

**EFEITOS ANTIRREUMÁTICOS DA ASSOCIAÇÃO DE  
TRATAMENTO ORAL E TRANSDÉRMICO COM ÓLEO  
ESSENCIAL DE COPAÍBA EM RATOS ARTRÍTICOS**

**JOÃO VITOR DE ARAUJO SILVA**

Maringá  
2024

**JOÃO VITOR DE ARAUJO SILVA**

**EFEITOS ANTIRREUMÁTICOS DA ASSOCIAÇÃO DE  
TRATAMENTO ORAL E TRANSDÉRMICO COM ÓLEO  
ESSENCIAL DE COPAÍBA EM RATOS ARTRÍTICOS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciência de Alimentos.

MARINGÁ

2024

**Orientador:**  
Jurandir Fernando Comar

**BIOGRAFIA:**

João Vitor de Araujo Silva, filho de Ana Cláudia de Araujo e Luiz Batista da Silva, nascido em Rosana-SP, criado em Santa Cruz de Monte Castelo-PR.

Graduado em Tecnologia em Alimentos pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Santa Catarina - IFSC - Detém experiência nas áreas de Ciência de Alimentos e Bioquímica Metabólica, atuando nos seguintes temas: Análises de alimentos, Análise de águas, e doenças inflamatórias.

Atua como representante discente e membro do conselho acadêmico do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, bem como membro da comissão de autoavaliação do mesmo programa.

**Dedicatória:**

Dedico esta dissertação à Rita, minha avó querida (*in memoriam*);  
á Ana, minha mãe, forte e batalhadora, que me inspirou a resistir;  
às minhas tias, Katia e Cassia, aos meus irmãos, Pedro e Rita, e demais  
familiares, que alimentaram a minha capacidade  
de escrever e sonhar.

**AGRADECIMENTOS:**

Agradeço à todos que contribuíram de maneira significativa para a realização deste, em âmbitos pessoais e profissionais.

À minha família, mãe, tias, tio, irmãos, sobrinho e primo;

Aos amigos especiais que me edificaram e acreditaram;

Aos que fizeram possível a realização deste trabalho, e contribuíram: Any, Jailson, Carla, Magna, Guilherme, Camila, Célia, Roberto, e demais amigos do LMH e LabInf;

Agradeço ao meu Orientador, prof. Dr. Jurandir Fernando Comar, pela parceria e compreensão.

Aos professores, AnaCharis Beбето e Livia Bracht, por estarem sempre atentas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, conselho acadêmico e todos os professores e secretária, representados pelo Prof. Dr. Oscar Oliveira, meu muito Obrigado.

À Universidade Estadual de Maringá, pela acolhida e concessão.

Este trabalho não poderia estar prestes a ser apresentado e defendido se não houvesse a participação especial de todos estes.

**MUITO OBRIGADO!**

## APRESENTAÇÃO

Esta dissertação de mestrado está apresentada na forma de UM artigo científico:

João Vitor de Araújo, Any Carolina Chagas-Almeida, Ana Paula Ames-Sibin, Francielli Maria de Souza Silva, Jurandir F. Comar.

Associação de tratamento oral e transdérmico com óleo de copaíba em ratos artríticos.

Revista de Saúde Pública (ISSN 1518-8787), **submetido.**

## **Efeitos antirreumáticos da associação de tratamento oral e transdérmico com óleo essencial de copaíba em ratos artríticos**

João Vitor de Araújo<sup>1</sup>, Any Carolina Chagas-Almeida<sup>1</sup>, Ana Paula Ames-Sibin<sup>1</sup>,  
Francielli Maria de Souza Silva<sup>2</sup>, Jurandir F. Comar<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá, PR, Brasil

<sup>2</sup> Departamento de Farmacologia e Terapêutica, Universidade Estadual de Maringá, PR, Brasil

Endereço para correspondência:

\* Jurandir Fernando Comar

Departamento de Bioquímica

Universidade Estadual de Maringá

87020900 Maringá, PR, Brasil

Email: [jfcomar@uem.br](mailto:jfcomar@uem.br)

## RESUMO

**Introdução e objetivos:** O bálsamo de copaíba administrado por via oral reduz a inflamação de ratos artríticos, mas causa danos hepáticos. A destilação do bálsamo gera o óleo essencial de copaíba (OEC), consistindo de sesquiterpenos, principalmente  $\beta$ -cariofileno. O OEC carregado em um sistema autoemulsionante de liberação de drogas formado por Cremophor e linoleato de etila (FSNEDDS) tem efeito antirreumático sobre ratos artríticos, mas apenas parcialmente e na dose de 100 mg/kg. Porém, sem causar dano hepático. Seria possível aumentar a efetividade do FSNEEDS aumentando a dose, mas poderia causar dano hepático, pois o óleo absorvido no intestino é enviado ao fígado pelo sistema portal. Uma solução seria administrar a FSNEDDS por uma via que direciona o OEC para a circulação sistêmica, como a via transdérmica. Portanto, este estudo avaliou os efeitos da associação de tratamento oral e por via transdérmica do OEC formulado em SNEDDS (FSNEDDS) sobre a inflamação e estresse oxidativo sistêmicos de ratos com artrite induzida por adjuvante.

**Métodos:** Animais artríticos receberam salina (A), FSNEDDS 100 mg/kg oral (AS100), FSNEDDS 200 mg/kg transdérmico (AT200), e FSNEDDS oral e transdérmico cada um nas doses de 100 mg (ASOT100) e 200 mg (ASOT200). Ratos controles receberam salina (C) ou FSNEDDS 200 mg/kg oral mais transdérmico (CSOT200). O tratamento foi realizado durante 18 dias.

**Resultados:** O FSNEDDS 100 mg/kg via oral (AS100) teve efeito parcial sobre a inflamação, mas não sobre o estresse oxidativo de ratos artríticos. O ASOT200 diminuiu o edema das patas, escore artrítico, atividade da MPO, número de leucócitos circulantes e nas articulações. Estes efeitos foram comparáveis ao AS100, mas o edema na pata injetada foi menor do que AS100 e ASOT100. O ASOT200 foi também o único que diminuiu o estresse oxidativo sistêmico. O AT200 não mostrou efeitos antiartrítico e antioxidante evidentes, exceto por uma leve redução no edema da pata injetada e escore artrítico. Nenhum tratamento aumentou os marcadores de dano hepático.

**Conclusão:** A associação de FSNEDDS via oral associado com via transdérmica não promove aumentos consideráveis na efetividade do FSNEDDS apenas por via oral. Entretanto, o aumento da dose de FSNEDDS oral de 100 mg/kg para 200 mg/kg mostra uma possível melhora no seu efeito antioxidante e antiartrítico, porém, sem apresentar evidências de hepatotoxicidade.

**Palavras-chave:** Óleo essencial de copaíba; SNEDDS; hepatotoxicidade; artrite reumatoide; artrite induzida por adjuvante.

## ABSTRACT

**Introduction:** Oral administration of copaiba balsam reduces inflammation in arthritic rats but causes liver damage. Distillation of the balsam produces copaiba essential oil (CEO), consisting of sesquiterpenes, mainly  $\beta$ -caryophyllene. CEO carried in a self-emulsifying drug delivery system formed by Cremophor and ethyl linoleate (FSNEDDS) has an antirheumatic effect on arthritic rats, but only partially at a dose of 100 mg/kg, without causing liver damage. Increasing the effectiveness of FSNEDDS by increasing the dose could cause liver damage, as the absorbed oil in the intestine is sent to the liver via the portal system. A solution could be to administer FSNEDDS by a via that directs the CEO to the systemic circulation, such as the transdermal via. Therefore, this study evaluated the effects of the association of oral and transdermal administration of CEO formulated in SNEDDS (FSNEDDS) on inflammation and oxidative stress in rats with adjuvant-induced arthritis.

**Methods:** Arthritic animals received saline (A), FSNEDDS 100 mg/kg orally (AS100), FSNEDDS 200 mg/kg transdermally (AT200), and FSNEDDS orally and transdermally each at doses of 100 mg (ASOT100) and 200 mg (ASOT200). Control rats received saline (C) or FSNEDDS 200 mg/kg orally plus transdermally (CSOT200). The treatment was carried out for 18 days.

**Results:** FSNEDDS 100 mg/kg orally (AS100) had a partial effect on inflammation but not on oxidative stress in arthritic rats. ASOT200 decreased paw edema, arthritis score, MPO activity, and the number of circulating and joint leukocytes. These effects were comparable to AS100, but paw edema in the injected paw was lower than in AS100 and ASOT100. ASOT200 was also the only one that decreased systemic oxidative stress. AT200 did not show evident anti-arthritic and antioxidant effects, except for a slight reduction in paw edema and arthritis score. No treatment increased liver damage markers.

**Conclusion:** The association of FSNEDDS orally and transdermally does not considerably increase the effectiveness of FSNEDDS orally alone. However, increasing the oral dose of FSNEDDS from 100 mg/kg to 200 mg/kg shows a possible improvement in its antioxidant and anti-arthritic effects without showing evidence of hepatotoxicity.

**Keywords:** Copaiba essential oil; SNEDDS; hepatotoxicity; rheumatoid arthritis; adjuvant-induced arthritis.

## 1. INTRODUÇÃO

Artrite reumatoide é uma doença autoimune crônica e sistêmica que afeta primariamente as articulações. Sua fisiopatologia envolve a hiperplasia do tecido articular com a participação de mediadores inflamatórios e espécies reativas [Gui et al., 2015]. O estresse oxidativo está aumentado tanto no tecido articular quanto sistemicamente, com manifestações da doença afetando vários órgãos, como cérebro, pulmões e fígado [McInnes & Schett, 2011; Misko et al., 2013]. Alterações metabólicas também são comuns, incluindo a condição de perda muscular conhecida como caquexia reumatoide [Roubenoff, 2009]. A artrite reumatoide é incurável e o tratamento foca na remissão dos sintomas e prevenção de recidivas. Uma combinação de drogas, com medicamentos fitoterápicos associados aos tradicionais tem sido utilizado no tratamento da artrite [McInnes & Schett, 2017; DeSalvo et al., 2019].

O óleo ou bálsamo de copaíba é um óleo-resina extraído do tronco de árvores do gênero *Copaifera*, nativas de regiões tropicais da América do Sul. Este bálsamo consiste em uma mistura de diterpenos e sesquiterpenos [Medeiros et al., 2019]. O componente principal do bálsamo é o  $\beta$ -cariofileno, um sesquiterpeno, que é responsável pela sua atividade anti-inflamatória. O óleo de copaíba é muito utilizado na medicina popular, principalmente para tratar dores e inflamação [Urasaki et al., 2020a; Hebert et al., 2017]. O óleo de copaíba tem sido utilizado no tratamento de doenças reumáticas, mas apenas por aplicação tópica nas articulações [Urasaki et al., 2020a; Hebert et al., 2017]. No entanto, o baixo custo e a ampla aceitação popular do bálsamo tem levado ao seu uso oral, embora em doses abaixo das eficazes devido a manifestações gástricas adversas [Medeiros et al., 2019].

A eficácia antirreumática do óleo de copaíba administrado por via oral foi avaliada em ratos com artrite induzida por adjuvante [Castro-Ghizoni et al., 2017]. O óleo de copaíba (*C. reticulata* Ducke) reduziu o estresse oxidativo sistêmico e a inflamação em ratos artríticos. No entanto, o bálsamo suprimiu a gliconeogênese hepática e alterou a morfometria dos hepatócitos em ratos saudáveis, efeitos ligados à danos hepáticos [Castro-Ghizoni et al., 2017]. Esse efeito adverso está associado com os diterpenos do óleo e possivelmente pela alta dose de um bálsamo lipofílico (500 mg/Kg) [Cardinelli et al., 2023; Castro-Ghizoni et al., 2017; Emerenciano et al., 2019; Xavier-Junior et al., 2016]. Por

outro lado, o  $\beta$ -cariofileno causa os mesmos efeitos antirreumáticos do óleo em ratos artríticos, mas sem causar danos hepáticos [Ames-Sibin et al., 2018]. Portanto, a remoção dos diterpenos do bálsamo potencialmente preserva seu efeito antiartrítico enquanto elimina uma ação tóxica. Os diterpenos (fração resinosa) são separados dos sesquiterpenos voláteis por destilação [Deus et al., 2011; Soares et al., 2013]. Este procedimento produz óleo essencial de copaíba (OEC) concentrado em  $\beta$ -cariofileno, mas sem comprometer os efeitos sinérgicos previamente relatados para os diferentes sesquiterpenos [Urasaki et al., 2020a; Wagner & Ulrich-Merzenich, 2009; Ferreira et al., 2017].

O OEC tem sido usado para uma variedade de condições inflamatórias, mas na forma tópica [Urasaki et al., 2020b; Bahr et al., 2018; Trindade et al., 2018]. No entanto, a sua natureza lipofílica e volátil dificulta sua estabilidade de estocagem e a interação com o ambiente gastrointestinal [Ames-Sibin et al., 2024]. Este último fator diminui a biodisponibilidade quando administrado por via oral. Neste sentido, estratégias têm sido estudadas para superar estas dificuldades, como a formulação do OEC em sistemas autoemulsionantes nanoestruturados de liberação de drogas (SNEDDS) [Ames-Sibin et al., 2024a]. Os SNEDDS são misturas isotrópicas de óleos e surfactantes que formam emulsões em ambientes aquosos com agitação suave, assemelhando-se às condições encontradas no trato gastrointestinal [Yao et al., 2020]. De fato, um SNEDDS preparado com Cremophor (surfactante), linoleato de etila (óleo transportador) e OEC melhorou significativamente a solubilidade aquosa e a estabilidade do óleo essencial [Ames-Sibin et al., 2024a]. Quando emulsificado em meio aquoso o OEC formou pequenas micelas com bioacessibilidade superior a 60% na fase intestinal de digestão simulada [Ames-Sibin et al., 2024a].

Esta formulação contendo OEC em SNEDDS (FSNEDDS) foi investigada para sua atividade antirreumática em ratos com artrite induzida por adjuvante e mostrou resultados satisfatórios, a saber apresentou uma biodisponibilidade oral para o OEC quatro vezes maior se comparado com o mesmo não formulado [Ames-Sibin et al., 2024b]. Esse fenômeno permitiu que o FSNEDDS 100 mg/kg (em termos de  $\beta$ -cariofileno) reduzisse a inflamação articular e sistêmica e o estresse oxidativo em ratos artríticos em uma dose quatro vezes menor do que aquela relatada para o óleo de copaíba e o  $\beta$ -cariofileno. Além disso, o FSNEDDS não alterou os marcadores séricos de dano hepático, a morfometria hepática e a gliconeogênese hepática em ratos saudáveis, isto é, apresentou um risco

reduzido de hepatotoxicidade. Por outro lado, a efetividade antirreumática esperada para a FSNEEDS na maior dose testada (100 mg/kg) foi ainda baixa. Isto porque o edema da pata injetada foi reduzido em apenas 20% e a aumentada atividade da mieloperoxidase (MPO) no plasma e no fígado foi reduzida apenas pela metade. O surgimento e a evolução das lesões secundárias à artrite foi até atrasado nos ratos artríticos que receberam FSNEEDS 100 mg/kg, mas não foi diferente dos ratos não tratados aos 18 dias após a indução. Uma forma de aumentar a efetividade do FSNEEDS seria aumentar a dose administrada. Entretanto, a administração oral de doses maiores poder causar dano hepático, pois o óleo absorvido no intestino é direcionado para o fígado pelo sistema portal hepático [Castro-Ghizoni et al., 2017]. Uma alternativa seria administrar a FSNEEDS por uma via que direciona o OEC para a circulação sistêmica, como por exemplo, a via transdérmica. Esta via é muito pouco invasiva e deveria permitir uma absorção considerável através da derme de compostos lipofílicos administrados em formulações autoemulsionantes.

Levando em consideração o que foi acima exposto, o presente estudo investigou os efeitos da associação do tratamento por via oral e por via transdérmica do OEC, formulado em SNEDDS (FSNEEDS), sobre a inflamação articular e sistêmica, a função hepática e o estresse oxidativo sistêmico de ratos com artrite induzida por adjuvante. Este último serve como um modelo de artrite reumatoide em ratos e é caracterizado por uma resposta inflamatória generalizada, facilitando assim a avaliação da patogênese tanto localmente nas articulações quanto sistemicamente, incluindo possíveis efeitos hepatotóxicos [Stolina et al., 2009; Bendele et al., 1999].

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Reagentes

O óleo de copaíba extraído do gênero *Copaifera langsdorffii* foi fornecido pela Apis Flora Industria e Comercio Ltda. (Ribeirão Preto, SP, Brasil). Linoleato de etila (CAS No.: 544-35-4) e Cremophor® EL (CAS No.: 61791-12-6) foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Kits para determinar a atividade de ALT, AST e fosfatase alcalina no plasma foram adquiridos da Gold Analisa Diagnóstica Ltda (Belo Horizonte, MG, Brasil). Todos os outros produtos reagentes foram de grau analítico.

### 2.2. Preparação de SNEDDS contendo OEC (FSNEDDS)

O OEC foi obtido a partir do bálsamo de copaíba por hidrodestilação (modelo Clevenger TE-2761; Tecnal®) e o FSNEDDS preparado com Cremophor (surfactante), linoleato de etila (óleo carreador) e OEC conforme já descrito [Ames-Sibin et al., 2024a]. Para administração transdérmica, foi adicionado 1.5 g de água deionizada e 1 g ácido hialurônico à 1g de FSNEDDS, formando um gel (FSNEDDS-H). A tecnologia foi registrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) no Brasil (protocolo ADED6FB).

A composição do OEC foi determinada em estudo prévio [Ames-Sibin et al., 2024<sup>a</sup>] e os compostos encontrados foram:  $\beta$ -cariofileno (51,8%),  $\alpha$ -humuleno (9,76%),  $\alpha$ -copaeno (8,34%),  $\alpha$ -bergamoteno (3,9%), germacreno D (2,8%),  $\beta$ -elemeno (2,78%),  $\delta$ -elemeno (1,94%), muruuleno (1,86%),  $\delta$ -cadineno (1,65%),  $\beta$ -bisaboleno (1,38%),  $\gamma$ -elemeno (1,01%), óxido de cariofileno (1,34%) e outras 18 substâncias diferentes representando menos de 1% cada. O OEC é composto basicamente por sesquiterpenos (mais de 97%).

### 2.2. Animais e indução da artrite

Ratos machos da linhagem Holtzman pesando cerca de 190-210g (50 dias de idade) foram adquiridos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá (UEM) e mantidos em condições padrões de laboratório com um ciclo controlado de 12 horas de luz/escuro. Os animais tiveram acesso *ad libitum* a

água e dieta padrão (Nuvilab<sup>®</sup>, Colombo, Brasil). Para induzir artrite, os animais receberam uma injeção subcutânea de 0,1 mL (500 µg) de adjuvante completo de Freund (composto por *Mycobacterium tuberculosis* inativado pelo calor, derivado da cepa humana H37Ra) suspenso em óleo mineral, administrado na pata traseira esquerda [Bendele et al., 1999]. Ratos saudáveis de idades similares serviram como controle. Todos os procedimentos seguiram as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da UEM (Número do protocolo: 6943280920).

#### 2.4. Delineamento experimental

Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em sete grupos, com sete ratos por grupo (n = 7): controles (C), ratos saudáveis tratados com salina; CSOT200, ratos saudáveis tratados com FSNEDDS na dose de 200 mg/mL via oral (em termos de concentração de β-cariofileno) + 200 mg/kg transdérmica; A, ratos artríticos tratados com salina; AS100, ratos artríticos tratados com FSNEDDS na dose de 100 mg/kg por via oral; ASOT100, ratos artríticos tratados com FSNEDDS na dose de 100 mg/kg por via oral + 100 mg/kg transdérmica; ASOT200, ratos artríticos tratados com FSNEDDS na dose de 200 mg/kg por via oral + 200 mg/kg transdérmica; AT200, ratos artríticos tratados com FSNEDDS na dose de 200 mg/kg por via transdérmica. Os ratos receberam administração oral (gavage) uma vez ao dia pela manhã durante 5 dias antes da indução da artrite, e continuaram esse regime por adicionais 18 dias. A administração transdérmica foi também realizada diariamente pela manhã. Para isso, a região abdominal dos animais foram depiladas e a FSNEDDS-H foi colocada sobre a pele abdominal, espalhada e massageada para facilitar a absorção. As doses administradas por via oral foram baseadas em estudo anterior [Ames-Sibin et al., 2024b] e calculadas para corresponder a 2 e 4 vezes menor que a dose de bálsamo de copaíba [Castro-Ghizoni et al., 2017]. Um protocolo combinado de tratamento preventivo e curativo foi empregado devido à natureza intermitente da artrite reumatoide, bem como à ocorrência de autoimunidade que precede o início da fase inflamatória no processo da doença.

## 2.5. Avaliação da resposta inflamatória

Os animais foram pesados e avaliados quanto à resposta ao adjuvante durante um período de 18 dias. Após a administração do adjuvante, o volume de ambas as patas traseiras até a articulação tibiotarsal foi medido utilizando pletismografia. Os resultados foram expressos como o incremento do volume da pata em relação ao volume inicial (volume no dia 0). As lesões secundárias à artrite foram avaliadas entre o 10<sup>o</sup> e o 18<sup>o</sup> dia utilizando uma pontuação que varia de 0 a 5: (+1) nódulos na cauda; (+1 ou +2) nódulos em uma ou ambas as orelhas; e (+1 ou +2) inchaço em um ou ambos os membros anteriores [Sá-Nakanishi et al., 2018]. Amostras de sangue foram coletadas por incisão na cauda para obter tanto a contagem total quanto a diferencial de leucócitos circulantes [Moreira et al., 2021]. No 18<sup>o</sup> dia, contagens totais e diferenciais de leucócitos no espaço articular femorotibial foram avaliadas nos animais eutanasiados.

## 2.6. Coleta e preparação dos tecidos

Ratos em jejum de 12 h foram anestesiados (i.p.) com cetamina (100 mg/kg) mais xilazina (10 mg/kg). O espaço peritoneal foi exposto, o sangue foi coletado da veia cava e colocado em tubos contendo heparina sódica (100 UI/mL). Posteriormente, o fígado foi removido, imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado à -80 °C para avaliações do estado oxidativo e atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). Em seguida, as articulações femorotibiais traseiras foram expostas e as cavidades articulares lavadas com 40 µL de solução salina tamponada com fosfato (PBS). Os exsudatos obtidos foram utilizados para a quantificação de leucócitos [Moreira et al., 2021].

O sangue foi centrifugado a 3.000g/10 min e o plasma separado. Para preparar o homogeneizado do fígado, o tecido congelado foi homogeneizado em Potter-Elvehjem em 10 volumes de tampão fosfato de potássio a 0,1 M (pH 7,4). Uma parte foi separada (homogeneizado total) e o restante centrifugado a 11.000g/15 min. O sobrenadante foi separado para ensaios enzimáticos.

## 2.7. Análises no plasma

Os níveis de proteínas carboniladas foram determinados por espectrofotometria (370 nm) e os valores calculados usando o coeficiente de

extinção molar ( $\epsilon$ ) de  $2,20 \times 10^4/(M \times cm)$  [Levine et al., 1990]. Os níveis de tióis totais foram determinados por espectrofotometria a 412 nm utilizando DTNB (ácido 5,5'-ditiobis 2-nitrobenzóico) [Faure & Lafond, 1995]. A atividade da mieloperoxidase (MPO) foi determinada pelo aumento da absorbância a 460 nm devido à oxidação de o-dianisidina. A atividade de MPO foi determinada utilizando o coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) de  $11,3 \times 10^3/(M \times cm)$  [Bradley et al., 1982]. A atividade enzimática de AST, ALT e ALP, foram determinadas usando kits de ensaio comerciais.

## 2.8. Estresse oxidativo no fígado

O conteúdo de proteínas carboniladas determinado da mesma forma que no plasma. Os níveis hepáticos de lipoperóxidos foram determinados pela quantificados pelo método do TBARS [Comar et al., 2013]. A atividade da catalase foi determinada monitorando a queda na absorbância a 240 nm utilizando  $H_2O_2$  como substrato, e os resultados foram expressos em  $mmol/(min \times mg \text{ de proteína})$  [Bergmeyer, 1974]. A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi avaliada com base na sua capacidade de inibir a autooxidação do pirogalol em meio alcalino, medida por espectrofotometria em 420 nm [Marklund & Marklund, 1974]. Uma unidade (U) de SOD representa a quantidade de enzima necessária para causar uma inibição de 50%, e os resultados foram expressos em  $U/(mg \text{ de proteína})$ . A atividade da MPO foi determinada empregando um procedimento idêntico ao descrito para o plasma [Bradley et al., 1982].

## 2.9. Análise estatística

Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism (versão 8.0). Para conjuntos de dados contendo três ou mais valores, a significância estatística foi avaliada usando ANOVA ONE-WAY, seguida pelo teste post hoc de Newman-Keuls, com um nível de significância definido em 5% ( $p < 0,05$ ). Para a comparação de dois valores, foi aplicado o teste t de Student com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Efeitos antiartríticos da FSNEEDDS e FSNEEDDS-H

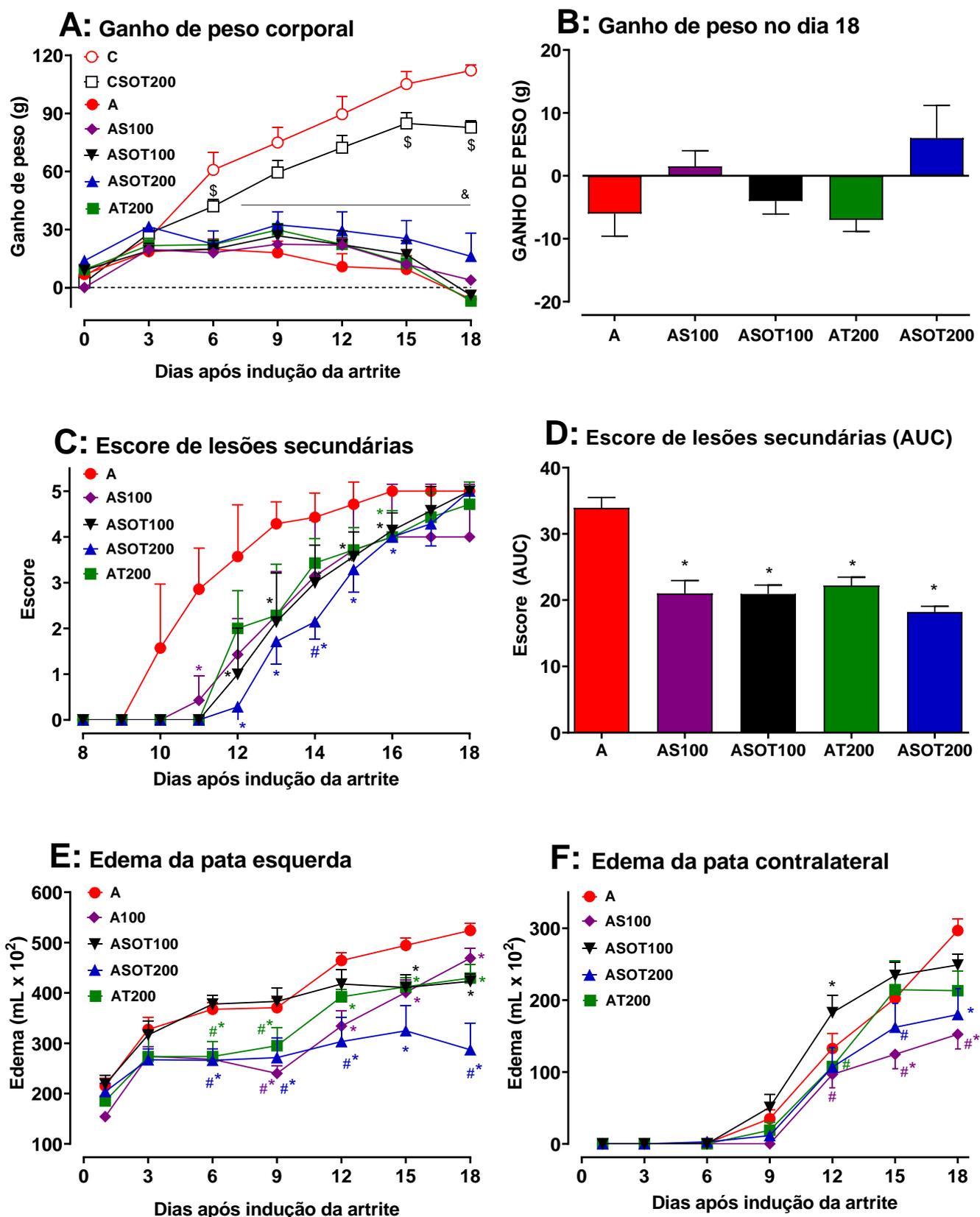
A Fig. 1 mostra os efeitos do FSNEEDDS e FSNEEDDS-H sobre o ganho de peso corporal, edema das patas e escore de artrite. Esses parâmetros foram monitorados por 18 dias após a indução da artrite. Ratos saudáveis não tratados (C) e tratados com FSNEEDDS via oral e via transdérmica na dose de 200 mg/kg (CSOT200) exibiram ganho de peso corporal progressivo durante esse período, entretanto esse ganho de peso foi menor para o grupo CSOT200 (Fig. 1A). O peso corporal do grupo C e CSOT200 aumentou 48% e 36%, respectivamente, no dia 18 em comparação com o dia 0. Tanto os ratos artríticos tratados quanto os não tratados não exibiram ganho de peso durante o período mencionado. Dependendo do grupo, alguns até perderam peso em comparação com o peso inicial no dia zero. A Fig. 1B ilustra o ganho de peso corporal especificamente de ratos artríticos no dia 18 em relação ao dia zero. Ratos artríticos tratados com 100 mg/Kg de FSNEEDDS via oral (AS100) e o ASOT200 mostraram até uma menor diminuição no peso corporal em comparação com os ratos artríticos (A) que não receberam tratamento, mas sem diferença estatística.

As lesões secundárias decorrentes da artrite apareceram no dia 10 e atingiram o pico de gravidade no dia 18, sem valores diferentes observados entre todos os grupos (Fig. 1C). No entanto, todos os grupos de ratos artríticos tratados tiveram menor escores entre os dias 10 e 15. De fato, as curvas dos escores parecem ter inclinações menores nos ratos artríticos tratados. Para melhor comparar, a AUC das curvas mostradas na Fig. 1C foi calculada, com os valores expressos como a soma de todos os escores do dia 10 ao dia 18. Esses valores são representados na Fig. 1D. Todos os grupos de ratos artríticos tratados (AT200, AS100, ASOT100 e AST200) exibiram valores de AUC menores em comparação com o grupo de ratos artríticos não tratados (A).

A evolução do edema na patas traseira injetada e contralateral está mostrada na Fig. 1E e F. A resposta inflamatória na pata injetada foram observadas no primeiro dia, sem diferença entre os grupos (Fig. 1E). No dia 18, o volume da pata injetada dos ratos não tratados (A) foi 400% maior do que no dia zero. O tratamento de ratos artríticos dos grupos AT200, AS100 e ASOT200 diminuiu o edema na pata injetada a partir do dia 6 e diminuiu no dia 18 este edema para todos os grupos tratados. Para propósitos de comparação, o valor

do edema da pata injetada no dia 18 para todos os grupos foi repetido na primeira linha da [Tabela 1](#). O tratamento com FSNEEDDS-H transdérmico 200 mg/kg (AT200), com FSNEEDDS oral 100 mg/kg (AS100) e FSNEEDDS oral mais FSNEEDDS-H transdérmico 100 mg/kg cada (ASOT100) diminuiu o edema da pata injetada em aproximadamente 15% no dia 18, enquanto o tratamento com FSNEEDDS oral mais FSNEEDDS-H transdérmico 200 mg/kg cada (ASOT200) diminuiu o edema da pata injetada em aproximadamente 45% neste mesmo dia. As reações inflamatórias na pata contralateral começaram no dia 10, e o volume dos ratos artríticos não tratados foi 176% maior no dia 18 quando comparado ao dia zero ([Fig. 1F](#)). Apenas a administração de FSNEEDDS oral na dose de 100 mg/kg (AS100) e FSNEEDDS oral mais FSNEEDDS-H transdérmico na dose de 200 mg/kg cada (ASOT200) diminuiu o edema da pata injetada em aproximadamente 45% no dia 18 (segunda linha da [Tabela 1](#)).

O peso do fígado de ratos artríticos foi 56% maior em comparação com os controles ([Tabela 1](#)). Todos os grupos tratados (AT200, AS100, ASOT100 e ASOT200) não tiveram este parâmetro alterado. O peso dos linfonodos poplíteos e inguinais (peso combinado dos órgãos direito e esquerdo) foi bastante elevado em ratos artríticos se comparado aos controles. Nenhum tratamento alterou o peso destes órgãos em ratos artríticos. A enzima MPO é expressa mais abundantemente nos peroxissomos dos neutrófilos e sua atividade é usada como marcador do estado inflamatório de um tecido. A [Tabela 1](#) apresenta os valores de atividade da MPO no fígado e no plasma. A atividade desta enzima foi 127% maior no fígado e 600% maior no plasma de ratos artríticos (A) em comparação com os controles (C). Em ratos artríticos, a atividade da MPO no fígado foi reduzida em 35% pelo tratamento com FSNEEDDS oral mais FSNEEDDS-H transdérmico 100 mg/kg cada (ASOT100) e completamente reduzida para os níveis controles com o tratamento utilizando FSNEEDDS oral 100 mg/kg (AS100) e FSNEEDDS oral mais FSNEEDDS-H transdérmico 200 mg/kg (ASOT200). Em relação à MPO plasmática, o tratamento com FSNEEDDS-H transdérmico na dose de 200 mg/kg não modificou este parâmetro, mas o tratamento com FSNEEDDS 100 mg/kg oral (AS100), FSNEEDDS oral mais FSNEEDDS-H transdérmico 100 mg/kg (ASOT100) e FSNEEDDS oral mais FSNEEDDS-H transdérmico 200 mg/kg (ASOT200) reduziram este parâmetro em aproximadamente 41%.



**Fig. 1.** Efeitos do FSNEDDS e FSNEDDS-H sobre o ganho de peso corporal, as lesões secundárias à artrite e o edema de pata de ratos artríticos. **A:** Evolução do ganho de peso corporal. O peso corporal inicial foi de  $229 \pm 6$  g. **B:** ganho de peso corporal dos ratos artríticos no dia 18. **C** e **D:** evolução do escore de

lesões secundárias e área sob a curva (AUC) dos escores no Painel C, respectivamente. **E** e **F**: evolução do edema ( $\Delta vol$ ) das patas traseiras esquerda (injetada) e direita (contralateral), respectivamente. O volume inicial da pata foi de  $1,68 \pm 0,04$  mL. C e A, ratos controles artríticos não tratados; CSOT, controle tratado com FSNEEDDS via oral na dose de 200 mg/Kg + transdémica 200 mg/kg; AS100, ratos artríticos tratados com FSNEEDDS via oral na dose de 100 mg/kg; ASOT100 e ASOT200, respectivamente, ratos artríticos tratados com FSNEEDDS via oral e FSNEEDDS-H via transdémica nas doses de 100 e 200 mg/g; AT200, ratos artríticos tratados por via transdémica com FSNEEDDS-H na dose de 200 mg/kg. Os dados são a média  $\pm$  SEM de 5-7 animais. \* $p < 0,05$ : diferente de A; # $p < 0,05$ : para diferença entre ASOT200 e ASOT100; \$ $p < 0,05$ : para diferença entre C e CSOT200; & $p < 0,05$ : diferente de CSOT200.

A [Tabela 1](#) também apresenta as contagens do número de leucócitos no sangue e aqueles recrutados para o espaço articular das juntas femorotibiais traseiras esquerda e direita. Em ratos artríticos não tratados (A), a contagem total de leucócitos no sangue foi quatro vezes maior no dia 18 do que no dia zero, com os leucócitos polimorfonucleares sendo predominantes. O tratamento de ratos artríticos com FSNEEDDS oral na dose de 100 mg/kg (AS100) e FSNEEDDS oral mais FSNEEDDS-H transdémico na dose de 200 mg/kg (ASOT200) reduziu este parâmetro em aproximadamente 33%, enquanto que AT200 e ASOT100 não apresentaram reduções para este parâmetro quando comparados com ratos artríticos não tratados (A). O número total de leucócitos recrutados para o espaço articular femorotibial da pata injetada não diferiu do número recrutado para o espaço articular femorotibial da pata contralateral. O tratamento de ratos artríticos com FSNEEDDS oral na dose de 100 mg/kg (AS100) e FSNEEDDS oral mais FSNEEDDS-H transdémico na dose de 200 mg/kg cada (ASOT200) reduziu o número de leucócitos na cavidade articular da junta femorotibial injetada em aproximadamente 50%, enquanto que estes valores não foram diminuídos para os grupos AT200 e ASOT100. Similarmente, apenas o tratamento de ratos artríticos com FSNEEDDS oral na dose de 100 mg/kg (AS100) e FSNEEDDS oral mais FSNEEDDS-H transdémico na dose de 200 mg/kg cada (ASOT200) reduziu o número de leucócitos na articulação contralateral (aproximadamente 62%; [Tabela 1](#)).

**Tabela 1:** Parâmetros inflamatórios e pesos dos órgãos. O volume inicial da pata foi de  $1,68 \pm 0,04$  ml; Edema ( $\Delta$ volume) das patas injetadas e contralateral = volume no dia 18 - volume inicial, expresso em mL. Pesos do fígado e dos linfonodos estão expressos respectivamente em g e mg/(100 g de peso corporal). C e A, ratos controles e artríticos não tratados; CSOT, ratos controles tratados com FSNEEDDS 200 mg/kg via oral e transdérmica; AS100, ratos artríticos tratados com FSNEEDDS 100 mg/kg via oral; ASOT100 e ASOT200, respectivamente, ratos artríticos tratados com FSNEEDDS via oral e FSNEEDDS-H via transdérmica nas doses de 100 e 200 mg/g; AT200, artríticos tratados por via transdérmica com FSNEEDDS-H na dose de 200 mg/kg. Os dados são a média  $\pm$  SEM de 6-7 animais.  $p < 0,05$ : letras iguais sobrescritas para valores que não diferem.

Parâmetro	Grupos					
	C	A	AT200	AS100	ASOT100	ASOT200
Edema da pata injetada	---	$5,24 \pm 0,14^a$	$4,29 \pm 0,26^b$	$4,69 \pm 0,20^b$	$4,23 \pm 0,14^b$	$2,87 \pm 0,52^c$
Edema da pata contralateral	---	$2,96 \pm 0,16^a$	$2,10 \pm 0,26^{a,b}$	$1,52 \pm 0,20^c$	$2,40 \pm 0,14^{a,b}$	$1,79 \pm 0,35^{b,c}$
Peso do fígado	$2,80 \pm 0,10^a$	$4,36 \pm 0,22^b$	$4,54 \pm 0,22^b$	$3,96 \pm 0,30^b$	$4,26 \pm 0,23^b$	$3,98 \pm 0,10^a$
Linfonodos poplíteos	$8,9 \pm 1,3^a$	$78 \pm 10^b$	$74 \pm 18^b$	$50 \pm 6^b$	$88 \pm 10^b$	$65 \pm 7^b$
Linfonodos inguinais	$15 \pm 1^a$	$80 \pm 15^b$	$67 \pm 15^b$	$65 \pm 11^b$	$55 \pm 15^b$	$53 \pm 8^b$
MPO hepática	$11,3 \pm 2,1^a$	$25,7 \pm 1,2^b$	$24,9 \pm 1,2^b$	$13,0 \pm 1,5^a$	$18,0 \pm 1,8^c$	$12,9 \pm 0,9^{a,c}$
MPO plasmática	$3,7 \pm 0,1^a$	$27,8 \pm 1,0^b$	$26,1 \pm 1,0^b$	$15,6 \pm 0,9^c$	$17,0 \pm 3,9^c$	$16,0 \pm 1,0^c$
	Inicial (dia 0)	Leucócitos no sangue (dia 18)				
Leucócitos totais ( $\times 10^3$ )/mm <sup>3</sup>	$13,6 \pm 0,4^a$	$61,1 \pm 1,9^b$	$58,7 \pm 5^b$	$40,9 \pm 4,2^c$	$51,4 \pm 6,0^{b,c}$	$40,8 \pm 3,4^c$
PMN (%)	$20 \pm 2^a$	$63 \pm 3^b$	$67 \pm 2^b$	$51 \pm 3^c$	$49 \pm 2^c$	$57 \pm 3^c$
		Leucócitos articulares (articulação da pata injetada)				
Leucócitos totais ( $\times 10^4$ )/mm <sup>3</sup>	---	$21,6 \pm 2,5^a$	$18,4 \pm 2,2^a$	$9,9 \pm 2,9^b$	$14,6 \pm 1,4^{a,b}$	$11,0 \pm 2,0^b$
PMN (%)	---	$61 \pm 8^a$	$43 \pm 5^a$	$40 \pm 11^a$	$44 \pm 8^a$	$67 \pm 5^a$
		Leucócitos articulares (articulação da pata contralateral)				
Leucócitos totais ( $\times 10^4$ )/mm <sup>3</sup>	---	$19,3 \pm 2,1^a$	$16,0 \pm 1,0^a$	$6,1 \pm 2,8^b$	$12,3 \pm 1,3^{a,b}$	$7,0 \pm 2,1^b$
PMN (%)	---	$53 \pm 7^a$	$57 \pm 7^a$	$40 \pm 7^a$	$57 \pm 6^a$	$38 \pm 8^a$

### 3.2. Estresse oxidativo hepático

Os níveis de proteínas carboniladas e TBARS, dois marcadores pró-oxidativos, estão apresentados nas Fig. 2A e B, respectivamente. Os níveis de proteínas carboniladas foram 50% maiores no fígado de ratos artríticos (A) quanto comparados aos controles (C), porém não houve diferença nos níveis hepáticos de TBARS entre estes dois grupos. O tratamento do próprio controle com FSNEEDDS oral mais FSNEEDDS-H transdérmico 200 mg/kg cada (CSOT200) reduziu os níveis hepáticos de proteínas carboniladas em 27%, mas não modificou os níveis de TBARS. Nenhum dos tratamentos (AT200, AS100, ASOT100 e ASOT200) modificou os níveis de proteínas carboniladas no fígado de ratos artríticos. Já os níveis hepáticos de TBARS foram diminuídos em 28% no fígado de ratos artríticos tratados com FSNEEDDS oral mais FSNEEDDS-H transdérmico 200 mg/kg cada (ASOT200) quando comparados aos artríticos não tratados (A), mas não foram diminuídos no fígado de ratos artríticos tratados com FSNEEDDS oral mais FSNEEDDS-H transdérmico 100 mg/kg cada (ASOT100), FSNEEDDS oral 100 mg/kg (AS100) e FSNEEDDS-H transdérmico 200 mg/kg (AT200). A atividade das enzimas antioxidantes catalase e SOD foram reduzidas respectivamente em cerca de 50% e 30% no fígado de ratos artríticos não tratados (A) quando comparada aos controles (C) (Fig. 2C e D). Nenhum tratamento, tanto de ratos controles quanto de ratos artríticos, modificaram a atividade destas duas enzimas no fígado (Fig. 2C e D).

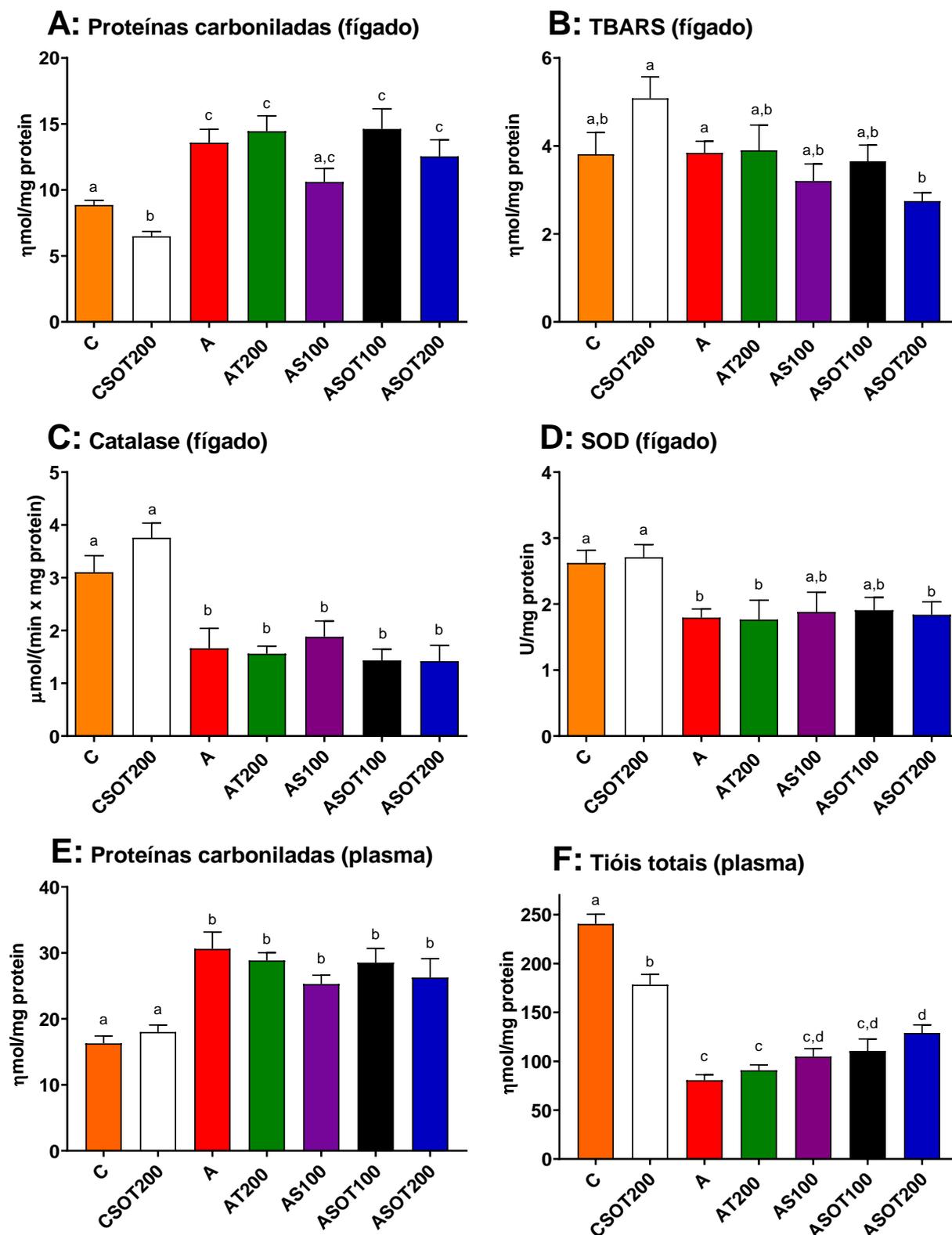
### 3.3. Estado oxidativo plasmático

Os níveis de proteínas carboniladas e grupos de tióis totais no plasma foram quantificados como marcadores pró e antioxidante, respectivamente. Os resultados estão apresentados nas Fig. 2E e F. Quando comparado aos controles não tratados (C), os níveis de proteínas carboniladas foram aumentadas em aproximadamente 95% e os níveis de tióis diminuídos em cerca de 66% no plasma de ratos artríticos não tratados (A). O tratamento dos ratos controles com FSNEEDDS oral mais FSNEEDDS-H transdérmico 200 mg/kg cada (CSOT200) reduziu os níveis plasmáticos de proteínas carboniladas em 26%, mas não modificou os níveis de proteínas carboniladas no plasma destes animais. Nenhum dos tratamentos (AT200, AS100, ASOT100 e ASOT200) modificou os níveis de proteínas carboniladas no plasma de ratos artríticos. Já os níveis

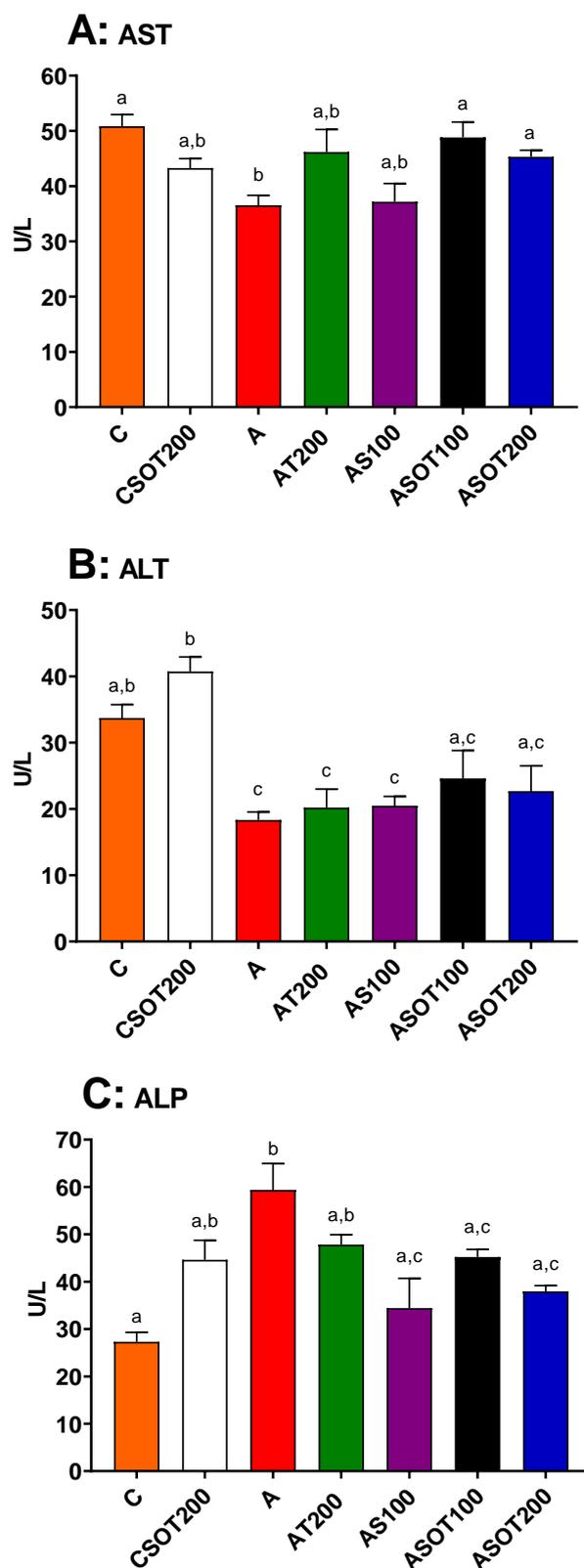
plasmáticos de tióis totais foram aumentados em 60% no plasma de ratos artríticos tratados, mas apenas com FSNEEDDS oral mais FSNEEDDS-H transdérmico 200 mg/kg cada (ASOT200).

#### 3.4. Marcadores plasmáticos de lesão hepática

As atividades das enzimas AST, ALT e ALP foram determinadas no plasma para avaliar possíveis danos hepáticos induzidos pelos tratamentos. Os resultados estão apresentados na [Fig. 3A-C](#). A indução da artrite causou uma redução na atividade da AST em 30% e da ALT em 45%, enquanto aumentou a atividade da ALP em 100%. O tratamento dos ratos controles com FSNEEDDS oral mais FSNEEDDS-H transdérmico 200 mg/kg (CSOT200) não modificou a atividade das três enzimas. O tratamento dos ratos artríticos com FSNEEDDS oral mais FSNEEDDS-H transdérmico 200 mg/kg e 100 mg/kg (ASOT200 e ASOT100) aumentaram a atividade da AST, mas não da ALT, para os níveis controle (C). O tratamento dos animais artríticos com FSNEEDDS oral na dose de 100 mg/kg (AS100) e FSNEEDDS oral mais FSNEEDDS-H transdérmico 200 mg/kg e 100 mg/kg (ASOT110 e ASOT200) diminuíram a atividade da ALP para valores comparados aos controles (C).



**Fig. 2.** Efeitos do FSNEDDS e FSNEDDS-H sobre estado oxidativo do fígado e plasma de ratos artríticos. **A:** Níveis hepáticos de proteínas carboniladas; **B:** níveis hepáticos de TBARS; **C** e **D:** Atividade das enzimas catalase e SOD no fígado; **E:** níveis plasmáticos de proteínas carboniladas. **F:** níveis plasmáticos de tióis totais. Os dados são a média  $\pm$  SEM de 5-7 animais. Letras sobrescritas diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).



**Fig. 3.** Efeitos do FSNEDDS e FSNEDDS-H sobre os marcadores plasmáticos de lesão hepática (atividade enzimática). **A:** AST (aspartato aminotransferase); **B:** ALT (alanina aminotransferase); **C:** ALP (fosfatase alcalina). **F:** níveis plasmáticos de tióis totais. Os dados são a média  $\pm$  SEM de 5-7 animais. Letras sobrescritas diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

## 4. DISCUSSÃO

O modelo experimental utilizado no presente estudo compartilha muitas características com artrite reumatoide avançada e não controlada em humanos [Stolina et al., 2009; Hegen et al., 2008]. Na artrite induzida por adjuvante, os animais desenvolvem uma resposta pronunciada ao adjuvante nas patas, resultando em poliartrite, e leva à caquexia e manifestações inflamatórias sistêmicas [Stolina et al., 2009]. No presente estudo, essas manifestações inflamatórias foram indicadas por atividade elevada de MPO no plasma e no fígado, edema nas patas, lesões secundárias à artríticas, aumento do peso dos linfonodos e aumento da contagem de leucócitos no sangue e recrutados nos espaços articulares femorotibiais. Além disso, o aumento do estresse oxidativo hepático dos ratos artríticos estão alinhados com achados anteriores [Sá-nakanishi et al., 2014; Castro-Ghizoni et al., 2017; Simões et al., 2022]. A este respeito, foi observado um aumento nos níveis de proteínas carboniladas no plasma e fígado, redução dos grupos tióis no plasma e da atividade das enzimas catalase e SOD no fígado.

O presente estudo teve como objetivo verificar se a administração transdérmica do óleo essencial de copaíba (OEC) veiculado em um SNEDDS (FSNEDDS) melhora os efeitos antiartríticos do mesmo administrado por via oral. O FSNEDDS foi elaborado utilizando Cremophor como surfactante e linoleato de etila como carreador lipídico do OEC. Para a formulação transdérmica, o FSNEDDS foi modificado pela inclusão de ácido hialurônico (FSNEDDS-H). Além disso, o estudo buscou explorar possíveis associações entre esses efeitos e a hepatotoxicidade, já que essa manifestação foi anteriormente associada ao bálsamo de copaíba [Castro-Ghizoni et al., 2017]. Duas frações podem ser obtidas do bálsamo de copaíba por destilação: uma resinosa, muito rica em diterpenos, e uma fração volátil formada quase completamente por sesquiterpenos. A fração volátil também é conhecida como óleo essencial de copaíba (OEC) e é muito rica em  $\beta$ -cariofileno. Este composto, administrado por via oral em doses de 200 e 400 mg/Kg, reduziu efetivamente tanto a inflamação articular quanto a inflamação sistêmica de ratos artríticos, sem induzir hepatotoxicidade [Ames-Sibin et al., 2018]. As doses correspondem à quantidade de  $\beta$ -cariofileno presente nas doses hepatotóxicas do bálsamo de copaíba [Castro-Ghizoni et al., 2017]. Estudos adicionais utilizando FSNEEDS,

mostraram efetividade parcial desta formulação sobre a artrite com doses de OEC quatro vezes menores do que as anteriormente administradas de  $\beta$ -cariofileno, ou seja, 50 e 100 mg/Kg de FSNEEDDS (em termos de  $\beta$ -cariofileno) [Ames-Sibin et al., 2024b]. De fato, a biodisponibilidade do OEC administrado por via oral foi cerca de quatro vezes maior quando o óleo essencial foi veiculado em FSNEEDDS comparado à sua forma não formulada. Isto foi atribuído à adição Cremophor e linoleato de etila à formulação, pois levam à formação de uma estrutura do tipo micela que protege o OEC da precipitação no ambiente gastrointestinal [Ames-Sibin et al., 2024a] e ainda aumenta a sua área de superfície e melhora as interações com os componentes da digestão [Alkrad et al., 2016]. Além disso, a alta biodisponibilidade do FSNEEDDS também pode ser atribuída à absorção linfática promovida pelos óleos de cadeia longa presentes na formulação [Zgair et al., 2016].

Uma vantagem observada para a FSNEEDDS foi que a mesma não alterou os marcadores séricos de dano hepático, a morfometria hepática e a gliconeogênese no fígado de ratos saudáveis, isto é, apresentou um risco reduzido de hepatotoxicidade [Ames-Sibin et al., 2024b]. Entretanto, a efetividade antirreumática esperada para a FSNEEDDS na maior dose testada (100 mg/kg) foi ainda baixa se comparada com compostos antirreumáticos convencionais, como o ibuprofeno [Castro-Ghizoni et al., 2017]. O presente estudo, portanto, aumentou a dose oral para 200 mg/kg de FSNEEDDS e o associou com a administração transdérmica da FSNEEDDS-H na mesma dose. Os efeitos foram comparados com a FSNEEDDS por via oral na dose de 100 mg/kg conforme já usada no trabalho anterior [Ames-Sibin et al., 2024b]. Esta última de fato diminuiu as manifestações artríticas induzidas pelo adjuvante, mais precisamente, diminuiu o edema da patas, retardou o surgimento das lesões secundárias, a atividade da MPO no plasma e no fígado, os número de leucócitos circulantes e recrutados nas cavidades das articulações femorotibiais (Tabela 1). A administração conjunta da FSNEEDDS-H transdérmica na dose de 100 mg/kg (ASOT100) não melhorou a atividade antirreumática da FSNEEDDS 100 mg/kg administrada por via oral (AS100). Por outro lado, quando a dose de FSNEEDDS foi aumentada para 200 mg/kg via oral e associada com FSNEEDDS-H 200 mg/kg via transdérmica (ASOT200), o edema na pata injetada foi consideravelmente menor do que os demais tratamentos (AS100 e ASOT100). Entretanto, os demais parâmetros inflamatórios foram melhorados igualmente

ao tratamento do grupo AS100, ou seja, o aumento da dose oral de 100 para 200 mg/kg e a associação com a via transdérmica não mostraram considerável melhora na ação já demonstrada da FSNEDDS 100 mg/kg oral. O efeito adicional na pata injetada no grupo ASOT200 pode ser atribuído tanto ao aumento da dose oral quanto pela combinação de via oral com a transdérmica. De fato, a administração de FSNEDDS-H exclusivamente por via transdérmica na dose de 200 mg/kg diminuiu o edema da pata injetada igualmente o AS100 e também retardou o surgimento de lesões secundárias à artrite. Entretanto, não modificou os demais parâmetros artríticos induzidos pelo adjuvante.

Em relação ao estado oxidativo, este foi aumentado no plasma e fígado de ratos artríticos, conforme demonstrado pelos maiores níveis de proteínas carboniladas, uma condição já observada anteriormente [Castro-Ghizoni et al., 2017; Ames-Sibin et al., 2018; Ames-Sibin et al., 2024b]. Entretanto, nenhum dos tratamentos diminuiu os níveis teciduais de proteínas carboniladas. Por outro lado, os níveis de TBARS hepáticos, um marcador que não foi aumentado na artrite, foi diminuído no grupo ASOT200 e não nos demais. Em adição, apenas este grupo (ASOT200) foi capaz de aumentar os níveis de tióis totais, um marcador antioxidante, no plasma dos animais artríticos. Em conjunto, estes dois resultados mostram ao menos em parte uma ação antioxidante da associação de FSNEDDS 200 mg/kg via oral com FSNEDDS-H 200 mg/kg via transdérmica (ASOT200) sobre o estado oxidativo sistêmico. Entretanto, este efeito não foi observado nos animais tratados com FSNEDDS-H exclusivamente por via transdérmica na dose de 200 mg/kg, mostrando que os mesmos podem ter sido causados pelo simples aumento da dose por via oral. De fato, estudo anterior [Ames-Sibin et al., 2018] mostra que a administração de  $\beta$ -cariofileno exatamente na dose utilizada no presente estudo (200 mg/kg via oral) diminuiu consideravelmente o estresse oxidativo sistêmico de ratos artríticos.

Um resultado que chama a atenção no presente estudo foi que o FSNEDDS administrado por via oral na dose de 200 mg/kg não aumentou os parâmetros plasmáticos de lesão hepática nem nos animais controles nem nos animais artríticos (Fig. 3). Embora as análises histomorfométricas do fígado não tenham sido realizadas, estes resultados mostram ao menos em parte que o tratamento com FSNEDDS não está associado com lesão hepática evidente na dose de 200 mg/kg por via oral, ou seja, os efeitos hepatotóxicos do bálsamo de copaíba causada com a mesma dose (em termos de  $\beta$ -cariofileno) não foi

observada para o OEC formulado na FSNEEDDS [Castro-Ghizoni et al., 2017]. Outro efeito que merece uma consideração adicional é o fato de o FSNEEDDS não ter melhorado o ganho de peso corporal dos animais artríticos. Nenhum dos grupos teve nem que minimamente o ganho de peso corporal melhorado (Fig. 1A e B). Em termos práticos, a caquexia reumática associada a este modelo experimental impede o ganho de peso dos animais [Wendt et al., 2019] e nem mesmo o ibuprofeno, a indometacina e a dexametasona melhoram o peso corporal [Bendele et al., 1999].

Em resumo, o tratamento baseado na associação de FSNEEDDS por via oral com FSNEEDDS-H por via transdérmica parece ao menos em parte não proporcionar incrementos positivos ao tratamento com FSNEEDDS apenas por via oral. Entretanto, o aumento da dose de FSNEEDDS oral de 100 mg/kg para 200 mg/kg via oral mostra uma possível melhora no efeito antioxidante sistêmico sobre a artrite e, ao mesmo tempo, sem apresentar evidências para hepatotoxicidade. Os resultados do presente estudo devem encorajar estudos adicionais para aprimorar uma formulação transdérmica efetiva para o tratamento da artrite reumatoide e também estudos que demonstrem por análises histomorfométricas a ausência de comprometimento hepático para o OEC carregado em SNEEDDS na dose de 200 mg/kg administrada por via oral.

## **Agradecimentos**

Os autores agradecem o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## REFERENCES

- Alkrad, J. A., Mrestani, Y., & Neubert, R. H. (2016). Development and characterization of microemulsions containing hyaluronic acid. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 86, 84–90. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.02.008>
- Ames-Sibin, A. P., Lima Barizão, C., Castro-Ghizoni, C. V., Silva-Comar, F. M. S., Sá-Nakanishi, A. B., Bracht, L., Bersani-Amado, C. A., Natali, M. R. M., Bracht, A., & Comar, J. F. (2018).  $\beta$ -Caryophyllene, the major constituent of copaiba oil, reduces systemic inflammation and oxidative stress in arthritic rats. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(12), 10262–10277. <https://doi.org/10.1002/jcb.27369>
- Ames-Sibin, A. P., Chagas, A. C., Ferreira, S. B. S., Mandim, F., Finimundy, T. C., Calhelha, M. R. C., Peralta, R. M., Sá-Nakanishi, A. B., Bracht, L., Bruschi, M. L., Bracht, A., Barros, L., Comar, J. F. (2024a). Characterization and bioactivity of copaiba essential oil carried in a self-nanoemulsifying drug delivery system. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 91, 105206. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.105206>
- Ames-Sibin, A. P., Chagas, A. C., Castro, J. C., Ferreira, S. B. S., Silva-Comar, F. M. S., Cuman, R. K. N., Bruschi, M. L., Natali M. R. M., Sá-Nakanishi, A. B., Bracht, L., Bracht, A., Comar, J. F. (2024b). Characterization and bioactivity of copaiba essential oil carried in a self-nanoemulsifying drug delivery system. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 91, 105206. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.105206>
- Bahr, T., Allred, K., Martinez, D., Rodriguez, D., Winterton, P., 2018. Effects of a massage-like essential oil application procedure using copaiba and deep blue oils in individuals with hand arthritis. *Complement. Ther. Clin. Pract.* 33, 170-176. <https://doi.org/10.1016/j.ctcp.2018.10.004>
- Bendele, A.M., McComb, J., Gould, T., Mcabee, T., Sennelle, G., Chlipala, E., Guy, M., 1999. Animal models of arthritis: relevance to human disease. *Toxicologic Pathol.* 27, 134-142. <https://doi.org/10.1177/019262339902700125>
- Bergmeyer, H. U. (1975b). Methods of Enzymatic Analysis. *Journal - Association of Official Analytical Chemists*, 58(5), 1085. <https://doi.org/10.1093/jaoac/58.5.1085>
- Bradley, P., Christensen, R. D., & Rothstein, G. (1982). Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. *Blood*, 60(3), 618–622. <https://doi.org/10.1182/blood.v60.3.618.618>

Cardinelli, C. C., Silva, J. E. a. E., Ribeiro, R., Veiga-Junior, V. F., Santos, E. P. D., & De Freitas, Z. M. F. (2023). Toxicological Effects of Copaiba Oil (*Copaifera* spp.) and Its Active Components. *Plants*, *12*(5), 1054. <https://doi.org/10.3390/plants12051054>

Castro-Ghizoni, C. V., Ames, A. P. A., Lameira, O. A., Bersani-Amado, C. A., Sá-Nakanishi, A. B., Bracht, L., Natali, M. R. M., Peralta, R. M., Bracht, A., & Comar, J. F. (2017). Anti-inflammatory and antioxidant actions of copaiba oil are related to liver cell modifications in arthritic rats. *Journal of Cellular Biochemistry*, *118*, 3409–3423. <https://doi.org/10.1002/jcb.25998>

Comar, J. F., Sá-Nakanishi, A. B., Oliveira, A. L. R., Wendt, M. M. N., Berani-Amado, C. A., Iwamoto, E. L. I., & Bracht, A. (2013). Oxidative state of the liver of rats with adjuvant-induced arthritis. *Free Radical Biology and Medicine*, *58*, 144–153. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.12.003>

Deus, R. J. A., Alves, C. N., & Arruda, M. S. (2011). Avaliação do efeito antifúngico do óleo resina e do óleo essencial de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne). *Revista Brasileira De Plantas Mediciniais*, *13*(1), 01–07. <https://doi.org/10.1590/s1516-05722011000100001>

DeSalvo, J., Skiba, M. B., Howe, C. L., Haiber, K. E., & Funk, J. L. (2019). Natural Product Dietary Supplement Use by Individuals With Rheumatoid Arthritis: A Scoping Review. *Arthritis Care and Research*, *71*(6), 787–797. <https://doi.org/10.1002/acr.23696>

Emerenciano, D. P., Baracho, B. B. D., De Medeiros, M. L., Rocha, H. a. O., Xavier, F. J. S., Da Veiga, V. F., & Maciel, M. R. W. (2019). Physicochemical Characterizations and Antioxidant Property of Copaiba Oil Loaded into SNEDDS Systems. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, *30*(2), 234–246. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20180172>

Faure, P., & Lafond, J. (1995). Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. In *Birkhäuser Basel eBooks* (pp. 237–248). [https://doi.org/10.1007/978-3-0348-9074-8\\_17](https://doi.org/10.1007/978-3-0348-9074-8_17)

Ferreira, I. C., Martins, N., & Barros, L. (2017). Phenolic Compounds and Its Bioavailability. In *Advances in food and nutrition research* (pp. 1–44). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.12.004>

Gui, H., Tong, Q., Qu, W., Mao, C., & Dai, S. (2015). The endocannabinoid system and its therapeutic implications in rheumatoid arthritis. *International Immunopharmacology*, *26*(1), 86–91. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.03.006>

Hebert, P. R., Barice, E. J., Park, J., Dyess, S., McCaffrey, R., & Hennekens, C. H. (2017). Treatments for Inflammatory Arthritis: Potential But Unproven Role

of Topical Copaiba. *PubMed*, 16(2), 40–42.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30881236>

Hegen, M., Keith, J. C., Collins, M., & Nickerson-Nutter, C. (2008). Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 67(11), 1505–1515.  
<https://doi.org/10.1136/ard.2007.076430>

Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C., Amici, A., Climent, I., Lenz, A., Ahn, B., Shaltiel, S., & Stadtman, E. R. (1990). [49] Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. In *Methods in Enzymology* (pp. 464–478). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86141-h](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86141-h)

Marklund, S. L., & Marklund, G. (1974). Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry*, 47(3), 469–474.  
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x>

McInnes, I.B., Schett, G., 2011. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* 365, 2205-2209. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1004965>

McInnes, I. B., & Schett, G. (2017). Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis. *The Lancet*, 389(10086), 2328–2337.  
[https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(17\)31472-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(17)31472-1)

Medeiros, M., Humberto F, Júnior X, Florêncio V, Veiga V, Aparecida M, et al. Copaiba Oil for Nano-Pharmaceutics and Drug Delivery. *Encycl Nanosci Nanotechnol.* 2019;(May):165–189.

Misko, T.P., Radabaugh, M.R., Highkin, M., Abrams, M., Friese, O., Gallavan, R., Bramson, C., Hellio Le Graverand, M.P., Lohmander, L.S., Roman, D., 2013. Characterization of nitrotyrosine as a biomarker for arthritis and joint injury. *Osteoarthritis Cart.* 21, 151-156. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2012.09.005>

Moreira, L. B., Chagas, A. C., Sibin, A. P. A., De Oliveira Pateis, V., Bona, E., De Souza Silva-Comar, F. M., Hernandez, L., De Sá Nakanishi, A. B., Bracht, L., Amado, C. a. B., Bracht, A., & Comar, J. F. (2021). Alpha-tocopherol-loaded polycaprolactone nanoparticles improve the inflammation and systemic oxidative stress of arthritic rats. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 12(4), 414–425. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2021.12.003>

Roubenoff, R., 2009. Rheumatoid cachexia: a complication of rheumatoid arthritis moves into the 21st century. *Arthritis Res. Ther.* 11, 108-109. <https://doi.org/10.1186/ar2658>

Sá-Nakanishi, A. B., Soares, A. A., De Oliveira, A. L., Comar, J. F., Peralta, R. M., & Bracht, A. (2014). Effects of treating old rats with an aqueous agaricus

blazeiextract on oxidative and functional parameters of the brain tissue and brain mitochondria. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2014/563179>

Sá-Nakanishi, A.B., Soni-Neto, J., Moreira, L.S., Gonçalves, G.A., Silva, F.M.S., Bracht, L., Bersani-Amado, C.A., Peralta, R.M., Bracht, A., Comar, J.F., 2018. Anti-inflammatory and antioxidant actions of methyl jasmonate are associated with metabolic modifications in the liver of arthritic rats. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2018, 2056250. <https://doi.org/10.1155/2018/2056250>

Simões, M., Ames-Sibin, A. P., De Lima, E. P., De Oliveira Pateis, V., Bersani-Amado, C. A., Mathias, P. C., Bracht, A., De Sá-Nakanishi, A. B., Bracht, L., Bracht, A., & Comar, J. F. (2022). Resveratrol biotransformation and actions on the liver metabolism of healthy and arthritic rats. *Life Sciences*, 310, 120991. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120991>

Soares, D. C., Portella, N. A., De Souza Ramos, M. F., Siani, A. C., & Saraiva, E. M. (2013). *Trans-β-Caryophyllene*: An Effective Antileishmanial Compound Found in Commercial Copaiba Oil (*Copaifera* spp.). *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2013/761323>

Stolina, M., Bolon, B., Middleton, S., Dwyer, D., White, M., Duryea, D., Zhu, L., Rohner, A., Pretorius, J. K., Kostenuik, P. J., Feige, U., & Zack, D. (2009). The Evolving Systemic and Local Biomarker Milieu at Different Stages of Disease Progression in Rat Adjuvant-Induced Arthritis. *Journal of Clinical Immunology*, 29(2), 158–174. <https://doi.org/10.1007/s10875-008-9238-8>

Trindade, R., Silva, J. K., Setzer W. N., & 2018. *Copaifera* of the neotropics: a review of the phytochemistry and pharmacology. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 1511. <https://doi.org/10.3390/ijms19051511>

Urasaki, Y., Beaumont, C., Talbot, J. N., Hill, D. J., & Le, T. D. (2020). Akt3 Regulates the Tissue-Specific Response to Copaiba Essential Oil. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(8), 2851. <https://doi.org/10.3390/ijms21082851>

Urasaki, Y., Beaumont, C., Workman, M., Talbot, J. N., Hill, D. J., & Le, T. D. (2020). Fast-Acting and Receptor-Mediated Regulation of Neuronal Signaling Pathways by Copaiba Essential Oil. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7), 2259. <https://doi.org/10.3390/ijms21072259>

Wagner, H., & Ulrich-Merzenich, G. (2009). Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*, 16(2–3), 97–110. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.12.018>

Wendt, M. M. N., De Oliveira, M. C., Franco-Salla, G. B., Castro, L. A., Parizotto, Â. V., De Souza Silva-Comar, F. M., Natali, M. R. M., Bersani-Amado, C. A., Bracht, A., & Comar, J. F. (2019). Fatty acids uptake and oxidation are increased in the liver of rats with adjuvant-induced arthritis. *Biochimica Et Biophysica Acta: Molecular Basis of Disease*, 1865(3), 696–707. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.12.019>

Xavier-Junior, F.H., Gueutin, C., Morais, A.R.V., Alencar, E.N., Egito, E.S., Vauthier, C., 2016. HPLC method for the dosage of paclitaxel in copaiba oil: development, validation, application to the determination of the solubility and partition coefficients, *Chromatographia* 79, 405-412. <https://doi.org/10.1007/s10337-016-3058-4>

Yao, M., Li, Z., McClements, D. J., Tang, Z., Xiao, H., 2020. Design of nanoemulsion-based delivery systems to enhance intestinal lymphatic transport of lipophilic food bioactives: Influence of oil type, *Food Chem.* 317, 126229. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126229>

Zgair, A., Wong, J. W. C., Lee, J., Mistry, J. H., Sivak, O., Wasan, K. M., Hennig, I., Barrett, D. A., Constantinescu, C. S., Fischer, P., & Gershkovich, P. (2016). Dietary fats and pharmaceutical lipid excipients increase systemic exposure to orally administered cannabis and cannabis-based medicines. *PubMed*, 8(8), 3448–3459. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27648135>