

## Desenvolvimento e avaliação da atividade antileishmania de microemulsão contendo a fração resinosa da oleoresina de Copaíba

Adonay da Silva Costa<sup>1</sup>, Adiel Dayan Silva da Silva<sup>2</sup>, Rebecca Sayuri Barbosa Hanada<sup>3</sup>, Waldireny Rocha Gomes<sup>4</sup>, Emersom Silva Lima<sup>5</sup>, Antonia Maria Ramos Franco<sup>6</sup>, Bruno Bezerra Jensen<sup>7</sup>, Kátia Solange Cardoso Rodrigues dos Santos<sup>8</sup>

A oleoresina extraída da copaibeira (*Copaifera* sp.) apresenta propriedades analgésica, anti-inflamatória, antimicrobiana e antileishmania, e apresenta duas frações principais: a volátil, rica em óleos essenciais sesquiterpênicos, e a resinosa, rica em compostos terpênicos. A extração industrial do óleo essencial, que possui valor comercial, ocorre por hidrodestilação ou arraste de vapor, sendo que a fração resinosa costuma ser descartada. O objetivo deste estudo foi reaproveitar a fração resinosa como fase oleosa em sistemas microemulsionados e avaliar a atividade *in vitro* dessas formulações contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Foram preparadas microemulsões do tipo bicontínua e A/O, contendo, respectivamente, 10 e 20% da fração resinosa da oleoresina de Copaíba. Todas as formulações estudadas foram capazes de inibir a proliferação *in vitro* de formas promastigotas de *L. amazonensis*, apresentando valores de IC<sub>50</sub> inferiores a 6,9 µg·mL<sup>-1</sup> após 48 horas de ensaio, indicando eficácia superior à do medicamento padrão para o tratamento da leishmaniose, o Glucantime®, cujo IC<sub>50</sub> foi maior que 100 µg·mL<sup>-1</sup>. A microemulsão com menor teor de oleoresina (10%), mas com maior teor em água (20%), apresentou o menor IC<sub>50</sub> após 24 horas de ensaio (2,7 µg·mL<sup>-1</sup>), indicando que o teor de água da formulação foi importante para a permeação celular.

**Palavras-chaves:** sustentabilidade, *Leishmania* spp., tratamento.

The oleoresin extracted from *Copaifera* spp has analgesic, anti-inflammatory, antimicrobial, antileishmanial properties, and comprises two main fractions: a volatile fraction, rich in sesquiterpene essential oils, and a resinous fraction, rich in terpenoid compounds. Essential oil extraction, which has notable commercial value, is typically performed by hydrodistillation or steam distillation, and the resinous fraction is often discarded. This study aimed to repurpose the resinous fraction as the oil phase in microemulsion systems and to evaluate the *in vitro* activity of these formulations against promastigote forms of *Leishmania amazonensis*. There were obtained bicontinuous and water-in-oil (W/O) microemulsions containing 10% and 20% of the copaiba oleoresin resinous fraction, respectively. All tested formulations were able to inhibit the *in vitro* proliferation of *L. amazonensis* promastigotes, with IC<sub>50</sub> values below 6.9 µg·mL<sup>-1</sup> after 48 hours of exposure—demonstrating greater efficacy than the standard antileishmanial drug, Glucantime®, which IC<sub>50</sub> exceeded 100 µg·mL<sup>-1</sup>. The microemulsion with the lowest oleoresin concentration (10%) but highest water content (20%) exhibited the lowest IC<sub>50</sub> at 24 hours (2.7 µg·mL<sup>-1</sup>), indicating that water content in the formulation plays a key role in improving the cellular permeation.

**Keywords:** sustainability, *Leishmania* spp., treatment.

<sup>1</sup> Farmacêutico pela Universidade Federal do Amazonas (UFAM). ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-8486-1168>.

E-mail: adonaycosta46@gmail.com

<sup>2</sup> Farmacêutico pela UFAM. ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-7138-1269>.

<sup>3</sup> Farmacêutica. Mestranda pelo Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada (PPGIBA-UFAM). ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-0523-1495>.

<sup>4</sup> Doutora em Química pela Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Pesquisadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF-UFAM). ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0699-4993>.

<sup>5</sup> Doutor em Farmácia pela Universidade de São Paulo (USP). Pesquisador do PPGCF-UFAM. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9367-2812>.

<sup>6</sup> Doutora em Biologia Celular e Molecular pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ/RJ). Pesquisadora Titular III do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4300-5325>.

<sup>7</sup> Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica (PPGIF-UFAM). Pesquisador Adjunto do INPA. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9102-9698>.

<sup>8</sup> Doutora em Fármaco e Medicamentos pela Universidade de São Paulo (USP). Pesquisadora do PPGCF-UFAM. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1054-2853>.

## 1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma zoonose tropical negligenciada causada por protozoários do gênero *Leishmania*, parasitas intracelulares do sistema mononuclear fagocítico, transmitidos ao homem pela picada de flebotomíneos dos gêneros *Phlebotomus* (na Europa, Ásia e África) ou *Lutzomyia* (nas Américas)<sup>(1)</sup>. A manifestação clínica da doença depende da espécie infectante e pode ocorrer nas formas visceral (afetando órgãos internos, como fígado e baço), cutânea (também chamada de tegumentar, com ulcerações cutâneas) ou mucocutânea (atingindo mucosas e tecidos adjacentes)<sup>(2)</sup>.

A Leishmaniose Tegumentar (LT) apresenta prevalência crescente nas últimas décadas, com aumento estimado de 174,2% nos casos entre 1990 e 2013. No Brasil, as regiões Norte e Nordeste são as mais afetadas, com, respectivamente, cerca de 235 mil e 72 mil casos registrados pela OMS em 2017. Dentre esses, os estados do Pará e Amazonas foram responsáveis por 58% das notificações<sup>(1)</sup>. Há mais de 20 espécies de *Leishmania* associadas à infecção em humanos, sendo *L. guyanensis* e *L. amazonensis* as espécies causadoras da forma tegumentar mais prevalentes na Região Norte do Brasil<sup>(3)</sup>.

Apesar da existência de medicamentos tópicos, como a pomada de paromomicina e injeções intralesionais de antimoniato de meglumina, ainda não há terapias locais com eficácia superior à dos tratamentos sistêmicos, os quais utilizam miltefosina, isetionato de pentamidina, anfotericina B e derivados antimoniais. Estes tratamentos representam sérios inconvenientes, como toxicidade elevada, tempo prolongado de administração e baixa adesão dos pacientes<sup>(3)</sup>. Diante disso, torna-se evidente a necessidade de desenvolver veículos tópicos que facilitem a penetração do fármaco na pele e o direcionamento ao parasita intracelular.

Emulsões clássicas são obtidas pela mistura de água e óleo, em um processo que envolve agitação mecânica e aquecimento, cuja interface das gotículas formadas é estabilizada por um tensoativo anfifílico. Quanto menor o tamanho das gotículas, maior a estabilidade do sistema que, por ser termodinamicamente instável, tende à separação com o passar do tempo. As microemulsões (ME) são mais vantajosas que as emulsões tradicionais por serem termodinamicamente estáveis (e por isso não separam fases) e de formação espontânea, o que diminui o custo de produção<sup>(4)</sup>. Além disso, as MEs têm maior poder de permeação cutânea, tanto na pele do hospedeiro quanto nas células dos parasitas, o que faz destas um excelente veículo para o tratamento de leishmaniose.

tegumentar, especialmente se o óleo empregado para a sua obtenção apresentar atividade leishmanicida, como é o caso do óleo de Copaíba.

A região amazônica é a mais importante zona extrativista do exsudato do tronco da copaibeira, que é uma oleoresina rica em terpenóides, como os sesquiterpenos da fração volátil (trans- $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -humuleno,  $\alpha$ -cpaeno) e os diterpenos da fração resinosa (ácidos copálico, hardwickiico, agátilo, caurenóico)<sup>(5)</sup>.

Diversos estudos têm demonstrado as propriedades farmacológicas da oleoresina de Copaíba, incluindo atividades antimicrobiana<sup>(6)</sup>, antileishmania<sup>(7)</sup>, esquistossomicida<sup>(8)</sup>, antichagásica<sup>(9)</sup>, anti-inflamatória<sup>(10)</sup>, antitumoral<sup>(6)</sup>, cicatrização de lesões de psoríase<sup>(11)</sup>. Entretanto, a indústria tende a valorizar apenas a fração volátil, extraída por hidrodestilação, descartando a fração resinosa – rica em compostos bioativos – sem aproveitamento.

A extração dos óleos essenciais geralmente é conduzida por hidrodestilação e, no caso da Copaíba, a fração resinosa, rica em diterpenos com potenciais aplicações farmacológicas, costuma ser descartada pelo fabricante sem reaproveitamento em outros processos. O emprego dessa fração resinosa como fase oleosa no preparo de sistemas microemulsionados, além de dar aplicação farmacêutica a esse refugo industrial, valoriza o aspecto ecológico e autossustentável que existe no aproveitamento máximo dos recursos naturais disponíveis.

Embora já existam estudos envolvendo MEs e nanoemulsões contendo a oleoresina bruta de Copaíba<sup>(12,13)</sup>, não foram encontrados relatos de MEs elaboradas a partir do refugo da hidrodestilação, o que demonstra, ainda, o caráter inédito desta pesquisa, que visa desenvolver, caracterizar e avaliar a atividade antileishmania *in vitro* de MEs preparadas com a fração resinosa descartada do óleo de Copaíba, com foco no tratamento tópico da LT causada por *L. amazonensis*.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Materiais

A oleoresina de Copaíba foi fornecida pela empresa Nativus da Amazônia. Tween 80 e ácido oleico pela Synth® e o Etanol pela Dinâmica®. O dimetilsulfóxido (DMSO) 99,5% foi fornecido pela Nuclear® e o antimoniato de meglumina (Glucantime®) pela Fundação de Medicina Tropical (FMT-HVD). O meio de cultivo RPMI-1640 do Roswell Park Memorial Institute 1640 foi fornecido pela Gibco®.

## 2.2. Hidrodestilação da oleoresina

A fração resinosa terpênica foi separada do óleo essencial pela técnica da hidrodestilação por arraste de vapor. Ao final da extração, a fração resinosa hidratada foi deixada em repouso para a separação do excesso de água, que foi cuidadosamente removida com uma pipeta conta-gotas.

## 2.3. Obtenção das microemulsões, com e sem incorporação da fração resinosa da oleoresina de Copaíba

As MEs foram preparadas pela mistura de Tween 80, etanol, ácido oleico e água destilada, com e sem a presença da fração resinosa da oleoresina de Copaíba, que foi acrescentada à fase oleosa do sistema nas concentrações de 10 a 20% do peso total da formulação, conforme demonstra a Tabela 1.

**Tabela 1.** Composição das formulações microemulsionadas contendo 10% (ME10) e 20% (ME20) da fração resinosa da oleoresina de Copaíba, e seus respectivos placebos (ME10-p e ME20-p).

	Tween 20	Etanol	Água	Fração Resinosa	Ácido oleico
ME10	30%	30%	20%	10%	10%
ME10-p	30%	30%	20%	-	20%
ME20	25%	25%	10%	20%	20%
ME20-p	25%	25%	10%	-	40%

## 2.4. Caracterização físico-química das microemulsões

As MEs obtidas foram caracterizadas pela determinação da densidade absoluta, pH, viscosidade, índice de refração, transparência (transmitância em espectrofotometria de UV), tipo de fase externa (condutividade e teste de diluição) e microestrutura do sistema emulsionado (diâmetro médio de gotículas, índice de polidispersão e potencial zeta).

A densidade absoluta foi determinada utilizando um picnômetro de vidro acoplado a termômetro, com capacidade para 25 mL. O pH das MEs foi medido em pHmetro (Del Lab, modelo DL-PH), previamente calibrado com soluções tampão de pH 7 e 4, e a viscosidade, em viscosímetro analógico de Brookfield (BrasEq, modelo LVT), utilizando-se o splinde número 62 para a leitura das formulações.

O índice de refração foi medido em refratômetro analógico do tipo Abbé (Quimis, modelo Q767B), mediante calibração prévia com água destilada, e a transparência das MEs foi avaliada pela determinação da transmitância em espectrofotômetro de UV (Even, modelo IL-592) a 650 nm, utilizando cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm.

A condutividade da fase externa das MEs foi avaliada em condutivímetro portátil (Instrutherm, modelo CD-860), previamente calibrado com a solução padrão de 1413  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . O teste de diluição foi conduzido pela adição e agitação magnética de excesso de uma das fases aquosa ou oleosa das MEs, na proporção de 1:10, com água e com ácido oleico, com subsequente observação para verificar manutenção da transparência ou turbidez do sistema após a diluição.

A caracterização microscópica das MEs foi realizada em equipamento de espalhamento dinâmico de luz (Anton Paar, modelo Litesizer DLS 500), mediante diluição prévia das formulações em água, na proporção 1:10, para determinação do diâmetro médio e índice de polidispersão das gotículas, além do potencial zeta presente na superfície do filme de tensoativos.

## 2.5. Teste da atividade antileishmania *in vitro*

Para a avaliação da atividade antileishmania *in vitro*, foram utilizadas formas promastigotas de *L. amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8), criopreservadas no criobanco do Laboratório de Leishmaniose e Doenças de Chagas/COSAS/INPA. O cultivo dos parasitas foi realizado em meio RPMI 1640 completo, suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFBi) e 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de antibiótico (gentamicina), sendo incubados a 25 °C, conforme metodologia descrita por Jaffe e colaboradores<sup>(14)</sup>. As culturas obtidas foram então utilizadas nos bioensaios.

A atividade antileishmania das MEs contendo a fração resinosa de Copaíba foi determinada por meio da avaliação da inibição do crescimento e mortalidade das formas promastigotas. As amostras foram previsamente filtradas, diluídas em meio de cultura e testadas em concentrações seriadas que variaram de 100 a 6,3  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Como controle negativo, utilizou-se dimetilsulfóxido (DMSO) a 1%, e como controle positivo, Glucantime® (antimoníato de meglumina), nas concentrações seriadas de 100 a 6,3  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

As placas de bioensaio, contendo promastigotas, controles e amostras-teste, foram incubadas em estufa a 25 °C, durante um período de 24 a 72 horas. Os bioensaios foram realizados em triplicata e a média do número de células vivas foi utilizada para calcular a IC<sub>50</sub>, conforme descrito por Comandolli-Wyrepkowski e colaboradores<sup>(15)</sup>.

Para a análise estatística, os dados de proliferação parasitária foram ajustados a curvas sigmoidais utilizando o software GraphPad Prism 8.0, com análise dos respectivos intervalos de confiança (95%) e coeficientes de determinação linear. Ressalta-se que este

experimento não requer aprovação de Comitê de Ética, uma vez que não envolve a utilização de seres humanos nem de animais de experimentação, sendo realizado exclusivamente com parasitas de referência.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O processo de beneficiamento industrial da oleoresina de Copaíba envolve a extração do óleo essencial volátil, bastante valorizado na indústria de cosméticos, especialmente na produção de perfumes e essências. Entretanto, é sabido que a fração resinosa costuma ser descartada no processo após a extração do óleo volátil, mesmo a despeito da presença de componentes na fração resinosa com comprovada atividade antileishmania, dentre outras igualmente importantes. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo desenvolver sistemas MEs aproveitando a fração resinosa do óleo de Copaíba e avaliar sua atividade *in vitro* frente a espécie *L. amazonensis* (Protozoa: Kinetoplastida: Trypanosomatidae).

Após a preparação das MEs contendo a fração resinosa, todas as formulações e seus respectivos placebos foram caracterizados (Tabela 2). Tanto a ME10 quanto a ME20 apresentaram maior densidade que seus placebos, o que demonstra que o aumento da concentração da fração resinosa na fase oleosa da ME aumenta a densidade do sistema.

**Tabela 2.** Caracterização físico-química das formulações microemulsionadas contendo 10% (ME10) e 20% (ME20) da fração resinosa da oleoresina de Copaíba, e seus respectivos placebos (ME10-p e ME20-p).

Formulação	ME10	ME10-p	ME20	ME20-p
pH	5,86 ± 0,03	5,55 ± 0,02	5,50 ± 0,05	4,99 ± 0,02
Densidade (g/mL)	0,943 ± 0,002	0,914 ± 0,001	0,944 ± 0,006	0,915 ± 0,000
Viscosidade (cP)	120,8 ± 19,1	147,9 ± 3,6	241,7 ± 14,4	54,2 ± 7,2
IR	1,424 ± 0,001	1,420 ± 0,000	1,440 ± 0,001	1,427 ± 0,001
Transmitância (%)	81,5 ± 0,1	98,7 ± 0,6	48,6 ± 0,3	99,6 ± 0,7
Condutividade (mS/cm)	0,005 ± 0,001	0,002 ± 0,000	0,005 ± 0,000	0,002 ± 0,000
Potencial Zeta (mV)	-8,6 ± 0,9	- 7,4 ± 0,8	- 48,9 ± 0,7	- 11,0 ± 1,0
Diâmetro médio (nm)	193,4	293,4	344,9	298,2
IP	0,251	0,183	0,228	0,281

O pH é uma característica físico-química importante, pois desempenha papel fundamental na manutenção da homeostase do estrato córneo, regula a permeabilidade da barreira cutânea e influencia a resposta antimicrobiana da pele, além de interferir na estabilidade dos fármacos veiculados na formulação. Produtos destinados à aplicação na pele devem ter pH levemente ácido, entre 4 e 6, que corresponde à faixa do pH normal da pele. Produtos alcalinos podem causar irritação e alterar a microbiota cutânea<sup>(16)</sup>. Todas as

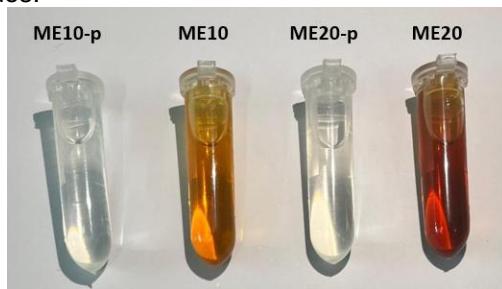
MEs produzidas apresentaram pH variando entre 4,99 e 5,86, sendo que o pH mais ácido foi observado na ME20-p, devido à maior concentração de ácido oleico em sua composição.

Quanto à viscosidade das formulações, todas as MEs produzidas eram fluidas, com valores variando entre 54,2 e 241,7 cP, o que garante boa fluidez e espalhabilidade das formulações na pele. Também pode ser evidenciado que a adição da resina de Copaíba eleva a viscosidade do sistema, pois ME20 mostrou-se ligeiramente mais viscosa que seu respectivo placebo.

O índice de refração das MEs é influenciado pela composição do sistema, como resultado da proporção do componente com o maior índice de refração. Os valores de referência do índice de refração dos componentes puros são: 1,333 para a água; 1,361 para o etanol; 1,459 a 1,463 para o ácido oleico e 1,468 para o Tween 20<sup>(17)</sup>. O índice de refração medido para a oleoresina de Copaíba foi de 1,508 para a matéria-prima bruta, 1,524 para a fração resinosa após a etapa de hidrodestilação, e 1,490 para a mistura entre a fração resinosa com ácido oleico (1:1). A ME20 foi a formulação que apresentou o maior índice de refração (1,440), por possuir o maior teor da fração resinosa de Copaíba (20%), que é componente de maior índice de refração (1,524). As outras formulações apresentaram índices de refração semelhantes, variando entre 1,420 e 1,427, e que estão muito próximos dos valores do ácido oleico (1,459 - 1,463) e do Tween 20 (1,468), cujos percentuais somados chegam a 40% na ME10 e 65% na ME20-p.

Por definição, as MEs são sistemas macroscopicamente transparentes, que se formam espontaneamente sob leve agitação. Para avaliar a transparência das formulações, as amostras foram analisadas em Espectrofotômetro de UV para medir a transmitância, e as formulações placebo apresentaram transmitância superior a 98,7%, confirmando a alta transparência e homogeneidade características das MEs (Figura 1).

**Figura 1.** Fotografia das formulações microemulsionadas contendo 10% (ME10) e 20% (ME20) da fração resinosa da oleoresina de Copaíba, e seus respectivos placebos (ME10-p e ME20-p), demonstrando a transparência dos sistemas obtidos.



Já as formulações contendo a resina de Copaíba, de coloração acastanhada, tiveram acentuada queda na transparência do sistema. Quanto maior o teor da oleoresina, menor a transparência da formulação, que foi de 48,6% para a ME20, (que contém 20% da fração resinosa) e 81,5% para a ME10 (que contém 20% da fração resinosa). De fato, a presença de pigmentação em MEs coloridas pode diminuir a transmitância resultante, uma vez que os pigmentos podem absorver em determinados comprimentos de onda, ou, simplesmente, podem dispersar a luz incidente<sup>(18)</sup>.

MEs do tipo O/A costumam apresentar maior condutividade porque apresentam água como fase externa, que é melhor condutora de corrente elétrica do que o óleo. Dessa forma, MEs com fase externa oleosa (tipo A/O) expressam baixa condutividade elétrica, e estruturas bicontínuas apresentam condutividade elétrica variável, pois tanto o óleo quanto a água formam redes lamelares contínuas na microestrutura<sup>(19)</sup>. A baixa condutividade medida para as formulações (entre 0,002 e 0,005 mS) já era esperada como consequência do baixo conteúdo de água (10 a 20%) e pelo emprego de um tensoativo não iônico (Tween 20) na composição. As formulações ME10 e ME20, que contém a fração resinosa da Copaíba, apresentaram condutividade maior (0,005 mS) que as formulações placebo ME10-p e ME20-p (0,002 mS), o que sugere que a oleoresina possui substâncias ionizáveis capazes aumentar a condutividade dos sistemas. Além disso, a baixa condutividade indica que as MEs desenvolvidas podem ser microestruturas do tipo A/O ou bicontínuas. Entretanto, a realização do teste de diluição (Figura 2) mostra que ME10-p e ME10 são estruturas bicontínuas, pois as MEs perdem a transparência e ficam turvas tanto pela adição de excesso de água (tubos 1 e 3) quanto pelo excesso de óleo (tubos 2 e 4), demonstrando que não há uma fase externa dispersante bem definida. Já as formulações microemulsionadas ME20-p e ME20, que ficam turvas pela adição de excesso de água (tubos 5 e 7), mas permanecem transparentes pela adição de excesso de óleo (tubos 6 e 8), demonstram que a microestrutura se organiza em gotículas do tipo A/O, onde a fase externa oleosa é facilmente dispersa pelo acréscimo de óleo, sem afetar a transparência.

A transparência exibida pelas MEs se deve ao fato de sua microestrutura não oferecer resistência à passagem do feixe luminoso, uma vez que o diâmetro médio das gotículas é menor que o comprimento de onda do espectro da luz visível, que varia entre 400 e 800nm. Entretanto, existem divergências na literatura quanto ao diâmetro médio que o sistema deve alcançar para ser caracterizado como ME. A maior parte das revisões bibliográficas afirmam que o diâmetro deve ser inferior a 100 nm<sup>(20)</sup>, característica esta

facilmente alcançada pelos sistemas coloidais micelares; porém, há relatos na literatura de que as MEs podem ter diâmetro médio variando entre 100 e 400 nm<sup>(21)</sup>, o que é mais coerente para contemplar a variedade e a complexidade das microestruturas nas quais uma ME pode se organizar, de acordo com a proporção entre seus componentes.

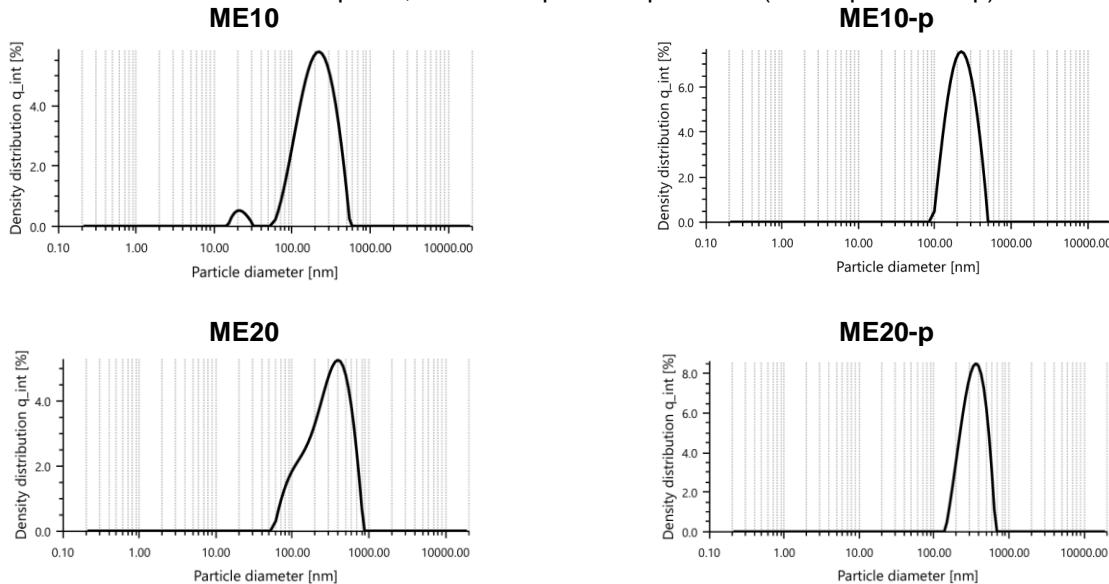
**Figura 2:** Teste de diluição: ME10-p diluída em água (1) e em óleo (2); ME10 diluída em água (3) e em óleo + barra magnética (4); ME20-p diluída em água (5) e em óleo (6); e ME20 diluída em água (7) e em óleo (8).



O diâmetro médio das gotículas pode ser determinado pela técnica do espalhamento de luz dinâmico (DLS), que exige a diluição prévia da amostra em meio líquido. Apesar das MEs serem formulações líquidas, fluidas e transparentes, ainda se faz necessária a diluição da amostra, de acordo com a sensibilidade do sinal do equipamento, razão pela qual essa técnica se aplica melhor ao estudo de dispersões coloidais micelares simples de A/O ou O/A. Microestruturas mais complexas, como sistemas cilíndricos, hexagonais ou lamelares bicontínuos, fatalmente serão desorganizadas pela diluição com o aumento do volume de uma das fases, seja esta aquosa ou oleosa<sup>(21)</sup>. Como as MEs ensaiadas não apresentavam fase externa aquosa (ME10 é bicontínua e ME20 é do tipo A/O, com provável arranjo cilíndrico), a diluição com água antes da leitura altera a microestrutura do sistema, fato este que explica o motivo pelo qual alguns autores que estudam sistemas bicontínuos tem optado por não realizar a determinação do diâmetro médio das MEs por DLS<sup>(20)</sup>. Entretanto, mesmo a despeito dessa reorganização da microestrutura após a diluição, as amostras foram submetidas ao Zetasizer (Tabela 2 e Figura 3) e os resultados para o diâmetro médio das gotículas encontravam-se na escala nanométrica, variando de 193,4 a 344,9 nm, com baixos índices de polidispersibilidade (IP) que significam sistemas monodispersos. Resultados semelhantes foram alcançados por Araújo e colaboradores<sup>(22)</sup>, que estudaram MEs com proporções variadas entre os componentes - Labrasol e Plurol Oleique (3:1), oleato de etila e água - para gerar sistemas A/O, O/A e bicontínuos, onde as MEs A/O

também geraram gotículas com diâmetro maior que a diluição das estruturas bicontínuas, que foram de, respectivamente, 354 e 106 nm, após a incorporação do princípio ativo estudado (ácido 5-aminolevulínico).

**Figura 3.** Análise da distribuição e determinação do diâmetro médio de gotículas (após diluição em água) das formulações microemulsionadas contendo 10% (ME10) e 20% (ME20) da fração resinosa da oleoresina de Copaíba, e seus respectivos placebos (ME10-p e ME20-p).

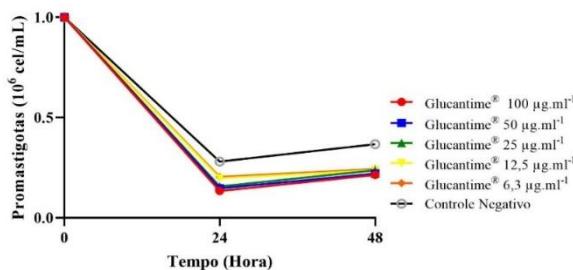


O potencial zeta é definido como a diferença de carga existente na interface entre as cargas aderidas em uma partícula em suspensão e a camada de cargas presentes no fluido que se move ao redor dela. Dessa forma, o potencial zeta pode ser utilizado para prever a estabilidade de sistemas coloidais, de modo que quanto maior for o módulo da diferença de cargas (com carga positiva ou negativa), maior será a repelência entre as partículas, evitando fenômenos de floculação e coalescência, que levam à instabilidade e separação de fases de sistemas emulsionados<sup>(23)</sup>. A Tabela 2 mostra valores de potencial zeta negativos, onde a adição da fração resinosa da oleoresina de Copaíba aumentou o potencial zeta, que foi passou de -7,4 para -8,6 mV na ME10-p, e de -11,0 para -48,9 mV na ME20-p. Isso demonstra que a incorporação da oleoresina não compromete a estabilidade do sistema, uma vez que a repelência entre os glóbulos aumenta com a proporção da oleoresina.

Os resultados obtidos para a atividade antileishmania *in vitro* das MEs estão apresentados nas Figuras 4 a 6 e Tabela 3. Na Figura 4, observa-se o comportamento da cultura parasitária na ausência do fármaco (controle negativo), com redução espontânea

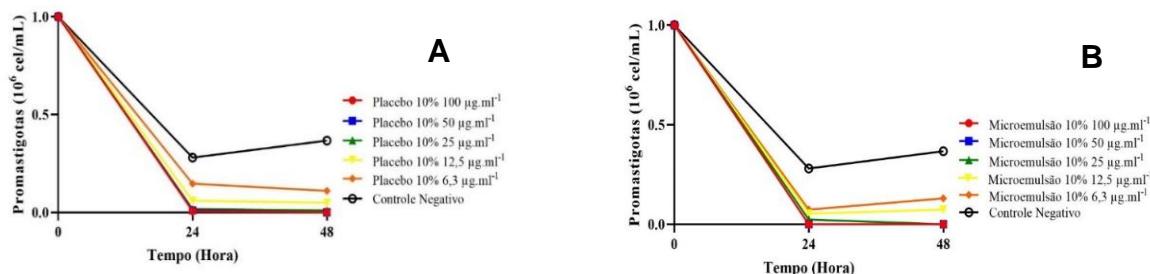
da população de promastigotas. A adição do controle positivo (Glucantime®) promoveu efeito inibitório crescente conforme o aumento da concentração, indicando a ação dose-dependente sobre a proliferação parasitária.

**Figura 4.** Atividade em 24 e 48 horas do Controle positivo (Glucantime®) e negativo, testados em ensaio biológico *in vitro* contra *L. amazonensis*.



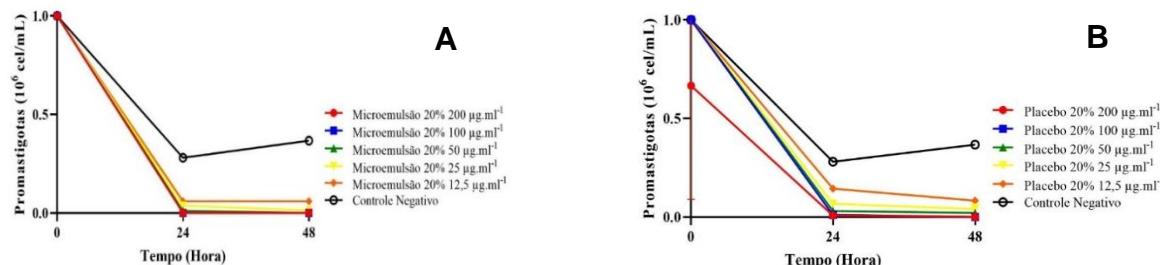
Na Figura 5A, observa-se que o placebo ME10-p apresentou efeito antileishmania significativo, sendo capaz de inibir totalmente a forma promastigota nas concentrações mais elevadas. Curiosamente, a menor concentração testada de ME10-p mostrou um efeito comparável à maior concentração de Glucantime®. Os Tweens são surfactantes com reconhecido potencial leishmanicida, e por estarem presentes na proporção de 25 a 30% de todas as MEs, explicam a atividade leishmanicida apresentada pelo próprio placebo<sup>(24)</sup>, além de potencializarem a ação dos componentes da oleoresina de Copaíba. De fato, a ME10 (Figura 5B) demonstrou um efeito leishmanicida superior ao placebo nas primeiras 24 horas, o que reforça os resultados obtidos por Santos et al.<sup>(7)</sup> e Moraes et al.<sup>(25)</sup>, que demonstraram que a porção resinosa da oleoresina de Copaíba também apresenta atividade leishmanicida, uma vez que esta é composta majoritariamente por diterpenos como ácidos copálico, hardwickiico, agátilico e caurenóico<sup>(5)</sup>. Após 48 horas, os efeitos da ME10 e da ME10-p tornaram-se similares, sugerindo ação inicial mais pronunciada da formulação com Copaíba.

**Figura 5.** Atividade em 24 e 48 horas de: (A) ME placebo (ME10-p) e (B) ME contendo 10% da fração resinosa da oleoresina de Copaíba (ME10), testadas em ensaio biológico *in vitro* contra *L. amazonensis*.



Conforme apresentado na Figura 6 (A e B), ambas as MEs testadas foram capazes de inibir 100% da forma promastigota do parasita, mas a ME20 (com maior concentração da fração resinosa da Copaíba) demonstrou maior atividade antileishmania em relação ao seu placebo, ME20-p.

**Figura 6.** Atividade em 24 e 48 horas de: (A) ME placebo (ME20-p) e (B) ME contendo 20% da fração resinosa da oleoresina de Copaíba (ME20), testadas em ensaio biológico *in vitro* contra *L. amazonensis*.



É importante destacar que, apesar da ME20 apresentar maior concentração da fração resinosa de Copaíba (20%), a ME10 (10%) mostrou-se mais ativa, uma vez que inibiu 100% da proliferação de promastigotas em concentrações superiores a 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Figura 5A), ao passo que ME20 só inibiu 100% em concentrações acima de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Figura 6A). Essa diferença de desempenho também pode ser observada na Tabela 3, que mostra a diferença de valores calculados para a Concentração Inibitória da multiplicação de metade da população de parasitas ( $\text{IC}_{50}$ ) de cada formulação, onde o placebo ME20-p tem  $\text{IC}_{50}$  cerca de duas vezes maior (12,7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) que o do placebo ME10-p (6,6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

**Tabela 3.** Valores calculados de  $\text{IC}_{50}$  contra promastigotas de *L. amazonensis*, das formulações microemulsionadas contendo 10% (ME10) e 20% (ME20) da fração resinosa da oleoresina de Copaíba, e seus respectivos placebos (ME10-p e ME20-p).

Formulação	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	
	24h	48h
ME10	2,7	5,2
ME10-p	6,6	4,3
ME20	4,7	6,9
ME20-p	12,7	5,7
Glucantime®	67,12	>100

Como ME10-p mostrou-se mais ativo que ME20-p, fica evidente que a diferença na potência da atividade antiparasitária também está relacionada ao tipo de veículo, e não somente à concentração da oleoresina de Copaíba. De fato, vários trabalhos têm demonstrado que a quantidade de água na composição das MEs interfere na capacidade de permeação das estruturas celulares<sup>(20)</sup>, de forma que ME10 e ME10-p, por possuírem

20% de água na composição, possuem maior capacidade de permeação da célula parasitária que ME20 e ME20-p, que só possuem 10% de água. Portanto, ME10 parece ter o equilíbrio ideal entre a capacidade de permeação e a concentração de resina de Copaíba, com maior potencial terapêutico que o Glucantime® para o tratamento tópico das manifestações clínicas da LT.

#### 4. CONCLUSÃO

Todas as MEs testadas foram eficazes na inibição completa da proliferação do parasita *L. amazonensis*. A fração resinosa do óleo de Copaíba demonstrou atividade antileishmania superior à do medicamento de referência, Glucantime®, especialmente na formulação ME10, que apresentou o maior potencial leishmanicida graças ao seu maior conteúdo de água, que aumenta a permeação celular.

Além disso, a combinação de Tween 20, com reconhecida atividade antiparasitária, e a oleoresina de Copaíba, rica em compostos cicatrizantes e anti-inflamatórios, mostrase promissora para o desenvolvimento de uma formulação tópica inovadora, de baixo custo e com menos efeitos adversos. As MEs, por apresentarem dimensões nanométricas, favorecem uma maior penetração celular, contribuindo não apenas para o combate ao parasita, mas também, para a regeneração do tecido lesionado. Esses achados sustentam o potencial dessas formulações como alternativa terapêutica eficaz e sustentável no tratamento de infecções cutâneas da LT.

#### REFERÊNCIAS

- 1 Melo MGN, Morais RCS, Goes TC, Silva RP, Morais RF, Guerra JAO, et al. Clinical and epidemiological profiles of patients with American cutaneous leishmaniasis from the states of Pernambuco and Amazonas, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2020;53:1-8. Doi: 10.1590/0037-8682-0083-2020.
- 2 Vries HJC, Schallig, HD. Cutaneous leishmaniasis: a 2022 updated narrative review into diagnosis and management developments. Am J Clin Dermatol. 2022; 23(6): 823-40. Doi: 10.1007/s40257-022-00726-8.
- 3 Aronson NE, Joya CA. Cutaneous leishmaniasis: updates in diagnosis and management. Infect Dis Clin North Am. 2019;33(1):101-17. Doi: 10.1016/j.idc.2018.10.004.

- 4 Szumała P, Macierzanka A. Topical delivery of pharmaceutical and cosmetic macromolecules using microemulsion systems. *Int J Pharm.* 2022;615:121488. Doi: 10.1016/j.ijpharm.2022.121488.
- 5 Veiga-Junior VF, Rosas EC, Carvalho MV, Henriques MG, Pinto AC. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne--a comparative study. *J Ethnopharmacol.* 2007;112(2):248-54. Doi: 10.1016/j.jep.2007.03.005.
- 6 Abrão F, Costa LDA, Alves JM, Senedese JM, Castro PT, Ambrósio SR, et al. *Copaifera langsdorffii* oleoresin and its isolated compounds: antibacterial effect and antiproliferative activity in cancer cell lines. *BMC Complement Altern Med.* 2015;15(443):1-10. Doi: 10.1186/s12906-015-0961-4.
- 7 Santos AO, Ueda-Nakamura T, Filho BPD, Junior VFV, Pinto AC, Nakamura CV. Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis*. *J Ethnopharmacol.* 2008;120(2):204-8. Doi: 10.1016/j.jep.2008.08.007.
- 8 Borges CH, Cruz MG, Carneiro LJ, Silva JJ, Bastos JK, Tavares DC, et al. *Copaifera duckei* oleoresin and its main nonvolatile yerpene: In vitro schistosomicidal properties. *Chem Biodivers.* 2016;13(10):1348-56. Doi: 10.1002/cbdv.201600065.
- 9 Izumi E. Efeitos do óleo de copaiba e constituintes em *Trypanosoma cruzi* [tese de doutorado]. Londrina: Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina; 2010. 93 p. Disponível em: <https://repositorio.uel.br/srv-c0003-s01/api/core/bitstreams/05c20ca5-e5d1-4b9c-a111-65983399800f/content>.
- 10 Menezes ACDS, Alves LDB, Goldemberg DC, Melo AC, Antunes HS. Anti-inflammatory and wound healing effect of *Copaiba* oleoresin on the oral cavity: a systematic review. *Heliyon.* 2022;8(2):e08993. Doi: 10.1016/j.heliyon.2022.e08993.
- 11 Gelmini F, Beretta G, Anselmi C, Centini M, Magni P, Ruscica M, et al. GC-MS profiling of the phytochemical constituents of the oleoresin from *Copaifera langsdorffii* Desf. and a preliminary in vivo evaluation of its antipsoriatic effect. *Int J Pharm.* 2013;440(2):170-8. Doi: 10.1016/j.ijpharm.2012.08.021.
- 12 Xavier-Junior FH, Huang N, Vachon JJ, Rehder VL, Egito ES, Vauthier C. Match of solubility parameters between oil and surfactants as a rational approach for the formulation of microemulsion with a high dispersed volume of copaiba oil and low surfactant content. *Pharm Res.* 2016;33(12):3031-43. Doi: 10.1007/s11095-016-2025-y.
- 13 Rodrigues IA, Ramos AS, Falcão DQ, Ferreira JLP, Basso SL, Silva JRA, et al. Development of nanoemulsions to enhance the antileishmanial activity of *Copaifera paupera* oleoresins. *Biomed Res Int.* 2018;2018:9781724. Doi: 10.1155/2018/9781724.
- 14 Jaffe, C.L.; Grimaldi, J.G.; McMahon-Pratt, D. The cultivation and cloning of *Leishmania*. In: morel, C.M- (ed), *Genes and Antigens of Parasites. A Laboratory Manual.* 2ed. Fundação Oswaldo Cruz, p. 47-91, 1984.

- 15 Comandolli-Wyrepkowski CD, Jensen BB, Grafova I, Santos P. Antileishmanial activity of extracts from *Libidibia ferrea*: development of in vitro and in vivo tests. *Acta Amaz.* 2017;47:331-40. Doi: 10.1590/1809-4392201700871.
- 16 Lukić M, Pantelić I, Savić SD. Towards optimal pH of the skin and topical formulations: from the current state of the art to tailored products. *Cosmetics.* 2021;8(3):69. Doi: 10.3390/cosmetics8030069.
- 17 O'Neil MJ. The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 15<sup>a</sup> ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 2013.
- 18 Chantrapornchai W, Clydesdale FM, McClements DJ (2008). Chapter 26: *Understanding Colors in Emulsions*. In: Culver, C.A., Wrolstad, R.E. *Color Quality of Fresh and Processed Foods*. American Chemical Society, p.364-387. Doi: 10.1021/bk-2008-0983.ch026.
- 19 Tan Z, Zhang Y, Dai C, Li L, Li Y, Xie X. Investigation of AOT/isoctane/water reverse microemulsion system with the presence of different mass ratios of SDS: conductivity and water solubilization. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 2022;648:129271. Doi: 10.1016/j.colsurfa.2022.129271.
- 20 Musakhanian J, Osborne DW. Understanding Microemulsions and Nanoemulsions in (Trans)Dermal Delivery. *AAPS PharmSciTech.* 2025;26(1):31. Doi:10.1208/s12249-024-02997-2.
- 21 Tartaro G, Mateos H, Schirone D, Angelico R, Palazzo G. Microemulsion Microstructure(s): A Tutorial Review. *Nanomaterials.* 2020;10(9):1657. Doi: 10.3390/nano10091657.
- 22 Araújo LMPdeC, Thomazine JA, Lopez RFV. Development of microemulsions to topically deliver 5-aminolevulinic acid in photodynamic therapy. *Eur J Pharm Biopharm.* 2010;75(1):48-55. Doi: 10.1016/j.ejpb.2010.01.008.
- 23 Li L, Qu J, Liu W, Peng B, Cong S, Yu H, et al. Advancements in characterization techniques for microemulsions: from molecular insights to macroscopic phenomena. *Molecules.* 2024;29(12):2901. Doi: 10.3390/molecules2912290.
- 24 Martins, AB. Avaliação do potencial antileishmania dos compostos naturais isolados ácido úsnicos, cumarina, quercetina e reserpina sobre as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania chagasi*. João Pessoa: Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba 2008; 123 p. Disponível em: [https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/tede/6691?locale=pt\\_BR](https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/tede/6691?locale=pt_BR).
- 25 Moraes LS, Galué-Parra AJ, Hage AAP, Moura HA, Garcia MSA, Macêdo CG, et al. In Vitro leishmanicidal activity of copaiba Oil and kojic acid combination on the protozoan *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* and host Cell. *Microorganisms.* 2023;11(12):2925. Doi: 10.3390/microorganisms11122925.