

DESENVOLVIMENTO DE EMULSÃO À BASE DE CBD: OTIMIZANDO A ADESÃO DOS PACIENTES ÀS TERAPIAS COM CANNABIS

Palavras-Chave: Cannabis Medicinal, Canabidiol, Estabilidade

Autores(as):

JULIANA FEITOZA BRASIL, FCF - UNICAMP

LUIZA APARECIDA LUNA SILVÉRIO, FCF - UNICAMP

CLAUDETE DA COSTA OLIVEIRA, FCM - UNICAMP

Prof.^a. Dr.^a. PRISCILA GAVA MAZZOLA (orientadora), FCF - UNICAMP

1. INTRODUÇÃO:

A Cannabis (*Cannabis sativa* L.) é uma planta rica em metabólitos que são produzidos para sua autodefesa contra agressores externos (Hiebert-Giesbrecht; Torres-Calzada; Wishart, 2023). Dentre a ampla variedade de componentes químicos, os mais importantes são o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), em maior abundância na planta; o canabidiol (CBD), segundo constituinte em maior abundância (Alexander, 2016) e o cannabigerol (CBG), presente em menor quantidade (Jastrząb *et al.*, 2022).

Atualmente a Cannabis tem sido utilizada para o tratamento de diversas condições, como a epilepsia, dores crônicas, náuseas, entre outros distúrbios. Além disso, o THC e CBD apresentaram atividade antioxidante, sugerindo uma atuação neuroprotetora (Hampson *et al.*, 1998), bem como atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas, como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae* (Blaskovich *et al.*, 2021).

No Brasil, atualmente, estão disponíveis apenas óleos contendo canabinoides em concentrações variadas. É importante lembrar que o THC tem restrições de comercialização (BRASIL, 2019). Os óleos contendo CBD são, preferencialmente para administração oral. No entanto, a adesão do paciente ao tratamento pode ser comprometida devido as propriedades organolépticas desagradáveis do produto (Baratta *et al.*, 2021).

O objetivo deste projeto de pesquisa é preparar emulsões óleo-em-água (O/A) à base de CBD. Essa abordagem é considerada uma alternativa promissora para oferecer aos pacientes alternativas terapêuticas mais confortáveis, uma vez que a fase contínua da formulação pode encobrir e mascarar o sabor e o odor característicos do óleo.

2. METODOLOGIA:

2.1. Avaliação da atividade antioxidante por DPPH

O método foi adaptado de Pires *et al.*, (2017), consistindo na avaliação da capacidade que a substância analisada tem em reduzir o radical DPPH (2,2- difenil-1-picril-hidrazil). Para tal, foram preparadas seis concentrações distintas da solução metanólica do extrato de CBD, que foram misturadas com solução metanólica de DPPH (0,34 µg/mL). A placa foi incubada em penumbra durante 30 minutos e analisada por espectrofotometria a 517 nm. A leitura do branco consistiu na mistura da amostra em metanol. A reação foi feita em triplicata e o resultado expresso em IC₅₀, que expressa a quantidade necessária de extrato para reduzir em 50% o radical DPPH, e em porcentagem de atividade antioxidante, calculado segundo a Equação 1:

$$\%AAO = \frac{(\text{Abs Controle DPPH} - \text{Abs amostra}) \times 100}{\text{Abs Controle DPPH}} \quad (1)$$

2.2. Flavonoides totais

O método foi adaptado de Alves e Kubota (2013). Inicialmente, uma curva padrão de quercetina foi preparada nas concentrações de 0, 5, 10, 20 e 40 µg/mL. Para o ensaio com a amostra, uma solução metanólica de CBD (5 mg/mL) foi diluída em cloreto de alumínio (AlCl₃). A reação foi feita em triplicata, incubada durante 10 minutos e analisada por espectrofotometria a 425 nm. A quantidade de fenólicos totais foi determinada por equivalência de quercetina (µg/mg).

2.3. Avaliação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana do extrato rico em CBD foi analisada através da CIM, utilizando as bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (ATCC 33591). Para isso, os microrganismos foram cultivados 24 horas antes em meio Agar Triptona de Soja (ATS) a 37°C, e o inóculo foi suspenso em Agar Muelle-Hinton Broth (MHB). Para a determinação da CIM, foi feita diluição seriada da solução estoque dos extratos (1 mg/mL) em placa de 96 poços contendo MHB. O procedimento foi feito em triplicata. Foi feito o controle positivo e negativo, contendo apenas meio de cultura e metanol como diluente. Tanto a placa de teste, quanto a de controle foram incubadas a 37 °C durante 24 horas e coradas com risazurina. Os testes com cada microrganismo foram feitos em duplicata em experimentos independentes.

2.4. Preparo de emulsão O/A

O óleo foi preparado solubilizando o extrato de CBD em azeite de oliva na concentração de 24 mg/mL. Foram preparadas duas formulações de emulsões O/A diferentes, denominadas de emulsão A e B, sendo adaptadas do método de Baratta e colaboradores (2022). Para ambas as formulações, foram preparadas a fase aquosa e a fase oleosa separadamente, tendo sua composição descrita na Tabela 1. Ao

final, ambas as fases foram vertidas uma na outra, homogeneizadas em ultra-turrax e submetidas ao teste de pré-estabilidade, sendo centrifugadas a 3.000 RPM durante 30 minutos. As formulações foram submetidas a análises de viscosidade utilizando um viscosímetro rotacional, além de avaliações de pH e aspecto físico. Todos os parâmetros foram analisados em triplicata e realizados em temperatura ambiente.

Tabela 1: Composição das emulsões A e B.

| | | Emulsão A | | Emulsão B | |
|--------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|--|
| | Composição | Quantidade (g) | Composição | Quantidade (g) | |
| Fase aquosa | Poloxamer P407 | 4 | Poloxamer P407 | 1 | |
| | Lecitina de soja | 2 | Lecitina de soja | 3 | |
| | Benzoato de sódio | 0,09 | Benzoato de sódio | 0,06 | |
| | Glicerina | 2 | Glicerina | 2 | |
| | Água ultra purificada | q.s.p. 30 | Água ultra purificada | q.s.p. 20 | |
| Fase oleosa | Óleo de CBD | 2 | Óleo de CBD | 2 | |
| | Tocoferol | 0,01 | Tocoferol | 0,01 | |
| | | | Álcool cetearílico | 1,4 | |

Fonte: Autoria própria.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

3.1. Atividade antioxidante usando DPPH

Os resultados da porcentagem de atividade antioxidante estão apresentados na Tabela 2, onde é possível notar que a atividade antioxidante foi proporcional a concentração do extrato de CBD.

Tabela 2: Atividade antioxidante em cada concentração da amostra.

| Concentração (mg/mL) | %AAO |
|-----------------------------|-------------|
| 0,5 | 19,35 |
| 1,5 | 32,45 |
| 4,5 | 44,76 |
| 7,5 | 73,01 |
| 10,5 | 79,83 |
| 13,5 | 86,11 |

Fonte: Autoria própria.

O potencial antioxidante também foi avaliado através da IC₅₀. Neste caso, os valores foram submetidos analisados em programa estatístico (GraphPad Prism 5), em que a atividade antioxidante foi correlacionada com o logaritmo das concentrações de extrato bruto (Chen; Bertin; Frolidi; 2013). Com isso, foi obtido uma IC₅₀ de 5,672 mg/mL. Esses resultados estão de acordo com dados presentes na literatura, tendo a sua atividade antioxidante justificada pela presença de grupos fenólicos no extrato capazes de reduzir o radical DPPH, resultando em uma menor IC₅₀ (Hacke *et al.*, 2019).

3.2. Teor de flavonoides totais

Através da curva padrão de quercetina, foi obtida a equação da reta $Y = 0,0605x + 0,0127$ com um coeficiente de correção (R^2) de 0,9983. Com isso, obteve-se um valor de $11 \pm 0,1$ μg equivalentes à quercetina por mg de flavonoides em uma concentração da amostra de 0,5 mg/mL. O conteúdo de flavonoides no extrato de CBD já era esperado, uma vez que diferentes compostos dessa classe já foram identificados na *Cannabis sativa* L., sendo relatados previamente na literatura (Baron, 2018).

3.3. Atividade antimicrobiana

O extrato de CBD apresentou resposta eficiente contra cepas Gram-positiva de *S. aureus* e *S. aureus* resistente à meticilina (SARM), tendo CIM de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As placas de SARM apresentaram crescimento em alguns poços devido a uma possível contaminação durante o procedimento. Estudos anteriores demonstraram que essa atividade contra cepas Gram-positivas está associada a presença de grupos fenólicos como o resorcinol na estrutura do canabinoide testado (Martinenghi *et al.*, 2020). Em relação as placas controle, todas apresentaram bom crescimento dos microrganismos, não demonstrando prejuízos na presença de diluente e metanol. Já no controle negativo, apenas uma das placas apresentou crescimento em poços aleatórios, sendo resultado provável de uma contaminação durante o procedimento.

3.4. Teste de pré-estabilidade e características físicas das emulsões

Não houve separação de fases em ambas as emulsões após a centrifugação, mantendo aspecto homogêneo quando armazenado em temperatura ambiente. A análise com viscosímetro resultou em viscosidade média de $11,3 \pm 1,75$ cP para a emulsão B. Já a emulsão A atingiu o limite máximo da viscosidade do aparelho. Essa alta viscosidade contribui para a estabilidade observada após a centrifugação. Em relação ao pH, a emulsão A apresentou um valor médio de $6,84 \pm 0,03$, enquanto a emulsão B apresentou um valor médio de $6,59 \pm 0,02$.

Quanto ao aspecto físico (Figura 1), ambas as emulsões apresentaram homogeneidade das fases, sem indícios de separação. A emulsão B apresentou coloração amarelada mais intensa em comparação a emulsão A, devido à maior quantidade de lecitina de soja utilizada na formulação. Ambas apresentaram um leve odor de azeite de oliva.

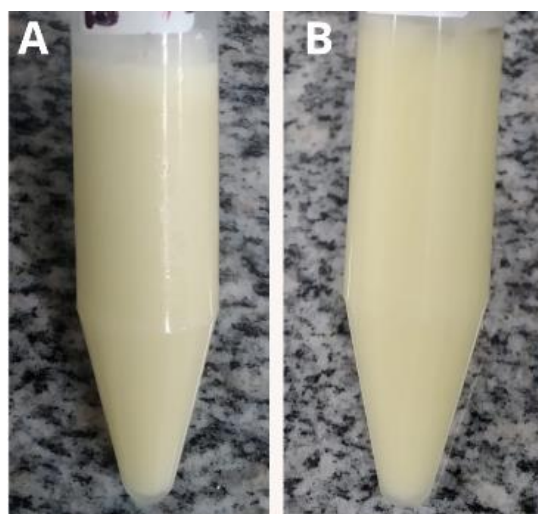


Figura 1: Emulsões A e B.
Fonte: Autoria própria.

4. CONCLUSÕES:

Os testes preliminares da estabilidade indicam que as emulsões à base de CBD têm bom potencial em manter as suas características ao longo do tempo, sem apresentar sinais de separação de fases. Além disso, as propriedades antioxidantes e antimicrobianas observadas ressaltam a diversidade de aplicações do CBD, abrindo novas oportunidades para o desenvolvimento de formulações inovadoras.

5. BIBLIOGRAFIA

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 327, de 9 de dezembro de 2019. Procedimentos para a concessão da Autorização Sanitária para a fabricação e a importação, bem como estabelece requisitos para a comercialização, prescrição, a dispensação, o monitoramento e a fiscalização de produtos de Cannabis para fins medicinais, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, 2019.

ALEXANDER, S. P. Therapeutic potential of cannabis-related drugs. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 64, p. 157-166, 2016.

ALVES, E.; KUBOTA, E. H. Conteúdo de fenólicos, flavonoides totais e atividade antioxidante de amostras de própolis comerciais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 1, 2013.

BARATTA, F. *et al.* Cannabis-based oral formulations for medical purposes: preparation, quality and stability. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 2, p. 171, 2021.

BARON, E. P. Medicinal properties of cannabinoids, terpenes, and flavonoids in cannabis, and benefits in migraine, headache, and pain: an update on current evidence and cannabis science. **Headache: The Journal of Head and Face Pain**, v. 58, n. 7, p. 1139-1186, 2018.

CHEN, Z.; BERTIN, R.; FROLDI, G. EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs. **Food chemistry**, v. 138, n. 1, p. 414-420, 2013.

HACKE, A. C. M. *et al.* Probing the antioxidant activity of Δ 9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol in Cannabis sativa extracts. **Analyst**, v. 144, n. 16, p. 4952-4961, 2019.

HAMPSON, A. J. *et al.* Cannabidiol and (-) Δ 9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 14, p. 8268-8273, 1998.

HIEBERT-GIESBRECHT, M.; TORRES-CALZADA, C.; WISHART, D. S. Metabolomics of the cannabis plant. In: **Cannabis Use, Neurobiology, Psychology, and Treatment**. Academic Press, p. 3-19, 2023.

JASTRZĄB A, JAROCKA-KARPOWICZ I, SKRZYDLEWSKA E. The Origin and Biomedical Relevance of Cannabigerol. **Int J Mol Sci**, v. 23, n. 14, 2022.

MARTINENGLI L. D *et al.* Isolation, Purification, and Antimicrobial Characterization of Cannabidiolic Acid and Cannabidiol from Cannabis sativa L. **Biomolecules**, 2020.

PIRES, J. S. *et al.* Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do método de sequestro do radical livre DPPH para extratos de algas. **Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo**, v. 12, p. 1-6, 2017.