BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

CENTRO UNIVERSITÁRIO UNIVATES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO – PPGAD
NÚCLEO DE ELETROFOTOQUÍMICA E MATERIAIS POLIMÉRICOS – NEMP

ULTRASSOM TERAPÊUTICO ASSOCIADO AO PRINCÍPIO ATIVO CAFEÍNA: ANÁLISE DE UTILIZAÇÃO FISIOTERAPÊUTICA, AVALIAÇÃO ELETROQUÍMICA E DE DIFUSÃO VERTICAL

João Alberto Fioravante Tassinary

Lajeado, janeiro de 2010

João Alberto Fioravante Tassinary

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

ULTRASSOM TERAPÊUTICO ASSOCIADO AO PRINCÍPIO ATIVO CAFEÍNA: ANÁLISE DE UTILIZAÇÃO FISIOTERAPÊUTICA, AVALIAÇÃO ELETROQUÍMICA E DE DIFUSÃO VERTICAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Desenvolvimento, do Centro Universitário Univates, como parte da exigência para obtenção do título de Mestre em Ambiente e Desenvolvimento.

Orientador(a): Profa. Dra. Simone Stülp

Co-orientador(a): Profa. Dra. Claudete Rempel

Lajeado, janeiro de 2010

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

DEDICATÓRIA:

Dedico esta dissertação ao meu avô Osmar Tassinary tenho certeza que estas bem onde estiver, sinto saudades. Dedico também a duas pessoas que com muita sabedoria, discernimento, bom senso e dedicação, estiveram ao meu lado me encorajando nas horas difíceis e me aplaudindo nos momentos de glória. Obrigada por serem meus pais, corretos e competentes, fonte de inspiração, apoio e ensino diário.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço a Deus e a espiritualidade, e referencio Fernando Pessoa “Como o não sabes ainda Agradecer é mistério”.

Necessito frisar que de forma alguma meus agradecimentos são formais. Eu não me reconheceria neles se assim fora. Quero agradecer a todas as pessoas que se fizeram presentes, que se preocuparam, que foram solidárias e torceram por mim. Mas bem sei que agradecer é sempre difícil. Posso cometer mais injustiças esquecendo pessoas que me ajudaram do que fazer jus a todas que merecem.

De qualquer forma, todos os que realizam um trabalho de pesquisa sabem que não o fazem sozinhos, embora seja solitário o ato da leitura e o do escrever. Talvez possa me expressar através de uma frase escrita por Newton em uma Carta para Hooke em 1676, "Se vi mais longe foi por estar de pé sobre ombros de gigantes."

Baseado nas palavras de Newton começo agradecendo a minha orientadora Dra. Simone Stülp, inicialmente pela paciência que teve comigo, pelos ensinamentos e pelas horas consumidas de leitura e no laboratório de eletroquímica. Suas sugestões sempre foram de grande valia e demonstraram a Dra., professora e profissional que és (muito obrigado mesmo Simone por todas horas disponibilizadas, pela enorme paciência e pela grande amizade que se formou). A professora Dra. Claudete Rempel pela co-orientação, pelos conselhos e contribuições preciosas que estão incorporadas no

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

trabalho, agradeço também a minha colega fisioterapeuta Paula Bianchetti pelas horas de contribuição, dedicação e responsabilidade.

Professora Magali Grave, (sou eternamente grato por tudo que fizeste por mim, e me orgulho de estar junto contigo), lembro... que minha admiração por ti começou em um dos momentos mais importantes e decisivos da minha vida (orientação de matrícula do curso de graduação em Fisioterapia) e esta admiração vem aumentando a cada semestre de convívio na universidade. Professora Débora Cerutti, eu quero deixar registrado meu agradecimento *"per tutti"*, sabes que és um exemplo para mim, pessoalmente e profissionalmente falando, diria que foste excelente como professora e peça fundamental para minha entrada no PPGAD e conseqüente desenvolvimento desta dissertação, além de ser peça chave no seleto grupo da "confiança" (agradeço do fundo do coração). Agradeço meu Professor e Mestre Dênis Barnes (estou a pensar por muito tempo e não consigo atribuir adjetivos que contemplem o grau de importância de vossa pessoa em minha vida e consequentemente no desenvolvimento desta dissertação) obrigado pelos conselhos, dicas, ensinamentos, apoio emocional, Professor Dênis obrigado pala amizade, pela confiança e por me nortear dentro da academia, me orientando para entrada no PPGAD e me incentivando a continuar na vida acadêmica, muito obrigado por tudo.

Quero agradecer ainda o grande amigo Telmo Garcez, Karina Costa, a Professora Dra. Fernanda Nummer por tudo, a professora Giovana Sinigaglia, a Dra. Adriane Pozzobon (também pelas contribuições na banca de qualificação), aos professores do mestrado em especial o Dr. Eduardo Périco. Agradeço ao Centro Universitário Univates, à PROPEX, às funcionárias Aline e Cassiane, e aos colegas do PPGAD, João Carlos, André, Marciano e Estevam.

Minha família merece poucas palavras, mas aquelas que considero mais caras. Obrigado por vocês existirem. Obrigado por depositarem em mim a confiança para todas as horas. Sei que vocês se orgulham por eu ter atingido uma etapa que nenhum outro de nós tinha atingido antes. Mas este orgulho que sentem por mim, converto numa obrigação de a cada dia ser mais digno de os representar. Pai (João Caetano

Tassinary) e Mãe (Lione Giselda Tassinary), obrigado pelo convívio, de uma existência inteira ao lado de vocês. Rafa e Renatinha, um beijo para cada uma, amo vocês.

E a Mariah, que por vezes deve ter detestado o meu jeito alucinado de viver e a este trabalho, pois ele sacrificou muitos momentos que poderíamos ter desfrutado juntos, mas sempre incentivou, sempre apoiou e, o melhor de tudo, sempre me cobrou para que eu continuasse e concluísse mais esta etapa de nossas vidas que vamos construindo juntos. Te amo. Agradeço também ao Dr. Walter Waigner a Dra. Sônia pelo carinho de filho e a confiança em mim depositada, ao meu Irmão Filipe e a Mariana, mais do que proficiente, selei grandes amizades (muito obrigado).

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

RESUMO

Os profissionais da saúde têm trabalhado em busca de alternativas à terapia convencional, com o intuito de acelerar o processo de reabilitação dos pacientes e consequentemente minimizar o período de afastamento de suas atividades de vida diária. Dentre as mais diferentes técnicas inseridas nos recursos eletrotermofototerápicos, destaca-se a terapia por ultrassom (US). Esse recurso é normalmente eleito pelos fisioterapeutas que buscam a aceleração do reparo tecidual de lesões musculares, bem como a diminuição de edema e de dor. Atualmente, a aceleração transdérmica de fármacos vem sendo utilizada pelos fisioterapeutas por meio de uma técnica denominada fonoforese, que consiste na utilização de ultrassom terapêutico para facilitar a migração de moléculas de ativos tópicos, sendo que os mesmos podem ser de origem sintética ou natural. Contudo, são escassos os estudos que revelam e quantificam o quanto a onda sônica pode realmente incentivar a liberação e a permeação dos ativos pelo estrato córneo. É importante ressaltar ainda, que o ultrassom apresenta propriedades oxidativas sendo utilizado, por exemplo, na aceleração de reações químicas, bem como, em processos que envolvem limpeza de sistemas contaminados com compostos orgânicos. Sendo assim, o presente trabalho tem o objetivo de avaliar o uso de produtos cosméticos à base de cafeína e erva-mate no tratamento fisioterapêutico, realizar avaliações eletroquímicas das soluções a base de cafeína quando submetida a aplicações de US terapêutico, bem como verificar os potenciais de liberação e permeação dos ativos quando associados à onda sônica. Foram utilizadas técnicas tais como, voltametria cíclica, medidas de pH, potencial de circuito aberto, bem como a espectrofotometria UV/Vis para avaliação do sistema, além de um questionário para a obtenção de dados acerca da utilização do ultrassom por fisioterapeutas. A partir dos resultados verificou-se uma possível degradação das moléculas de cafeína, quando submetidas ao ultrassom terapêutico no modo contínuo, com intensidade de 1,0Wcm^{-2} e frequência de 1 MHz, sendo este um aspecto negativo em termos fisioterapêuticos, pela possibilidade de perda das propriedades dos fármaco, além disso observa-se uma maior liberação e permeação do ativo quando associado à onda sônica terapêutica, sendo este um aspecto positivo. Quanto à utilização do US, os resultados inferem uma larga utilização da técnica nas condutas regenerativas, contrapondo com o baixo índice de profissionais que utilizam a fonoforese.

Palavras-chave: Fisioterapia. Ultrassom. Fonoforese. Cafeína.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

ABSTRACT

The professionals have working to seek alternatives to conventional therapy, in objective to accelerate the rehabilitation process of the patients and consequently accelerate of the cure process. Among the many different techniques in electrothermal resources, there is the ultrasound (US) therapy. This is normally elected by the physical therapists who seek to accelerate tissue repair muscle damage, as well as reducing swelling and pain. Currently, the acceleration of transdermal drug has been used by physiotherapists using a technique called phonophoresis, which is the use of therapeutic ultrasound to facilitate the migration of molecules of active threads, and they may be synthetic or natural origin. However, there are few studies that reveal and quantify how much the sonic wave may actually encourage the release and permeation through the stratum cornium of the assets. It is important out that the ultrasound oxidative properties being used, for example, speeding up chemical reactions and, in cases that involve cleaning systems contaminated with organic compounds. However, this study lens evaluate the use of cosmetic products based on caffeine and yerba mate in physical therapy, electrochemical evaluations of caffeine-based solutions when subjected to therapeutic applications of US, as well as verify the potential release and permeation of assets when coupled with the sonic wave. Used techniques such as cyclic voltammetry, pH measurements, open circuit potential, as well as spectrophotometry UV/Vis to evaluate the system. The results there was a possible degradation of caffeine molecules when exposed to therapeutic ultrasound in continuous mode with an intensity of 1.0 Wcm^{-2} and frequency 1 MHz, this being a negative aspect in terms of physical therapy, the possibility of losing the properties of drugs, and an increased release and permeation of the active when associated with the sonic wave therapy, which is a good thing. The use of the US, the results show a wide use of the technique in regenerative behavior, contrasting with the low number of professionals using phonophoresis.

Words keys: Physiotherapy. Ultrasound. Phonophoresis. Caffeine.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Comparativo entre estrutura do estrato córneo da pele humana (a) e da muda de pele de cobra (b)..... 25

Figura 2- Estrutura química da cafeína..... 27

Figura 3 - Equipamento de ultrassom terapêutico utilizado nos experimentos..... 32

Figura 4 - Célula receptora acoplada à mesa agitadora..... 35

Figura 5 - pHmetro utilizado para análise das amostras..... 36

Figura 6 - Sistema de difusão vertical..... 37

Figura 7 - Célula de difusão utilizada nos ensaios de liberação, no detalhe, área exposta para aplicação do US sobre membrana de acetato de celulose..... 37

Figura 8 - Pele de cobra *Boa constrictor* em solução de azida sódica 0,0002% em água destilada..... 38

Figura 9 - Voltamograma cíclico do Hidrogel antes e após a aplicação de ultrassom – 10 minutos, v = 20 mV/s..... 41

Figura 10 - Voltamograma cíclico do Hidrogel+Cafeína antes e após a aplicação de ultrassom – 10 minutos, v = 20 mV/s..... 42

Figura 11 – Mecanismo proposto para oxidação da cafeína..... 43

Figura 12 - Espectro UV/Vis das amostras de Hidrogel e Hidrogel + Cafeína 5%, com e sem exposição ao US terapêutico no modo contínuo..... 45

Figura 13 - Espectro UV/Vis das amostras de Hidrogel e Hidrogel + Cafeína 5%,

com e sem exposição ao US terapêutico no modo contínuo..... 47

Figura 14 - Espectro UV/Vis das amostras de retenção de Hidrogel + Cafeína 5%.. 48

Figura 15 - Voltamograma cíclico do Gel comercial antes e após a aplicação de ultrassom – 10 minutos, v = 20 mV/s..... 51

Figura 16 - Zoom da janela eletroquímica..... 52

Figura 17 - Espectro UV/Vis das amostras de Gel comercial, com e sem exposição ao US terapêutico no modo contínuo..... 54

Figura 18 - Espectro UV/Vis das amostras de Gel Comercial, com e sem exposição ao US terapêutico no modo contínuo..... 56

Figura 19 - Utilização de Ultrassom terapêutico por profissionais fisioterapeutas das clínicas do Vale do Taquari-RS..... 57

Figura 20 – Associação do Ultrassom terapêutico com produtos (géis) contendo princípios ativos derivados de produtos naturais, por profissionais fisioterapeutas nas clinicas do Vale do Taquari-RS..... 57

Figura 21 – Associação do Ultrassom terapêutico com produtos (géis) contendo cafeína, por profissionais fisioterapeutas nas clinicas do Vale do Taquari-RS..... 59

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variação de pH e Potencial de Circuito Aberto (PCA) do Hidrogel e Hidrogel + Cafeína 5%, antes e após a exposição à onda sônica terapêutica no modo contínuo..... 44

Tabela 2 - Variação de pH e Potencial de Circuito Aberto (PCA) do gel comercial, antes e após a exposição à onda sônica terapêutica no modo contínuo..... 53

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

LISTA DE ABREVIATURAS

A - Ampère

Ag/AgCl - Cloreto de prata

cm^2 - Centímetro quadrado

ERA - Área de radiação efetiva do cabeçote

Hz - Hertz

kg - quilograma

L - Litro

m - metro

mm - milímetro

mol - unidade de base do Sistema Internacional de Unidades para a grandeza quantidade de matéria

MPa - Megapascal

mV - milivolt

PCA - Potencial de circuito aberto

RDO - Reação de desprendimento de oxigênio

REO - Reação de evolução de oxigênio

US - Ultrassom

UV/VIS - ultravioleta visível

W/cm² - Watt por centímetro quadrado

W - Watts

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 16

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA..... 19

3 MATERIAIS E MÉTODOS..... 31
3.1 Reagentes..... 31
3.2 Tratamento com Us terapêutico..... 32
3.3 Aplicação do ultrassom terapêutico *in vitro*..... 34
3.4 Análise da liberação da cafeína através de uma membrana de acetato de celulose..... 36
3.5 Análise da permeação da cafeína através da biomembrana de pele de cobra..... 38
3.6 Análise de retenção da cafeína..... 39
3.7 Descrição do procedimento..... 39
3.8 Procedimentos para análise dos dados..... 39
3.9 Avaliação da utilização fisioterapêutica de ultrassom terapêutico associado ao uso de princípios ativos..... 40

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 41
4.1 Análises da cafeína..... 41
4.1.1 Análise de voltametria cíclica da cafeína..... 41
4.1.2 Análise de pH e potencial de circuito aberto da cafeína..... 44
4.2 Análises espectrofotométricas..... 45
4.2.1 Análise da liberação da cafeína..... 45
4.2.2 Análise de permeação da cafeína..... 47
4.2.3 Análise de retenção da cafeína..... 48
4.3 Análises do gel comercial contendo *Ilex paraguariensis*..... 50
4.3.1 Análise de voltametria cíclica do gel comercial..... 51
4.3.2 Análise de pH e potencial de circuito aberto do gel comercial..... 53

4.4 Análises espectrofotométricas..... 53
4.4.1 Análise de liberação do gel comercial..... 53
4.4.2 Análise de permeação do gel comercial..... 55
4.5 Avaliação da utilização de ultrassom terapêutico..... 57

5 CONCLUSÃO..... 61

REFERÊNCIAS..... 64

APÊNDICE..... 70

APÊNDICE A – Questionário..... 71
APÊNDICE B – Ofício encaminhado aos fisioterapeutas..... 72

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

1 INTRODUÇÃO

A utilização de Ultrassom (US) em diferentes aplicações na área das ciências experimentais tem ganhado destaque, devido ao fato do US poder ser usado como fonte de energia para a ocorrência de reações químicas. O US apresenta diferentes formas de uso, nas mais variadas frequências, sendo que na área da fisioterapia seu uso ocorre nas frequências de 1 MHz e 3 MHz.

Ainda, no âmbito da fisioterapia, a utilização do US terapêutico pode ocorrer com e sem a conjugação de fármacos, sendo que quando há esta associação, a técnica é denominada fonoforese. Diversos estudos têm sido realizados avaliando a ação e os efeitos produzidos pelo do US sobre estes fármacos, envolvendo, por exemplo, o aumento de permeação destes na pele.

Dentre as substâncias que podem ser agregadas à onda sônica, a cafeína possui destaque, sendo caracterizada, como um pó ou cristais brancos, pouco solúvel em água e podendo ser extraída da *Coffea arábica*. A cafeína está entre as três metilxantinas de ocorrência natural farmacologicamente ativas e também pode ser encontrada em chás.

As plantas medicinais são amplamente pesquisadas, tanto farmacologicamente quanto para o desenvolvimento de novas drogas e produtos tópicos, não somente quando os seus constituintes são usados diretamente como agentes terapêuticos, mas também como matérias-primas para a síntese, ou modelos para compostos farmacologicamente ativos. Assim as plantas medicinais, as preparações

fitofarmacêuticas e os produtos naturais isolados, como a cafeína, são pesquisados e utilizados em todo o mundo e, desta forma, representam um mercado que movimenta bilhões de dólares, tanto em países industrializados como em desenvolvimento. A cafeína, como princípio ativo dermatológico, exerce ação no tecido adiposo subcutâneo, através da inibição da fosfodiesterase, tendo um efeito lipolítico.

É fundamental ressaltar que a promoção de permeação de fármacos pela pele através da onda sônica, pode levar a maior eficácia da liberação de ativos; aumento do fluxo ou retenção do mesmo, aumento da liberação localizada; tópica ou dos tecidos alvo através da pele; ou ainda a combinação das hipóteses citadas. No entanto esta liberação poderá promover efeitos tóxicos tanto intracelulares como extracelulares, caso não haja utilização adequada da quantidade do composto associado, ou ainda devido à ocorrência de alteração da estrutura química do composto.

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o ultrassom terapêutico associado ao princípio ativo cafeína, em termos de análise de utilização fisioterapêutica, avaliação eletroquímica e de difusão vertical. Tendo como objetivos específicos: avaliar o uso de produtos cosméticos à base de cafeína e erva-mate no tratamento fisioterapêutico; avaliar as alterações da cafeína e gel comercial contendo *Ilex paraguariensis* (erva-mate) antes e após a aplicação do Ultrassom no modo contínuo em termos de análise eletroquímica, pH, Temperatura e Condutividade; avaliar a liberação da cafeína 5% e do gel comercial contendo *Ilex paraguariensis* (erva-mate), com e sem a aplicação do Ultrassom no modo contínuo em modelo de célula de difusão vertical, com membrana de acetato de celulose; e avaliar a permeação da cafeína 5% e do gel comercial contendo *Ilex paraguariensis* (erva-mate) com e sem aplicação do Ultrassom no modo contínuo em modelo de célula de difusão vertical, com modelo de biomembrana (muda de pele de cobra).

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Na medicina atual, o ultrassom é uma modalidade amplamente utilizada para diversas finalidades, dentre as quais destaca-se o uso terapêutico, bem como método de diagnóstico (PRENTICE, 2003; PRENTICE, 2004). Quando a onda sônica ultrapassa os tecidos biológicos com finalidade terapêutica, objetiva-se estimular os processos de cicatrização e consequentemente o reparo das lesões (KITCHEN; BAZIN, 1998), alívio da dor, redução da rigidez articular, aumento do fluxo sanguíneo (KITCHEN; BAZIN, 2003), aumento da permeabilidade celular, auxílio no retorno venoso e linfático, reabsorção de edemas e incremento da flexibilidade dos tecidos ricos em colágeno (AGNE, 2004).

As radiações ultrassônicas foram descobertas no século passado, através da aplicação de uma corrente elétrica senoidal sobre um cristal de quartzo posicionado entre duas placas metálicas, constatando assim a geração de uma vibração de alta frequência (AGNE, 2004). O ultrassom foi inicialmente produzido através de um cristal de quartzo vibrante, submetido a uma corrente de alta frequência. Atualmente, é empregado um cristal cerâmico sintético na sua fabricação, devido a sua durabilidade e eficiência em converter corrente elétrica em vibrações mecânicas, primordiais para o funcionamento do equipamento, eis que essas vibrações acionam as partículas do meio. Ou seja, as referidas vibrações são produzidas a partir da contração do cristal,

sob a influência de uma corrente elétrica em uma determinada direção (FURINI; LONGO, 2002).

Segundo Low e Reed (2001), os transdutores piezoelétricos são cristais adequadamente cortados que alteram seu formato sob influência da carga elétrica, sendo um dos mais indicados é o quartzo. A espessura destes transdutores é de fundamental importância, de modo que ressoe na frequência eleita, atingindo, assim, a máxima vibração. Para aplicar as cargas elétricas no cristal, é fixado um eletrodo de metal, enquanto a superfície oposta fica no ar. A maior parte da energia da vibração é transmitida do cristal para a placa e então para o líquido, onde é aplicada, este é o cabeçote utilizado na prática clínica para transmitir a energia sonora aos tecidos lesados.

O ultrassom apresenta diferentes formas de uso, nas mais variadas frequências, como por exemplo, os médicos que também usufruem do US para obtenção de imagens corporais (HEWLTT, 2002), na faixa de 5 a 10 MHz (CONCEICAO et al., 2007). Já na fisioterapia com finalidade regenerativa são utilizadas frequências de 0,75 MHz até 3 MHz, sendo o uso mais comum de 1 MHz e 3 MHz (PRENTICE; 2004).

A frequência que é ajustada pelo fisioterapeuta no aparelho, caracteriza-se pelo número de ciclos de ondas completados a cada segundo, sendo o determinante para a profundidade de penetração no tecido. Grande parte dos antigos geradores de ultrassom eram acertados apenas para a frequência de 1 MHz, ou seja, o cristal é deformado 1 milhão de vezes por segundo, enquanto a maioria dos novos modelos apresentam, também, a opção de uso na frequência de 3 MHz (PRENTICE, 2002; PRENTICE, 2004).

Kitchen e Bazin (1998 e 2003) elucidam que o controle da frequência de saída do US fornece ao terapeuta o controle da profundidade a ser atingida pela energia, consequentemente do mecanismo físico em ação. Basicamente quanto maior a frequência, mais superficial será a profundidade de penetração, o que levará a uma rápida atenuação da onda ultrassônica, acarretando assim efeito biológico de aquecimento do tecido. Ou seja, na prática, em lesões superficiais o terapeuta utilizaria

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

um aplicador de 3 MHz sendo que lesões mais profundas exigiriam um aplicador de 1MHz.

Prentice (2003), corrobora com os autores supracitados quando refere que a energia de 3 MHz é absorvida nos tecidos superficiais. Guirro e Guirro (2007) especifica que o cabeçote de 3 MHz promove penetração entre 1 e 2 cm, havendo assim maior absorção da onda, sendo utilizado com maior eficácia na fisioterapia dermato-funcional, onde se busca atividade superficial.

O cabeçote de 1 MHz favorece e consequentemente fornece penetração mais profunda à onda sônica, entre 2 e 5 cm (LOPES et al., 2005; PRENTICE, 2004; BORGES, 2006). Sendo útil para indivíduos com alta percentagem de gordura corporal cutânea e sempre que os efeitos desejados estiverem nas camadas mais profunda (PRENTICE, 2003). Portanto se deve ter em mente que os coeficientes de absorção variam conforme o tecido a ser atingido, assim como variam conforme a frequência a ser utilizada (GUIRRO; GUIRRO, 2007).

O feixe de ultrassom carrega uma quantidade de energia produzida pelo transdutor, sendo esta energia transportada num determinado espaço de tempo, denominada de potência (Watt). No exato momento em que essa potência é dividida pela superfície do feixe (cm^2), se define a intensidade desse feixe em Wcm^{-2} (AGNE, 2004).

A intensidade ou densidade do US terapêutico varia de 0,1 a 3,0 Watts por centímetro quadrado (Wcm^{-2}), sendo que o som desloca-se em forma de ondas, o que requer um meio material para sua transmissão (AGNE, 2004). A propagação da onda dá-se como uma perturbação na posição de equilíbrio das partículas do material, de forma que o meio não seja submetido a nenhuma alteração constante. A energia é transmitida pelas vibrações das moléculas do meio por onde a onda está se propagando (GUIRRO, 2002). Para a determinação da intensidade terapêutica correta, em cada caso, deve-se ter consciência que a dose ideal deverá chegar até o tecido alvo, levando-se em consideração a atenuação das ondas sonoras nos tecidos superficiais à área da lesão, por exemplo, pele, gordura e músculo (BORGES, 2006).

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

Na fisioterapia dermato-funcional grande parte dos protocolos indicam ajuste do aparelho em torno de 1,2 Wcm^{-2} no modo contínuo, já para os processos de reparo tecidual, procura-se chegar até o local da lesão com doses que vão até 0,5 Wcm^{-2} usando um regime de emissão no modo pulsado (BORGES, 2006).

A permanência da aplicação da técnica terapêutica, por sua vez, pode ser calculada através das medidas da área a ser tratada, a qual é dividida pela ERA (área efetiva de radiação do cristal) do ultrassom. Em Prentice (2002 e 2004), ainda acrescenta-se que o tempo de tratamento depende de inúmeros fatores, dentre os quais destaca-se o tamanho da área a ser tratada; a intensidade; a frequência e o aumento da temperatura desejado.

Praticamente a maioria dos geradores de onda sônica terapêutica pode emitir duas formas de ondas: as pulsadas e contínuas. No caso das ondas contínuas, a intensidade do som se mantém constante durante o tratamento, já no ultrassom pulsado, a intensidade é interrompida periodicamente. O ultrassom contínuo é utilizado para induzir efeitos térmicos, enquanto o pulsado apresenta uma redução do aquecimento médio do tecido, produzindo o efeito chamado de mecânico ou não-térmico (PRENTICE, 2002).

Low e Reed (2001), referem-se ao modo contínuo como fundamental à produção do aquecimento nos tecidos se a intensidade for suficientemente alta. Este tem sido recomendado e utilizado para distúrbios musculoesqueléticos como espasmo muscular, rigidez articular, promovendo também processos de cicatrização. Já o modo pulsado na mesma intensidade instantânea, terá uma média temporal de intensidade muito menor e, assim, um aquecimento praticamente insignificante, neste modo os efeitos terapêuticos a nível tecidual serão proporcionados pelos efeitos denominados não-térmicos.

No momento que o US penetra no corpo, pode proporcionar efeitos nas células e tecidos essencialmente por dois mecanismos: térmico e não-térmico (KITCHEN, 2003). Kitchen e Basin (1998) concordam que o ultrassom terapêutico pode induzir respostas

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

clinicamente significativas em células, tecidos e órgãos por meio de efeitos térmicos e não-térmicos.

Kitchen e Basin (1998), ainda sugerem que dentre os mecanismos físicos envolvidos na produção dos efeitos terapêuticos, estão a cavitação, a corrente acústica e as ondas estacionárias.

A onda sonora terapêutica pode provocar um aumento de energia térmica no interior de um tecido quando um porcentual dela é absorvida. A quantidade de absorção depende da natureza do tecido, da sua vascularização e da frequência do ultrassom eleita pelo terapeuta. Tecidos com enorme quantidade de proteína são capazes de absorver mais a onda sônica do que aqueles com conteúdo de gordura maior. Um efeito biologicamente significativo pode ser obtido se a temperatura do tecido for elevada entre 40 a 45 °C por pelo menos 5 minutos (KITCHEN, 2003).

Guirro (2002) descreve que o efeito térmico deve-se à absorção da onda ultrassônica pelo tecido, sendo que essa temperatura promove um temporário aumento da extensibilidade das estruturas de colágeno como tendões, ligamentos e cápsulas articulares, diminuindo a rigidez articular e a dor. Além disso produz, um acréscimo da circulação sanguínea e uma reação inflamatória suave.

Prentice (2004) corrobora com a idéia de que os efeitos clínicos do ultrassom para aquecer o tecido são similares aos de outras técnicas, incluindo o aumento da extensibilidade das fibras de colágeno dos tendões e cápsulas articulares; diminuição da rigidez articular; modulação da dor; redução do espasmo muscular e aumento do fluxo sanguíneo.

Entretanto, no momento em que uma onda de ultrassom alcança a interface de dois tecidos com distinta impedância acústica, ocorre reflexão de uma porcentagem da onda. As ondas refletidas podem incidir com aquelas que estão chegando para formar um campo de onda estacionária, sendo a onda estacionária composta de ondas sobrepostas e por isso as intensidades de pico e as pressões são mais altas do que a

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

onda incidentemente normal. A pressão elevada produzida por essa onda pode causar cavitação transitória e, como consequência, formar radicais livres (KITCHEN, 2003).

Low e Reed (2001) concordam que as ondas estacionárias ocorrem como resultado da sobreposição das ondas refletidas com as ondas incidentes. O resultado é conjugado de ondas fixas com picos de alta pressão, separadas por uma extensão de meia onda entre as quais existem zonas sem pressão.

A onda sônica forma cavidades com dimensões de micrômetros em fluidos contendo gases, e, dependendo da amplitude de pressão da energia, essas bolhas podem ou não ser benéficas. Amplitudes de baixa pressão resultam na formação de bolhas que vibram até um grau a partir do qual são produzidas alterações reversíveis na permeabilidade das membranas celulares. Altas amplitudes de pressão podem resultar em cavitações mais violentas, nos quais as bolhas se colapsam, sendo geradas pressões acima de 1.000 MPa. Isso pode levar à geração de radicais livres altamente reativos (KITCHEN, 2003, GARBELLINI; SALAZAR-BANDA; AVACA, 2008).

Guirro (2002) ressalta que esses radicais livres são formados, possivelmente, por descargas elétricas geradas pela dissociação térmica causada pelo colapso das bolhas, ou pela cavitação do vapor da água no interior das cavidades. A cavitação pode causar ondas de choque hidrodinâmico e elevação instantânea da temperatura e pressão, podendo alterar as estruturas terciárias das proteínas.

Outro produto da onda ultrassônica citado por Low e Reed (2001) é a corrente acústica, que caracteriza-se por um fluxo circulatório invariável devido ao torque de radiação. O efeito também denominado microcorrenteza desempenha sobrecarga viscosa sobre a membrana da célula e, portanto, pode aumentar a permeabilidade da membrana. Esses movimentos de líquidos pequenos ocorrem em torno das células, fibras de tecidos e outras interfaces, podendo trazer alterações terapêuticas úteis.

Fisioterapeutas vêm aplicando fármacos através da pele, para o interior dos tecidos cutâneos, sob influência da onda sônica terapêutica. Muitos princípios ativos são absorvidos lentamente pela pele e a vibração sonora de alta frequência tem a

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

finalidade de acelerar este processo. Esse tipo de tratamento vem sendo utilizado desde 1950 denomina-se fonoforese ou ultra-sono-forese (LOW; REED, 2001).

Segundo Kitchen (2003), fonoforese caracteriza-se como a migração de moléculas de substâncias através da pele sob a influência do ultrassom. Teoricamente, a fonoforese é possível devido à utilização das forças da corrente acústica existentes no campo do ultrassom. Entretanto, é questionável se essa força é suficiente para carrear as moléculas até o ponto alvo, diferenciando, por exemplo, se o efeito biológico de uma onda aplicada topicamente é resultado de um efeito sistêmico, ou da sua ação direta no tecido alvo subjacente. Sendo assim, é de se considerar o fato que a fonoforese não dependa apenas dos parâmetros ajustados pelo fisioterapeuta no aparelho de ultrassom, mas também da natureza da molécula do medicamento ou ativo propriamente dito. Dessa forma, é necessário um maior número de pesquisas com fármacos que possam ser associados com esta técnica clínica (MITRAGOTRI; KOST, 2004; MARTINES et al., 2000).

Agne (2004), refere que o US aumenta a penetração transcutânea por pressão somática, podendo chegar em média a atingir entre 4 e 5 cm de profundidade. Porém concluiu em seus estudos recentes que ativos como a *Arnica montana* quando adicionado ao gel condutor para aplicação com fonoforese, não teve passagem para as camadas adjacentes ao estrato córneo (biomembrana de pele de cobra) em curtos períodos de tempo. O estudo sugeriu ainda, uma maior atenuação da onda ultrassônica e consequente redução da taxa de transmissibilidade, sendo que os valores encontrados demonstram qualidade na chegada da onda e transmissão ainda dentro de valores aceitáveis para tratamento terapêutico. A muda de pele de cobra é utilizada como biomembrana por possuir semelhanças com o estrato córneo da pele humana, tal comparativo pode ser observado na Figura 1.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

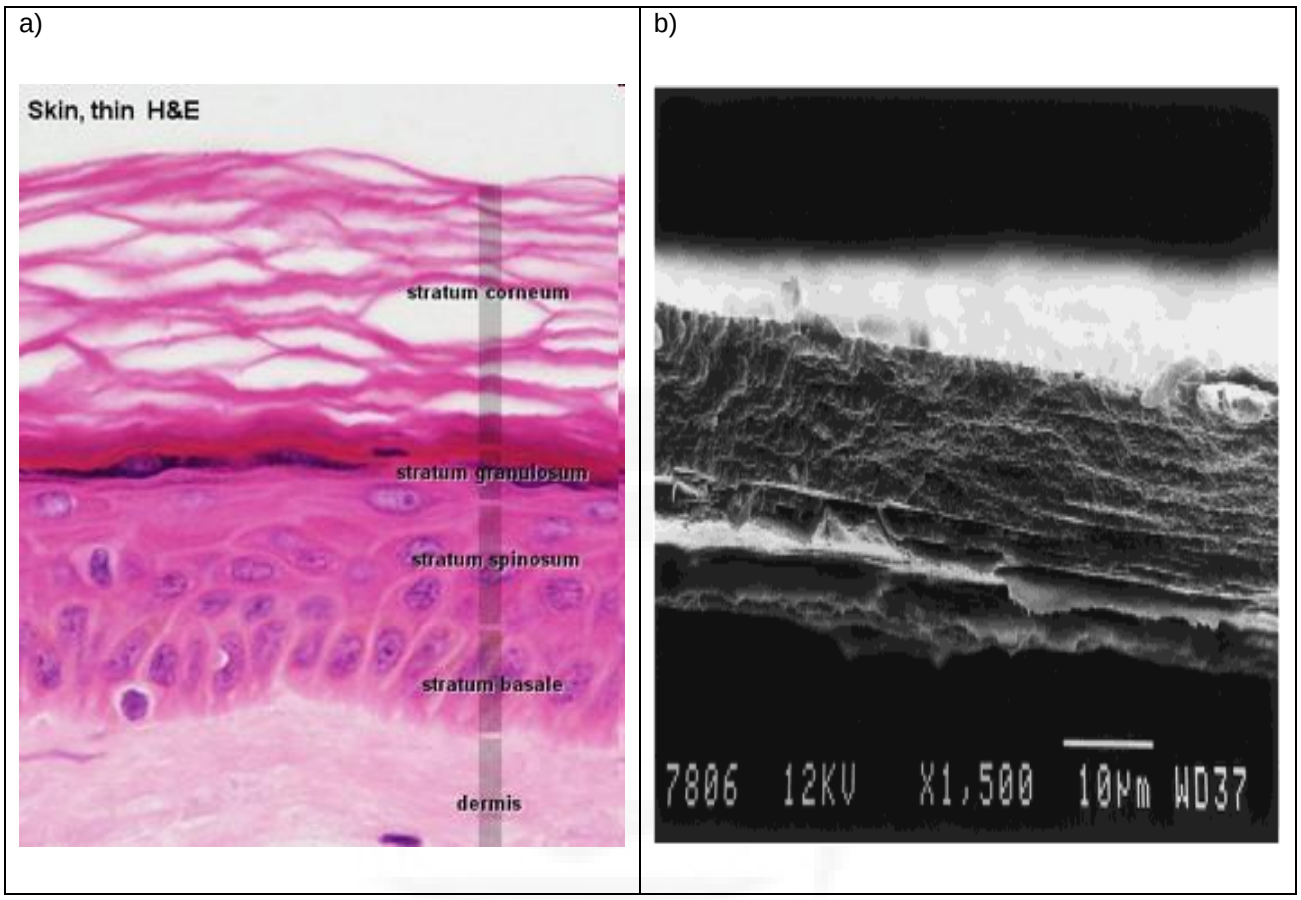

Figura 1 – Comparativo entre estrutura do estrato córneo da pele humana (a) e da muda de pele de cobra (b).

Fonte:a)http://cours.cegep-st-jerome.qc.ca/101-nya.b/Organisationcellulaire/ photoepithpeau.htmb) HA,IGH, et al, 1998.

Fonoforese baseia-se na perturbação dos tecidos, gerando um movimento mais acelerado das partículas, facilitando a absorção da substância (LOW; REED, 2001). Prentice (2004) ressalta que a técnica emprega-se, normalmente, substâncias de uso tópico, geralmente anti-inflamatório ou analgésicos. A técnica mais difundida da fonoforese é a permeação de hidrocortisona, que tem efeito anti-inflamatório, sendo usada no tratamento de bursite, ponto gatilho e tendinite. Agne (2004), corrobora com os achados e ainda acrescenta que nos primeiros estudos com hidrocortisona houve penetração do corticóide em até 6 cm de profundidade.

Importante referir que foram realizados alguns estudos com animais, dentre os quais se destaca o de Hsieh (2006) que, a partir de pesquisas experimentais com a

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

utilização de diclofenaco em ratos, relatou uma diminuição dos sintomas da artrite nestes animais quando da aplicação da técnica de fonoforese, ou seja, US terapêutico associado ao diclofenaco.

Recentemente, Ferreira e colaboradores (2006) trabalharam medindo a capacidade de condutividade de trinta e sete meios condutores comumente utilizados na fonoforese, com a finalidade de facilitar e orientar a escolha desses durante a prática clínica dos fisioterapeutas. O estudo mostrou que, de uma forma geral, os produtos fabricados especificamente para esse tipo de utilização (géis), registraram condutividades elevadas. Outrossim, os fármacos de aplicação tópica com denominações de gel ou emulgel registraram valores igualmente elevados, contrastando, assim, com os cremes, loções e pomadas, que apresentaram valores de condutividade muito baixos.

Importante ressaltar que são extremamente escassos artigos, pesquisas ou estudos que descrevam o efeito do ultrassom sobre a estrutura química dos medicamentos usados na fonoforese. Ainda que exista a sugestão de que raramente o ultrassom promova mudanças químicas na molécula dos fármacos (BARNES, 2008), há relatos de que seu uso produz alguns efeitos químicos importantes, uma vez que, como destacou Furini e Longo (2002), o ultrassom pode provocar alterações nas estruturas moleculares, podendo ser utilizado na condução de reações químicas, dependendo de sua frequência e intensidade (GARBELLINI; SALAZAR-BANDA; AVACA, 2008).

Cerutti (2009), obteve resultados que detectaram a possibilidade de degradação da *Arnica montana,* através da técnica de voltametria cíclica, sugerindo que a ação física e química do ultrassom terapêutico (US), tanto no modo contínuo quanto no modo pulsado, promove alteração do substrato estudado (*Arnica montana*).

Uma das substâncias que vem sendo agregada à onda sônica é a cafeína (Figura 2),que Korolkovas (1988), caracteriza como pó ou cristais brancos, sendo pouco solúvel em água e podendo ser extraída da *Coffea arabica.* A cafeína está entre as metilxantinas mais importantes de ocorrência natural farmacologicamente ativas e também pode ser encontrada no chá (RANG et al., 2001*).*

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

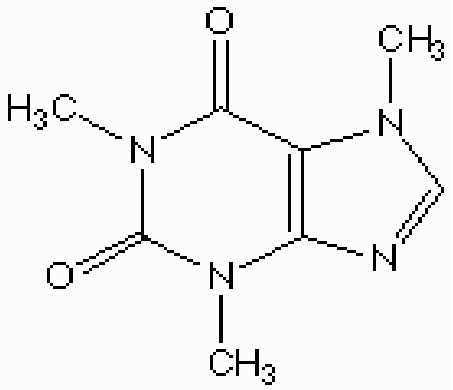

Figura 2- Estrutura química da cafeína

Gomes (2009) corrobora que a cafeína é um alcalóide do grupo das xantinas, existente em alguns produtos alimentares como o mate, sugerindo ainda que esta possui atividade lípolítica. Em contrapartida Filho et al. (2006), realizaram um ensaio clínico randomizado, duplo-cego, comparativo entre medicamentos, para o tratamento de pacientes com lombalgia e lombociatalgia agudas, e observaram uma efetividade da cafeína na redução da dor lombálgica.

A cafeína como princípio ativo dermatológico exerce ação no tecido adiposo subcutâneo, através da inibição da fosfodiesterase, tendo um efeito lipolítico. Entretanto, para que a molécula transponha a principal barreira à penetração cutânea, deve ser associada a promotores de absorção cutânea ou veiculada através de lipossomas (RAMALHO; CURVELO, 2006). Segundo Chorilli et al. (2004), a cafeína também ocasiona uma redução da espessura da hipoderme devido ao achatamento nos lóbulos de tecido adiposo.

Pesquisas *in vitro*, utilizando célula de difusão, sugerem que o ultrassom acentua e acelera significativamente a permeação da cafeína através da pele, permitindo a realização da fonoforese com este fármaco no tratamento de lipodistrofias. Análises histológicas da pele de suínos submetidas a diferentes tratamentos demonstraram que o ultrassom facilita a ação da cafeína, levando a uma redução significativa da espessura da hipoderme. Esta redução está relacionada a uma diminuição significativa no número de adipócitos presentes nesta região (CAMPOS, 2004).

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

Campos (2004), analisando adipócitos isolados do tecido adiposo subcutâneo de suínos, evidenciaram a eficácia do ultrassom em promover a permeação cutânea, fato demonstrado pelo aumento da lipólise basal e da resposta máxima estimulada pela isoprenalina, o mesmo estudo sugere que a aplicação tópica da cafeína, no tempo de tratamento estudado, não produz nenhuma alteração no processo de lipólise, assim como a aplicação do ultrassom, sem a utilização de fármacos.

É na natureza que o homem busca, desde primórdios de sua existência, recursos que melhorem sua condição de vida para, assim, aumentar suas chances de sobrevivência pela melhoria de sua saúde (RODRIGUES et al., 2006). As plantas medicinais são amplamente pesquisadas, tanto farmacologicamente quanto para o desenvolvimento de novos fármacos e produtos tópicos, não somente quando os seus constituintes são usados diretamente como agentes terapêuticos, mas também como matérias-primas para a síntese, ou modelos para compostos farmacologicamente ativos (WHO, 2003). Ainda, segundo Philippi (2000), a utilização de princípios ativos provenientes de produtos naturais está vinculado ao conceito de etno-tecnologia, que envolve o processo cultural de aproveitamento dos recursos do meio.

As plantas sempre foram usadas em cosméticos e na dermatologia, porém os atuais princípios ativos são pouco elucidados. Estudos cada vez mais aprofundados da maneira de atuação desses constituintes têm permitido que o uso das plantas a nível cutâneo seja feito de um modo mais científico e quase sempre a partir de extratos (CUNHA, 2004).

Dentre as plantas que contém cafeína tem-se a erva-mate, ou seja, no metabolismo secundário da erva-mate está a cafeína, onde estudos recentes de variação de metilxantinas totais em amostras de erva-mate no estado do Rio Grande do Sul mostraram que esta pode ser considerada uma espécie com ampla variação fenotípica no conteúdo de metilxantinas (SCHUBERT, 2006).

Segundo Gomes (2009), a erva-mate é obtida de árvores que podem chegar até 10 m em mata nativa da América do Sul, que depois de torrada, é bebida na forma de infusão, como chá ou chimarrão. Tem como principais constituintes; Ácidos cafeico e

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

tânico (tanino); alcalóides (cafeína, metilxantina, teobromina e teofilina); carboidratos (celulose, dextrina, frutose, glicose, gomas, rafinose e sacarose); lipídeos; proteínas (aminoácidos essenciais); vitaminas A, B1, B2, B9, (ácido fólico), C e E; minerais; alumínio, cálcio, ferro, fósforo, magnésio, manganês, potássio. Sendo as principais ações da planta: antioxidante, diurética e estimulante.

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.:Aqüifoliaceae) é caracterizada como uma planta arbórea de suma importância socioeconômica, principalmente no Sul do Brasil, onde ocorre de forma nativa ou cultivada. A erva-mate está localizada na Floresta Ombrófila Mista, sendo uma das centrais atividades econômicas de muitos municípios desta região (BOZZETO, 1995 *apud* FERLA, 2005).

É fundamental ressaltar que a promoção de permeação de fármacos pela pele através da onda sônica, pode levar a maior eficácia da liberação de ativos; aumento do fluxo ou retenção do mesmo, aumento da liberação localizada; tópica ou dos tecidos alvo através da pele; ou ainda a combinação das hipóteses citadas. No entanto esta liberação poderá promover efeitos tóxicos tanto intracelulares como extracelulares, caso não haja utilização adequada da quantidade do composto associado (ROGERO et al., 2003), ou ainda devido à ocorrência de alteração da estrutura química do composto (BIANCHETTI et al., 2009). Poderão ocorrer efeitos adversos e não desejáveis ao tratamento, assim como, a utilização adequada poderá promover redução de possíveis agentes tóxicos ao organismo. Para tanto, é importante que sejam realizados testes de toxicidade, para a confirmação dos resultados esperados. Dentre estes, há o método de incorporação do vermelho neutro e o método de difusão de agar, sendo que o primeiro é um teste quantitativo e o segundo qualitativo (ROGERO et al., 2003). Ainda, determinações eletroquímicas podem auxiliar na avaliação de possíveis degradações de princípios ativos, além de possibilitar a determinação da toxicidade dos mesmos (FERREIRA et al., 2010; OLIVEIRA-BRETT; GOULART; ABREU, 2002).

Em face do exposto, o presente trabalho tem o intuito de avaliar o ultrassom terapêutico associado ao princípio ativo cafeína, em termos de análise de utilização fisioterapêutica, avaliação eletroquímica e de difusão vertical, com a finalidade de

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

contribuir cientificamente para o desenvolvimento do conhecimento desta modalidade baseada na utilização da onda sonora, amplamente utilizada para fins terapêuticos.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho tem caráter qualitativo e quantitativo experimental, e foi dividido em três partes: na avaliação eletroquímica a partir de experimentos *in vitro* onde foram analisados os parâmetros de pH e potencial de circuito; na avaliação de permeação e liberação *in vitro* de cafeína e de gel contendo erva-mate em sistema de difusão vertical; e finalmente na aplicação de um questionário de avaliação para a utilização de ultrassom terapêutico e de produtos cosméticos à base de cafeína e erva-mate no tratamento fisioterapêutico das clínicas do Vale do Taquari – RS.

3.1 Reagentes

Nos ensaios de incidência de onda sônica, as amostras utilizadas para a análise foram obtidas a partir de gel condutor da MERCUR® com fabricação 13/09/08 e validade até 09/2011, lote 237 506-403, cafeína 5%, produzido pelo laboratório SIGMA-ALDRICH®, lote 029k 1023, com data de fabricação 31/08/2009 e com validade até 14/09/2014, gel comercial, linha corporal com ativos de arnica, castanha da índia, *Centella asiatica*, cavalinha, algas fucus, hera e erva-mate, fabricado 08/08 com validade até 08/2010 do lote 277 e posteriormente foi adquirido mais uma unidade do gel comercial anteriormente referido do lote 457, fabricado 11/09 e com validade até 11/2011.

3.2 Tratamento com US terapêutico

O equipamento de ultrassom (Figura 3) utilizado para a pesquisa foi fornecido pela empresa DGM eletrônica Ltda., sendo que as características técnicas fornecidas pelo manual de instrução do equipamento são:

Figura 3 - Equipamento de ultrassom terapêutico utilizado nos experimentos

Fonte: Pesquisador

- Alimentação: 110V/ 220V ~ 60 Hertz;

- Consumo máximo: 50 W;

- Modo de operação: contínuo;

- Classificação: classe I - tipo BF;

- Fusível externo: 1A/110V / 0,5A/220V, tipo 20AG;

- Fusível interno: 1A/110V ~ tipo 20AG;

- Temporizador: de 01 a 30 minutos;

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

- Frequência de ultrassom: 1 e 3 MHz.

- Modo de emissão do ultrassom:

• Contínuo;

• Pulsado a 100 Hz com ciclos de duração do pulso de:

50% - 5,0 ms on / 5,0 ms off (1/2);

20% - 2,0 ms on / 8,0 ms off (1/5);

10% - 1,0 ms on / 9,0 ms off (1/10);

5% - 0,5 ms on / 9,5 ms off (1/20).

• Pulsado a 48 Hz com ciclos de duração do pulso de:

50% - 10,4 ms on / 10,4 ms off (1/2); 20% - 4,1 ms on / 16,7 ms off (1/5);

• Pulsado a 16 Hz com ciclos de duração do pulso de:

50% - 31,25 ms on / 31,25 ms off (1/2);

20% - 12,5 ms on / 50,0 ms off (1/5);

- Intensidade de potência: 0,1 a 2,0 W/cm²

- ERA (Efective Radiaton Area): 3,5 cm²;

- Dimensões: 440mm X 270mm X 125mm (LxPxA);

- Peso: (aprox. s/ transdutor) 4,0 kg.

Foram usados os seguintes parâmetros:

- Modo contínuo;

- Intensidade de 1,0 Wcm^{-2} e frequencia de 1 MHz;

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

- Tempo de 10 minutos de aplicação.

3.3 Aplicação do ultrassom terapêutico *in vitro*

A técnica de fonoforese é baseada na perturbação dos tecidos, que gera um movimento mais acelerado das partículas, encorajando assim a absorção do fármaco (LOW; REED, 2001). Quando o US penetra no corpo, pode ocasionar efeitos nas células e tecidos (KITCHEN, 2003). Igualmente, estudos recentes sugerem, a partir de análises eletroquímicas como a voltametria cíclica, que o ultrassom terapêutico pode degradar moléculas de fármacos comumente utilizadas na fonoforese como a rutina, com mais evidência quando esta estiver sob efeito do US no modo contínuo (BIANCHETTI et al., 2009).

Para a realização do experimento montou-se um sistema sobre uma mesa agitadora Tecnal® modelo TE – 140, com a finalidade de simular a aplicação *in vivo* sem a formação de ondas estacionárias, que ocorrem como resultado da sobreposição das ondas refletidas com as ondas incidentes, Low e Reed, (2001) ainda confirmam que em todos os métodos é importante movimentar o cabeçote continuamente. Acoplada à mesa agitadora estava uma célula receptora contendo água (solução receptora), em contato com uma membrana e esta com o gel contendo o fármaco, e o transdutor de ultrassom, de modo a absorver possíveis ondas, para que estas não se reflitam e incidam com aquelas que estão chegando (KITCHEN, 2003). Na Figura 4 tem-se a montagem do experimento descrito, utilizada para as analise das amostras de hidrogel, hidrogel+cafeína e gel comercial.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

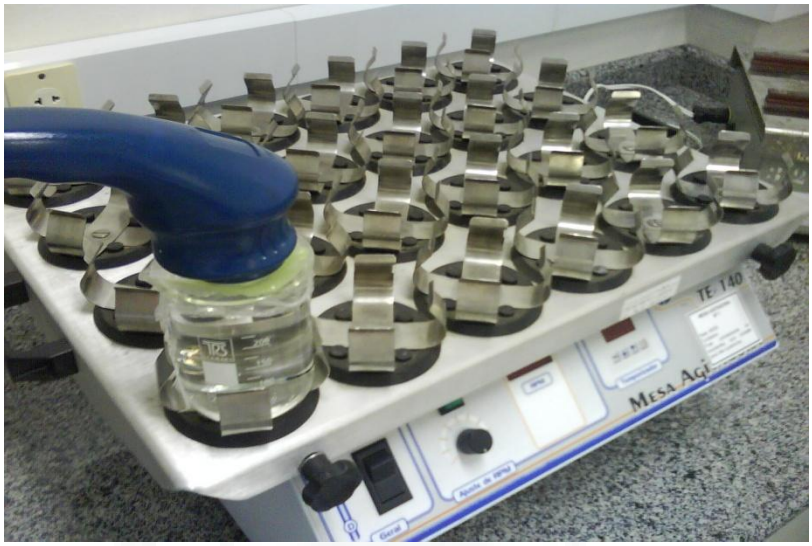

Figura 4 - Célula receptora acoplada à mesa agitadora
Fonte: Pesquisador

No acompanhamento deste experimento *in vitro* foram analisados os seguintes parâmetros: pH e potencial de circuito aberto, ambos mensurados a partir de um pHmetro do modelo 827 pH lab, da Metrohm® (Figura 5), previamente calibrado. A técnica de voltametria cíclica foi realizada com o auxílio de um potenciostato modelo PGSTAT128N da marca AUTOLAB/Ecochemie® com velocidade de varredura de 20 mV/s. A célula eletroquímica continha um eletrodo de trabalho de platina com área de 0,385 cm^2, assim como um contra eletrodo de platina e um eletrodo de referência sendo um fio de prata revestido com cloreto de prata (Ag/AgCl).

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

Figura 5 - pHmetro utilizado para análise das amostras

Fonte: Pesquisador

3.4 Análise da liberação da cafeína através de uma membrana de acetato de celulose

A fonoforese é caracterizada como a migração de moléculas de fármacos através da pele sob a influência do ultrassom (KITCHEN, 2003), ou seja, o ultrassom funciona como um agente facilitador para a permeação das moléculas em tecidos adjacentes à pele, sendo assim, neste experimento foi avaliado a liberação efetiva do substrato. Para tal, fez-se uso de membrana de acetato de celulose (0,45 µm de porosidade) da marca Sartorius Biolab Products®, com a finalidade de separar o compartimento doador do receptor, ou seja, formar uma barreira não interferente a um fluido denominado receptor (MOTA et al., 2008).

Preparou-se um sistema contendo uma célula de difusão vertical (Figura 6), sobre uma chapa agitadora VELP SCIENTIFICA®, colocou-se uma camisa termostatizada de 200 mL da marca GERMANY, contendo água aquecida a 37ºC por um banho ultratermostatizado MA-184 MARCONI, simulando a temperatura corporal,

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

dentro deste foi inserida uma célula (100 mL), demonstrado na Figura 7, com solução receptora de água e álcool etílico 99,5% (Nuclear®) com proporção de 1:1, e uma barra agitadora magnética para manter a homogeneidade da amostra. Em contato com esta área da membrana foi adicionado o agente acoplador, hidrogel, hifrogel+cafeína e gel comercial e acima o transdutor do US (ANTONIO, 2007; BABY et al*.,* 2008). Após foram realizadas análises de varreduras espectrofotométricas (190nm a 990nm) de alíquotas retiradas da célula de difusão, para a verificação da presença do substrato na solução receptora. Os ensaios foram obtidos através de um Espectrofotômetro Cary 100 Bio UV/Vis.

Figura 6 - Sistema de difusão vertical

Fonte: Pesquisador

Figura 7 - Célula de difusão utilizada nos ensaios de liberação, no detalhe, área exposta para aplicação do US sobre membrana de acetato de celulose
Fonte: Pesquisador

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

3.5 Análise da permeação da cafeína através da biomembrana de pele de cobra

Para detectar a permeação *in vitro* de cafeína foram utilizados os mesmo parâmetros da espectrofotometria supracitados e o mesmo sistema de difusão vertical, porém o acetato de celulose foi substituído por muda de pele de cobra *Boa constrictor* (Figura 8), cedida pelo Museu de Ciências Naturais do Centro Universitário UNIVATES, uma vez que a utilização de tecido humano para pesquisa é dificultada. Utilizou-se a referida membrana, pois esta possui propriedades similares ao estrato córneo da pele humana, sendo que a parte ventral possui uma maior similaridade ao tecido humano (MEGRAB; WILLIAMS; BARRY, 1995). É importante mencionar que a pele de cobra foi hidratada por três dias em solução de azida sódica 0,0002% em água destilada (NUNES et al.,2005).

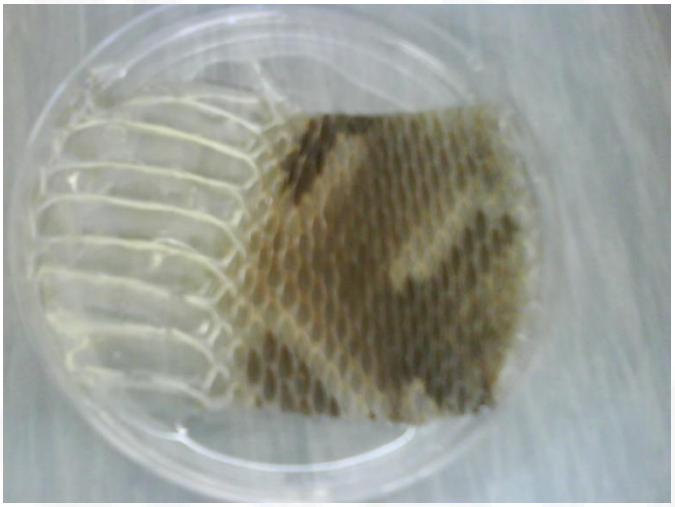

Figura 8 - Pele de cobra Boa constrictor em solução de azida sódica 0,0002% em água destilada
Fonte: Pesquisador

3.6 Análise de retenção da cafeína

As mudas de pele de cobra utilizadas na avaliação da penetração *in vitro* da cafeína foram retiradas das células de difusão vertical após o término do experimento, recortadas adequadamente, sendo que o excesso da preparação foi removido das mudas de pele de cobra com auxílio de um frasco lavador contendo água deionizada e

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

após álcool etílico. As amostras foram reduzidas a fragmentos e transferidas para balão volumétrico e imersas em solução de água deionizada e álcool etílico absoluto 99,5% (proporção 1:1). Com a finalidade de favorecer a liberação da cafeína retida na pele de cobra levou-se a solução para o banho ultrassônico (Marconi®), modelo Ultrasonic Cleaner por 40 minutos. Foram retiradas amostras da solução e realizadas leituras as espectrofotométricas (BABY et al., 2008).

3.7 Descrição do procedimento

- Preparo das amostras: As amostras de cafeína foram preparadas a partir de gel (hidrogel) condutor e cafeína na concentração de 5%, para garantir a homogeneidade da amostra utilizou-se um agitador mecânico (FISATOM®) modelo 703 D.

- Análise instrumental antes da aplicação do ultrassom: Cada uma das amostras de aplicação do ultrassom terapêutico *in vitro* foi avaliada através de pH, potencial de circuito aberto e voltametria cíclica, sendo que as avaliações de liberação e permeação de cafeína foram obtidas através de espectrofotometria.

- Terapia por ultrassom: Foi aplicado o ultrassom terapêutico em cada uma das amostras, na seguinte modulação: modo contínuo, com frequência de 1 MHz, intensidade (1,0 W/cm^2) e tempo de 10 min de aplicação.

- Resultados: os resultados obtidos a partir das análises instrumentais foram analisados comparativamente. É importante referir que todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.8 Procedimentos para análise dos dados

Todos os resultados foram considerados, sendo tabulados em programa Microsoft Windows Excel 2003 e analisados estatisticamente pelo teste ANOVA, com nível de significância 0,05, no programa estatístico Origin 5.0 e Instat.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

3.9 Avaliação da utilização fisioterapêutica de ultrassom terapêutico associado ao uso de princípios ativos

A fonoforese permeia os fármacos através da pele, sob influência do ultrassom para dentro dos tecidos cutâneos. Muitos fármacos são absorvidos lentamente e a vibração sonora de alta frequência pode acelerar este processo (LOW; REED, 2001). Segundo Borges (2006), o ultrassom terapêutico vem sendo um recurso altamente utilizado por profissionais que atuam na área da saúde, principalmente fisioterapia e dermato-funcional, em função da promoção de excelente resposta terapêutica a inúmeras afecções, além da boa associação a produtos cosméticos na técnica de fonoforese.

Low e Reed (2001), ainda referem que este tratamento vem sendo utilizado desde a década de 1950, divergindo com o autor supracitado, mencionando que o método é utilizado por poucos fisioterapeutas. Sendo assim, um dos objetivos do presente estudo foi avaliar a utilização de ultrassom terapêutico e de produtos cosméticos à base de cafeína e erva-mate no tratamento fisioterapêutico das clínicas do Vale do Taquari – RS, a partir de questionário (Apêndice A), previamente formulado. Inicialmente o referido questionário foi enviado por correio eletrônico para todos os fisioterapeutas credenciados na Associação dos Fisioterapeutas do Vale do Taquari juntamente com um ofício (Apêndice B) esclarecendo acerca dos objetivos do estudo. É importante mencionar que o referido correio eletrônico foi enviado para um total de sessenta profissionais. Diante das dificuldades encontradas, com o retorno dos questionamentos, foi definida uma amostra intencional não probabilística nem estatisticamente significativa utilizando como critério de seleção dos fisioterapeutas a facilidade de acesso (VERGARA, 2000), desta forma, foram analisados, ao todo, dez questionários.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Análises da cafeína

4.1.1 Análise de voltametria cíclica da cafeína

Os ensaios de caracterização eletroquímica, por meio da utilização da técnica de voltametria cíclica, foram realizados em amostras de Hidrogel e Hidrogel + Cafeína 5%, antes e após a aplicação de ultrassom terapêutico, por um tempo de 0 e 10 minutos, na velocidade de varredura de 20 mV/s, sendo que os potenciais medidos são em relação ao eletrodo de Ag/AgCl.

Na Figura 9 tem-se um voltamograma cíclico do Hidrogel antes e após a aplicação de ultrassom por 10 minutos.

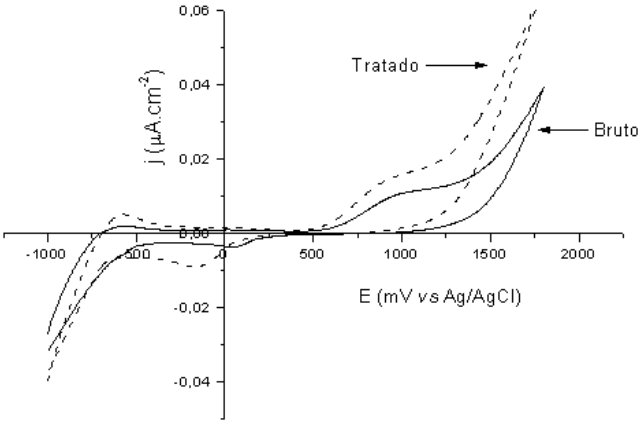

Figura 9 - Voltamograma cíclico do Hidrogel antes e após a aplicação de ultrassom – 10 minutos, v = 20 mV/s

Avaliando a Figura 9, verifica-se que houve alteração eletroquímica no sistema, após exposição por 10 minutos ao US terapêutico, pela visualização da alteração da área do voltamograma. Confirmando a análise, o cálculo da carga evidencia um acréscimo de Q = 5,291.10^{-2} C cm^{-2} para Q = 9,991.10^{-2} C cm^{-2}, do hidrogel bruto para o tratado, respectivamente.

Na Figura 10 tem-se um voltamograma cíclico do Hidrogel+Cafeína antes e após a aplicação de ultrassom por 10 minutos.

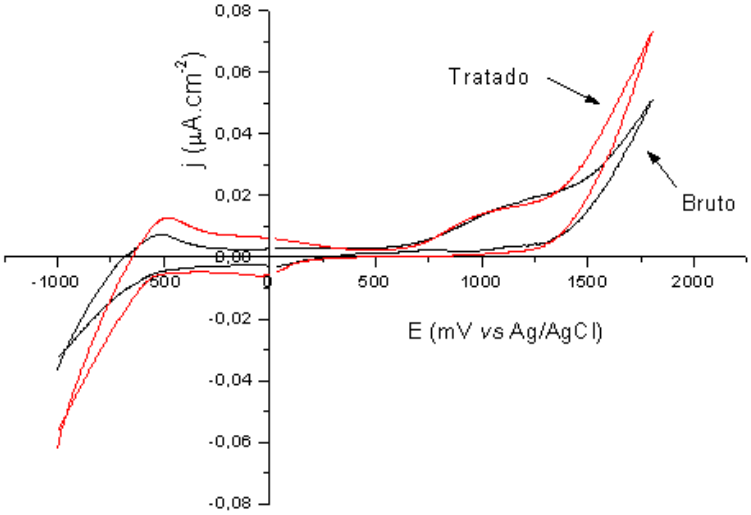

Figura 10 - Voltamograma cíclico do Hidrogel+Cafeína antes e após a aplicação de ultrassom – 10 minutos, v = 20 mV/s

Avaliando a Figura 10, verifica-se que houve alteração eletroquímica do sistema hidrogel/cafeína, após exposição por 10 minutos ao US terapêutico, em função da área do voltamograma, sendo acrescida após a aplicação da onda sônica. Em termos de valores de carga, há um acréscimo de Q=8,080.10^{-2} C cm^{-2} para Q=1,005.10^{-1} C cm^{-2}, do sistema hidrogel/cafeína bruta para a tratada respectivamente, sendo este de uma ordem de grandeza. Os resultados obtidos (voltamogramas) neste estudo são semelhantes aos obtidos em outro estudo de determinação eletroquímica de cafeína (SANGHAVI; SRIVASTAVA, 2010), porém neste caso com eletrodos de pasta de carbono e a cafeína em solução aquosa.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

Esse aumento nos valores de carga, após exposição ao US terapêutico pode evidenciar uma maior susceptibilidade à oxidação do sistema após a aplicação do US terapêutico (BIANCHETTI et al., 2009).

Além deste efeito, em potenciais próximos a 1,1 V, tem-se uma onda no potencial eletroquímico característico da cafeína (MARIA; MOREIRA, 2007). Porém, cabe também salientar que em potenciais próximos a 1 V, sistemas contendo compostos orgânicos normalmente apresentam picos de oxidação (LAVAGNOLI et al. 1995., NOEL; VASU, 1990), sendo este o motivo pelo qual nas Figuras 9 e 10 têm-se picos nestas regiões, já que um dos constituintes do hidrogel analisado é o carbopol (polímero vinílico) e o propilenoglicol, compostos orgânicos amplamente utilizados em formulações dermatológicas (BOLFE; GUIRRO, 2009; MARTINS; VEIGA, 2002; BABY et al., 2008). Entretanto na Figura 10, há um incremento dos valores das correntes de pico, devido à presença da cafeína no sistema analisado.

Ainda, segundo alguns trabalhos envolvendo o estudo de soluções contendo cafeína (SANGHAVI; SRIVASTAVA, 2010; LOURENÇÃO et al., 2009), o mecanismo proposto de eletrooxidação (Figura 11) envolve 4 elétrons e 4 prótons, e ocorre em duas etapas. A primeira etapa envolve a perda de dois elétrons e dois prótons ocorrendo a oxidação da molécula no carbono 8 e nitrogênio 9, obtendo assim um ácido úrico substituído (composto intermediário), este composto intermediário é oxidado em uma segunda etapa que envolve a perda de mais dois elétrons, formando então um análogo ao ácido úrico diidroxilado nas posições 4 e 5.

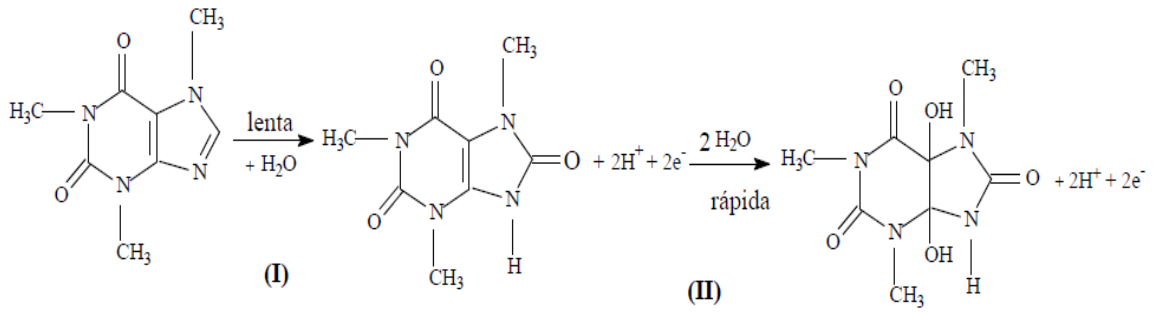

FIGURA 11 - Mecanismo proposto para oxidação da cafeína

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

Finalmente, verifica-se que o tratamento com US terapêutico promove um deslocamento da Reação de Desprendimento de Oxigênio (RDO) para valores de potenciais mais negativos, no sistema hidrogel e hidrogel + cafeína após a aplicação do US terapêutico, indicando que a oxidação do sistema é facilitada após a aplicação do US, pelas características da onda sônica (GARBELLINI; SALAZAR-BANDA; AVACA, 2008).

4.1.2 Análise de pH e potencial de circuito aberto da cafeína

A Tabela 1 apresenta a variação do potencial do circuito aberto (PCA) antes e após a aplicação do ultrassom no modo contínuo, em Hidrogel e Hidrogel + Cafeína 5%, bem como o valor de pH destes sistemas.

Tabela 1 - Variação de pH e Potencial de Circuito Aberto (PCA) do Hidrogel e Hidrogel + Cafeína 5%, antes e após a exposição à onda sônica terapêutica no modo contínuo

	pH		**PCA (mV)**	
	Média	**DP (± σ)**	**Média**	**DP (± σ)**
Hidrogel Bruto	6,72	0,05	9,15	1,81
Hidrogel Tratado	6,68	0,01	11,4	0,43
Hidrogel + Cafeína 5% Bruto	6,64	0,03	13,66	1,42
Hidrogel + Cafeína 5% Tratado	6,63	0,03	14,2	1,83

Na avaliação da Tabela 1, verifica-se que o potencial de circuito aberto das amostras Hidrogel e Hidrogel + Cafeína 5% tratados**,** tiveram um discreto aumento, após a análise estatística verificou-se que os resultados do PCA para cafeína e gel não foram significativos ($p>0,05$).

Em relação ao pH, verifica-se que o Hidrogel, quando submetido ao ultrassom no modo contínuo, apresenta uma discreta redução de seus valores. Já a amostra de Hidrogel + Cafeína 5%, não apresenta alteração significativa em seus resultados ($p>0,05$).

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

4.2 Análises espectrofotométricas

4.2.1 Análise de liberação da cafeína

O gráfico apresentado na Figura 12 foi obtido a partir da análise da absorbância das diferentes amostras de hidrogel e hidrogel + Cafeína 5%, com e sem a aplicação do US, nos ensaios de liberação com membrana de acetato de celulose, através de varredura em toda a faixa espectral (195-1100 nm), sendo considerados os valores próximos a 280 nm como a região de absorbância máxima.

Segundo a literatura (SANTOS et al., 2007), alguns componentes do café verde (cru), tais como proteínas, peptídeos, aminoácidos aromáticos livres, trigonelina e cafeína, apresentam absorção em 280 nm. Porém a análise da cafeína no comprimento de onda específico de 272 nm aumenta a seletividade do método e, portanto, sua precisão e exatidão (MARIA; MOREIRA, 2007).

Na Figura 12, tem-se espectro UV/Vis das amostras de Hidrogel e Hidrogel + Cafeína 5%, com e sem exposição ao US terapêutico no modo contínuo.

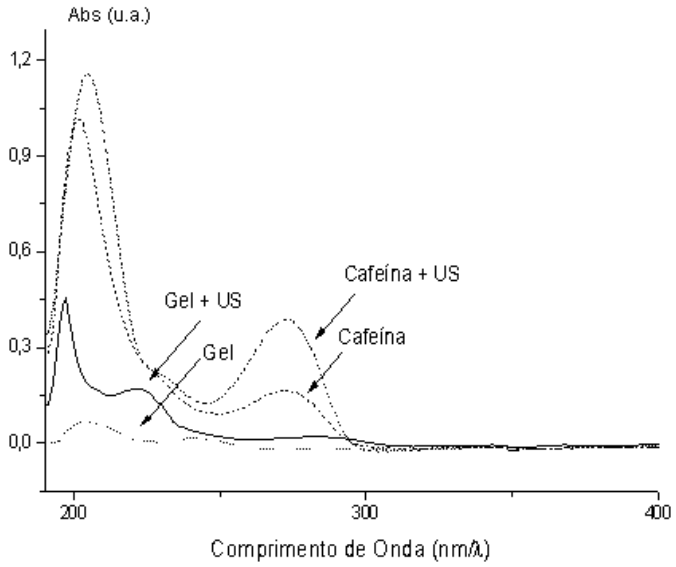

Figura 12 - Espectro UV/Vis da solução receptora das amostras de Hidrogel e Hidrogel + Cafeína 5%, com e sem exposição ao US terapêutico no modo contínuo

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

A Figura 12 permite a visualização da diferença de absorbância entre as amostras, sendo que a solução receptora do hidrogel e do hidrogel após aplicação de US não apresentaram incremento da banda (λ = 272 nm), já o sistema hidrogel + cafeína mostrou uma discreta absorbância por volta da faixa de 0,2 (de absorbância) e quando este foi associado ao tratamento com US terapêutico revelou um maior incremento da banda na região de absorbância característico da cafeína por volta dos 272 nm, sugerindo então uma liberação mais acentuada do ativo para o meio, provavelmente por conta da ação física da onda sônica, atingindo valores de absorbância por volta de 0,4. Em termos de concentração, a partir de curva de calibração realizada com soluções de cafeína em solução água/álcool 1:1, tem-se que, antes da aplicação de US, a concentração de cafeína na solução receptora é de 5,25 10^{-5} mol L^{-1}, enquanto que após a aplicação de US terapêutico, ocorre a liberação de 1,73 10^{-4} mol L^{-1} de cafeína, sendo este aumento de uma ordem de grandeza.

Finalmente os dados evidenciam incrementos de absorbância nas bandas características da cafeína, sugerindo uma maior liberação do ativo quando associado à onda sônica terapêutica, ou seja, o US atuou apresentou-se como facilitador no processo de liberação da cafeína.

4.2.2 Análise de permeação da cafeína

O gráfico da Figura 13 foi obtido a partir da análise da absorbância das diferentes amostras de Hidrogel e Hidrogel + Cafeína 5%, com e sem a aplicação do US, nos ensaios de permeação da cafeína em biomembrana de pele de cobra, através de varredura em toda a faixa espectral (195-1100 nm), sendo considerados os valores próximos a 280 nm como a região de absorbância máxima.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

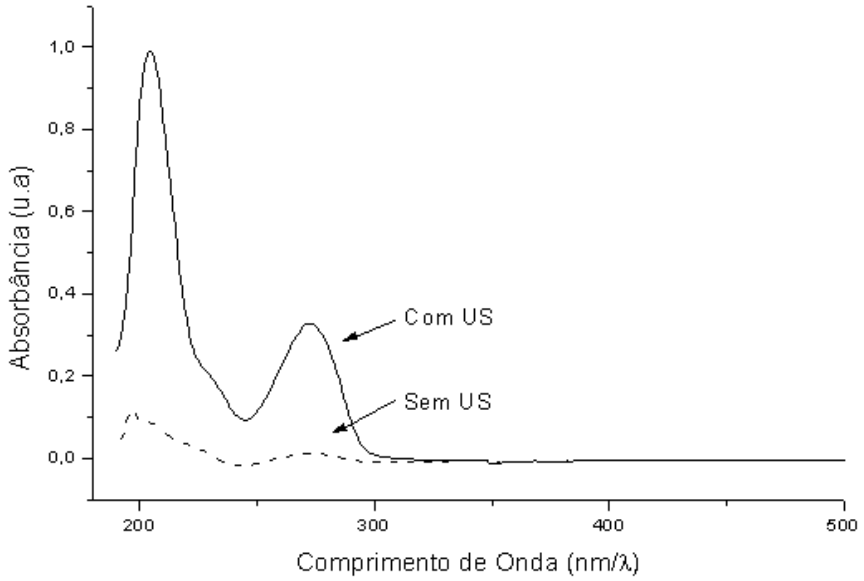

Figura 13 - Espectro UV/Vis da solução receptora das amostras de Hidrogel + Cafeína 5%, com e sem exposição ao US terapêutico no modo contínuo

A Figura 13 sugere uma diferença acentuada de absorbância entre as amostras supracitadas na faixa dos (λ = 272 nm), a cafeína sem a associação da onda sônica mostrou uma discreta absorbância e quando esta foi associado ao tratamento com US terapêutico revelou um maior incremento da banda na região de absorbância característico da cafeína por volta dos 272 nm, por volta de 0,3 (de absorbância) sugerindo então uma permeação mais acentuada do ativo para o meio, em termos de concentração de cafeína esta absorbância corresponde a 1,04 10^{-4} mol L^{-1} de cafeína permeada através da biomembrana para a solução receptora analisada. É importante ressaltar que estes resultados são valores obtidos a partir de médias, sendo que houve um largo desvio padrão nos resultados, este amplo desvio pode ser explicado pela diferença de permeabilidade que pode ocorrer de região para região corpórea (HADGRAFT, 2004), e ainda a literatura sugere que espessura da pele de cobra pode variar de 10 a 20 µm (WIDLER; SIGRIST; GAFNER, 2002).

Os resultados de permeação da cafeína *in vitro* evidenciam e corroboraram com a literatura, onde se sugere que inúmeros ativos são absorvidos lentamente pela pele e

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

a vibração sonora de alta frequência tem a finalidade de acelerar este processo (LOW; REED, 2001).

Jesus et al. (2006), em um artigo de revisão bibliográfica acerca do assunto, refere que a maioria das pesquisas tenta esclarecer o papel do ultrassom na permeação cutânea, dando ênfase para o efeito acelerador, diminuindo o tempo de aplicação do processo, mais do que aumentar a taxa de absorção. Estes autores ainda referem que mesmo que os mecanismos pelos quais a fonoforese funciona ainda não estejam muito claros, o fato é que o US, favorece a permeação cutânea de produtos farmacológicos e cosmecêuticos, devido aos seus efeitos térmicos e/ou mecânicos,

4.2.3 Análise de retenção da cafeína

O gráfico apresentado na Figura 14 foi obtido a partir da análise de absorbância da retenção da cafeína após o ensaio de permeação no sistema de difusão vertical.

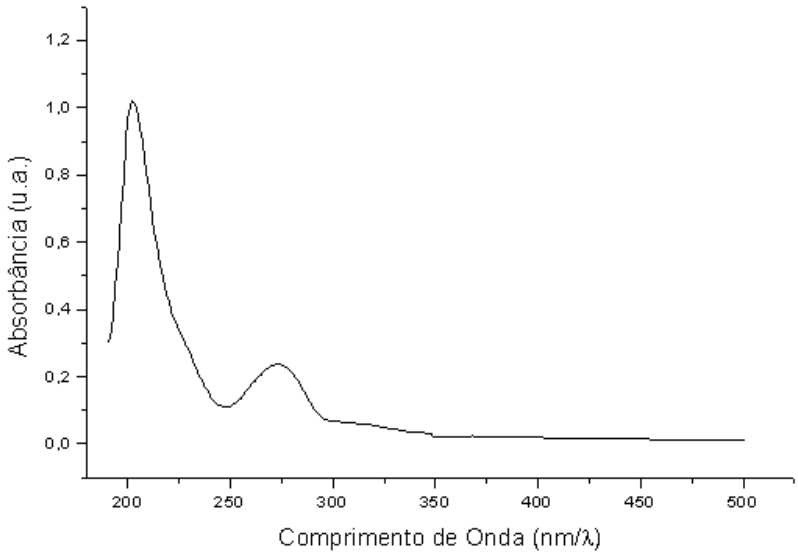

Figura 14 - Espectro UV/Vis das amostras de retenção de Hidrogel + Cafeína 5%

Os resultados de permeação da cafeína *in vitro,* utilizando *biomembrana* de pele de cobra se mostraram positivos principalmente quando associado à onda sônica terapêutica, no entanto é importante referir, a partir da leitura do gráfico da Figura 14

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

que houve incremento da banda na região de absorbância característico da cafeína, em 272 nm, por volta de 0,2 (de absorbância), indicando de que boa parte do ativo ficou retido no modelo de biomembrana, em termos de concentração de cafeína esta absorbância corresponde a 5,25 10^{-5} mol L^{-1} de cafeína retida na biomembrana analisada. Ainda, relacionando-se os resultados obtidos em termos de liberação, permeação e retenção da cafeína, estes demonstram a tendência de correlação entre os resultados, pois constata-se que a quantidade de cafeína liberada é maior que a quantidade de cafeína permeada, podendo portanto esta diferença ser relativa à quantidade de cafeína retida na biomembrana de pele de cobra.

Estudos recentes de penetração cutânea da rutina tiveram resultados semelhantes aos supracitados. Baby et al. (2008) utilizaram muda de pele de cobra de *Crotalus durissus* como modelo de biomembrana alternativo, não evidenciaram a passagem da substância ativa para a fase receptora através do estrato córneo de *C. durissus*, porém, verificaram, a retenção cutânea da rutina no modelo de biomembrana.

Os autores referenciados acima demonstraram alternância metodológica no seu estudo em função do tempo para coleta das amostras, aumentando este para ter maior confiabilidade nos resultados. Entretanto Montenegro e seus colaboradores, (2007) pesquisaram a penetração cutânea da quercetina e seus ésteres de 3-*o*acila através da pele humana, verificando a penetração cutânea da quercetina e desnorteando que o período de tempo de realização do experimento é um fator de extrema relevância. O estudo sugere que o tempo de duração para o ensaio de difusão deve ser igual ou superior a 22 horas, pois somente a partir deste período houve a identificação e quantificação da quercetina no fluido receptor das células de difusão utilizadas.

Em face exposto, fica implícita a importância de futuros estudos relacionando a aplicação tópica da cafeína com e sem ultrassom, grau de permeação para a célula receptora e valores de retenção, sendo todas estas variáveis analisadas em função do tempo de contato do ativo com a biomembrana.

Diante dos resultados obtidos, percebe-se que há a ocorrência de um aumento de liberação e permeação de cafeína para o sistema receptor, devido à aplicação do US

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

terapêutico, sendo este um aspecto positivo para aplicações fisioterapêuticas, porém, há o indicativo de oxidação, ou seja, alteração da estrutura da molécula de cafeína, sendo este um aspecto negativo, já que a aplicação da cafeína, em termos terapêuticos, ocorre devido às características que a molécula possui em função de sua estrutura química. Estudos posteriores são necessários para verificar se a atividade da cafeína é mantida após a ação da onda sônica, como por exemplo, a atividade anti-inflamatória, e ainda estudos de toxicidade para avaliar possíveis ações tóxicas no organismo.

Ainda, estabelecendo uma relação entre as concentrações de cafeína detectadas nas soluções receptoras, nos ensaios de difusão vertical com aplicação de ultrassom terapêutico, comparando-se os ensaios de liberação, permeação e retenção, tem-se que nos ensaios de liberação a concentração foi de 1,73 10^{-4} mol L^{-1}, sendo que este valor de concentração representa a cafeína liberada do hidrogel para o meio, desta 5,25 10^{-5} mol L^{-1} permanece retido na biomembrana, e 1,04 10^{-4} mol L^{-1} permeia através da biomembrana para a solução receptora, indicando que da cafeína liberada, uma pequena quantidade permanece retida na biomembrana e a maior parte permeia para a solução receptora, sendo este aspecto positivo em termos clínicos quando nos tratamentos fisioterapêuticos busca-se a permeação do fármaco pelo estrato córneo da pele.

4.3 Análises do gel comercial contendo *Ilex paraguariensis*

Após a realização das análises com o padrão hidrogel+cafeína 5%, a proposta metodológica foi repetida, porém com um gel comercial composto de ativos de arnica (*Arnica montana*), castanha da índia (*Aesculus hippocastanum*), *Centella asiatica*, cavalinha (*Equisetum giganteum*), algas fucus (*Fucus vesiculosus*), hera (*Hedera helix*) e erva-mate (*Ilex paraguariensis)***,** que tem no seu metabolismo secundário a cafeína (SCHUBERT, 2006). O objetivo principal do estudo destes parâmetros é trazer a avaliação eletroquímica e de permeação para um sistema real de aplicabilidade clínica dentro da fisioterapia regenerativa ou dermato-funcional.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

4.3.1 Análise de voltametria cíclica do gel comercial

Na Figura 15 tem-se o voltamograma cíclico do Gel comercial antes e após a aplicação de ultrassom por 10 minutos.

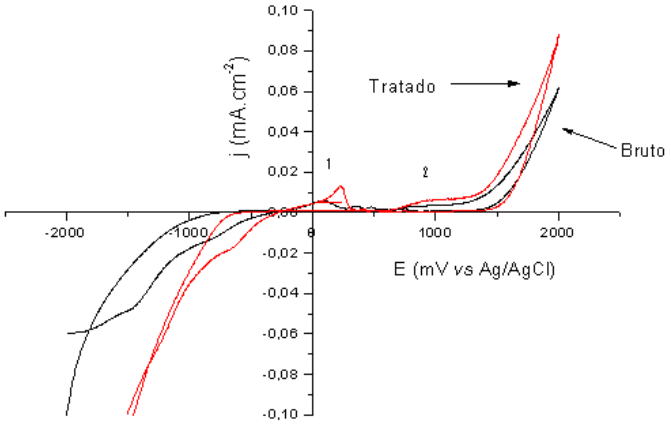

Figura 15 - Voltamograma cíclico do Gel comercial antes e após a aplicação de ultrassom – 10 minutos, v = 20 mV/s

Na avaliação da Figura 15, tem-se duas regiões importantes para este estudo, picos 1 e 2 representados no gráfico numericamente, no pico de oxidação 1, tem-se o potencial característico da *Arnica montana*, descrita em regiões próximas a 0,39 V (GIL; GONÇALVES; LUCIO, 2007., SANTOS; MAZO; CAVALHEIRO, 2008), sendo este um pico de retorno, representando processos de adsorção eletrodo/solução.

Na Figura 16 tem-se um zoom do voltamograma cíclico do Gel comercial antes e após a aplicação de ultrassom por 10 minutos, elucidando a região do propilenoglicol e da cafeína e das demais substâncias orgânicas presentes na amostra (região de oxidação 2).

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

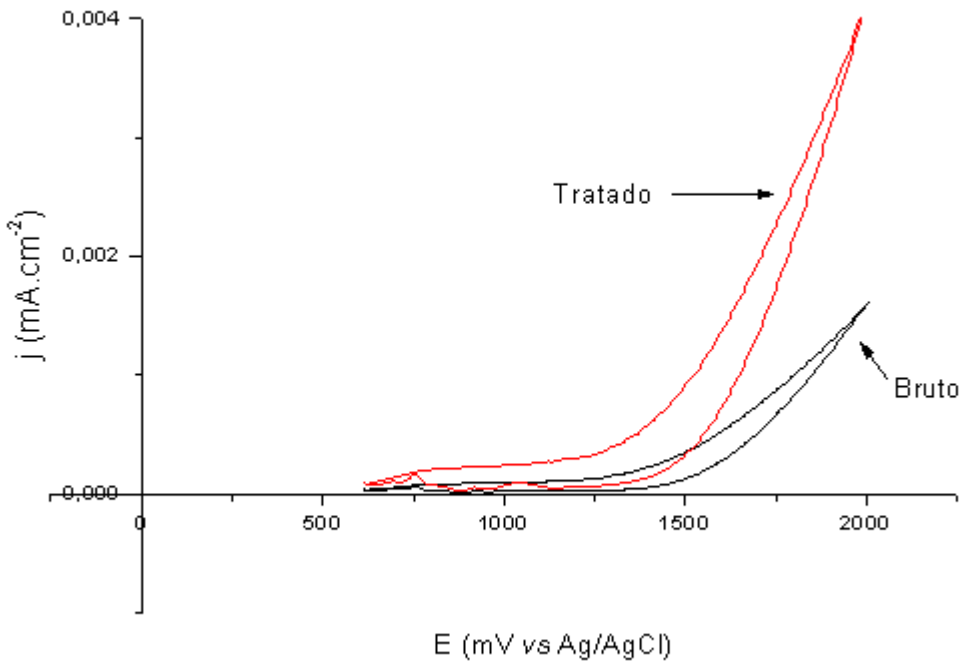

Figura 16 - Zoom da janela eletroquímica

Na avaliação das Figuras 15 e 16, observa-se que a amostra de Gel comercial submetida ao US terapêutico, apresentou alteração eletroquímica após exposição por 10 minutos de US terapêutico, pela visualização da alteração da área do voltamograma. Confirmando a análise, o cálculo da carga elucida um acréscimo de Q = $7{,}804.10^{-2}$ C cm^{-2} e Q = $1{,}023.10^{-1}$ C cm^{-2}, do gel comercial bruto para o tratado respectivamente.

A Figura 16 mostra o *zoom* na janela eletroquímica, confirmando a alteração do sistema após a aplicação do ultrassom terapêutico, dando ênfase a uma onda de oxidação na região de orgânicos semelhante aos resultados obtidos para o sistema hidrogel+ cafeína 5%

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

4.3.2 Análise de pH e potencial de circuito aberto do gel comercial

A Tabela 2 apresenta a variação do potencial do circuito aberto (PCA) antes e após a aplicação do ultrassom no modo contínuo, em Gel comercial, bem como o valor de pH destes sistemas.

Tabela 2 - Variação de pH e Potencial de Circuito Aberto (PCA) do gel comercial, antes e após a exposição à onda sônica terapêutica no modo contínuo

	pH		PCA (mV)	
	Média	**DP(± σ)**	**Média**	**DP(± σ)**
Gel Comercial Bruto	6,67	0,01	12,63	0,35
Gel Comercial Tratado	6,72	0,05	9,3	2,17

Na avaliação da Tabela 2, verifica-se uma diminuição do potencial de circuito aberto da amostra de gel comercial ao final do tempo de exposição da onda sônica sendo que a análise estatística mostrou significância ($p<0,05$).

Em relação ao pH, verifica-se que o gel comercial, elucida um ligeiro incremento de seu pH. Estes resultados não apresentaram significância estatística ($p<0,05$). Essa discrepância entre acréscimo e decréscimo dos resultados no gel comercial e Hidrogel+Cafeína (Tabela 1), provavelmente está relacionado à constituição base dos sistemas estudados, uma vez que a constituição base do hidrogel é propilenoglicol e a base do gel comercial, além do propilenoglicol, é com ativos de *Arnica montana*, *Aesculus hippocastanum*, *Centella asiática*, *Equisetum giganteum*, *Fucus vesiculosus*, *Hedera helix*, *Ilex paraguariensis*, ou seja, constitui-se em uma amostra mais complexa.

4.4 Análises espectrofotométricas

4.4.1 Análise de liberação do gel comercial

O gráfico apresentado na Figura 16 foi obtido a partir da análise da absorbância das diferentes amostras de Gel Comercial, com e sem a aplicação do US, nos ensaios de liberação com membrana de acetato de celulose, através de varredura em toda a

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

faixa espectral (195-1100 nm), sendo considerados os valores próximos a 280 nm como a região de absorbância máxima.

Na Figura 17 tem-se espectro UV/Vis das amostras de Gel Comercial, com e sem exposição ao US terapêutico no modo contínuo.

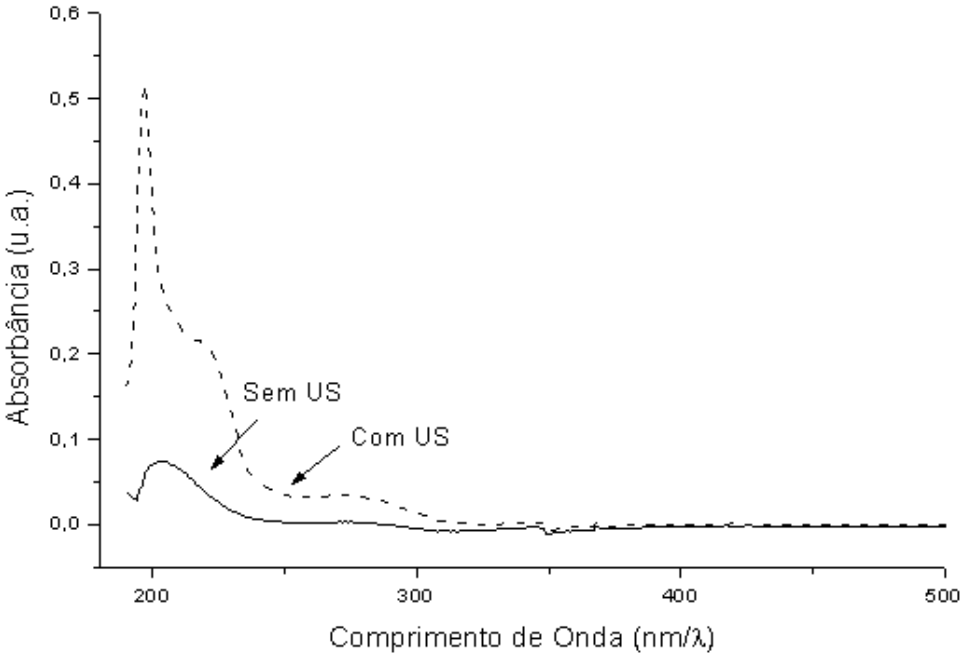

Figura 17 - Espectro UV/Vis da solução receptora das amostras de Gel comercial, com e sem exposição ao US terapêutico no modo contínuo

A Figura 17 elucida a diferença de absorbância entre as amostras, sendo que o Gel comercial antes da aplicação de US apresenta um discreto incremento da banda (λ = 272 nm), e quando este foi associado ao tratamento com US terapêutico revelou um maior incremento da banda na região de absorbância característico da cafeína por volta dos 272 nm, sugerindo então uma liberação mais acentuada do ativo para o meio, provavelmente por conta da ação física da onda sônica, com valores de absorbância por volta de 0,05.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

Ou seja, o gráfico evidenciou incrementos de absorbância nas bandas características da cafeína sugerindo uma maior liberação dos ativos quando associado à onda sônica terapêutica, ou seja, o US atuou como facilitador no processo de liberação dos ativos. Os resultados supracitados confirmam os obtidos nas análises de permeação da hidrogel+cafeína (Figura 13), sendo que está diferença de absorbância entre Hidrogel+cafeína e Gel comercial, provavelmente está relacionada ao grau de concentração do ativo na amostra, que no hidrogel+cafeína é de 5% e no Gel comercial não é disponibilizado pelo fabricante.

4.4.2 Análise de permeação do gel comercial

O gráfico da Figura 18 foi obtido a partir da análise da absorbância das diferentes amostras de Gel comercial, com e sem a aplicação do US, nos ensaios de permeação do Gel comercial em biomembrana de pele de cobra, através de varredura em toda a faixa espectral (195-1100 nm), sendo considerados os valores próximos a 280 nm como a região de absorbância máxima.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

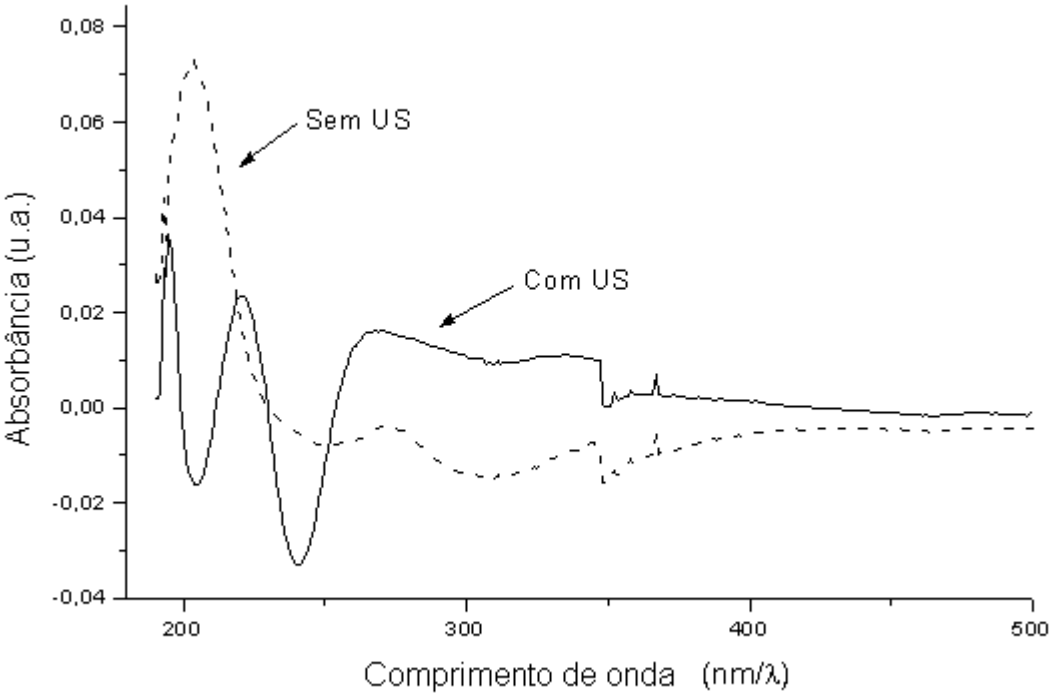

Figura 18 - Espectro UV/Vis da solução receptora das amostras de Gel Comercial, com e sem exposição ao US terapêutico no modo contínuo

A Figura 18 sugere uma discreta diferença de absorbância entre as amostras avaliadas nas diferentes faixas, já que os valores de absorbância são extremamente baixos. Os picos apresentados podem ser característicos dos ativos que compõe o produto comercial além da cafeína apontada na faixa de absorbância de λ = 272 nm, ou seja, o gráfico pode elucidar a permeação de alguns ativos que compunham o produto de venda comercial, a partir do aparecimento de faixas características como, por exemplo, o pico de 210 nm da Centella asiatica (LEAL, 2006), porém devido aos baixos valores de absorbância esta não é uma análise conclusiva, demonstrando a dificuldade de permeação dos princípios ativos pela muda de pele de cobra. Portanto faz-se necessário o estudo em separado dos ativos para uma maior compreensão dos resultados.

Os resultados de permeação do gel comercial *in vitro* utilizando biomembrana de pele de cobra foram positivos no sentido de corroborar com os resultados obtidos nas

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

análises de liberação e permeação da cafeína (Figuras 12 e 13), podendo comprovar em um sistema real que a onda sonora de alta frequência tem a capacidade de acelerar o processo de permeação. O gráfico da Figura 18 ainda indica a importância de realizar futuros estudos a cerca de cada um dos ativos constituintes nos complexos comerciais, em termos liberação, permeação e alteração eletroquímica.

4.5 Avaliação da utilização de ultrassom terapêutico

Além dos estudos *in vitro* realizados, buscou-se uma avaliação da aplicação junto a clínicas fisioterapêuticas em termos de utilização do US terapêutico e de princípios ativos. Na Figura 19 têm-se os resultados obtidos a partir da aplicação dos questionários referenciados na metodologia, onde se procura identificar o uso de Ultrassom terapêutico em atendimentos fisioterapêuticos.

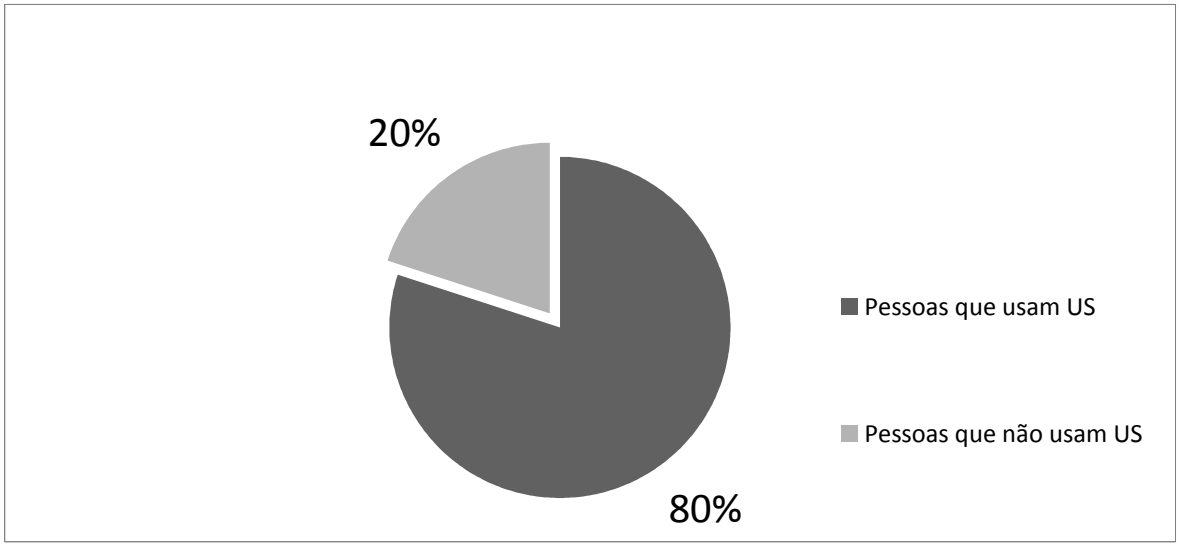

Figura 19 - Utilização de Ultrassom terapêutico por profissionais fisioterapeutas das clínicas do Vale do Taquari-RS

Avaliando o gráfico da Figura 19, pode-se inferir em uma ampla utilização do ultrassom nas condutas fisioterapêuticas, perfazendo 80% dos entrevistados. Os resultados obtidos corroboram com o descrito na literatura, onde o ultrassom é apontado como uma ferramenta amplamente utilizada devido às suas características

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

vantajosas, como refere Scalassara et al. (2002), em seu estudo quando fala sobre as ondas utilizadas com a finalidade de diagnosticar patologias. Costa et al. (2008), relatam a importância do ultrassom e sua larga utilização em Fisioterapia já por algumas décadas, sugerindo que é uma das opções em terapia por diatermia.

Na Figura 20 tem-se os resultados obtidos a partir da aplicação dos questionários, arguindo se quando utilizado o Ultrassom terapêutico, há a associação com produtos (géis) contendo princípios ativos derivados de produtos naturais.

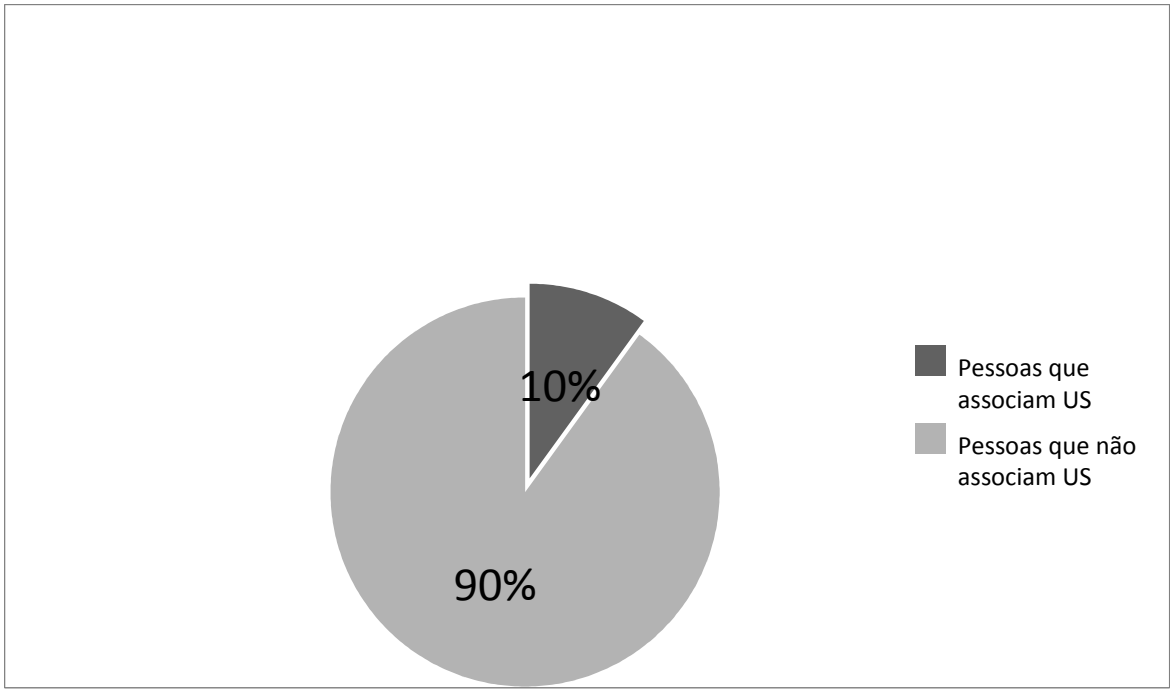

Figura 20 – Associação do Ultrassom terapêutico com produtos (géis) contendo princípios ativos derivados de produtos naturais, por profissionais fisioterapeutas nas clinicas do Vale do Taquari-RS

Na Figura 21 têm-se os resultados obtidos a partir da aplicação dos questionários, interrogando se quando utilizado do Ultrassom terapêutico, há a associação com produtos (géis) contendo cafeína.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

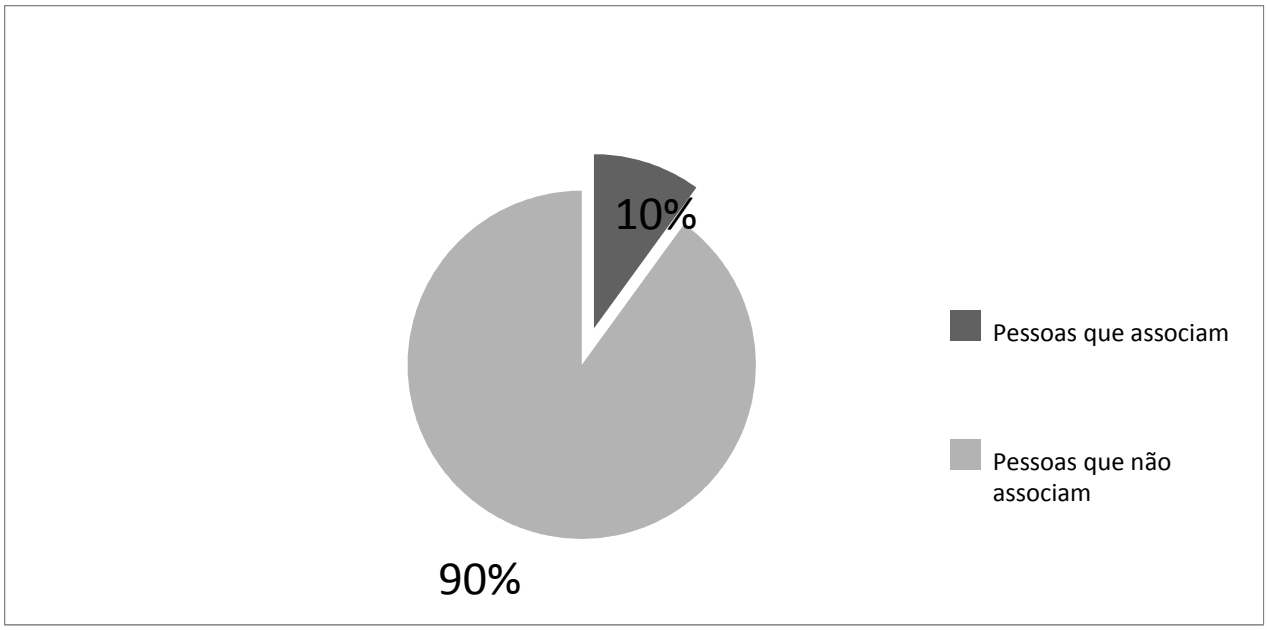

Figura 21 – Associação do Ultrassom terapêutico com produtos (géis) contendo cafeína, por profissionais fisioterapeutas nas clinicas do Vale do Taquari-RS.

Em contraponto, aos resultados encontrados na avaliação do uso do US (Figura 18), os gráficos da Figura 20 e 21 inferem em uma a baixa utilização da técnica de fonoforese nas clínicas de fisioterapia, onde apenas 10% dos entrevistados confirmaram o uso de produtos com ativos, com a finalidade de acelerar o processo de tratamento estético e de reabilitação fisioterapêutica. A não utilização da técnica por parte de todos os terapeutas pode ser atribuído à falta de conhecimento científico acerca do tema, ou a falta de dados comprobatórios da eficácia desses princípios ativos quando associados ao US. Segundo Low e Reed (2001), a eficácia dos tratamentos associado ao US ainda é incerto, mesmo após o uso clínico disseminado e numerosos estudos relatados. Os autores ainda ponderam que várias revisões destas pesquisas refletem essa incerteza, criticam grande parte da pesquisa publicada e pedem novos estudos.

Estes autores, ainda discutem que as mesmas considerações feitas para o uso de ultrassom se aplicam para justificar o menor uso da técnica de (apenas 10% dos entrevistados mencionaram a utilização) fonoforese. Provavelmente pelo fato nesta técnica o efeito do fármaco precisa ser considerado; por exemplo, fármacos anti-

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

inflamatórias podem suprimir as reações inflamatórias necessárias, como infecções locais da pele, permitindo que se tornem mais sérias.

Os resultados obtidos inferindo no baixo uso da técnica de fonoforese justificam este estudo, ressaltando a importância de pesquisas em torno desta técnica que de acordo com Prentice (2002), tem como grande vantagem o fato de que o medicamento pode ser distribuído por intermédio de uma técnica segura, indolor e não invasiva.

Kitchen e Bazin (2003) reforçam a importância do conhecimento científico, relatando que quando profissionais clínicos sabem como uma modalidade funciona, há a possibilidade de prever, com alto grau de precisão, qual deve ser o regime ideal de tratamento correto para uma lesão em particular, sem precisar apoiar-se apenas na experiência clínica e em boatos.

Cabe destacar que o estudo caracteriza-se como sendo qualitativo e portanto não representa significativamente os fisioterapeutas da região estudada, porém pode fornecer subsídios para futuros trabalhos a serem desenvolvidos nesta área do conhecimento.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesta pesquisa elucidaram a possibilidade de detecção da degradação da Cafeína e do gel comercial através da técnica de voltametria cíclica e complementada pelas análises de pH e potencial de circuito aberto.

Sugere-se que a ação física do ultrassom (US), no modo contínuo, tem a capacidade de oxidar os sistemas analisados. As amostras de hidrogel e hidrogel + cafeína, apresentaram ainda um deslocamento da Reação de Desprendimento de Oxigênio (RDO) ou Reação de Evolução de Oxigênio (REO), apresentando pico característico de sistemas que possuem espécies orgânicas, em potenciais em torno de 1 V. Já as amostras de gel comercial, também apresentaram alterações eletroquímicas após exposição do US terapêutico, sendo que pode-se evidenciar a partir dos resultados no voltamograma picos relativos à *Arnica montana* descrita em regiões próximas a 0,39 V.

Considerando que a onda sônica terapêutica associada a agentes com princípios ativos é uma técnica diariamente elencada na prática clínica fisioterapêutica e sabendo-se que houve uma degradação dos sistemas estudados, após a aplicação da técnica de fonoforese por 10 min no modo contínuo, torna-se fundamental o desenvolvimento de um conhecimento aprofundado de seus efeitos ao interagir com tecidos, ou seja,

a ação anti-inflamatória e lipolítica dos ativos estudados, cientificamente comprovados, uma vez que a onda sônica pode ocasionar a alteração da estrutura química dos ativos.

Outro fator relevante na prática clínica é a permeação dos ativos nos tecidos superficiais. Os resultados do presente estudo sugerem uma maior liberação da cafeína quando associado à onda sônica terapêutica, ou seja, o ultrassom apresentou-se como facilitador no processo de liberação da cafeína para o meio.

Conforme mencionado acima, os valores de absorbância na análise de permeação em sistema de difusão vertical utilizando biomembrana de pele de cobra, permitem concluir que o ultrassom terapêutico tem a capacidade de acelerar o processo de permeação da cafeína, consequentemente a onda sônica de alta freqüência pode ser considerada um agente facilitador de permeação cutânea da cafeína.

As inferências obtidas a partir da aplicação dos questionários, que buscava avaliar o uso de ultrassom em atendimentos fisioterapêuticos, mostraram larga utilização da técnica nas condutas regenerativas principalmente ligadas à traumatologia e ortopedia pelos fisioterapeutas entrevistados, corroborando com dados descritos na literatura e contrapondo com o baixo índice de profissionais que se utilizam da técnica denomina fonoforese, quando associada aos ativos relacionados na literatura como opção de veículo para onda sônica e abordados nesta dissertação.

É importante referir que a real causa para o baixo uso da técnica não foi objeto de estudo, porém fica esta questão como sugestão para trabalhos futuros, com a finalidade de discutir, com base nas referências bibliográficas a não utilização da técnica por parte de todos os terapeutas, podem ser atribuído à falta de conhecimento científico acerca do tema.

Ainda para trabalhos futuros sugere-se:

- Avaliar as alterações específicas de cada ativo que compoem o gel comercial antes e após a aplicação do Ultrassom.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

- Avaliar a permeação e liberação de cada ativo que compõem o gel comercial antes e após a aplicação do Ultrassom.

- Avaliar os efeitos e a atividade da cafeína ao interagir com tecidos após a incidência do ultrassom terapêutico.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

REFERÊNCIAS

AGNE, J. E. **Eletrotermoterapia:** teoria e prática. 1. ed. Santa Maria: Pallotti, 2004.

ANTONIO, M. **Permeação cutânea *in vitro* como ferramenta auxiliar para o estudo de formulações semi-sólidas de cetoconazol para aplicações.** Dissertação de Mestrado. Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná – UFPR, Paraná, 2007.

BABY, A. R; HAROUTIOUNIAN-FILHO, C. A; SARRUF, F. D; TAVANTE-JÚNIOR, C. R; PINTO, C. A. S .O; ZAGUE, V; ARÊAS, .P. G; KANEKO, T. M; VELASCO, M. V. R. Estabilidade e estudo de penetração cutânea in vitro da rutina veiculada em uma emulsão cosmética através de um modelo de biomembrana alternativo. **Rev. Bras. Cienc. Farm**, v.44, n.2, p.233-248, 2008.

BARNES, D. **Efeito do Ultra-som sobre a Nocicepção e o Processo Inflamatório em Modelos Animais e sobre a Estrutura Química de Fármacos.** Dissertação de Mestrado. PPGAD. Centro Universitário UNIVATES, 2008.

BIANCHETTI, P; TASSINARY, J. A. F; CERUTTI, D. G. U; BARNES, D; ETHUR, E. M; STÜLP, S. Avaliação eletroquímica e espectrofotométrica de soluções de rutina submetidas a ultrassom terapêutico. **Revista Liberato**,v.10, n.14, p. 139-148, 2009.

BIANCHETTI. P. **Avaliação Das Variáveis Associadas Ao Uso De Fonoforese Na Veiculação Do Extrato Glicólico De Arnica Montana.** Trabalho de conclusão de curso apresentado à banca examinadora para obtenção do título de bacharel em fisioterapia. Centro Universitário UNIVATES, 2009.

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

BOLFE, V. J; GUIRRO, R. R. J. Electrical resistance of gels and liquids used in electrotherapy for electrode-skin coupling**. Rev Bras Fisioter**, v. 13, n. 6, p. 499-505, 2009.

CAMPOS, M. S. M. P. **Influencia Do Ultra-Som Na Permeação Cutanea Da Cafeina: Estudo Em Fragmentos De Pele E Em Adipocitos Isolados De Suínos.** Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, 2004.

CERUTTI, D. G. U**. Estudo dos Efeitos do Ultra-som na Veiculação de Fitoterápicos através da Análise da Degradação da Arnica Montana.** Dissertação de Mestrado. PPGAD. Centro Universitário UNIVATES, 2009.

COSTA, R. M; BUNN P. S; MAGGI, L. E; VON KRUGER, M. A; PEREIRA, W. C. A. **Phantom com propriedades termocromáticas para visualização da radiação gerada por transdutores Ultra-sônicos de fisioterapia.** 21º Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, 2008.

CHORILLI, M; CARVALHO, L. de S; PIRES-DE-CAMPOS, M. S. M; LEONARDI, G. R; RIBEIRO, M. C. de A. P; POLACOW, M. L. O. Avaliação Histológica da Hipoderme de Suínos Submetida a Tratamento Mesoterápico com Tiratricol, Cafeína e Hialuronidase. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 24, n. 1, p 14 – 18, 2004.

CONCEIÇÃO, D. B; HELAYEL, P. E; FILHO, G. R. O. Bloqueios Nervosos Guiados por Ultra-Som**. Rev Bras Anestesiol**, , v. 56, n. 5, p 507 - 510, 2007.

CUNHA, A. et al. **Plantas e produtos vegetais em cosmética e dermatologia.** Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2004.

Estrato córneo da pele humana. Disponível em: http://cours.cegep-st-jerome.qc.ca/101-nya-.b/Organisationcellulaire/photoepithpeau.htm. Acesso em: 27 janeiro de 2011.

FERREIRA, L; STATTMILER, C; BELO, F; PINHEIRO, H; PEDROSA, L; GASPAR, P; COUTINHO, I; DIAS, N. Ultra-som e Meios de Contacto: medição das condutibilidades específicas. **Arquivos de Fisioterapia**. v, 1, p.14 -22, 2006.

FERREIRA, S. B; GONZAGA, D. T. G; SANTOS, W. C; ARAÚJO, K. G. L; FERREIRA, V. F. β-lapachona*:* Sua importância em química medicinal e modificações estruturais **Rev. Virtual Quim***.* v. 2, n. 2, p 140 – 160, 2010.

FERLA, N. J; MARCHETTI, M. M; SIEBERT, J. C. Acarofauna (acari) de erva-mate (Ilex paraguariensis st. hil.: aqüifoliaceae) no estado do Rio Grande do Sul. **Biociências**, Porto Alegre, v. 13, n. 2, p. 133-142, dez. 2005.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

FILHO, G. R. J. et al. Ensaio clínico randomizado, duplo-cego, comparativo entre a associação de cafeína, carisoprodol, diclofenaco sódico e paracetamol e a ciclobenzaprina, para avaliação da eficácia e segurança no tratamento de pacientes com lombalgia e lombociatalgia agudas. **Acta ortop. bras**. v.14, n.1, p. 11-16, 2006.

FURINI N. JR; LONGO, G. J. **Ultra-som.** 2. ed. Amparo: KLD – Biossistemas Equipamentos Eletrônicos Ltda, 2002.

GARBELLINI, G. S; SALAZAR-BANDA, G. R; AVACA, L. A. Potencialidades do uso de ultrassom na determinação do pesticida carbaril empregando eletrodos de diamante. **Química Nova**, v.10, n.0, p. 1-5, 2008.

GIL, E. S; GONÇALVES, A. L. S; LUCIO, T. C. **Determinação do potencial anódico em estado sólido: Uma ferramenta preditiva para determinação do potencial antioxidante de fitoterápicos.** In: Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2007, Águas de Lindóa-SP. São Paulo: Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2007.

GUIRRO, E. C. O; GUIRRO, R. R. J. **Fisioterapia dermato-funcional:** fundamentos, recursos, patologias. 3. ed. Rev. ampl. Barueri: Manole, 2007.

GUIRRO, E. C. O; GUIRRO, R. R. J. **Fisioterapia Dermato-funcional**. 3. ed. São Paulo: Manole, 2002.

GOMES, R. K. **Cosmetologia:** descomplicando os princípios ativos. São Paulo: Livraria Médica Paulista, 2009.

HADGRAFT, J. Skin Deep. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.** v. 58, n. 2, p. 291-299, 2004.

HAIGH, J.M. et al. In vitro permeation of progesterone from a gel through the shed skin of three different snake species. International Journal of Pharmaceutics. v. 170, p.151-156, 1998.

HEWLTT, P. G. **Física conceitual.** 9. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

HSIEH, Y. L. Effects of Ultrasound and Diclofenac Phonophoresis on Inflaniniatory Pain Relief: suppression of indudble nitric oxide synthase in arthritic rats**. Physical Therapy**. v, 86, p. 39-49, 2006.

JESUS, G. S; FERREIRA, A. S; MENDONÇA, A. C. Fonoforese x permeação cutânea. **Fisioterapia em Movimento**, Curitiba, v.19, n.4, p. 83-88, out./dez., 2006.

KITCHEN, S. **Eletroterapia:** prática baseada em evidências. 11. ed. São Paulo: Manole, 2003.

KITCHEN, S; BAZIN, S. **Eletroterapia de Clayton.** 10. ed. São Paulo: Manole, 1998.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

KOROLKOVAS, A. **Química farmacêutica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, c1988.

LAVAGNOLI, L. V; NAVARRO, M; GIOVANI, de W. F; ROMERO J. R. Oxidações Eletroanáliticas de Substratos Orgânicos em sistema Bifásico Utilizando um Complexo de Rutênio (IV). **Química Nova**, v. 18, n. 2, p. 30 – 42, 1995.

LEAL, C. P. S. **Isolamento e quantificação de marcadores químicos de Centella Asiática L.E Cynara Scolymus.** Disseratação de Mestrado, Programa de Pós Graduação em Quimica. Universidade Federal do Paraná, 2006.

LOPES, L.G, et al. Análise morfometrica de tecido muscular de coelhos submetidos a ultra-som pulsado e continuo de 1 MHz. **Fisioterapia e pesquisa**. v.12, n.3, p.15:21, 2005.

LOURENÇÃO, B. C; MEDEIROS, R. A; ROCHA-FILHO, R. C; MAZO, L. H; FATIBELLO-FILHO, O. Simultaneous voltammetric determination of paracetamol and caffeine in pharmaceutical formulations using a boron-doped diamond electrode. **Talanta.** v.78, n.3, p.748-752, 2009.

LOW, J; REED, A. **Ultra-som terapêutico** In: Eletroterapia Explicada Princípios e Prática. 3. ed. São Paulo: Manole, 2001.

MARTINS, M. R. F. M; VEIGA, F. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.2, n. 2, 2002.

MARTINES, M. U; DAVOLOS, M. R; JAFELICCI JÚNIOR, M. O. efeito do ultra-som em reações químicas. **Química Nova**, v.23, p.251-256, 2000.

MARIA, C. A. B; de MOREIRA, R. F. A; Cafeína: Revisão Sobre Métodos De Análise. **Quim. Nova**, v. 30, n. 1, p. 99-105, 2007.

MEGRAB, N. A; WILLIAMS, A. C; BARRY, B. W. O. Estradiol permeation across human skin, silastic and snake skin membranes: the effects of ethanol/water co-solvent systems. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 116, p.101 - 112, 1995.

MITRAGOTRI. S; KOST, J. Low-frequency sonophoresis**. A review. Advanced Drug Delivery Reviews.** v. 56, p. 589– 601, 2004.

MOTA, A. C. V; VOLPATO, N. M; FREITAS, Z. M. F; SANTOS, E. P. Estudo de liberação in vitro do fi ltro solar p-metoxicinamato de octila incluso em lipossoma e â-ciclodextrina. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl**., v. 29, n.3, p. 285-289, 2008.

MONTENEGRO, L; CARBONE, C; MANISCALCO, C; LAMBUSTA, D; NICOLOSI, G; CINZIA A; VENTURA; PUGLISI, G. In vitro evaluation of quercetin-3-O-acyl esters as topical prodrugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 336, n.2, p. 257 - 262 , 2007.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

NOEL, M; VASU, K. I. Cyclic Voltammetry and the Frontiers of Electrochemistry. **Aspect Publications Ltd.**, 1990, 702p.

NUNES, R. S; AZEVEDO, J. R; VASCONCELOS, A. P; PEREIRA, N. L.; Estudo de padronização da pele de cobra espécie – *Boa constrictor* - como modelo de estrato córneo para permeação de fármacos. **Scientia Plena.** v. 1, n. 7, p 171-175, 2005.

OLIVEIRA-BRETT, A. M; GOULART, M. O. F; ABREU F. C. Reduction of lapachones and their reaction with L-cysteine and mercaptoethanol on glassy carbon electrodes. **Bioelectrochemistry.,** v**.** 56, p. 53 – 55, 2002.

PHILIPPI, Jr. A. **Interdisciplinaridade em Ciências Ambientais /** A. Philippi Jr., C. E. M. Tucci, D. J. Hogan, R. Navegantes. - São Paulo : Signus Editora, 2000.

PRENTICE, W. E. **Técnicas de reabilitação em medicina esportiva.** São Paulo: Manole, 2002.

PRENTICE, W. E; VOIGHT, M. L. **Técnicas em Reabilitação Musculoesquelética.** Porto, Alegre: Artmed, 2003.

PRENTICE, W. E. **Modalidades Terapêuticas para Fisioterapeutas.** 2. Ed, Porto Alegre: Artmed, 2004.

RANG, H. P, et al*.* **Farmacologia.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

RAMALHO, A. T; CURVELO, S. Substâncias Cosmetologicamente Activas, Caracterização, Andicação, Eficácia e Segurança: Cafeína*.* **Revista Lusófona de Ciências e Tecnologias da Saúde**. v. 3, n. 2, p. 183-190, 2006.

RODRIGUES, A. G; SANTOS, M. G. dos; AMARAL, A. C. F**. Políticas Públicas em Plantas Medicinais e Fitoterápicos.** In.: BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos/Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 148 p. – (Série B. Textos Básicos de Saúde).

ROGERO, S. O; LUGAOA, A. B; LKEDAB, T. I; CRUZB, A. S. Teste in vitro de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. **Material Research**, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.

SCALASSARA, P. R; NEGRÃO, F. A; TSUZUKI, E. M; MACIEL, C. D. Medida de Velocidade de Propagação do Som e Espessura de Materiais por Ultra-som. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 23, n. 1, 2002.

SANGHAVI, B. J; SRIVASTAVA, A. K. Simultaneous voltammetric determination of acetaminophen, aspirin and caffeine using an in situ surfactant-modified multiwalled

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

carbon nanotube paste electrode. **Electrochimica Acta**, v. 55, n. 28, p. 8638-8648, 2010.

SANTOS, S. X. dos; MAZO, LUIZ. H; CAVALHEIRO, T. G. The Use of a Graphite-Silicone Rubber Composite Electrode in the Determination of Rutin in Pharmaceutical Formulation**. Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 8, p. 1600-1606, 2008.

SANTOS, M. H dos, et al. Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade antioxidante do café (Coffea arabica). **Química Nova**. v.30, n.3, 2007.

SCHUBERT, A; ZANIN, F. F; PEREIRA, D. F; ATHAYDE, M. L. Variação anual de metilxantinas totais em amostras de Ilex paraguariensis A. St. - Hil. (erva-mate) em Ijuí e Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. **Química Nova**. v. 29, 2006.

VERGARA, S. C. **Projetos e Relatórios de Pesquisa em Administração.** São Paulo: Atlas, 2000.

WHO. Guidelines on Good Agricultural and Collection Practices (GACP) for Medicinal Plant. **Geneve: World Health Organization**, v.1, 2003.

WIDLER, N; SIGRIST, A; GAFNER, F.M. Lipid analysis and transepidermal water loss in snakes. **IFSCC Magazine**. v.5, n.1, p.24-29, 2002.

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

APÊNDICE

APÊNDICE A - Questionário

1 – Nos atendimentos fisioterapêuticos, há utilização de Ultrassom terapêutico?
( ) Sim
( ) Não

2 – Quando da utilização do Ultrassom terapêutico, há a associação com produtos (géis) contendo princípios ativos derivados de produtos naturais?
( ) Sim
( ) Não

3 – Nestas aplicações, há a associação com produtos (géis) contendo cafeína?
( ) Sim
( ) Não

4 – Nos produtos (géis) utilizados associados com o Ultrassom terapêutico, há presença de uma ou mais das plantas abaixo, indique quais:
( ) Erva Mate – Ilex paraguaiensis
( ) Arnica - Arnica montana
( ) Babosa - Aloe vera

5 – Em sua prática clínica, a que se destina a aplicação do Ultrassom terapêutico?

6 – Qual a finalidade da utilização de cosméticos contendo princípios ativos no tratamento fisioterapêutico?

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)

BDU – Biblioteca Digital da UNIVATES (http://www.univates.br/bdu)