

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE PLGA INCORPORANDO ÓLEO DE CANABIDIOL PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS.

**ALICE RIBEIRO1; CARLA DAVID2; JAQUELINE SOUZA3; ANDRE FARJADO4;
RAFAEL MORAES5; RAFAEL GUERRA LUND6**

1 Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil - lice22.ribeiro@gmail.com

2 Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil - cldp58@gmail.com

3 Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil - jferreirasouzaS3@hotmail.com

4 Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil - andre.fajardo@ufpel.edu.br

5 Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil - mraesrr@gmail.com

6 Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil – rafael.lund@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, há um interesse crescente no uso e potencial terapêutico do canabidiol (CBD). Esta substância é um dos mais de 120 fitocannabinoides derivados da planta Cannabis sativa (ANCESCHI et al., 2022). A crescente popularidade do CBD pode ser atribuída às suas múltiplas propriedades medicinais, todas ainda não comprovadas, incluindo efeitos antieméticos, antioxidantes (CHEN et al., 2022), anticancerígenos, regenerativos e anti-inflamatórios. O CBD foi testado em terapias para câncer, epilepsia, dor, inflamação e distúrbios psiquiátricos. Ações semelhantes aos cannabinoides podem mediar processos de cicatrização de tecidos recrutando células regenerativas em locais de lesão (KAMALI et al., 2019). O desenvolvimento de formulações de CBD é desafiador porque a natureza oleaginosa desta substância lhe confere alta lipofilicidade, hidrofobicidade e permeabilidade em membranas biológicas (GRIFONI et al., 2022). O CBD também tem baixa estabilidade e pode ser degradado por oxidação leve ou auto-oxidação em temperatura ambiente (GRIFONI et al., 2022). Para superar essas limitações e ampliar a aplicabilidade do CBD em usos biomédicos e odontológicos, este estudo teve como objetivo sintetizar e caracterizar micropartículas de poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) contendo óleo de CBD, desenvolvidas como um sistema de liberação para biomateriais médico-odontológicos.

2. METODOLOGIA

Tipo de estudo e reagentes

O estudo *in vitro* foi aprovado pelo CEP FO/UFPEL (CAAE: 64527316.4.0000.5318). Os reagentes incluíram: óleo de canabidiol (Epifractán, 5% CBD e <0,1% THC, Medic Plast S.A, Uruguai), ácido poli (láctico-co-glicólico) (PLGA, 65:35, Sigma-Aldrich, EUA), PVA (99% hidrolisado, Sigma-Aldrich, EUA), Tween 80 (Sigma-Aldrich, EUA) e diclorometano (DCM) puro, Synth®, Brasil. O óleo de CBD foi analisado em um cromatógrafo a gás/espectrômetro de massa (GC-MS, QP2010,

Shimadzu Ultra, Japão), usando coluna capilar de polidimetilsiloxano. O pH (n=3) foi medido com um medidor de pH digital (HI2221, Hanna Instruments, EUA) e a viscosidade (n=5) foi determinada com um reômetro de oscilação dinâmica (R/S-CPS+; Brookfield, EUA).

Sínte das Micropartículas PLGA@CBD

Micropartículas de PLGA@CBD foram preparadas por emulsão simples (O/A). A fase oleosa foi feita dissolvendo 300 µL de CBD em DCM com PLGA, que foi gotejada em água destilada com PVA e Tween 80, em banho de gelo. A emulsão foi homogeneizada a 7000 rpm por 20 min (Heidolph Silent Crusher M, Alemanha). A mistura foi agitada a 6000 rpm por 3 h para evaporar o solvente. As micropartículas foram filtradas, lavadas, congeladas a -20 °C, liofilizadas e armazenadas.

Eficiência Encapsulamento e morfologia

A quantidade de CBD encapsulada foi determinada por espectrofotometria UV_Vis (Lambda 24; Perkin-Elmer, EUA). As micropartículas foram moídas e extraídas em DCM, centrifugadas a 5000 rpm por 15 min, e analisadas por espectroscopia de fluorescência. A morfologia foi analisada em um microscópio eletrônico de varredura (MEV, JSM 6610LV; Jeol Ltd., Japão) e o tamanho foi determinado pelo software Size Meter® v.1.1.

EE(%)=Quantidade de CBD em Microparticulas/Total de CBD utilizado ×100 (1)

Viabilidade Celular (MTT)

Células primárias da polpa dentária humana (hDPCs) foram obtidas, criopreservadas e caracterizadas por citometria de fluxo (FACS Calibur; BD Biosciences). A biocompatibilidade das micropartículas foi avaliada pelo ensaio MTT, conforme ISO 10993-5. Foram pesados 0,312 mg (50% carga) das micropartículas PLGA@CBD e PLGA, esterilizados por UV (30 min) e colocados em frascos estéreis com 5 mL de meio suplementado (10% soro fetal bovino, L-glutamina e 1% penicilina-estreptomicina), incubando a 37 °C. A cada 21 dias, 500 µL de meio foram substituídos. As células (1×10^4) foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas a 37 °C por 24 h com 5% CO₂. O meio foi trocado por eluatos em intervalos de 1, 2, 7 e 21 dias, permanecendo em contato por 24 h. Após remoção, 200 µL de solução MTT (5 mg/mL) foram adicionados e incubados por 4 h. A solução foi removida, e 200 µL de DMSO adicionados. A absorbância a 540 nm foi medida (TP-Reader; Thermoplate, Shenzhen, China).

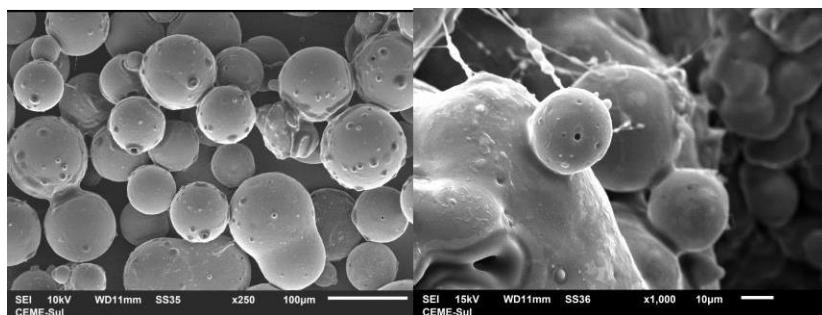
Teste de Difusão em Agar (TDA)

As micropartículas PLGA@CBD (0,312 mg) foram pesadas e desinfectados por radiação UV durante 30 minutos a 37 °C. Em seguida, foram colocadas em meio de agar BHI contendo inóculo bacteriano (*Staphylococcus aureus*- ATCC 25923) previamente semeado a uma concentração de 0,5 McFarland. O grupo controle negativo foi representado por uma solução de 2% de CHX, enquanto o controle positivo consistiu na suspensão bacteriana de *S. Aureus*. Após 24 horas de incubação, as zonas de inibição do crescimento microbiano ao redor dos espécimes foram medidas e registradas. Os diâmetros das zonas de inibição foram medidos em

milímetros utilizando um paquímetro digital (HENN et al. 2011). Para as micropartículas PLGA@CBD, os dados foram avaliados quanto à normalidade com os testes de Shapiro-Wilk e homogeneidade de variâncias. A citotoxicidade e a atividade antimicrobiana foram analisadas por ANOVA bidirecional, adotando-se $\alpha = 0,05$, com análises estatísticas realizadas no SigmaPlot 12.0 (Systat Inc., EUA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O óleo foi caracterizado no espectro de massas, determinando-se a presença de CBD em sua composição. O pH foi de 8,4 ($\pm 2,3$) e a viscosidade de 1,44, comparada à da água (1,33) e do óleo de milho (1,43), conforme identificado na composição do Epifractán. As imagens das micropartículas PLGA@CBD obtidas usando MEV (Fig. 1A e B) demonstraram uma forma esférica e uma estreita faixa de distribuição de tamanho ($81 \pm 8 \mu\text{m}$). Em alta ampliação, as micropartículas mostraram uma superfície lisa e densa, observado por outros autores que preparam micropartículas de PLGA usando uma técnica semelhante (KAMALI et al., 2019; QI et al., 2022). No geral, o EE% foi calculado em torno de $52 \pm 0,3\%$, enquanto o Loading% foi de $50 \pm 1,1\%$.



Figuras 1. Micropartículas PLGA@CBD

As micropartículas PLGA@CBD e PLGA avaliadas apresentaram valores não citotóxicos e maiores ao estabelecido pela norma ISO (citar). Os eludatos de 24 h e 21 dias das micropartículas PLGA@CBD apresentaram diferenças ($p < 0,001$) ao ser comparados ao controle celular e as micropartículas de PLGA. As concentrações de CBD examinadas exibiram uma influência positiva na viabilidade celular de hDPCs (KAMALI et al., 2019; QI et al., 2022). Essas são células que têm um alto potencial proliferativo e a capacidade de se diferenciar em vários tipos de outras células (QI et al., 2021). Enquanto aos ensaios de TDA apenas as micropartículas PLGA@CBD, apresentaram halos de inibição ($12,03 \pm 2,1 \text{ mm}$), confirmando o potencial antimicrobiano que o CBD poderia desenvolver em baixas concentrações como as usadas no presente estudo, rompendo as membranas citoplasmáticas bacterianas, inibindo a síntese de proteínas, DNA, RNA e peptidoglicanos (QI et al., 2022). Por fim, nas limitações do estudo foram não ter resultados da degradação das partículas e hidrogéis mediada por enzimas biológicas. O tamanho das micropartículas também poderia ser menor e, assim, gerar maior eficiência de encapsulamento e influenciar a liberação de CBD após a hidrólise. Estudos futuros sobre o assunto poderiam avaliar

as doses mínimas e máximas após a degradação do CBD liberado, com capacidades de proliferação celular e o efeito na diferenciação de diferentes linhagens celulares

4. CONCLUSÕES

As micropartículas de PLGA contendo óleo de CBD foram fabricadas e caracterizadas em um sistema inovador de encapsulamento, com características promissoras para promover e facilitar a entrega do fármaco. O sistema mostrou ausência de citotoxicidade e apresentou propriedades antimicrobianas contra *S. aureus*, o que o torna potencialmente adequado para ser incorporado em outros biomateriais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANCESTRAIS, L.; CODELUPPI, A.; BRIGHENTI, V.; TASSINARI, R.; TAGLIOLI, V.; MARCHETTI, L.; RONCATI, L.; ALESSANDRINI, A.; CORSI, L.; & PELLATI, F. Caracterização química de extratos não psicoativos de *Cannabis sativa* L., atividade antiproliferativa in vitro e indução de apoptose em células cancerígenas de leucemia mielóide crônica. **Phytotherapy Research**, v. 2, n. 1, p. 36, 2022.

CHEN, L.; YANG, W.; GAO, C.; LIAO, X.; YANG, J.; YANG, B. Os complexos de canabidiol mediados por dímeros de ciclodextrinas em ponte com alta solubilização, atividade antioxidante in vitro e citotoxicidade. **Journal of Molecular Liquids**, v. 345, n. 1, p. 41, 2022.

GRIFONI, L.; VANTI, G.; DONATO, R.; SACCO, C.; BILIA, AR. Nanocarreadores promissores para aumentar a solubilidade e a biodisponibilidade do canabidiol para uma infinidade de oportunidades terapêuticas. **MDPI Journal List**, v. 27, n. 10, p. 59, 2022.

KAMALI, A.; ORYAN, A.; HOSSEINI, S.; GHANIAN, MH.; ALIZADEH, M.; ESLAMINEJAD, MB. Microesferas carregadas com canabidiol incorporadas em andaimes osteocondutores aumentam o recrutamento de células-tronco mesenquimais e a regeneração de defeitos ósseos de tamanho crítico. **Materials Science and Engineering**, v. 12, n. 1, p. 64, 2019.