

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS

**Nano-CBD: Sistemas Nanoestruturados para Liberação
Controlada de Canabinoides**

Vinícius de Souza Major

SÃO CARLOS -SP
2022

Nano-CBD: Sistemas Nanoestruturados para Liberação Controlada de Canabinoides

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de São Carlos, como requisito para obtenção do título de bacharel em Engenharia de Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Caio Gomide Otoni

São Carlos-SP
2022



ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO (TCC)

NOME: Vinicius de Souza Major

RA: 727427

TÍTULO: Nano-CBD: Sistemas poliméricos nanoestruturados para liberação controlada de canabinoides

ORIENTADOR: Prof. Dr. Caio Gomide Otoni

CO-ORIENTADOR:

DATA/HORÁRIO: 13/12/2022, 10h

BANCA – NOTAS:

	Monografia	Defesa
Prof. Dr. Caio Gomide Otoni	6,0	6,0
Prof. Dr. Francys Kley Vieira Moreira	6,0	6,0
Média	6,0	6,0

BANCA – ASSINATURAS:

Prof. Dr. Caio Gomide Otoni

Prof. Dr. Francys Kley Vieira Moreira

DEDICATÓRIA

Eu dedico essa obra a minha família, em especial aos meus pais, Fabio e Regina, que acreditaram em mim e me apoiaram em meus estudos, mesmo quando não fazia sentido para eles. Dedico também aos meus professores do DEMa, em especial aos professores Bolfarini, Caio, Francys, Juliano e Murilo, por me apresentarem e/ou me apoiarem no tema de Drug Delivery Systems, e aos professores Scuracchio e Sousa por serem meus amigos.

Agradeço aos meus companheiros da República Cabañas, em especial ao Doda, por me incentivar a ir atrás de conhecimento, ao Tonhão, por me apresentar plataformas de pesquisa científica, e ao Remorso, que sempre me socorreu em momentos difíceis durante a graduação. Por fim, gostaria de dedicar esse trabalho ao falecido Dr. Elisaldo Carlini, pai da pesquisa brasileira em cannabis medicinal, e a Dra. Eliane Nunes, coordenadora da Sociedade Brasileira de Estudos da Cannabis.

AGRADECIMENTO

Gostaria de agradecer a Deus, primeiramente, por permitir que eu chegasse até aqui. Agradeço ao professor Caio, por me orientar, e ao professor Francys, por aceitar fazer parte da banca examinadora. Agradeço à UFSCar por essa oportunidade maravilhosa de estudar em um dos maiores departamentos de engenharia de materiais do mundo; à UNIFESP por ser pioneira e linha de frente em estudos relacionados à *Cannabis sativa* no Brasil; e à Sociedade Brasileira de Estudos da Cannabis por me dar coragem e suporte para desenvolver o tema.

“A Cannabis está para a medicina do século XXI como os antibióticos estiveram para a medicina do século XX: Uma grande revolução.”

Sidarta Ribeiro, 2019.

RESUMO

O desenvolvimento da nanotecnologia tem acarretado o aprimoramento de diversas ciências nas últimas décadas, sendo a engenharia de materiais a base dessa implementação através do estudo das nanoestruturas e da melhoria de um amplo espectro de propriedades físico-químicas da matéria. Com o estudo dos princípios farmacológicos da *Cannabis sativa*, levando à descoberta dos canabinoides e do sistema endocanabinoide em mamíferos, a medicina ocidental passa por uma adaptação no tratamento de diversos transtornos do século XXI. Isto possibilita a retomada de medicinas ancestrais com a aplicação de conceitos modernos, e explora, com segurança e lucidez, práticas que foram abordadas apenas de maneira mística, implementando-as com tecnologia e fundamentação científica. Nanossistemas para liberação controlada de canabinoides (e.g., micelas, nanopartículas, nanoemulsões, lipossomas e dendrímeros) unificam o conhecimento das sociedades antigas e atuais, através do uso de sistemas nanoestruturados carreadores de canabidiol (nano-CBD) fabricados por técnicas específicas (emulsificação, gelificação iônica e polimerização em miniemulsão, como exemplos) utilizando materiais biocompatíveis (e.g., polietileno glicol, poli(ácido láctico), poli(ácido acrílico), hidroxipropilmetilcelulose, a quitosana, silicatos e a ciclodextrina). À luz deste cenário, o presente trabalho oferece uma revisão de base da literatura técnico-científica e apresenta métodos de produção de sistemas nanoestruturados mais relevantes para liberação controlada de canabinoides.

Palavras-chave: Cannabis medicinal. Nanotecnologia. Nano-CBD. Sistemas de liberação controlada de Fármacos.

ABSTRACT

Nanotechnology has enhanced in many fields of knowledge in the last decades, being materials engineering the basis for implementing nanostructures and upgrading of a long list of physicochemical properties of materials. Modern medicine has been adapted on the treatment of several diseases of the 21st century with studies of the *Cannabis sativa* pharmacology that led to the discovery of cannabinoids and the endocannabinoid system in mammals, bringing back ancestral medicines with the modern concepts applying and exploring practices that used to be explained just mystically and that are now explained scientifically. Nanostructured systems developed for drug delivery systems of cannabinoids (e.g., micelles, nanoparticles, liposomes, and dendrimers) unify the knowledges of older and nowadays societies through the drug carriers applied into cannabinoids (nano-CBD) produced by specific techniques of manufacturing (emulsification, ionic gelation and miniemulsion polymerizations) using biocompatible materials (e.g. PEG, PLA, PAA, HPMC, CS, silicates and CD). Considering it, the present text offers a basement review of technical and scientific literature about most relevant methods to produce nanostructured systems to drug delivery of cannabinoids.

Keyword: Cannabidiol. Nanotechnology. Nano-CBD. Drug Delivery Systems.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Canabinoides presentes na *Cannabis sativa*. 5
- Figura 2.** Terpenos (primeira linha), flavonoides (segunda linha), estilbenoides (terceira linha) e alcaloides (quarta linha) presentes na *Cannabis sativa*. 5
- Figura 3.** Esquema de uma linha de produção genérica a partir da *Cannabis sativa*. 8
- Figura 4.** Representação de uma nanopartícula modificada pela adição de fármaco (incorporado ao núcleo e conjugado) e ligantes (anticorpos, peptídeos, aptâmeros e moléculas catiônicas), para além do PEG e da sonda fluorescente. 10
- Figura 5.** Diferentes tipos de nanoestruturas utilizadas para transporte de fármacos. (A) nanopartículas; (B) micelas; (C) dendrímeros; e (D) lipossomas. 10
- Figura 6.** Representação esquemática do processo de formação de micelas poliméricas. 11
- Figura 7.** Nanopartículas poliméricas: nanoesfera e nanocápsula. 12
- Figura 8.** Lipossomas mono (a) e multilamelar (b). 13
- Figura 9.** Evolução dos lipossomas como DDS: (A) Lipossoma fosfolipídico convencional com fármaco hidrofílico (a) incorporado no seu interior aquoso e fármaco hidrofóbico (b) incorporado na membrana lipossomal; (B) Imunolipossoma com anticorpo ligado covalentemente aos fosfolípidos da membrana ou ligado hidrofobicamente na membrana lipossomal após modificações com um grupo hidrofóbico; (C) Lipossoma com um polímero protetor, como PEG, que promove um aumento do tempo de circulação na corrente sanguínea e protege a superfície do lipossoma da interação com proteínas opsonizantes; (D) Imunolipossoma de longa circulação, simultaneamente, com polímero protetor e anticorpo, em que este último pode ser ligado à superfície do lipossoma ou, de preferência, à extremidade distal da cadeia polimérica inserida. (E) Nova geração de lipossomas, em que a superfície pode ser modificada (separadamente ou simultaneamente) de diferentes formas: adição de um polímero protetor (e.g., PEG) ou adição de um polímero protetor juntamente com um ligando específico para determinado alvo; incorporação de um marcador de diagnóstico; incorporação de lípidios com carga positiva que permitem a complexação com o DNA, que apresenta carga negativa; incorporação de lípidios sensíveis a estímulos, como temperatura e pH; adição de polímeros que respondem a estímulos; adição de peptídeos que favorecem a penetração nas células; incorporação de componentes virais. 14
- Figura 10.** Dendrímero de quatro gerações utilizado para transporte de fármacos. 16
- Figura 11.** Esquema dos principais modos de desintegração dos dendrímeros: (a) Clivagem supramolecular; (b) Clivagem covalente; e (c) Combinação das clivagens covalente e

supramolecular.	17
Figura 12. Mapa de composição da formulação sob concentração de surfactante constante.	19
Figura 13. Esquema de um misturador rotor-estator e um moinho coloidal.	23
Figura 14. Esquema de uma válvula de alta pressão e um microfluidizador.	23
Figura 15. Esquema das tecnologias de sonda ultrassônica e jato ultrassônico.	24
Figura 16. Esquema do processo de emulsificação por membrana.	24
Figura 17. Esquema da formação de nanoesfera através da desprotonação da solução de quitosana (acima) e da formação de nanocápsula através de reticulações iônicas entre as moléculas de quitosana em solução e moléculas ionizadas de TPP (abaixo).	25
Figura 18. Produtos canábicos em cápsula, tintura e tópico.	32
Figura 19. Balas de goma canábicas.	32
Figura 20. Supositório canábico.	32

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
	1.1 PERSPECTIVA HISTÓRICA DA <i>Cannabis sativa</i>	1
	1.2 FARMACOLOGIA DA <i>Cannabis sativa</i>	4
	1.2.1 Métodos de Extração, Separação e Purificação, e Identificação de Compostos Canábicos	6
2	SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS (DDS)	9
	2.1 NANOESTRUTURAS	10
	2.1.1 Micelas	11
	2.1.2 Nanopartículas	12
	2.1.3 Lipossomas	13
	2.1.4 Dendrímeros	15
	2.2 PROCESSAMENTOS DE DDS	18
	2.2.1 Método PIT	19
	2.2.2 Emulsificação Espontânea	20
	2.2.3 Método PIC	21
	2.2.4 Emulsificação por Rotor-Estator e Bombas Hidráulicas	22
	2.2.5 Ultrassonificação	23
	2.2.6 Emulsificação por Membranas	24
	2.2.7 Gelificação Iônica	25
	2.2.8 Polimerização por Miniemulsões	25
3	NANO-CBD	27
	3.1 ÓLEOS, SPRAYS E TINTURAS	30
	3.2 TÓPICOS	30
	3.3 CÁPSULAS	31
	3.4 OUTROS	31
4	CONCLUSÕES/CONSIDERAÇÕES FINAIS	33
	REFERÊNCIAS	35

1 INTRODUÇÃO

1.1 PERSPECTIVA HISTÓRICA DA *Cannabis sativa*

O Brasil e a planta *Cannabis Sativa* L. estão conectados desde a chegada das caravelas portuguesas à nova terra em 1500, onde as velas e o cordame de tais embarcações eram feitas com fibra de cânhamo, um dos vários nomes da planta (Carlini, 2006). Segundo documento oficial do governo brasileiro (Ministério das Relações Exteriores, 1959):

Citação direta: “A planta teria sido introduzida em nosso país, a partir de 1549, pelos negros escravos, como alude Pedro Corrêa, e as sementes de cânhamo eram trazidas em bonecas de pano, amarradas nas pontas das tangas” (Pedro Rosado, 1959, alud. Carlini, 2006, p. 1).

No século XVIII, há o incentivo da coroa portuguesa na cultura da cannabis, devido ao interesse da metrópole no mercado de cânhamo. O uso recreativo da maconha ganha popularidade ao longo dos anos, disseminando-se entre os negros escravos e os índios brasileiros, chegando a atingir pessoas da alta classe, como a rainha Carlota Joaquina, esposa do Rei D. João VI. (Carlini, 2006).

Em outubro de 1830, é introduzido ao código criminal, pela Câmara Municipal do Rio de Janeiro a chamada Lei do Pito do Pango, sendo o Brasil o primeiro país a incitar o movimento proibicionista moderno, até hoje vigente (Barros & Peres, 2011).

A partir da segunda metade do século XIX, começam a ser produzidos relatos médicos a respeito da maconha que, apesar de citarem seu uso para tratamento de diversas doenças, eram também incumbidos de grande preocupação quanto ao uso recreativo, sendo relatado como um prazer vicioso (Carlini, 2006; Ministério da Saúde, 1958). Ainda sim, a maconha era comercializada em farmácias na forma de cigarros, sendo já conhecidos extratos mais rudimentares da planta, como o haxixe, o charas e o kief (Carlini, 2006; Lucena, 1958).

No início do século XX, propaga-se o movimento proibicionista moderno no contexto global, onde em 1924, durante a II Conferência Internacional do Ópio, realizada pela Liga das Nações Unidas, os representantes egípcios e brasileiros passam a descrever a *Cannabis sativa* como uma planta tão perigosa quanto o ópio, com potencial de letalidade tão grande quanto os opioides. Apesar de não haver relatos de mortes relacionadas ao uso da maconha, e de já haver relatos da inofensividade de seu uso, ainda que excessivo, os países membros não

contestaram as afirmações por virem de países cujo uso de derivados da planta era considerado endêmico (Carlini, 2006; Kendell, 2003). Durante este congresso, foi apresentada a lei brasileira nº4.296 de 6 de julho de 1921, que menciona o haxixe. A partir de tal evento, conseguiu-se a proibição da venda de maconha e a intensificação da repressão sobre os usuários e contrabandistas da mesma (Carlini, 2006). Nas décadas posteriores, diversos estados brasileiros passam a caçar usuários de maconha, em prol do extermínio completo do vício (Carlini, 2006). Durante as décadas de 30 e 40 há publicações de diversos estudos médicos a respeito da *Cannabis sativa*, porém, poucos estudos pautados na metodologia científica. Apesar de alguns pesquisadores ainda relatarem do uso do haxixe para tratamento de doenças, são atribuídos a estes estudos relatos de malefícios causados pela maconha, sem as descrições do histórico do paciente, do contexto ou das experimentações nas quais os usuários eram submetidos (Carlini, 2010; Ministério da Saúde, 1958). A legislação Federal começa a proibir diversas condutas relacionadas à *Cannabis sativa* tendo, por muitas vezes, apoio internacional, através do contexto de guerra às drogas, considerando que a maconha estaria categorizada juntamente com a heroína pela OMS, conceito que foi implementado ao longo das diversas conferências sobre drogas organizadas pela ONU, se consagrando em 1971, com a postura do presidente Nixon de combate à maconha assim como às outras drogas ilícitas (Carlini, 2006; Barros & Peres, 2011; Downs, 2016).

Mesmo no contexto proibicionista, pesquisas importantes para o avanço da cannabis medicinal foram desenvolvidas na segunda metade do século XX (Carlini, 2010). Na década de 60, José Ribeiro do Valle inicia estudos sobre os efeitos do haxixe pautados na metodologia científica na Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), juntamente com um grupo de alunos, dentre os quais Elisaldo Carlini, futuro doutor (Carlini, 2010). Em 1964, o Dr. Raphael Mechoulam, em Israel, isola o Δ 9-tetrahydrocannabinol (Δ 9-THC), o canabidiol (CBD) e o canabinol (CBN) do haxixe, tratando-os como principais compostos ativos da *Cannabis sativa* (Gaoni & Mechoulam, 1964). Em 1973, foi fundado o Departamento de Psicobiologia na UNIFESP, dirigido pelo Dr. Elisaldo Carlini e, a partir deste ano, foram publicados 57 trabalhos relacionados à *Cannabis sativa*, sendo 42 destes em revistas internacionais, contando com a colaboração de grupos israelenses de química, com participação do Dr. Mechoulam, e grupos alemães de química, trazendo a tona os aspectos medicinais da planta (Carlini,

2010). Em 1988, é descoberto o sistema endocanabinoide, grupo de receptores de canabinoides no cérebro de ratos (Devane et. al., 1988). Em 1992, um grupo liderado pelo Dr. Raphael Mechoulam isola a anandamida, neuroconstituente endógeno responsável pelo estímulo dos receptores de canabinoides no corpo humano (Devane et. al., 1992). A partir desse momento são realizados diversos estudos sobre o sistema endocanabinoide e seus componentes, trazendo diversos avanços em relação à cannabis medicinal (Nunes, 2019).

Em 1996 inicia-se a ascensão da indústria moderna da *Cannabis sativa* com a aprovação do uso medicinal da planta no estado da Califórnia, nos Estados Unidos da América (Major, Fernandes & Donato, 2022).

No Brasil, a cannabis medicinal ganha visibilidade em 2014, com o caso da menina Anny Fischer, portadora CDKL5, uma doença genética rara que tem como sintoma a encefalopatia epilética infantil precoce tipo 2 (EIEE2), e cuja mãe, Kat Fischer, processa o Congresso Nacional, ganhando o direito à importação de canabidiol. Este episódio disparou uma série de resoluções legais que permitem a comercialização de produtos à base de cannabis no país (Major, Fernandes & Donato, 2022; Formiga, 2015).

Em 2017, começa a produção nacional, com aspectos legais, de cannabis medicinal com a liminar obtida pela Associação Brasileira de Apoio Cannabis Esperança (ABRACE), em João Pessoa, na Paraíba. Esta liminar permitiu que a organização cultivasse a *Cannabis sativa* para extração e fabricação de tinturas, como é conhecido a classe de medicamentos veiculados por óleos (Resende, 2019; ABRACE Esperança, 2022). A partir da regulamentação da ABRACE, diversas outras associações passam a se regulamentar com o intuito de acolhimento ao paciente, educação sobre *Cannabis sativa* e produção de cannabis medicinal no país, dentre elas o projeto Mulheres e Mães Jardineiras (MMJ), a Sociedade Brasileira de Estudos da Cannabis (SBEC) e a APEPI (MMJ, 2022; SBEC, 2022; APEPI, 2022).

Em 2020, a Prati-Donaduzzi, em parceria com a Universidade de São Paulo (USP) de Ribeirão Preto, é a primeira empresa do país a produzir o canabidiol isolado (Prati-Donaduzzi, 2021).

Atualmente, a ANVISA permite que as pessoas jurídicas fabriquem e comercializem de produtos à base de cannabis no Brasil, sob certas restrições, tendo mais de 300 produtos a base de cannabis regulamentados no mercado legal

do país, sendo mais de 60 produtos produzidos por organizações não-governamentais (associações) nacionais e 18 produtos de empresas com produção nacional (Major, Fernandes & Donato, 2022; ANVISA, 2022).

Com a ascensão da indústria moderna da *Cannabis sativa*, são criados diversos processos de fabricação e produtos canábicos utilizando nanotecnologia, sendo este o objeto de estudos da engenharia de materiais.

De acordo com o BDSA, estima-se que as vendas de cannabis legal movimentaram mais de US\$29 bilhões pelo mundo, em 2021, sendo mais de US\$23 bilhões atrelados ao mercado dos EUA, aproximadamente US\$3,8 bilhões ao mercado canadense e US\$1,5 bilhões a outros mercados (BDSA Cannabis Data Company, 2022). O Google Patents tem mais de 61 mil patentes relacionadas à palavra cannabis registradas (Major, Fernandes & Donato, 2022).

1.2 FARMACOLOGIA DA *Cannabis sativa*

A *Cannabis sativa* tem sido utilizada por milhares de anos como um remédio no alívio de dores e convulsões. Como demonstrado nas figuras 1 e 2, contém aproximadamente 540 componentes naturais, incluindo mais de 100 canabinoides (i.e., compostos encontrados na planta que atuam em neurorreceptores do sistema endocanabinoide, responsável pelo controle termogênico no corpo de diversos mamíferos), sendo os principais o Δ^9 -THC e o CBD (Amin & Ali, 2019).

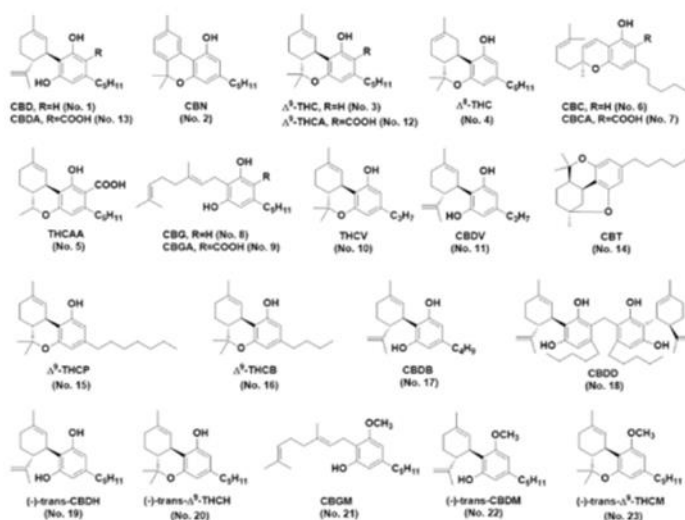


Figura 1. Canabinoides presentes na *Cannabis sativa* (Liu et al. 2022).

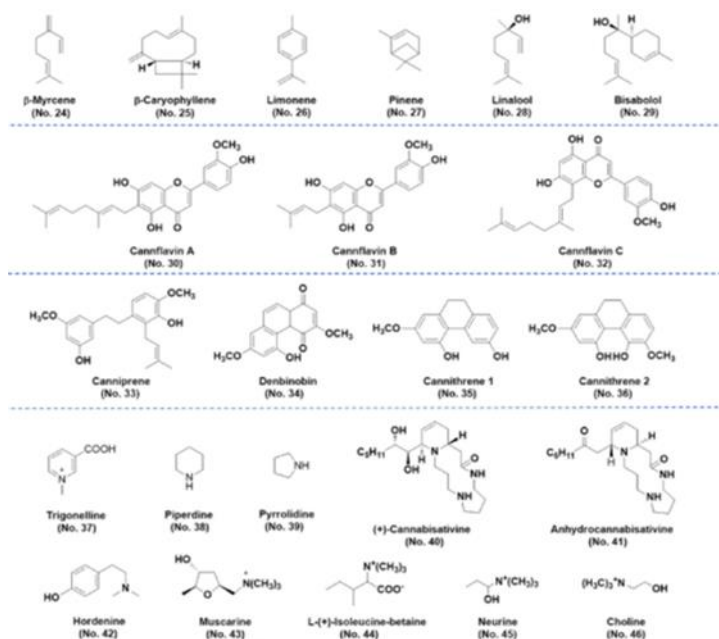


Figura 2. Terpenos (primeira linha), flavonoides (segunda linha), estilbenoides (terceira linha) e alcaloides (quarta linha) presentes na *Cannabis sativa* (Liu et al. 2022).

Atualmente, é reconhecida a eficácia dos canabinoides no tratamento de doenças e disfunções de naturezas neurológica, psiquiátrica e metabólicas, como a ansiedade, o autismo, os cânceres, a diabetes, as dores crônicas, os quadros inflamatórios, a epilepsia, a fibromialgia, a insônia, o mal de Alzheimer, o mal de Parkinson, transtornos pós-traumáticos e compulsivos. (Sholler et al., 2020).

Existem diversos métodos para extração de compostos da planta (Major, Fernandes & Donato, 2022), como a extração em fluido supercrítico com CO₂ (do inglês: SFE-CO₂) aplicado nas flores, para extração de canabinoides e terpenos, podendo ou não se utilizar de álcoois para aumentar o rendimento (Rovetto & Aieta, 2017). O extrato obtido é utilizado para confecção de medicamentos à base de cannabis, conhecidos comercialmente como canabidiol, e podendo estes ser caracterizados como Full Spectrum (contém Δ^9 -THC, CBD e outros canabinoides), Broad Spectrum (contém CBD e outros canabinoides que não o THC) e o CBD isolado (Major, Fernandes & Donato, 2022). Devido à natureza lipofílica dos canabinoides, é necessária a utilização de um óleo ou gordura como veículo, sendo comum o uso de óleo de soja, óleo de milho, óleo de girassol, óleo de coco, azeite de oliva, triglicérideo de cadeia média (MCT) e até o próprio óleo de sementes de cannabis (Nunes, 2019; Söpper, Hoffmann e Daniels, 2021). Apesar de ser comum o uso somente de óleos e gorduras como veículos para a ingestão de canabinoides,

sua absorção através da pele é baixa, desperdiçando o princípio ativo. Ademais, sua administração por outras mucosas é ruim (Millar et. al., 2020), acarretando efeitos colaterais nos pacientes que utilizam óleos pela via oral, como náusea e condições de psicoatividade (Ribeiro, 2020).

Existem diversas classes de medicamentos administrados pela via oral, parenteral e transdérmica contendo canabinoides, a saber: óleos; sprays; tinturas; cápsulas; comestíveis (gomas e balas); tópicos; e supositórios (TerraCannabis, 2022). Sprays, tinturas e óleos são os produtos à base de cannabis predominantes no mercado brasileiro (ABRACE, 2022; APEPI, 2022; Prati-Donaduzzi, 2022; TerraCannabis, 2022). O Epidiolex (spray de CBD isolado) e o Sativex (tintura full spectrum, 1:1 THC:CBD), são produzidos pela GW Pharmaceutical, comercializados no mundo inteiro, com alto grau de aceitabilidade entre os pacientes devido a aplicação de DDS (Ramalho et. al., 2017; Millar et. al., 2020). Blendas poliméricas e copolímeros compostos por polietileno glicol (PEG), poli(ácido láctico) (PLGA), hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), poli(ácido acrílico) (PAA), ciclodextrina (CD), policaprolactona (PCL) e quitosana (CS) são utilizados na confecção de nanocanabidiol (nano-CBD) (Munjal et. al., 2006; Martín-Banderas et. al., 2014; Ramalho et. al., 2017; Söpper, Hoffmann e Daniels, 2021).

1.2.1 Métodos de Extração, Separação e Purificação, e Identificação de Compostos Canábicos

O texto dessa seção foi retirado do pôster “Prospecção da Cannabis Medicinal no Mercado Brasileiro: Produtos, Métodos de Produção, Uso & Propriedade Industrial (PI)” (Major, Fernandes & Donato, 2022), apresentado no Congresso Brasileiro da Cannabis Sativa, em Salvador, e disponível na Revista Brasileira de Cannabis (Sociedade Brasileira de Estudos da Cannabis, 2022).

São estipulados diversos métodos para obtenção e caracterização dos compostos canábicos, como mostra a figura 3, sendo estes divididos em três grandes grupos: Métodos de Extração; Métodos de Separação e Purificação; e Métodos de Identificação (Liu et. al, 2022).

Os métodos de extração são: Extração com microondas (do inglês: MAE); Extração com ultrassom (do inglês: UAE); Extração pressurizada à frio (do inglês: CPE); Extração em fluido supercrítico (do inglês: SFE); Extração em líquido pressurizado (do inglês: PLE); Extração enzimática (do inglês: EAE); Extração com

campo elétrico pulsante (do inglês: PEF); Extração com solventes eutéticos profundos (do inglês: DESE); Extração por dinâmica metaestável sólido-líquido (do inglês: RSLDE); Destilação por microondas (do inglês: MD); Extração Hidroalcolica (do inglês: HAE) (Liu et. al, 2022).

Os métodos de separação e purificação são: Extração de fase sólida (do inglês: SPE); Cromatografia de separação centrifugada (do inglês: CPC); Cromatografia líquida de alta performance preparatória (do inglês: Prep-HPLC); Cromatografia de nano-líquidos (do inglês: Nano-LC); Cromatografia líquida de interações hidrofílicas (do inglês: HILIC) (Liu et. Al, 2022).

E os métodos de identificação de compostos são: Cromatografia em camada delgada (do inglês: TLC); Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (do inglês: GC-MS); Cromatografia líquida de alta performance acoplada à espectrometria de massas (do inglês: HPLC-MS); Cromatografia de fluido supercrítico acoplada à espectrometria de massas (do inglês: SFC-MS); Ressonância magnética nuclear (do inglês: NMR) (Liu et. al, 2022).

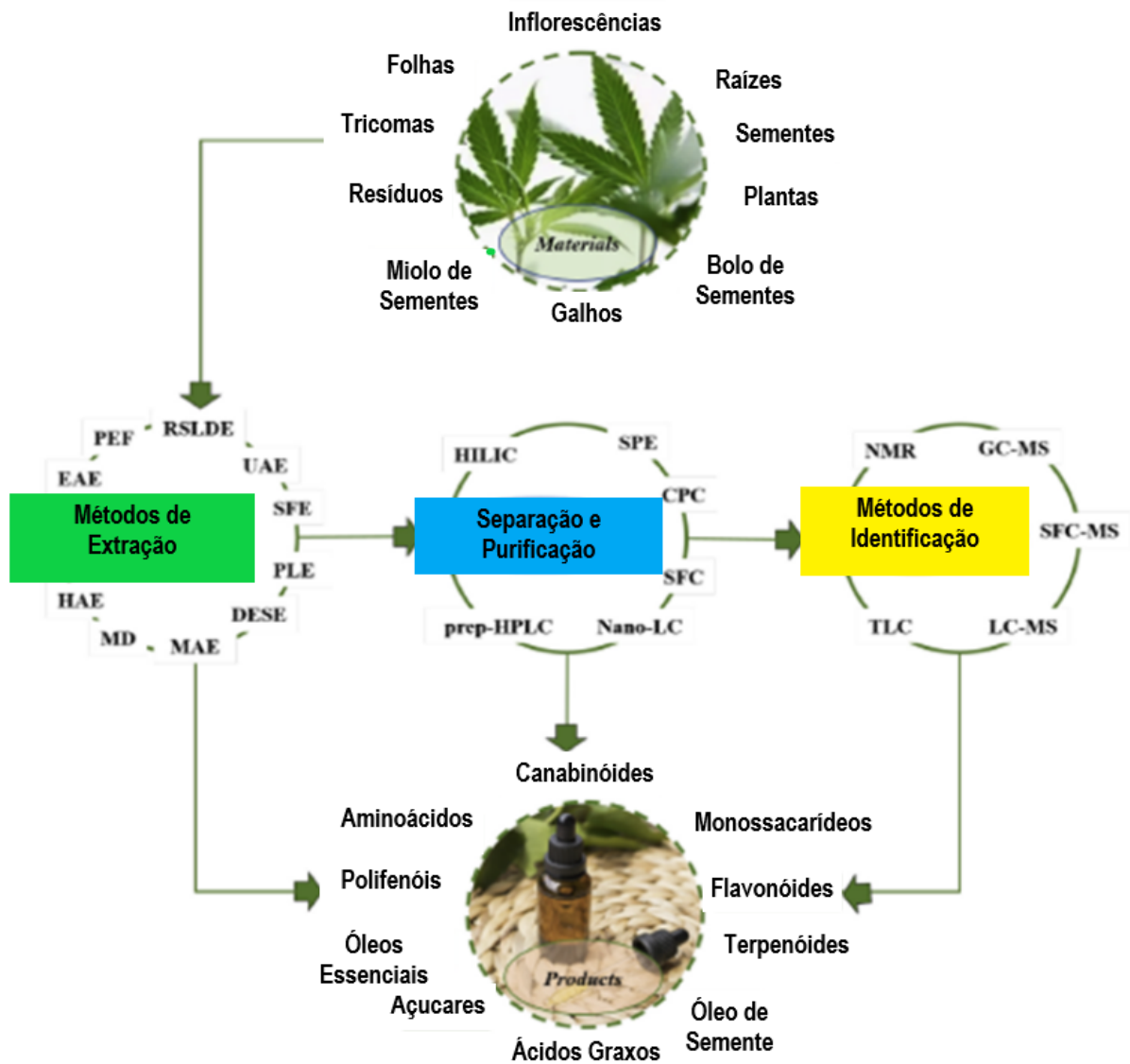


Figura 3. Esquema de uma linha de produção genérica a partir da *Cannabis sativa* (Major et. al, 2022).

Selecionam-se os métodos de produção de acordo com a matéria-prima que se tem e com o produto que deseja-se obter (Liu et. al, 2022).

2. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS (DDS)

Com o avanço da nanotecnologia, sistemas de liberação controlada de fármacos (DDS – Drug Delivery Systems) foram desenvolvidos para permitir uma melhor bioadministração dentro do corpo humano (Miranda, 2014).

Os DDS se baseiam em sistemas coloidais (Wolfram, 1977; Ohshima & Makino, 2014), definidos pelo Compendium of Chemical Terminology Gold Book como sendo sistemas nos quais as moléculas dispersas em um meio tenham, pelo menos, uma dimensão entre 1-1000 nm (IUPAC, 2012). Tais sistemas compreendem emulsões, aerossóis, géis, dentre outras classes, podendo algumas das dimensões serem de poucos micrometros e ainda sim representarem coloides (IUPAC, 2012).

Os componentes de DDS têm funções específicas classificadas de acordo com a sua atuação na bioadministração do fármaco no corpo humano, sendo estas: (1) Função Reservatório (FR); (2) Função de Carregamento (FC); (3) Função de Liberação Controlada (FLC).

A primeira função (FR), é responsável pelo isolamento do fármaco em relação aos órgãos e tecidos do corpo humano, sendo o componente que exerce tal função decomposto com uma taxa controlada, assim administrando o tempo necessário para que a substância médico-farmacêutica seja expelida pelo organismo. A segunda função (FC) é responsável por encaminhar o princípio ativo até o órgão ou tecido alvo dentro do corpo humano, sendo necessário que o componente possua composição química cujo metabolismo humano reconheça e permita o transporte o fármaco até o local de atuação. A terceira função (FLC) é responsável pela administração do princípio ativo na célula - ou tecido - alvo, sendo necessário que o nanossistema se decomponha, altere suas propriedades químicas ou mude de forma de acordo com as condições do meio (temperatura, pressão, pH e atuação enzimática) específicas no órgão alvo, permitindo a atuação direta da substância médico-farmacêutica somente em seu sítio de atuação.

Para controlar a atuação *in vivo* dos nanossistemas, são efetuadas modificações em suas estruturas, como demonstrado na Figura 4. Isto permite que o fármaco incorporado tenha maior tempo de circulação na corrente sanguínea, acesso a sistemas específicos do corpo humano, atividade rastreável por mecanismos eletromagnéticos e efeito potencializado pela ação conjunta de

múltiplos princípios ativos, podendo ser metabolizado por órgãos previamente selecionados (com condições específicas de pH e ação enzimática) (Miranda, 2014).

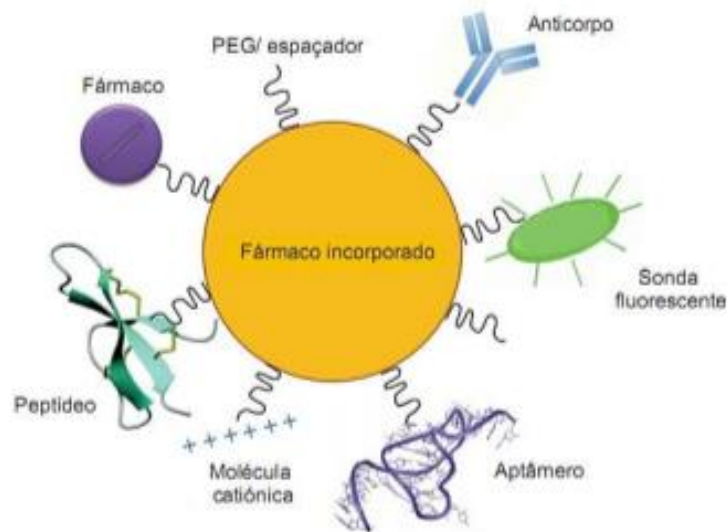


Figura 4. Representação de uma nanopartícula modificada pela adição de fármaco (incorporado ao núcleo e conjugado) e ligantes (anticorpos, peptídeos, aptâmeros e moléculas catiônicas), para além do PEG e da sonda fluorescente (Masserini, 2013).

2.1. NANOESTRUTURAS

Como demonstrado na Figura 5, os nanossistemas podem ser divididos em quatro grandes grupos: micelas, nanopartículas, lipossomas e dendrímeros.

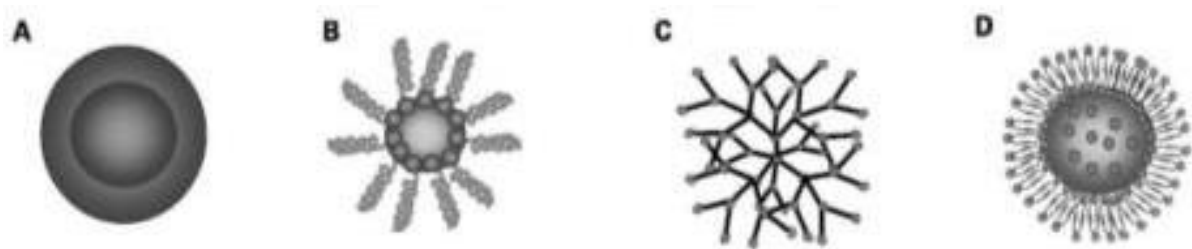


Figura 5. Diferentes tipos de nanoestruturas utilizadas para transporte de fármacos. (A) nanopartículas, (B) micelas, (C) dendrímeros e (D) lipossomas (Miranda, 2014).

Cada um desses grupos apresenta vantagens e limitações relativas à entrega de fármacos no organismo, descritas a seguir.

2.1.1. Micelas: são sistemas coloidais análogos às emulsões simples (Jafari & McClements, 2018). Utilizadas no transporte de proteínas, material genético e fármacos hidrofóbicos, as micelas são nanoestruturas formadas por copolímeros anfifílicos em bloco (como o PLGA, o PCL-co-PEG e outros poliésteres PEGuilados) e agentes tensoativos orgânicos (como monoglicerídeos). Ao atingirem a concentração micelar crítica (CMC), em meio aquoso, se auto-organizam em agregados poliméricos (Figura 6), podendo ser adicionadas pequenas quantidades de fase orgânica ou óleo para incorporação na estrutura, variando seu diâmetro entre 10 e 100 nm (Miranda, 2014; Jafari & McClements, 2018). Seu tamanho e o processo de micelização dependem de fatores como a massa molar dos copolímeros, a proporção entre o número de segmentos hidrofílicos e hidrofóbicos, o tamanho da porção hidrofóbica, a concentração dos compostos anfifílicos, a temperatura e o solvente (Mourya et. al., 2010; Hussein & Pitt, 2008).

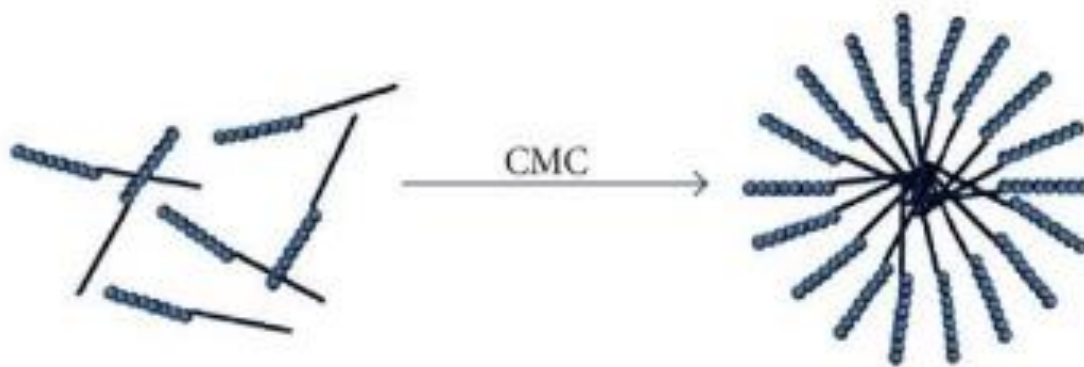


Figura 6. Representação esquemática do processo de formação de micelas poliméricas (Andrade et. al., 2011).

Quando em água, o núcleo das micelas apresenta elevada capacidade para encapsular compostos hidrofóbicos, enquanto sua superfície estabiliza (estabilidade cinética) o sistema. Isto facilita a circulação de tais medicamentos na corrente sanguínea e exerce bem a segunda função dos DDSs (FC) para fármacos de composição hidrofóbica (Francis et. al., 2004; Hussein & Pitt, 2008). Com isso, melhoram a biodisponibilidade pela via oral e por outras mucosas (Francis et. al., 2004). Devido à sua estrutura reversível, sensível a variações de temperatura, pressão, concentração e pH, este é um nanossistema que apresenta curtos

períodos de metabolização e excreção no sistema circulatório, também podendo ser utilizado para aplicações pela via intravenosa (Mourya et. al., 2010).

2.1.2. Nanopartículas: São sistemas coloidais compostos por partículas sólidas dispersas (IUPAC, 2012; Jafari & McClements, 2018), com tamanho de partícula compreendido entre 10 e 1000 nm, compostas por polímeros naturais ou sintéticos, estes podendo ser copolímeros, atuando como FC e/ou FLC (Rawat et. al., 2006; Neha et. al., 2013). São divididas em nanoesferas e nanocápsulas (Schaffazick et. al., 2003). As nanoesferas são sistemas formados por matrizes poliméricas densas, onde o fármaco é distribuído de forma homogênea ao longo de toda a estrutura (como ilustrado na Figura 7), sendo liberado no organismo através de um mecanismo de difusão (Steichen et. al., 2013; Modi et. al., 2010). As nanocápsulas são sistemas de carregamento com um núcleo líquido, normalmente lipofílico, onde a substância médico-farmacêutica está diluída, envolvida por uma membrana polimérica (como ilustrado na Figura 7) (Steichen et. al., 2013; Modi et. al., 2010).

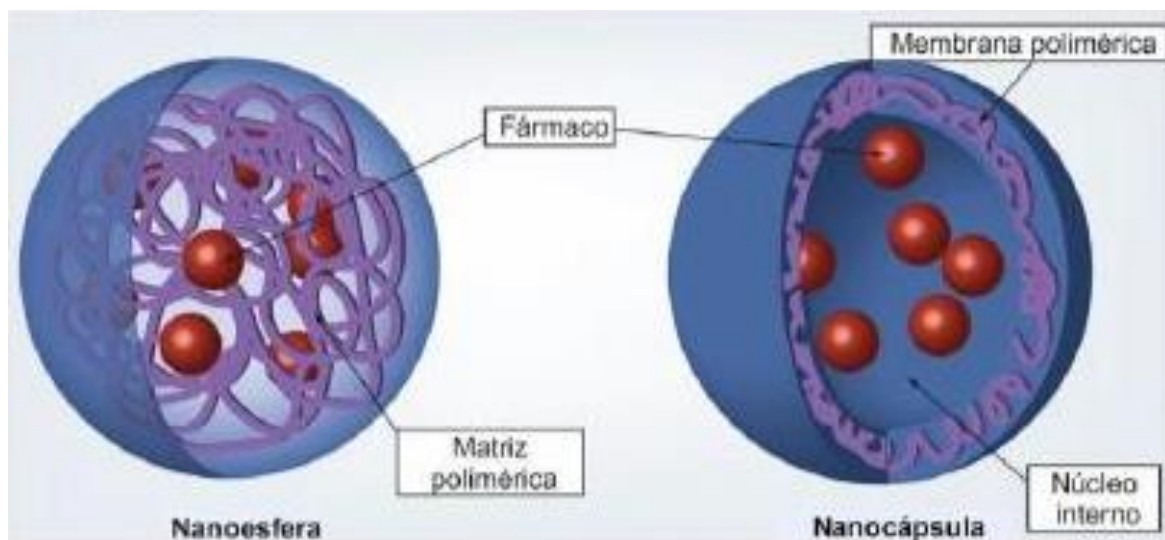


Figura 7. Nanopartículas poliméricas: nanoesfera e nanocápsula (Bei, Meng & Youan, 2010).

Tais sistemas podem ser preparados diretamente durante a síntese da nanoestrutura, realizada juntamente com a incorporação do fármaco, ou através da precipitação de polímeros pré-formados em soluções com a substância médico-

farmacêutica. Sua preparação se dá pela utilização de um polímero, de um ou de vários solventes, de um não-solvente, de um ou mais agentes tensoativos (polimérico ou não), e, no caso das nanocapsulas, de um óleo ou veículo (Miranda, 2014).

2.1.3. Lipossomas: São sistemas coloidais análogos às emulsões múltiplas (Jafari & McClements, 2018). Estrutura pertencente à primeira geração de nanossistemas para liberação controlada de fármacos, os lipossomas são vesículas esféricas compostas por uma – ou múltiplas – bicamada(s) lipídica(s), que envolve(m) um compartimento interno aquoso (como ilustrado na Figura 8), de tal forma que o diâmetro total varie entre 25 e 5000 nm, dependendo das dimensões da vesícula e do número de bicamadas lipídicas (Miranda, 2014).

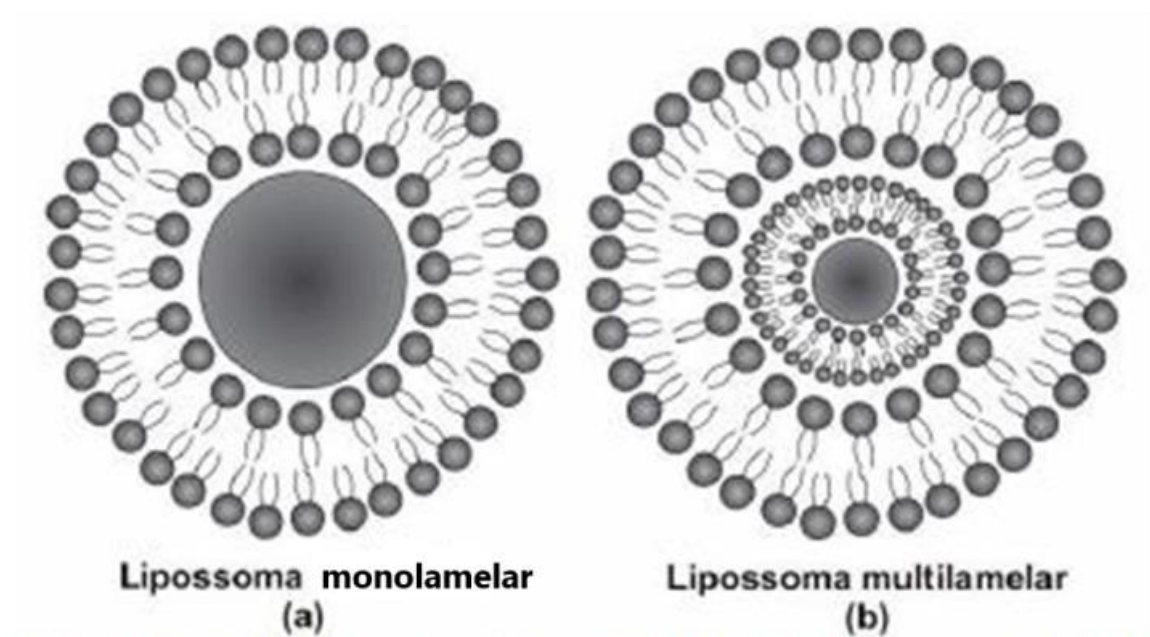


Figura 8. Lipossomas mono (a) e multilamelar (b) (Spuch & Navarro, 2011).

São categorizados de acordo com seu tamanho e número de lamelas: SUV, quando o lipossoma tem apenas uma bicamada lipídica e tamanho compreendido entre 25 e 100 nm; LUV, quando o lipossoma tem apenas uma bicamada lipídica e o tamanho compreendido entre 200 e 800 nm; e MLV, quando tem múltiplas bicamadas lipídicas e tamanho compreendido entre 500 e 5000 nm (Spuch & Navarro, 2011). Quanto maior o diâmetro da vesícula, mais rápida é sua captura e excreção pelo organismo. Substâncias hidrofílicas são incorporadas no compartimento interno aquoso. Substâncias hidrofóbicas são inseridas ou

adsorvidas nas bicamadas lipídicas. A porcentagem de encapsulamento do fármaco varia de acordo com o método de produção do lipossoma e com a proporção núcleo-casca (Φ_s) (Vemuri & Rhodes, 1995; Sharma & Sharma, 1997; McClements, 2018). Apesar de vesículas apresentarem diversidade em relação aos lipídios constituintes da bicamada, o uso de fosfolipídios com a presença de colesterol em suas formulações é recorrente, apresentando uma forte interação em sítios específicos do corpo e estabilidade na corrente sanguínea (Batista et. al., 2007; Masserini, 2013). As vesículas podem sofrer mudanças estruturais, apresentando agentes ligantes e modificações na bicamada lipídica, vide Figura 9 (Spuch & Navarro, 2011; Masserini, 2013). Devido a essas mudanças, há três classes: lipossomas catiônicos, onde há uma forte interação entre a carga positiva da bicamada lipídica e a carga negativa do material genético (fragmentos de DNA ou RNA) a ser transportado; imunolipossomas, onde o agente ligante é um anticorpo monoclonal; e virossoma, onde o agente ligante é um envelope viral (Miranda, 2014).

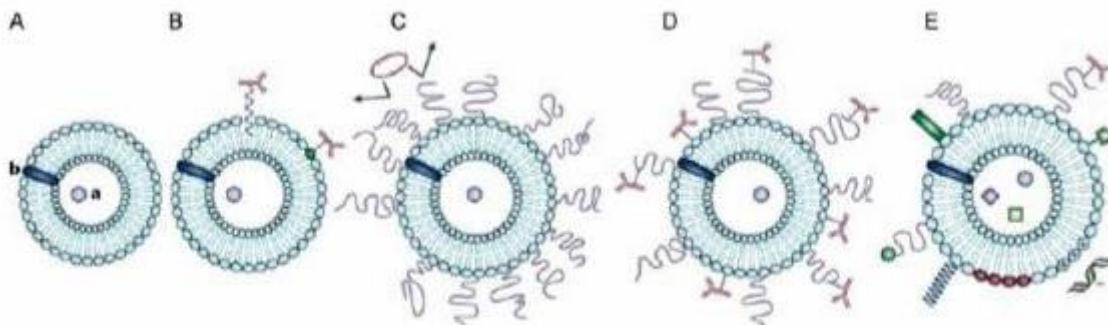


Figura 9. Evolução dos lipossomas como DDS: (A) Lipossoma fosfolipídico convencional com fármaco hidrofílico (a) incorporado no seu interior aquoso e fármaco hidrofóbico (b) incorporado na membrana lipossomal; (B) Imunolipossoma com anticorpo ligado covalentemente aos fosfolipídios da membrana ou por interação hidrofóbica na membrana lipossomal após modificações com um grupo lipofílico; (C) Lipossoma com um polímero protetor, como PEG, que promove um aumento do tempo de circulação na corrente sanguínea e protege a superfície do lipossoma da interação com proteínas opsonizantes; (D) Imunolipossoma de longa circulação, simultaneamente, com polímero protetor e anticorpo, em que este último pode ser ligado à superfície do lipossoma ou, de preferência, à extremidade distal da cadeia polimérica inserida. (E) Nova geração de lipossomas, em que a superfície

pode ser modificada (separada ou simultaneamente) de diferentes formas: adição de um polímero protetor (e.g., PEG) ou adição de um polímero protetor juntamente com um ligando específico para determinado alvo; incorporação de um marcador de diagnóstico; incorporação de lipídios com carga positiva que permitem a complexação com o DNA, que apresenta carga negativa; incorporação de lipídios sensíveis a estímulos, como temperatura e pH; adição de polímeros que respondem a estímulos; adição de peptídeos que favorecem a penetração nas células; incorporação de componentes virais (Miranda, 2014).

A estrutura lipossômica com fosfolipídios, colesterol e os devidos ligantes é sensível a alterações no pH e na temperatura. Por apresentar semelhanças com as estruturas celulares presentes em seres humanos, exerce com louvor a segunda (FC) e a terceira (FLC) funções nos DDSs.

2.1.4. Dendrímeros: Estruturas altamente ramificadas, com diâmetro entre 3 e 10 nm, capazes de aprisionar substâncias médico-farmacêuticas dentro da macromolécula que compõe essa estrutura e incorporar fármacos e grupos químicos em sua superfície na forma de agentes ligantes, como ilustrado na Figura 10 (Miranda, 2014).

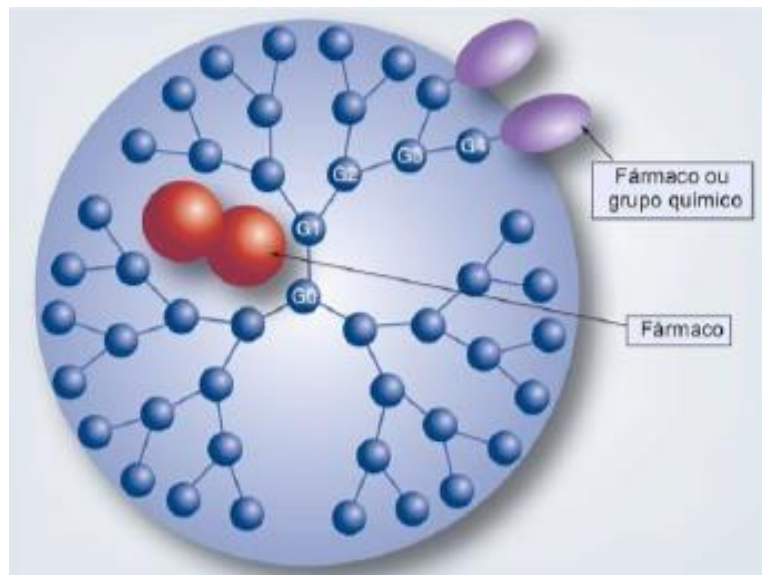


Figura 10. Dendrímero de quatro gerações utilizado para transporte de fármacos (Bei, Meng & Youan, 2010).

Os dendrímeros são formados a partir de polímeros com grupos funcionais contendo oxigênio e nitrogênio (como éteres, amidas, ésteres e uretanos), sendo estes grupos polares e com propriedades que permitem a clivagem das cadeias poliméricas, possibilitando um mecanismo de retenção de fármacos no interior da estrutura com abertura de caminhos para a liberação dos mesmos de acordo com as interações químicas do meio em que se encontram (D'Emanuelle & Attwood, 2005). Há três possibilidades de desintegração dos dendrímeros, como demonstrados na Figura 11, durante a entrega de fármacos, a saber: clivagem supramolecular; clivagem covalente; e combinação da clivagem covalente com a clivagem supramolecular (Gringas, Raimundo & Chabre, 2007).

Os dendrímeros são sintetizados em torno de um átomo central, podendo ser estruturados através de um método de síntese divergente ou convergente. Na síntese divergente, monômeros são adicionados ao grupo central, fazendo com que a cadeia polimérica cresça através de gerações (como demonstrado na Figura 10) formadas por grupos com ramificações que apresentam disjunções binárias. A síntese divergente forma camadas concêntricas radiais com diâmetro proporcional ao número de gerações presentes na estrutura, sendo que, a cada geração adicionada na estrutura, o raio da partícula aumenta em até 1 nm. Na síntese convergente, ocorre uma pré-sinterização, formando cadeias poliméricas ramificadas que, ao atingirem o tamanho desejado, são ligadas a um átomo central, formando assim uma estrutura radial altamente ramificada. Por permitir produtos com menor número de defeitos e maior homogeneidade estrutural, a síntese divergente é preferencial à síntese convergente (Esfand & Tomalia, 2001; Miranda, 2014).

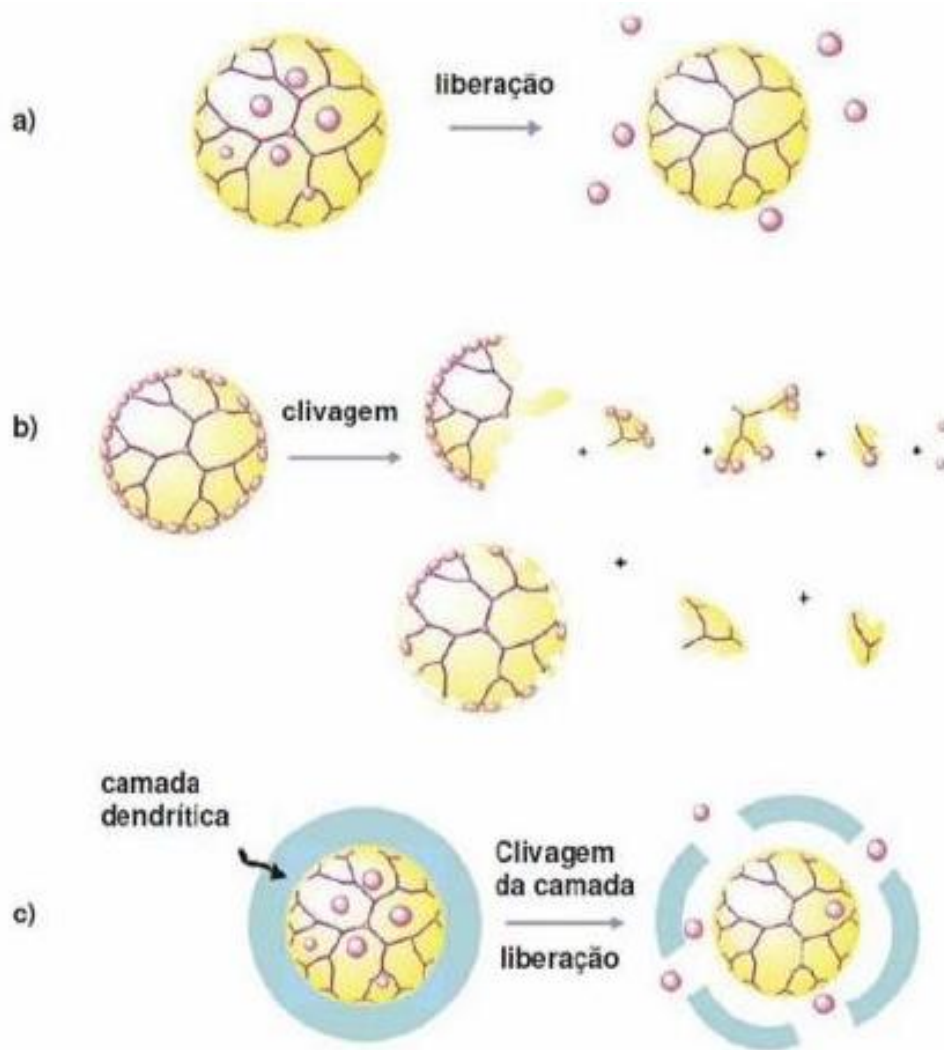


Figura 11. Esquema ilustrativo dos principais modos de desintegração dos dendrímeros: (a) Clivagem supramolecular; (b) Clivagem covalente; e (c) Combinação das clivagens covalente e supramolecular (Gringas, Raimundo & Chabre, 2007).

2.2. PROCESSAMENTO DE DDS

Devido à natureza lipofílica dos canabinoides e orgânica dos materiais aplicados em DDS, os métodos de processamentos para nano-CBD se baseiam, predominantemente, em métodos de fabricação de nanoemulsões, sendo necessário para sua realização uma solução aquosa, pelo menos um componente lipídico e um agente tensoativo, além dos princípios ativos de interesse farmacológico (Jafari & McClements, 2018, Liu et. al., 2022). É preferível a síntese

de fármacos através dos métodos de baixa energia (método PIT e emulsificação espontânea); porém, devido à dificuldade na produção em escala industrial através de tais métodos, também são aplicados métodos de nanoemulsificação de alta energia (Jafari & McClements, 2018).

Os métodos de baixa energia são baseados no conceito universal da formação de nanoemulsões, normalmente através da inversão de fases (fenômeno físico-químico que ocorre tanto de maneira transicional, formando emulsões simples, quanto de maneira catastrófica, formando emulsões múltiplas, como demonstrado na Figura 12). De acordo com a composição do surfactante, a temperatura, a composição do óleo, o pH da solução aquosa, e a ordenação na adição de elementos e proporção da mistura, tem-se a inversão de fases de maneira transicional ou catastrófica (Jafari & McClements, 2018).

A inversão de fases transicional é preferível e ocorre quando, dada uma mistura óleo, água e surfactante estável, modifica-se o valor do fator de desvio hidrofílico-lipofílico (do inglês: HLD) do surfactante, de tal forma que a mistura atravessa a fronteira de inversão (Figura 12). O HLD é calculado com base na energia livre de Gibbs de um surfactante diluído em uma mistura de fases (SAD), para uma determinada temperatura, e é dado pela seguinte equação: $HLD = (SAD - SAD_{ref})/RT$; sendo SAD a energia da mistura considerada; SAD_{ref} a energia de uma mistura referencial, com distribuição de fases lamelar (onde a fase contínua e a fase dispersa se dispõem em forma de lamelas); R a constante dos gases ideais; e T a temperatura. O valor do fator HLD pode ser modificado de três formas: através da mudança na composição química do surfactante ou do óleo; através da temperatura; através da mudança de pH da solução aquosa (Jafari & McClements, 2018).

A inversão de fases catastrófica acontece quando há mudança na proporção entre óleo e água na mistura de tal forma que a mesma atravessa a fronteira de inversão de fases de maneira entrópica e desordenada, como demonstrado na Figura 12 (Jafari & McClements, 2018).

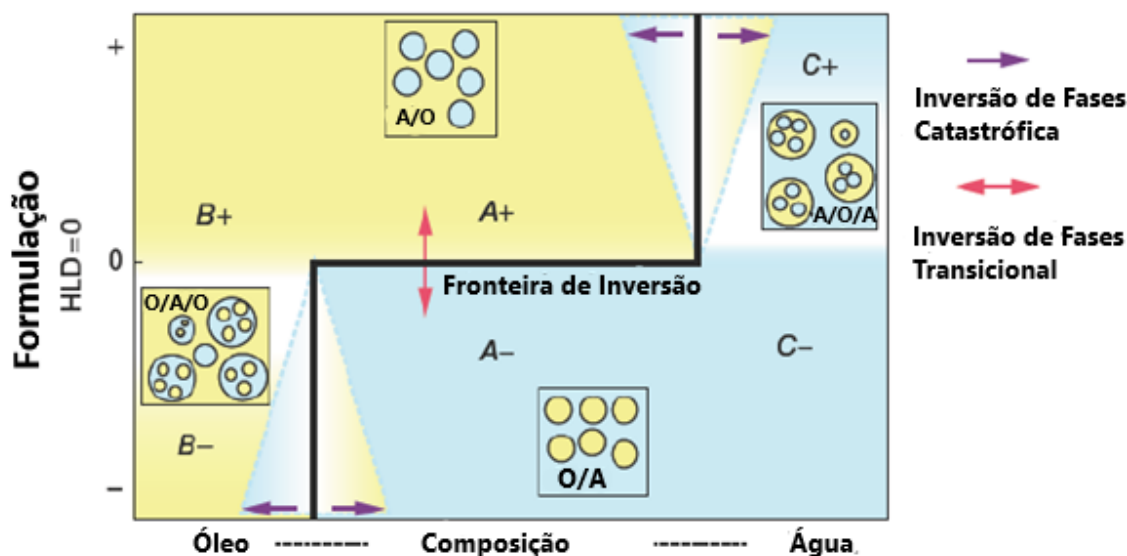


Figura 12. Mapa de composição da formulação sob concentração de surfactante constante (Jafari & McClements, 2018).

2.2.1 Método PIT: considerando surfactantes não iônicos e a não adição de agentes iônicos (como sais e princípios ativos ionizados), o método da temperatura de inversão de fases (do inglês: PIT) é um método eficiente para produção de nanoemulsões, realizado pela alteração na temperatura da mistura. Dada uma mistura entre um composto anfifílico de natureza não iônica (como surfactantes de PEG) e água (ou óleo), em proporções que permitam a formação de aglomerados (i.e. micelas), há uma temperatura mínima (ou máxima), conhecida como temperatura de névoa (T_{cp}), na qual o composto anfifílico forma aglomerados homogeneamente distribuídos sobre toda a fase contínua. Acima (ou abaixo) de T_{cp} , os aglomerados tendem a coalescer, na intenção de formar uma única fase contínua, separando a mistura em duas fases contínuas. Abaixo (ou acima) desta T_{cp} , há a solubilização total desse composto em água (ou óleo). Em uma mistura de surfactante, água e óleo, há uma temperatura, entre a T_{cp} do surfactante em óleo ($T_{cp\alpha}$) e a T_{cp} do surfactante em água ($T_{cp\beta}$), onde as afinidades químicas do surfactante pelo óleo e pela água são iguais (ou seja, geram forças de interação molecular de igual intensidade pelos dois meios, formando assim um sistema de divisão de fases lamelar), conhecida como PIT. A PIT ocorre devido à diminuição das interações eletromagnéticas entre os átomos com o aumento da temperatura

(diminuindo assim as interações entre os dipolos presentes no surfactante e a água), sendo definida como a temperatura onde a condutividade de uma dada mistura é igual à metade da condutividade máxima da mesma. Em temperaturas maiores que a PIT, o surfactante é mais lipofílico que hidrofílico, favorecendo emulsões simples de água em óleo, ou emulsões múltiplas de água em óleo em água. Em temperaturas menores que a PIT, o surfactante é mais hidrofílico que lipofílico, favorecendo emulsões simples de óleo em água, ou emulsões múltiplas de óleo em água em óleo. Para a realização do método PIT, prepara-se uma mistura de óleo em água (ou água em óleo), eleva-se (ou abaixa-se) a temperatura até um ponto superior (ou inferior) a T_{cp} , e, depois, resfria-se (ou aquece-se) a mistura até pouco abaixo (ou pouco acima) da PIT, mantendo-a até formação das nanoestruturas. Utiliza-se, então, estabilizadores para manter a estrutura formada (como espessantes e agentes estabilizadores de pressão) (Jafari & McClements, 2018). É possível a formação de micelas, lipossomas e nanopartículas por esse método (Miranda, 2014; Jafari & McClements, 2018).

2.2.2 Emulsificação Espontânea: abrange um conjunto de métodos para formação de nanoemulsões pautado simplesmente na mistura de dois componentes imiscíveis utilizando surfactantes (de qualquer natureza), cossolventes, e/ou agentes estabilizadores de pressão com composição pré-definida e temperatura constante. Pelo conceito universal, dois líquidos imiscíveis em contato tendem a formar dispersões em uma fase contínua, antes de atingirem o equilíbrio termodinâmico (seja este através da separação de fases ou sistemas de microemulsões). A cinética da mistura para o alcance do equilíbrio depende da tensão interfacial entre as fases contínua e dispersa, da pressão (e outros elementos termomecânicos) aplicada no sistema e da energia livre de Gibbs associada à diferença de área superficial entre a fase dispersa e uma única fase contínua da mesma composição. Devido às propriedades físico-químicas (viscosidade, solubilidade e afinidade química) dos elementos presentes na mistura, formam-se emulsões de dimensão nanométrica de maneira espontânea, superando a pressão de Laplace do sistema sem a necessidade de aplicação de altos níveis energéticos para dispersão dos coloides. Com o tamanho nanométrico das dispersões, os elementos da macromecânica (como a gravidade) pouco afetam a fase dispersa, e a

presença de surfactantes, espessantes e agentes estabilizadores de pressão, impede a coalescência e o envelhecimento de Ostwald, mantendo assim as nanoemulsões estáveis cineticamente por longos períodos. Considerando que o equilíbrio metaestável entre fases é mantido por uma cinética lenta de reação, trata-se de um método que só pode ser aplicado em misturas restritas: com baixas razões volumétricas entre fase dispersa e fase contínua; com altas concentrações de surfactantes (maiores que CMC); razão de viscosidade entre fase dispersa e fase contínua menor que 4; e baixa concentração iônica. É um método preferencialmente utilizado para mistura de água em óleo, considerando uma termodinâmica favorável para formação de microemulsões devido à razão entre as viscosidades dos meios disperso e contínuo menor que 1; porém, também abrangendo metodologias para emulsões de O/A com viscosidades semelhantes entre as fases contínua e dispersa, e pode ser aplicado para formação de sistemas complexos como emulsões múltiplas de água/óleo/água (Jafari & McClements, 2018). É possível a formação de micelas, lipossomas e nanopartículas por esse método (Miranda, 2014; Jafari & McClements, 2018). O método PIC é um exemplo de emulsificação espontânea.

2.2.3 Método PIC: a inversão de fases por composição (do inglês: PIC) é realizada através da diluição de um dado sistema surfactante/óleo (ou surfactante/água) em água (ou em óleo). O sistema surfactante/óleo é preparado através da mistura entre surfactante e óleo em um solvente orgânico, seguido pela evaporação do solvente, formando assim esferas, cilindros, cubos ou lamelas (de acordo com fator de empacotamento crítico do surfactante) de óleo revestidas por surfactante. Logo após, dilui-se o sistema em água, podendo ou não conter princípios ativos hidrofílicos e modificadores de superfície (como PEG, RNA, agentes ionizantes e etc.), sob agitação branda, formando uma mistura com emulsões múltiplas. Apesar da formação de emulsões múltiplas, trata-se um processo de realização mais simples que o método PIT, sendo mais utilizado pelas indústrias. Através desse método, são formadas micelas, lamelas e nanopartículas com as mais diversas aplicações médico-farmacêuticas (Miranda, 2014; Jafari & McClements, 2018).

Os métodos de alta energia para formação de nanoemulsões se baseiam na aplicação de energia mecânica em sistemas termodinamicamente estáveis de líquidos insolúveis, de tal forma que se quebram as barreiras termodinâmicas (como a energia livre de Gibbs e a pressão de Laplace), criando assim sistemas coloidais de natureza termodinâmica instável. Porém, devido à aplicação de surfactantes e outros mecanismos de estabilização, apresentam cinética de transformação lenta, garantindo a metaestabilidade das estruturas durante sua aplicação (Jafari & McClements, 2018).

2.2.4 Emulsificação por rotor-estator e bombas hidráulicas: método de produção de nanoemulsões considerado para misturas com alta viscosidade e/ou fração volumétrica da fase dispersa. Consiste na aplicação de um misturador rotor-estator ou um moinho coloidal, como demonstrados na Figura 13, tecnologias que utilizam o rotor como fonte de energia cinética em sistemas de fase líquida, seguida pela aplicação de métodos de pressurização com bombas hidráulicas (válvulas de alta pressão ou microfluidizadores, como demonstrados na Figura 14), para redução e homogeneização das dimensões nas nanoemulsões. O misturador rotor-estator utiliza os mecanismos de Laminação Viscosa, de Turbulência Inercial e de Turbulência Viscosa para fragmentação de emulsões, formando assim partículas de tamanho nanométrico. O moinho coloidal utiliza o mecanismo de Laminação Viscosa para fragmentação de emulsões. Os métodos de pressurização com bombas hidráulicas utilizam mecanismos de Turbulência Inercial, Turbulência Viscosa e Cavitação para redução e homogeneização no tamanho das nanoemulsões (Jafari & McClements, 2018).

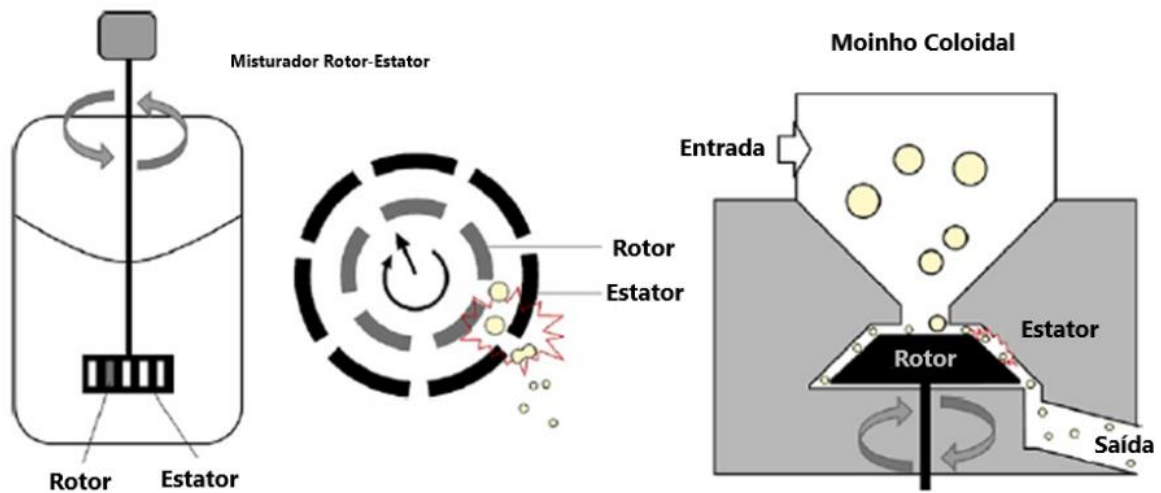


Figura 13. Esquema de um misturador rotor-estator e um moinho coloidal (Jafari & McClements, 2018).

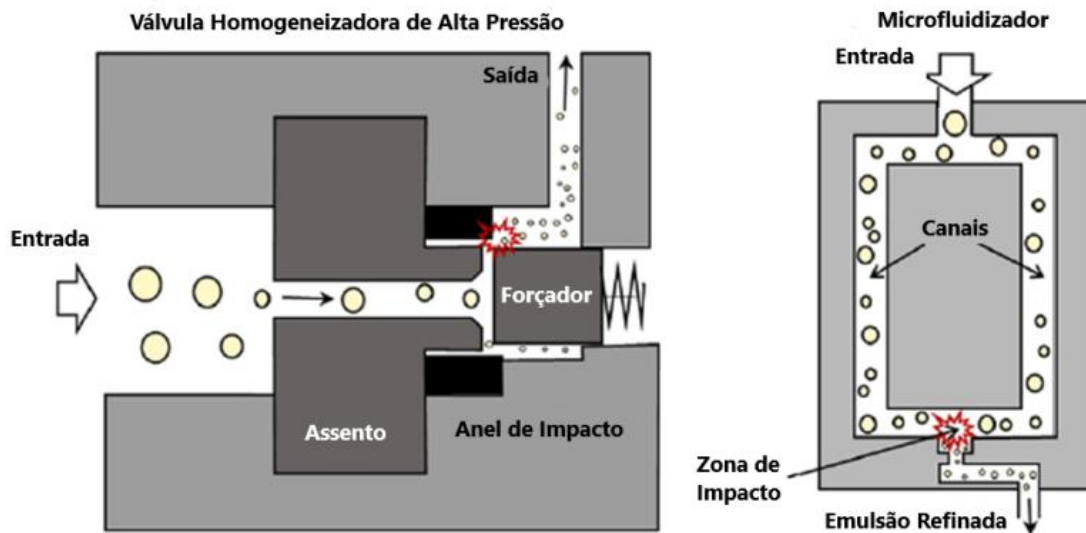


Figura 14. Esquema de uma válvula de alta pressão e um microfluidizador (Jafari & McClements, 2018).

2.2.5 Ultrassonicação: é um método de fabricação de nanoemulsões utilizado para misturas com baixa viscosidade e/ou baixa fração volumétrica da fase dispersa. Consiste na aplicação de tecnologias de ultrassom na mistura, como demonstrado na Figura 15, fragmentando as emulsões através de mecanismos de cavitação (Jafari & McClements, 2018).

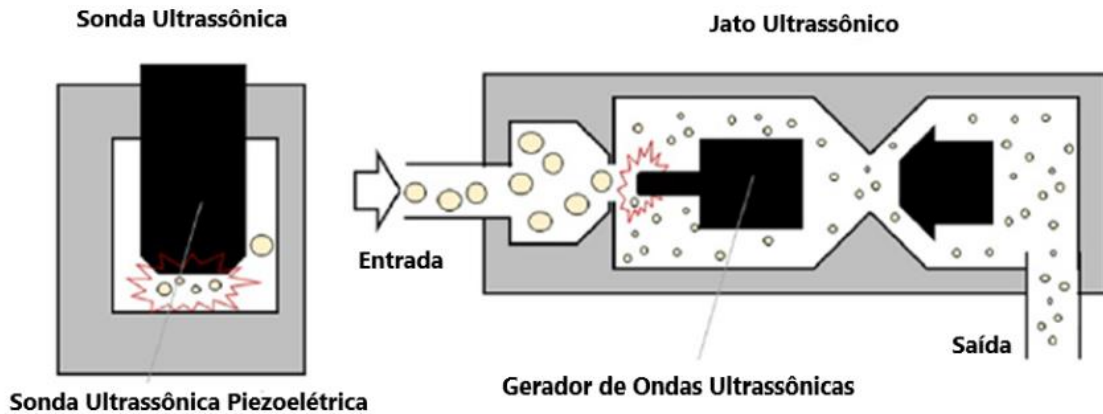


Figura 15. Esquema das tecnologias de sonda ultrassônica e jato ultrassônico (Jafari & McClements, 2018).

2.2.6 Emulsificação por Membrana: é um método de fabricação de nanoemulsões utilizado para misturas com baixa viscosidade e/ou baixa fração volumétrica da fase dispersa. Consiste na pressurização da fase dispersa (ou mistura) através de uma membrana de poros nanométricos, com fluxo laminar de fase contínua entre duas membranas. Ao atravessar os poros da membrana, a fase dispersa sofre um processo similar a laminação viscosa, reduzindo o tamanho da emulsão. É uma técnica recente (da década de 80) e empregada para fabricação de lipossomas monolamelares (Sharma & Sharma, 1997; Jafari & McClements, 2018).

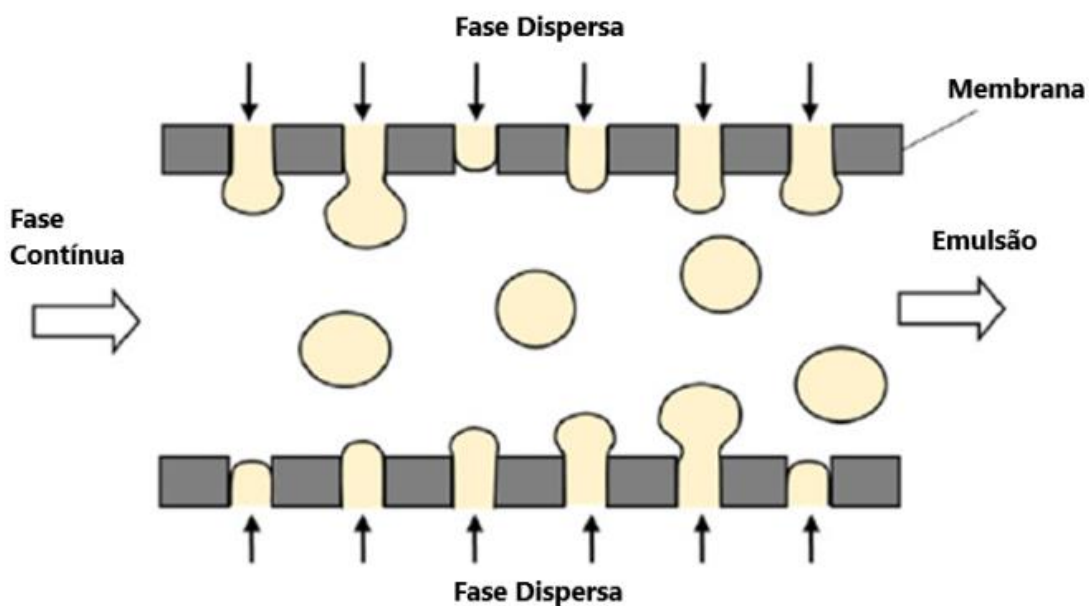


Figura 16. Esquema do processo de emulsificação por membrana (Jafari & McClements, 2018).

Apesar das nanoemulsões serem sistemas coloidais práticos para DDSs, há um grande interesse pelos nano-CBD na forma gelificada, considerando a aplicação do canabidiol para doenças de pele e pela farmacocinética favorável pela via transdérmica (Vanti et. al., 2021; Casiraghi et. al., 2020).

2.2.7 Gelificação Iônica: Método de produção de nanopartículas que utiliza pelo menos um polímero iônico ou ionizável, tradicionalmente polissacarídeos como a quitosana e seus copolímeros, em solução aquosa juntamente com o princípio ativo de interesse em uma mistura dispersa. Através da desprotonação ou de reticulações iônicas, obtêm-se nanoestruturas sólidas, como nanocapsulas e nanoesferas, como demonstradas na Figura 17 (Calvo et. al., 1997; Ribeiro et. al., 2020; Parhi, 2020).

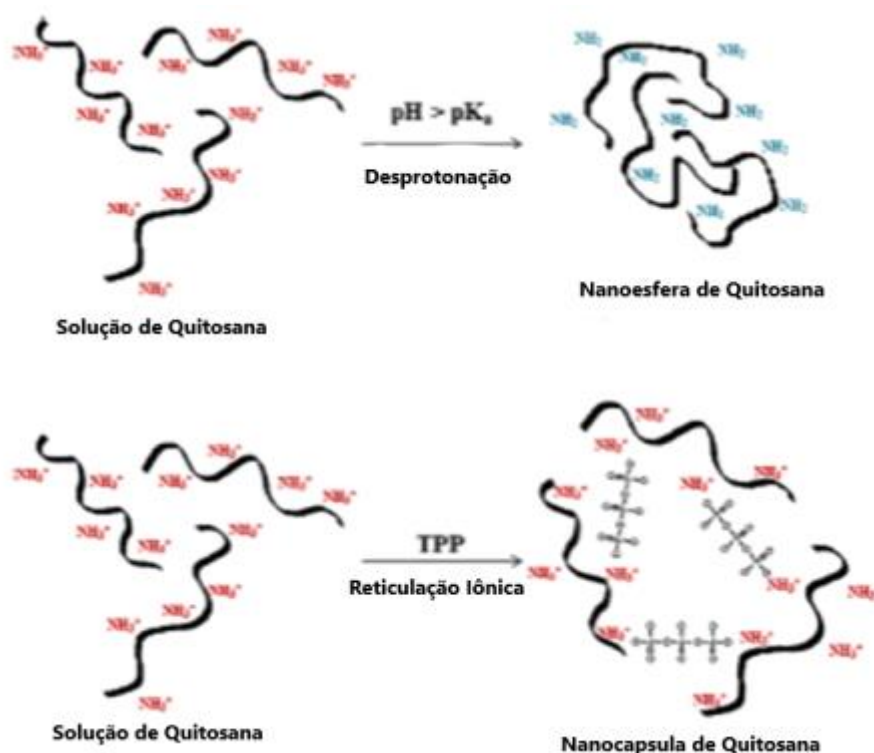


Figura 17. Esquema da formação de nanoesfera através da desprotonação da solução de quitosana (acima) e da formação de nanocápsula através de reticulações iônicas entre as moléculas de quitosana em solução e moléculas ionizadas de TPP (abaixo) (Ribeiro et. al., 2020).

2.2.8 Polimerização por Miniemulsões: apesar de ser um processo complexo, é possível a polimerização de monômeros e oligômeros em conjunto com o processo de nanoemulsificação, sendo uma possibilidade na síntese de nanoesferas e dendrímeros (Boas, Christensen & Heehard, 2006; Abbasi et. al., 2014; Jafari & McClements, 2018). O mecanismo de realização de tais polimerizações é semelhante ao de polimerização por emulsões (onde um monômero apolar é dissolvido em um meio polar através da utilização de surfactantes, formando micelas carregadas com monômeros que, ao entrarem em contato com um iniciador, promovem a polimerização dentro das emulsões); Porém, devido à maior instabilidade termodinâmica do sistema, é necessária a aplicação das técnicas de nanoemulsificação somadas a agentes de estabilização especiais desenvolvidos para redução de efeitos da pressão osmótica (Canevarolo, 2017; Jafari & McClements, 2018). Tais agentes são moléculas orgânicas com baixa massa molar, baixa afinidade com a fase contínua e alta solubilidade monomérica. Por questões de processamento, a polimerização por emulsões ocorre em misturas de óleo em água, porém, devido às dimensões nanométricas das emulsões formadas em processos de nanoemulsificação, a polimerização por miniemulsões também ocorre em misturas de água em óleo, sendo conhecidas como polimerizações direta (O/A) e inversa (A/O) (Jafari & McClements, 2018). A confecção de nanoesferas pode ser aplicada em qualquer uma das polimerizações, de acordo com a solubilidade do monômero utilizado (Jafari & McClements, 2018). A confecção de dendrímeros envolve monômeros com grupos orgânicos polares, sendo preferível sua síntese através de A/O (Miranda, 2014; Jafari & McClements, 2018). É comum a utilização de hexadecano e álcool cetílico como agentes de estabilização osmótica em reações de polimerização direta. Para a polimerização inversa, são aplicados sais orgânicos e açúcares (Jafari & McClements, 2018). No caso de sistemas de DDS, é necessária a aplicação de componentes de síntese com baixa toxicidade; sendo assim, estudos com solventes eutéticos profundos têm sido realizados para substituição de sais orgânicos na síntese de medicamentos à base de cannabis (Choi et. al., 2011; Dai et. al., 2013; Křížek et. al., 2018, Cai et. al., 2019).

3 Nano-CBD

Nanocanabidiol (ou nano-CBD) é o nome dado aos produtos canábicos com aplicação de nanotecnologia, existindo em todas as classes de produtos à base de cannabis (Stanger, 2021). A produção de nano-CBD é predominantemente industrial, porém, há técnicas, como os métodos de nanoemulsificação de baixa energia, que permitem a confecção de produtos artesanais com nanotecnologia aplicada, agregando valor aos produtos e aumentando a aceitabilidade dos mesmos entre os clientes, quando comparados a produtos canábicos de baixa tecnologia (Leo, 2020; Millar et. al., 2020; Sloat, Sandoval & West, 2021). A tabela a seguir demonstra alguns métodos de produção de nano-CBD obtidos através das patentes “CANNABIS NANOEMULSION METHODS” (Leo, 2020), “COMPOSITIONS FOR THE DELIVERY OF THERAPEUTIC AGENTS AND METHODS OF USE AND MAKING THEREOF” (Sloat, Sandoval & West, 2021) e “CANNABINOID AND CAFFEINE EMULSIFICATIONS” (Silver, 2017).

Método de Extração	Método de Separação e Purificação	Método de Processamento	Veículo	Agente Tensoativo	Tamanho Médio de Partícula
Fluido supercrítico sem utilização de cossolvente	Nenhum	Válvula Homogeneizadora de Alta Pressão ou Microfluidizador;	MCT, óleo de coco, azeite de oliva, óleo de girassol ou óleo de sementes de cannabis.	Lecitina Surfactantes de PEG Polissacarídeos diversos (quitosana, goma xantam, glicerol, sorbitol, ciclodextrina, etc.)	< 1,0 µm para aplicação única do método de processamento; ≤ 0,2 µm para múltiplas aplicações

Tabela 1. Métodos de produção industrial de nano-CBD (parte I).

Método de Extração	Método de Separação e Purificação	Métodos de Processamento	Veículos	Agente Tensoativo	Tamanho Médio de Partícula
Fluido supercrítico sem utilização de cossolvente	Nenhum	Válvula Homogeneizadora de Alta Pressão ou Microfluidizador, com Utilização de Membrana	MCT, óleo de coco, azeite de oliva, óleo de girassol e óleo de sementes de cannabis.	Lecitina Surfactantes de PEG Polissacarídeos diversos (quitosana, goma xantam, glicerol, sorbitol, ciclodextrina, etc.)	$\leq 0,15 \mu\text{m}$
Fluido Supercrítico Com Utilização De Água Como Cossolvente e Secagem por Microondas	Nenhum; Separação de Fase Sólida; Cromatografia de Partição Centrifugada; Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Preparatória	Válvula Homogeneizadora de Alta Pressão ou Microfluidizador	MCT, óleo de coco, azeite de oliva, óleo de girassol e óleo de sementes de cannabis.	Lecitina Surfactantes de PEG Polissacarídeos diversos (quitosana, goma xantam, glicerol, sorbitol, ciclodextrina, etc.)	< 1,0 μm para aplicação única do método de processamento; $\leq 0,2 \mu\text{m}$ para múltiplas aplicações
Fluido Supercrítico Com Utilização De Água Como Cossolvente e Secagem por Microondas	Nenhum; Separação de Fase Sólida; Cromatografia de Partição Centrifugada; Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Preparatória	Válvula Homogeneizadora de Alta Pressão ou Microfluidizador, com Utilização de Membrana	MCT, óleo de coco, azeite de oliva, óleo de girassol e óleo de sementes de cannabis.	Lecitina Surfactantes de PEG Polissacarídeos diversos (quitosana, goma xantam, glicerol, sorbitol, ciclodextrina, etc.)	$\leq 0,15 \mu\text{m}$
Fluido Supercrítico Com Utilização De Cossolvente Orgânico e Secagem por Microondas	Nenhum; Separação de Fase Sólida; Cromatografia de Partição Centrifugada; Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Preparatória	Válvula Homogeneizadora de Alta Pressão ou Microfluidizador	MCT, óleo de coco, azeite de oliva, óleo de girassol e óleo de sementes de cannabis.	Lecitina Surfactantes de PEG Polissacarídeos diversos (quitosana, goma xantam, glicerol, sorbitol, ciclodextrina, etc.)	< 1,0 μm para aplicação única do método de processamento; $\leq 0,2 \mu\text{m}$ para múltiplas aplicações

Tabela I. Métodos de produção industrial de nano-CBD (parte II).

Método de Extração	Método de Separação e Purificação	Métodos de Processamento	Veículos	Agente Tensoativo	Tamanho Médio de Partícula
Fluido Supercrítico Com Utilização De Cossolvente Orgânico e Secagem por Microondas	Nenhum; Separação de Fase Sólida; Cromatografia de Partição Centrifugada; Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Preparatória	Válvula Homogeneizadora de Alta Pressão ou Microfluidizador, com Utilização de Membrana	MCT, óleo de coco, azeite de oliva, óleo de girassol e óleo de sementes de cannabis.	Lecitina Surfactantes de PEG Polissacarídeos diversos (quitosana, goma xantam, glicerol, sorbitol, ciclodextrina, etc.)	≤ 0,15 µm
Extração em Líquido Pressurizado Com Solução Hidroalcolica e Secagem por Microondas	Nenhum; Separação de Fase Sólida; Cromatografia de Partição Centrifugada; Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Preparatória	Válvula Homogeneizadora de Alta Pressão ou Microfluidizador	MCT, óleo de coco, azeite de oliva, óleo de girassol e óleo de sementes de cannabis.	Lecitina Surfactantes de PEG Polissacarídeos diversos (quitosana, goma xantam, glicerol, sorbitol, ciclodextrina, etc.)	< 1,0 µm para aplicação única do método de processamento; ≤ 0,2 µm para múltiplas aplicações
Extração em Líquido Pressurizado Com Solução Hidroalcolica e Secagem por Microondas	Nenhum; Separação de Fase Sólida; Cromatografia de Partição Centrifugada; Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Preparatória	Válvula Homogeneizadora de Alta Pressão ou Microfluidizador, com Utilização de Membrana	MCT, óleo de coco, azeite de oliva, óleo de girassol e óleo de sementes de cannabis.	Lecitina Surfactantes de PEG Polissacarídeos diversos (quitosana, goma xantam, glicerol, sorbitol, ciclodextrina, etc.)	≤ 0,15 µm

Tabela I. Métodos de produção industrial de nano-CBD (parte III).

As seções a seguir discutem algumas classes de produtos canábicos e exemplificam métodos de produção baseados em artigos científicos e patentes.

3.1 ÓLEOS, SPRAYS E TINTURAS

São as classes de produtos predominantes no mercado brasileiro (ABRACE, 2022; AMA+ME, 2022; AMME, 2022; APEPI, 2022; Flor da Vida, 2022; Santa Planta Brasil, 2022; Terracannabis, 2022). Produtos de Nano-CBD dessas classes são produzidos utilizando os métodos de nanoemulsões (método PIT, emulsificação espontânea, emulsificação por rotor-estator e bombas hidráulicas, ultrassonicação e emulsificação por membrana) aplicados em extratos de *Cannabis sativa* ricos em canabinoides (Leo, 2020). É interessante que os polímeros aplicados em óleos, sprays e tinturas tenham boas propriedades de penetração em mucosas e redução de citotoxicidade, como a quitosana e compósitos poliméricos (Söpfer, Hoffmann e Daniels, 2021; Martín-Bandeiras et. Al, 2014). Para o setor industrial, o ideal é a combinação do processo de extração com o processo de nanoemulsificação, obtendo-se produtos a partir de substratos da planta (i.e. as inflorescências da maconha) como matéria prima, como, por exemplo, a extração hidroalcolica com o método de sonicação utilizando compósitos de silicatos com PEG (Durkacz et. al., 2020; Söpfer, Hoffmann e Daniels, 2021).

3.2 TÓPICOS

É a classe de produtos mais promissora considerando a diversidade na aplicação dos compostos da *Cannabis sativa*. Abrange pomadas, colírios, adesivos e cosméticos. Produtos de nano-CBD dessa classe são produzidos utilizando os métodos de nanoemulsões combinados aos métodos de gelificação e métodos de polimerização em miniemulsão (Sharkawy et. al., 2021; Han, 2021). É possível a combinação dos canabinóides com outros princípios ativos em nanoestruturas, potencializando a eficiência de tratamentos alopáticos e reduzindo efeitos colaterais de determinadas substâncias médico-farmacêuticas como a lidocaína (Franzè et. al., 2022). Assim como na produção de tinturas a aplicação de polímeros com boas propriedades de penetração em mucosas é fundamental, sendo a quitosana e a ciclodextrina protagonistas na produção de tópicos canábicos por exercerem com efetividade a função de SC devido à melhor absorção de fármacos lipofílicos veiculados por sacarídeos (Sharkawy et. al., 2021; Sosnik, Shabo & Halamish, 2021; CYCLOLAB, 2018). Também é interessante a combinação dos métodos de extração com os processos de DDS (Leo, 2020), como a extração por campo elétrico

pulsante em processos de ultrassonicação (Haji-Moradkhani, Raziei & Moghimi, 2019) ou a extração hidroalcoólica utilizando ciclodextrina (Li et. al., 2022).

3.3 CÁPSULAS

É a classe de produtos com melhor administração de canabidiol. É prática a aplicação de processos de separação e purificação, após a extração, para isolamento dos compostos de interesse da planta (como em produtos de $\Delta 8$ -THC e de CBD isolado), tendo um maior controle e nível de pureza na formulação das cápsulas (Aphios, 2022; Millar et. Al, 2020). Também é uma classe interessante para combinação entre canabinóides e outros princípios ativos, como cápsulas de CBD com Melatonina para melhoria do sono (Sloat, Sandoval & West, 2021; Lazarus Naturals, 2022). Podem ser produzidas através dos métodos de nanoemulsificação combinados com métodos de polimerização por miniemulsões utilizando extratos purificados da planta, por processos de gelificação iônica com remoção completa do solvente, e até mesmo por processos de extração utilizando solventes (e cossolventes) polares com auxílio da ciclodextrina e completa remoção do solvente (De Vries et. al., 2015; Silver, 2017; Aphios, 2022). É interessante que os materiais poliméricos aplicados combinem propriedades de retenção de fármacos com propriedades de penetração em mucosas, trazendo assim um sistema de liberação controlada com máximo aproveitamento, como por exemplo, canabidiol encapsulado por (polis)sacarídeos (quitosana e ciclodextrina) em um reservatório de HPMC (Jarho, Mannila & Järvinen, 2003; Millar et. al., 2020; Ramalho et. al., 2017). Devido a propriedades de cristalização dos canabinóides, também é possível sua solidificação e encapsulamento por polímeros com boas propriedades de retenção, como o HPMC (Millar et. al., 2020; Söpper, Hoffmann e Daniels, 2021; Taha, 2016).

3.4 OUTROS

Existem ainda outras classes de produtos nas quais a cannabis medicinal é produzida: soro intravenoso; supositórios; comestíveis (balas e gomas); aerossóis; e bebidas (Terracannabis, 2022; Ross & Rosenthal, 2016; Leo, 2020). Apesar de menos populares no Brasil devido baixa praticidade, ou a confusão entre uso adulto e uso medicinal, a indústria americana utiliza métodos de fabricação com nanotecnologia aplicada para sua produção (Leo, 2020).



Figura 18. Produtos canábicos em cápsula, tintura e tópicos (Healthline, 2022).



Figura 19. Balas de goma canábicas (Kubala, 2021).



Figura 20. Supositório Canábico (Glamour, 2017).

4 CONCLUSÕES/CONSIDERAÇÕES FINAIS

Mesmo com todo o debate em torno da *Cannabis sativa* devido ao movimento proibicionista dos séculos XIX e XX, o século XXI abre-se com um grande esclarecimento sobre o que é a maconha e seu potencial no tratamento de doenças modernas, e, aliada a ciência e as tecnologias atuais, demonstra um grande poder de evolução social. No Brasil, tem-se a cannabis medicinal como linha de frente em produtos canábicos, que tem se mostrado bastante popular e aceita até mesmo pelos nichos sociais mais conservadores. Com sua farmacologia complexa, adjunta aos processos de extração, purificação e separação, identificação e processamento de medicamentos nanoestruturados, é possível trazer segurança e conforto a todos os usuários da planta no Brasil, seja por meio de tinturas e tópicos, com ação mais imediata, seja por meio de cápsulas, com ação prolongada. A engenharia de materiais tem função fundamental nessa missão, sendo a produção de nanoestruturas através das nanoemulsões parte fundamental para a inclusão da *Cannabis sativa* em nossa sociedade. Com a ascensão da indústria moderna da *Cannabis sativa*, e, sendo a engenharia de materiais hoje um dos principais desenvolvedores de alta tecnologia industrial, a produção canábica é um novo setor para acolhimento e desenvolvimento de engenheiros, caminhando conjuntamente com as recentes frentes de atuação descobertas em materiais como processos industriais para fabricação de nanotecnologia, biomateriais e sistemas de liberação controlada de fármacos. Atualmente existem milhares de patentes atreladas a indústria de cannabis no mundo, sendo predominante o uso dos métodos de nanoemulsificação mais básicos, como técnicas de rotor-estator e bombas hidráulicas em conjunto com métodos de extração, separação e purificação de compostos da *Cannabis sativa*, e é necessário aprofundar o conhecimento no âmbito tecnológico e trabalhar também com métodos mais refinados, como a ultrassonicação, além de mexer com os processos de forma que a extração e a nanoemulsificação do extrato sejam realizadas em um único processo, sem a necessidade de etapas para a fabricação do nano-CBD. Outro grande desafio na área da engenharia de materiais é incorporar os conhecimentos de farmácia nos estudos para o desenvolvimento de formulações com máxima efetividade na função de DDS, sendo este desconhecimento evidente em algumas das patentes

trabalhadas, pois abordam um amplo espectro de formulações, sendo necessário que os estudantes e produtores façam experimentações para achar as melhores composições considerando condições de processamento para fabricação de sistemas de liberação controlada de canabinóides e aceitabilidade aos medicamentos produzidos. Por fim deixo a reflexão de como é interessante perceber como a aplicação dos conhecimentos modernos em conjunto com a natureza nos traz resultados imensuráveis: os canabinóides (princípios ativos obtidos de uma planta), em conjunto com polímeros artificiais (substâncias naturais modificadas para uso humano) nos trazem uma infinidade de produtos para uma ampla diversidade de aplicações, demonstrando que o mutualismo entre o ser humano e a *Cannabis sativa* é uma relação sem limites no universo e, se caminarmos junto à natureza, veremos que há espaço para todos os seres vivos em nosso planeta e que a ciência só cresce quando trabalhamos com o todo.

REFERÊNCIAS

Artigo de periódico (Digital)

CARLINI, E.A. A história da maconha no Brasil. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, São Paulo, vol. 55, n. 4, dezembro de 2006. P. 314-317. Disponível em < <https://doi.org/10.1590/S0047-20852006000400008>>. Acesso em: 18 de outubro de 2022.

BARROS, A.; PERES, M. Proibição da maconha no Brasil e suas raízes históricas escravocratas. **Revista Periferia**, Rio de Janeiro, vol. III, n. 2, 2011. 20 páginas. Disponível em: < <https://www.e-publicacoes.uerj.br/index.php/periferia/article/download/3953/2742#:~:text=%C3%89%20proibida%20a%20venda%20e,em%20tr%C3%AAs%20dias%20de%20cadeia.>> . Acesso em: 18 de outubro de 2022.

KENDELL, R. Cannabis condemned: The proscription of Indian Hemp. **Addiction**, Edinburgh, vol. 98, fevereiro de 2003. P. 143-151. Disponível em: < <https://doi.org/10.1046/j.1360-0443.2003.00273.x>>. Acesso em: 18 de outubro de 2022.

CARLINI, E.A. Pesquisas com a maconha no Brasil. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, São Paulo, vol.32, n.1, maio de 2010. 2 páginas. Disponível em: < <https://doi.org/10.1590/S1516-44462010000500002>>. Acesso em: 18 de outubro de 2022.

GAONI, Y.; MECHOULAM, R. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of na Active Constituent of Hashish. **Journal of the American Chemical Society**, vol. 86, n. 8, abril de 1964. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/ja01062a046>>. Acesso em: 18 de outubro de 2022.

DEVANE, W.A. et. al. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. **Molecular Pharmacology**, vol. 34, n. 5, novembro de 1988. P. 605-613. Disponível em: < <http://www.worldcat.org/issn/1521-0111>>. Acesso em: 19 de outubro de 2022.

DEVANE, W.A. et. al. Isolation and Structure of a Brain Constituent That Binds the Cannabinoid Receptor. **Science**, vol. 258, n. 5090, dezembro de 1992. P. 1946-1949. Disponível em: < <https://doi.org/10.1126/science.1470919>>. Acesso em: 19 de outubro de 2022.

LIU, Yi et al. *Cannabis sativa* bioactive compounds and their extraction, separation, purification, and identification technologies: An updated review. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdã, vol. 149, abril 2022. 15 páginas. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116554>>. Acesso em: 5 de setembro de 2022.

SHOLLER, D.J.. SCHOENE, L.. SPINDLE, T.R.. Therapeutic Efficacy of Cannabidiol (CBD): a Review of the Evidence From Clinical Trials and Human Laboratory

Studies. **Current Addiction Reports**, Cham, vol. 7, n. 3, Setembro de 2020. P. 405–412. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s40429-020-00326-8>>. Acesso em: 5 de setembro de 2022.

ROVETTO, L.J.. AIETA, N.V.. Supercritical carbon dioxide extraction of cannabinoids from *Cannabis sativa* L.. **The Journal of Supercritical Fluids**, vol. 129, novembro de 2017. P.16-27. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.03.014>>. Acesso em: 5 de setembro de 2022.

MILLAR, S.A. et. al. Towards Better Delivery of Cannabidiol (CBD). **Pharmaceuticals**, vol.13, n.9, agosto de 2020. P.219-233. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ph13090219>>. Acesso em: 6 de setembro de 2022.

MUNJAL, M. et. al. Polymeric System for Amorphous Δ^9 -Tetrahydrocannabinol Produced by a Hot-Melt Method. Part I: Chemical and Thermal Stability during Processing. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 95, n.8, agosto de 2006. P.1841-1853. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/jps.20667>>. Acesso em: 20 de outubro de 2022.

MARTÍN-BANDERAS, L.. et al. Engineering of Δ^9 -tetrahydrocannabinol delivery systems based on surface modified-PLGA nanoplatfoms. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdã, vol. 123, novembro de 2014. P.114-122. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.09.002>>. Acesso em: 7 de setembro de 2022.

SÖPPER, U.. HOFFMANN, A.. DANIELS, R.. Mucoadhesion and Mucopenetration of Cannabidiol (CBD)-Loaded Mesoporous Carrier Systems for Buccal Drug Delivery. **Scientia Pharmaceutica**, vol. 89, n. 3, agosto de 2021. P.35-49. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/scipharm89030035>>. Acesso em: 6 de setembro de 2022.

RAMALHO, I.M.M. et. al. Current trends on cannabidiol delivery systems: where are we and where are we going?. **Expert Opinion on Drug Delivery**, vol.18, n.11, julho de 2021. P.1577-1587. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/17425247.2021.1952978>>. Acesso em: 20 de outubro de 2022.

MASSERINI, M.. Nanoparticles for Brain Drug Delivery. **International Scholarly Research Notices**, vol. 2013, maio de 2013. 18 páginas. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2013/238428>>. Acesso em: 22 de setembro de 2022.

MOURYA, V.K. et. al. Polymeric Micelles: General Considerations and their Applications. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**, vol. 45, n.2, abril de 2011. P.128-138. Disponível em: <https://www.ijper.org/sites/default/files/IJPER_45_2_4.pdf>. Acesso em: 20 de setembro de 2022.

HUSSEINI, G.A.; PITT, W.G.. Micelles and nanoparticles for ultrasonic drug and gene delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol. 60, n.10, junho de 2008. P.1137-1152. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.03.008>>. Acesso em: 20 de setembro de 2022.

ANDRADE, F. et. al. Chitosan-Grafted Copolymers and Chitosan-Ligand Conjugates as Matrices for Pulmonary Drug Delivery. **International Journal of Carbohydrate Chemistry**, vol. 2011, outubro de 2011. 14 páginas. Disponível em <<https://doi.org/10.1155/2011/865704>>. Acesso em 23 de setembro de 2022.

FRANCIS, M.F. et. al., Polymeric micelles for oral drug delivery: Why and How*. **Pure and Applied Chemistry**, vol.76, n.7-8, 2004. P.1321-1335. Disponível em: < <https://doi.org/10.1351/pac200476071321>>. Acesso: 20 de setembro de 2022.

RAWAT, M. et. al. Nanocarriers: Promising Vehicle for Bioactive Drugs. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, vol.29, n.9, 2006. P.1790-1798. Disponível em: <<https://doi.org/10.1248/bpb.29.1790>>. Acesso em: 20 de setembro de 2022.

NEHA, B. et. al. Drug Delivery To The Brain Using Polymeric Nanoparticles: A Review. **International Journal of Pharmaceutical and Life Sciences**, vol.2, n.3, maio de 2013. P.107-132. Disponível em: <<https://doi.org/10.3329/ijpls.v2i3.15457>>. Acesso em: 20 de setembro de 2022.

SCHAFFAZICK, S.R. et. al. Caracterização e Estabilidade Físico-Química de Sistemas Poliméricos Nanoparticulados para Administração de Fármacos. **Química Nova**, vol.26, n.5, 2003. P.726-737. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000500017>>. Acesso em: 20 de setembro de 2022.

STEICHEN, S.D. et. al. A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of câncer therapeutics. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 48, n. 3, fevereiro de 2013. P.416-427. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.12.006>>. Acesso em: 20 de setembro de 2022.

MODI, G. et. al. Advances in the treatment of neurodegenerative disorders employing nanotechnology. **Annals of the New York Academy of Sciences**, vol.1184, janeiro de 2010. P.154-172. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05108.x>>. Acesso em: 20 de setembro de 2022.

BEI, D.; MENG, J.; YOUAN, B.C.. Engineering nanomedicines for improved melanoma therapy: progress and promises. **Nanomedicine**, vol. 5, n.9, dezembro de 2010. P.1385-1399. Disponível em: <<https://doi.org/10.2217/nnm.10.117>>. Acesso em: 20 de setembro de 2022.

SPUCH, C.. NAVARRO, C.. Liposomes for Target Delivery of Active Agents Against Neurodegenerative Diseases (Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease).

Journal of Drug Delivery, vol. 2011, setembro de 2011. 12 páginas. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2011/469679>>. Acesso em: 23 de setembro de 2022.

VEMURI, S.; RHODES, C.T.. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, vol.70, n. 2, julho de 1995. P. 95-111. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0031-6865\(95\)00010-7](https://doi.org/10.1016/0031-6865(95)00010-7)>. Acesso em: 20 de setembro de 2022.

SHARMA, A.; SHARMA U.S.. Liposomes in drug delivery: progress and limitations. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 154, n. 2, agosto de 1997. P. 123-140. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(97\)00135-X](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(97)00135-X)>. Acesso em: 20 de setembro de 2022.

BATISTA, C.M. et. al. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol.43, n. 2, abril de 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1516-93322007000200003>>. Acesso em: 20 de setembro de 2022.

D'EMANUELE, A.; ATTWOOD, D.. Dendrimer-drug interactions. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol.57, n.15, dezembro de 2005. P.2147-2162. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.09.012>>. Acesso em: 20 de setembro de 2022.

GRINGAS, M.. RAIMUNDO, J.M.. CHABRE, Y.M.. Cleavable Dendrimers. **Angewandte Chemie International Edition**, vol. 46, n. 7, janeiro de 2007. P. 1010-1017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/anie.200601962>>. Acesso em: 23 de setembro de 2022.

ESFAND, R.; TOMALIA, D.A.. Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical applications. **Drug Discovery Today**, vol. 6, n.8, abril de 2001. P.427-436. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(01\)01757-3](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(01)01757-3)>. Acesso em: 20 de setembro de 2022.

VANTI, G. et. al.. Development and optimisation of biopharmaceutical properties of a new microemulgel of cannabidiol for locally-acting dermatological delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 607, setembro de 2021. 13 páginas. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.121036>>. Acesso em: 25 de outubro de 2022.

CASIRAGHI, A. et. al. Topical Administration of Cannabidiol: Influence of Vehicle-Related Aspects on Skin Permeation Process. **Pharmaceutics**, vol.13, n.11, outubro de 2020. P.337-348. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ph13110337>>. Acesso em: 25 de outubro de 2022.

CALVO, P. et. al.. Chitosan and Chitosan/Ethylene Oxide-Propylene Oxide Block Copolymer Nanoparticles as Novel Carriers for Proteins and Vaccines. **Pharmaceutical Research**, vol. 14, n.10, outubro de 1997. P.1431-1436. Disponível

em: <<https://doi.org/10.1023/A:1012128907225>>. Acesso em: 25 de outubro de 2022.

PARHI, R.. Drug delivery applications of chitin and chitosan: a review. **Environmental Chemistry Letters**, vol. 18, n. 3, janeiro de 2020. P.577-594. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10311-020-00963-5>>. Acesso em: 6 de setembro de 2022.

RIBEIRO, E.F. et. al.. Chitosan and crosslinked chitosan nanoparticles: Synthesis, characterization and their role as Pickering emulsifiers. **Carbohydrate Polymers**, Amsterdã, vol. 250, dezembro de 2020. 10 páginas. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116878>>. Acesso em: 6 de setembro de 2022.

ABBASI, E. et. al.. Dendrimers: synthesis, applications, and properties. **Nanoscale Research Letters**, vol. 9, maio de 2014. 10 páginas. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1556-276X-9-247>>. Acesso em: 26 de outubro de 2022.

CHOI, Y.H. et. al. Are Natural Deep Eutectic Solvents the Missing Link in Understanding Cellular Metabolism and Physiology? **Plant Physiology**, vol. 156, n.4, agosto de 2011. P.1701-1705. Disponível em: <<https://doi.org/10.1104/pp.111.178426>>. Acesso em: 26 de outubro de 2022.

DAI, Y. et. al.. Natural deep eutectic solvents as a new potential media for green technology. **Analytica Chimica Acta**, vol.766, março de 2013. P.61-83. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.019>>. Acesso em: 26 de outubro de 2022.

KŘÍŽEK, T. et. al.. Menthol-based hydrophobic deep eutectic solvents: Towards greener and efficient extraction of phytocannabis. **Journal of Cleaner Production**, vol.193, agosto de 2018. P. 391-396. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.05.080>>. Acesso em: 26 de outubro de 2022.

CAI, C. et. al.. Green extraction of cannabidiol from industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) using deep eutectic solvents coupled with further enrichment and recovery by macroporous resin. **Journal of Molecular Liquids**, vol. 287, agosto de 2019. 9 páginas. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.110957>>. Acesso em: 26 de outubro de 2022.

SHARKAWY, A. et. al. Pickering emulsions stabilized with chitosan/collagen peptides nanoparticles as green topical delivery vehicles for cannabidiol (CBD). **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, vol. 631, outubro de 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2021.127677>>. Acesso em: 1 de novembro de 2022.

FRANZÈ, S. et. al. Design of Liposomal Lidocaine/Cannabidiol Fixed Combinations

for Local Neuropathic Pain Treatment. **Pharmaceutics**, vol.14, n.9, setembro de 2022. 11 páginas. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14091915>>. Acesso em: 31 de outubro de 2022.

SOSNIK, A.; SHABO, R.B.; HALAMISH, H.M. Cannabidiol-Loaded Mixed Polymeric Micelles of Chitosan/Poly(Vinyl Alcohol) and Poly(Methyl Methacrylate) for Trans-Corneal Delivery. **Pharmaceutics**, vol.13, n.12, dezembro de 2021. 21 páginas. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13122142>>. Acesso em: 31 de outubro de 2022.

CYCLOLAB. Cyclodextrin-enabled Cannabinoid Formulations. **CYCLODEXTRIN NEWS**, vol.32, n.2, fevereiro de 2018. 15 páginas. Disponível em: <https://cyclolab.hu/userfiles/CD%20NEWS_2018_FEBRUARY.pdf>. Acesso em: 31 de outubro de 2022.

HAJI-MORADKHANI, A.; REZAEI, R.; MOGHIMI, M. Optimization of pulsed electric field-assisted oil extraction from cannabis seeds. **Journal of Food Process Engineering**, vol.42, n.4, junho de 2019. 8 páginas. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/jfpe.13028>>. Acesso em: 31 de outubro de 2022.

LI, H. Optimization of cyclodextrin-assisted green extraction of cannabidiol from industrial hemp leaves: Release behavior, permeability, bioactivity and stability. **Industrial Crops & Products**, vol.188, novembro de 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115709>>. Acesso em: 31 de outubro de 2022.

Capítulo de livro

LUCENA, J. Os Fumadores de Maconha Em Pernambuco. In: Serviço Nacional de Educação Sanitária. **Maconha: Coletânea de Trabalhos Brasileiros**. Rio de Janeiro. 2ª Edição, 1958.

AMIN, M.R.. ALI, D.W.. Pharmacology of Medical Cannabis. In: Bukiya, A. (Ed.) **Recent Advances in Cannabinoid Physiology and Pathology**. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 1162. Cham: Springer, 2019. Cap 8, p. 151 – 165.

Dissertação/Tese

MIRANDA, A.A.A.. **Aplicações da Nanotecnologia em Doenças do Foro Neurológico: Vantagens e Desafios**. 2014. 37 páginas. Tese de mestrado em farmácia – Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra, Portugal, Julho de 2014.

Livro

Ministério da Saúde. **Maconha: coletânea de trabalhos brasileiros**. 2ª Edição. Rio de Janeiro: Oficinas do Serviço Gráfico do IBGE, 1958. 386 páginas.

WOLFRAM, E. **Colloid and Surface Science**. Pergamon: Elsevier Inc., 1977. 108 páginas.

OHSHIMA, H.; MAKINO, K. **Colloid and Interface Science in Pharmaceutical Research and Development**. Londres: Elsevier Inc., 2014. 516 páginas.

IUPAC. **Compendium of Chemical Terminology: Gold Book**. 2ª Edição, versão 2.3.1, 2012. 1670 páginas.

JAFARI, S.M.; MCCLEMENTS, D.J. **Nanoemulsions: Formulation, Applications, and Characterization**. Londres: Elsevier Inc., 2018. 642 páginas.

BOAS, U.; CHRISTENSEN, J.B.; HEEGAARD, P.M.H. **Dendrimers in Medicine and Biotechnology: New Molecular Tools**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2006. 190 páginas.

Canevarolo Jr., S.V.. **Ciência dos Polímeros**. 3ª Edição. São Paulo: Artliber Editora Ltda., 2017. 280 páginas.

Texto da Web

DOWNS, David. **The Science behind the DEA's Long War on Marijuana**.

Documento eletrônico. Disponível em: <

<https://www.scientificamerican.com/article/the-science-behind-the-dea-s-long-war-on-marijuana/>>. Acesso em: 18 de outubro de 2022.

FORMIGA, Isabella. **'Vida nova', dizem pais de menina que há 2 anos usa derivado da maconha**. Documento eletrônico. Disponível em: <

<https://g1.globo.com/distrito-federal/noticia/2015/11/vida-nova-dizem-pais-de-menina-que-ha-2-anos-usa-derivado-da-maconha.html>>. Acesso em: 19 de outubro de 2022.

RESENDE, André. **Única entidade que pode cultivar maconha com fim medicinal no país atende pacientes há 2 anos**. Documento eletrônico. Disponível em: < <https://g1.globo.com/pb/paraiba/noticia/2019/04/27/unica-entidade-que-pode-cultivar-maconha-com-fim-medicinal-no-pais-atende-pacientes-ha-2-anos.ghtml>>. Acesso em: 20 de outubro de 2022.

BDSA Cannabis Data Company. **BDSA CANNABIS MARKET FORECAST 2022 UPDATE**. Documento eletrônico. Disponível em: <<https://bdsa.com/wp-content/uploads/2022/03/BDSA-Cannabis-Market-Forecast-Spring-2022-Update-6->

[15-22-1.pdf](#)>. Acesso em: 19 de outubro de 2022.

PRATI-DONADUZZI. **Parceria público-privada: Prati-Donaduzzi repassa royalties do Canabidiol à USP.** Documento eletrônico. Disponível em: < <https://www.pratidonaduzzi.com.br/imprensa/noticias/item/2022-parceria-publico-privada-prati-donaduzzi-repassa-royalties-do-canabidiol-a-usp>>. Acesso em: 20 de outubro de 2022.

SOCIEDADE Brasileira de Estudos da Cannabis. **Revista Brasileira de Cannabis.** Documento eletrônico. Disponível em: <<https://revistacannabis.med.br/index.php/sbec/issue/view/2>>. Acesso em: 26 de outubro de 2022.

STANGER, MaryAnn. **What Is Nano CBD?/ Nano CBD VS CBD Oil.** Documento eletrônico. Disponível em: < <https://zatural.com/blogs/cbd-and-hemp-blog/nano-cbd-vs-cbd-oil#:~:text=Nano%20CBD%20is%20CBD%20broken,capsules%2C%20gum%2C%20and%20mints.>>>. Acesso em: 16 de dezembro de 2022.

HEALTHLINE. **Lazarus Naturals CBD Products: A 2022 Review.** Documento eletrônico. Disponível em: <<https://www.healthline.com/health/lazarus-naturals>>. Acesso em: 5 de novembro de 2022.

KUBALA, J.. **Can You Eat Weed? All You Need To Know About Marijuana Edibles.** Documento eletrônico. Disponível em: <<https://www.healthline.com/nutrition/eating-weed>>. Acesso em: 9 de dezembro de 2022.

GLAMOUR. **Supositório de Maconha Promete Aliviar Cólicas Menstruais.** Documento eletrônico. Disponível em: <<https://glamour.globo.com/lifestyle/trending/noticia/2017/12/supositorio-de-maconha-promete-aliviar-colicas-menstruais.ghtml>>. Acesso em: 9 de dezembro de 2022.

Sites

ABRACE Esperança. Documento eletrônico. Disponível em: < <https://abraceesperanca.org.br/>>. Acesso em 20 de outubro de 2022.

MMJ. Documento eletrônico. Disponível em: < <https://maesjardineiras.com.br/>>. Acesso em 20 de outubro de 2022.

SBEC. Documento eletrônico. Disponível em: < <https://sbec.med.br/>>. Acesso em 20 de outubro de 2022.

APEPI. Documento eletrônico. Disponível em: < <https://apepi.org/>>. Acesso em 20 de outubro de 2022.

ANVISA. Documento eletrônico. Disponível em: < <https://www.gov.br/anvisa/pt-br>>. Acesso em 19 de outubro de 2022.

TERRACANNABIS. Documento eletrônico. Disponível em: <<https://terracannabismedicinal.com/>> . Acesso em: 25 de agosto de 2022.

PRATI-DONADUZZI. Documento eletrônico. Disponível em: <<https://www.pratidonaduzzi.com.br/>>. Acesso em: 20 de outubro de 2022.

AMA+ME. Documento eletrônico. Disponível em: <<https://amame.org.br/>> . Acesso em: 25 de agosto de 2022.

AMME Medicinal Associação. Documento eletrônico. Disponível em: <<https://ammemedicinal.org/>> . Acesso em: 25 de agosto de 2022.

FLOR da Vida. Documento eletrônico. Disponível em: <<https://www.flordavida.org.br/site/>>. Acesso em: 25 de agosto de 2022.

SANTA Planta Brasil. Documento eletrônico. Disponível em: <<https://santaplantabrasil.com/>>. Acesso em: 25 de agosto de 2022.

APHIOS. Documento eletrônico. Disponível em: <<https://aphios.com/>>. Acesso em: 1 de novembro de 2022.

LAZARUS Naturals. Documento eletrônico. Disponível em: <<https://www.lazarusnaturals.com/>>. Acesso em: 31 de outubro de 2022.

Trabalho apresentado em evento

NUNES, Eliane. Audiência Pública. In: COMISSÃO ESPECIAL – PL 0399/15 – MEDICAMENTOS FORMULADOS COM CANNABIS, 2019. Brasília, DF. Câmara dos Deputados.

MAJOR, V.S.; FERNANDES, L.S.; DONATO, M.F. Prospecção da Cannabis Medicinal no Mercado Brasileiro: Produtos, Métodos de Produção Uso & Propriedade Industrial (PI). In: Congresso Brasileiro de Cannabis Sativa, 2022, Salvador, BA. Revista Brasileira de Cannabis, 2022, p. 54.

RIBEIRO, Sidarta. Audiência Pública: Indicações terapêuticas dos canabinóides & Diferenças entre canabinóides naturais e sintéticos. In: COMISSÃO ESPECIAL – PL

0399/15 – MEDICAMENTOS FORMULADOS COM CANNABIS, 2019. Brasília, DF. Câmara dos Deputados.

RIBEIRO, Sidarta. Aula 1: Revolução Canabinóide. In: CURSO SOBRE CANNABIS MEDICINAL, Número V, 2020. Evento online. UNIFESP.

NUNES, Eliane. Aula de extração. In: CURSO DE CULTIVO E EXTRAÇÃO DE CANNABIS MEDICINAL, 2020. Evento online. Sociedade Brasileira de Estudos da Cannabis sativa (SBEC).

Patentes

LEO, Daniel Michael. CANNABIS NANOEMULSION METHODS. Depositante: Daniel Michael Leo. Procurador: INSECTERGY, LLC.. US10738268B2. Depósito: 6 out. 2018. Concessão: 11 ago. 2020.

SLOAT, Brian R.; SANDOVAL, Michael A.; WEST, Tyler B..COMPOSITIONS FOR THE DELIVERY OF THERAPEUTIC AGENTS AND METHODS OF USE AND MAKING THEREOF. Depositante: Disruption Labs Inc.. Procurador: Griffith Hack. AU2021203013A1. Depósito: 12 de maio de 2021. Concessão: 10 de junho de 2021.

DURKACZ, Anthony J.; CULLEN, Mark T. METHOD FOR EXTRACTING COMPOSITIONS FROM PLANTS. Depositante: World Class Extractions, Inc.. Procurador: WORLD CLASS EXTRACTATIONS INC.. US10851077B2. Depósito: 1 fev. 2019. Concessão: 1 dez. 2020.

HAN, Chunxiao. NANOEMULSION HYDROPHOBIC SUBSTANCES. Depositante: Bertosa, Inc.. US2021/0251948A1. Depósito: 6 mai. 2021. Concessão: 19 ago. 2021.

DE VRIES, Jan Albert, et. al. COMPRESSED TABLET CONTAINING CANNABIDIOL, METHOD FOR ITS MANUFACTURE AND USE OF SUCH TABLET IN ORAL TREATMENT OF PSYCHOSIS OR ANXIETY DISORDERS. Depositante: ECHO PHARMACEUTICALS B.V.. Procurador: NEDERLANDSCH OCTROOIBUREAU. WO2015/065179A1. Depósito: 29 out. 2014. Concessão: 7 mai. 2015.

SILVER, Ronald. CANNABINOID AND CAFFEINE EMULSIFICATIONS. Depositante: Ronald Silver. Procurador: ONOFRIO, Dara L. WO2017/180948A1. Depósito: 14 abr. 2017. Concessão: 19 out. 2017.

JARHO, Pekka; MANNILA, Janne; JÄRVINEN, Tomi. NOVEL NATURAL CYCLODEXTRIN COMPLEXES. Depositante: Pekka Jarho, Janne Mannila e Tomi Järvinen. Procurador: OY JALO ANT-WUORINEN AB. WO03/070775A1. Depósito: 20 fev. 2003. Concessão: 28 ago. 2003.

TAHA, Ashraf. COMPOSITIONS AND METHODS FOR CANNABINOID COATINGS FOR USE IN DRUG DELIVERY. Depositante: Medipath, Inc.. Procurador: Medipath, Inc.. US2016/0051480A1. Depósito: 24 ago. 2015. Concessão: 25 fev. 2016.

ROSS, Franklin M.; ROSENTHAL, Ed. METHOD FOR CONDUCTING CONCENTRATED CANNABIS OIL TO BE STABLE, EMULSIFIABLE AND FLAVORLESS FOR USE IN HOT BEVERAGES AND RESULTING POWDERIZED CANNABIS OIL. Depositante: Franklin M. Ross e Ed Rosenthal. Procurador: Alexander Schlee. WO2016/135621A1. Depósito: 23 fev. 2016. Concessão: 1 set. 2016.