

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 30/07/2027.



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Letícia Pereira Lima Durão

**Potencial sistema nanoemulsionado carregado com hesperitina e canabidiol:
desenvolvimento, caracterização e avaliação in vitro do seu impacto na
polarização fenotípica de macrófagos**

Araraquara

2025



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Letícia Pereira Lima Durão

**Potencial sistema nanoemulsionado carregado com hesperitina e canabidiol:
desenvolvimento, caracterização e avaliação in vitro do seu impacto na
polarização fenotípica de macrófagos**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Periodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para obtenção do título de Mestre em Odontologia na área de Periodontia

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Patricia
Milagros Maquera Huacho

Araraquara

2025

D951p

Durão, Letícia Pereira Lima

Potencial sistema nanoemulsionado carregado com hesperitina e canabidiol :
desenvolvimento, caracterização e avaliação in vitro do seu impacto na
polarização fenotípica de macrófagos / Letícia Pereira Lima Durão. --

Araraquara, 2025

132 f. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Faculdade de Odontologia, Araraquara

Orientadora: Patricia Milagros Maquera Huacho

1. Flavonoides. 2. Canabidiol. 3. Sistemas de Liberação de Fármacos por
Nanopartículas. 4. Macrófagos. 5. Doenças periodontais. I. Título.

Letícia Pereira Lima Durão

**Potencial sistema nanoemulsionado carregado com hesperitina e canabidiol:
Desenvolvimento, caracterização e avaliação in vitro do seu impacto na
polarização fenotípica de macrófagos**

Comissão julgadora

Defesa para obtenção do grau de Mestre em Odontologia

Presidente e orientador: Prof^a. Dr^a. Patricia Milagros Maquera Huacho

2º Examinador: Prof^a. Dr^a. Fernanda Gonçalves Basso

3º Examinador: Prof. Dr. Vinicius Paiva Gonçalves

4º Examinador: Prof^a. Dr^a. Camila Chierici Marcantonio

5º Examinador: Prof^a. Dr^a. Telma Blanca Lombardo Bedran

Araraquara, 30 de julho de 2025

DADOS CURRICULARES

Letícia Pereira Lima Durão

NASCIMENTO: 22/11/1999 – Brodowski – São Paulo

FILIAÇÃO: Marinez Pereira Lima Durão e Nazareno Antonio Sertóri Durão

2018 – 2023: Curso de graduação – Faculdade de Odontologia de Araraquara – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

2023 – Atual: Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Concentração em Periodontia – Mestrado Acadêmico - Faculdade de Odontologia de Araraquara – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Dedico esse trabalho a minha vó Ana (*In memoriam*), a qual devo muita gratidão, e sei que vem acompanhando toda minha jornada e vibrando comigo por mais uma etapa.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais **Nazareno** e **Marinez**, os quais sempre me incentivaram em todos os contextos da minha vida, sobretudo educação. Com muito zelo e amor e mesmo sem entender ao certo sobre a pós-graduação propriamente dita nunca deixaram de estar comigo. Se hoje concluo mais uma fase, o mérito é nosso. É imensurável o amor que sinto.

Aos meus avós, **Antônia** e **Pereira** que aos domingos antes das viagens até Araraquara me esperavam no portão com minhas marmitas da semana. Faziam com que eu me recarregasse de colo, amor e paz no coração. Obrigada por estarem esses 25 anos por perto se fazendo presente em cada momento meu.

Aos meus irmãos, **Samuel** e **Marília**, que mesmo em cidades diferentes e sob a rotina muitas vezes exaustiva, celebravam comigo cada passo dado. Além de me servirem de exemplo para querer ser uma pessoa melhor a cada dia. Obrigada pela força sempre.

À minha orientadora **Patrícia Maquera**, que como educadora, não só transferiu conhecimento técnico, mas criou as possibilidades para minha própria produção, me concedendo autonomia e principalmente pensamento crítico. Me fez enxergar que fazer ciência é ir muito além uma titulação obtida, é resiliência, é paixão e sobretudo empatia para com o outro. Tenho muito orgulho da nossa jornada. Obrigada.

À professora **Denise Spolidorio**, a qual não mediu esforços para que a pesquisa sempre tivesse todo recurso necessário. Além de todo acolhimento proporcionado para conosco.

Aos meus colegas de Laboratório, **Celina Mainardes** e **Jhonatan Carvalho** pelos ótimos momentos de convivência e troca de experiências

Às minhas amigas de Araraquara, **Ana Carolina**, **Milena Gimenes**, **Maria Júlia Mancim** e **Nayara Diniz**, por me acolherem em momentos de angústias, fazendo com

que o cuidado sempre prevalecesse. Agradeço por cada troca que tivemos durante esses anos

Ao professor **Marlus Chorilli**, pelo auxílio no desenvolvimento das nanoemulsões e pela disponibilização de seu laboratório para condução dos testes.

Aos doutores **Jonatas Lobato** e **Leonardo Di Filippo**, os quais foram essenciais para o desenvolvimento das nanoemulsões testadas. Deixo meu agradecimento, pela jornada que tivemos juntos e todo conhecimento compartilhado, além da amizade construída que levo comigo.

À professora **Erica Dorigatti**, pelo auxílio na elaboração da revisão e compartilhamento de conhecimento acerca da temática.

Ao meu namorado, **Renan Cesca**, pelo encontro que tivemos, por sempre me instigar a viver com mais questionamentos sobre coisas que poucas pessoas questionam, nunca a inércia. Sorte dos poucos que te acessam. Obrigada por sempre me fazer sentir mais corajosa e capaz.

Às minhas amigas e amigos, **Lara, Marcela, Maria Clara, Natália, Letícia, Veronica, Bethânia, Rodrigo, André, Gabriela** por deixarem as minhas voltas a Brodowski sempre muito mais divertidas e com muito lazer. Também, por vibrarem a cada conquista minha, me fazendo sentir sempre muito amada.

À CAPES: O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

“Se eu caí, é porque estava caminhando. E caminhar vale a pena, mesmo que você caia”
Eduardo Galeano*

* Galeano E. Nas veias abertas da América Latina. Uruguai: Paz e Terra; 1971.

Durão LPL. Potencial sistema nanoemulsionado carregado com hesperitina e canabidiol: Desenvolvimento, caracterização e avaliação in vitro do seu impacto na polarização fenotípica de macrófagos [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2025.

RESUMO

Terapias alternativas combinando produtos naturais têm sido utilizadas nos últimos anos como alternativa ou complementação de tratamentos convencionais. A hesperitina (HT), é um flavonoide, presente em frutas cítricas, com propriedades biológicas, incluindo ação antioxidante, anti-inflamatória e analgésica. Por outro lado, o canabidiol (CBD), é composto pertencente a classe dos canabinoides, isolado da planta *Cannabis Sativa*, com efeitos farmacológicos benéficos como anti-inflamatórios, antioxidantes e na regeneração óssea e tecidual. Atualmente, as nanobioteχνologias estão abrindo novas perspectivas para a liberação controlada de medicamentos. Nesse sentido, as nanoemulsões (NEs) mostram resultados promissores devido à sua estrutura e notáveis propriedades biológicas. Assim, o objetivo do presente estudo foi desenvolver e caracterizar um novo sistema nanoemulsionado carregado com HT e CBD isolados e associados, e avaliar seus efeitos na polarização fenotípica, anti-inflamatórios e antioxidantes em macrófagos. Na **publicação 1** foi realizada uma revisão narrativa sobre o papel do CBD na cicatrização de feridas através do seu efeito anti-inflamatório e regeneração tecidual óssea, fornecendo embasamento para as investigações subsequentes. Já na **publicação 2**, foi desenvolvido e validado um método para quantificação do CBD em NEs. Finalmente, na **publicação 3**, as NEs foram sintetizadas e carregadas com HT e CBD isolados e associados. A caracterização das NEs incluiu a análise dos parâmetros: diâmetro médio de gotícula, índice de polidispersão (IPd), potencial zeta, eficiência de encapsulação, liberação e internalização, além do tamanho e morfologia das partículas. Depois, o efeito das NEs sobre o perfil fenotípico M1 em macrófagos foi avaliado por citometria de fluxo, enquanto a modulação de mediadores inflamatórios foi analisada por RT-PCR e a expressão de espécies reativas de oxigênio (EROs) determinada usando a sonda fluorescente DCF-DA. Os dados numéricos foram submetidos à análise estatística, adotando-se um nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Os resultados indicaram que o CBD tem efeitos modulatórios na cicatrização de feridas e ossos atuando nos estágios envolvidos. Entretanto, sua eficácia é limitada devido à sua baixa biodisponibilidade, metabolismo rápido e solubilidade reduzida. Por outro lado, o método validado demonstrou alta sensibilidade para análise das NEs apresentando linearidade de 2,5 a 75 µg/mL, coeficiente de correlação de 0,9998, taxas de recuperação maiores a 85%, além de ser preciso, exato, robusto e seletivo. Finalmente, as NEs mostraram propriedades ideais de caracterização com gotículas <100 nm, IPd < 0,5 e potencial zeta adequado. Adicionalmente, a alta eficiência de encapsulação facilitou uma liberação gradual e controlada. As NEs apresentaram internalização eficaz, mantendo uma morfologia esférica e sem coalescência. Por fim, o estudo in vitro demonstrou que as NEs são biocompatíveis, modulam a polarização de macrófagos M1 através supressão da expressão dos genes IL-6 e TNF-α e inibição significativa da produção de EROs. Em conclusão, a revisão reforça o potencial terapêutico do CBD na regeneração tecidual e óssea, no entanto há necessidade de novos estudos para avaliação do mecanismo de ação, biodisponibilidade e posologia do CBD. O método de quantificação do CBD em NE proposto foi validado demonstrando-se sensível e confiável. Finalmente, as NEs com HT e CBD demonstraram efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes, configurando-se como agentes promissores no tratamento de doenças inflamatórias, como a periodontite.

Palavras-chave: Flavonoides. Canabidiol. Sistemas de Liberação de Fármacos por Nanopartículas. Macrófagos. Doenças periodontais. Inflamação.

Durão LPL. Potential nanoemulsion system loaded with hesperetin and cannabidiol: Development, characterization, and in vitro evaluation of its impact on macrophage phenotypic polarization [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2025.

ABSTRACT

Alternative therapies combining natural products have been used in recent years as an alternative or complement to conventional treatments. Hesperitin (HT) is a flavonoid found in citrus fruits with biological properties, including antioxidant, anti-inflammatory and analgesic action. On the other hand, cannabidiol (CBD) is a compound belonging to the cannabinoid class, isolated from the Cannabis Sativa plant, with beneficial pharmacological effects such as anti-inflammatory, antioxidant, and bone and tissue regeneration properties. Currently, nanobiotechnologies are opening up new perspectives for the controlled release of drugs. In this sense, nanoemulsions (NEs) show promising results due to their structure and remarkable biological properties. Thus, the objective of the present study was to develop and characterize a new nanoemulsified system loaded with isolated and associated HT and CBD, and to evaluate its effects on phenotypic polarisation, anti-inflammatory and antioxidant properties in macrophages. In **publication 1**, a narrative review was conducted on the role of CBD in wound healing through its anti-inflammatory effect and bone tissue regeneration, providing a basis for subsequent investigations. In **publication 2**, a method for quantifying CBD in NEs was developed and validated. Finally, in **publication 3**, NEs were synthesised and loaded with isolated and associated HT and CBD. The characterization of NEs included the analysis of the following parameters: mean droplet diameter, polydispersity index (PDI), zeta potential, encapsulation efficiency, release and internalization, as well as particle size and morphology. Then, the effect of NEs on the M1 phenotypic profile in macrophages was evaluated by flow cytometry, while the modulation of inflammatory mediators was analysed by RT-PCR and the expression of reactive oxygen species (ROS) was determined using the DCF-DA fluorescent probe. The numerical data were submitted to statistical analysis, adopting a significance level of 5% ($p < 0.05$). The results indicated that CBD has modulatory effects on wound and bone healing by acting on the stages involved. However, its efficacy is limited due to its low bioavailability, rapid metabolism, and reduced solubility. On the other hand, the validated method demonstrated high sensitivity for NE analysis, presenting linearity from 2.5 to 75 $\mu\text{g/mL}$, a correlation coefficient of 0.9998, recovery rates greater than 85%, and being precise, accurate, robust, and selective. Finally, NEs showed ideal characterization properties with droplets < 100 nm, $\text{IPd} < 0.5$, and adequate zeta potential. Additionally, the high encapsulation efficiency facilitated gradual and controlled release. The NEs showed effective internalization, maintaining a spherical morphology and without coalescence. Finally, the in vitro study demonstrated that NEs are biocompatible, modulate M1 macrophage polarization through suppression of IL-6 and TNF- α gene expression and significant inhibition of ROS production. In conclusion, the review reinforces the therapeutic potential of CBD in tissue and bone regeneration; however, further studies are needed to evaluate the mechanism of action, bioavailability, and dosage of CBD. The proposed method for quantifying CBD in NEs was validated as sensitive and reliable. Finally, NEs with HT and CBD demonstrated anti-inflammatory and antioxidant effects, making them promising agents in the treatment of inflammatory diseases such as periodontitis.

Keywords: Flavonoids. Cannabidiol. Nanoparticle Drug Delivery system. Macrophages. Periodontal Diseases. Inflammation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 PROPOSIÇÃO	24
2.1 Objetivos Específicos	24
3 PUBLICAÇÕES	25
3.1 Publicação 1	25
3.2 Publicação 2	60
3.3 Publicação 3.....	77
4 CONCLUSÃO	115
REFERÊNCIAS.....	116
APÊNDICE A – MATERIAIS E MÉTODOS PUBLICAÇÃO 2	122
APÊNDICE B – MATERIAIS E MÉTODOS PUBLICAÇÃO 3	126

1 INTRODUÇÃO

A periodontite é uma das doenças mais prevalentes da cavidade oral, caracterizando-se por uma inflamação crônica que resulta na perda de tecidos de suporte dos dentes, como cemento, ligamento periodontal e osso alveolar¹. Sua progressão resulta na ruptura do processo natural de cicatrização, estabelecendo um estado inflamatório persistente que compromete a regeneração tecidual e favorece a destruição dos tecidos periodontais². Seu desenvolvimento resulta da interação entre a resposta imunológica do hospedeiro e o desequilíbrio bacteriano, conhecido como disbiose³. Dentre os principais microrganismos envolvidos, destacam-se bactérias Gram-negativas tais como *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia*, que compõem o chamado complexo vermelho e estão associados à instalação da doença periodontal em adultos⁴. Nesse sentido, o lipopolissacarídeo (LPS) é o principal componente da membrana externa de bactérias Gram-negativas, que é considerado um dos principais indutores da resposta imune local, uma vez que interage com os receptores Toll-like 4 (TLR4), desencadeando a transcrição de mediadores inflamatórios^{5,6}.

As interações entre o hospedeiro e o patógeno no sulco gengival e na bolsa periodontal estimulam a infiltração de neutrófilos e linfócitos, direcionada por gradientes quimiotáticos, que são responsáveis por fagocitar patógenos, assim como liberar metaloproteinases da matriz (MMPs) e fatores de crescimento⁷. Além disso, a disbiose desencadeia também a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF), o fator de crescimento transformador beta (TGF- β), a interleucina (IL)-1, a prostaglandina E2 (PGE₂) e o interferon-gama (IFN- γ), além da produção de anticorpos contra o biofilme bacteriano⁷. Durante este processo, os macrófagos desempenham um papel crucial e atuam como células apresentadoras de antígeno juntamente com as células dendríticas⁸. Essas células, conhecidas como APC (células apresentadoras de antígenos), são responsáveis pela ligação entre a resposta imune inata e adaptativa⁹. Em função a sua flexibilidade, os macrófagos podem se diferenciar em fenótipos M1 (pró-inflamatórios) ou M2 (anti-inflamatórios) em resposta ao ambiente extracelular¹⁰. Quando estimulados por LPS e/ou IFN- γ , os macrófagos assumem o fenótipo M1, liberando moléculas pró-inflamatórias como óxido nítrico sintase induzível (iNOS), IL-1 β , IL-6 e TNF- α , essenciais para a eliminação de patógenos¹¹. Contudo, se essas moléculas pró-inflamatórias não forem

eficientemente removidas, podem agravar as reações inflamatórias e causar danos ao hospedeiro. Por outro lado, quando induzidos com IL-4, os macrófagos assumem o fenótipo M2, secretando fatores anti-inflamatórios como arginase (Arg)1, IL-10 e IL-13, que ajudam a atenuar a resposta inflamatória e promovem a regeneração tecidual¹². Apesar da relevância da polarização M1/M2 nas doenças inflamatórias, pouco se sabe sobre o estado de polarização dos macrófagos na periodontite em humanos. Dessa forma, compreender a atuação dos fenótipos M1 (pró-inflamatório) e M2 (anti-inflamatório) nessa patologia é essencial para elucidar os mecanismos envolvidos na inflamação crônica. Assim mesmo, a avaliação da polarização fenotípica dos macrófagos pode revelar alvos terapêuticos promissores para modular a resposta imune e controlar o dano tecidual.

Diante do microambiente inflamatório característico da periodontite, a ativação de leucócitos polimorfonucleares leva à liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais desempenham papéis essenciais em processos biológicos como proliferação celular e defesa antimicrobiana¹³. Em concentrações fisiológicas, as EROs favorecem o crescimento de fibroblastos e células epiteliais¹⁴. Contudo, em níveis elevados, desencadeiam lesões teciduais por meio de mecanismos oxidativos¹⁴. No meio intracelular, as EROs danificam biomoléculas e membranas, quando radicais livres como O_2^- , H_2O_2 e OH , produzidos durante a respiração mitocondrial dos neutrófilos, promovem peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e lesões no DNA celular¹⁵. Esse desequilíbrio resulta em alterações patológicas e na consequente destruição dos tecidos periodontais do hospedeiro. Assim, investigar o papel das EROs na mediação do dano tecidual é válido para esclarecer os mecanismos envolvidos na destruição periodontal, bem como contribuir para a identificação de alvos terapêuticos capazes de modular o estresse oxidativo e prevenir a progressão da doença.

No tratamento da doença periodontal, se houver remoção de maneira eficaz dos patógenos e controle da resposta do hospedeiro tem-se, por sua vez, o reestabelecimento da homeostase tecidual. Entretanto, o processo inflamatório contínuo acelera a destruição do tecido periodontal, favorecendo a progressão da doença¹⁶. O tratamento essencial para essa condição consiste na raspagem e alisamento radicular (RAR), aliada a orientações de higiene oral para que o paciente consiga remover eficazmente o biofilme dentário supra e subgengival, além de controlar os fatores de risco^{17,18}. Nos últimos anos, terapias adjuvantes que ampliam

os benefícios da RAR têm ganhado destaque. As drogas bioativas e biocompatíveis têm atraído a atenção da comunidade médica devido aos seus benefícios para a saúde, especialmente no tratamento de doenças inflamatórias^{19,20}. Paralelamente, grande parte da população mundial, particularmente em países em desenvolvimento, depende das plantas medicinais e dos fitoterápicos como principais formas de cuidado à saúde. Esse panorama tem incentivado a indústria farmacêutica a explorar compostos bioativos de origem natural como base para o desenvolvimento de novos fármacos. A identificação de moléculas predominantes extraídas de organismos naturais possibilita a síntese de análogos mais eficazes e seletivos, consolidando os produtos naturais como recursos estratégicos para a inovação terapêutica e a descoberta de novas alternativas medicamentosas²¹.

Nesse contexto, os flavonoides correspondem a substâncias bioativas, pertencentes a classe química dos polifenóis. Em função a variedade de estruturas os flavonoides se dividem em flavonois, flavonas, flavononas, flavon-3-ol, isoflavononas e antocianinas²². Dentre estes, a hesperitina (HT) é um metabólito da hesperidina, pertencente ao subgrupo flavanona, encontrado principalmente em frutas cítricas como laranja e grapefruit²³. A HT exibe diversas propriedades biológicas e farmacológicas, destacando sua capacidade anti-inflamatória, antibacteriana, antioxidante, proteção da função neurológica, promoção de apoptose de células tumorais e efeitos benéficos no metabolismo ósseo²⁴⁻³⁰. Consequentemente, diversos ensaios experimentais utilizam a HT como parte de estratégias que visam a busca por novas aplicações terapêuticas.

Estudos evidenciando os efeitos anti-inflamatórios da HT são relatados na literatura. Nesse sentido, Liu et al. (2021)²⁴ demonstraram que a HT reduziu significativamente a secreção de citocinas inflamatórias como TNF- α e IL-6 e, simultaneamente, atenuando a infiltração de células inflamatórias e fibrose no tecido hepático. No mesmo estudo foi demonstrado que a HT suprimiu a ativação da via de sinalização fator nuclear kappa B (NF- κ B). Wang et al. (2022)²⁵ demonstraram a atividade anti-inflamatória da HT através do seu efeito inibitório na expressão de TNF- α e IL-6 induzidas por LPS em macrófagos de camundongos. A HT também promoveu a redução significativa de citocinas pró-inflamatórias tais como óxido nítrico sintase induzível (iNOS), ciclooxigenase-2 (COX-2), óxido nítrico (NO) em condrócitos induzidos por IL-1 β ²⁶. Além disso, Kong et al. (2019)²⁷ investigaram o papel da Hesperitina-12 (HT-12), uma forma da HT com melhor solubilidade em água

e maior biodisponibilidade, na polarização de macrófagos M1. Em células RAW 264.7 estimuladas com LPS e IFN- γ , a HT-12 foi capaz de modular a resposta inflamatória, promovendo a polarização para um perfil anti-inflamatório. Os resultados demonstraram aumento na expressão de Arg-1, IL-10 e TGF- β , marcadores associados ao fenótipo M2, e redução na expressão de iNOS, característica do fenótipo M1. Da mesma forma, Alipour et al. (2023)²⁸ demonstraram que nanocristais contendo HT reduziu significativamente os níveis de TNF, IL-6 e ROS em modelos inflamatórios in vitro de células-tronco da polpa dentária humana (hDPSCs) e macrófagos/monócitos U937. Por outro lado, em modelo experimental de trauma torácico contuso em ratos, a HT apresentou efeito protetor contra a inflamação sistêmica e a lesão hepática²⁹. O tratamento resultou na diminuição dos níveis séricos de TNF- α , AST e ALT, e menor expressão de NF- κ B e em alterações histopatológicas atenuadas. Além disso, reduziu-se significativamente a apoptose hepática.

Em relação ao efeito antioxidante da HT, em células HepG2 expostas ao ácido oleico, a HT atenuou o estresse oxidativo hepático ao ativar a via PI3K/AKT-Nrf2, promovendo o aumento de enzimas antioxidantes, como SOD, GPx, GR, GCLC e HO-1³⁰. Essa resposta contribuiu para a redução da produção de espécies ROS e da hepatotoxicidade induzida. Também, um estudo prévio mostrou que após estimulação com H₂O₂, células endoteliais de ratos tratadas com HT e seu metabólito Hst-7-O-glucuronídeo apresentaram uma redução significativa na expressão de ICAM-1 e MCP-1, quando comparadas ao grupo controle³¹. A HT atenuou significativamente o estresse oxidativo e a inflamação testicular em ratos diabéticos, reduzindo os níveis de ROS, MDA, proteína carbonilada e citocinas inflamatórias como TNF- α e IL-17. Além disso, aumentou a atividade de enzimas antioxidantes como SOD, GPx e catalase, reforçando a defesa redox³². Foi constatado em outro estudo in vivo que a HT reduziu significativamente o nível de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas regiões do córtex e do hipocampo do cérebro de camundongos, além de recuperar a expressão de proteínas antioxidantes como Nrf-2 e HO-1²³. Adicionalmente, o impacto da HT sob estresse oxidativo foi avaliado em ratas Sprague-Dawley submetidas a lesão contusa na medula espinhal³³. Os resultados demonstraram que o tratamento com diferentes concentrações de HT atenuou o estresse oxidativo nos tecidos lesionados, evidenciado pela redução significativa dos níveis de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e malondialdeído (MDA). No mesmo estudo, as evidências mostraram que houve um aumento nas atividades das enzimas antioxidantes CAT,

SOD e GSH-PX, responsáveis pela neutralização de espécies reativas de oxigênio³³. Em outro ensaio in vivo, usando a técnica de gavagem, foi administrado HT na dose de 50 mg/kg, evidenciando-se nos resultados que grupos pre-tratados com HT apresentaram maior atividade antioxidante contra diferentes sistemas oxidativos tais como sequestro de ânions superóxido, poder redutor e efeitos quelantes de metais. Os autores também avaliaram *in vitro* os efeitos antioxidantes da HT, onde o tratamento resultou numa redução significativa da expressão das proteínas iNOS e COX-2 induzidas por LPS, tanto em macrófagos RAW 264.7 quanto em células musculares lisas vasculares A7r5³⁴. Também, o efeito protetor da HT contra a toxicidade de colôn induzida por 1,2-Dimetil-hidrazina (um agente oxidante), foi avaliado em ratos Wistar³⁵. O tratamento com HT atenuou significativamente a peroxidação lipídica induzida, além de aumentar a atividade e os níveis de enzimas antioxidantes, como GR, GPx, GST, GSH e SOD. Além disso, a HT foi capaz de reduzir a expressão de proteínas inflamatórias, incluindo TNF- α , IL-6, iNOS, COX-2 e NF- κ B p65³⁵. Adicionalmente, a HT demonstrou efeitos protetores na lesão renal aguda em ratos induzida por LPS, ao reduzir a disfunção renal e as alterações histológicas³⁶. Esses benefícios estão associados à atenuação do estresse oxidativo por meio da regulação negativa do NOX4, restauração dos níveis de glutathione e ativação de enzimas antioxidantes. Da mesma forma, o composto suprimiu a apoptose via caspase-3/p53 e inibiu a inflamação e a infiltração de macrófagos³⁶.

Em relação as outras propriedades relevantes da HT, foi evidenciado que a HT promove a apoptose em células A549 (linhagem celular de câncer de pulmão) por meio da via mitocondrial, ao inibir a expressão da proteína Hsp70 (proteína de choque térmico 70), um regulador negativo frequentemente superexpresso em células cancerígenas e associado à inibição dessa via apoptótica³⁷. A HT também demonstrou um efeito anti-proliferativo e capacidade de induzir apoptose em células de glioma humano, por meio da modulação negativa das vias de sinalização fosfoinosítídeo 3-quinase/proteína quinase B (PI3K/AKT) e fator nuclear kappa B (NF- κ B). Tais achados reforçam seu potencial anti-cancerígeno, evidenciando sua atuação em processos celulares essenciais à sobrevivência e progressão tumoral³⁸. Em relação aos benefícios da HT no metabolismo ósseo, Zhang et al. (2018)³⁹ demonstraram, por meio de experimentos *in vitro* e *in vivo*, que o tratamento com HT foi eficaz na redução significativa da expressão dos fatores de transcrição JNK, IRF-3 e c-Jun. Essa modulação resultou na inativação das vias de sinalização NF- κ B/MAPK e do fator de

transcrição NFATc-1, levando à supressão de genes específicos envolvidos na diferenciação/atividade dos osteoclastos, e redução da osteoclastogênese. Por outro lado, no estudo de Liu et al. (2021)⁴⁰ investigaram o potencial osteogênico do HT em um modelo in vitro com células-tronco mesenquimais da medula óssea (BMSCs) submetidas à indução por glicocorticoides, condição que simula alterações celulares associadas à osteoporose. Os resultados mostraram que a HT induziu a atividade da fosfatase alcalina, promoveu um aumento significativo na expressão de genes associados à diferenciação osteogênica e ativou a via de sinalização ERK, a qual desempenha um papel fundamental nesse processo em BMSCs. Em relação aos efeitos da HT sobre a regeneração tecidual, foi evidenciado em um modelo de ferida em rato diabético, que esta biomolécula promoveu significativamente a cicatrização de feridas, reduzindo os níveis de ferroptose tecidual⁴¹. Assim, considerando estas informações, a HT torna-se um dos flavonóides atrativos e de interesse devido aos seus impactos benéficos sobre a saúde, sobretudo no contexto das doenças inflamatórias crônicas.

Em contrapartida, o CBD é um fitocanabinoide fenólico mais abundantes da *Cannabis sativa L.*, ao lado do tetraidrocanabinol (THC). Embora compartilhem a mesma fórmula molecular ($C_{21}H_{30}O_2$), o CBD e o THC diferem em sua estrutura química: o THC, principal responsável pelos efeitos psicoativos da planta, possui um anel cíclico, enquanto o CBD contém um grupo hidroxila^{42,43}. Essa diferença impede a conversão do CBD em THC, conferindo ao CBD propriedades farmacológicas distintas, sem efeitos psicotrópicos e cognitivos⁴⁴. Considerado também uns dos componentes mais seguros dentre os fitocanabinoides por possuir poucos efeitos adversos descritos, tais como sonolência, perda de apetite, diarreia e sedação⁴⁵. O CBD possui ampla bioatividade que incluem efeitos analgésicos, anti-inflamatórios, anticonvulsivantes, neuroprotetores, ansiolíticos e potencial de atuação na remodelação óssea⁴⁶⁻⁵⁰. Diante disso, vários protocolos experimentais utilizando o CBD são empregados como estratégia alternativa de novos usos terapêuticos.

Em se tratando do efeito anti-inflamatório do CBD, Kozela et al. (2010)⁴⁶ destacou que o CBD nas concentrações de 1, 5 e 10 μ M foram responsáveis por diminuir a liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β , IL-6 e IFN- β em células microgлияis BV-2 quando ativadas por LPS, e também foi capaz de reduzir a atividade da via NF- κ B. Em outro estudo in vitro, o CBD isolado reduziu significativamente os níveis das citocinas inflamatórias IL-6 e IL-8 em fibroblastos

gingivais humanos estimulados com LPS de *Porphyromonas gingivalis* (Pg). Além disso, demonstrou atividade antimicrobiana contra Pg, com uma concentração inibitória mínima (MIC) de 1,5 µg/mL⁴⁷. Em um modelo in vitro de convulsão induzido por cainato, utilizando fatias de hipocampo de ratos, o CBD demonstrou efeitos neuroprotetores bloqueando a ativação da microglia do fenótipo M0 para o M1⁴⁸. Adicionalmente, o CBD favoreceu a transição da microglia para o fenótipo M2 e paralelamente, reduziu o dano neuronal reforçando seu potencial terapêutico em condições neuro-inflamatórias⁴⁸. Da mesma forma, o CBD também favoreceu a transição da microglia para o fenótipo M2, promovendo o aumento da produção de IL-12 e a inibição da liberação de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10, de forma dependente da dose⁴⁹. Células mononucleares do sangue periférico humano (PBMCs), quando tratadas com CBD em concentrações entre 0,1–10 µg/mL apresentaram uma redução na expressão do mRNA de IFN-γ, evidenciando os efeitos imunossupressores desse canabinoide⁵⁰. Por outro lado, Verrico et al. (2020)⁵¹ demonstraram que o CBD reduz significativamente a secreção das citocinas pró-inflamatórias TNF-α e IL-6, e aproximadamente 60% nos níveis de neutrófilos circulantes em amostras sanguíneas de camundongos após injeção intraperitoneal de LPS. Já em um modelo de neuroinflamação associado à doença de Alzheimer, camundongos foram inoculados com o peptídeo β-amiloide humano Aβ e os resultados mostraram que o CBD demonstrou um efeito anti-inflamatório ao reduzir a expressão da proteína iNOS e da citocina IL-1β⁵². Também, em modelo murino de cardiomiopatia diabética tipo I, o CBD apresentou efeitos benéficos sobre disfunção miocárdica, fibrose, inflamação, estresse oxidativo/nitrosativo e morte celular, modulando marcadores como NF-κB, MAPK (JNK e p38), ICAM-1, VCAM-1, TNF-α, TGF-β, colágeno-1 e caspase 3/7⁵³. Em outro modelo murino de artrite, o CBD demonstrou efeitos analgésicos e anti-inflamatórios ao reduzir a infiltração de células inflamatórias nas articulações e modular de forma dose-dependente a expressão de biomarcadores pró-inflamatórios como CGRP, OX42 e TNF-α⁵⁴. Complementar a evidência acima descrita, o CBD possui atividade antiartrítica, atuando diretamente sobre fibroblastos sinoviais aumentando os níveis intracelulares de cálcio, e suprimindo a produção de mediadores inflamatórios como IL-6, IL-8 e MMP-3, contribuindo, assim, para a atenuação da inflamação articular⁵⁵.

A literatura mostra também evidências da propriedade antioxidante do CBD. Borges et al. (2013)⁵⁶ indicam que a atividade antioxidante do CBD está relacionada

à presença de grupos hidroxila em sua estrutura fenólica, que atuam capturando radicais livres ou convertendo-os em formas menos reativas, contribuindo assim para o equilíbrio redox. Neste contexto, em culturas de células microgliais de camundongos ativadas por LPS, foi observado que o CBD inibiu a produção de EROs mediada pela enzima NADPH oxidase e a ativação de vias de sinalização dependentes do fator de transcrição NF-Kb⁵⁷. Outra evidência mostrou a ação moduladora do CBD sobre mecanismos oxidativos e inflamatórios através da avaliação deste composto em modelo de lesão hepática por isquemia/reperfusão⁵⁸. Em células de Kupffer isoladas de camundongos, o tratamento com CBD reduziu em cerca de 56% a expressão de Nox2, além de diminuir a produção de TNF- α de forma dose-dependente⁵⁸. Da mesma forma, em estudo realizado por Pan et al. (2009)⁵⁹, o CBD demonstrou efeito protetor contra a nefrotoxicidade induzida por cisplatina em camundongos, ao reduzir o estresse oxidativo, nitrosativo e a morte celular. Foi evidenciado que, houve diminuição significativa nos níveis dos biomarcadores MDA, iNOS, Nox1 e Nox4, o que também resultou na redução das citocinas inflamatórias TNF- α e IL-1 β . Além disso, o CBD foi capaz de reduzir os níveis de NO no fígado de camundongos submetidos à administração de doxorrubicina, bem como no tecido da pata de ratos Wistar em modelo experimental de inflamação crônica^{60,61}. O CBD também modula a inflamação induzida por neutrófilos ao reduzir seu acúmulo, a atividade oxidativa de leucócitos e os marcadores de estresse oxidativo, como a expressão de NOX2 e os níveis de peroxidação lipídica⁶². Adicionalmente, o CBD é capaz de reduzir a formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) em pacientes com psoríase, contribuindo para a redução do estresse oxidativo e da lesão tecidual em condições inflamatórias crônicas⁶³.

No que diz respeito a estudos clínicos com o CBD direcionados à periodontia e processos inflamatórios, Jirasek et al. (2024)⁴⁷ relataram efeitos positivos do CBD por meio de um ensaio clínico randomizado, duplo-cego, com duração de 56 dias, onde avaliou-se o uso de um gel contendo 1% de CBD como terapia adjuvante à escovação com dentífrício. Os resultados indicaram uma melhora estatisticamente significativa nos índices gengivais em comparação com o grupo placebo⁴⁷. Em outra evidência clínica, avaliou-se o efeito de uma dose única de 30 mg de CBD administrada previamente a 10 participantes saudáveis⁶⁴. Após a administração, foram realizadas coletas de sangue para o isolamento de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), as quais foram estimuladas com LPS e posteriormente as análises dos

sobrenadantes revelaram uma redução nos níveis da citocina pró-inflamatória TNF- α após a exposição ao CBD, em comparação com aquelas obtidas antes da administração⁶⁴.

No contexto de outras propriedades benéficas do CBD, estudos tem demonstrado seus efeitos favoráveis na remodelação óssea. Desta forma, foi constatado em um modelo experimental de periodontite em roedores que o uso de CBD foi efetivo na diminuição da perda óssea alveolar, suprimindo a expressão de RANKL e aumentando a expressão de OPG⁶⁵. Kogan et al. (2015)⁶⁶ verificaram que o CBD estimulou a expressão de mRNA de Plod1 em culturas primárias de osteoblastos, codificando uma enzima que catalisa a hidroxilação da lisina, que por sua vez está envolvida na estabilização do colágeno, o que contribui para a melhoria das propriedades biomecânicas da fratura óssea. Também, foi investigado o efeito analgésico e de cicatrização óssea do CBD em camundongos com tíbias fraturadas⁶⁷. Os resultados demonstraram que o CBD reduziu significativamente a sensibilidade à dor frente a diversos estímulos e favoreceu a consolidação óssea ao atuar em diferentes fases do processo de cicatrização. Observou-se aceleração da mineralização, aumento da expressão de colágeno tipo I e osteocalcina, aumento no número de osteoblastos por área de superfície óssea tecidual e melhora na densidade e qualidade do osso formado⁶⁷. Adicionalmente, em outro modelo in vivo avaliaram em ratas o efeito do CBD na osteopenia induzida por ovariectomia⁶⁸. Assim, foram constatadas melhorias significativas na qualidade óssea, por meio do aumento na densidade mineral óssea das vértebras lombares e no número de trabéculas no colo do fêmur. Além disso, foi evidenciado um aumento no número de osteoblastos e uma redução nos osteoclastos nos animais ovariectomizados, sugerindo um efeito promotor da formação óssea e inibidor da reabsorção⁶⁸. No contexto dos efeitos do CBD na regeneração tecidual, tem sido demonstrado que em fibroblastos gengivais humanos (HGF-1), a exposição a 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de CBD resultou em uma média de fechamento da área da ferida de 33,49%, superior à observada no grupo controle não tratado, que apresentou 24,34%⁶⁹. Também, a administração inalatória de 10 mg de CBD elevou a expressão de fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF) no local da lesão em camundongos diabéticos, sugerindo um potencial benefício na cicatrização de feridas em contextos de diabetes⁷⁰. No estudo de Lapmanee et al. (2024)⁷¹, o tratamento com hidrogel contendo CBD promoveu aceleração significativa no fechamento de feridas cutâneas em ratos Wistar, com redução da área lesionada

ao longo do tempo. A análise histológica revelou epitelização precoce, maior deposição de colágeno, aumento da vascularização dérmica e organização epidérmica, além de menor infiltração inflamatória. Desta forma, devido as promissoras propriedades biológicas e farmacológicas do CBD encontradas na literatura, torna-se atrativo a utilização do composto como uma alternativa para regulação de condições inflamatórias crônicas.

Contudo, tanto a HT quanto o CBD apresentam como desvantagem a alta lipofilicidade, o que compromete sua solubilidade em meio aquoso e, consequentemente, sua absorção sistêmica⁷²⁻⁷⁴. A HT tem sua aplicação clínica limitada principalmente pela baixa solubilidade em água, o que resulta em uma biodisponibilidade oral reduzida⁷²⁻⁷⁴. Sua rápida metabolização e eliminação diminuem significativamente o tempo de meia-vida plasmática, tornando necessária a administração de doses frequentes para manutenção dos efeitos terapêuticos⁷⁵. Outro fator limitante é sua instabilidade química em diferentes condições fisiológicas, o que pode comprometer sua eficácia e dificultar o desenvolvimento de formulações farmacêuticas estáveis e viáveis para uso clínico⁷⁶. Da mesma forma, o CBD por ser uma molécula hidrofóbica, tem sua absorção limitada no trato gastrointestinal, onde a biodisponibilidade oral varia entre 6% e 19%⁷⁴. Após a administração de 10 mg de CBD, a concentração plasmática máxima atinge apenas 3 µg/L em aproximadamente 2,8 horas⁷⁴. Além disso, o metabolismo de primeira passagem hepática reduz ainda mais sua disponibilidade sistêmica, promovendo a formação de metabólitos ativos e inativos que podem impactar sua eficácia terapêutica⁷⁷. Por outro lado, a elevada variabilidade interindividual na absorção e metabolismo do CBD representa um desafio adicional para a padronização de doses, sendo influenciada por fatores como idade, sexo, peso corporal e condições sistêmicas⁷⁸.

Neste contexto, o uso da nanotecnologia surge como uma abordagem inovadora capaz de aumentar a biodisponibilidade, estabilidade e solubilidade de compostos naturais. Também, em função do foco crescente no aprimoramento da saúde humana, a utilização de nanotecnologia tem ganhado destaque em inúmeras áreas da medicina. A nanotecnologia pode ser definida como a engenharia e fabricação de materiais em escala atômica e molecular⁷⁹. Tem se mostrado capaz de transpor barreiras das ciências biológicas e físicas, através da utilização de nanoestruturas e nanofases em diversos campos da ciência⁸⁰. As partículas de nanoescala apresentam propriedades magnéticas, químicas, mecânicas, estruturais,

elétricas e biológicas exclusivas⁸¹. Nas últimas décadas, medicamentos associados a nanotecnologia ganharam visibilidade em função a capacidade das nanoestruturas que servirem como agentes de entrega, seja encapsulando fármacos, ou realizando a entrega de drogas terapêuticas com mais precisão e liberação controlada diretamente ao seu sítio de ação, aumentando dessa forma a eficácia e diminuindo os efeitos colaterais⁸². Dentre os inúmeros nanomateriais pode-se destacar lipossomas, vesículas, micelas, nanopartículas, nanosuspensões, microemulsões e nanoemulsões⁸³.

As nanoemulsões (NEs) são consideradas dispersões bifásicas de dois líquidos imiscíveis (água em óleo ou óleo em água) que são estabilizadas por meio de um surfactante. Sendo a convenção usual para a faixa de tamanho médio das partículas compreenda uma escala de 1 a 100 nm, o que concede como característica visual uma aparência clara ou turva⁸⁴. As nanoemulsões podem ser comercialmente disponíveis em veículos como líquidos, cremes, sprays, géis, aerossóis e espumas⁸⁵. Dentre as inúmeras vantagens das nanoemulsões dá-se ênfase a propriedade de incorporação de fármacos considerados hidrofílicos e hidrofóbicos. Ademais, em razão ao pequeno tamanho de sua partícula, esta facilita o aprimoramento biológico de fármacos hidrofóbicos, aumentando assim a biodisponibilidade e absorção de substancias naturais com alta lipofilicidade⁸⁶. Neste contexto, um estudo desenvolvido por Fuior et al., (2019)⁸⁷ demonstrou que as nanoemulsões permitem a incorporação de flavonoides aumentando a efetividade terapêuticas destes compostos. Adicionalmente, Zeng et al. (2021)⁸⁸ desenvolveram uma NE contendo HT com excelente estabilidade à diluição e armazenamento, além de um perfil de liberação significativamente superior ao da HT livre nos testes in vitro. Por meio de estudos de absorção intestinal, demonstraram também um aumento de 5,67 vezes na absorção cumulativa da HT em todos os segmentos intestinais avaliados. Desta forma, os autores reforçaram o potencial das NEs como sistemas eficientes para melhorar a biodisponibilidade de flavonoides como a HT, por meio do aumento de sua solubilidade⁸⁸. Neste contexto, nosso grupo de pesquisa também desenvolveu previamente um sistema nanoemulsionado contendo HT, o qual foi devidamente caracterizado mostrando valores ideais de tamanho de gotícula, índice de polidispersidade e potencial zeta, eficiência de encapsulamento de $74,07 \pm 5,33\%$ e demonstrando uma liberação gradual e controlada⁸⁹. Além disso, os resultados in vitro demonstraram que este novo biomaterial potencializou os efeitos da HT nos

mecanismos envolvidos na promoção e aceleração da osteogênese, estimulando a formação de nódulos de cálcio, aumentando a expressão dos genes Runx2, ALPL e TGF- β , a síntese de colágeno e a atividade da fosfatase alcalina em osteoblastos.

Por outro lado, em relação às nanoemulsões carregadas com CBD, a literatura apresenta poucos estudos até o momento. Dentre os ensaios mais relevantes podemos destacar o estudo desenvolvido por Ahamed et al. (2022)⁹⁰, no qual desenvolveu uma NE contendo CBD para administração intranasal com o objetivo de direcioná-lo ao cérebro. Os resultados demonstraram que, em comparação com o CBD puro, a formulação otimizada apresentou uma liberação significativamente superior in vitro, além de maior permeabilidade nasal em testes ex vivo. A eficiência de direcionamento do fármaco e a porcentagem de transporte direto foram de 419,64% e 76,17%, respectivamente. Além disso, após a administração intranasal, observaram-se concentrações consideravelmente mais elevadas de CBD no cérebro, indicando uma maior eficiência no direcionamento cerebral⁹⁰. Provenzano et al. (2023)⁹¹ desenvolveram uma NE contendo CBD com a finalidade de melhorar sua biodisponibilidade. A formulação apresentou propriedades físico-químicas adequadas, como tamanho de partícula uniforme, boa estabilidade e controle de dose. Em seguida, por meio de testes in vitro, foi observada uma permeação mais eficiente pela mucosa, além de maior estabilidade em fluidos bucais simulados e liberação efetiva do fármaco em até 5 horas. Posteriormente, no mesmo estudo, foi realizado em camundongos machos, a administração bucal da NE, a qual teve início de ação mais rápido e maiores concentrações plasmáticas quando comparada à administração oral convencional de CBD⁹¹. Adicionalmente, em um estudo in vivo utilizando ratos do tipo Sprague-Dawley machos, foi testada uma NE contendo 2% de CBD com o objetivo de avaliar a biodisponibilidade do composto. Após a administração por via oral o CBD contido na NE apresentou um aumento de 4 vezes da biodisponibilidade típica do CBD administrado em formas farmacêuticas convencionais, tais como as soluções orais de CBD⁹². Essas evidências ressaltam o potencial das NEs na melhora da biodisponibilidade, estabilidade e direcionamento do CBD, ampliando sua capacidade terapêutica.

De forma geral as informações apresentadas nesta seção evidenciam que o mecanismo de ação sobre processos inflamatórios de um novo sistema nanoemulsionado contendo HT e CBD isolados e associados, não está bem elucidado. Sendo assim, no presente trabalho foi realizado uma revisão narrativa

elencando as principais propriedades biológicas do CBD, para conceder bases ao desenvolvimento e caracterização de um novo sistema nanoemulsionado com potenciais efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes. Da mesma forma, a capacidade inibitória destes novos sistemas nanoemulsionados na resposta inflamatória e oxidativa de macrófagos assim como na polarização dos mesmos foi avaliada in vitro.

4 CONCLUSÃO

Considerando os resultados apresentados, pode-se concluir que:

- A revisão destaca evidências pré-clínicas atuais demonstrando que o CBD é um promissor potencial terapêutico na melhora da cicatrização de feridas e do reparo/regeneração óssea. No entanto, a falta de conhecimento sobre a dose mínima de CBD capaz de garantir o resultado esperado, reduzindo os efeitos colaterais, ainda requer mais pesquisas para traduzir essas descobertas em aplicações clínicas em humanos. Todos os estudos discutidos destacam lacunas significativas de conhecimento sobre os efeitos locais e sistêmicos do CBD e sua interação com as vias de sinalização. Portanto, pesquisas *in vitro* e *in vivo* são necessárias antes do início dos ensaios clínicos, com foco específico na compreensão dos mecanismos complexos do CBD no corpo humano.
- O método de quantificação do CBD em NEs por HPLC foi validado, atendendo aos critérios de especificidade, linearidade, exatidão, precisão, robustez e seletividade, garantindo assim a confiabilidade das análises de controle de qualidade. Além disso, o sistema nanoemulsionado com CBD demonstrou alta capacidade de encapsular o CBD devido à sua incorporação na matriz lipídica, melhorando as propriedades físico-químicas do CBD.
- As formulações desenvolvidas apresentaram parâmetros de caracterização satisfatórios, com alta eficiência de encapsulação, morfologia adequada e biocompatibilidade. As análises biológicas demonstraram os efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes das NEs desenvolvidas, principalmente das menores doses dos sistemas nanoemulsionados carregados com HT, CBD e HT+CBD. Além disso, modulam a polarização de macrófagos M1 suprimindo a expressão dos genes IL-6 e TNF- α e atenuando significativamente a produção de EROs, o qual poderia representar uma abordagem promissora para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas. Por outro lado, a associação do CBD e HT na formulação do sistema nanoemulsionado mostrou um efeito aditivo e nenhum efeito sinérgico foi observado.

REFERÊNCIAS*

1. Petersen PE, Ogawa H. The global burden of periodontal disease: towards integration with chronic disease prevention and control. *Periodontol* 2000. 2012; 60: 15-39.
2. Martin P, Nunan R. Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing. *Br J Dermatol*. 2015; 173(2): 370-8.
3. Kinane D, Stathopoulou P, Papapanou P. Periodontal diseases. *Nat Rev Primers*. 2017; 3: 17038.
4. Socransky S, Haffajee A, Cugini MA, Smith C, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998; 25(2): 134-44.
5. Kato H, Taguchi Y, Tominaga K, Umeda M, Tanaka A. *Porphyromonas gingivalis* LPS inhibits osteoblastic differentiation and promotes pro-inflammatory cytokine production in human periodontal ligament stem cells. *Arch Oral Biol*. 2014; 59(2): 167-75.
6. Park BS, Lee JO. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Exp Mol Med*. 2013; 45(12): 66.
7. López-Valverde N, Quispe-López N, Blanco Rueda JA. Inflammation and immune response in the development of periodontal disease: a narrative review. *Front Cell Infect Microbiol*. 2024; 14: 1493818.
8. Chen S, Saeed AFUH, Liu Q, Jiang Q, Xu H, Xiao GG et al. Macrophages in immunoregulation and therapeutics. *Signal Transduct Target Ther*. 2023; 8(1): 207.
9. Wynn TA, Vannella KM. Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis. *Immunity*. 2016; 44(3): 450-62.
10. Yunna C, Mengru H, Lei W, Weidong C. Macrophage M1/M2 polarization. *Eur J Pharmacol*. 2020; 877:173090.
11. Keewan E, Naser S. The Role of Notch Signaling in Macrophages during Inflammation and Infection: Implication in Rheumatoid Arthritis? *Cells*. 2020; 9(1), 111.
12. Martinez F., Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Reports*. 2014; 6: 13.
13. Patil RT, Dhadse PV, Salián SS, Punse SD. Role of Oxidative Stress in Periodontal Diseases. *Cureus*. 2024;16(5): e60779.
14. Dahiya P, Kamal R, Gupta R, Bhardwaj R, Chaudhary K, Kaur S. Reactive oxygen species in periodontitis. *J Indian Soc Periodontol*. 2013; 17(4): 411-416.
15. Shang J, Liu H, Zheng Y, Zhang Z. Role of oxidative stress in the relationship between periodontitis and systemic diseases. *Front Physiol*. 2023; 14: 1210449.
16. Serhan CN, Savill J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol*. 2005; 6(12): 1191-97.
17. Sanz M, Herrera D, Kebschull M, Chapple I, Jepsen S, Beglundh T, et al. EFP Workshop Participants and Methodological Consultants. Treatment of stage I-

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

- III periodontitis EFP S3 level clinical practice guideline. *J Clin Periodontol*. 2020; 47: 4-60.
18. Herrera D, Sanz M, Kebschull M, Jepsen S, Sculean A, Berglundh T, et al. EFP Workshop Participants and Methodological Consultant. Treatment of stage IV periodontitis: The EFP S3 level clinical practice guideline. *J Clin Periodontol*. 2022; 49, 24: 4-71.
 19. Figueiredo LC, Freitas Figueiredo N, da Cruz DF, Baccelli GT, Sarachini GE, Bueno MR, et al. Propolis, Aloe Vera, Green Tea, Cranberry, Calendula, Myrrha and Salvia Properties against Periodontal Microorganisms. *Microorganisms*. 2022; 31, 10(11): 2172.
 20. Carvalho JS, Ramadan D, de Paiva Gonçalves V, Maquera-Huacho PM, Assis RP, Lima TFO, et al. Impact of citrus flavonoid supplementation on inflammation in lipopolysaccharide-induced periodontal disease in mice. *Food Funct*. 2021, 12(11): 5007-5017.
 21. Miller JS. The global importance of plants as sources of medicines and the future potential of Chinese plants. In: Zhang W, Shen Y. *Phytochemistry of medicinal plants*. 2000; 23–39.
 22. Cassidy A, Minihane AM. The role of metabolism (and the microbiome) in defining the clinical efficacy of dietary flavonoids. *Am J Clin Nutr*. 2017; 105(1): 10–22.
 23. Muhammad T, Ikram M, Ullah R, Rehman SU, Kim MO. Hesperetin, a Citrus Flavonoid, Attenuates LPS-Induced Neuroinflammation, Apoptosis and Memory Impairments by Modulating TLR4/NF- κ B Signaling. *Nutrients*. 2019; 11(3): 648.
 24. Li J, Wang T, Liu P, Yang F, Wang X, Zheng W, et al. Hesperetin ameliorates hepatic oxidative stress and inflammation via the PI3K/AKT-Nrf2-ARE pathway in oleic acid-induced HepG2 cells and a rat model of high-fat diet-induced NAFLD. *Food Funct*. 2021; 12(9): 3898-3918.
 25. Wang QQ, Shi JB, Chen C, Huang C, Tang WJ, Li J. Hesperetin derivatives: Synthesis and anti-inflammatory activity. *Bioorg Med Chem Lett*. 2016; 26(5): 1460-5.
 26. Lin Z, Fu C, Yan Z, Wu Y, Zhan J, Lou Z, et al. The protective effect of hesperetin in osteoarthritis: an in vitro and in vivo study. *Food Funct*. 2020; 11(3): 2654-2666.
 27. Kong LN, Lin X, Huang C, Ma TT, Meng XM, Hu CJ, et al. Hesperetin derivative-12 (HDND-12) regulates macrophage polarization by modulating JAK2/STAT3 signaling pathway. *Chin J Nat Med*. 2019; 17(2): 122-130.
 28. Alipour M, Sharifi S, Samiei M, Shahi S, Aghazadeh M, Dizaj SM. Synthesis, characterization, and evaluation of Hesperetin nanocrystals for regenerative dentistry. *Sci Rep*. 2023; 13(1): 2076
 29. Duran Y, Karaboğa İ. Effect of hesperetin on systemic inflammation and hepatic injury after blunt chest trauma in rats. *Biotech Histochem*. 2020; 95(4): 297-304.
 30. Li J, Wang T, Liu P, Yang F, Wang X, Zheng W, et al. Hesperetin ameliorates hepatic oxidative stress and inflammation via the PI3K/AKT-Nrf2-ARE pathway in oleic acid-induced HepG2 cells and a rat model of high-fat diet-induced NAFLD. *Food Funct*. 2021; 12(9): 3898-3918.
 31. Yamamoto M, Jokura H, Hashizume K, Ominami H, Shibuya Y, Suzuki A, et al. Hesperidin metabolite hesperetin-7-O-glucuronide, but not hesperetin-3'-O-glucuronide, exerts hypotensive, vasodilatory, and anti-inflammatory activities. *Food Funct*. 2013; 4(9): 1346-1351.

32. Samie A, Sedaghat R, Baluchnejadmojarad T, Roghani M. Hesperetin, a citrus flavonoid, attenuates testicular damage in diabetic rats via inhibition of oxidative stress, inflammation, and apoptosis. *Life Sci.* 2018; 210:132-139.
33. Zhang Y, Chen X, Wang X, Xu Y, Li J, Wu Y, et al. Hesperetin ameliorates spinal cord injury in rats through suppressing apoptosis, oxidative stress and inflammatory response. *Eur J Pharmacol.* 2024; 971:176541.
34. Yang HL, Chen SC, Senthil Kumar KJ, Yu KN, Lee Chao PD, et al. Antioxidant and anti-inflammatory potential of hesperetin metabolites obtained from hesperetin-administered rat serum: an ex vivo approach. *J Agric Food Chem.* 2012; 60(1): 522-532
35. Shree A, Islam J, Yadav V, Sultana S, Khan HA. Hesperetin alleviates DMH induced toxicity via suppressing oxidative stress and inflammation in the colon of Wistar rats. *Environ Toxicol.* 2022; 37(9): 2153-2166.
36. Yang Y, Choi J, Kim K, Leem J. Antioxidant, Antiapoptotic, and Anti-Inflammatory Effects of Hesperetin in a Mouse Model of Lipopolysaccharide-Induced Acute Kidney Injury. *Molecules.* 2023; 28(6): 2759.
37. Tanaka M, Endo H, Sakusa K, Yano M. Hesperetin induces apoptosis in A549 cells via the Hsp70-mediated activation of Bax. *Int J Oncol.* 2022; 61(6):143.
38. Cheng Q, Mao L, Huang H, Tang L, Jiang H, Zhang Y, et al. Hesperetin ameliorates glioblastoma by inhibiting proliferation, inducing apoptosis, and suppressing metastasis. *Transl Cancer Res.* 2022; 11(6): 1781-1794
39. Zhang Q, Tang X, Liu Z, Song X, Peng D, Zhu W, et al. Hesperetin Prevents Bone Resorption by Inhibiting RANKL-Induced Osteoclastogenesis and Jnk Mediated Irf-3/c-Jun Activation. *Front Pharmacol.* 2018; 9:1028.
40. Liu P, Chen J, Qi J, Liu M, Zhang M, Xue Y, et al. Hesperetin ameliorates ischemia/hypoxia-induced myocardium injury via inhibition of oxidative stress, apoptosis, and regulation of Ca²⁺ homeostasis. *Phytother Res.* 2023; 37:1787–1805
41. Yu X, Liu Z, Yu Y, Qian C, Lin Y, Jin S, et al. Hesperetin promotes diabetic wound healing by inhibiting ferroptosis through the activation of SIRT3. *Phytother Res.* 2024; 38(3): 1478-1493.
42. Rock EM, Parker LA. Constituents of Cannabis Sativa. *Adv Exp Med Biol.* 2021; 1264: 1-13
43. Ahmed SA, Ross SA, Slade D, Radwan MM, Khan IA, ElSohly MA. Minor oxygenated cannabinoids from high potency Cannabis sativa L. *Phytochemistry.* 2015; 117: 194-199.
44. Castillo-Arellano J, Canseco-Alba A, Cutler SJ, León F. The Polypharmacological Effects of Cannabidiol. *Molecules.* 2023; 28(7): 3271.
45. Chesney E, Oliver D, Green A, Sovi S, Wilson J, Englund A, et al. Adverse effects of cannabidiol: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Neuropsychopharmacology.* 2020;45(11):1799-1806.
46. Kozela E, Pietr M, Juknat A, Rimmerman N, Levy R, Vogel Z. Cannabinoids Delta(9)-tetrahydrocannabinol and cannabidiol differentially inhibit the lipopolysaccharide-activated NF-kappaB and interferon-beta/STAT proinflammatory pathways in BV-2 microglial cells. *J Biol Chem.* 2010; 285(3): 1616-1626.
47. Jirasek P, Jusku A, Frankova J, Urbankova M, Diabelko D, Ruzicka F, et al. Phytocannabinoids and gingival inflammation: Preclinical findings and a placebo-controlled double-blind randomized clinical trial with cannabidiol. *J Periodontal Res.* 2024; 59(3): 468-479

48. Landucci E, Mazzantini C, Lana D, Calvani M, Magni G, Giovannini MG, et al. Cannabidiol inhibits microglia activation and mitigates neuronal damage induced by kainate in an in-vitro seizure model. *Neurobiol Dis.* 2022; 174: 105895.
49. Sacerdote P, Martucci C, Vaccani A, Bariselli F, Panerai AE, Colombo A, et al. The nonpsychoactive component of marijuana cannabidiol modulates chemotaxis and IL-10 and IL-12 production of murine macrophages both in vivo and in vitro. *J Neuroimmunol.* 2005;159(1-2): 97-105.
50. Jenny M, Schröcksnadel S, Überall F, Fuchs D. The Potential Role of Cannabinoids in Modulating Serotonergic Signaling by Their Influence on Tryptophan Metabolism. *Pharmaceuticals (Basel).* 2010; 3(8): 2647-2660.
51. Verrico CD, Wesson S, Konduri V, Hofferek CJ, Vazquez-Perez J, Blair E, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of daily cannabidiol for the treatment of canine osteoarthritis pain. *Pain.* 2020;161(9): 2191-2202.
52. Esposito G, Scuderi C, Savani C, Steardo L Jr, De Filippis D, Cottone P, et al. Cannabidiol in vivo blunts beta-amyloid induced neuroinflammation by suppressing IL-1 β and iNOS expression. *Br J Pharmacol.* 2007; 151(8): 1272-1279.
53. Rajesh M, Mukhopadhyay P, Bátkai S, Patel V, Saito K, Matsumoto S, et al. Cannabidiol attenuates cardiac dysfunction, oxidative stress, fibrosis, and inflammatory and cell death signaling pathways in diabetic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2010; 56(25): 2115-2125.
54. Hammell DC, Zhang LP, Ma F, Abshire SM, McIlwrath SL, Stinchcomb AL, et al. Transdermal cannabidiol reduces inflammation and pain-related behaviours in a rat model of arthritis. *Eur J Pain.* 2016; 20(6): 936-948.
55. Lowin T, Tingting R, Zurmahr J, Classen T, Schneider M, Pongratz G. Cannabidiol (CBD): a killer for inflammatory rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Cell Death Dis.* 2020; 11(8): 714
56. Borges RS, Batista J Jr, Viana RB, Baetas AC, Orestes E, Andrade MA, et al. Understanding the molecular aspects of tetrahydrocannabinol and cannabidiol as antioxidants. *Molecules.* 2013; 18(10): 12663-12674.
57. Dos Santos Pereira M, Maitan Santos B, Gimenez R, Guimarães FS, Raisman-Vozari R, Del Bel E, et al. The two synthetic cannabinoid compounds 4'-F-CBD and HU-910 efficiently restrain inflammatory responses of brain microglia and astrocytes. *Glia.* 2024; 72(3): 529-545.
58. Mukhopadhyay P, Rajesh M, Horváth B, Bátkai S, Park O, Tanchian G, et al. Cannabidiol protects against hepatic ischemia/reperfusion injury by attenuating inflammatory signaling and response, oxidative/nitrative stress, and cell death. *Free Radic Biol Med.* 2011; 50(10): 1368-1381.
59. Pan H, Mukhopadhyay P, Rajesh M, Patel V, Mukhopadhyay B, Gao B, et al. Cannabidiol attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity by decreasing oxidative/nitrosative stress, inflammation, and cell death. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009; 328(3): 708-714.
60. Fouad AA, Albuali WH, Al-Mulhim AS, Jresat I. Cardioprotective effect of cannabidiol in rats exposed to doxorubicin toxicity. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2013; 36(2): 347-357.
61. Costa B, Trovato AE, Comelli F, Giagnoni G, Colleoni M. The non-psychoactive cannabis constituent cannabidiol is an orally effective therapeutic agent in rat chronic inflammatory and neuropathic pain. *Eur J Pharmacol.* 2007; 556(1-3): 75-83.

62. Wang Y, Mukhopadhyay P, Cao Z, Wang H, Feng D, Haskó G, et al. Cannabidiol attenuates alcohol-induced liver steatosis, metabolic dysregulation, inflammation and neutrophil-mediated injury. *Sci Rep.* 2017; 7(1): 12064.
63. Wójcik P, Garley M, Wroński A, Jabłońska E, Skrzydlewska E. Cannabidiol Modifies the Formation of NETs in Neutrophils of Psoriatic Patients. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(18): 6795.
64. Hobbs JM, Vazquez AR, Remijan ND, Trotter RE, McMillan TV, Freedman KE, et al. Evaluation of pharmacokinetics and acute anti-inflammatory potential of two oral cannabidiol preparations in healthy adults. *Phytother Res.* 2020; 34(7): 1696-1703.
65. Napimoga MH, Benatti BB, Lima FO, Alves PM, Campos AC, Pena-Dos-Santos DR, et al. Cannabidiol decreases bone resorption by inhibiting RANK/RANKL expression and pro-inflammatory cytokines during experimental periodontitis in rats. *International Immunopharmacology.* 2009; 9(2): 216-222.
66. Kogan NM, Melamed E, Wasserman E, Raphael B, Breuer A, Stok KS, et al. Cannabidiol, a Major Non-Psychotropic Cannabis Constituent Enhances Fracture Healing and Stimulates Lysyl Hydroxylase Activity in Osteoblasts. *J Bone Miner Res.* 2015; 30(10): 1905-1913.
67. Khajuria DK, Karuppagounder V, Nowak I, Sepulveda DE, Lewis GS, et al. Cannabidiol and Cannabigerol, Nonpsychotropic Cannabinoids, as Analgesics that Effectively Manage Bone Fracture Pain and Promote Healing in Mice. *J Bone Miner Res.* 2023; 38(11): 1560-1576.
68. de Oliveira AC, Macedo AP, Shimano AC. Effects of Cannabidiol on Bone Quality in Ovariectomized Rats. *Calcif Tissue Int.* 2024; 115(5): 700-711.
69. Kongkadee K, Wisuitiprot W, Ingkaninan K, Waranuch N. Anti-inflammation and gingival wound healing activities of Cannabis sativa L. subsp. sativa (hemp) extract and cannabidiol: An in vitro study. *Arch Oral Biol.* 2022; 140: 105464.
70. Shah P, Holmes K, Chibane F, Wang P, Chagas P, Salles E, et al. Cutaneous Wound Healing and the Effects of Cannabidiol. *Int J Mol Sci.* 2024;25(13):7137.
71. Lapmanee S, Bhubhanil S, Charoenphon N, Inchan A, Bunwatcharaphansakun P, Khongkow M, et al. Cannabidiol-Loaded Lipid Nanoparticles Incorporated in Polyvinyl Alcohol and Sodium Alginate Hydrogel Scaffold for Enhancing Cell Migration and Accelerating Wound Healing. *Gels.* 2024; 10(12): 843.
72. Liu Z, Tabakman S, Welsher K, Dai H. Carbon nanotubes in biology and medicine: in vitro and in vivo detection, imaging and drug delivery. *Nano Res.* 2009; 2: 85–120.
73. Kanaze FI, Bounartzi MI, Georgarakis M, Niopas I. Pharmacokinetics of the citrus flavanone aglycones hesperetin and naringenin after single oral administration in human subjects. *Eur J Clin Nutr.* 2007; 61(4): 472–477
74. Millar SA, Stone NL, Yates AS, O'Sullivan SE Uma revisão sistemática sobre a farmacocinética do canabidiol em humanos. *Front. Pharmacol.* 2018; 9: 1365.
75. Manach C, Scalbert, A, Morand C, Rémésy C, Jiménez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition.* 2005; 81(1): 230S-242S.
76. Nielsen F, Chee S, Poulsen L, Offord-Cavin E, Rasmussen E, Frederiksen H, et al. Bioavailability is improved by enzymatic modification of citrus flavonoids. *The Journal of Nutrition.* 2006; 136(2): 404-408.
77. Zgair A, Wong J, Lee B, Mistry J, Sivak O, Wasan M, et al. Dietary fats and pharmaceutical lipid excipients increase systemic exposure to orally

- administered cannabis and cannabis-based medicines. *American Journal of Translational Research*. 2016; 8(8): 3448-3459.
78. Huestis MA. Human cannabinoid pharmacokinetics. *Chem Biodivers*. 2007; 4(8): 1770-1804.
 79. Farokhzad OC, Langer R. Impact of nanotechnology on drug delivery. *ACS Nano*. 2009; 3(1): 16-20.
 80. Liu LX, Chen J. Solubility of hesperetin in various solvents from (288.2 to 323.2) K. *J Chem Eng Data*. 2008; 53(7): 1649–1650.
 81. Jahangirian H, Lemraski EG, Webster TJ, Rafiee-Moghaddam R, Abdollahi Y. A review of drug delivery systems based on nanotechnology and green chemistry: green nanomedicine. *Int J Nanomed*. 2017; 12: 2957.
 82. Lam PL, Wong WY, Bian Z, Chui CH, Gambari R. Recent advances in green nanoparticulate systems for drug delivery: efficient delivery and safety concern. *Nanomedicine*. 2017; 12: 357–385
 83. Grifoni L, Vanti G, Donato R, Sacco C, Bilia AR. Promising Nanocarriers to Enhance Solubility and Bioavailability of Cannabidiol for a Plethora of Therapeutic Opportunities. *Molecules*. 2022; 27(18): 6070.
 84. Mason TG, Wilking JN., Meleson K, Chang CB, Graves SM. Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. 2006; 18(41): 635-666.
 85. Sabjan KB, Munawar SM, Rajendiran D, Vinoji SK, Kasinathan K. Nanoemulsion as Oral Drug Delivery - A Review. *Curr Drug Res Rev*. 2020; 12(1): 4-15.
 86. Ipar VS, Dsouza A, Devarajan PV. Enhancing Curcumin Oral Bioavailability Through Nanoformulations. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 2019; 44(4): 459-480.
 87. Fuior EV, Deleanu M, Constantinescu CA, Rebleanu D, Voicu G, Simionescu M, et al. Functional Role of VCAM-1 Targeted Flavonoid-Loaded Lipid Nanoemulsions in Reducing Endothelium Inflammation. *Pharmaceutics*. 2019; 11(8): 391.
 88. Zeng F, Wang D, Tian Y, Wang M, Liu R, Xia Z, et al. Nanoemulsion for Improving the Oral Bioavailability of Hesperetin: Formulation Optimization and Absorption Mechanism. *J Pharm Sci*. 2021;110(6):2555-2561.
 89. Mancim-Imbriani MJ, Duarte JL, Di Filippo LD, Durão LPL, Chorilli M, Palomari Spolidorio DM, et al. Formulation of a Novel Hesperetin-Loaded Nanoemulsion and Its Promising Effect on Osteogenesis. *Pharmaceutics*. 2024; 16(6): 698.
 90. Ahmed B, Rizwanullah M, Mir SR, Akhtar MS, Amin S. Development of cannabidiol nanoemulsion for direct nose to brain delivery: statistical optimization, in vitro and in vivo evaluation. *Biomed Mater*. 2022; 17(6).
 91. Provenzano R, De Caro C, Vitiello A, Izzo L, Ritieni A, Ungaro F, Quaglia F, Russo E, Miro A, d'Angelo I. Enhancing transmucosal delivery of CBD through nanoemulsion: in vitro and in vivo studies. *Drug Deliv Transl Res*. 2024; 14(6): 1648-1659.
 92. ElSohly MA, Shahzadi I, Gul W. Absorption and Bioavailability of Novel UltraShear Nanoemulsion of Cannabidiol in Rats. *Med Cannabis Cannabinoids*. 2023; 6(1): 148-159.