



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS

MAYARA THAYS ALCÂNTARA DA COSTA

DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO
EXTRATO DE *Cannabis sativa* COM POTENCIAL ATIVIDADE
ANTILEISHMANIA

JOÃO PESSOA - PB

2024

MAYARA THAYS ALCÂNTARA DA COSTA

DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO
EXTRATO DE *Cannabis sativa* COM POTENCIAL ATIVIDADE ANTILEISHMANIA

Dissertação apresentada ao programa de
Pós-graduação em Produtos Naturais e
Sintéticos Bioativos, área
Farmacoquímica da Universidade
Federal da Paraíba, como requisito para
a obtenção do grau de Mestre em
Produtos Naturais e Sintéticos
Bioativos.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Humberto Xavier Júnior

JOÃO PESSOA – PB

2024

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

C838d Costa, Mayara Thays Alcântara da.

Desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas contendo extrato de Cannabis sativa com potencial atividade antileishmania / Mayara Thays Alcântara da Costa. - João Pessoa, 2024.
75 f. : il.

Orientação: Francisco Humberto Xavier Júnior.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Leishmaniose. 2. Nanotecnologia. 3. Cannabis sativa. I. Xavier Júnior, Francisco Humberto. II. Título.

UFPB/BC

CDU 616.993.161(043)

MAYARA THAYS ALCÂNTARA DA COSTA

**DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO
EXTRATO DE *Cannabis sativa* COM POTENCIAL ATIVIDADE
ANTILEISHMANIA**

Aprovado em 26 de setembro de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Francisco Humberto Xavier Júnior
Orientador

Prof. Dr. Éverton do Nascimento Alencar
Examinador externo

Prof. Dr. Yuri Manguiera do Nascimento
Examinador interno

*Dedico a Deus, Nossa Senhora e Santa Rita de Cássia
por nunca terem me desamparado nos momentos mais difíceis
À minha família e amigos*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, primordial em minha vida, obrigada por sempre me amparar e não me deixar desistir ou desanimar apesar de todas as dificuldades. Toda honra e toda a glória sejam dadas a Ti.

À Nossa Senhora, por sempre me acolher, cuidar de mim, amparar e me ouvir em todos os momentos.

À minha família, minha mãe Marinalva Alcântara por ser uma mulher guerreira, que apesar de qualquer circunstância, cuida, escuta e faz tudo por mim. Meu pai Manoel Geraldo, por acreditar no meu potencial e na educação. Ao meu irmão Mathews Alcântara, que me incentiva em muitos momentos que eu preciso.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Francisco Humberto Xavier Júnior, por toda a paciência e aprendizado, e por sempre acreditar na ciência, é uma pessoa que eu admiro demais.

À Lúcia Alcântara, quase uma segunda mãe, sempre me apoiou em todas as minhas ideias. Luana Alcântara e Larissa Alcântara, por serem meu ombro amigo e me ouvirem sempre.

Aos meus amigos: Erllon, Erivaldo, Mayara, Denner, Gislaine, Lucas, Neylon, Eduarda, Guilherme e Letícia, por trazerem mais alegria na minha vida.

A todos os colaboradores do Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica (BioTecFarm), ICs e pós-graduandos. Principalmente Karla, que sempre me ajudou e me ouviu e Álisson, por todo o aprendizado e paciência.

Ao Prof. Dr. Yuri Manguiera e ao Prof. Dr. Éverton Alencar pela disponibilidade em avaliar esta dissertação.

Ao CNPq pelo financiamento.

A UFPB e ao PgPNSB pela oportunidade.

Ao LMCA e ao LABIDIC pela disponibilidade.

E a todos que acreditaram e acreditam em mim, até mesmo quando eu não acredito. Obrigada!

"Nada na vida deve ser temido, somente compreendido. Agora é hora de compreender mais para temer menos."-Marie Curie

RESUMO

As leishmanioses são infecções zoonóticas e endêmicas no Brasil. A *Leishmania infantum* é a causadora da forma mais grave das leishmanioses. *Cannabis sativa* é uma planta bastante utilizada, com inúmeros alvos farmacológicos com promissora aplicação no tratamento de leishmanioses. Desta forma, a nanotecnologia surge como uma área inovadora que busca a cura de doenças de maneira menos invasiva e entre os nanossistemas existentes, destacam-se as nanocápsulas poliméricas. Este nanossistema demonstra uma liberação controlada do fármaco, diminuindo efeitos adversos, aumentando a biodisponibilidade e eficácia. Nessa perspectiva, o objetivo deste estudo foi desenvolver nanocápsulas poliméricas contendo extrato bruto das flores de *Cannabis sativa* para aplicação em formas promastigotas de *Leishmania infantum*. Sendo assim, o extrato foi caracterizado através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). A partir disso, as nanocápsulas de PCL 80 com o extrato de Cannabis foram desenvolvidas através da técnica de nanoprecipitação, otimizadas por planejamento experimental Box-Behnken e funcionalizadas com quitosana e L-PEG 5000. Estes sistemas foram caracterizados através das análises de tamanho, índice de polidispersão (PDI), potencial zeta, espectroscopia de infravermelho, microscopia eletrônica de varredura, doseamento e eficiência de encapsulação analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e determinação da estabilidade à diferentes temperaturas. O teste de viabilidade na forma promastigota de *Leishmania infantum* foi executado para analisar a CI_{50} das nanocápsulas. De acordo com a CG-EM, composto majoritário do extrato foi o canabidiol. As nanocápsulas de PCL e extrato (NCBDP), nanocápsulas contendo extrato funcionalizadas com L-PEG (NCBDLP) e quitosana (NCBDQ), apresentaram tamanhos $174,4 \pm 1,2$, $197 \pm 2,6$ e $269,8 \pm 4,5$ nm, PDI $0,11 \pm 0,02$, $0,1 \pm 0,04$, $0,26 \pm 0,02$ e potencial zeta $-32,77 \pm 0,9$, $-24,95 \pm 0,5$ e $+43,31 \pm 0,3$ mV, respectivamente. A espectroscopia de infravermelho detectou a presença dos principais grupos funcionais. As nanocápsulas apresentaram homogeneidade e estabilidade. NCBDP, NCDLP e NCBDQ apresentaram eficiência de encapsulação de 99,3%, 99,8% e 99,8%, respectivamente. O teste de viabilidade na forma promastigota de *Leishmania infantum* demonstrou CI_{50} 35,04 e $12,50 \mu\text{g/mL}$, para NCBDP e NCBDQ, respectivamente. Assim, as nanocápsulas encapsuladas com extrato de *Cannabis sativa* podem ser uma alternativa aplicada ao tratamento da leishmaniose visceral.

Palavras-chave: Nanotecnologia, *Cannabis sativa*, leishmaniose.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a zoonotic and endemic infection in Brazil. *Leishmania infantum* is the cause of the most severe form of leishmaniasis. *Cannabis sativa* is a widely used plant, with numerous pharmacological targets with promising application in the treatment of leishmaniasis. Thus, nanotechnology emerges as an innovative area that seeks to cure diseases in a less invasive way and among the existing nanosystems, the polymeric nanocapsule stands out. This nanosystem demonstrates a controlled release of the drug, reducing adverse effects, increasing bioavailability and efficacy. In this perspective, the objective of this study was to develop polymeric nanocapsules containing crude extract of *Cannabis sativa* flowers for application in promastigote forms of *Leishmania infantum*. Therefore, the extract was characterized by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). From this, PCL 80 nanocapsules with the extract were developed through nanoprecipitation, optimized by the Box-Behnken experimental design and functionalized with chitosan and L-PEG 5000. This system was characterized through particle size, polydispersity index (PDI), zeta potential, infrared spectroscopy, scanning electron microscopy, dosing and the encapsulation efficiency analyzed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and subjected to stability testing, being stored at different temperatures. The viability test in the promastigote form of *Leishmania infantum* was performed to analyze the IC₅₀ of the nanocapsules. According to GC-MS, the major compound of the extract was cannabidiol. The PCL and extract nanocapsules (NCBDP), extract-containing nanocapsules functionalized with L-PEG (NCBDLP) and chitosan (NCBDQ), presented particle sizes 174.4 ± 1.2 , 197 ± 2.6 and 269.8 ± 4.5 nm, PDI 0.11 ± 0.02 , 0.1 ± 0.04 , 0.26 ± 0.02 , and zeta potential -32.77 ± 0.9 , -24.95 ± 0.5 and $+43.31 \pm 0.3$ mV, respectively. Infrared spectroscopy detected the presence of the main functional groups. The nanocapsules presented homogeneity and stability. NCBDP, NCDLP and NCBDQ presented encapsulation efficiency of 99.3%, 99.8% and 99.8%, respectively. The viability test in the promastigote form of *Leishmania infantum* demonstrated IC₅₀ of 35.04 and 12.50 μ g/mL, for NCBDP and NCBDQ, respectively. Thus, nanocapsules encapsulated with *Cannabis sativa* extract represents an alternative for the treatment of visceral leishmaniasis.

Keywords: Nanotechnology, *Cannabis sativa*, leishmaniasis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ocorrência da leishmaniose no mundo.....	19
Figura 2 – Ciclo da Leishmaniose.....	20
Figura 3 – Exemplos de canabinoides.....	23
Figura 4 – Estrutura do canabidiol.....	24
Figura 5 – Cromatograma do extrato de <i>Cannabis sativa</i>	39
Figura 6 – Gráfico de Pareto relação do tamanho (nm).....	43
Figura 7 – Gráfico de Pareto relação do potencial zeta (mV).....	44
Figura 8 – Superfície dos fatores CBD e PCL em relação ao tamanho (nm).....	45
Figura 9 – Superfície dos fatores Kolliphor e PCL em relação ao tamanho (nm).....	45
Figura 10 - Superfície dos fatores Kolliphor e CBD em relação ao tamanho (nm).....	46
Figura 11 – Superfície dos fatores PCL e CBD em relação ao potencial zeta.....	46
Figura 12 – Superfície dos fatores PCL e Kolliphor em relação ao potencial zeta.....	47
Figura 13 – Superfície dos fatores Kolliphor e CBD em relação ao potencial zeta.....	47
Figura 14 – Espectro de infravermelho dos compostos utilizados nas formulações.....	51
Figura 15 – Espectro de infravermelho do CBD e das nanoformulações.....	52
Figura 16 - Análise morfológica das nanocápsulas.....	53
Figura 17 – Curva analítica obtida para o canabidiol.....	54
Figura 18 – Estabilidade do nanossistema NCBDP nas temperaturas de 4°C, 25°C e 37°C	56
Figura 19 – Estabilidade do nanossistema NCBDLP nas temperaturas de 4°C, 25°C e 37°C	56
Figura 20 – Estabilidade do nanossistema NCBDQ nas temperaturas de 4°C, 25°C e 37°C.....	57
Figura 21 – Estabilidade do potencial zeta (mV) NCBDP.....	57
Figura 22 – Estabilidade do potencial zeta (mV) NCBDLP.....	58
Figura 23 – Estabilidade do potencial zeta (mV) NCBDQ.....	58
Figura 24 – Atividade anti-promastigota do NCBDQ.....	60
Figura 25 - Atividade anti-promastigota do NCBDP.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - CG-EM do extrato de <i>Cannabis sativa</i>	40
Tabela 2: Tamanho, PDI e Potencial Zeta de pré-formulações.....	41
Tabela 3: Fatores e níveis do Box-Behnken.....	42
Tabela 4: Tamanho, PDI e Potencial Zeta do planejamento Box-Behnken.....	42
Tabela 5: Tamanho, PDI e Zeta do nanossistema funcionalizado com diferentes concentrações de L-PEG.....	49
Tabela 6: Tamanho, PDI e Zeta do nanossistema funcionalizado com diferentes concentrações de quitosana.....	50
Tabela 7: Avaliação da atividade anti-promastigota dos compostos de <i>L. infantum</i>	59

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Δ 9-THC — Δ 9-tetrahidrocanabinol

5-HT — 5-hidroxitriptamina

ACN — Acetonitrila

AEA — N-araquidonoiletanolamina

APEPI — Associação de Pesquisa e Apoio ao Paciente com Cannabis Medicinal

ATR — Reflectância Total Atenuada

BB — Box Behnken

BSTFA — N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida

CB1 — Receptor canabinoide tipo 1

CB2 — Receptor canabinoide tipo 2

CBD — Canabidiol

CG-EM — Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas

CI₅₀ — Concentração Inibitória Média

CLAE — Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLNs — Carreadores Lipídicos Nanoestruturados

DBO — Demanda Biológica de Oxigênio

DLS — Dynamic Light Scattering

FAAH — N-acilfosfatidiletanolamina-seletiva

FT — Formulação teste

FTIR — Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

GPR55 — Receptor acoplado à proteína G55

LABIDIC — Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas

L-PEG — Lipoid-Polietilenoglicol

MAGL — Monoacylglycerol lipase

MEV — Microscopia Eletrônica de Varredura

NCBDLP — Nanocápsula com canabidiol otimizada com Lipoid-PEG

NCBDP — Nanocápsula com canabidiol com policaprolactona

NCBDQ — Nanocápsula com canabidiol otimizada com quitosana

NIST — National Institute of Standards and Technology

NLSs — Nanopartículas Lipídicas Sólidas

PCL — Policaprolactona

PLGA — Ácido láctico-co-ácido glicólico

PDI — Índice de Polidispersão

PEG — Polietilenoglicol

PPAR γ — Proliferadores de Peroxissoma Tipo Gama

rpm — rotações por minuto

SDS — Dodecil Sulfato de Sódio

TCM — Triglicerídeos de Cadeia Média

THC — Tetrahydrocannabinol

TMCS — Trimethyl-chlorosilane

TRPV1 — Receptores Vanilóides de Pontecial Transitório do Tipo 1

WHO — World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	20
2.1 Aspectos gerais das Leishmanioses	20
2.2 Produtos naturais	22
2.3 <i>Cannabis sativa</i>.....	23
2.3.1 Canabidiol.....	25
2.3.2 Sistema endocanabinóide	26
2.4 Nanotecnologia.....	27
2.4.1 Nanocápsulas poliméricas	28
3 OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo geral.....	30
3.2 Objetivos específicos.....	30
4 METODOLOGIA.....	33
4.1 Obtenção do extrato	33
4.2 Caracterização do extrato de <i>Cannabis sativa</i>	33
4.3 Estudo de pré-formulação das nanocápsulas.....	34
4.4 Otimização da produção de nanocápsulas usando planejamento fatorial do tipo Box-Behnken	34
4.5 Desenvolvimento de nanossistemas funcionalizados	34
4.6 Caracterização físico-química dos nanossistemas	35
4.6.1 Análise do tamanho de partícula	35
4.6.2 Análise do potencial Zeta	35
4.6.3 Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier.....	35
4.6.4 Morfologia das nanocápsulas	35
4.6.5 Doseamento e Eficiência de Encapsulação	36
4.7 Estabilidade dos nanossistemas.....	37

4.8 Avaliação da atividade anti-<i>Leishmania</i> de formulações de extrato de <i>Cannabis sativa</i> em <i>L. infantum</i>.....	37
4.8.1. Manutenção de parasitas in vitro	37
4.8.2. Avaliação da atividade anti-promastigota e determinação da Concentração Inibitória mínima (CI50)	37
4.9 Análises estatísticas	38
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1 Cromatografia gasosa acoplada à espectrômetro de massas.....	40
5.2 Produção das nanocápsulas contendo óleo de <i>Cannabis sativa</i> , análise de tamanho de partícula e potencial zeta	41
5.3 Desenvolvimento de nanossistemas funcionalizados	49
5.4 Infravermelho com transformada de Fourier.....	51
5.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	53
5.6 Doseamento e Eficiência de Encapsulação	54
5.7 Estabilidade.....	56
5.8 Avaliação da atividade anti-promastigota e determinação da Concentração Inibitória mínima (CI50).....	60
6 CONCLUSÕES.....	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

1. Introdução

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas pelo protozoário *Leishmania* e transmitidas por insetos flebotomíneos, e geralmente afetam mamíferos, inclusive humanos, estando entre as principais doenças parasitárias. São caracterizadas por causar danos nos tecidos viscerais, cutâneos e mucocutâneos e se proliferam em vários sistemas hospedeiros (Bruno *et al.*, 2024).

No reino vegetal, além de metabólitos primários como proteínas e carboidratos, as plantas também produzem metabólitos secundários, que muitas vezes são identificados como produtos naturais (Zhang *et al.*, 2023). Os produtos naturais são um grupo de moléculas diversas oriundas de organismos, que buscam sobreviver e se adaptar sob as diversas condições ambientais. Além disso, essas moléculas podem interagir com alvos biológicos e alterar funções fisiológicas. Além disso, o uso de produtos naturais em diversas aplicações é antigo mas perdura até os dias atuais (Cano-Prieto *et al.*, 2024).

Dentre estes materiais surge a Cannabis, o nome de um gênero dentro da família Cannabaceae. A Cannabis apresenta compostos secundários chamados de canabinoides, dentre os quais já foram descobertas mais de 100 moléculas diferentes. O mais descrito é o tetrahydrocannabinol (THC), conhecido por seus efeitos psicoativos (Schilling, Melzer e McCabe, 2020).

A *Cannabis sativa* é utilizada de várias formas, sendo o mais comum, o uso recreativo que é bastante conhecido. Ao utilizá-la o usuário passa a ter efeitos como disforia, sonolência, alucinações e pensamentos anormais. Esses efeitos são causados pelo Δ 9-tetrahydrocannabinol (Δ 9-THC), um dos canabinoides encontrados nessa planta. Porém, a *Cannabis sativa* apresenta o Canabidiol (CBD), que possui potencial terapêutico, e pode ser usado em casos de epilepsia, ansiedade e tratamento para distúrbio do sono. Estudos recentes, demonstram também os efeitos anti-inflamatórios desse composto. Sendo assim, o canabidiol vem sendo muito utilizado para o tratamento de várias doenças (Pernoncini e Oliveira, 2014).

Ainda que os produtos naturais apresentem potencial aplicação terapêutica, estes demonstram dificuldades físico-químicas de solubilidade e biodistribuição em fluidos biológicos, além de que quando administrados provocam efeitos colaterais tóxicos em vários tecidos. Com os avanços tecnológicos e científicos, a fim de promover uma melhor biodisponibilidade de moléculas, surge a nanotecnologia, que apresenta uma grande variedade de nanopartículas, sendo vantajosa, por compor sistemas com baixa toxicidade,

mostrando aplicabilidade, sendo assim favorável para o tratamento de doenças (Güven, 2021).

As nanocápsulas são um exemplo de nanopartículas, sendo um sistema vesicular no qual o ativo está confinado a uma cavidade, podendo consistir em um núcleo líquido interno envolto por uma membrana polimérica. Nesse caso o ativo é geralmente dissolvido no núcleo interno e também pode ser adsorvido à superfície da cápsula (Lammari *et al.*, 2020).

Diante deste contexto, este trabalho baseia-se no desenvolvimento inovador de sistemas nanotecnológicos biodegradáveis e funcionalizados capazes de transportar moléculas naturais bioativas com potencial aplicação no tratamento de leishmaniose. Sendo assim, nanocápsulas poliméricas biodegradáveis contendo produtos naturais como o óleo de *Cannabis sativa* serão projetados para uma potencial atividade antileishmania, apresentando diferentes características de superfície e estrutura compatíveis para aplicação no tratamento de leishmaniose.

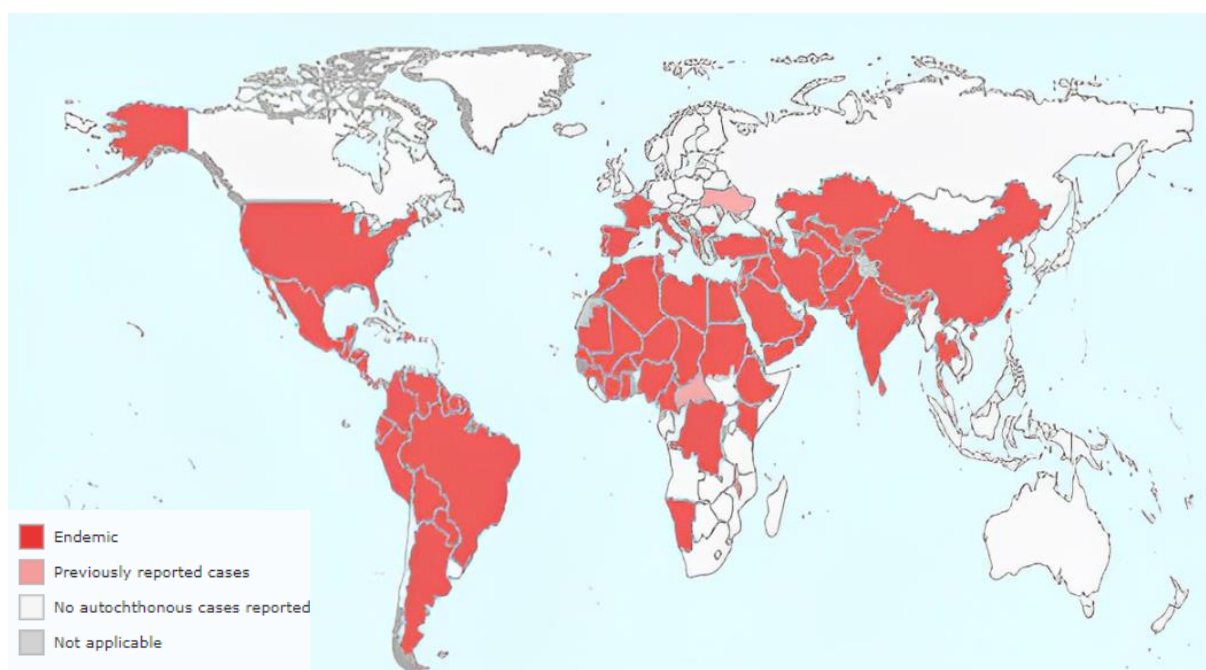
2. Fundamentação Teórica

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Aspectos gerais das Leishmanioses

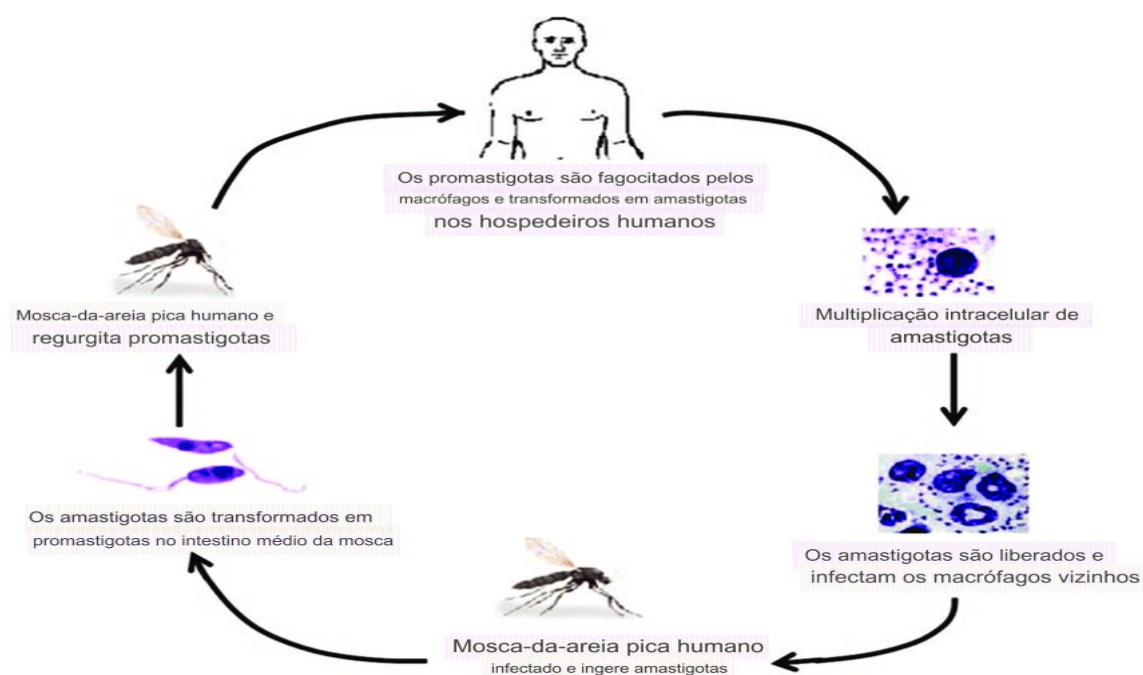
As leishmanioses são descritas como um conjunto de doenças causadas pela *Leishmania*, um protozoário parasita. Essas doenças são transmitidas através da picada de fêmeas de flebotomíneos infectados. Os principais tipos de leishmaniose são: cutânea, visceral e mucocutânea. Ela atinge principalmente países subdesenvolvidos na África, América e Ásia (Fig. 1), pois está relacionada a habitações precárias, subnutrição, deslocamento populacional, imunidade baixa e falta de recursos (World Health Organization, 2023).

Figura 1: Ocorrência da leishmaniose no mundo.



Fonte: WHO, 2023.

O ciclo de vida da *Leishmania* (Fig. 2) apresenta dois estágios: promastigota e amastigota. Os promastigotas de *Leishmania* vivem no intestino de uma fêmea de flebotomíneos do gênero *Lutzomia* ou *Phelobotomus*, após este protozoário se alimentar do sangue do hospedeiro, os promastigotas são depositados na epiderme ou na camada superior da derme, sendo internalizadas por macrófagos e neutrófilos. Os promastigotas se transformam em amastigotas que se disseminam. O ciclo de vida é completado quando um flebotomíneo se alimenta de sangue com as células parasitadas, e no intestino do inseto as amastigotas das células parasitadas se transformam rapidamente em promastigotas (Uribe-Querol; Rosales, 2024).

Figura 2: Ciclo da Leishmaniose

Fonte: Adaptado de Want, Yadav e Afrin, 2016.

O tipo mais comum de leishmaniose é a leishmaniose cutânea. É caracterizada pelo aparecimento de uma ou várias pápulas ou nódulos. Normalmente são indolores, mas em caso de infecção podem se tornar dolorosos. A leishmaniose cutânea pode ser causada pelas espécies *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. tropica*, *L. braziliensis*. Para o diagnóstico do parasita, é necessário passar pelo procedimento de biópsia ou raspagem (Siadat *et al.*, 2020). Após um período de incubação que dura semanas ou meses, as lesões da leishmaniose cutânea iniciam o seu desenvolvimento, em áreas expostas como o rosto. As pápulas escurecem conforme o tempo, até 6 meses quando as lesões cicatrizam (Paz *et al.*, 2011). Já a leishmaniose mucocutânea causa lesões potencialmente fatais na região da garganta, nariz e ouvido, e é mais comumente causada por *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* (Basile *et al.*, 2020; Paz *et al.*, 2011).

Leishmaniose visceral, conhecida como calazar, é uma infecção causada pela espécie *Leishmania infantum*, onde os cães são considerados os principais hospedeiros, embora outros animais, como os gatos, também podem ser hospedeiros da doença. Ela ocorre através das picadas das fêmeas flebotomíneos infectadas (Villanueva-Saz *et al.*, 2022).

A leishmaniose visceral é a forma sistêmica da doença, portanto, a mais grave, afetando principalmente medula óssea, o baço e o fígado, podendo ser letal se não for tratada. No

nordeste da África e sudeste da Ásia, é causada por *Leishmania donovani*. L. no sul da Europa, América do Sul e Central e nordeste da África, são causadas por *Leishmania infantum*. No caso de *L. infantum*, trata-se de uma infecção zoonótica, já a *Leishmania donovani*, trata-se de uma transmissão antroponética. É caracterizada por lesões papulares, nodulares ou maculares na pele. Entretanto, inicialmente os pacientes infectados com leishmania visceral podem ser infectados em um nível subclínico, não desenvolvendo sintomas clínicos e podem permanecer infectados em um nível subclínico, dificultando o diagnóstico e o tratamento, aumentando o desafio de um diagnóstico correto e tratamento adequado (Reimão, 2020).

Ademais, medicamentos como anfotericina B, antimoniais pentavalentes e miltefosina são utilizados para o tratamento da doença. Porém, esses fármacos apresentam alto custo e alta toxicidade. Inclusive, eles são utilizados há anos, podendo contribuir para o desenvolvimento da resistência dos parasitas (Alves *et al.*, 2024). Diante deste contexto, existe uma grande urgência de novas terapias, mais seguras e eficazes. Dessa forma, pesquisas em andamento na área da nanomedicina, podem auxiliar para possíveis alternativas terapêuticas (Goyzueta-Mamani *et al.*, 2024).

Os produtos naturais apresentam vários compostos bioativos, desta maneira metabólitos secundários com diversas estruturas e propriedades farmacológicas já foram identificados a partir de plantas (Nasim; Sandeep; Mohanty, 2022). Além disso, produtos naturais, como extratos de plantas medicinais, expressam grande aplicabilidade na terapia de várias doenças, podendo possuir propriedades imunomoduladoras contra doenças antiparasitárias, como a leishmaniose (Alves *et al.*, 2024).

Sendo assim, devido a rápida proliferação, gravidade e grande número de casos dessa zoonose em várias áreas do mundo, sobretudo no Brasil, há necessidade de melhores procedimentos de diagnóstico, tratamento e estratégias de controle (Bragança *et al.* 2024).

2.2 Produtos naturais

Os produtos naturais são fontes de moléculas bioativas extremamente importantes e têm sido um recurso para a química medicinal. Existem várias fontes de moléculas bioativas como plantas, bactérias, marinhas e fúngicas, além de substâncias endógenas produzidas por animais e humanos. Por isso, são empregados na química medicinal para desenvolver novas terapias. Os produtos naturais mostram grande potencial farmacológico, pois têm sido usados na medicina popular por milhares de anos (Gómez-García; Medina-Franco, 2022).

Ademais, o reino Plantae tem se mostrado muito promissor ao decorrer dos anos. Historicamente, a utilização de plantas medicinais tem sido muito comum em muitas civilizações, porque as pessoas buscam recursos na natureza para curar suas dores ou enfermidades (Yien *et al.*, 2023). O uso de plantas medicinais é muito comum principalmente em países em desenvolvimento, pois as pessoas utilizam as ervas para tratar muitas doenças. Além disso, esse conhecimento tradicional é transmitido para as próximas gerações, muitas vezes, sem algum documento formal (Asiamah *et al.*, 2023).

Os produtos naturais de plantas abrangem uma grande variedade de metabólitos secundários, como terpenos, compostos aromáticos e alcaloides. Além de serem utilizados para tratar doenças, também têm sido usados tradicionalmente para colorir tecidos, dar sabor a alimentos, entre outros usos na forma de extratos de fontes naturais, destacando sua importância social, cultural e econômica (Romero-Suarez; Keaslin; Jensen, 2022).

Nos últimos anos, houve um grande desenvolvimento tecnológico, ocorrendo o advento de ferramentas analíticas avançadas, novas técnicas e estratégias de síntese sofisticadas, abrindo novos caminhos e um maior desenvolvimento para a pesquisa de produtos naturais. Esses avanços expandiram a pesquisa farmacêutica, e também aumentou o interesse em produtos naturais, como uma das áreas de estudo mais visadas e promissoras. Ademais, continua sendo uma área crucial para o desenvolvimento de novos fármacos. Sendo evidente na busca por novos compostos anti-inflamatórios, antimicrobianos e antineoplásicos (Wang *et al.*, 2024).

2.3 *Cannabis sativa*

Cannabis sativa L. é uma das plantas mais antigas cultivadas para fins medicamentosos e alimentícios. A planta é originária da Ásia, mas foi introduzida no ocidente no século XIX. Pertence à família Cannabaceae, e cresce em todos os habitats. Na *Cannabis* são encontrados os canabinóides, uma classe química específica encontrada nesta planta, eles são produzidos no tricomas glandulares da planta. O principal canabinóide é o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), sendo um constituinte psicoativo (Radwan *et al.*, 2021). Inicialmente, três espécies de cannabis foram originalmente reconhecidas: *Cannabis sativa*, *Cannabis ruderalis* e *Cannabis indica* (Oriola; Kar; Oyedeji, 2024).

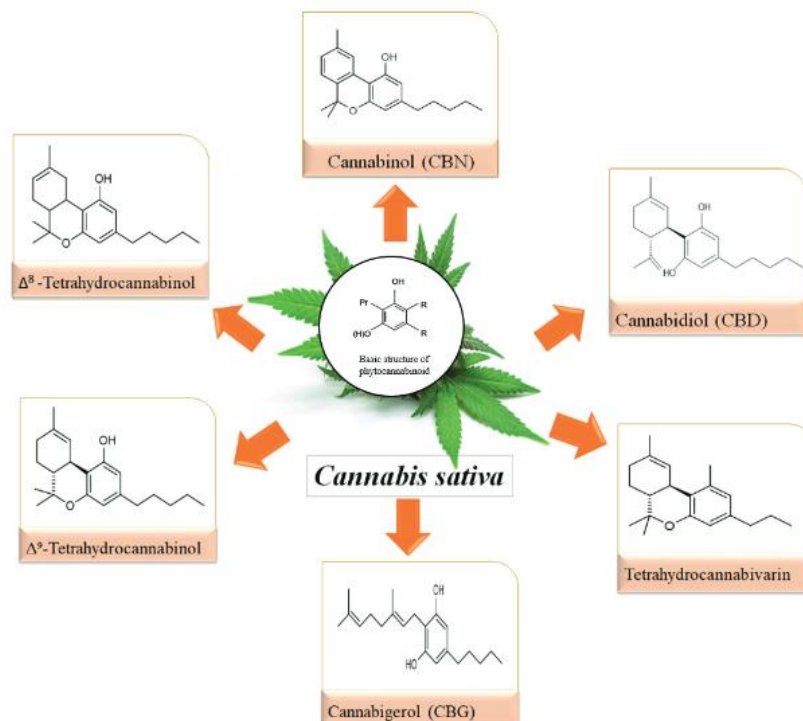
Os canabinoides, são um grande grupo que contém mais de 500 compostos diferentes, sendo mais de 100 caracterizados como fitocanabinoides e entre eles se destacam o canabidiol (CBD) e o delta-9-tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) (Laezza *et al.*, 2020).

Devido à ampla gama de compostos químicos provenientes da Cannabis, em adição à várias propriedades farmacológicas, a investigação sob os canabinoides está se tornando cada vez mais recorrente, atraindo popularidade e atenção para essa planta e seus fitocompostos (Docampo-Palacios *et al.*, 2023). A numerosa quantidade de compostos bioativos, apresentam um grande potencial para o tratamento de doenças e consequentemente o desenvolvimento de novos fármacos. Dessa forma, por apresentar atividade antiinflamatória e neuroprotetora, o isolamento desses compostos podem gerar vários produtos medicinais para o tratamento de várias doenças (Schanknecht *et al.*, 2023).

Os estudos clínicos têm constantemente mostrado perspectivas importantes e resultados positivos em relação ao uso de canabinoides, como o tratamento para dor (Heider *et al.*, 2022).

Para fabricação, prescrição, comercialização, dispensação, fiscalização e monitoramento para uso medicinal da *Cannabis sativa* no Brasil, há Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 327, de 9 de dezembro de 2019 que dispõe sobre os procedimentos para a concessão da Autorização Sanitária (Brasil, 2019).

Figura 3: Exemplos de fitocanabinóides



Fonte: Gupta *et al.*, 2023.

2.3.1 Canabidiol

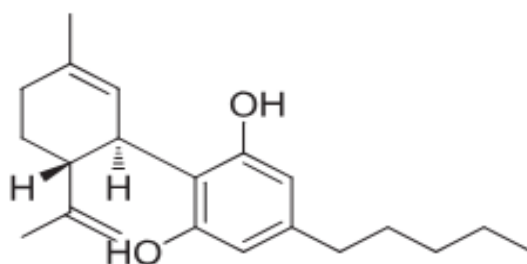
O canabidiol (CBD) é um dos principais fitocanabinoides encontrados na *Cannabis sativa*. Possui ação antioxidante, anti-inflamatória, relaxa o corpo e a mente e protegem os nervos (Sun, 2023). O canabidiol tem recebido muita atenção nos últimos anos, porque diferentemente do THC, apresenta atividades biológicas não psicoativas. Além disso, o CBD pode proteger o sistema nervoso do THC (Wang *et al.*, 2023).

O canabidiol (CBD) é um composto terpenofenólico, apresenta 21 carbonos em sua estrutura, com vários alvos moleculares. Muitos estudos celulares e pré-clínicos sugerem que este fitocanabinóide apresenta propriedades anti-inflamatórias, cardioprotetoras e neuroprotetoras. No entanto, poucos ensaios clínicos altamente controlados investigando o canabidiol foram executados para esclarecer seu potencial terapêutico (Britch; Babalonis; Walsh, 2021).

Porém, apresenta um grande potencial para terapia de várias doenças e disfunções, como perda de apetite e peso, esquizofrenia, glaucoma, câncer, Alzheimer, síndrome de Tourette, câncer, depressão, ansiedade, doença de Huntington, distonia, distúrbios do sono, síndrome do intestino irritável e epilepsia. Isso ocorre, pois o CBD atua a partir de mecanismos diferentes, consequentemente utiliza-se várias vias moleculares, receptores e alvos como canais iônicos, receptores 5-HT, receptores de adenosina, receptores opioides, GPR55, receptores de dopamina e receptores PPAR γ . Mas alguns mecanismos ainda são desconhecidos, como o mecanismo da leishmaniose (Assadpour *et al.*, 2023).

Em relação à estrutura química do CBD, este apresenta um núcleo bíciclo formado pelo monoterpene p-cimeno e olivetol, sendo assim, é caracterizado por ter um esqueleto tetrahidrobifenílico (Fig. 4). Por apresentar um derivado do alquilresorcinol, no olivetol, um grupo hidroxila é substituído por uma cadeia alquil. Embora o THC e o CBD sejam os principais canabinoides, representam apenas uma parte do metaboloma do terpenilalquilresorcinol do gênero *Cannabis* (Nelson *et al.*, 2020).

Figura 4: Estrutura do canabidiol.



Fonte: Peng *et al.*, 2022.

2.3.2 Sistema endocanabinóide

A partir do estudo dos efeitos da *Cannabis*, seus ligantes endógenos e receptores, verificou-se a importância fisiopatológica do sistema endocanabinoide (Pařízek *et al.*, 2023). O sistema endocanabinoide, apresenta uma combinação de receptores canabinoides e canabinoides endógenos, é responsável por estimular vários alvos, sendo assim, formando uma complexa rede de sinalização celular (Rezende *et al.*, 2023).

Os receptores canabinoides (CBs), fazem parte da base desse sistema e grande parte desses receptores, principalmente os CB1, que estão localizados no sistema nervoso dos mamíferos (Gülck; Moller, 2020). Porém, os receptores CB2 estão distribuídos nas células do sistema imunológico e tecidos periféricos (Yan *et al.*, 2023).

Além dos receptores inibitórios acoplados à proteína G CB1 e CB2, fazem parte do sistema endocanabinoide dois ligantes endógenos principais: N-araquidonoiletanolamina (anandamida ou AEA) e 2-araquidonoilglicerol (2-AG). A sinalização deste sistema é regulada por duas enzimas metabólicas, a amida hidrolase de ácido graxo (FAAH) e a lipase monoacilglicerídica (MAGL), são responsáveis por hidrolisar os ligantes endógenos AEA e 2-AG, respectivamente. Consequentemente, as interações dinâmicas entre esses componentes do sistema endocanabinoide são extremamente importantes nos processos fisiológicos, homeostase, plasticidade sináptica e processos comportamentais e emocionais (Meyer; Lee; Gee, 2017).

A sinalização retrógrada é descrita como o mecanismo de ação do sistema endocanabinoide. Isto significa que a produção de endocanabinoides é causada a partir da atividade pós-sináptica, dessa forma os endocanabinoides seguem para o nível pré-sináptico, consequentemente estimulando os receptores CB1, inibindo a liberação de neurotransmissores (Jîtcă *et al.*, 2023). Desta maneira, a atividade pós-sináptica leva à produção de um endocanabinoide, que a partir da sinapse, move-se para trás, liga-se aos receptores CB1 pré-sinápticos e suprime a liberação de neurotransmissores. Porém, há evidências sugerindo que os endocanabinoides podem sinalizar de forma não retrógrada, podendo interagir com o receptor vaniloide tipo 1 (TRPV1) (Castillo *et al.*, 2012).

Devido à ampla distribuição dos receptores canabinoides, estes estão envolvidos em vários processos fisiopatológicos e vias de sinalização de várias doenças, sendo assim, a utilização de canabinoides, como o canabidiol, pode trazer vários benefícios terapêuticos, além do desenvolvimento de novas terapias (Lowe *et al.*, 2021).

2.4 Nanotecnologia

Com o crescimento, desenvolvimento e benefícios da nanociência, é esperado que a produção em nanoescala seja ainda mais incorporada em muitas áreas da tecnologia e da ciência (Malik; Muhammad; Waheed, 2023). Atualmente a nanotecnologia tem demonstrado um grande potencial em aplicações biológicas. Além disso, também pode aumentar a eficácia de determinada substância com maior penetração celular, ligando-se de forma mais específica em células defeituosas, diminuindo a toxicidade. Por isso, novos estudos e descobertas em relação à nanomedicina estão sendo produzidos e elucidados (Dissanayake; Towner; Ahmed, 2023).

O desenvolvimento de nanomedicamentos, ou nanocarreadores, é produto do avanço da nanomedicina. Desta forma, apresentam vantagens em relação a medicina convencional, já que melhoram a entrega de substâncias ativas para estruturas alvo. Os nanocarreadores protegem as substâncias ativas, consequentemente, permitem o acesso as estruturas alvo em quantidade suficiente, possibilitando a liberação controlada das substâncias ativas (Sher *et al.*, 2024).

Entre os principais tipo de nanocarreadores, destacam-se: lipossomas, nanopartículas poliméricas e nanopartículas baseadas em lipídios. Lipossomas apresentam alta biodegradabilidade, estabilidade, biocompatibilidade, podendo encapsular conteúdos hidrofílicos e hidrofóbicos, já que apresenta um interior hidrofílico e uma membrana lipídica. Portanto, destacam-se como um veículo promissor de distribuição de fármacos. Seus principais componentes são lipídios e ácidos graxos que compreendem fosfolipídios, distribuídos em uma bicamada lipídica com um núcleo aquoso. Sendo assim, sendo um nanocarreador versátil pois podem ser usados para fornecer moléculas hidrofílicas e hidrofóbicas (Jiang *et al.*, 2024).

As nanopartículas poliméricas são nanocarreadores que consistem em uma matriz polimérica. Apresentam várias vantagens, como: biocompatibilidade, alta capacidade de carga e liberação controlada. Podem ser produzidas a partir de polímeros sintéticos, naturais e híbridos. Os polímeros sintéticos são ajustáveis e reprodutíveis, enquanto os polímeros naturais são biocompatíveis e biodegradáveis. Os polímeros híbridos combinam as vantagens dois tipos de polímeros. Porém, as nanopartículas poliméricas podem ter desvantagens como baixa estabilidade a longo prazo, mas estudos recentes têm se concentrado na melhoria e otimização de nanopartículas poliméricas (Tariq *et al.*, 2023).

As nanopartículas baseadas em lipídios consistem em uma matriz lipídica estabilizada por surfactantes, que têm como objetivo encapsular fármacos hidrofóbicos. Os

seus subtipos são definidos a partir da composição da matriz lipídica. Entre as nanopartículas lipídicas, destacam-se: As nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs). As NLSs são compostas de lipídios 100% sólidos. Porém, NLS evoluíram para carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs) que apresentam uma mistura de lipídios líquidos e sólidos. Essa mistura evita a cristalização lipídica, ou seja, evita que o fármaco encapsulado seja expelido (Da Silva *et al.*, 2021).

O CBD, pode ser encapsulado a nanocarreadores, como as nanocápsulas poliméricas, pois as formas tradicionais apresentam limitações (Assadpour *et al.*, 2023). Sendo assim, novas alternativas de produção de medicamentos utilizando a nanotecnologia vem sendo empregadas (Mehandole *et al.*, 2023).

Os principais estudos utilizando canabidiol ou outros fitocanabinoides oriundos da *Cannabis sativa*, utilizam nanopartículas baseadas em lipídios, como nanoemulsão e carreador lipídico nanoestruturado. Desta maneira, Aparicio-Blanco *et al.*, 2019 desenvolveram nanocápsulas lipídicas carregadas com canabidiol direcionados para terapia de glioma, e demonstraram uma CI_{50} entre 129,1 μM a 615,4 μM .

2.4.1 Nanocápsulas poliméricas

As nanocápsulas poliméricas apresentam características únicas, pois há cavidades internas em sua estrutura, que podem manter cargas protegidas pelo polímero (Sun *et al.*, 2020). As nanocápsulas são formadas por um núcleo líquido no interior de sua estrutura, sendo delimitado por uma membrana polimérica. Estas são consequentemente consideradas um nanossistema vesicular já que o fármaco pode estar confinado em uma cavidade (Apolinário *et al.*, 2020).

Para produzir as nanocápsulas, há vários métodos de preparação. Sendo elas: nanoprecipitação, revestimento de polímero, dupla emulsificação, polimerização interfacial, emulsão-difusão, camada por camada e emulsão- coacervação. Porém, outros métodos também estão sendo utilizados como a emulsão-evaporação (Mora-Huertas; Fessi; Elaissari, 2010).

A policaprolactona (PCL) é um poliéster alifático biodegradável, com baixo ponto de fusão (59–64 °C) e estável em temperaturas acima de 300 °C, apresenta boa solubilidade e um longo tempo de degradação, tornando-se viável na nanomedicina. As propriedades físico-químicas do PCL afetam seu grau de cristalinidade e peso molecular, que geralmente

varia de 3.000 a 90.000 g/mol. O PCL é um poliéster extremamente importante devido à sua grande estabilidade térmica e, também pela aprovação do FDA (Rahimkhoei *et al.*, 2023).

Quitosana é um polímero natural derivado da quitina, é um dos polissacarídeos mais utilizados em produtos farmacêuticos e empregados em aplicações biológicas. É renovável e biodegradável. Apresenta excelentes propriedades, como estabilidade, biocompatibilidade, formação de nanopartículas, liberação controlada e facilidade de derivatização, a quitosana é frequentemente empregada para administração de medicamentos. (Kankariya; Chatterjee, 2023).

Dessa forma, tem sido aplicada como revestimento ou como matriz polimérica para administração de fármacos pois o grupo amina que apresenta carga positiva, interage com as mucosa e membranas carregadas negativamente, melhorando a absorção pois adere com facilidade ao epitélio intestinal. Sendo assim, nanocápsulas que contém quitosana apresentam melhores propriedades mucoadesivas, facilitando a administração do fármaco e ocasionando uma melhor entrega (Penteado *et al.*, 2021).

Os Fosfolipídios PEGilados são conjugados de fosfolipídios e PEG utilizados para o desenvolvimento de diferentes sistemas de administração de medicamentos. Nanocarreadores baseados em fosfolipídios PEGilados podem escapar do sistema reticuloendotelial, aumentando o tempo de circulação sanguínea tendo assim um longo tempo de circulação sanguínea. Desta maneira, podem servir como nanocarreadores automontáveis, além disso, os fosfolipídeos PEGilados não alteram significativamente suas propriedades físico-químicas, eficiência de encapsulamento e índice de polidispersão (PDI). Desta maneira, fosfolipídeos PEGilados são muito utilizados para modificar nanopartículas (Zhang; Zhang, 2020).

3. Objetivos

3 OBJETIVOS

Geral

Desenvolver e caracterizar nanocápsulas poliméricas com extrato de *Cannabis sativa* para potencial tratamento de leishmaniose visceral.

Específicos

- Caracterizar o extrato etanólico bruto das flores de *Cannabis sativa* através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas;
- Desenvolver e otimizar nanocápsulas do extrato etanólico bruto das flores de *Cannabis sativa* rico em canabidiol através do uso do planejamento experimental do tipo Box-Behnken usando o método de nanoprecipitação;
- Realizar a funcionalização das nanocápsulas com quitosana e Lipoid-PEG;
- Caracterizar os nanossistemas desenvolvidos através das análises de tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta, espectroscopia de infravermelho e microscopia eletrônica de varredura;
- Determinar a estabilidade dos nanossistemas sob armazenamento à diferentes temperaturas;
- Dosear e determinar a eficiência de encapsulação do extrato etanólico bruto das flores de *Cannabis sativa* rico em canabidiol nas nanopartículas;
- Realizar testes de viabilidade na forma promastigota de *Leishmania infantum*.

4. Metodologia

4 METODOLOGIA

4.1 Obtenção do extrato

O extrato de *Cannabis sativa* foi obtido por meio da Associação de Pesquisa e Apoio ao Paciente com Cannabis Medicinal (APEPI). Desta forma, o extrato seguiu a metodologia padronizada de preparo, do cultivo à elaboração do produto. O quimiotipo utilizado no estudo foi *Doctor Seedsman*, e cultivado na sede campestre da APEPI, localizada em Paty de Alferes, Rio de Janeiro - Brasil. Espécimes férteis foram coletados no Rio de Janeiro, RJ - Brasil.

As flores de *Cannabis sativa* cultivadas foram secas em armário de circulação de ar com controle de umidade e temperatura. Depois, foram trituradas por um moinho de facas, após isso foram acondicionadas em embalagens hermeticamente fechadas para serem utilizadas na etapa de extração e obtenção do extrato vegetal. As flores de Cannabis trituradas foram colocadas em contato com álcool de cereais (92,8°) em proporção de substrato para solvente de 1:10 (m/v). O protocolo de extração seguiu o método padronizado do laboratório da APEPI, que consiste em maceração dinâmica da solução, seguida da filtração da biomassa e evaporação do solvente para obtenção do extrato. Após a evaporação do solvente, o extrato foi submetido à etapa de descarboxilação em câmara de secagem/aquecimento com circulação forçada de ar em frasco âmbar vedado a 115°C por 150 minutos. Após a descarboxilação, o extrato estava pronto para utilização nos estudos.

4.2 Caracterização do extrato de *Cannabis sativa*

O extrato foi submetido ao processo de derivatização por sililação utilizando o agente derivatizante BSTFA (N,O-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida) + TMCS (trimethyl-chlorosilane) (Sigma – Aldrich) para facilitar a análise de compostos polares por cromatografia gasosa. Esse processo consiste na combinação de 5mg da amostra com 500 µL de BSTFA e essa mistura incubada por 5-10 minutos ou até completa reação. A amostra derivatizada foi preparada em hexano (1000 µL) e injetada.

A identificação do extrato de *Cannabis sativa* foi realizada em um Cromatógrafo Gasoso acoplado a Espectrômetro de Massas, do LMCA – UFPB. Sendo o modelo GCMS-QP2010 Ultra, Shimadzu. A coluna para realização das análises foi RTX-5MS capilar (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). A temperatura do forno da coluna foi 40,0 °C e a temperatura de injeção: 200°C. As condições cromatográficas foram: temperatura inicial da coluna: 100 °C, mantida por 10 minutos, seguido de aquecimento de até 280 °C. O volume injetado de cada

amostra foi de 1 μ L e a vazão do gás Hélio foi de 1,0 mL/min. A identificação dos compostos foi baseada na comparação dos espectros de massa obtidos com os da biblioteca NIST (Software package, Finnigan) e dos respectivos índices de retenção com a literatura.

4.3 Estudo de pré-formulação das nanocápsulas

Para a produção das nanopartículas, foi realizado um estudo de pré-formulação de amostras contendo diferentes concentrações dos componentes que integram esses sistemas. As nanocápsulas foram elaboradas segundo o método de nanoprecipitação. Sendo assim, para a obtenção da fase orgânica foram utilizados 50 mg de óleo TCM (Triglicerídeo de Cadeia Média), 40 mg de policaprolactona (PCL) e 40 mg de alguns excipientes, como: Span 60 ou Lipoid S100. Foram solubilizados em 6 mL de acetona para produzir a fase orgânica. Esta fase foi injetada lentamente a 12 mL de água Milli-Q®. Outras formulações foram produzidas com outros excipientes na fase aquosa, como Kolliphor® ELP ou Tween 80 ou Pluronic p188. Desta forma, 40 mg de PCL e 50 mg de TCM também foram solubilizados em 6 mL de acetona, e foram injetados lentamente na fase aquosa, que foi composta por Kolliphor ELP ou Pluronic ou Tween 80 a 12 mL de água Milli-Q®. Estas dispersões foram homogeneizadas durante 10 minutos por agitação magnética a 900 rpm à temperatura ambiente. A dispersão coloidal obtida foi concentrada por evaporador rotativo à 40°C.

4.4 Otimização da produção de nanocápsulas usando planejamento fatorial do tipo Box-Behnken

Um planejamento experimental de três fatores e três níveis tipo Box-Behnken foi empregado. As concentrações de PCL (20, 30, 40 mg), extrato de *Cannabis sativa* (25, 75, 125 mg) e Kolliphor® ELP (20, 40, 60 mg) foram codificadas e usadas como variáveis independentes. A produção das nanocápsulas foi desenvolvida conforme descrito anteriormente com modificação segundo o planejamento experimental aleatorizado tipo Box-Behnken. As variáveis dependentes foram: tamanho da partícula, índice de polidispersão e potencial zeta. A otimização foi realizada pela construção de gráficos 3D de superfície de resposta. As análises foram realizadas utilizando o software Statistica 7.

4.5 Desenvolvimento de nanossistemas funcionalizados

Os nanossistemas com modificação da superfície (funcionalização) foram preparados conforme descrito anteriormente com pequenas modificações. Assim, 0,05%, 0,1%, 0,15% e 0,20% de fosfolipídeos PEGlados 5000 (Lipoid-PEG 5000) foram adicionados na fase

orgânica e 0,05%, 0,1%, 0,15% e 0,20% de quitosana foram adicionados na fase aquosa durante o processo de produção, e foram solubilizados durante 10 minutos e concentrados em rotaevaporador a 40°C.

4.6 Caracterização físico-química dos nanossistemas

4.6.1 *Análise do tamanho de partícula*

O diâmetro hidrodinâmico e a distribuição do tamanho dos nanossistemas foram determinados pelo espalhamento dinâmico de luz (DLS – *Dynamic Light Scattering*), usando Zetasizer Lab (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, RU) a 25°C. O ângulo de dispersão foi fixado em 90 graus. As amostras foram diluídas a uma razão de cerca de 1: 100 com água Milli-Q® antes da análise. Os resultados foram expressos como o diâmetro hidrodinâmico médio, o desvio-padrão da distribuição do tamanho e o índice de polidispersão (PDI).

4.6.2 *Análise do potencial Zeta*

A medida do potencial zeta foi determinada a fim de conhecer o comportamento dos nanossistemas quando em suspensão. Para isto, foi feita a determinação utilizando um Zetasizer Lab (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, RU) a 25°C. As amostras foram diluídas a uma razão de cerca de 1: 100 com água Milli-Q® antes da análise. Todos os resultados correspondem à média de três determinações.

4.6.3 *Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier*

Estudos de infravermelho com transformada de Fourier foram realizados para comprovar a funcionalização dos nanossistemas. As amostras foram analisadas pelo espectrômetro Agilent Cary 630 FTIR (Agilent, Santa Clara, Califórnia (CA), 2020), através de reflectância total atenuada (ATR), com módulo de amostragem: Multi Reflexão ZnSe ATR, Refletância especular (45 graus). As amostras foram analisadas à 25°C em intervalo de 600-4000 cm^{-1} , com varredura de 2 cm^{-1} e número total de 126 scans.

4.6.4 *Morfologia das nanocápsulas*

As nanocápsulas foram diluídas na proporção de 1:10 v/v em água Miliq. Após isso, em uma lamínula de vidro fixada em fita de carbono em stub, foram inseridos 5 uL das formulações. As amostras foram secas em estufa a 37 °C por 24 horas, metalizadas com ouro,

usando um metalizador DESK II (Denton Vacuum) e analisadas usando um MEV (TESCAN, MIRA3) com uma tensão de aceleração de 20 kV e uma distância de trabalho de 15 milímetros. Também foram realizadas análises de espectroscopia de energia dispersiva (EDS), usando um EDS (OXFORD ULTIM MAX 40) acoplado ao MEV (tensão de aceleração de 20kv e distância de trabalho de 5mm).

4.6.5 Doseamento e Eficiência de Encapsulação

Um sistema Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) equipado com detector UV-VIS SPD-10A (Shimadzu, Japão) e coluna GIST C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 µm) acoplado a pré-coluna GIST C18 (4 x10mm) foi usado para as etapas de doseamento e eficiência de encapsulação do extrato de *Cannabis sativa*. A fase móvel foi composta por metanol: água (90:10 v/v), que foram filtrados e degaseificados previamente. O comprimento de onda de análise foi obtido a partir do espectro de varredura de 220 nm. O fluxo da fase móvel foi estabelecido para 1,5 mL/min e o volume de injeção foi de 20 µL de amostra. Os cromatogramas resultantes foram analisados usando o software empower® para obter as áreas dos picos correspondentes a cada concentração.

Inicialmente, foi realizada a construção da curva de calibração usando metodologia adaptada de Mandreoli *et al.*, 2019. Antes de usar o instrumento, o sistema foi condicionado por 20 minutos por fluxo da mistura de eluente no instrumento sob as mesmas condições do método. Simultaneamente à análise da amostra, soluções padrão foram injetadas em diferentes concentrações (1, 5, 10, 15, 20 ug/mL) para a construção de curvas de calibração. Para formá-la, utilizou-se a concentração e absorbância, sendo expressas através da equação da linha $y = mx + b$.

A quantificação de canabinoides foi feita a 220 nm, seguindo a metodologia adaptada de Mandreoli *et al.*, 2019. O doseamento das 3 formulações foi feito a partir da CLAE. Sendo assim, 10 µl de cada formulação foram solubilizados em 990 µl de Acetonitrila, para ocorrer o rompimento das partículas pelo solvente. Após isso, foram centrifugadas em centrífuga Eppendorf a 14000 rpm em 10 minutos. Desta forma 100 µl dessa solução foram adicionados em mais 900 µl de ACN em Banho Ultrassônico por 5 minutos, seguido de filtração e análise no CLAE.

A eficiência de encapsulação (EE%) foi determinada por método de ultrafiltração em um filtro Amicon® Ultra 0.5mL10 kDa submetidos a centrifugação de 5.000 rpm por 15 minutos. O filtrado foi diluído em ACN e analisado na CLAE. A EE% foi calculada pela seguinte formula:

$$EE (\%) = \frac{\text{Quantidade total do composto} - \text{Quantidade do composto não encapsulado}}{\text{Quantidade total do composto}} \times 100$$

4.7 Estabilidade dos nanossistemas

A estabilidade dos nanossistemas foi avaliada por um período de 3 meses à diferentes temperaturas: 4°C, 25°C e 37°C, em termos de tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta.

4.8 Avaliação da atividade anti-*Leishmania* de formulações de extrato de *Cannabis sativa* em *L. infantum*

4.8.1. Manutenção de parasitas *in vitro*

As formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum* [IOC/L0579 (MHOM/BR/1974/PP75)] foram mantidas *in vitro* em meio Schneider (24,084 g/L de pó Schneider + 0,4 g/L de Bicarbonato de Sódio (NaHCO₃) + 0,6 g/L de cloreto de cálcio anidro – CaCl₂), pH 7, suplementado com 20% de soro bovino fetal (SBF), 1% de antibiótico (penicilina 200 U/mL e estreptomicina 0.1 mg/mL) e 2% de urina masculina humana estéril filtrada (filtro 0,22 µm), a 26 ± 1 °C em estufa de Demanda Biológica de Oxigênio (DBO) e repicadas (passagem celular) semanalmente, não ultrapassando vinte repiques, para manutenção dos parasitas.

4.8.2. Avaliação da atividade anti-promastigota e determinação da Concentração Inibitória mínima (CI₅₀)

A atividade anti-*Leishmania* dos compostos em populações de promastigotas metacíclicas foi avaliada utilizando o teste de MTT (brometo de 3-[4,5- dimetil-tiazol-zil]-2,5- difeniltetrazólio), para análise de citotoxicidade. Em placas de 96 poços foram adicionados 50µL de meio Schneider suplementado e posteriormente, foram adicionados os compostos em duplicata, previamente diluídos em meio Schneider suplementado, para um volume final de 100 µL para cada poço.

Por fim, foram adicionadas 1 x 10⁶ parasitas/poço e as placas incubadas por 72h estufa de demanda biológica de oxigênio (DBO) à 26°C. Ao final da incubação, foram adicionados 10 µL de MTT diluído em tampão fosfato-salino a uma concentração final de 5

mg/mL. Após incubação por mais 4h, em estufa de demanda biológica de oxigênio a 26°C, foram adicionados 50µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10%. A placa permaneceu em *overnight* para dissolução do formazan e, por último, foi realizada leitura a 540 nm em leitora de placa (Biotek modelo ELx800). O branco foi mantido na ausência de substâncias e de células e o controle negativo foi mantido apenas com promastigotas em meio Schneider suplementado na ausência dos compostos.

4.9 Análises estatísticas

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos como a média $\pm$ desvio padrão. As médias de dois grupos foram comparados usando testes t de Student não emparelhados. Ao comparar vários grupos, a análise de variância unidirecional (ANOVA) foi aplicada com o pós-teste de comparação múltipla de Tukey. Os dados estatísticos foram considerados significativos com $p < 0,05$.

5. Resultados e Discussão

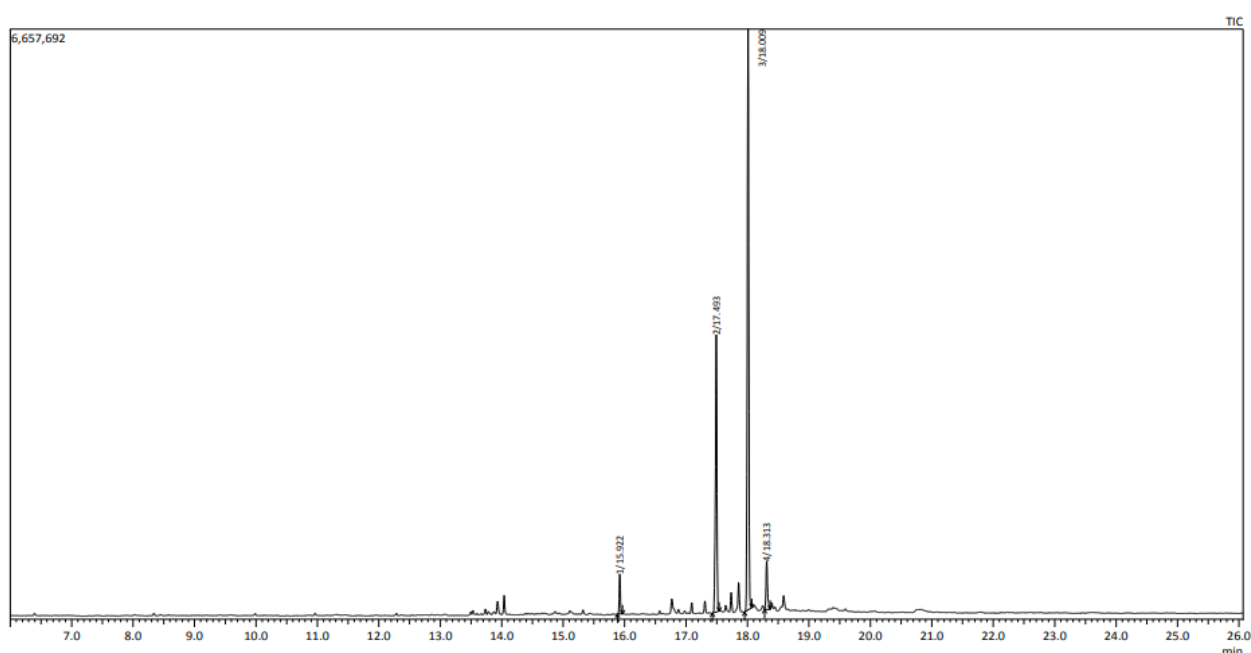
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Cromatografia gasosa acoplada à espectrômetro de massas

A cromatografia gasosa acoplada à espectrômetro de massas (CG/EM) é utilizada com bastante frequência na análise de produtos naturais, já que apresenta estabilidade e reprodutibilidade. Anteriormente, era utilizada para analisar compostos voláteis, mas com o desenvolvimento de vários mecanismos de derivatização, também se tornou possível a análise de compostos não voláteis (Putri *et al.*, 2022).

A partir do cromatograma (Fig. 5) foi possível observar 2 picos principais. Nesta análise, o pico 2 demonstrou-se majoritário, com o tempo de retenção (TR) de 18,009 minutos e área correspondendo a 61,49% (Tabela 1). Apresentou relação massa-carga (m/z) 231,10 representando a fórmula molecular $C_{21}H_{30}O_2$, comparando com a biblioteca NIST08, foi possível indicar que a substância analisada era o canabidiol. Desta forma, apresentou resultados similares ao extrato de *Cannabis sativa* de Dos Santos, 2023.

Figura 5: Cromatograma do extrato de *Cannabis sativa*



Fonte: Autoria própria, 2024.

Tabela 1: Dados do CG-EM do extrato de *Cannabis sativa*

Pico	TR (min)	Área (%)	m/z	Substância
1	15,922	3,33	117.10	Ácido hexadecanoico
2	18,009	61,49	231.10	Canabidiol

Fonte: Autoria própria, 2024.

5.2 Produção das nanocápsulas contendo óleo de *Cannabis sativa*, análise de tamanho de partícula e potencial zeta

Para desenvolver as nanocápsulas poliméricas, inicialmente, foi utilizado PCL 80 e outros excipientes como surfactantes para o estudo inicial. O polímero PCL é um poliéster hidrofóbico amplamente aplicado em sistemas de liberação de fármacos, pois confere importantes propriedades físico-químicas e mecânicas ao dispositivo carreador. O surfactante e o estabilizador utilizados devem garantir o arranjo supramolecular das nanocápsulas. (Penteado *et al.*, 2021). Foram desenvolvidas 5 formulações teste (FT) para testar alguns excipientes, com o objetivo de verificar os excipientes mais compatíveis ou com um melhor resultado, através da análise de tamanho de partícula, PDI e potencial zeta e posteriormente escolhe-los para encapsular o extrato bruto rico em canabidiol.

Nesta etapa de seleção de estabilizantes, foi demonstrado que a formulação teste 5 (FT-5), contendo PCL e TCM na fase orgânica e Kolliphor ELP na fase aquosa apresentou um melhor resultado (tabela 2), com um menor tamanho de partícula (242,4 nm) e índice de polidispersão (PDI) 0,07. Desta forma, foram escolhidos estes componentes para o planejamento Box-Benkhen.

Tabela 2: Tamanho, PDI e Potencial Zeta de pré-formulações.

Form	PCL (mg)	TCM (mg)	Tween 80 (mg)	Span 60 (mg)	Pluronic (mg)	Lipoid S100 (mg)	K. ELP (mg)	Tamanho (nm)	PDI	P. Zeta (mV)
FT-1	40	50	40	-	-	-	-	274,7±0,4	0,12±0,05	-25,1±0,9
FT-2	40	50	-	40	-	-	-	243,8±3,8	0,17±0,04	-35,52±2,9
FT-3	40	50	-	-	40	-	-	441,8±16,9	0,22±0,04	-26,78±1,0
FT-4	40	50	-	-	-	40	-	252,3±6,4	0,21±0,02	-32,32±2,9
FT-5	40	50	-	-	-	-	40	242,4±2,3	0,07±0,04	-23,38±0,9

Fonte: Autoria própria, 2024.

Após o estudo de pré-formulações, o planejamento Box-Benkhen foi formulado, as formulações foram codificadas com o nome BB (Box Behnken) e o número correspondente (1 a 15). Na tabela 3 estão descritos os fatores e os níveis utilizados, e na tabela 4 estão descritas as concentrações de cada formulação, assim como o tamanho, PDI e potencial zeta obtidos. A partir das análises de tamanho de partícula e potencial zeta, foi possível criar e observar os gráficos de Pareto (Figs. 6 e 7) e gráficos de superfície de resposta (8 a 13).

Box-Behnken é um design experimental que se fundamenta em uma metodologia que utiliza a superfície de resposta. Há três blocos em um design Box-Behnken de três fatores. Comparado com outras metodologias de superfície de resposta, se torna mais vantajoso pois requer apenas 15 execuções (12 mais 3 pontos centrais), além disso, apresenta três níveis. O design Box-Behnken não busca fatores em níveis extremamente baixos ou altos, sendo assim ele é útil quando o pesquisador quer evitar resultados irracionalmente extremos (Zhang, Murowchick e Youan, 2011).

Tabela 3: Fatores e níveis do Box-Behnken

FATORES (mg)	NÍVEIS		
	-1	0	+1
PCL	20	30	40
Extrato	25	75	125
Kolliphor ELP	20	40	60

Fonte: Autoria própria, 2024.

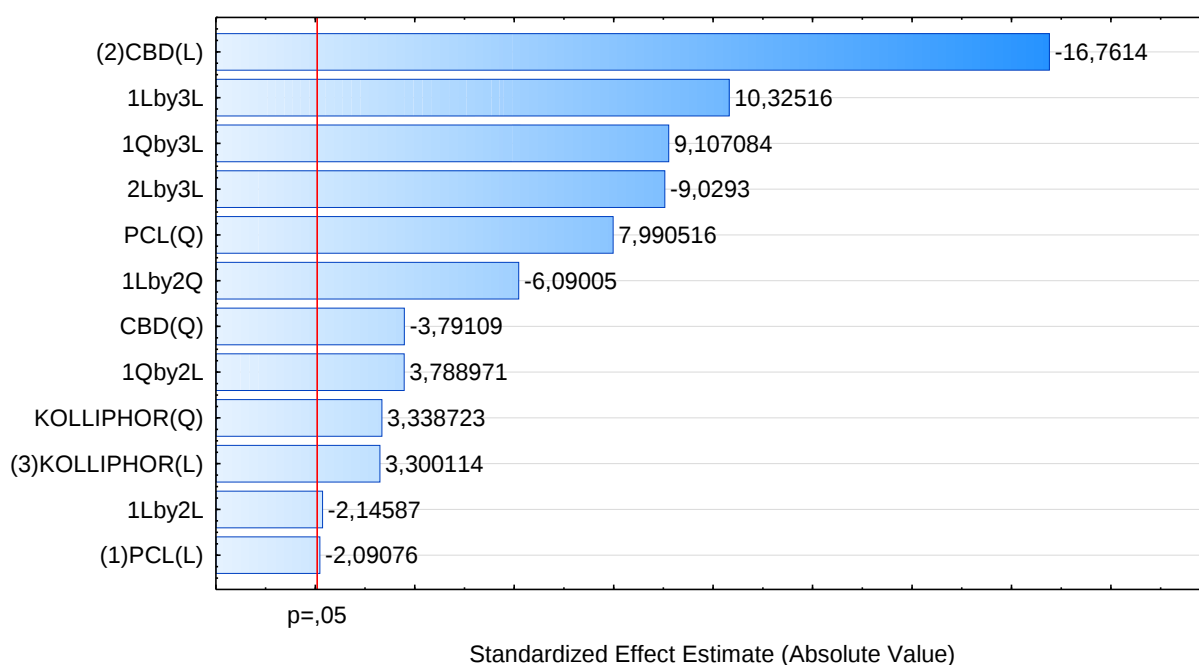
Tabela 4: Tamanho, PDI e Potencial Zeta do planejamento Box-Behnken

Formulação	PCL (mg)	Extrato (mg)	Kolliphor ELP (mg)	Tamanho (nm)	PDI	Zeta (mV)
BB01	20	25	40	174,3 ±1,9	0,11 ±0,15	-28,14 ±0,7
BB02	30	75	40	199 ±1,6	0,11 ±0,03	-30,12 ±0,2
BB03	20	125	40	191 ±2,4	0,15 ±0,03	-33,02 ±0,6
BB04	30	125	60	197,3 ±1,3	0,12 ±0,02	-30,72 ±0,5
BB05	30	25	60	184,4 ±2,5	0,11 ±0,06	-23,54 ±0,8
BB06	30	125	20	183,9 ±1,2	0,23 ±0,02	-31,53 ±0,5
BB07	30	75	40	211,1 ±0,3	0,12 ±0,03	-28,96 ±0,2
BB08	20	75	20	202,1 ±1,2	0,07 ±0,03	-27,9 ±0,8
BB09	40	75	20	204,7 ±1,5	0,17 ±0,04	-34,95 ±0,3
BB10	20	75	60	174,4 ±1,2	0,11 ±0,02	-32,77 ±0,9
BB11	40	125	40	209,5 ±1,3	0,19 ±0,01	-33,33 ±0,4
BB12	30	25	20	202,1 ±0,5	0,09 ±0,01	-31,57 ±0,4
BB13	40	25	40	204,1 ±2,2	0,12 ±0,02	-26,76 ±0,7
BB14	30	75	40	178,4 ±1,2	0,09 ±0,02	-29,23 ±1,1
BB15	40	75	60	171,6 ±2,8	0,14 ±0,01	-31,55 ±1,0

Fonte: Autoria própria, 2024.

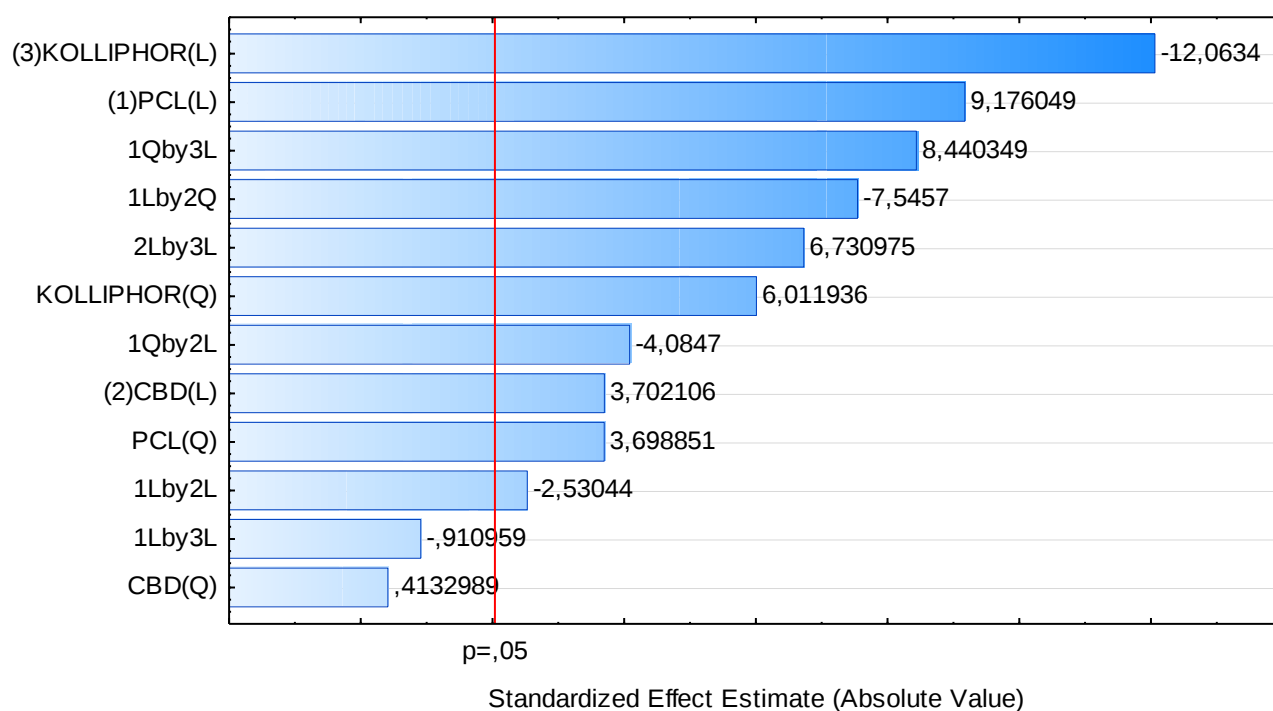
Com os gráficos de Pareto, foi possível analisar os efeitos de interação de cada variável sobre o tamanho e potencial zeta das formulações. Além disso, também permitiu identificar variáveis estatisticamente significativas para o processo, com nível de significância (valor $-0,05$). Dessa maneira, valores positivos demonstraram resultados favoráveis, e valores negativos indicaram efeitos antagônicos (Xavier-Junior, 2018). Sendo assim, foi possível constatar que o canabinóide CBD (canabidiol), contido na *Cannabis sativa* foi a variável que mais aumentou significativamente o tamanho do nanossistema (Fig.6). Além disso, o gráfico demonstrou que a variável Kolliphor ELP, foi responsável pela diminuição do potencial zeta (Fig.7).

Fig. 6: Gráfico de Pareto relação do tamanho (nm)



Fonte: Autoria própria, 2024.

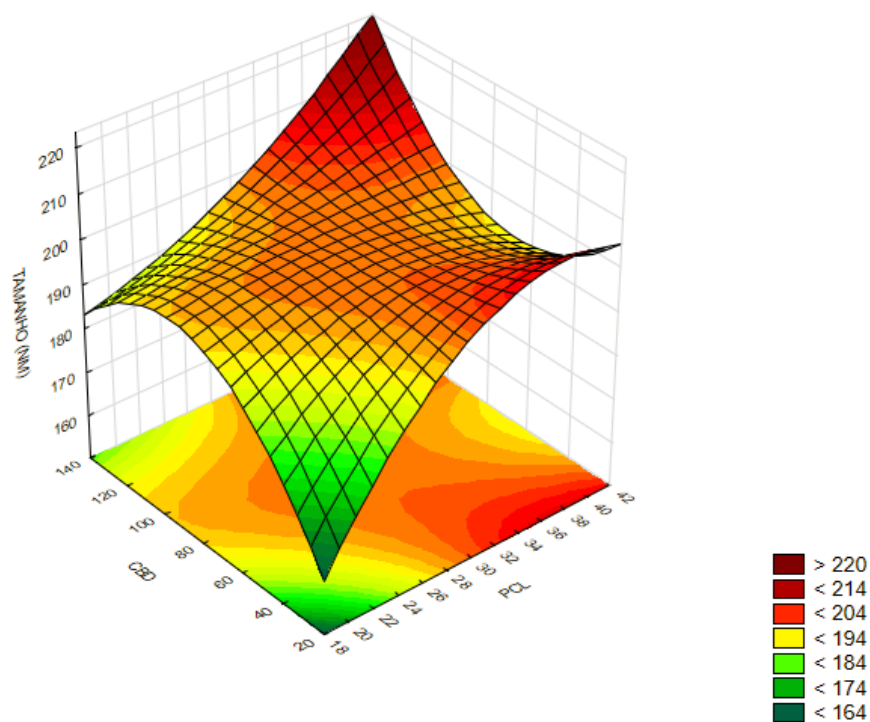
Fig. 7: Gráfico de Pareto relação do potencial zeta (mv)



Fonte: Próprio autor, 2024.

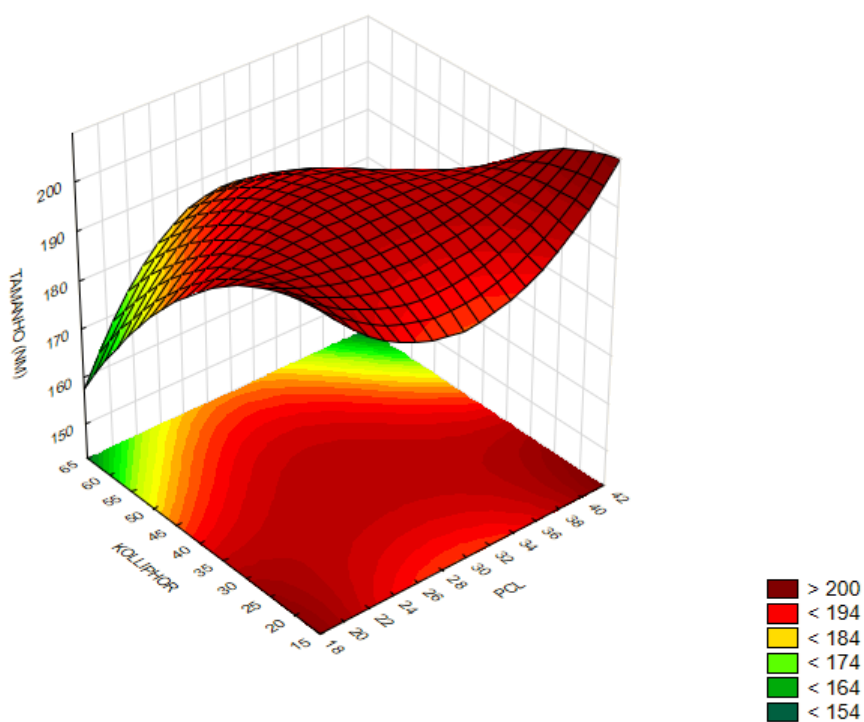
Os gráficos de superfície de resposta foram calculados e obtidos a partir da relação dos componentes da formulação (PCL, óleo de *Cannabis sativa* e Kolliphor ELP) com o tamanho da nanocápsula e com o potencial zeta. Nestes gráficos, foram demonstrados que uma menor quantidade de PCL, a quantidade intermediária de *Cannabis sativa* e a maior quantidade Kolliphor ELP empregados no planejamento Box-Benkhen, diminuiu o tamanho do nanossistema e potencial zeta com resultados próximos a -30 mV.

Figura 8: Superfície dos fatores CBD e PCL em relação ao tamanho (nm)



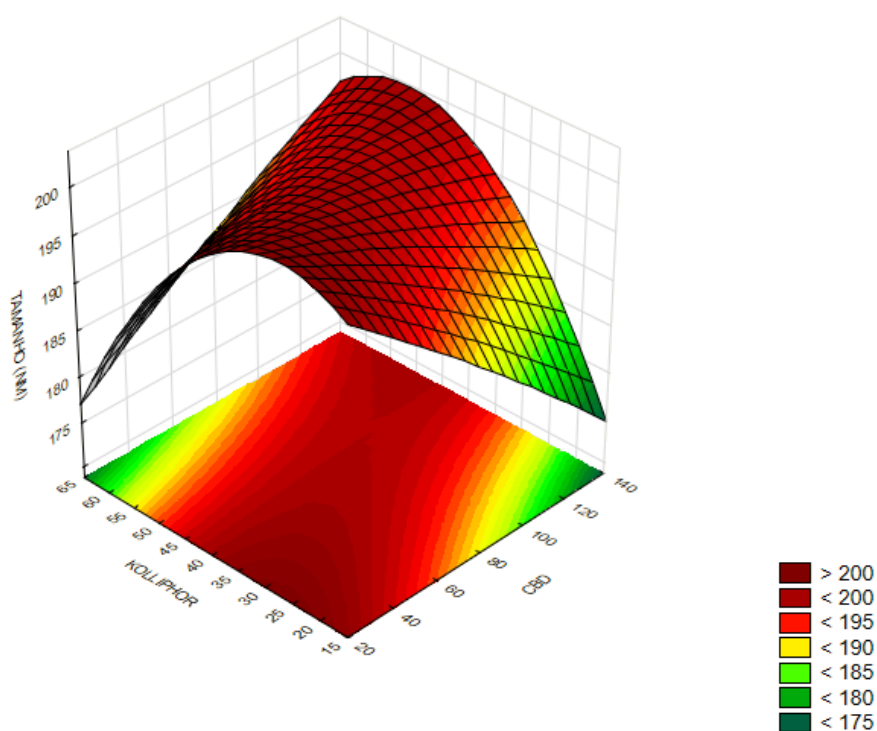
Fonte: Autoria própria, 2024.

Figura 9: Superfície dos fatores Kolliphor e PCL em relação ao tamanho (nm)



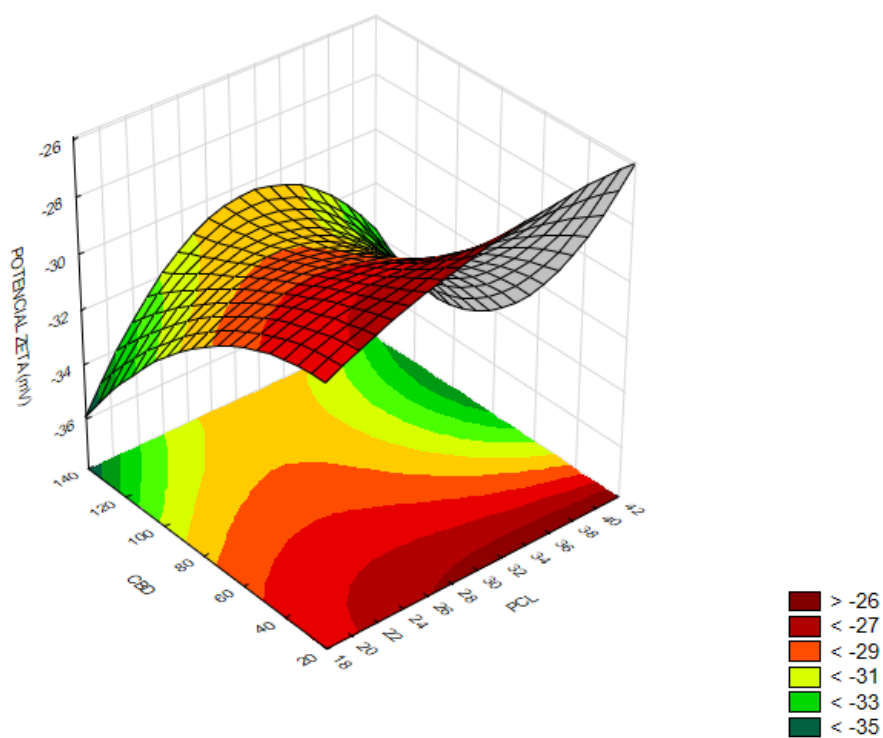
Fonte: Autoria própria, 2024.

Figura 10: Superfície dos fatores Kolliphor e CBD em relação ao tamanho (nm)



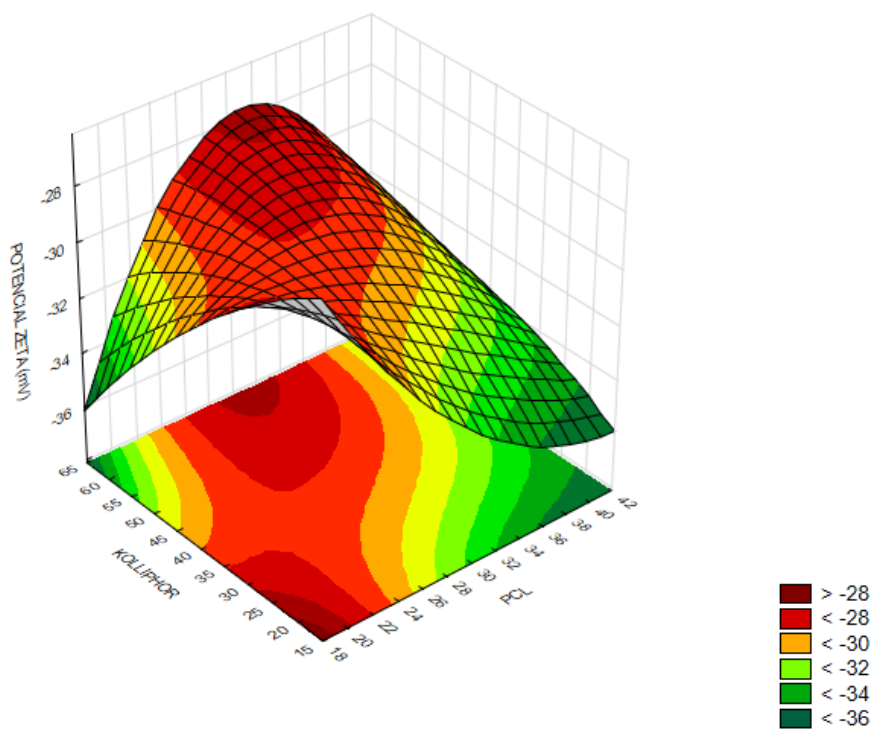
Fonte: Autoria própria, 2024.

Figura 11: Superfície dos fatores PCL e CBD em relação ao potencial zeta



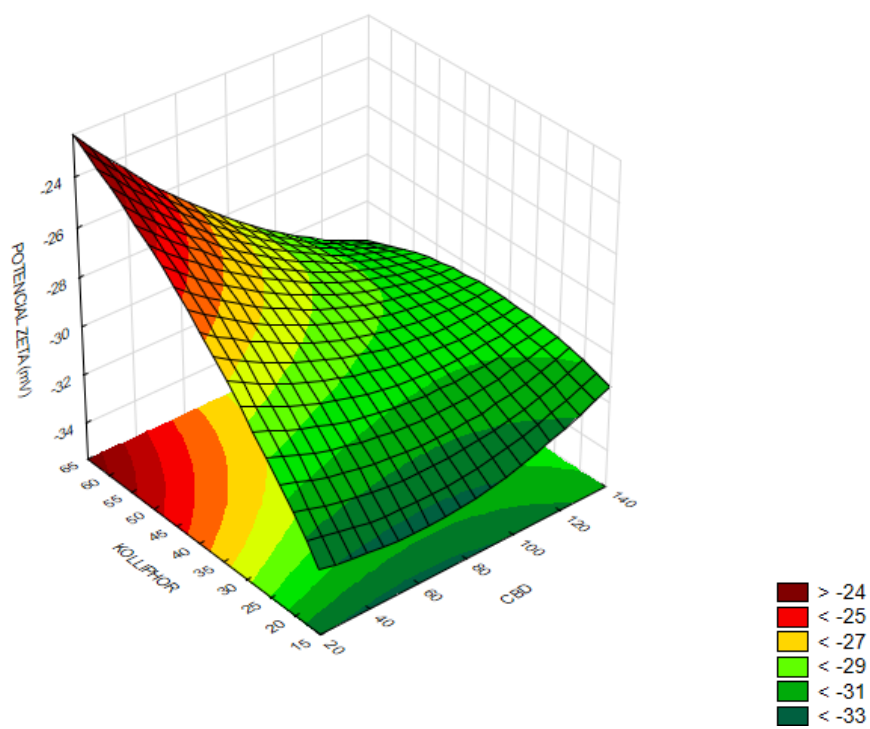
Fonte: Autoria própria, 2024.

Figura 12: Superfície dos fatores PCL e Kolliphor em relação ao potencial zeta



Fonte: Autoria própria, 2024.

Figura 13: Superfície dos fatores Kolliphor e CBD em relação ao potencial zeta



Fonte: Autoria própria, 2024.

De acordo com o ANOVA, foi possível observar que o modelo linear foi significativo, pois $p < 0,05$. $R^2 = 0,92$.

O Índice de Polidispersão (PDI) se fundamenta na representação da distribuição do tamanho da população dentro de uma determinada amostra, sendo assim, o valor numérico do PDI pode variar entre 0,0 a 1,0, ou seja, valores de PDI maiores que 0,25 demonstra que a amostra tem uma alta distribuição (Danaei *et al.*, 2018). Em suma, os valores de PDI das amostras demonstram que ambas estão dentro dos parâmetros de Índice de Polidispersão. O Potencial zeta demonstra a diferença de potencial entre a dupla camada elétrica (EDL) das partículas e camada dispersante (Bhattacharjee, 2016). As nanopartículas são consideradas estáveis quando apresentam potencial zeta acima de 20mV (Mohanraj; Chen, 2006). Os nanossistemas obtidos apresentaram valores de potencial zeta próximo a 20mV, indicando que estes se apresentam estáveis em solução.

Desta forma, a formulação 10 que apresentou o tamanho de partícula de 174,4 nm e potencial zeta, -32,77 mV, foi escolhida para os ensaios de otimização. E posteriormente, denominada NCBDP.

5.3 Desenvolvimento de nanossistemas funcionalizados

A funcionalização é uma estratégia extremamente importante pois as nanocápsulas são responsáveis de proteger, carregar e liberar substâncias bioativas. Desta forma, os polímeros escolhidos podem influenciar na estabilidade, perfil de liberação, eficiência de encapsulamento, e biodistribuição da nanocápsula como sistema de entrega de fármacos. Polímeros biocompatíveis, como a quitosana, têm sido amplamente considerados como candidatos apropriados para o desenvolvimento de nanocápsulas, para eliminação de nanopartículas e liberação de carga. Porém, polímeros não biodegradáveis, mas biocompatíveis, como o polietilenoglicol (PEG) também têm sido amplamente utilizados para contribuir para a fabricação de nanopartículas, eles podem auxiliar na liberação do medicamento por difusão, graças à sua hidrofiliabilidade (Deng *et al.*, 2020).

A quitosana é um copolímero catiônico. Em ambiente ácido, o grupo amino da sua estrutura sofre protonação, lhe concedendo uma carga positiva, tornando-a capaz de interagir com muitas moléculas. É um polímero semicristalino. Suas vantagens incluem biocompatibilidade, natureza mucoadesiva e condições de gelificação. Nanocápsulas contendo quitosana são desenvolvidas para várias doenças infecciosas, já que por meio

eletrostático interagem com bactérias carregadas negativamente, já que são catiônicas (Mehandole *et al.*, 2023).

A quitosana apresenta caráter catiônico e tem a capacidade de formar complexos com polímeros carregados negativamente. Além disso, é caracterizada por apresentar alta permeabilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade e boa relação custo-benefício (Kumar *et al.*, 2015).

As nanocápsulas foram funcionalizadas com Lipoid-PEG 5000 em diferentes concentrações (0,05%, 0,1%, 0,15%, 0,20%) na fase orgânica e quitosana nas concentrações 0,05%, 0,1%, 0,15%, 0,20% na fase aquosa. Após a análise do tamanho, PDI e potencial zeta (tabelas 5 e 6), foi possível perceber uma pequena variação de tamanho (192,4 – 207,9 nm), PDI (0,08 - 0,11) e potencial zeta (-21,33 – -24,96 mV) em nanocápsulas otimizadas com L-PEG e variação significativa em nanocápsulas otimizadas com quitosana, já que apresentou tamanhos entre 240,7 – 398,4 nm, PDI entre 0,23 – 0,39 e potencial zeta 37,8 – 53,83 mV devido a concentrações diferentes. Desta forma, essas nanocápsulas demonstraram resultados semelhantes às nanocápsulas de eugenol produzidas por Wang, Zhang e Ding, 2020, pois apresentaram 229,09nm índice de polidispersão 0,251, que é inferior a 0,3, indicando homogeneidade e dispensabilidade.

Porém, Berberolli *et al.*, 2023, desenvolveram nanocápsulas com quitosana para administração de trans-cinamaldeído e apresentaram $PDI \leq \sim 0,2$, tamanho entre 156-166nm e potencial zeta entre + 41-48 mV. Ademais, Zhang *et al.*, 2024 produziram nanocápsulas com óleo essencial de cominho, mas obtiveram tamanho entre 584,67–810 nm. Desta forma, é possível afirmar que o tamanho, potencial zeta e índice de polidispersão podem variar a depender da concentração e do ativo, método de produção e excipientes utilizados.

Tabela 5: Tamanho, PDI e Zeta do nanossistema funcionalizado com diferentes concentrações de L-PEG.

Formulação	Tamanho (nm)	PDI	Zeta (mV)
L-PEG 0,05% + CBD	207,9±4,2	0,08±0,04	-23,55±0,4
L-PEG 0,10% + CBD	197±2,6	0,1±0,04	-24,96±0,5
L-PEG 0,15% + CBD	206,5±0,8	0,11±0,03	-21,33±0,5

L-PEG 0,20% + CBD	192,4±0,8	0,08±0,06	-24,19±0,4
------------------------------	-----------	-----------	------------

Fonte: Autoria própria, 2024.

Tabela 6: Tamanho, PDI e Zeta do nanossistema funcionalizado com diferentes concentrações de quitosana.

Formulação	Tamanho (nm)	PDI	Zeta (mV)
Quitosana 0,05% + CBD	240,7±1,5	0,23±0,03	37,8±0,5
Quitosana 0,10% + CBD	269,8±4,5	0,26±0,02	43,31±0,3
Quitosana 0,15% + CBD	311,4±9,6	0,35±0,06	53,83±0,6
Quitosana 0,20% + CBD	398,4±13	0,39±0,07	38,02±0,1

Fonte: Autoria própria, 2024.

Desta maneira, as formulações contendo 0,1% de L-PEG e 0,1% de quitosana foram escolhidas para os seguintes testes, sendo nomeadas como NCBDLP e NCBDQ.

5.4 Infravermelho com transformada de Fourier

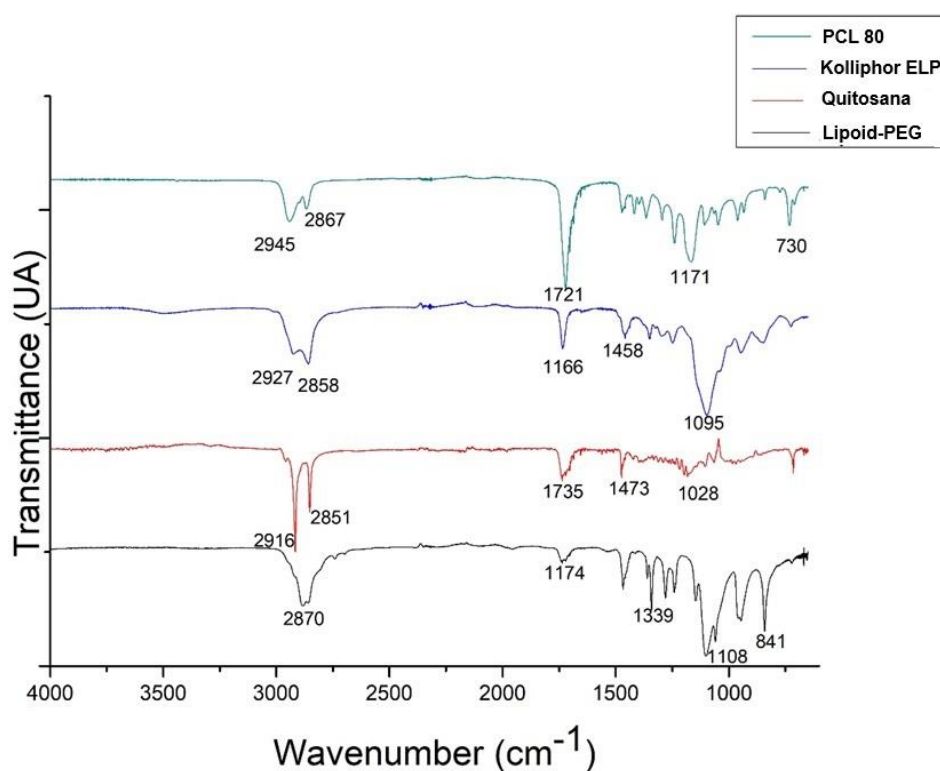
As análises por espectroscopia no infravermelho foram realizadas com as nanocápsulas e CBD e os das formulações, como: PCL, Kolliphor ELP, quitosana e L-PEG. Nos espectros, é possível visualizar que PCL (Figura 14) mostrou bandas típicas do polímero, próximas a 2945 (estiramento –CH₃), 1710 (estiramento C=O), 1170 (estiramento assimétrico C–O) e 730 cm⁻¹ (estiramento –CH₃). Esses resultados são semelhantes com os resultados obtidos por Rodrigues *et al.*, 2023. Em torno de 2945 e 2877 cm⁻¹, é possível observar estiramento C-H simétrico e assimétrico, respectivamente. As bandas 1473 cm⁻¹ e 1735 cm⁻¹ demonstra a presença de grupos N-acetil, atribuídas a quitosana. Demonstrando similaridade com o estudo de Najafabadi, Abdouss e Faghihi, 2014.

Além disso, bandas em torno de 3442 cm⁻¹ (estiramento O-H), 2927 cm⁻¹ (estiramento carbono aromático), 1746 cm⁻¹ (estiramento C=O, éster de ácido graxo) e 1440

cm^{-1} (CH) foram atribuídas ao CBD (Fig. 15), demonstrando similaridade com David *et al.*, 2024.

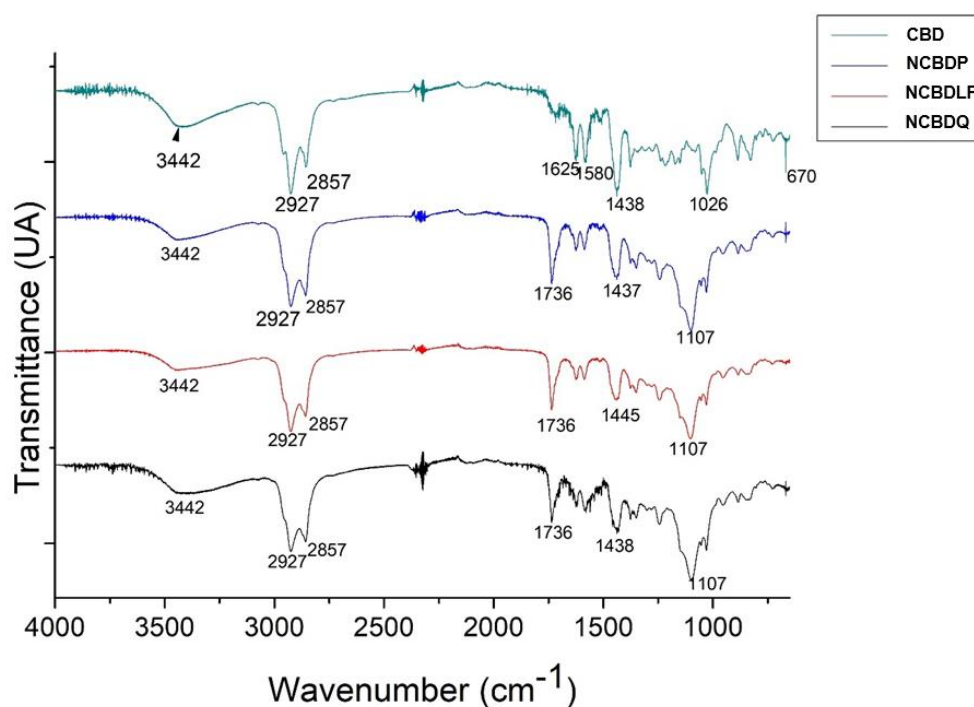
Em torno de 2945 e 2877 cm^{-1} , é possível observar estiramento C-H simétrico e assimétrico, respectivamente. As bandas 1473 cm^{-1} e 1735 cm^{-1} demonstram a presença de grupos. As nanopartículas apresentaram sinais de absorção similares entre si, aos excipientes e também ao CBD. Desta forma, indicando a presença dos excipientes no fármaco (Rodrigues *et al.*, 2023).

Figura 14: Espectro de infravermelho dos compostos utilizados nas formulações



Fonte: Autoria própria, 2024.

Figura 15: Espectro de infravermelho do extrato bruto rico em CBD e das nanoformulações.

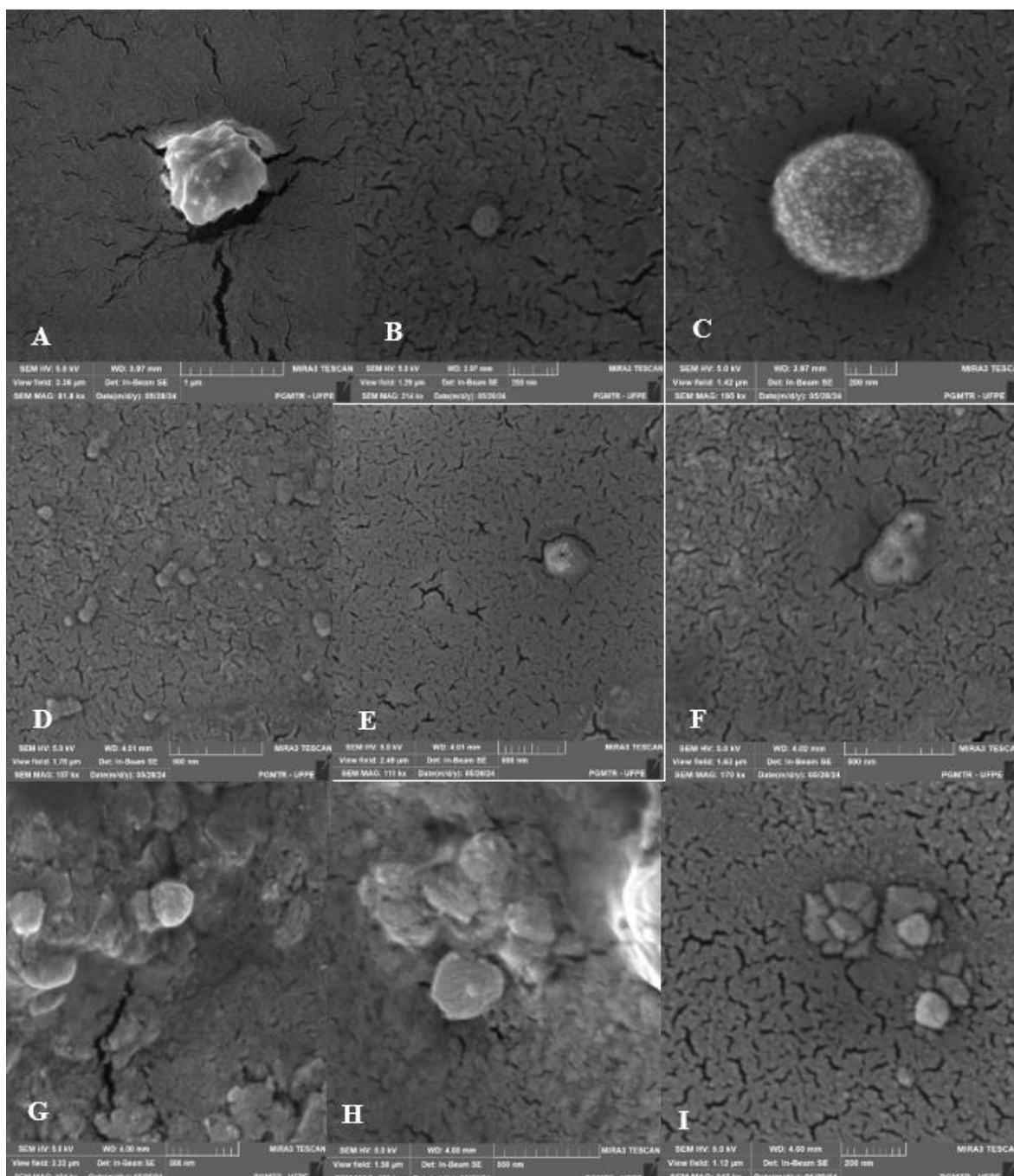


Fonte: Autoria própria, 2024

5.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para analisar as características de superfície e morfologia, foi utilizada a Microscopia Eletrônica de Varredura, desta maneira, foi possível visualizar o formato e tamanho das nanocápsulas. Conforme mostrado em 16A, B, C, D, E e F. As nanopartículas não demonstraram aglomeração e apresentaram distribuição homogênea. As nanocápsulas de óleo essencial de orégano de Salinas *et al.*, 2022, apresentaram resultados semelhantes. As nanocápsulas demonstraram tamanhos entre 200-1000 nm, ou seja, dentro da escala nanométrica, corroborando com os resultados do DLS. Mas o tamanho da partícula pode variar, dependendo de fatores como tempo e temperatura. As nanocápsulas contendo quitosana, apresentaram pequena aglomeração, demonstrando resultado similar à De Castro *et al.*, 2019.

Figura 16: Análise morfológica das nanocápsulas. Sendo A, B, C: NCBDP, C, D, E: NCBDLP e F, G, H: NCBDQ.



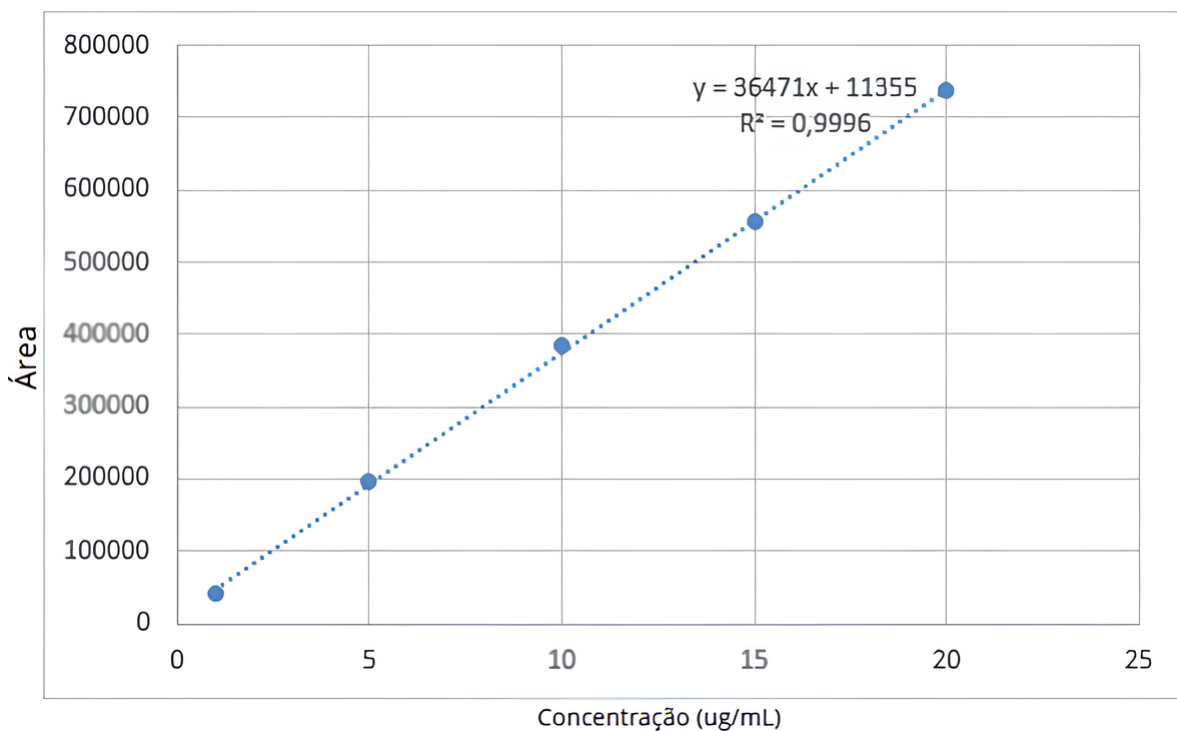
Fonte: Autoria própria, 2024.

5.6 Doseamento e Eficiência de Encapsulação

A linearidade do método pode ser obtida através da equação da reta $y = ax + b$, chamada de curva analítica. Os coeficientes desta curva de calibração podem ser estimados utilizando o método matemático regressão linear. Calculando-se o coeficiente de correlação

r e coeficiente de determinação r^2 , consequentemente apresentam parâmetros que permitem uma simulação da qualidade da curva obtida. Desta maneira, resultados mais próximos de 1, são mais confiáveis e recomendados (Aragão, Veloso e Andrade, 2009).

Figura 17: Curva analítica obtida para o canabidiol



Fonte: Autoria própria, 2024.

Desta forma, a curva analítica (Figura 17) obtida para o canabidiol apresentou um $r^2 = 0,9996$ em relação às suas concentrações (1, 5, 10, 15, 20 ug/mL) e absorbância. Ou seja, demonstrou uma boa linearidade ou correlação na curva, dentro da concentração proposta.

A eficiência de encapsulamento (EE%) é a concentração do material incorporado detectados na formulação sobre a concentração inicial usada, dessa forma, se o material for um polímero, ele pode ser dissolvido no solvente, consequentemente a molécula utilizada ficará solúvel, podendo ser quantificada (Piacentini, 2017). Portanto, a E.E.% obtida para cada formulação, foi: NCBDP: 99.3 %, NCBDLP: 99.8% e NCBDQ: 99.8% Estes resultados demonstram que o óleo de *Cannabis sativa* foi encapsulado de forma eficaz, com quase 100% de eficiência, obtendo valores muito superiores a Han *et al.*, 2024 e Zheng, Zhang e Lu, 2024. E superiores que as nanopartículas carregadas com CBD-PLGA de Jin *et al.*, 2023.

5.7 Estabilidade

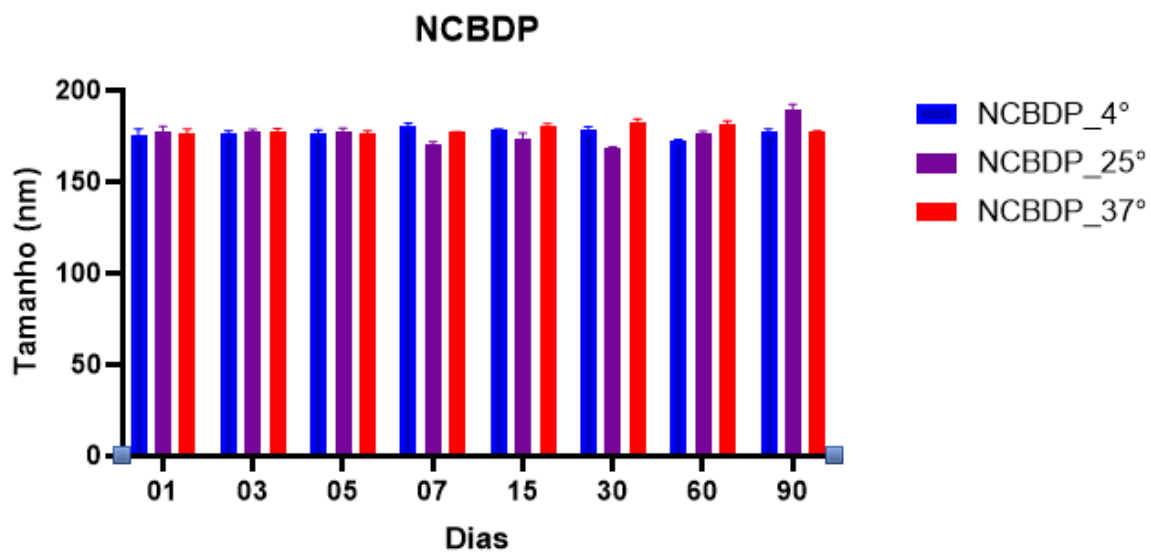
Neste estudo, além das nanocápsulas de PCL contendo CBD, as formulações foram otimizadas com Lipoid-PEG (0,1%) e quitosana (0,1%). Desta maneira, NCBDP, NCBDLP e NCBDQ foram armazenadas em diferentes temperaturas, ou seja, 4°, 25° e 37°C, durante 90 dias. Sendo assim, o tamanho e o potencial zeta foram analisados. A partir dos gráficos (Figs. 18, 19, 20, 21, 22 e 23), pode-se observar que as nanocápsulas NCBDP, NCBDLP e NCBDQ não demonstraram variação significativa. Em 25° apresentaram 177,5 nm inicialmente e ao final dos 90 dias, 189,3 nm e em 37°C 176,3 nm

PCL é um polímero semicristalino, hidrofóbico e biocompatível. Apresenta alta solubilidade, baixo ponto de fusão e dependendo do seu peso molecular, se degrada totalmente entre 2 a 4 anos.(Ghavimi *et al.*, 2014). Durante 90 dias, as nanocápsulas de NCBDP não apresentaram variação significativa em nenhuma temperatura. Apresentaram tamanho inicial de 177,5 nm e ao final dos 90 dias, 179,2 nm na temperatura de 4°C. Em 25° apresentaram 177,5 nm inicialmente e ao final dos 90 dias, 189,3 nm. Em 37°C, inicialmente apresentaram 176,3 nm e ao final dos 90 dias, 177,8 nm. Porém no dia 60, demonstrou uma variação no potencial zeta na temperatura 37°, pois apresentou um potencial zeta médio de -19,31. Os resultados obtidos demonstraram similaridade com o estudo de Dos Santos *et al.*, 2015.

O uso de PCL combinado com PEG é uma estratégia utilizada para implementar terapias com o fármaco, ligando-se no local de ação e diminuindo os efeitos fora de destino (Urrejola *et al.*, 2018). CBDLP também não apresentou grande variação entre os 90 dias, obtendo tamanhos entre 195 nm e 218 nm e potencial zeta entre -25 e -30mV. Os resultados deste estudo se assemelharam com os resultados de Hervella *et al.*, 2014.

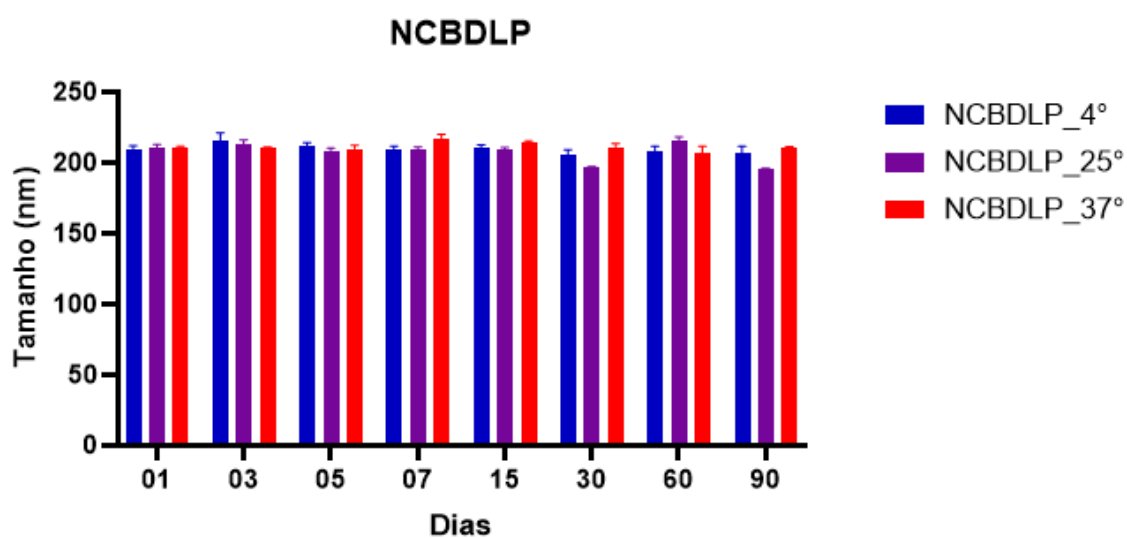
NCBDQ apresentaram inicialmente um tamanho médio 240,1 264,6 e 249,9 nm nas temperaturas 4°C, 25°C e 37°C, respectivamente. Estes tamanhos oscilaram pouco durante os 90 dias, porém foi possível observar que variaram mais que NCBDP e NCBDLP. O potencial zeta variou entre 25,29 e 40,2 mV, 24,13 e 34,15 mV e 23,42 e 32,14 mV nas temperaturas de 4°C, 25°C e 37°C. Estes resultados divergem de Lertsutthiwong, Rojsitthisak e Nimmannit, 2009 e apresentaram tamanhos similares com as de Menossi *et al.*, 2024.

Figura 18: Gráfico de estabilidade de tamanho (nm) NCBDP

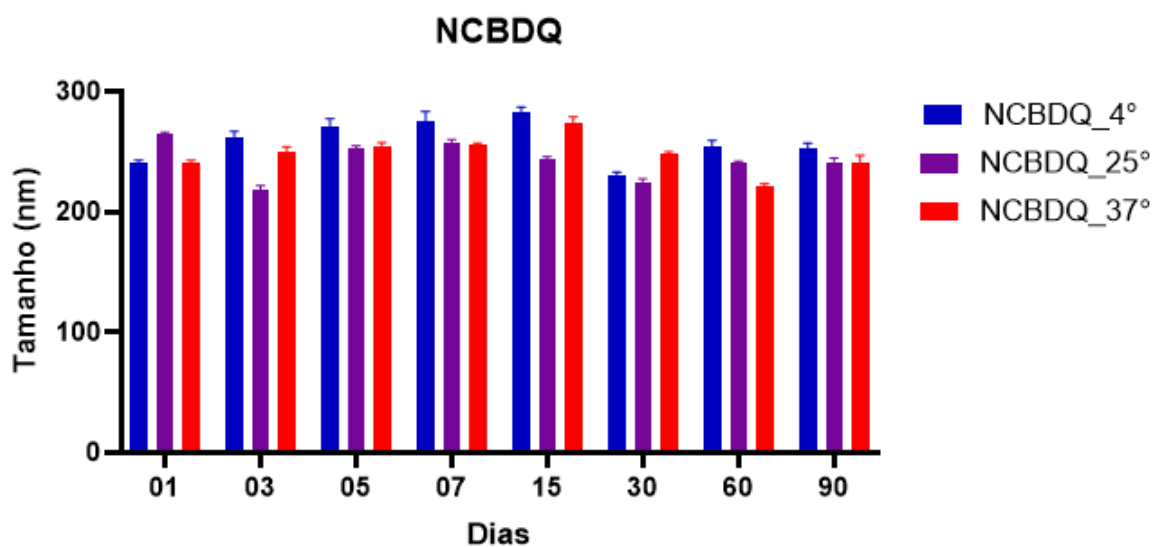


Fonte: Autoria própria, 2024.

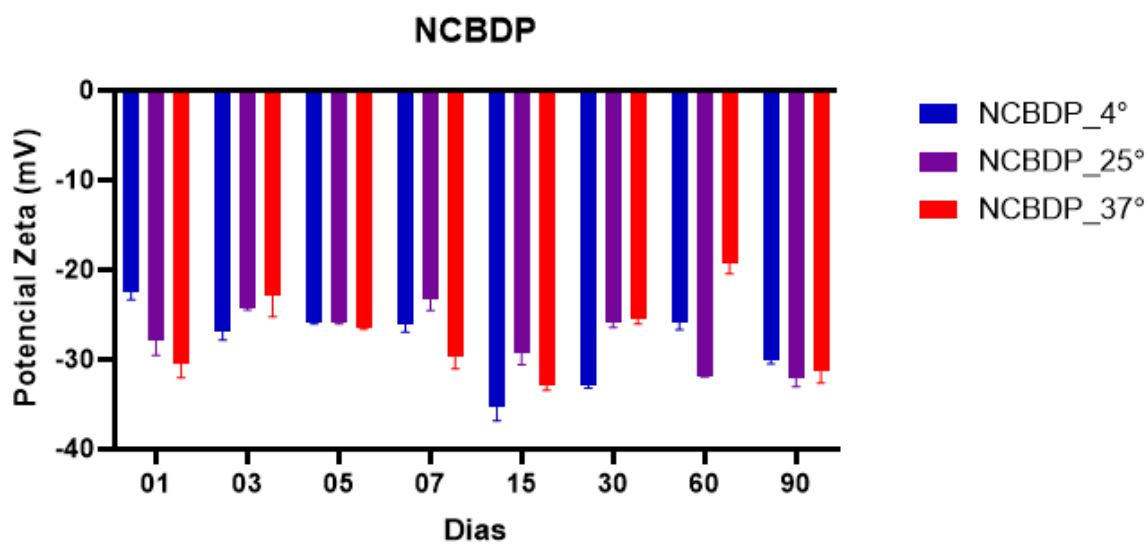
Figura 19: Gráfico de estabilidade de tamanho (nm) NCBDLP



Fonte: Autoria própria, 2024.

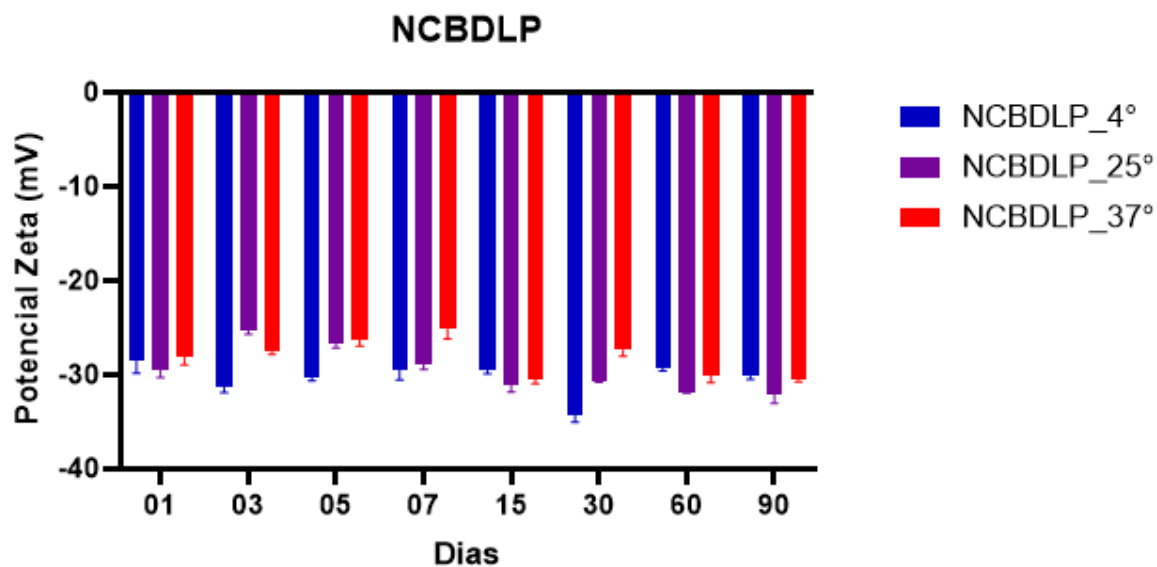
Figura 20: Gráfico de estabilidade de tamanho (nm) NCBDQ

Fonte: Autoria própria, 2024.

Figura 21: Gráfico de estabilidade de potencial zeta (mV) NCBDP

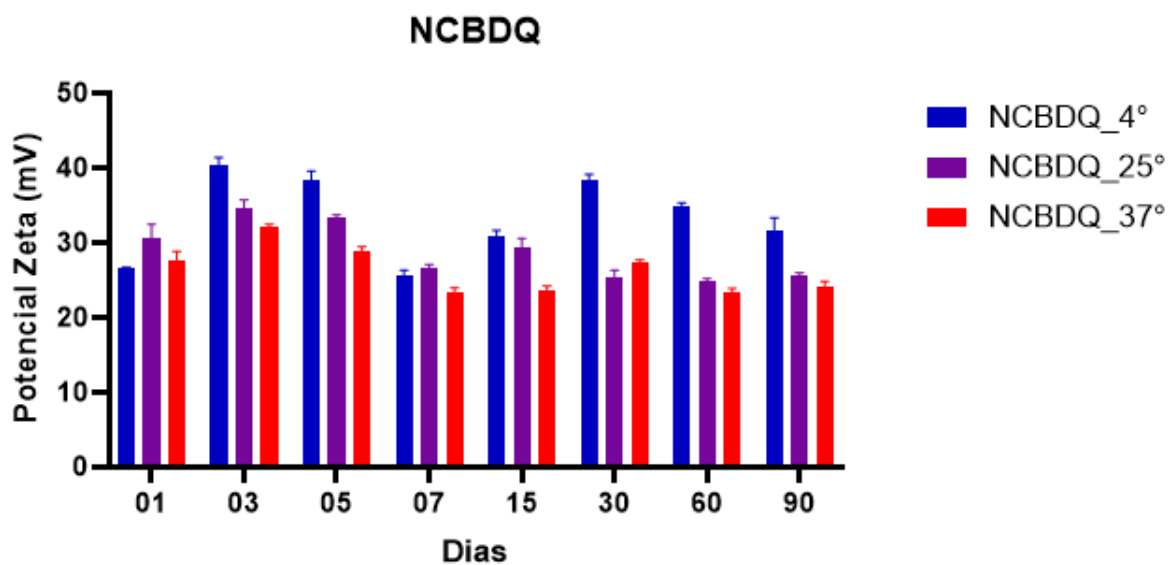
Fonte: Autoria própria, 2024.

Figura 22: Gráfico de estabilidade de potencial zeta (mV) NCBDLP



Fonte: Autoria própria, 2024.

Figura 23: Gráfico de estabilidade de potencial zeta (mV) NCBDQ



Fonte: Autoria própria, 2024.

5.8 Avaliação da atividade anti-promastigota e determinação da Concentração Inibitória mínima (CI₅₀)

Foi avaliada, quanto a atividade anti-promastigota em *L. infantum*, uma série de 3 formulações a partir de extrato de *Cannabis sativa*, NCBDLP, NCBDQ, NCBDP e uma amostra controle, TCM, contendo 20 mg de PCL, 75 mg de TCM e 60 mg de Kolliphor ELP. Para isso, essas substâncias foram submetidas a ensaios em duplicatas em três experimentos independentes. Entre os compostos avaliados, NCBDQ e NCBDP apresentaram atividade contra as formas promastigotas e valores de CI₅₀ de 12.38 e 35.04 µg/mL, respectivamente (Tabela 7).

Tabela 7 - Avaliação da atividade anti-promastigota dos compostos em *L. infantum*

Composto	CI ₅₀ (µg/mL)	Intervalo de Confiança (µg/mL)
NCBDLP	NA	-
NCBDQ	12.38	10.41 - 14.76
NCBDP	35.04	25.32 - 51.13
TCM	NA	-

Fonte: Autoria própria, 2024. Os valores de CI₅₀ “NA” representam a ausência de atividade biológica por parte dos compostos testados.

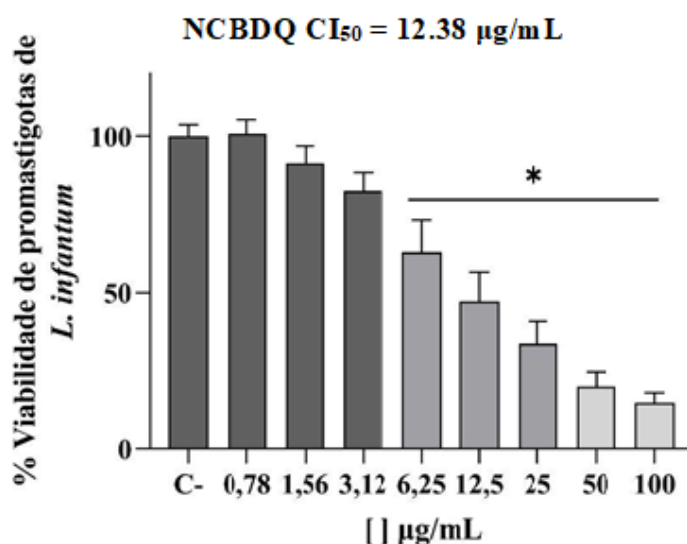
De acordo com a figura 24 é possível observar que o composto NCBDQ inibiu mais de 50% dos parasitas nas concentrações de 12.5, 25, 50 e 100 µg/mL, condizente com o valor calculado de CI₅₀. Com o teste ANOVA, foi possível avaliar significância estatística entre essas concentrações e o controle negativo, além da concentração de 6.25 µg/mL também apresentar diferença estatística ($p < 0.05$) quando comparado com o controle o que pode ser explicado pelo intervalo de confiança que compreende valores entre as concentrações testadas de 6.25 e 12.5 µg/mL.

Porém, NCBDLP não demonstrou atividade anti-promastigota. Apesar de o L-PEG apresentar várias vantagens, como o aumento do efeito terapêutico e biodisponibilidade, também pode haver reconhecimento fagocitário ou dificuldade de liberação do fármaco ao alvo, desta forma, não ocorrendo a atividade biológica (Dalle mole *et al.*, 2023).

Na figura 25 é possível observar que o composto NCBDP apresentou uma capacidade de inibição menor que de NCBDQ, com inibição de mais de 50% apenas nas concentrações de 50 e 100 µg/mL, o que condiz com o valor de CI₅₀ de 35.04 µg/mL. Apesar disso, as

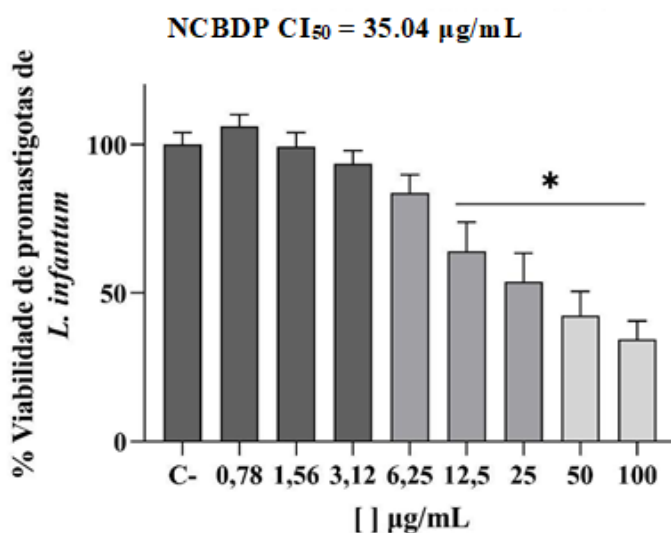
concentrações de 12.5 e 25 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram ainda diferença estatística quando comparadas ao controle negativo. O intervalo de confiança do composto compreendeu valores entre as concentrações de 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$, com seu valor mínimo sendo de 25.32 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 24 - Atividade anti-promastigota de NCBDQ



Fonte: Autoria própria, 2024. Curva de viabilidade celular das formas promastigotas de *L. infantum* na presença dos compostos testados. *p-value*: $p < 0,05$ (*).

Figura 25 - Atividade anti-promastigota de NCBDP



Fonte: Autoria própria, 2024. Curva de viabilidade celular das formas promastigotas de *L. infantum* na presença dos compostos testados. *p-value*: $p < 0,05$ (*).

NCBDQ demonstrou ser mais agressiva que as nanopartículas de PLGA carregadas com éster fenetílico de ácido cafeico, desenvolvida por Abamor, 2017, que apresentou CI_{50} de 32 $\mu\text{g/mL}$. Desta forma, NCBDP apresentou resultado semelhante a esta partícula. Além disso, NCBDP e NCBDQ também apresentaram uma menor CI_{50} que o éster fenetílico do ácido cafeico, analisado no mesmo estudo. No entanto, nanoemulsão desenvolvida por Rodrigues *et al.*, 2018, contendo α -copaeno apresentou melhor atividade, que NCBDQ e NCBDP, apresentando uma CI_{50} de 2,2 $\mu\text{g/mL}$ contra as formas promastigotas de *L. Infantum*.

Da Paz, 2018, desenvolveu nanoemulsões contendo os óleos essenciais *C. reticulata*, *C. limonum* e *C. aurantium*. Elas também foram testadas em formas promastigotas de *Leishmania infantum* e apresentaram CI_{50} semelhantes a NCBDQ, com 11,7; 19,5 e 16,9 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Além disso, também foram testados apenas os óleos essenciais, que apresentaram as seguintes CI_{50} : 156,7; 163,6 e 158,7 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Demonstrando que a nanoemulsão otimizou o resultado desses óleos essenciais, diminuindo em aproximadamente 10 vezes a CI_{50} .

6. Conclusões

6 CONCLUSÕES

O estudo realizado demonstrou o processo de desenvolvimento, caracterização, funcionalização e uma potencial atividade anti-*leishmania* oriundas das nanocápsulas poliméricas contendo extrato de *Cannabis sativa*, o qual o canabidiol apresentou-se como composto majoritário. Dessa forma, pode-se concluir que as nanocápsulas foram desenvolvidas, otimizadas através do planejamento Box-Behnken e funcionalizadas com Lipoid-PEG 5000 e quitosana. As nanocápsulas demonstraram tamanho, PDI e potencial zeta adequados, de acordo com a literatura. De forma geral, demonstraram estabilidade e homogeneidade, além disso, apresentaram quase 100% de eficiência de encapsulação. NCBDQ e NCBDP apresentaram atividade anti-*leishmania* em formas promastigotas de *Leishmania infantum*. Desta maneira, é importante haver novos estudos para detalhamento e aprofundamento dos seus mecanismos e efeitos, pois pode se tornar uma alternativa para a terapia da leishmaniose visceral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAMOR, E. S. Antileishmanial activities of caffeic acid phenethyl ester loaded PLGA nanoparticles against *Leishmania infantum* promastigotes and amastigotes in vitro. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 10, n. 1, p. 25–34, 2017.

ALVES, S.; SILVA, C.; COSTA, C.; FERREIRA, C.; RIBEIRO, H.; LIMA, A., ROCHA, C.; CALABRESE, K.; ABREU-SILVA, A.; ALMEIDA-SOUZA, F. Leishmanicidal and immunomodulatory activity of *Terminalia catappa* in *Leishmania amazonensis* in vitro infection. **Heliyon**, v. 10, n. 2, p. e24622–e24622, 2024.

APARICIO-BLANCO, J.; SEBASTIÁN, V.; BENOIT, J.; V.; TORRES-SUÁREZ, A. Lipid nanocapsules decorated and loaded with cannabidiol as targeted prolonged release carriers for glioma therapy: In vitro screening of critical parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 134, p. 126–137, 2019.

ARAGÃO, N. M. DE; VELOSO, M. C. DA C.; ANDRADE, J. B. DE. Validação de métodos cromatográficos de análise: um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da “Química Verde” na determinação de metilxantinas em bebidas. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2476–2481, 2009.

ASIAMAH, I.; OBIRI, S.; TAMEKLOE, W.; ARMAH, F.; BORQUAYE, L. Applications of Molecular Docking in Natural Products-Based Drug Discovery. **Scientific African**, p. e01593, 2023.

ASSADPOUR, E., REZAI, A., DAS, S., RAO, B., SINGH, S., KHARAZMI, M., JHA, N., PR IETO, M., JAFARI, S. Cannabidiol-loaded nanocarriers and their therapeutic applications, **Pharmaceutics**, 16(4), p. 487. 2023.

BASILE, G.; CRISTOFARO, G.; LOCATELLO, L.; VELLERE, I.; PICCICA, M.;^A, BRESCI, S.; MAGGIORE, G.; GALLO, O.; NOVELLI, A.; DI MUCCIO, T.; GRAMICCIA, M.; GRADONI, L.; GAIERA, G.; BARTOLONI, A.; ZAMMARCHI, L. Refractory mucocutaneous leishmaniasis resolved with combination treatment based on intravenous pentamidine, oral azole, aerosolized liposomal amphotericin B, and intralesional

meglumine antimoniate. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 97, p. 204–207, 2020.

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential – What They are and They are not?. **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337-351, 2016.

BERBEROLLI S, COLLADO-GONZÁLEZ M, GONZÁLEZ-ESPINOSA Y, KAUR G, SAHARIAH P, GOYCOOLEA FM. Derivatized chitosan-oil-in-water nanocapsules for trans-cinnamaldehyde delivery. **Int J Biol Macromol**, v. 240, p.124464, 2023.

BRAGANÇA, C.; SEVÁ, A.; CAMARGO NETO, J.; LOPES, U.; BRESCIANI, K. Finding Priority Areas in the Evaluation of Strategies for the Prevention of Leishmaniasis in an Endemic Municipality of Brazil. **Tropical medicine and infectious disease**, v. 9, n. 5, p. 115–115, 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. RDC nº 327, de 9 de dezembro de 2019.

BRITCH, S.; BABALONIS, S.; WALSH, S. Cannabidiol: pharmacology and therapeutic targets. **Psychopharmacology (Berl)**. 238(1):9-28. 2021.

BRUNO, F.; CASTELLI, G.; LI, B.; REALE, S.; CARRA, E.; VITALE, F.; SCIBETTA, S.; CALZOLARI, M.; VARANI, S.; ORTALLI, M.; FRANCESCHINI, E.; GENNARI, W.; RUGNA, G.; SPÄTH, G. Genomic and epidemiological evidence for the emergence of a *L. infantum/L. donovani* hybrid with unusual epidemiology in northern Italy. **MBio**, 2024.

CANO-PRIETO, C.; UNDABARRENA, A.; DE CARVALHO, A.; KEASLING, J.; CRUZ-MORALES, P. Triumphs and Challenges of Natural Product Discovery in the Postgenomic Era. **Annual Review of Biochemistry**, v. 93, n. 1, p. 411–445, 2 ago. 2024.

CASTILLO, P.; YOUNTS, T.; CHÁVEZ, A.; HASHIMOTODANI, Y. Endocannabinoid signaling and synaptic function. **Neuron**, v. 76, n. 1, p. 70–81, out. 2012.

DANAEI, M.; DEHGHANHOLD, M.; ATAEI, S.; DAVARINI, H. S.; JAVANMARD, R.; DOKHANI, A.; KHORASANI, S. MOZAFARI, M. R. Impact of Particle Size and

Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. **Pharmaceutics**, v.10, n.57, 2018.

DA SILVA, G.; DE MOURA, L.; CARVALHO, F.; GERONIMO, G.; MENDONÇA, T.; DE LIMA, F.; DE PAULA, E. Antineoplastics Encapsulated in Nanostructured Lipid Carriers. **Molecules**, v. 26, n. 22, p. 6929, 17 nov. 2021.

DA PAZ, M. M. **Avaliação do efeito *Anti-Leishmania infantum* de nanoemulsões contendo óleos essenciais de *Citrus spp.*** Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas (Licenciatura). Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2018.

DALLEMOLE, D.; CIOCHETA, T.; FRANK, L.; ALVES, A.; ZOCHE, B.; GUTERRES, S.; PAESE, K.; POHLMANN, A. Nanocápsulas de núcleo lipídico: preparação, caracterização e aplicações biológicas. **Química Nova**, 2023.

DAVID, C.; SOUZA, J.; SILVA, A.; GRAZIOLI, G.; BARBOZA, A.; LUND, R.; FAJARDO, A.; MORAES, R. Cannabidiol-loaded microparticles embedded in a porous hydrogel matrix for biomedical applications. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 35, n. 1, 2024.

DE CASTRO, K., MEI, L.; CARVALHO, F.; CAMPOS, M.. Charge tunable chitosan/PLA microspheres for potential biomedical application. **Materials Research Express**, v. 6, n. 12, p. 125403–125403, 12 nov. 2019.

DENG, S.; GIGLIOBIANCO, M.R.; CENSI, R.; DI MARTINO, P. Polymeric Nanocapsules as Nanotechnological Alternative for Drug Delivery System: Current Status, Challenges and Opportunities. **Nanomaterials**, 10, 847, 2020.

DISSANAYAKE, R., TOWNER, R. E AHMED, M. Metastatic breast cancer: Review of emerging nanotherapeutics. **Cancers**, v.15, n. 11, p. 2906, 2023.

DOCAMPO-PALACIOS, M. L., RAMIREZ, G., TEFATSION, T., OKHOVAT, A., PITTIGLIO, M., RAY, K., CRUCES, W. Saturated cannabinoids: Update on synthesis

strategies and biological studies of these emerging cannabinoid analogs, **Molecules**, v.28, n. 17, p. 6434, 2023.

DOS SANTOS, A. M. F. **Investigação do Potencial Antiepileptico de um óleo de extrato de *Cannabis Sativa* rico em canabidiol: Uma Abordagem *in silico* e *in vivo***. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Neurociencia Cognitiva e Comportamento) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2023.

DOS SANTOS, P.; PAESE, K.; GUTERRES, S.; POHLMANN, A.; COSTA, T.; JABLONSKI, A.; FLÔRES, S.; RIOS, A. Development of lycopene-loaded lipid-core nanocapsules: physicochemical characterization and stability study. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 17, n. 2, fev. 2015.

GHAVIMI, S.; EBRAHIMZADEH, M.; SOLATI-HASHJIN, M.; OSMAN, N. Polycaprolactone/starch composite: Fabrication, structure, properties, and applications. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 103, n. 7, p. 2482–2498, 2014.

GÓMEZ-GARCÍA, A.; MEDINA-FRANCO, J. L. Progress and Impact of Latin American Natural Product Databases. **Biomolecules**, v. 12, n. 9, p. 1202–1202, 2022.

GOYZUETA-MAMANI, L.; BARAZORDA-CCHAUNA, H.; CANDIA-PUMA, M.; GALDINO, A.; MACHADO-DE-AVILA, R.; GIUNCHETTI, R.; MEDINA-FRANCO, J.; FLORIN-CHRISTENSEN, M.; COELHO, E.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M.. Targeting *Leishmania infantum* Mannosyl-oligosaccharide glucosidase with natural products: potential pH-dependent inhibition explored through computer-aided drug design. **Frontiers in Pharmacology**, v. 15, 30 maio 2024.

GÜLCK, T. E MØLLER, B. L. Phytocannabinoids: Origins and biosynthesis, **Trends in plant science**, 2020. 25(10), p. 985–1004.

GUPTA P, SINGH A, SHAFI S, RALLI T, POTTOO FH, SULTANA Y, KOHLI K. *Cannabis Sativa* in Phytotherapy: Reappraisal of Therapeutic Potential and Regulatory Aspects. **Curr Pharm Biotechnol**. 2023.

GÜVEN, E. Nanotechnology-based drug delivery systems in orthopedics. **Jt Dis Relat Surg**, v. 32, n. 1, p. 267-273, 2021.

HAN, Y.; ZHANG, H.; ZHAO, H.; FU, S.; LI, R.; WANG, Z.; WANG, Y.; LU, W.; YANG, X. Nanoparticle encapsulation using self-assembly abietic acid to improve oral bioavailability of curcumin. **Food Chemistry**, v. 436, n. 137676, p. 137676, 2024.

HEIDER, C. G., ITENBERG, S., RAO, J., MA, H., WU, X. Mechanisms of cannabidiol (CBD) in cancer treatment: A review, **Biology**, v.11, n. 6, p. 817, 2022.

HERVELLA, P.; ALONSO-SANDE, M.; LEDO, F.; LUCERO, M.; ALONSO, M.; GARCIA-FUENTES, M. PEGylated Lipid Nanocapsules with Improved Drug Encapsulation and Controlled Release Properties. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 9, p. 1115–1123, 29 mar. 2014.

JIANG, Y.; LI, W.; WANG, Z.; LU, J. Lipid-Based Nanotechnology: Liposome. **Pharmaceutics**, v. 16, n. 1, p. 34–34, 26 dez. 2023.

JIN, Z.; ZHAN, Y.; ZENG, L.; WEI, Q.; XU, S.; QIN, Z. Cannabidiol-Loaded Poly Lactic-Co-Glycolic Acid Nanoparticles with Improved Bioavailability as a Potential for Osteoarthritis Therapeutic. **ChemBioChem**, v. 24, n. 9, 3 abr. 2023.

JÎTCĂ, G., Ősz, B., VARI, C., RUSZ, C., TERO-VESCAN, A., PUSCAS, A. Cannabidiol: Bridge between antioxidant effect, cellular protection, and cognitive and physical performance, **Antioxidants**, v. 12, n. 2, p. 485. 2023.

KANKARIYA, Y.; CHATTERJEE, B. Biomedical Application of Chitosan and Chitosan Derivatives: A Comprehensive Review. **Current Pharmaceutical Design**, v. 29, n. 17, p. 1311–1325, 1 maio 2023.

KUMAR S, CHAUHAN N, GOPAL M, KUMAR R, DILBAGHI N. Development and evaluation of alginate-chitosan nanocapsules for controlled release of acetamidiprid. **Int J Biol Macromol**, v. 81, p.631-637, 2015.

LAEZZA, C.; PAGANO, C.; NAVARRA, G.; PASTORINO, O.; PROTO, M.; PISCOPO, C.; GAZZERRO, P.; BIFULCO, M. The endocannabinoid system: A target for cancer treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 3, p. 747, 2020.

LAMMARI, N.; LOUAER, O.; MENIAI, A. H.; ELAISSARE, A. Encapsulation of essential oils via nanoprecipitation process: Overview, progress, challenges and prospects. **Pharmaceutics**, v. 12, p. 431, 2020.

LERTSUTTHIWONG, P.; ROJSITTHISAK, P.; NIMMANNIT, U. Preparation of turmeric oil-loaded chitosan-alginate biopolymeric nanocapsules. **Materials Science and Engineering: C**, v. 29, n. 3, p. 856–860, abr. 2009.

LIMA, A.; GRATIERI, T.; CUNHA-FILHO, M.; GELFUSO, G. et al. Polymeric nanocapsules: A review on design and production methods for pharmaceutical purpose. **Methods**, v. 199, p. 54–66, mar. 2022.

LOWE, H.; TOYANG, N.; STEELE, B.; BRYANT, J.; NGWA, W. The endocannabinoid system: A potential target for the treatment of various diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 17, p. 9472, 2021.

MALIK, S.; MUHAMMAD, K. E.; WAHEED, Y. Nanotechnology: A revolution in modern industry. **Molecules**, v. 28, n. 2, p. 661, 2023.

MANDRIOLI, M.; TURA, M.; SCOTTI, S.; TOSCHI, T. Fast Detection of 10 Cannabinoids by RP-HPLC-UV Method in Cannabis sativa L. **Molecules**, v. 24, n. 11, p. 2113, 4 jun. 2019.

MEHANDOLE, A.; WALKE, N.; MAHAJAN, S.; AALHATE, M.; MAJI, I.; GRUPTA, U.; MEHRA, N.; SINGH, P. Core-shell type lipidic and polymeric nanocapsules: The transformative multifaceted delivery systems. **AAPS PharmSciTech**, v. 24, n. 1, 2023.

MENOSSE M. Cannabis extract-loaded lipid and chitosan-coated lipid nanoparticles with antifungal activity. **Colloids and Surfaces A Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 685, p. 133207–133207, 11 jan. 2024.

MEYER, H. C.; LEE, F. S.; GEE, D. G. The Role of the Endocannabinoid System and Genetic Variation in Adolescent Brain Development. **Neuropsychopharmacology**, v. 43, n. 1, p. 21–33, 7 jul. 2017.

MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles – A Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, p. 561, 2006.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, n. 1-2, p. 113–142, jan. 2010.

NAJAFABADI, A.; ABDOUSS, M.; FAGHIHI, S. Synthesis and evaluation of PEG-O-chitosan nanoparticles for delivery of poor water soluble drugs: Ibuprofen. **Materials Science and Engineering: C**, v. 41, p. 91–99, ago. 2014.

NELSON, K. M.; BISSON, J.; SINGH, G.; GRAHAM, J.; CHEN, S.; FRIESEN, J.; DAHLIN, J.; NIEMTZ, M.; WALTERS, M.; PAULI, G. The essential medicinal chemistry of cannabidiol (CBD). **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 63, n. 21, p. 12137–12155, 2020.

ORIOLO, A. O.; KAR, P.; OYEDEJI, A. O. Cannabis sativa as an Herbal Ingredient: Problems and Prospects. **Molecules**, v. 29, n. 15, p. 3605–3605, 2024.

NASIM, N.; SANDEEP, I. S.; MOHANTY, S. Plant-derived natural products for drug discovery: current approaches and prospects. **The Nucleus**, v. 65, n. 3, 18 out. 2022.

PAŘÍZEK, A.; SUCHOPÁR, J.; LAŠTŮVKA, Z.; ALBLOVÁ, M.; HILL, M.; DUŠKOVÁ, M. The Endocannabinoid System and Its Relationship to Human Reproduction. **Physiological Research**, p. S365–S380, 17 dez. 2023.

PAZ, C.; DOUMBIA, S.; KEITA, M.; SETHI, A. Cutaneous Leishmaniasis in Mali. **Dermatologic Clinics**, v. 29, n. 1, p. 75–78, jan. 2011.

PENG, J.; FAN, M.; AN, C.; NI, F.; HUONG, W.; LUO, J. A narrative review of molecular mechanism and therapeutic effect of cannabidiol (CBD). **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 130, n. 4, p. 439–456, 6 fev. 2022.

PENTEADO, L.; LOPES, V. F.; KARAM, T. K.; NAKAMURA, C. V.; KHALIL, N. M.; MAINARDES, R. M. Chitosan-coated poly(ϵ -caprolactone) nanocapsules for mucoadhesive applications of perillyl alcohol. **Soft Materials**, v. 20, n. 1, p. 1–11, 2021.

PERNONCINI, K. V.; OLIVEIRA, R. M. M. W. Usos terapêuticos potenciais do canabidiol obtido da *Cannabis sativa*. **Uningá Review**, v. 20, n. 3, p. 101-106, 2014.

PIACENTINI, E. Encapsulation efficiency. Em: **Encyclopedia of Membranes**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2016. p. 706–707.

PUTRI, S.; IKRAM, M.; SATO, A.; DAHLAN, H.; RAHMAWATI, D.; OHTO, Y.; FUKUSAKI, E. Application of gas chromatography-mass spectrometry-based metabolomics in food science and technology. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 133, n. 5, fev. 2022.

RADWAN, M.; CHANDRA, S.; GUL, S.; ELSOHLI, M. Cannabinoids, Phenolics, Terpenes and Alkaloids of Cannabis. **Molecules**, v. 26, n. 9, p. 2774, 2021.

RAHIMKHOEI, V.; PADERVAND, M.; HEDAYAT, M.; SEIDI, F.; DAWI, E.; AKBARI, A. Biomedical applications of electrospun polycaprolactone-based carbohydrate polymers: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 253, p. 126642, 31 dez. 2023.

REIMÃO, J.; COSER, E.; LEE, M.; COELHO, A. Laboratory Diagnosis of Cutaneous and Visceral Leishmaniasis: Current and Future Methods. **Microorganisms**, v. 8, n. 11, p. 1632, 22 out. 2020.

REZENDE, B., ALENCAR, A., BEM, G., FONTES-DANTAS, F., MONTES, G. Endocannabinoid system: Chemical characteristics and biological activity, **Pharmaceuticals**, v.16, n.2, p. 148, 2023.

RODRIGUES, I. A.; RAMOS, A.; FALCÃO, D.; PEREIRA, J.; BASSO, S.; SILVA, J.; AMARAL, A. Development of Nanoemulsions to Enhance the Antileishmanial Activity of *Copaifera paupera* Oleoresins. **BioMed research international (Print)**, v. 2018, p. 1–9, 1 jan. 2018.

RODRIGUES, V.M.; OLIVEIRA, W.N.; PEREIRA, D.T.; ALENCAR, É.N.; PORTO, D.L.; ARAGÃO, C.F.S.; MOREIRA, S.M.G.; ROCHA, H.A.O.; AMARAL-MACHADO, L.; EGITO, E.S.T. Copaiba Oil-Loaded Polymeric Nanocapsules: Production and In Vitro Biosafety Evaluation on Lung Cells as a Pre-Formulation Step to Produce Phytotherapeutic Medicine. **Pharmaceutics**, v. 15, p.161, 2023.

ROMERO-SUAREZ, D.; KEASLING, J. D.; JENSEN, M. K. Supplying plant natural products by yeast cell factories. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 33, p. 100567, fev. 2022.

SALINAS, C., LIS, M., CODERCH, L., MARTI, M. Formation and Characterization of Oregano Essential Oil Nanocapsules Applied onto Polyester Textile. v. 14, n. 23, p. 5188–5188, 29 nov. 2022.

SCHANKNECHT, E.; BACHARI, A.; NASSAR, N.; PIVA, T.; MANTRI, N. Phytochemical Constituents and Derivatives of Cannabis sativa; Bridging the Gap in Melanoma Treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 1, p. 859–859, 3 jan. 2023.

SCHILLING, S., MELZER, R., MCCABE, P. *Cannabis sativa*. **Current Biology**, 2020.

SHER, E.; ALEBIĆ, M.; BORAS, M.; BOŠKAILO, E.; FARHAT, M.; KARAHMET, A.; PAVLOVIĆ, B.; SHER, F.; LEKIĆ, L. Nanotechnology in medicine revolutionizing drug delivery for cancer and viral infection treatments. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 660, p. 124345–124345, 1 jul. 2024.

SIADAT, A.; ZOLFAGHARI, A.; SHAHMORADI, Z.; SHARIAT, S.; SOHRABI, K. Application of laser for treatment of cutaneous leishmaniasis: a review of literature. **Lasers in Medical Science**, v. 35, n. 7, p. 1451–1457, 24 abr. 2020.

SUN, H.; ERDMAN III, W.; YUAN, Y.; MOHAMED, M.; XIE, R.; WANG, W.; GONG, S.; CHENG, C. Crosslinked Polymer Nanocapsules for Therapeutic, Diagnostic, and Theranostic Applications. **Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology**, v. 12, n. 6, p. e1653, 1 nov. 2020.

SUN, X. Research Progress on Cannabinoids in Cannabis (*Cannabis sativa* L.) in China. **Molecules**, v. 28, n. 9, p. 3806, 29 abr. 2023.

TARIQ, F.; ZAMAN, M.; WAQAR, M.; SAEED, M.; SARFRAZ, R. Design, optimization & characterization of niosomal & polymeric nanoparticles. **International Journal of Polymeric Materials**, v. 73, n. 15, p. 1353–1366, 3 nov. 2023.

VILLANUEVA-SAZ, S.; GINER, J.; MARTELES, D.; VERDE, M.; YZUEL, A.; RIERA, C.; FISA, R.; ALCOVER, M.; FERNÁNDEZ, A. Leishmaniosis caused by *Leishmania infantum* in ferrets: Update review, **Veterinary and Animal Science**, v. 15, 2022.

URIBE-QUEROL, E.; ROSALES, C. Neutrophils versus Protozoan Parasites: *Plasmodium*, *Trichomonas*, *Leishmania*, *Trypanosoma*, and *Entamoeba*. **Microorganisms**, v. 12, n. 4, p. 827–827, 19 abr. 2024.

URREJOLA, M. C.; SOTO, L.; ZUMARÁN, C.; PEÑALOZA, J.; ÁLVAREZ, B.; FUENTEVILLA, I.; HAIDAR, Z. Sistemas de Nanopartículas Poliméricas II: Estructura, Métodos de Elaboración, Características, Propiedades, Biofuncionalización y Tecnologías de Auto-Ensamblaje Capa por Capa (Layer-by-Layer Self-Assembly). **International Journal of Morphology**, v. 36, n. 4, p. 1463–1471, dez. 2018.

WANG, Q.; ZHANG, L.; DING, W. Eugenol nanocapsules embedded with gelatin-chitosan for chilled pork preservation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 158, p. 837-844, 2020.

WANG, X.; ZHANG, H.; LIU, YAN, L.; XU, Y.; YANG, B.; LI, H.; CHEN, L. An overview on synthetic and biological activities of cannabidiol (CBD) and its derivatives. **Bioorganic Chemistry**, v. 140, 2023.

WANG, X.; IZZO, A.; PAPAPETROPOULOS, A.; ALEXANDER, S.; CORTESE-KROTT, M.; KENDALL, D.; MARTEMYANOV, K.; MAURO, C.; PANNETIERI JR, R.; PATEL, H.; SCHULZ, R.; STEFANSKA, B.; STEPHENS, G.; TEIXEIRA, M.; VERGNOLLE, N.; FERDINANDY, P. Natural product pharmacology: the British Journal of Pharmacology perspective. **British Journal of Pharmacology**, 11 ago. 2024.

WANT, M. Y.; YADAV, P.; AFRIN, F. Nanomedicines for Therapy of Visceral Leishmaniasis. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 16, n. 3, p. 2143–2151, 1 mar. 2016.

World Health Organization. Leishmaniasis. 2023. Disponível em: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/topics/gho-ntd-leishmaniasis>. Acesso em: 12/06/2023.

XAVIER-JUNIOR, F. H.; EGITO, E. S. T.; MORAIS, E.R.V.; ALENCAR, E. N.; VAUTHIER, A. M. C. Experimental design approach applied to the development of chitosan coated poly(isobutylcyanoacrylate) nanocapsules encapsulating copaiba oil. **Colloids and surfaces. A, Physicochemical and engineering aspects**, v. 536, p. 251–258, 2018.

YAN, C., LI, Y., LIU, H., CHEN, D., WU, J. Antitumor mechanism of cannabidiol hidden behind cancer hallmarks, *Biochimica et biophysica acta*. **Reviews on cancer**, v.1878, n. 4, p. 188905, 2023.

YIEN, R.; MATOS, A., GOMES, A.; GARÓFALO, D.; SANTOS-OLIVEIRA, R.; SIMAS, N.; RICCI-JÚNIOR, E. Nanotechnology Promoting the Development of Products from the Biodiversity of the Asteraceae Family. **Nutrients**, v. 15, n. 7, p. 1610–1610, 26 mar. 2023.

ZHANG, J.; GONG, X.; GAN, Q., YAN, Y. Application of Metabolite-Responsive Biosensors for Plant Natural Products Biosynthesis. **Biosensors**, v. 13, n. 6, p. 633–633, 7 jun. 2023.

ZHANG, M.; LI, M.; ZHANG, D.; YU, Y.; ZHU, K.; ZANG, X.; LIU, D. Preparation and Investigation of Sustained-Release Nanocapsules Containing Cumin Essential Oil for Their Bacteriostatic Properties. **Foods**, v.13, n.94, 2024.

ZHANG, T., MUROWCHICK, J., & YOUAN, B.-B. C. Optimization of formulation variables affecting spray-dried oily core nanocapsules by response surface methodology. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 3, p. 1031–1044, 2011.

ZHANG, D.; ZHANG, J. Surface engineering of nanomaterials with phospholipid-polyethylene glycol-derived functional conjugates for molecular imaging and targeted therapy. **Biomaterials**, v. 230, p. 119646, fev. 2020.

ZHENG, M.; ZHANG, W.; LU, S. The characterization of the pectin/alginate nanoparticle for encapsulation of hydroxypropyl- β -cyclodextrin-complexed naringin and its effects on cellular uptake and oxidative stress in Caco-2 cells. **International journal of biological macromolecules**, v. 263, n. 130398, p. 130398, 2024.