

**Desenvolvimento de
Drug Delivery Systems (DDS) com fibras e
óleo de Cannabis para aplicações orais e
dérmicas**

Versão final após defesa

Paulo Nuno Carvalho Saraiva

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Biomédicas
(2º ciclo de estudos)

Orientadora: Professora Doutora Joana Maria Rodrigues Curto

Agosto de 2022

Declaração de Integridade

Eu, Paulo Nuno Carvalho Saraiva, que abaixo assino, estudante com o número de inscrição M11102 de Ciências Biomédicas da Faculdade de Ciências da Saúde, declaro ter desenvolvido o presente trabalho e elaborado o presente texto em total consonância com o Código de Integridades da Universidade da Beira Interior.

Mais concretamente afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de Fraude Académica, e que aqui declaro conhecer, que em particular atendi à exigida referenciação de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, e assumindo assim na íntegra as responsabilidades da autoria.

Universidade da Beira Interior, Covilhã 29/06/2022

Paulo Nuno Carvalho Saraiva

Dedicatória

Para a mulher que me ajudou a tornar no homem que hoje sou. Para a mulher que me ensinou e forneceu todos os valores, todo o seu amor, toda a sua simpatia e toda a sua possível presença em todas as minhas alegrias e conquistas ao longo de toda a minha vida. Apenas gostaria que estivesses presente nesta etapa tão especial da minha vida. Para ti, avó Gabriela.

Agradecimentos

Através do desenvolvimento deste trabalho tive o privilégio de aumentar o meu conhecimento neste tema, tendo conhecido diversas pessoas que me proporcionaram uma elevada ajuda no desenvolvimento deste projeto, bem como me potenciaram um aumento a nível pessoal e profissional.

Expresso o meu profundo agradecimento, à Professora Doutora Joana Maria Rodrigues Curto, pela orientação, eterna simpatia, apoio, profissionalismo, incansável dedicação, motivação e compreensão ao longo deste ano de trabalho, tendo sempre acreditado no meu valor motivando-me durante toda a atividade experimental e desenvolvimento do trabalho, tendo crescido imenso a nível pessoal e profissional.

Um especial agradecimento, à empresa *Canna Forest*[®], em especial à D. Teresa Faísca, ao Doutor Christophe Bourrier e ao Senhor Duarte Bento, pela oportunidade de integrar, planear e acompanhar todas as partes executadas na produção, desenvolvimento e recolha das diversas espécies de *Cannabis sativa* L., tendo obtido conhecimento e experiência, ao longo de 2 meses, em diversas etapas do Processo Industrial, entre as quais, o cultivo e recolha das plantas de *Cannabis*, bem como o processo de *Cutting*, *Trimming* e posterior Secagem das flores.

Quero também agradecer, à Unidade de Investigação FibEnTech-UBI, pelas condições de trabalho que me proporcionaram.

Ao Técnico laboratorial, César Marques, aos investigadores, Mestre João Coelho, Mestre Vera Costa, e em especial à Mestre Flávia Morais, pela disponibilidade e ajuda na preparação e visualização das amostras no SEM, contribuição para a revisão do documento, e sobretudo por sempre me proporcionarem um bom ambiente de trabalho, revelarem companheirismo e espírito de equipa, bem como, toda a disponibilidade, no esclarecimento das diversas dúvidas que foram surgindo ao longo de todo o trabalho.

À Doutora Ana Paula Gomes pela disponibilidade e aquisição das diversas imagens provenientes do Microscópio Eletrónico de Varrimento.

Aos meus amigos, em especial ao Carlos Esteves, ao Francisco Colaço e à Ana Nobre por todo o apoio, honestidade, e por sempre acreditarem no meu potencial.

Um agradecimento em especial à minha namorada, Joana Pinto, por todas as incansáveis horas e palavras de dedicação, apoio e motivação, demonstrando sempre a crença no meu valor, sendo um pilar fundamental na conclusão deste trabalho.

À minha mãe, ao meu pai e à minha irmã, que são tudo para mim, por todas as palavras de incentivo, por me terem ajudado a tornar no homem que hoje sou, por todos os conselhos dados nos momentos mais difíceis e por todo o amor prestado. Um obrigado nunca será suficiente para agradecer toda a ajuda e amor que sempre me deram.

Resumo

A *Cannabis sativa* L. constitui uma matéria-prima de excelência tanto na investigação e desenvolvimento, como à escala industrial e empresarial, devido às suas características sustentáveis, renováveis, biodegradáveis, recicláveis e rentáveis. A presença de compostos ativos como o tetrahydrocannabinol (THC) e o canabidiol (CBD), apresenta um grande potencial terapêutico que tem sido utilizado em aplicações biomédicas. Assim, o desenvolvimento de sistemas que controlem a taxa de libertação destas moléculas ativas, e que preservem as suas propriedades terapêuticas, constitui um exemplo inovador de investigação multidisciplinar na área do projeto de tratamentos específicos adaptados a diferentes necessidades. Com este propósito, o objetivo do presente trabalho é desenvolver *Drug Delivery Systems* (DDS) à base de biomateriais de *Cannabis* em três aplicações distintas: suplementos alimentares, formulações orais e sistemas dérmicos.

Para alcançar este objetivo, foi realizada inicialmente uma moagem a partir de sementes de cânhamo através do processo de crio-moagem. De forma a preservar os compostos bioativos e obter uma textura suave e uniforme, foram otimizadas as condições de número de ciclos de operação (6), o tempo (10 minutos por ciclo), a temperatura (0-20°C), e a frequência utilizada (25 Hz). Adicionalmente, foi utilizada a técnica de EDX para a sua caracterização. Posteriormente, foram obtidas fibras de *Cannabis* a partir dos caules através de processos de cozimento e branqueamento. A caracterização destas foi realizada em termos de microscopia ótica e microscopia eletrónica de varrimento (SEM), obtendo-se 43% das fibras compreendidas entre 10 e 20 µm. Foi também desenvolvida uma metodologia de otimização da matriz 3D de fibras de *Cannabis*, com função de reter e libertar controladamente as moléculas bioativas do extrato e do óleo de *Cannabis*, utilizando ferramentas computacionais de simulação computacional e modelação 3D.

Os DDS dedicados às formulações orais foram produzidos com diferentes proporções e combinações de biomateriais, entre os quais se incluem as moléculas ativas, presentes na flor, extrato e óleo de *Cannabis*, e também polímeros e fibras para formação da matriz 3D de retenção e libertação controlada. Nestes incluem-se o alginato e a Carboximetilcelulose (CMC), assim como as fibras de celulose, das quais se destacam as fibras de *Cannabis* e de Celulose Nano Fibrilada (CNF).

Efetuarão-se também estudos *in vitro* de estabilidade dos DDS utilizando três soluções a fim de mimetizar o pH do estômago (pH = 2), duodeno (pH = 6,6), e da corrente sanguínea (pH = 7,4). Os resultados mostraram que foram obtidos DDS estáveis e uniformes, apresentando no seu interior uma rede 3D à base de biomateriais de celulose e fibras de *Cannabis*, com capacidade de reter e libertar controladamente substâncias ativas de interesse. A incorporação das fibras de

Cannabis nestes sistemas também promoveu um aumento da estabilidade da estrutura e conformidade do DDS, inibindo a sua degradação ao longo do tempo.

Por fim, os DDS dérmicos foram desenvolvidos utilizando como base matrizes 3D de fibras de celulose branqueadas de *Eucalyptus globulus* e não-branqueadas de *Picea abies*. A fim de serem aplicados nestas estruturas, os canabinóides de duas amostras de *Cannabis* foram ainda incorporados, após o processo de descarboxilação, em diversos óleos de interesse, sendo posteriormente caracterizados por FTIR-ATR.

A estratégia do design, desenvolvimento e otimização experimental e computacional de DDS com CBD como substância ativa, contendo combinações diversificadas de óleo de *Cannabis*, fibras de celulose de *Cannabis*, bem como extrato de *Cannabis* e incorporação da flor após descarboxilação, constitui numa abordagem inovadora no desenvolvimento de formulações de valor acrescentado para suplementação alimentar, na forma oral e dérmica, com elevado potencial de aplicação industrial.

Palavras-chave

Canabidiol (CBD); Cannabis; Celulose Nano Fibrilada (CNF); Crio-moagem; *Drug Delivery Systems* (DDS); Fibras de Cannabis; Matriz 3D de base celulósica; Óleo de Cannabis

Abstract

Cannabis sativa L. is an excellent raw material, both in research and development, at industrial and business scale, due to its sustainable, renewable, biodegradable, recyclable, and profitable characteristics. The presence of active compounds such as tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD) presents a high therapeutic potential that has been used in biomedical applications. Therefore, the development of systems that control the release rate of these active molecules, and that preserve their therapeutic properties, constitutes an innovative example of multidisciplinary research in the field of specific treatments, constitutes an innovative example of multidisciplinary research in the field of the design of specific treatments adapted to different needs. For this purpose, the present work aims to develop *Drug Delivery Systems* (DDS) based on *Cannabis* biomaterials in three distinct applications: food supplements, oral formulations, and dermal systems.

To achieve this goal, an extraction of *Cannabis* oil was initially carried out from seeds through the cryo-milling process. To preserve the bioactive compounds and obtain a smooth and uniform texture, the conditions of number of operating cycles (6), time (10 minutes per cycle), temperature (0-20°C), and the frequency used (25 Hz) were optimized. Additionally, EDX technique was used for its characterization. Subsequently, *Cannabis* fibers were obtained from the stems through cooking and bleaching processes. Their characterization was performed in terms of optical microscopy and scanning electron microscopy (SEM), obtaining 42.9% of the fibers between 10 and 20 µm. A methodology for optimizing the 3D matrix of *Cannabis* fibers was also developed, using computational tools of computational simulation and 3D modeling approach. This 3D network retains and controllingly release the bioactive molecules of the *Cannabis* extract and oil.

The DDS dedicated to oral formulations were produced with different proportions and combinations of biomaterials, including the active molecules present in the *Cannabis* flower, extract, and oil, as well as polymers and fibers for the formation of the 3D matrix for retention and controlled release. These included the alginate polymer, and carboxymethyl cellulose (CMC), as well as cellulose fibers, including *Cannabis* and Nano Fibrillated Cellulose (NFC).

In vitro stability studies of DDS were also performed using three solutions to mimic the pH of the stomach (pH = 2), duodenum (pH = 6.6), and bloodstream (pH = 7.4). The results showed that stable and uniform DDS were obtained, presenting inside a 3D network based on cellulose biomaterials and *Cannabis* fibers, with the ability to retain and release active substances of interest in a controlled way. The incorporation of *Cannabis* fibers in these systems also promoted an increase in DDS structure and compliance, inhibiting its degradation over time.

Finally, dermal DDS were developed using 3D matrixes of bleached *Eucalyptus globulus* and unbleached *Picea abies* cellulose fibers. To be applied in these structures, the cannabinoids from two samples of *Cannabis* flowers, after the decarboxylation process, were also incorporated into several oils of interest, being afterwards characterized by FTIR-ATR.

The strategy of design, development, and experimental and computational optimization of DDS with CBD as an active molecule, containing diverse combinations of *Cannabis* oil, *Cannabis* cellulose fibers, as well as *Cannabis* extract and incorporation of the flower after decarboxylation, constitutes an innovative approach in the development of formulations with added value for food supplementation, in the oral and dermic form, with high potential for industrial application.

Keywords

3D Cellulose-based Matrix; Cannabidiol (CBD); Cannabis; Cannabis Fibers; Cannabis Oil; Cryo-milling; Drug Delivery System (DDS); Nano Fibrillated Cellulose (NFC)

Índice

Capítulo I – Introdução	1
1. Introdução	3
1.1. Motivação	4
1.2. Objetivos	4
Capítulo II – Revisão Bibliográfica	5
2. Revisão Bibliográfica	7
2.1. A <i>Cannabis Sativa</i> L.	7
2.1.1. Fitocanabinóides	8
2.1.1.1. Descoberta e função do recetor canabinóide	11
2.1.1.2. Propriedades dos fitocanabinóides: THC e CBD	11
2.1.1.3. Farmacocinética	12
2.1.1.3.1. Absorção	12
2.1.1.3.2. Distribuição	13
2.1.1.3.3. Metabolismo	13
2.1.1.3.4. Eliminação	13
2.1.1.4. Farmacodinâmica	14
2.1.2. Aplicações da <i>Cannabis sativa</i> L.	14
2.1.2.1. Área Alimentar	14
2.1.2.2. Aplicações Terapêuticas	15
2.1.2.3. Aplicações Dérmicas	16
2.2. Sistemas de Entrega de Fármacos	17
2.2.1. Utilidade da nanotecnologia no desenvolvimento de DDS	18
2.2.2. Desenvolvimento de DDS diferenciados	19
2.2.2.1. Celulose	19
2.2.2.2. Desenvolvimento de DDS para aplicação oral	19
2.2.2.3. Desenvolvimento de DDS para aplicações dérmicas	20
2.2.2.4. Estudos de estabilidade dos DDS	21
2.3. Simulação computacional de matrizes 3D à base de materiais celulósicos	21
Capítulo III – Materiais e Métodos	25
3. Materiais e Métodos	27
3.1. Materiais	27
3.1.1. Óleo de <i>Cannabis</i>	27
3.1.2. Matriz de base celulósica do DDS	28
3.1.3. Amostras de flor e extrato de <i>Cannabis</i>	28
3.1.4. Estudos estruturais dos DDS	29
3.2. Métodos	29
3.2.1. Preparação das diversas soluções	30
3.2.2. Obtenção do óleo de <i>Cannabis</i>	30
3.2.3. Obtenção das fibras de <i>Cannabis</i>	31
3.2.3.1. Processo de cozimento	31
3.2.3.2. Processo de branqueamento	31
3.2.4. Desenvolvimento de DDS	32
3.2.4.1. Aplicações de suplementos alimentares	32

3.2.4.2. Aplicações terapêuticas orais	32
3.2.4.2.1. Desenvolvimento de DDS poliméricos incorporados com extrato de Cannabis	32
3.2.4.2.2. Desenvolvimento de DDS poliméricos incorporados com fibras de Cannabis, NFC e extrato de Cannabis	32
3.2.4.2.3. Desenvolvimento de DDS incorporados com a formulação crio-moída	33
3.2.4.2.4. Análise estrutural dos DDS	33
3.2.4.3. Aplicações dérmicas	34
3.2.4.3.1. Matriz 3D de celulose	34
3.2.4.3.1.1. Pastas de celulose	34
3.2.4.3.1.2. Desintegração das pastas de celulose	34
3.2.4.3.1.3. Homogeneização das fibras de celulose	34
3.2.4.3.1.4. Obtenção de estruturas de fibras de celulose em malha	35
3.2.4.3.1.5. Refinação das pastas de celulose	35
3.2.4.3.2. Produção de um óleo incorporado com canabinóides	35
3.2.4.3.2.1. Processo de descarboxilação	35
3.2.4.3.2.2. Processo de incorporação	36
3.2.5. Teor de Matéria Seca	36
3.2.6. Caracterização	37
3.2.6.1. Análise morfológica das fibras de Cannabis	37
3.2.6.1.1. Microscopia ótica	37
3.2.6.1.2. Microscopia Eletrônica de Varrimento	37
3.2.6.2. Análise FTIR-ATR	38
3.2.6.3. Espectroscopia de Raio-X por dispersão em energia	39
3.2.7. Simulação Computacional	39
3.2.8. Análise Estatística	39
Capítulo IV – Resultados e Discussão	41
4. Resultados e Discussão	43
4.1. Obtenção e caracterização do óleo de Cannabis	44
4.1.1. Processo de crio-moagem	44
4.1.2. EDX das sementes de cânhamo	45
4.2. Obtenção e caracterização das fibras de Cannabis a partir do Processo Alcalino	46
4.2.1. Caracterização das fibras de Cannabis por Microscopia Ótica	47
4.2.2. Caracterização das fibras de Cannabis por SEM	49
4.3. Desenvolvimento de DDS inovadores	50
4.3.1. DDS de suplementos alimentares	50
4.3.2. DDS para aplicações terapêuticas orais	51
4.3.2.1. Análise estrutural dos diversos DDS	54
4.3.2.1.1. DDS incorporados com extrato de Cannabis	55
4.3.2.1.2. DDS incorporados com óleo de Cannabis	57
4.3.3. DDS para aplicações dérmicas	58
4.3.3.1. Incorporação dos canabinóides em diversos óleos de interesse	62
4.3.3.2. Caracterização dos diversos óleos produzidos por FTIR-ATR	63
4.3.3.2.1. Óleos alimentares incorporados com canabinóides	64

provenientes da amostra A da flor de <i>Cannabis</i>	
4.3.3.2.2. Óleos dérmicos incorporados com canabinóides	
provenientes da amostra B da flor de <i>Cannabis</i>	65
Capítulo V – Conclusões e Perspetivas Futuras	67
5. Conclusões e Perspetivas Futuras	69
Bibliografia	73
Bibliografia	75
Anexos	I
Anexo A. Comunicação	II
Anexo B. Preparação das diversas soluções	VII
Anexo C. Normas ISO	IX
Anexo D. Cálculo dos rendimentos	XIV
Anexo E. Dados obtidos relativamente aos diversos tipos de estruturas em malha fibrosas celulósicas refinadas	XV
Anexo F. Cálculo do ratio para cada óleo de interesse	XVIII
Anexo G. Espectros FTIR-ATR dos diversos óleos incorporados com canabinóides	XIX

Lista de Figuras

Capítulo II – Revisão Bibliográfica	5
Figura 2.1 Estruturas moleculares dos dois principais canabinóides presentes na <i>Cannabis sativa</i> L., o THC (a) e o CBD (b) (elaborado no programa ACD/ChemSketch 2021, por Paulo Saraiva) (adaptado de (Pellati et al., 2018)).	8
Figura 2.2 A via sintética dos canabinóides: o ácido canabigerólico (CBGA) é o precursor comum dos canabinóides. É sintetizado através de uma alquilação da porção fenólica do ácido olivetólico com o componente terpenoide do pirofosfato de geranilo (GPP). A reação é catalisada por uma geranil-pirofosfato-ácido olivetólico geraniltransferase (GOT). O ácido olivetólico é originado na via citosólica do policetídeo através de uma condensação aldólica da hexanoil-coenzima A (CoA) com três moléculas de malonil-CoA, que é catalisada pela enzima policetídeo sintase (PKS) na presença da ciclase do ácido olivetólico (OAC). O GPP é sintetizado pela via do fosfato de metileritritol plastidial (MEP). No citosol, o CBGA é convertido na forma ácida dos três principais canabinóides, ácido tetrahydrocanabinol (THCA) que na forma ácida não apresenta atividade psicoativa, ácido canabidiólico (CBDA) e ácido canabicroménico (CBCA). GPS: geranil pirofosfato sintase; IPP: pirofosfato de isopentenilo; OAC: ciclase de ácido olivetólico (Adaptado de (Farinon, Molinari, Costantini, & Merendino, 2020)).	9
Figura 2.3 Biossíntese e vias de conversão dos principais canabinóides presentes na <i>Cannabis sativa</i> L. (CBGA: ácido canabigerólico, CBG: canabigerol, CBDA: ácido canabiólico, CBD: canabidiol, THCA: ácido tetrahydrocanabinólico, THC: tetrahydrocanabinol, CBN: canabinol, CBDV: canabidivarina) (Adaptado de (Fathordoobady, Singh, Kitts, & Pratap Singh, 2019)).	10
Figura 2.4 Estrutura molecular 3D do canabinóide CBD (a) e THC (b) (elaborado no programa ACD/ChemSketch 2021, por Paulo Saraiva) (adaptado de (Pellati et al., 2018)).	10
Figura 2.5 Diversos DDS empregues no diagnóstico e terapia de várias patologias (Adaptado de (Conniot et al., 2014; Panzarini, Inguscio, Tenuzzo, Carata, & Dini, 2013)).	17
Figura 2.6 A eficácia da utilização de nanopartículas como veículos de entrega de agentes terapêuticos encontra-se altamente dependente dos seus tamanhos e formas, afetando diretamente o seu movimento para o interior/exterior dos capilares sanguíneos, bem como, a sua velocidade de movimentação na corrente sanguínea (adaptado de (Farokhzad & Langer, 2009)).	18
Figura 2.7 Estrutura 3D de base celulósica obtida através do modelo KCL-PAKKA (adaptado de (Alava & Niskanen, 2006)).	22
Figura 2.8 Esquematisação, passo a passo, do modelo computacional 3D desenvolvido e validado por Curto (adaptado de (J.M.R. Curto, 2012)).	22
Figura 2.9 Esquema representativo da simulação computacional das estruturas celulósicas utilizando o modelo computacional validado por (J.M.R. Curto, 2012). Inicialmente, as propriedades físicas e dimensionais das fibras são introduzidas e as estruturas são obtidas através da sua deposição aleatória formando uma matriz 3D. Na deposição individual	23

de cada fibra utiliza-se um mecanismo de autómatos celulares. Por fim, a imagem da direita é a matriz porosa obtida tendo em conta os modelos 3D das fibras em causa (adaptado de (Flávia P. Morais & Curto, 2022)).

Capítulo III – Materiais e Métodos	25
Figura 3.1	Sementes de cânhamo descascadas (a) e sua informação nutricional presente no rótulo (b). 27
Figura 3.2	Amostras contendo CBD utilizadas ao longo do estudo, chá verde contendo extrato de <i>Cannabis</i> (a) e flor de <i>Cannabis</i> . (b). 29
Figura 3.3	Metodologia experimental e computacional desenvolvida ao longo do estudo. 29
Figura 3.4	Esquema ilustrativo das diversas características do CryoMill®. 31
Figura 3.5	Esquema representativo da metodologia utilizada no processo de descarboxilação. 36
Capítulo IV – Resultados e Discussão	41
Figura 4.1	Esquema das diversas metodologias aplicadas ao longo do estudo e informações relativas a cada etapa efetuada. 43
Figura 4.2	Características utilizadas nas sementes de cânhamo provenientes da técnica CryoMill®. 44
Figura 4.3	Esquema dos diversos ciclos CryoMill® realizados em sementes de cânhamo. 45
Figura 4.4	Imagem SEM (esquerda) e espectro de análise EDX (direita) das sementes de cânhamo crio-moídas. 46
Figura 4.5	Esquema ilustrativo das diversas etapas empregues na obtenção das fibras de <i>Cannabis</i> . 46
Figura 4.6	Imagens microscópicas das fibras de <i>Cannabis</i> obtidas através do processo alcalino. Foram utilizadas 2 óticas distintas de modo obter imagens diferenciadas e objetivas: 10x nas primeiras seis imagens e ótica 40x nas restantes. 48
Figura 4.7	Histograma relacionando os diâmetros médios das fibras de <i>Cannabis</i> observadas microscopicamente, com o número médio de fibras analisadas. No total, foram analisadas 114 fibras ao longo de toda a lâmina. 48
Figura 4.8	Imagens SEM das fibras de <i>Cannabis</i> obtidas através do processo alcalino, com ampliação de 30x (a), 50x (b), 100x (c) e 1000x (d). 49
Figura 4.9	Esquema ilustrativo da constituição dos diversos DDS inovadores produzidos. 50
Figura 4.10	Estudo estrutural dos DDS 2:1:1 após serem submetidos a diversas soluções com pH diferenciado. 56
Figura 4.11	Estudo estrutural dos DDS 2:2:1 após serem submetidos a diversas soluções com pH diferenciado. 56
Figura 4.12	Estudo estrutural dos DDS 2:2:1, contendo fibras de <i>Cannabis</i> (FC) e NFC na sua constituição, após serem submetidos a diversas soluções com pH diferenciado. 56
Figura 4.13	Estrutura dos DDS 2:2:0,1, contendo o óleo de <i>Cannabis</i> como sua substância ativa, após serem submetidos a diversas soluções com pH diferenciado. 57
Figura 4.14	Estudo estrutural dos DDS 2:2:0,5, contendo o óleo de <i>Cannabis</i> como sua substância ativa, após serem submetidos a diversas soluções com pH diferenciado. 58
Figura 4.15	Imagens SEM das fibras de <i>Picea abies</i> não-branqueadas sem refinação (a) e com refinação de 7500 revoluções PFI-mill (b), com uma 59

- ampliação de 100x.
- Figura 4.16** Modelação computacional da matriz celulósica 3D de fibras de BNC (a), adaptado de (Nicu, Ciolacu, & Ciolacu, 2021), e de fibras de *Cannabis* (b). 59
- Figura 4.17** Esquema exemplificativo das três camadas celulósicas que constituem os DDS para aplicações dérmicas, otimizados por métodos computacionais. A camada exterior caracteriza-se por ter reduzida porosidade, e propriedades barreira, obtida utilizando nano fibras de celulose vegetal, do caule de *Cannabis*, após nano fibrilação e celulose bacteriana (0-0,1%) enquanto as camadas intermédia e de contacto com a pele se otimizam para obter a porosidade e suavidade pretendidas, utilizando para o efeito a combinação ideal de fibras de *Cannabis* na escala micro (90-100%) e nano, na forma de *micro/nano fibrillated cellulose* (M/NFC), assim como percentagens estratégicas de fibras de *Picea abies*, e de *Eucalyptus globulus* (adaptado de (Martins et al., 2018; Morais, Flávia P., Curto, 2022; F P Morais & Curto, 2018; Flávia P. Morais & Curto, 2022; Flávia P. Morais, Simões, & Curto, 2020; Saraiva, Moreira, Lopes, Silva, & Curto, 2022)). 61
- Figura 4.18** Análise comparativa do espectro de três produtos alimentares provenientes da *Cannabis*: semente, óleo e farinha. As regiões espectrais dos macronutrientes estão indicadas na figura (adaptado de (Siano et al., 2019)). 63

Lista de Tabelas

Capítulo III – Materiais e Métodos	25
Tabela 3.1 Soluções empregues na realização dos estudos estruturais dos diversos DDS.	33
Tabela 3.2 Valores de TMS obtidos para diversos materiais ao longo do estudo.	37
Tabela 3.3 Características empregues na técnica FTIR-ATR.	38
Tabela 3.4 Zonas espectroscópicas dos diversos canabinóides (adaptado de (Cirrincione et al., 2021)).	38
Capítulo IV – Resultados e Discussão	41
Tabela 4.1 Descrição dos diversos DDS elaborados no estudo. As proporções foram realizadas em termos de massa (Alg – Alginato, CMC – Carboximetilcelulose, FC – Fibras de Cannabis, NFC – Nano celulose).	52
Tabela 4.2 Possíveis conjugações dos constituintes empregues na formulação de DDS inovadores para diversas áreas de interesse.	54
Tabela 4.3 Diversos óleos utilizados no estudo. Os óleos foram utilizados em conjunto com duas amostras distintas de flor de Cannabis, A e B.	62

Lista de Acrónimos e Formulas Químicas

3D	Três Dimensões
7-OH-CBD	7-hidroxi-canabidiol
11-CoOOH-THC	11-carboxi-tetrahidrocanabinol
11-OH-THC	11-hidroxi-tetrahidrocanabinol
ALA	<i>Alpha-linolenic acid</i> (Ácido Alfolinolênico)
BHE	Barreira Hematoencefálica
BNC	<i>Bacterial Nano Cellulose</i> (Nano Celulose Bacteriana)
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
CB ₁	Recetor Canabinóide tipo 1
CB ₂	Recetor Canabinóide tipo 2
CBC	Canabicromeno
BCBA	Ácido Canabicroménico
CBD	Canabidiol
CBDA	Ácido Canabidiólico
CBDV	Canabidivarina
CBG	Canabigerol
CBGA	Ácido Canabigerólico
CBN	Canabinol
CMC	Carboximetilcelulose
CoA	Coenzima A
CYP P450	Citocromo P450
DDS	<i>Drug Delivery System</i> (Sistema de Entrega de Fármacos)
eCBs	Endocanabinóides
EDX	<i>Energy-Dispersive X-Ray Spectroscopy</i> (Espectroscopia de Raio-X por Dispersão em Energia)
FTIR-ATR	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy with Attenuated Total Reflection</i> (Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier acoplada à Técnica de Reflexão Total Atenuada)
GOT	<i>Geranyl-pyrophosphate-olivetolic acid geranyltransferase</i> (Geranil-pirofosfato-ácido Olivetólico Geraniltransferase)
GPP	Pirofosfato de Geranilo
GPS	Geranil Pirofosfato Sintase
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogénio
HCl	Ácido Clorídrico
IPP	<i>Isopentenyl pyrophosphate</i> (Pirofosfato de Isopentenilo)
K ₂ HPO ₄	Hidrogeno Fosfato Dipotássico
LA	Linoleic Acid (Ácido Linoleico)

MEP	<i>Methylerythritol Phosphate</i> (Fosfato de Metileritritol)
NaOH	Hidróxido de Sódio
NFC	<i>Nanofibrillated Cellulose</i> (Celulose Nano Fibrilada)
OAC	<i>Olivetolic Acid</i> (Ácido Olivetólico)
PKS	Policetídeo Sintase
SEC	Sistema Endocanabinóide
SEM	<i>Scanning Eletron Microscopy</i> (Microscopia Eletrónica de Varrimento)
SNC	Sistema Nervoso Central
THC	Tetrahydrocannabinol
THCA	Ácido Tetra-hidrocanabinol
TMS	Teor de Matéria Seca

Capítulo I

Introdução

1. Introdução

A *Cannabis sativa* L. é uma planta que nos últimos tempos tem suscitado cada vez mais atenção por parte de diversas entidades e empresas, quer no seu uso medicinal, quer na utilização das suas fibras, de elevada resistência e flexibilidade, sementes e óleo, ricas em compostos nutricionais benéficos para a saúde, e os seus compostos bioativos, de extrema importância no tratamento de diversas patologias, sendo cada vez mais utilizada em terapias.

Dos múltiplos compostos bioativos presentes na *Cannabis*, o tetrahidrocanabinol (THC) e o canabidiol (CBD), são os compostos de maior interesse farmacológico e terapêutico, sendo utilizados em diversas terapias.

De forma a proporcionar uma elevada taxa de efeito terapêutico num dado local de ação específico, estes compostos podem ser incorporados em *Drug Delivery Systems* (DDS) à base de polímeros. Estes DDS são compostos por uma matriz 3D celulósica onde ficam retidos os compostos ativos, com sua libertação retardada e controlada. Através deste encapsulamento, os compostos podem ser transportados até ao local de ação predefinido com posterior controlo e otimização da taxa de libertação do agente terapêutico, através de simulações computacionais da rede 3D celulósica. Através deste mecanismo, estes DDS são empregues em diversas áreas de interesse, das quais: (1) alimentar; (2) terapêutica e (3) dérmica.

Surgiu por parte de uma empresa, sediada no Fundão, Portugal, denominada Canna Forest®, um interesse no desenvolvimento de linhas de suplementos nutricionais com óleo de *Cannabis* e várias percentagens de CBD proveniente de flores e/ou extrato, com formas de administração oral e dérmica, e simultaneamente o interesse no estudo da possibilidade da reutilização dos caules provenientes de suas plantações de *Cannabis*.

De forma a contribuir para o desafio que nos foi proposto, fez-se um extenso planeamento experimental que permitiu estudar no laboratório a melhor forma para a obtenção das fibras de *Cannabis*, a partir dos caules de cânhamo, através de um Processo Alcalino. Fez -se também um planeamento de desenvolvimento e projeto de várias linhas de DDS, com combinações de polímeros como o alginato e a CMC, fibras de celulose na escala micro e nano, e que posteriormente foram utilizados na elaboração das matrizes 3D dos DDS. Estas matrizes que têm como função reter e libertar de forma controlada as moléculas ativas, foram otimizadas recorrendo a metodologias de simulação computacional, de forma a poder sugerir à empresa várias possibilidades de produtos inovadores, relativamente ao que existe atualmente no mercado.

1.1. Motivação

No desenvolvimento e investigação de DDS de *Cannabis* de base celulósica o desafio principal é a otimização da proporção dos diversos constituintes a utilizar, para a obtenção de uma rede 3D celulósica estável. Este trabalho torna-se ainda mais interessante e inovador por explorar a possibilidade de formular DDS 100% à base de *Cannabis*, utilizando deste modo a totalidade da planta, diminuindo assim o uso de outros constituintes ou fibras. Para além disso, a incorporação dos diversos canabinóides num dado óleo de interesse, incluindo o óleo *Cannabis*, permite desenvolver formulações para aplicação oral e dérmica, de forma a controlar a dosagem e libertar os princípios ativos de forma controlada e estável.

1.2. Objetivos

O objetivo principal/geral do presente trabalho é desenvolver e caracterizar DDS inovadores à base de *Cannabis* para aplicações de (1) suplementos alimentares, (2) terapêuticas orais e (3) sistemas dérmicos. Para este propósito, os objetivos específicos incluíram:

- (1) Investigar e comparar novas formas de disponibilizar suplementos alimentares à base de óleo de *Cannabis*, obtido através de processos de crio-moagem a partir das sementes;
- (2) Investigar a eficácia e estabilidade de DDS contendo uma matriz 3D à base de fibras de *Cannabis*, celulose nano fibrilada (NFC) e CMC, com encapsulação e retenção do extrato e óleo de *Cannabis*, na libertação prolongada e controlada destas substâncias terapêuticas;
- (3) Investigar e otimizar matrizes 3D de fibras de celulose e de *Cannabis* com posterior incorporação de óleos com canabinóides, na retenção destes na estrutura 3D.

Capítulo II

Revisão Bibliográfica

2. Revisão Bibliográfica

2.1 A *Cannabis sativa* L.

A *Cannabis sativa* L., comumente conhecida como cânhamo, é uma espécie de planta herbácea e anemófila, altamente variável e complexa, pertencente à família *Cannabaceae*. De acordo com estudos filogenéticos baseados em análises moleculares e estudos de homologia de sequências de DNA, a maioria dos investigadores concorda que esta espécie surgiu na Ásia central e foi introduzida na Europa como uma planta agrícola cultivada (McPartland, Guy, & Hegman, 2018). No entanto, um trabalho recente forneceu evidências de que a *Cannabis sativa* L. era nativa também da Europa (McPartland et al., 2018). Esta planta possui um genoma diploide composto por nove autossomas e um par de cromossomas sexuais (X e Y) (Ming, Bendahmane, & Renner, 2011) e o seu genoma foi recentemente sequenciado (van Bakel et al., 2011). Sempre existiu uma controvérsia entre os taxonomistas botânicos acerca do número de espécies que compõem o género da *Cannabis*; contudo, atualmente existe um consenso sobre a nomenclatura proposta por Small e Cronquist, em 1976, onde a *Cannabis sativa* é monotípica, composta por duas subespécies: *sativa* e *indica*, com base na quantidade de canabinóides, o tetrahydrocannabinol (THC) e o canabidiol (CBD). A primeira subespécie é subdividida em duas variedades: *sativa* (baixo THC, domesticada) e espontânea (baixo THC, *wild-type*); a segunda subespécie é dividida em: *indica* (alto THC, domesticada) e *kafiristanica* (alto THC, *wild-type*) (Aliferis, Bernard-perron, Smith, & Stewart, 2020). Considerada uma cultura multiuso, sustentável e de baixo impacto ambiental, a *Cannabis sativa* L. tem diversos campos de aplicação, desde a agricultura até às indústrias têxteis, alimentares e farmacêuticas; uma vez que ao ser uma planta altamente versátil, é possível obter diversos produtos de interesse como fibras, materiais de bioconstrução, sementes e óleos com propriedades nutricionais e funcionais, e compostos bioativos de interesse farmacológico (Irakli, Tsaliki, Kalivas, Kleisiaris, & Sarrou, 2019). Assim, esta planta pode ser cultivada essencialmente para três propósitos principais: industrial, narcótico e medicinal (Zaami, Di Luca, Di Luca, & Montanari Vergallo, 2018). No entanto, apesar da controvérsia do uso e da exploração da *Cannabis sativa* L., a recente legalização do seu uso para fins medicinais e outros, dentro do quadro legislativo correspondente, em combinação com as propriedades notáveis dos canabinóides, representam um impulso para a aceleração e intensificação da sua pesquisa e desenvolvimento.

2.1.1. Fitocanabinóides

A planta *Cannabis* contém centenas de fitoquímicos, que incluem fitocanabinóides, terpenos e compostos fenólicos (Schurman, Lu, Kendall, Howlett, & Lichtman, 2019). O principal fator discriminante relacionado com os diferentes usos pretendidos da *Cannabis sativa* L. é precisamente, o nível de dois fitoquímicos: o único composto psicoativo e tóxico da planta, o THC; e o canabidiol não-psycoativo, o CBD (Figura 2.1).

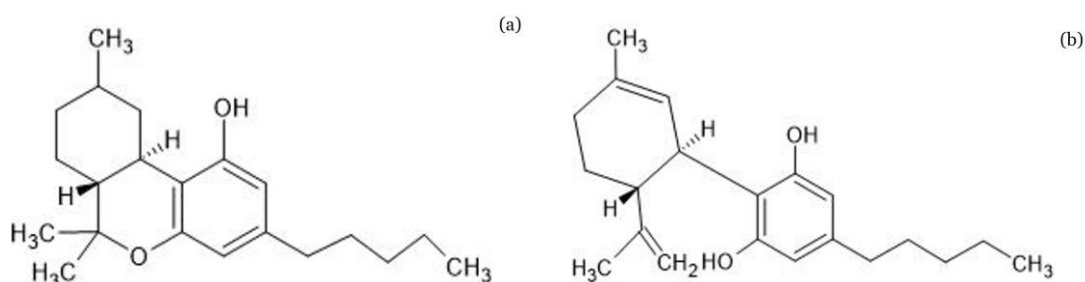


Figura 2.1 – Estruturas moleculares dos dois principais canabinóides presentes na *Cannabis sativa* L., o THC (a) e o CBD (b) (elaborado no programa ACD/ChemSketch 2021, por Paulo Saraiva (adaptado de (Pellati et al., 2018)).

Ambos pertencem à classe dos canabinóides que incluem mais de 100 metabólitos secundários pertencentes à família dos compostos terpenofenólicos. Esses compostos são sintetizados, coletados e armazenados em tricomas glandulares pedunculados, que são minúsculas glândulas epidérmicas secretoras (Aliferis et al., 2020; Irakli et al., 2019). Estas glândulas estão essencialmente presentes e abundantes na inflorescência da planta feminina e em menor número nas folhas e caules, enquanto que nas raízes e sementes estão ausentes e, por isso, estas partes da planta não contêm canabinóides (Schurman et al., 2019). As plantas de *Cannabis sativa* L. cultivadas para fins industriais, popularmente chamadas “*fiber-type*”, que são cultivadas para obtenção de fibras, sementes e seus derivados, contêm um baixo nível de THC (<0,3%); enquanto as plantas de *Cannabis sativa* L. cultivadas para fins narcóticos são caracterizadas por altos níveis de THC. Por outro lado, os cultivos para fins medicinais são caracterizados tanto por altos níveis de THC, como altos níveis de CBD (Farinon et al., 2020). Nos últimos anos, vários trabalhos esclareceram a via biossintética dos canabinóides (Farinon et al., 2020; Taura et al., 2009). De acordo com esses estudos, existe um precursor comum de todos os principais canabinóides, o ácido canabigerólico (CBGA). No citosol, o CBGA é convertido na forma ácida dos três principais canabinóides, a partir dos quais se originarão outros compostos canabinóides relacionados, nomeadamente o ácido tetra-hidrocanabinol (THCA), que na forma ácida não tem atividade psicoativa; o ácido canabidiólico (CBDA); e o ácido canabicroménico (CBCA). Essa conversão é catalisada por uma oxidociclase específica para cada canabinóide (THCA-sintase, CBDA-sintase e CBCA-sintase, respetivamente) (Figura 2.2).

Finalmente, a forma ácida de cada canabinóide sofre descarboxilação não enzimática para sua forma neutra e biologicamente ativa, ou seja, THC com atividade psicoativa, CBD e canabicromeno (CBC) que são encontrados em altos níveis em plantas jovens (Figura 2.3), onde é possível evidenciar a biodisponibilidade destes canabinóides através da análise da sua estrutura molecular 3D (Figura 2.4) (Booth, Page, & Bohlmann, 2017; Rotherham & Harbison, 2011).

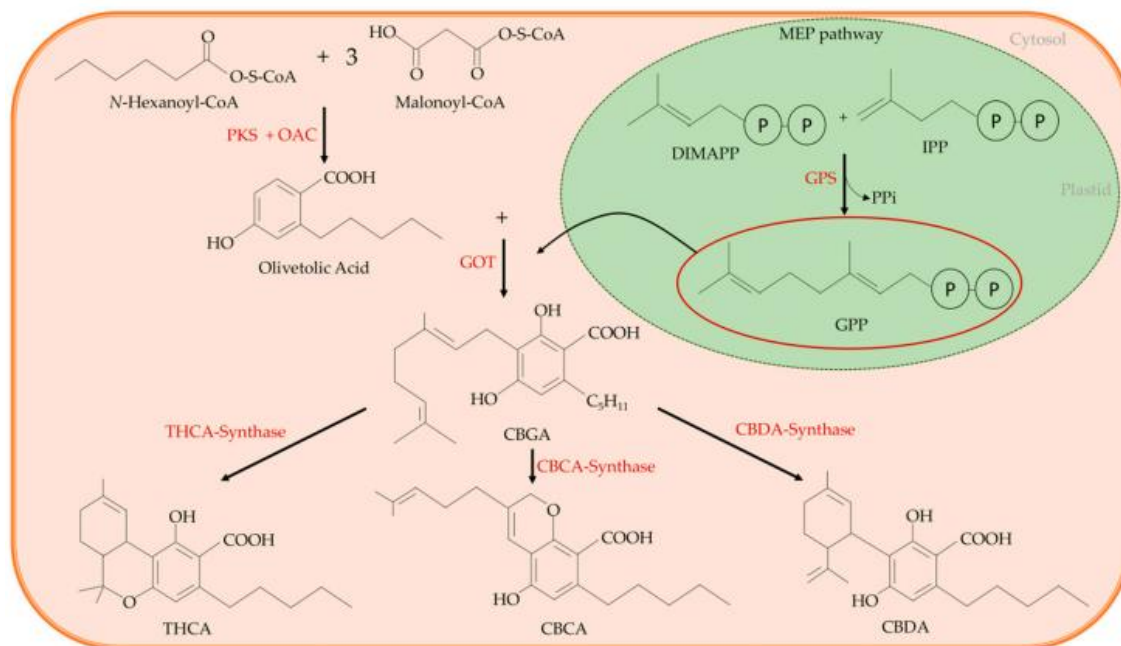


Figura 2.2 – A via sintética dos canabinóides: o ácido canabigerólico (CBGA) é o precursor comum dos canabinóides. É sintetizado através de uma alquilação da porção fenólica do ácido olivetólico com o componente terpenoide do pirofosfato de geranilo (GPP). A reação é catalisada por uma geranyl-pirofosfato-ácido olivetólico geraniltransferase (GOT). O ácido olivetólico é originado na via citosólica do policetídeo através de uma condensação aldólica da hexanoil-coenzima A (CoA) com três moléculas de malonil-CoA, que é catalisada pela enzima policetídeo sintase (PKS) na presença da ciclase do ácido olivetólico (OAC). O GPP é sintetizado pela via do fosfato de metileritritol plastidial (MEP). No citosol, o CBGA é convertido na forma ácida dos três principais canabinóides, ácido tetrahydrocanabinol (THCA) que na forma ácida não apresenta atividade psicoativa, ácido canabidiólico (CBDA) e ácido canabicroménico (CBCA). GPS: geranyl pirofosfato sintase; IPP: pirofosfato de isopentenilo; OAC: ciclase de ácido olivetólico (Adaptado de (Farinon et al., 2020)).

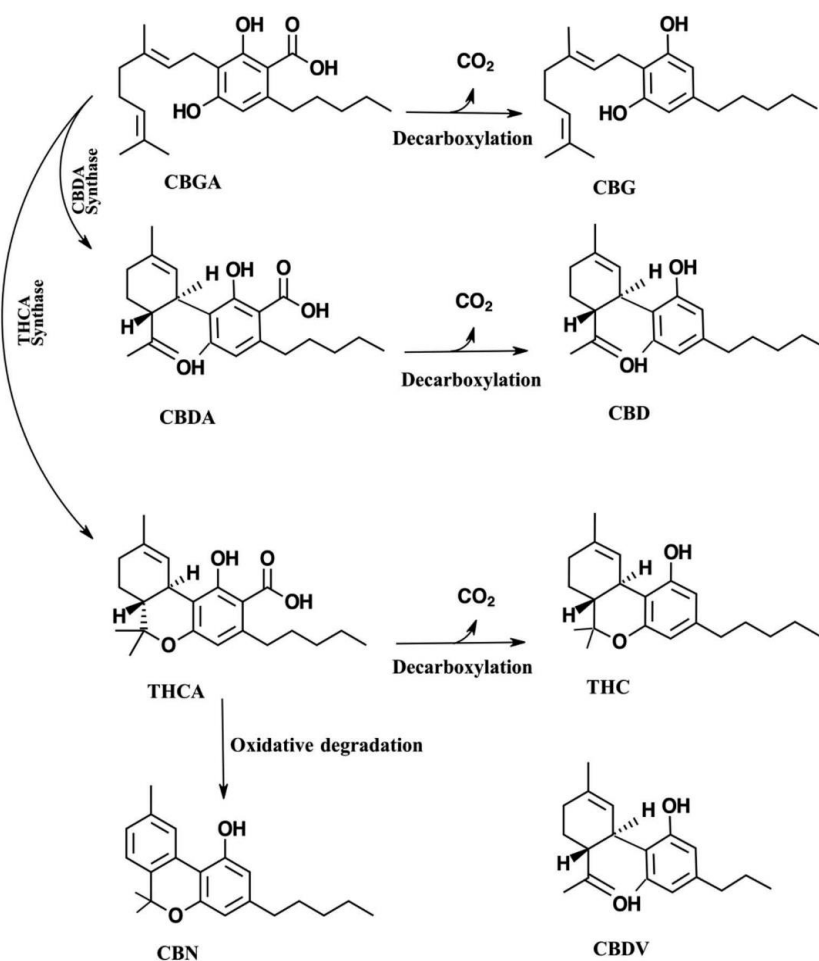


Figura 2.3 – Biossíntese e vias de conversão dos principais canabinóides presentes na *Cannabis sativa* L. (CBGA: ácido canabigerólico, CBG: canabigerol, CBDA: ácido canabiólico, CBD: canabidiol, THCA: ácido tetrahydrocanabinólico, THC: tetrahydrocanabinol, CBN: canabinol, CBDV: canabidivarina) (Adaptado de (Fathordoobady et al., 2019)).

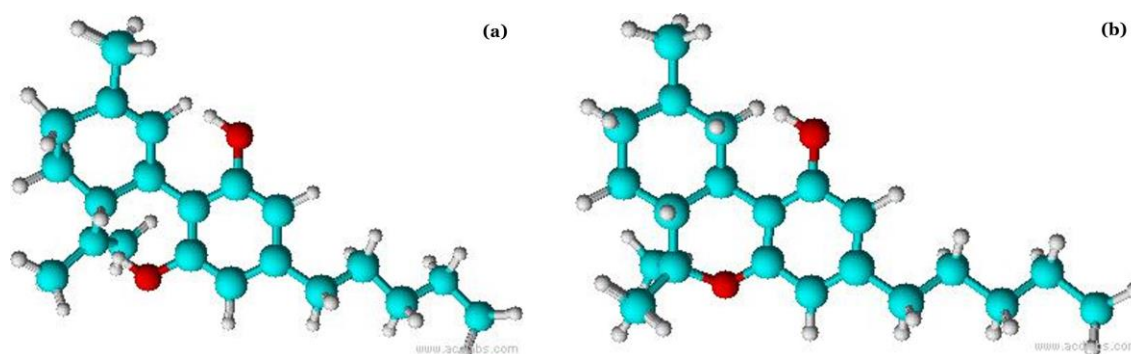


Figura 2.4 – Estrutura molecular 3D do canabinóide CBD (a) e THC (b) (elaborado no programa ACD/ChemSketch 2021, por Paulo Saraiva (adaptado de (Pellati et al., 2018))).

2.1.1.1. Descoberta e função do recetor canabinóide

Um grande impulso para a pesquisa voltada para a compreensão dos alvos moleculares dos canabinóides incluiu a identificação do THC como o principal constituinte psicoativo da *Cannabis*. Além disso, extensos esforços em química medicinal forneceram ferramentas úteis para ligar e ativar locais de ligação de recetores canabinóides específicos em tecidos biológicos. O desenvolvimento de antagonistas altamente seletivos para cada um desses recetores ajudou muito a investigação da farmacologia dos recetores canabinóides, bem como forneceu informações sobre a função do sistema canabinóide endógeno (Schurman et al., 2019). O sistema endocanabinóide (SEC) desempenha um papel no sistema nervoso central em desenvolvimento, enquanto no sistema nervoso maduro modula a atividade e a função da rede neuronal. O SEC compreende canabinóides endógenos (endocanabinóides [eCBs]), recetores de canabinóides e as proteínas que transportam, sintetizam e degradam os eCBs (Lu & Mackie, 2021). É importante notar que a maioria dos componentes do SEC são multifuncionais. Assim, em vez de ser um sistema discreto e isolado, o SEC influencia e é influenciado por muitas outras vias de sinalização. Isso é especialmente importante a ser considerado ao avaliar os efeitos dos medicamentos direcionados a este sistema. Embora a *Cannabis* contenha muitos compostos bioativos, a maioria dos efeitos psicoativos classicamente associados à *Cannabis* parecem ser mediados pela interação do THC com os recetores canabinóides. O CBD é outro constituinte da *Cannabis*, presente em níveis variáveis, que interage com o SEC, bem como outros sistemas neuromoduladores (Lu & Mackie, 2021). O sistema endocanabinóide refere-se coletivamente aos recetores canabinóides: (1) Recetor Canabinóide tipo 1 (CB1) e (2) Recetor Canabinóide tipo 2 (CB2), que são acionados por ligantes canabinóides produzidos endogenamente: o endocanabinóide (bem como por THC, outros fitocanabinóides e canabinóides sintéticos) e suas enzimas biossintéticas e degradativas (Schurman et al., 2019). A criação de camundongos mutantes nos quais o recetor CB1 ou o recetor CB2 foram silenciados geneticamente, forneceu uma ferramenta complementar poderosa para distinguir recetores alvos de agonistas canabinóides e revelar funções potenciais do sistema canabinóide endógeno (Schurman et al., 2019).

2.1.1.2. Propriedades dos fitocanabinóides: THC e CBD

Existe um crescente interesse clínico e público no uso de canabinóides exógenos para o controlo tanto de doenças, como de sintomas. No entanto, ao contrário da maioria dos medicamentos clinicamente disponíveis, existem poucas informações sobre a farmacocinética e farmacodinâmica dos canabinóides, sendo necessário um aumento do conhecimento para a prescrição ideal desses medicamentos. A maioria dos medicamentos de *Cannabis* contém uma grande variedade de compostos químicos. O constituinte canabinóide psicoativo primário é o THC, que produz muitos dos efeitos adversos (Atakan, 2012).

As formulações também podem conter uma alta percentagem de CBD, um canabinóide não psicoativo (Russo & McPartland, 2003) relatado como analgésico (Karst, Matthias MD, PhD; Kahlid Salim, MS; Sumner Burstein, PhD; Ingomar Conrad, MD; Ludwig Hoy, PhD; Udo Schneider, MD, 2003), neuroprotetor (Hampson, Grimaldi, Axelrod, & Wink, 1998), anticonvulsivante (Van den Elsen et al., 2014) e com propriedades anti-inflamatórias (Malfait et al., 2000; Van den Elsen et al., 2014). Enquanto o THC é um agonista parcial dos recetores CB1 e CB2 no sistema canabinóide endógeno e exerce seus efeitos psicoativos e moduladores da dor via agonismo CB1, o CBD tem relativamente pouca afinidade pelos locais ortostáticos desses recetores e pode inibir a ligação do THC aos recetores CB1 através de outro mecanismo. Também é relatado que o CBD se liga a outros recetores não canabinóides (Laprairie, Bagher, Kelly, & Denovan-Wright, 2015). Os recetores CB1 estão localizados principalmente no sistema nervoso central (SNC), mas também estão presentes no sistema nervoso periférico, órgãos e tecidos periféricos. Os recetores CB2 são predominantemente expressos em tecidos imunes, e podem ocorrer adicionalmente no Sistema Nervoso Central (SNC) (Onaivi et al., 2006).

2.1.1.3. Farmacocinética

Tanto a farmacocinética, como os efeitos observados com medicamentos de *Cannabis* estão altamente dependentes da formulação e da via de administração.

2.1.1.3.1. Absorção

Os canabinóides administrados via inalação exibem uma farmacocinética similar àqueles administrados por via intravenosa (Lucas, Galettis, & Schneider, 2018). Após a inalação, os picos das concentrações de THC e CBD são alcançados rapidamente (dentro de 3-10 min) e as concentrações máximas são superiores em relação à ingestão oral (Huestis, 2007; Newmeyer et al., 2016). A biodisponibilidade do THC após a inalação varia entre 10% e 35%, enquanto o CBD apresenta uma biodisponibilidade sistémica média de 31% (Lucas, Galettis, & Schneider, 2018). A entrega inalatória ou oromucosa de canabinóides evita ou reduz o extenso metabolismo da primeira passagem observada após a administração. Preparações oromucosais submetidas a uma rápida absorção através da mucosa oral (e, portanto, úteis para sintomas que requerem alívio rápido), produzem concentrações mais altas em relação à via oral, mas concentrações mais baixas em relação à inalação do THC (Lucas, Galettis, & Schneider, 2018). O THC e o CBD são altamente lipofílicos e apresentam uma baixa biodisponibilidade por via oral (cerca de 6%) (Russo, 2011). As formulações orais de THC exibem uma absorção variável e passam por um extenso metabolismo hepático de primeira passagem, resultando numa concentração mais baixa no plasma, em relação à inalação, o que faz com que o pico da concentração seja atingido mais lentamente (≈ 120 min) (Lucas, Galettis, & Schneider, 2018). Após a administração oral do CBD, é observado um perfil de concentração no plasma semelhante à administração oral de THC. Com base nisso, as formulações orais podem ser úteis para pacientes que exigem um alívio sintomático durante um período mais longo (Lucas, Galettis, & Schneider, 2018).

2.1.1.3.2. Distribuição

Os canabinóides distribuem-se mais rapidamente em órgãos bem vascularizados, como por exemplo: pulmão, coração, cérebro e fígado (Gaston & Friedman, 2017; Lucas, Galettis, & Schneider, 2018). A distribuição varia de indivíduo para indivíduo e depende de estados de doença, influenciando a permeabilidade das barreiras do tecido sanguíneo (Lucas, Galettis, & Schneider, 2018; Lucas, Galettis, Song, et al., 2018). Com o uso crônico, os canabinóides podem acumular-se nos tecidos adiposos (Devinsky et al., 2014). Liberação subsequente e redistribuição (por exemplo, no contexto da perda de peso) pode resultar na persistência da atividade canabinóide por várias semanas após sua administração (Gaston & Friedman, 2017; Martin, Schneider, Lucas, & Galettis, 2018; Rosenberg, Tsien, Whalley, & Devinsky, 2015). Para além disso, os volumes de distribuição de CBD e THC são elevados (Lucas, Galettis, & Schneider, 2018).

2.1.1.3.3. Metabolismo

O metabolismo do THC é predominantemente hepático, pela via do citocromo p450 (CYP 450). O THC é principalmente metabolizado pelo 11-hidroxi-tetrahydrocannabinol (11-OH-THC) e 11-Carboxi-THC (11-COOH-THC), que sofre glucuronidação (Newmeyer et al., 2016) e é subsequentemente excretado nas fezes e na urina (Gaston & Friedman, 2017). O metabolismo também ocorre noutros tecidos que expressam o CYP450, incluindo o intestino delgado e o cérebro. O CBD também é hepaticamente metabolizado, principalmente pelas isoenzimas CYP2C19 e CYP3A4 e após a hidroxilação a 7-hidroxi-canabidiol (7-OH-CBD), continua a ocorrer o metabolismo hepático e excreção desses metabólitos (Gaston & Friedman, 2017). Pouco se sabe sobre a atividade farmacológica dos metabólitos da CBD em humanos (Ujváry & Hanuš, 2016).

2.1.1.3.4. Eliminação

Após 5 dias de sua inalação, 80-90% do THC é eliminado nas fezes (65%) e urina (20%) na forma de metabólitos hidroxilados e carboxilatos (Barnett, Chiang, Perez-Reyes, & Owens, 1982; Halldin, Widman, V Bahr, Lindgren, & Martin, 1982; Harvey, 1999; Hunt & Jones, 1980; Johansson, Agurell, Hollister, & Halldin, 2011; Ohlsson et al., 1982; PEREZ-REYES, OWENS, & DI GUISEPPI, 1981; Wall, Sadler, Brine, Taylor, & Perez-Reyes, 1983). Na urina estão presentes inúmeros metabólitos acídicos, sendo o 11-COOH-THC o mais abundante (I.J., 2005; Williams & Moffat, 2011). Uma única dose de THC pode resultar em metabólitos detetáveis na urina durante 12 dias, uma vez que a excreção destes metabólitos não diminui monotonamente, resultando numa variação de resultados positivos e negativos em análises urinárias (Grotenhermen, 2003; Law, Mason, Moffat, Gleadle, & King, 2011).

Ao contrário da urina, os metabolitos encontrados nas fezes podem ser de origem acídica ou neutra, sendo o 11-hidroxi-tetrahidrocannabinol (11-OH-THC) o predominante (Barnett et al., 1982; Harvey, 1999; Johansson et al., 2011; PEREZ-REYES et al., 1981; Wall et al., 1983).

2.1.1.4. Farmacodinâmica

A maioria dos efeitos provenientes dos fitocannabinóides são mediados através de ações agonistas ou antagonistas realizados nos seus específicos recetores (Grotenhermen, 2003). O canabinóide THC liga-se por ação agonista ao recetor CB₁, promovendo a formulação de uma série de sistemas neurotransmissores, resultando desta forma nos seus efeitos psicoativos e analgésicos (Piomelli, 2003; Sulcova, 2019). Para além disso, o THC poderá também induzir taquicardia, proveniente desta interação agonista com o recetor CB₁ presente em tecidos cardíacos (Dumont et al., 2009). Para além da interação com o recetor CB₁, o THC interage também agonisticamente com o recetor CB₂, onde promove a ativação deste recetor que posteriormente irá desencadear a inibição da adenilciclase (Sulcova*, 2019). No caso do CBD, este atua como um modulador alostérico negativo dos recetores CB₁, reduzindo desta forma a eficácia de uma interação agonista dos seus ligantes, dos quais o THC (Abrams, 2018; Morales, Hurst, & Reggio, 2017; Rodríguez-Muñoz, Onetti, Cortés-Montero, Garzón, & Sánchez-Blázquez, 2018). Para além desta interação com o recetor CB₁, o CBD também engloba outras importantes características, das quais: (1) atua como um antagonista nos recetores CB₂; (2) desempenha um papel antagonista dos recetores canabinóides GPR18; (3) pode atuar como um inibidor não seletivo nos canais iónicos dependentes de voltagem (Abrams, 2018; Morales et al., 2017; Rodríguez-Muñoz et al., 2018). Por fim, o CBD tem sido alegadamente associado à produção dos efeitos de fadiga e sonolência após sua administração (Devinsky et al., 2017). Quando conjugados com fármacos simpaticomiméticos do SNC, estes sintomas podem agravar (Lucas, Galettis, & Schneider, 2018). Para além destas características, o uso da *Cannabis* está também associado tanto à toxicidade patológica como comportamental (Andréasson, Allebeck, & Rydberg, 1989; Schoeler et al., 2016; Thomas, Kloner, & Rezkalla, 2014), onde (D'Souza et al., 2004) relatou num estudo que, em pacientes saudáveis, a administração de THC produziu sintomas psicóticos, alterou a sua perceção, aumentou a ansiedade e os défices cognitivos.

2.1.2. Aplicações da *Cannabis sativa* L.

Atendendo à constituição das suas sementes e óleo, bem como, a presença de inúmeras substâncias ativas, a *Cannabis* pode ser empregue em diversas áreas de interesse.

2.1.2.1. Área Alimentar

Recentemente, na área alimentar, o desenvolvimento de suplementos em que o *Cannabis* nas suas diferentes formas está presente, tem vindo a suscitar um interesse do ponto de vista do consumidor e consequentemente do setor agroalimentar. No caso das sementes, estas têm vindo

a ganhar um elevado interesse devido à constituição das mesmas, uma vez que apresentam diversos componentes bioativos, dos quais macronutrientes e fitoquímicos, demonstrando ser um produto saudável e benéfico para a nutrição e saúde humana (J. C. Callaway, 2004; Vonapartis, Aubin, Seguin, Mustafa, & Charron, 2015). Os principais constituintes das sementes de cânhamo incluem: (1) proteínas facilmente ingeríveis (20-25%), (2) ácidos gordos polinsaturados (ácido linoleico (LA) e ácido alfa-linolênico (ALA)), (3) lípidos abundantes (25-35%) e (4) hidratos de carbono (20-30%) ricos em fibras insolúveis (J. C. Callaway, 2004; Deferne & Pate, 1996; House, Neufeld, & Leson, 2010; Matthäus & Brühl, 2008; Silversides & Lefrançois, 2005; Tang, Ten, Wang, & Yang, 2006; Vonapartis et al., 2015). As proteínas das sementes de cânhamo estão adaptadas ao consumo humano e animal, consistindo principalmente em proteínas de elevada qualidade e facilmente digeríveis, das quais proteínas edestin e albumina, abundantes em aminoácidos essenciais (J. C. Callaway, 2004; Matthäus & Brühl, 2008; Tang et al., 2006; Vonapartis et al., 2015). Os ácidos gordos insaturados (LA e ALA) são considerados favoráveis e equilibrados para a nutrição humana quando presentes numa proporção de 3:1, respetivamente (Ditrói, Kleiner, Böszörményi, Szentmihályi, & Fébel, 2013; Schultz et al., 2020; Tang et al., 2006; Vonapartis et al., 2015). As concentrações de LA variam entre 64-72% da composição total de ácidos gordos. Esta gama resulta da variação de diferentes meios de cultivo de cânhamo, técnicas de cultivo, bem como alterações das condições de processamento e armazenamento. Estes ácidos gordos devem ser obtidos a partir da dieta uma vez que não são sintetizados de forma endógena (Deferne & Pate, 1996; Dimić, Romanić, & Vujasinović, 2009; Kriese et al., 2004; Tang et al., 2006; Vonapartis et al., 2015).

2.1.2.2. Aplicações Terapêuticas

As propriedades terapêuticas da *Cannabis* são conhecidas desde a antiguidade e embora, na maioria dos casos, os resultados não possam ser considerados definitivos e não existam atualmente condições patológicas para quais os canabinóides possam ser considerados como tratamento de primeira linha, a literatura relata cada vez mais estudos relacionados com o uso médico da *Cannabis* e dos seus canabinóides para doenças relevantes, mas também para o bem-estar dos pacientes (Stella et al., 2021). Dos mais de 100 canabinóides descobertos, apenas alguns foram estudados com alguma profundidade. O THC é talvez o mais famoso de todos os canabinóides, para além de ser o mais controverso. Este químico é principalmente responsável por alterar o estado de espírito e também pela panóplia de usos terapêuticos. O THC é o canabinóide mais abundante nos quimiotipos, seletivamente criados para induzir um efeito psicoativo. É a interação do THC com o recetor CB1 dentro do SNC que suscita a sua ação psicotrópica. Uma das descobertas mais surpreendentes em modelos animais, em relação ao THC, foi a capacidade de induzir a apoptose nas células dos tumores, enquanto protege as células saudáveis da morte celular (Caffarel et al., 2010; Vaccani, Massi, Colombo, Rubino, & Parolaro, 2005). O THC interage tanto com os recetores CB1 como com os recetores CB2. Através deste mecanismo, este canabinóide também demonstrou regular a dor, espasticidade, sedação, apetite e humor. Por exemplo, uma investigação publicada na revista *Clinical*

Therapeutics descobriu uma redução significativa da dor em pacientes com esclerose múltipla progressiva imediatamente após a administração de uma preparação oral de THC. Adicionalmente, o THC também exibe efeitos neuroprotetores, e demonstrou inclusive que consegue diminuir os níveis de beta-amiloide *in vitro*, sugerindo que pode desempenhar um potencial papel terapêutico na doença de Alzheimer. Finalmente, o THC é um poderoso anti-inflamatório que demonstrou apresentar 20 vezes os efeitos anti-inflamatórios da aspirina. Em relação ao CBD, este apresenta efeitos supressores no sistema imunitário, incluindo redução da resposta inflamatória, supressão da imunidade celular e humoral, e indução de apoptose em alguns linfócitos; estes efeitos são benéficos para o tratamento de doenças inflamatórias (Booz, 2012; Nichols & Kaplan, 2020). A diabetes tipo 1 é um exemplo de uma doença de base inflamatória que pode beneficiar de tratamento preventivo utilizando o CBD; ratos diabéticos não obesos que receberam CBD como sua fonte de tratamento, apresentaram um atraso significativo no desenvolvimento da diabetes em comparação com ratos diabéticos não obesos que não receberam CBD (Lehmann et al., 2017).

2.1.2.3. Aplicações Dérmicas

No ponto de vista dérmico, a administração de medicamentos através da pele torna-se uma opção prática devido à sua fácil acessibilidade. As formulações dérmicas podem ser divididas em dois grupos: (1) transdérmicas e (2) tópicas (Stella et al., 2021). Na via transdérmica, a administração de substâncias terapêuticas requer alguns requisitos, dos quais: (1) elevada potência (menos de 10 mg/dia); (2) baixo peso molecular (menos de 500 g/mol); (3) lipofilia moderada (log P 1-5); (4) ponto de fusão inferior a 250°C (Kováčik, Kopečná, & Vávrová, 2020). Considerando as propriedades físico-químicas dos canabinóides, o CBD apresenta um peso molecular razoável (314,46 g/mol), característica pretendida de forma a ser introduzido por via transdérmica (Baswan et al., 2020). Contudo, devido à sua elevada lipofilia (Log P \approx 6,3), esta representa um fator limitante na introdução deste agente terapêutico por esta via (Baswan et al., 2020; Stella et al., 2021). De forma a combater este obstáculo, esta substância ativa poderá ser acoplada a um DDS facilitando deste modo, o seu transporte (Baswan et al., 2020). O óleo obtido através das sementes de cânhamo também apresenta diversas características benéficas em termos tópicos. Este pode ser uma cura eficaz para o eczema, bem como outras séries de doenças dérmicas, uma vez que é composto por mais de 80% de ácidos gordos polinsaturados (LA e ALA), bem como é rico em tocoferóis (J. C. Callaway, 2004; J. Callaway et al., 2005; Kriese et al., 2004). Estes constituintes apontam para os efeitos benéficos do óleo de cânhamo na redução e erradicação de doenças dérmicas, incluindo o eczema (Harbig, 1998). Um estudo clínico realizado por (J. Callaway et al., 2005) demonstrou que pacientes que apresentavam uma ingestão regular de óleo de *Cannabis* na sua dieta demonstraram menores sintomas de eczema, pele seca e irritação dérmica. Por fim, níveis elevados de LA e ALA demonstraram também ser um fator importante no melhoramento dos sintomas atópicos provenientes da dermatite (Okuyama, 1996).

2.2. Sistemas de Entrega de Fármacos

Um Sistema de Entrega de Fármacos, ou *Drug Delivery System* (DDS), é definido como um dispositivo que permite a introdução de uma substância terapêutica no corpo e melhora a sua eficácia e segurança através do controlo da taxa, tempo e local de libertação de fármacos no corpo (Jain, 2020). De forma obter uma resposta terapêutica desejada, uma quantidade adequada do produto terapêutico deve ser administrada, onde posteriormente serão libertados e absorvidos os constituintes ativos do fármaco, e por fim, transportados através das membranas biológicas com destino ao local de ação (Jain, 2020; Paolino, Sinha, Fresta, & Ferrari, 2006). O controlo da distribuição corporal bem como da taxa de libertação do fármaco são consideradas as duas características mais importantes na formulação de um DDS. Através do estudo, controlo e modificação destas características, bem como das diversas rotas destinadas pelos fármacos, é possível projetar e preparar novos DDS inovadores com um potencial de melhorar diversas terapias. Deste modo, os objetivos principais na formulação de DDS são: (1) controlar a taxa de libertação do fármaco pretendido, (2) promover a libertação da substância terapêutica no local específico de ação e (3) controlar a concentração do agente terapêutico de forma alcançar membranas e superfícies absorventes (Paolino et al., 2006). Alguns exemplos de DDS frequentemente utilizados para o diagnóstico e terapia de diversas patologias incluem lipossomas, niossomas, micelas, nanoesferas, nanocápsulas, nanopartículas, micropartículas, microesferas, microbolhas, sistemas poliméricos, dendrímeros, ouro coloidal, nanoesferas de ouro, pontos quânticos, partículas superparamagnéticas, nanotubos de carbono, ciclodextrinas e esfingomonas (Figura 2.5) (El-Ridy et al., 2011; Klajnert & Bryszewska, 2001; Lembo & Cavalli, 2010; Mayer, 2005; Mitra, Nan, Line, & Ghandehari, 2006; Ostro & Cullis, 1989; Torchilin, 2006; Uekama & Otagiri, 1987).

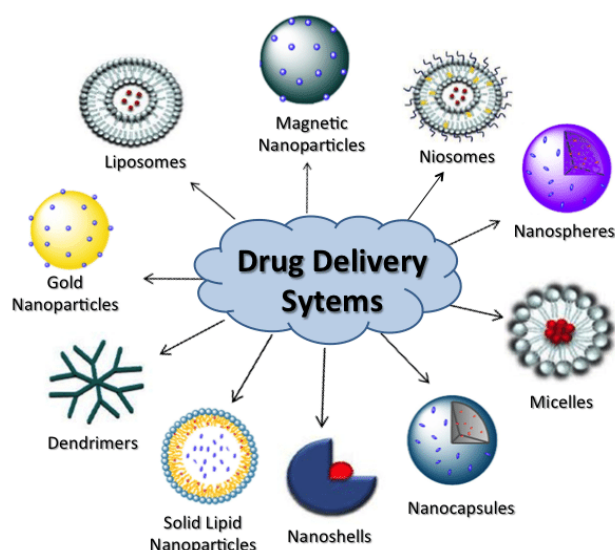


Figura 2.5 – Diversos DDS empregues no diagnóstico e terapia de várias patologias (adaptado de (Conniot et al., 2014; Panzarini et al., 2013)).

2.2.1. Utilidade da nanotecnologia no desenvolvimento de DDS

A nanotecnologia é considerada como a criação e utilização de materiais, dispositivos e sistemas na gama nanométrica, ou seja, ao nível dos átomos, moléculas e estruturas supramoleculares (Jain, 2020). As nanopartículas são uns dos diversos produtos provenientes da nanotecnologia. Estas partículas poliméricas são formuladas através de polímeros naturais ou artificiais, possuindo uma dimensão compreendida entre 10-1000 nm (Tiwari et al., 2012). Através destas partículas é possível conjugar um ou diversos agentes terapêuticos, através de uma solução sólida, adsorvidos na superfície das nanopartículas ou fixados quimicamente, e surgindo desta forma como uma das principais ferramentas na formulação de DDS especializados e inovadores, com utilidade em diversas terapias: imunoterapia, geneterapia, radioterapia, quimioterapia, tratamento antirretroviral, na distribuição de proteínas e antibióticos e, por fim, podem surgir na forma de vesículas com a finalidade de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) (Singh & Vyas, 1996; Tiwari et al., 2012). Posto isto, a nanotecnologia apresenta diversas vantagens no fabrico destes DDS, das quais: (1) modificação da solubilidade de um fármaco na água, proporcionando desta forma um aumento da sua libertação no local de ação mantendo, simultaneamente, o desejado perfil de libertação adequado (Jain, 2020); (2) facilitar a transcitose de agentes terapêuticos através das barreiras epiteliais e endoteliais, bem como, dos capilares sanguíneos (Figura 2.6); (3) facilitar o transporte e distribuição de fármacos macromoleculares ao seu respetivo local de ação intracelular; (4) proporcionar uma terapia combinada, ou seja, o uso de dois ou mais agentes terapêuticos; (5) proporcionar uma leitura em tempo real sobre a eficácia *in vivo* de um dado agente terapêutico (Farokhzad & Langer, 2009; Ferrari, 2005). Contudo, apesar destas vantagens, a citotoxicidade das nanopartículas, bem como dos seus metabolitos pós degradação, continuam a representar uma desvantagem limitante no uso das nanopartículas na formulação destes DDS, sendo por isso, necessário futuros estudos na melhoria da sua biocompatibilidade (Sivakumar, Mythily, Alamelu, & Panduranga Rao, 1994; Swapna & Nadkarni, 1998).

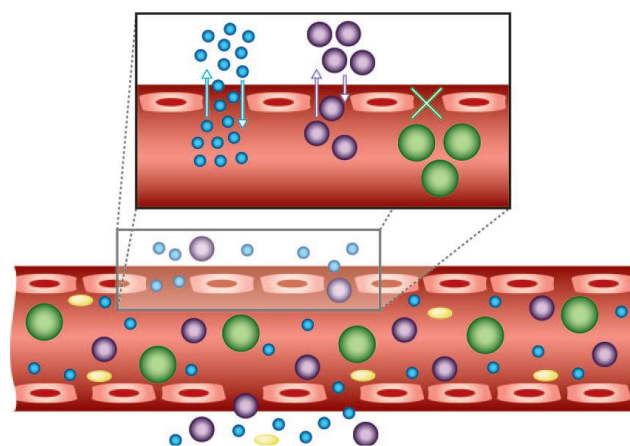


Figura 2.6 – A eficácia da utilização de nanopartículas como veículos de entrega de agentes terapêuticos encontra-se altamente dependente dos seus tamanhos e formas, afetando diretamente o seu movimento para o interior/exterior dos capilares sanguíneos, bem como, a sua velocidade de movimentação na corrente sanguínea (adaptado de (Farokhzad & Langer, 2009)).

2.2.2. Desenvolvimento de DDS diferenciados

Através do uso de polímeros celulósicos, nomeadamente a celulose, é possível a obtenção de diversos DDS de elevada importância, sendo posteriormente utilizados em diversas áreas de interesse. Estes DDS desenvolvidos a partir de fibras de celulose, desempenham uma vasta área de interesse devido à fácil aquisição deste polímero celulósico.

2.2.2.1. Celulose

A celulose é um dos polímeros mais abundantes da terra, podendo ser obtida a partir de árvores e plantas anuais utilizando um processo alcalino, entre os quais se encontra o processo *Kraft* (Chakar & Ragauskas, 2004; Demuner et al., 2021; Fearon, Kuitunen, Ruuttunen, Alopaeus, & Vuorinen, 2020). Em plantas anuais podem utilizar-se os caules e nestes a celulose representa cerca de 40-50% de sua constituição (Zhang et al., 2021). A celulose é um polímero composto por unidades de glicose, interligadas entre si através de ligações β -1,4-glicosídicas (Rajnish et al., 2021). Em termos de organização, a celulose encontra-se organizada na forma de fibrilas elementares, 3-5 nm, ligadas através de pontes de hidrogénio entre o grupo hidroxilo e o oxigénio dos anéis adjacentes das moléculas de celulose, onde estas se agregam formando estruturas maiores, as microfibrilas, 10-20 nm. Este elevado número de microfibrilas tornam a celulose um polímero altamente estável, bem como proporcionam rigidez às fibras (Moon, Martini, Nairn, Simonsen, & Youngblood, 2011; Rajnish et al., 2021; Zhang et al., 2021). Para além disso, a celulose pode sofrer diversos tratamentos mecânicos, enzimáticos e químicos de forma a produzir diversos derivados, por exemplo, a CMC e a NFC. Estes derivados representam uma elevada importância no desenvolvimento de DDS devido às suas diversas propriedades, sendo utilizados como aglutinantes (revestimento de fármacos) e/ou moduladores (libertação de substâncias ativas de forma controlada e retardada) (Kamel, Ali, Jahangir, Shah, & El-Gendy, 2008; Sindhu, Prasanth, & Thakur, 2014).

Os DDS podem ser desenvolvidos para serem administrados por diversas vias, sendo as mais importantes a via oral e a dérmica. No desenvolvimento de DDS de base celulósica, uma das etapas mais importantes é o desenvolvimento e otimização de uma matriz 3D porosa na qual se irão reter e libertar, de forma controlada, as moléculas ativas (Nicu et al., 2021).

2.2.2.2. Desenvolvimento de DDS para aplicação oral

No caso de uma aplicação oral, o objetivo é desenvolver uma matriz em que a celulose é o componente principal, a partir de NFC, micro celulose e celulose micro/nano fibrilada, como por exemplo, a CMC e obter uma combinação otimizada de forma que o sistema tenha a porosidade pretendida. Através das diversas propriedades benéficas apresentadas por estes polímeros celulósicos, das quais: (1) eficácia terapêutica; (2) biocompatibilidade; (3) baixa incidência de efeitos secundários e (4) facilidade de incorporação de agentes terapêuticos, farmacológicos e

nutricionais (Kierys, Grochowicz, & Kosik, 2015; F. P. Morais, 2017; Oliveira et al., 2015), estes demonstram uma elevada importância e utilidade no desenvolvimento de DDS. É possível constatar, através dos estudos morfológicos e mecânicos desenvolvidos por (Flávia P. Morais et al., 2019; Flávia P. Morais, Carta, Amaral, & Curto, 2021c; Nicu et al., 2021), a importância que estas fibras representam no desenvolvimento de um DDS, onde foi possível manipular os diversos constituintes fibrosos, dos quais a porosidade, podendo desta forma controlar a taxa de libertação da substância ativa e/ou nutricional incorporada no seu interior.

No desenvolvimento de DDS para aplicação oral pode utilizar-se o alginato, empregue na produção destes DDS devido às suas características de estabilização (Müller, Santos, & Brígido, 2011). A incorporação do alginato numa solução contendo iões divalentes e multivalentes, por exemplo Ca^{2+} , forma um gel reticulado e que permite o encapsulamento de todos os constituintes presentes, podendo retardar a libertação do agente terapêutico ou nutricional em questão (Hua, Ma, Li, Yang, & Wang, 2010; F. P. Morais, 2017).

Como resultado de toda a informação obtida na pesquisa bibliográfica, os DDS para aplicação oral podem ser desenvolvidos através da incorporação de uma conjugação de fibras celulósicas, formando uma matriz celulósica 3D, na qual será possível incorporar no seu interior várias substâncias ativas, tendo sempre em consideração a dosagem a utilizar de cada constituinte, formulando deste modo DDS adequados para ingestão.

2.2.2.3. Desenvolvimento de DDS para aplicações dérmicas

Nos DDS para aplicações dérmicas e transdérmicas, o objetivo principal é desenvolver uma camada porosa, que neste trabalho será feita a partir de uma matriz 3D de fibras de celulose, de forma a reter os óleos e as moléculas ativas pretendidas.

Nesta primeira etapa o desenvolvimento de uma matriz porosa a partir de várias fibras disponíveis, é um dos parâmetros-chaves de forma obter DDS para aplicações dérmicas eficazes. Na produção destes DDS dérmicos, é necessário ter em conta diversos fatores-chaves, dos quais: (1) porosidade; (2) proporção de fibras a utilizar; (3) combinação de diferentes fibras celulósicas e (4) taxa de refinação das fibras, se presente. Para além disso, é necessário o desenvolvimento de 3 camadas celulósicas distintas, apresentando características diferenciadas (Martins et al., 2018). Através dos estudos desenvolvidos por (Martins et al., 2018; Nicu et al., 2021; Rostamitabar et al., 2021), podemos concluir o papel e a importância que cada camada celulósica desempenha na formulação destes DDS dérmicos: (1) uma camada exterior, altamente hidrofóbica, inibindo interações com o meio exterior; (2) uma camada intermédia porosa, onde estão localizadas as substâncias ativas, retidas na matriz 3D celulósica e (3) uma camada de elevada suavidade, permanentemente em contacto com a pele. As substâncias terapêuticas presentes na camada intermédia deslocar-se-ão em direção ao local de ação, a derme.

2.2.2.4. Estudos de estabilidade dos DDS

A taxa de libertação de uma substância ativa, bem como a estabilidade de um DDS pode ser estudada através da produção, *in vivo*, dos diversos ambientes, mimetizando o seu pH, ao qual os DDS ficam submetidos. No caso dos DDS de base celulósica, a libertação de uma substância ativa para o meio envolvente encontra-se altamente dependente de diversos fatores, dos quais: (1) propriedades físico-químicas da substância ativa; (2) constituição dos DDS desenvolvidos; (3) meio de libertação da substância ativa; (4) porosidade da matriz 3D celulósica; (5) proporção de alginato a utilizar e (6) possíveis interações entre estes fatores (Fu & Kao, 2010; F. P Morais, 2017).

Os diversos DDS são testados em diversas soluções, contendo pH distintos, de forma a estudar o comportamento da estabilidade da estrutura e conformidade por parte dos DDS, bem como analisar a taxa de libertação da substância ativa presente no interior da matriz 3D celulósica. Este estudo procede-se com base nos diversos ambientes que os DDS ficam submetidos simulando o pH no trajeto destes, *in vivo*, até ao local de ação (González-Rodríguez, Holgado, Sánchez-Lafuente, Rabasco, & Fini, 2002).

2.3. Simulação computacional de matrizes 3D à base de materiais celulósicos

Na realização dos diversos DDS, por vezes é muito difícil prever a constituição fibrosa a utilizar na matriz 3D celulósica, deixando em aberto possíveis questões acerca de constituição e proporção fibrosa a desempenhar. Através do uso de modelos computacionais 3D, é possível estudar, prever, manipular e otimizar diversas propriedades estruturais e mecânicas das estruturas constituídas por fibras celulósicas (Borodulina, Motamedian, & Kulachenko, 2018; Motamedian, Halilovic, & Kulachenko, 2019; Sampson, 2009). Estes modelos computacionais desempenham uma elevada importância no desenvolvimento de DDS, especialmente nos DDS dérmicos, uma vez que é possível simular as diversas matrizes 3D de base celulósica, das diversas camadas, computacionalmente. Deste modo é possível otimizar cada camada, nas suas propriedades estruturais requeridas, tais como a espessura, porosidade e distribuição e tamanho dos poros, de modo alcançar as funcionalidades pretendidas de retenção e libertação controlada ao longo do tempo. Para além da otimização das diversas propriedades das matrizes constituídas por fibras, o uso destes modelos computacionais proporciona outras vantagens, das quais: (1) simulação de estruturas utilizando dados experimentais das fibras; (2) obtenção por simulação 3D da matriz celulósica e das suas propriedades estruturais e (3) diminuição do tempo e recursos a nível experimental (F. P Morais, 2017).

O primeiro modelo computacional surgiu em 1994, por Alava e Niskanen, denominado o modelo KCL-PAKKA. Este modelo simula geometricamente as estruturas 3D celulósicas através de uma disposição aleatória das fibras resultando numa estrutura representada na Figura 2.8. Para além

disso, a flexibilidade das fibras é considerada pela primeira vez neste modelo computacional, produzindo deste modo estruturas 3D com diferentes espessuras e porosidades (Alava & Niskanen, 2006; Niskanen & Alava, 1994).

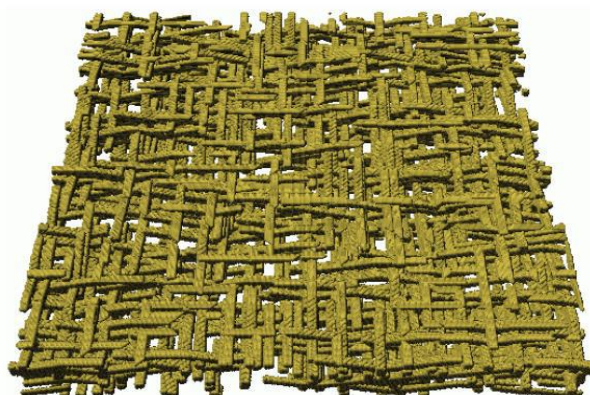


Figura 2.7 – Estrutura 3D de base celulósica obtida através do modelo KCL-PAKKA (adaptado de (Alava & Niskanen, 2006)).

Posteriormente, em 2011, foi validado um modelo computacional 3D, por (J.M.R. Curto, 2012), através do qual foi possível simular várias matrizes 3D de base celulósica e polimérica, através da manipulação do volume e flexibilidade de cada fibra, representada por uma sequência de voxéis numa divisão cartesiana, tal como ilustrado na Figura 2.8.

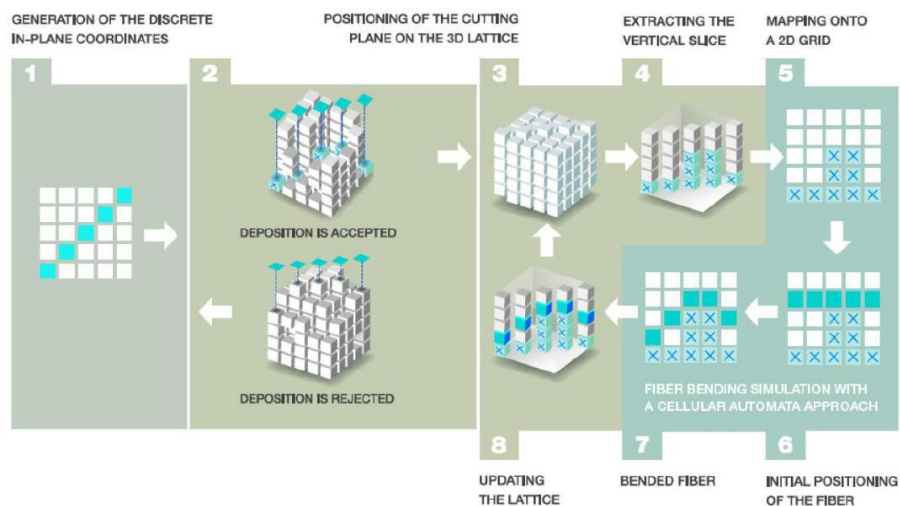


Figura 2.8 – Esquematisação, passo a passo, do modelo computacional 3D validado por Curto (adaptado Curto *et al.*, 2012; Curto, 2012, Conceição, Curto, Simões, & Portugal, 2011;).

Este modelo computacional validado por (J.M.R. Curto, 2012) constitui uma ferramenta útil na simulação, manipulação e otimização de matrizes 3D celulósicas, tendo sido utilizada em vários estudos (Flávia P. Morais, Carta, Amaral, & Curto, 2021b, 2021a, 2020b, 2020a; Flávia P. Morais & Curto, 2022). Com este modelo computacional, foi possível estudar, simular e otimizar diversas propriedades presentes nas estruturas formadas por fibras, de forma obter e manipular as múltiplas matrizes 3D celulósicas obtidas por simulação computacional (Figura 2.9).

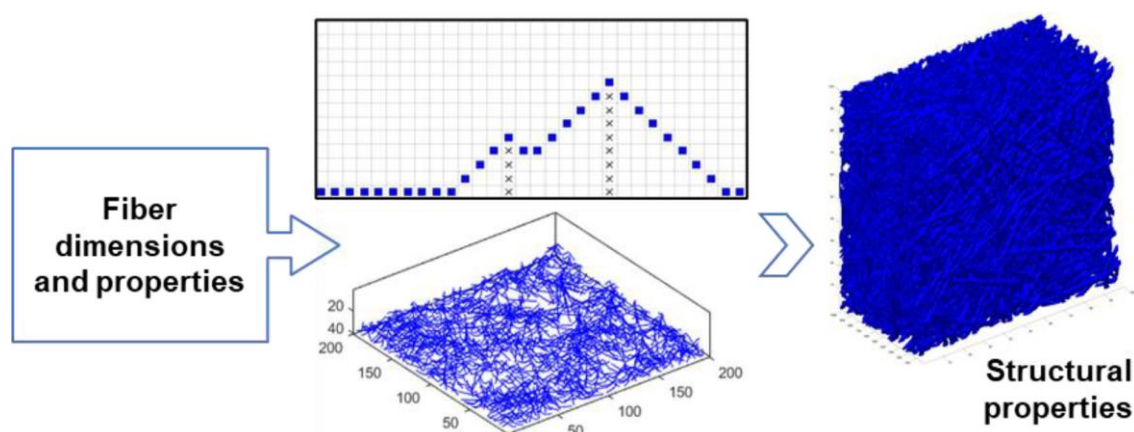


Figura 2.9 –Esquema representativo da simulação computacional das estruturas celulósicas utilizando o modelo computacional validado por (J.M.R. Curto, 2012). Inicialmente, as propriedades físicas e dimensionais das fibras são introduzidas e as estruturas são obtidas através da sua deposição aleatória formando uma matriz 3D. Na deposição individual de cada fibra utiliza-se um mecanismo de autômatos celulares. Por fim, a imagem da direita é a matriz porosa obtida tendo em conta os modelos 3D das fibras em causa (adaptado de (Flávia P. Morais & Curto, 2022)).

Através deste modelo computacional, será possível analisar, estudar e otimizar diversas matrizes 3D celulósicas desenvolvidas a partir das fibras que formam a rede celulósica. Um exemplo em concreto, neste trabalho será a possibilidade de simulação das fibras de *Cannabis*. Através deste modelo, será possível analisar a estrutura e porosidade da rede celulósica, de forma a produzir uma matriz com a capacidade de reter no seu interior e libertar controladamente as substâncias ativas de interesse.

Capítulo III

Materiais e Métodos

3. Materiais e Métodos

Neste capítulo serão mencionadas os diversos materiais e reagentes, bem como suas preparações, utilizados ao longo do estudo, com adicional descrição dos diversos métodos empregues, nomeadamente, óleo e fibras de *Cannabis*, produção de DDS inovadores, ultrassonificação, produção de óleos incorporados com canabinóides, Teor de Matéria Seca (TMS), FTIR-ATR, simulação computacional e análise estrutural dos diversos DDS incorporados com o extrato e o óleo de *Cannabis*, quando submetidos a diversas soluções com pH distintos.

3.1 Materiais

3.1.1. Óleo de Cannabis

Utilizaram-se sementes de cânhamo selecionadas para consumo alimentar de origem biológica, lote 1008821, da marca Continente, cuja constituição se encontra na Figura 3.1, e que contêm 49g de lipídios em 100g de amostra, o que corresponde a aproximadamente 50% lípidos.

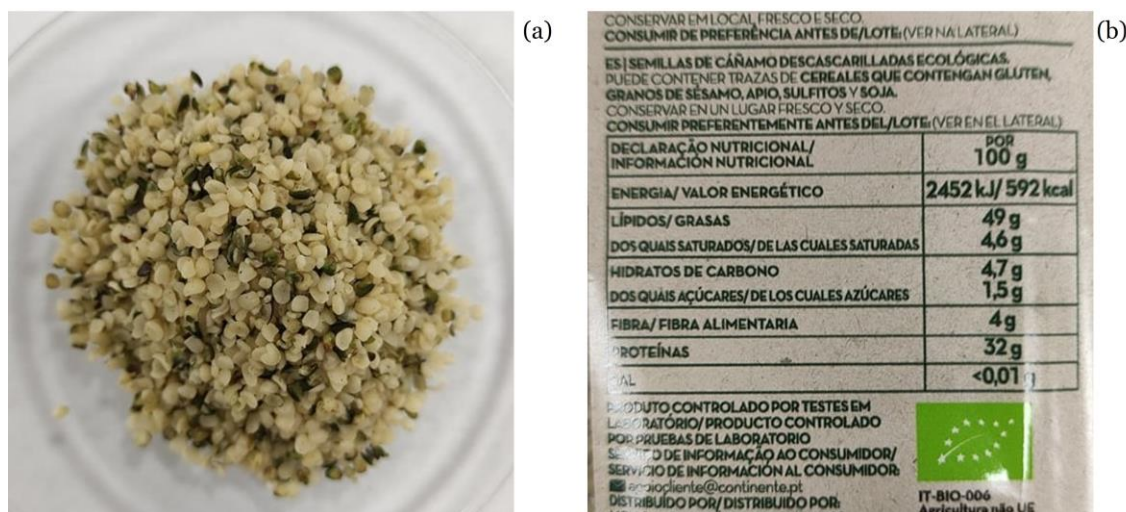


Figura 3.1 - Sementes de cânhamo descascadas (a) e sua informação nutricional presente no rótulo (b).

3.1.2. Matriz de base celulósica do DDS

Para a construção da matriz 3D dos DDS utilizaram-se vários tipos de materiais de base celulósica. As fibras de celulose de referência selecionaram-se a partir de um conjunto experimental contendo fibras de *Eucalyptus globulus* e fibras de *Picea abies* obtidas pelo processo Kraft com e sem branqueamento de um lote industrial. As fibras de *Cannabis* obtiveram-se laboratorialmente a partir da madeira do caule da planta, obtidos através de uma empresa de cânhamo, num processo alcalino. Neste processo utilizou-se no ensaio de referência madeira de *Eucalyptus globulus* sujeita às mesmas condições da madeira da *Cannabis*.

Utilizou-se a Carboximetilcelulose (CMC) com elevada viscosidade (1500-3000 cps), massa molecular média de 700000 g/mol, grau de substituição de 0.65-0.90, pureza analítica, obtida à Sigma-Aldrich.

A nano celulose, ou *Nanofibrillated Cellulose* (NFC), foi produzida em laboratório pela nossa unidade de investigação FibEnTech-UBI.

Os DDS foram produzidos utilizando, o polímero alginato de sódio com viscosidade de 1% a 20°C, da BioChemica, AppliChem, uma solução de cloreto de cálcio (CaCl₂), massa molecular 110,98 g/mol, um agente de reticulação, da BDH Chemicals Ltd, England e, nos DDS de suplementos nutricionais, o uso de cápsulas vegetais de hidroxipropilmetilcelulose, da dōTERRA®, Reino Unido.

3.1.3. Amostras de flor e extrato de Cannabis

Neste estudo foram utilizadas diversas amostras (Figura 3.2) provenientes de produtos comerciais, e identificados pela sua potencialidade no desenvolvimento de novas linhas de produtos com interesse para a Empresa em causa. A imagem da esquerda (a) diz respeito ao extrato de *Cannabis*, da empresa *Multitrance Amsterdam*®, com sede na Holanda, e que se encontra em conjunto com a planta *Camellia sinensis* com a designação comercial de *Tea White Widow*, na forma de saquetas para infusão. Na imagem da direita (b) encontra-se a embalagem de uma amostra de flor *Cannabis* obtida em Portugal, da *Happease*®, numa loja de especialidade. A amostra A designa-se comercialmente por *Cannabis Limoncello*, e amostra B por flor de *Cannabis sativa L.*, e foram ambas selecionadas por serem amostras de flor de *Cannabis* com potencial interesse para a Empresa em causa.



Figura 3.2 – Amostras contendo CBD utilizadas ao longo do estudo, chá verde contendo extrato de Cannabis (a) e flor de Cannabis (b).

3.1.4. Estudos Estruturais dos DDS

De forma a simular os diversos pH dos ambientes *in vivo*, foram utilizadas três soluções com pH distintos. Na mimetização do ambiente do estômago, pH ácido = 2, foi preparado uma solução de ácido clorídrico (HCl), massa molecular de 36,458 g/mol, da Sigma-Aldrich. Nos restantes ambientes, pH do duodeno = 6,6 e da corrente sanguínea = 7,4, foram empregues duas soluções de fosfato dipotássico (K_2HPO_4), massa molecular de 136,09 g/mol, da Sigma-Aldrich, onde foi ajustado o pH de cada solução para o pH desejado.

3.2 Métodos

A Figura 3.3 apresenta uma esquematização dos diversos métodos utilizados ao longo do presente estudo para obter o produto final desejado bem como a sua caracterização.

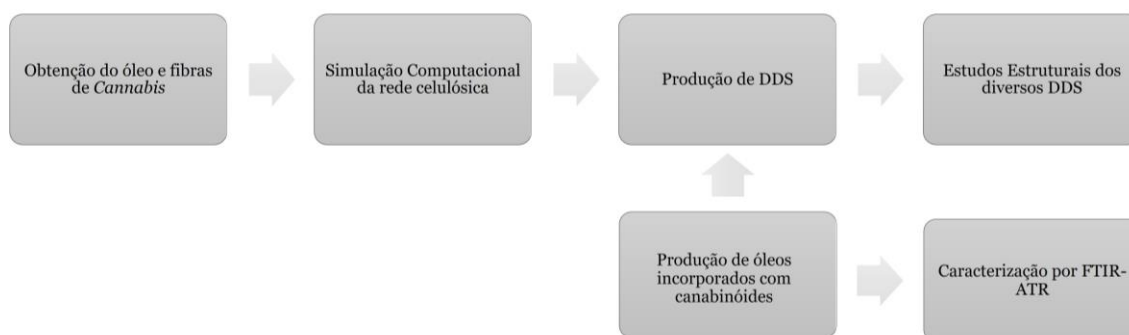


Figura 3.3 – Metodologia experimental e computacional desenvolvida ao longo do estudo.

3.2.1 Preparação das diversas soluções

No decorrer de toda a atividade experimental, foram preparadas e otimizadas diversas soluções empregues nas múltiplas etapas experimentais realizadas, através do auxílio de um protocolo desenvolvido e fornecido pela Prof. Dra. Joana Curto (Joana M.R. Curto, 2017), das quais:

- Na obtenção das fibras de *Cannabis*, foram preparadas duas soluções: (1) uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 3M, massa molecular aproximadamente 40 g/mol, e (2) uma solução de peróxido de hidrogénio (H₂O₂), massa molecular 34,0147 g/mol, de 10 Volume, titulada por permanganometria, proveniente do lote 18267, da Plural – Cooperativa Farmacêutica, Portugal;
- No desenvolvimento dos diversos DDS, foram formuladas as soluções de alginato de sódio 2% (m/v), CMC 0,5% (m/v) e CaCl₂ 0,2M, bem como, a preparação do extrato de *Cannabis*;
- Foram preparadas diversas soluções com pH distintos, no estudo estrutural dos diversos DDS, utilizando um medidor de pH, marca *Eutech Instruments*, modelo pH 700, no controlo e manipulação dos diversos pH requeridos. De forma a simular o ambiente do estômago, o pH foi ajustado para o valor final pretendido, através da incorporação, gota a gota, de água destilada na solução de HCl 0,1M, uma vez que esta solução apresentava valores de pH abaixo de 2. Por outro lado, na simulação dos restantes ambientes, utilizou-se uma base (NaOH) e um ácido (HCl) de forma a ajustar o pH da solução de K₂HPO₄ 0,1M para os valores desejados.

Os diversos cálculos realizados na preparação das diversas soluções, bem como o cálculo da concentração do extrato de *Cannabis* serão descritos no Anexo B.

3.2.2 Obtenção do óleo de Cannabis

De modo obter o óleo desejado, procedeu-se a diversos processos de moagem, com recurso ao CryoMill®, de duas amostras de sementes de cânhamo diferenciadas, uma congelada e outra a temperatura ambiente. O processo de moagem foi realizado através do auxílio do manual de instrumentação do CryoMill® (RETSCH, 2020), bem como, atendendo às suas diversas variáveis características (Figura 3.4). As sementes de cânhamo foram trituradas utilizando três objetos de moagem, numa frequência de 25 Hz a uma temperatura compreendida entre 0-20°C, durante 10 minutos. Foram realizados diversos ciclos de moagem até obter um produto final consistente.

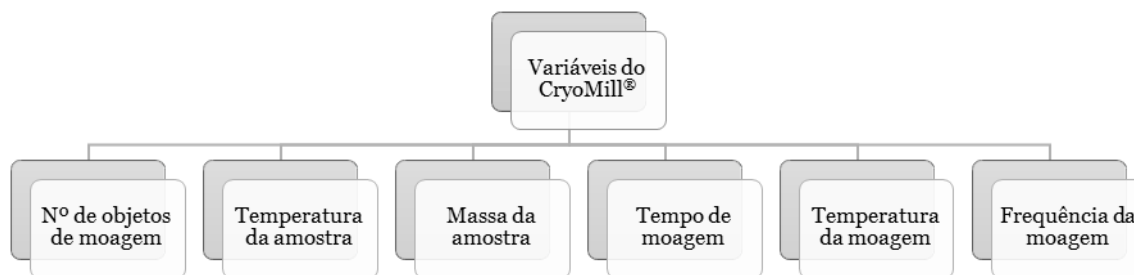


Figura 3.4 – Esquema ilustrativo das diversas características do CryoMill®.

3.2.3 Obtenção das fibras de *Cannabis*

De modo obter um DDS incorporado com fibras de *Cannabis*, com a finalidade de desenvolver uma rede 3D celulósica no seu interior, estas foram obtidas através de um Processo Alcalino. Este processo é responsável pela deslenhificação das fibras e está subdividido em duas etapas distintas: Processos de cozimento e branqueamento.

3.2.3.1 Processo de cozimento

Inicialmente os caules foram pesados numa balança analítica marca Mettler, modelo Toledo AG104, e repartidos em pequenas porções e posteriormente inseridos num reator. Seguidamente foram adicionados 10 mL de uma solução de NaOH 3M e colocado num banho térmico a 80°C durante 6 h, de modo a eliminar a lenhina presente nos caules, através do uso de uma placa de aquecimento e agitação, com velocidade controlada, marca Heidolph, modelo MR3001K. Por fim, os caules foram obtidos através de meio de filtragem sofrendo posteriormente dois ciclos de lavagem com H₂O destilada aquecida, de forma a eliminar resíduos de NaOH e lenhina presentes, e colocadas numa estufa, a 100°C até estarem totalmente secas (Demuner et al., 2021; Fearon et al., 2020).

3.2.3.2 Processo de branqueamento

Após secagem, os caules foram recolocados num reator juntamente com 50 mL de uma solução de H₂O₂, 10 volumes, titulada por permanganometria, durante 45 minutos. De seguida as fibras foram filtradas e sujeitas posteriormente a dois ciclos de lavagem com H₂O destilada a 40°C. Por fim, as fibras obtidas foram colocadas numa estufa a 100°C até se encontrarem totalmente secas (Chakar & Ragauskas, 2004; Seo & Kim, 2015).

3.2.4. Desenvolvimento de DDS

Neste tópico serão mencionados os diversos DDS desenvolvidos bem como as suas formulações.

3.2.4.1. Aplicações de suplementos alimentares

Na formulação dos DDS de suplementos alimentares, a formulação crio-moída das sementes de *Cannabis*, obtido após 6 ciclos no processo de crio-moagem, foi incorporado numa cápsula vegetal de hidroxipropilmetilcelulose, ficando retido no seu interior, e deste modo ocorrer a sua fácil ingestão.

3.2.4.2. Aplicações terapêuticas orais

A produção dos DDS para aplicação oral foi realizada utilizando uma solução final homogeneizada de três constituintes com propriedades distintas: Alginato 2% (m/v), responsável pela estrutura e conformidade dos DDS, um ou vários biopolímeros celulósicos como CMC 0,5% (m/v), fibras de *Cannabis* e NFC, conferindo desta forma uma rede celulósica 3D no interior dos DDS na qual estarão retidas as substâncias ativas de extrato de *Cannabis*. A proporção relativa de cada constituinte a incorporar na mistura final foi feita utilizando a massa.

3.2.4.2.1 Desenvolvimento de DDS poliméricos incorporados com extrato de Cannabis

Os DDS poliméricos incorporados com extrato de *Cannabis* foram preparados por uma mistura de uma solução de Alginato 2% (m/v), CMC 0,5% (m/v) e o extrato de *Cannabis*, com uma concentração de 3,126 g/L, numa proporção mássica de 2:1:1 e 2:2:1. A mistura foi homogeneizada a 1000 rpm durante 15 minutos. Após este processo, foram pipetados, gota a gota, 25 mL da mistura preparada a uma solução de CaCl₂ 0,2M, de forma a obter os DDS esféricos. Posteriormente, os DDS foram deixados *overnight* na solução de CaCl₂ (Vijayalakshmi, Gomathi, & Sudha, 2014). Por fim, os DDS foram filtrados e lavados com água destilada, com posterior secagem.

3.2.4.2.2 Desenvolvimento de DDS poliméricos incorporados com fibras de Cannabis, NFC e extrato de Cannabis

De forma a incorporar as fibras de *Cannabis* nos DDS poliméricos, estas foram re-suspendidas numa solução de NaOH 3M sofrendo uma agitação ocasional durante 30 minutos. Posteriormente, as fibras foram filtradas e lavadas com H₂O destilada, e colocadas em 100 mL de H₂O destilada com uma agitação de 300 rpm.

De seguida, o biopolímero celulósico foi obtido através da junção de fibras de *Cannabis*, CMC 0,5% (m/v) e NFC numa proporção 2:2:1. Para tal, a mistura do biopolímero celulósico foi inicialmente colocada a 800 rpm durante 15 minutos, com posterior ultrassonificação, através do uso de um ultrassonificador, de 3 ciclos durante 20s e por fim, novamente, 800 rpm durante 15 minutos.

Para a produção destes DDS utilizou-se o método descrito no subcapítulo 3.2.4.2.1 formando os DDS numa proporção 2:2:1.

3.2.4.2.3 Desenvolvimento de DDS poliméricos incorporados com a formulação crio-moída

Na preparação de DDS contendo a formulação crio-moída como sua substância ativa, esta formulação foi incorporada em CMC 0,5% (m/v) com posterior ultrassonificação de 3 ciclos durante 20s. De seguida foi incorporado Alginato 2% (m/v), CMC 0,5% (m/v) e formulação crio-moída numa proporção de 2:2:0,1 e 2:2:0,5, respetivamente. Por fim, a obtenção dos DDS tal como descrito no subcapítulo 3.2.4.2.1.

3.2.4.2.4 Análise Estrutural dos DDS

Após obtenção dos DDS poliméricos esféricos encapsulados com os diversos constituintes em estudo, estudou-se o comportamento estrutural de cada DDS quando submetidos em diversas soluções com pH diferenciados durante 6h nas condições de 30°C. Na Tabela 3.1 estão referidas as diversas soluções preparadas com a finalidade de mimetizar os diversos meios presentes ao qual os DDS encontrar-se-ão sujeitos, mimetizando desta forma o trajeto percorrido pelos DDS após entrada no corpo humano.

Tabela 3.1 – Soluções empregues na realização dos estudos estruturais dos diversos DDS.

Soluções	pH	Meio a Mimetizar
Solução Tampão HCl	2	Estômago
Solução Tampão Fosfato	6,6	Duodeno
Solução Tampão Fosfato	7,4	Corrente Sanguínea

Os DDS foram colocados na solução tampão HCl a pH 2, durante 2h. Seguidamente, foram filtrados e empregues na solução tampão fosfato com pH a 6,6 durante outras 2 h. Por fim, estes foram novamente filtrados e submetidos noutra solução tampão fosfato com um pH um pouco mais elevado (7,4) durante outras 2 h, concluindo desta forma o ensaio (Gonza, 2002).

3.2.4.3 Aplicações dérmicas

No desenvolvimento de DDS para fins dérmicos, foram utilizados dois tipos distintos de fibras, uma branqueada, de *Eucalyptus*, e outra não branqueada, de *Picea abies*, dependente da quantidade de lenhina presente na sua constituição.

3.2.4.3.1 Matrizes 3D de celulose

De forma a formular um DDS dérmico, é necessário inicialmente preparar, desenvolver e otimizar as matrizes 3D celulósica das fibras de interesse.

3.2.4.3.1.1 Pastas de celulose

Neste trabalho, foram utilizadas duas pastas industriais de Eucalipto kraft branqueada e *Picea abies* não branqueada, sem terem sofrido anteriormente nenhum processo de secagem e sem a presença de cloro total na sua constituição.

Estas pastas de Eucalipto foram fornecidas por um fabricante português de papel *tissue* com a finalidade de serem empregues na produção, com posterior caracterização, de diversos produtos para fins dérmicos.

3.2.4.3.1.2 Desintegração das pastas de celulose

De forma a produzir estruturas fibrosas em malha, as diversas pastas de celulose diferenciadas (30 g) foram previamente desintegradas a 30000 revoluções, segundo a norma de desintegração ISO 5263/1 (Anexo C1), através de um desintegrador apresentando as características referidas na norma.

3.2.4.3.1.3 Homogeneização das fibras de celulose

Posteriormente, são adicionados 6 litros de H₂O desmineralizada à suspensão fibrosa obtida após desintegração, consistência de 0,34% (m/m) para a pasta branqueada e consistência de 0,33% (m/m) para a pasta não branqueada, seguindo a norma TAPPI 240 om-88 (Anexo C4). Seguidamente, a suspensão fibrosa foi colocada em agitação, num agitador pro pás, a 3000 rpm, segundo a norma de preparação de estruturas/folhas de laboratório para ensaios de caracterização ISO 5269/1 (Anexo C2).

3.2.4.3.1.4 Obtenção de estruturas de fibras de celulose em malha

As estruturas foram obtidas em discos com uma gramagem de 60 g/m², sujeitas ao processo de prensagem, de forma a retirar o máximo de água possível, de acordo com a norma ISO 5269/1.

Posteriormente, as estruturas em malha sofreram uma secagem, sob tensão, num laboratório especializado com temperatura (22 °C) e humidade (50%) controladas, segundo a norma ISO 5269/1.

3.2.4.3.1.5 Refinação das pastas de celulose

Por fim, de forma a avaliar a influência da refinação nas diversas estruturas em malha, estas foram refinadas a diversas revoluções, utilizando um refinador PFI-mill: (1) 2500 revoluções, (2) 4500 revoluções e (3) 7500 revoluções, com propriedades específicas como descrito na norma ISO 5264-2:2011 (Anexo C5). Posteriormente, foram produzidas estruturas com estas suspensões fibrosas refinadas, com o mesmo método mencionado no subcapítulo 3.2.4.3.1.4.

As diversas amostras de celulose refinadas foram caracterizadas de modo a realizar um estudo comparativo entre elas, com o intuito de estudar a influência da refinação nas diversas características presentes nas fibras de celulose, de acordo com a norma ISO 534.

3.2.4.3.2 Produção de um óleo incorporado com canabinóides

Nesta etapa foi realizada a produção de diversos óleos incorporados com os canabinóides presentes de duas amostras de *Cannabis* com o intuito de serem utilizados na formulação dos DDS dérmicos, bem como, estudar a incorporação destes canabinóides em óleos alimentares. Para tal, recorreu-se a dois processos distintos, um processo inicial, Processo de Descarboxilação, e posteriormente a um processo de incorporação dos canabinóides no óleo de interesse, Processo de Incorporação.

3.2.4.3.2.1 Processo de descarboxilação

Primeiramente, os cadinhos foram pré-aquecidos num forno, a uma temperatura de 150°C durante 30 minutos, até atingirem uma massa constante, retirando restos de H₂O retidos nestes de modo a não influenciar futuras pesagens. Posto isto, as amostras de *Cannabis* foram previamente moídas, pesadas e aquecidas no forno a uma temperatura compreendida entre 120-140°C. Cada amostra foi retirada do forno após 2 h e inserida num exsiccador, de modo arrefecer totalmente, antes de ser pesado de modo a calcular o rendimento final obtido (Anexo D) (Moreno, Dyer, & Tallon, 2020).

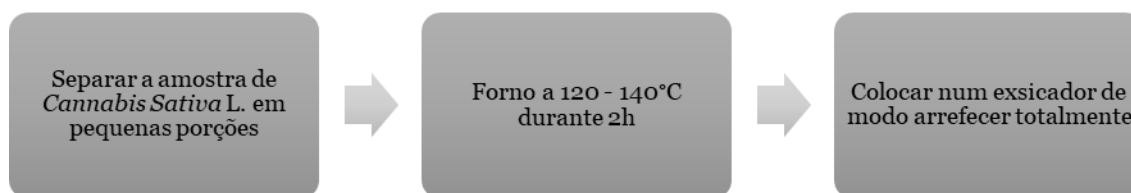


Figura 3.5 – Esquema representativo da metodologia utilizada no processo de descarboxilação.

3.2.4.3.2.2 Processo de incorporação

Após arrefecimento das amostras pós-decarboxiladas, estas foram pesadas e calculado o rendimento final e a quantidade de óleo a incorporar em cada amostra de modo obter um Ratio compreendido entre 20-40. Após pesagem do óleo, este foi incorporado na respetiva amostra descarboxilada e colocado num banho-maria a 70°C durante 2 h. Por fim, o óleo final foi colocado num exsicador até arrefecimento total.

$$Ratio (20 - 40) = \frac{m (mg) \text{ Matéria Orgânica}}{m (g) \text{ Óleo Incorporado}} \quad (3.1)$$

Equação do cálculo do Ratio na preparação dos óleos infundidos.

3.2.5 Teor de Matéria Seca

O teor de matéria seca (TMS) de uma amostra aplica-se à quantidade de material seco existente em amostras húmidas sujeitas a aquecimento em condições controladas de laboratório, eliminado desta forma toda a água possível.

Desta forma, de modo a determinar o TMS dos vários materiais utilizados ao longo do estudo, colocou-se uma quantidade de amostra numa balança de infravermelhos marca Mettler, modelo LJ16 Moisture Analyzer, seguindo a norma ISO 5263. A tabela 3.2 mostra os valores obtidos dos TMS dos diversos materiais utilizados ao longo do estudo, bem como, o tempo utilizado para as suas determinações.

Tabela 3.2 – Valores de TMS obtidos para diversos materiais ao longo do estudo.

Materiais	Tempo (min)	TMS (%)
Caule	60	90,20%
Sementes de Cânhamo	60	97,70%
Extrato e folhas de Cannabis	60	97,60%
Pasta de Celulose Branqueada	60	92,94%
Pasta de Celulose Não Branqueada	60	93,00%

3.2.6 Caracterização

Após obtenção das fibras de *Cannabis* e dos diversos óleos incorporados, estes foram caracterizados através de diversos processos.

3.2.6.1 Análise morfológica das fibras de Cannabis

A caracterização morfológica das fibras de *Cannabis*, obtidas pelo processo alcalino foi realizada através de dois métodos de microscopia: Microscopia Ótica e Microscopia Eletrônica de Varrimento.

3.2.6.1.1 Microscopia Ótica

A contagem, caracterização morfológica e as dimensões correspondentes das fibras de *Cannabis* foram investigadas utilizando o programa LARSX, acoplado ao Microscópio Ótico. Esta metodologia representa um processo simples e acessível, apresentando uma resolução adequada face à amostra analisar. Após secagem das fibras na estufa, estas foram colocadas entre lâmina e lamela de modo a conferir a fixação das mesmas, e posterior análise através do programa LARSX. Foram analisadas propriedades como o número de fibras presentes, e as dimensões de comprimento e largura das fibras e da sua parede celular.

3.2.6.1.2 Microscopia Eletrônica de Varrimento

De forma obter imagens de maior definição das fibras de *Cannabis*, o método de Microscopia Eletrônica de Varrimento (SEM), marca Hitachi (Tóquio, Japão), modelo S-2700, do Laboratório Ótico, da Faculdade de Ciências, da Universidade da Beira Interior, foi realizado. O SEM beneficia de uma grande profundidade de campo, pelo que, a maioria da superfície da amostra se encontra simultaneamente em foco, independentemente da rugosidade da superfície.

Ao contrário do SEM, os microscópios óticos dispõem uma profundidade de campo muito pequena, onde a qualidade da imagem se encontra altamente dependente da rugosidade da superfície da amostra (Vernon-Parry, 2000). Tendo em conta a rugosidade da superfície das fibras de *Cannabis*, o SEM demonstrou ser um método facultativo e conveniente na obtenção de imagens de elevada resolução.

As amostras foram colocadas sobre um suporte de alumínio, utilizando uma fita adesiva de lado duplo. De seguida, as amostras foram cobertas de ouro usando um Sputter Quorum Q 15 OR ES (Quorum Technologies, Reino Unido) e analisadas no SEM S2700 (Hitachi, Tóquio, Japão), operando a +20 kV e em diferentes ampliações.

3.2.6.2 Análise FTIR-ATR

De modo a caracterizar, identificar e quantificar os diversos óleos incorporados com os canabinóides, bem como as diversas amostras em estudo, utilizou-se a técnica de reflexão total atenuada (ATR) acoplada ao FTIR, marca Thermo-Nicolet IS10. O FTIR-ATR permite obter uma análise direta da superfície das amostras através da análise do espectro obtido da interação dos raios infravermelhos com a superfície da amostra.

Os espectros foram obtidos obedecendo às condições presentes na Tabela 3.3, onde posteriormente recorreu-se a um estudo comparativo entre eles. Posto isto, os espectros foram analisados nas diversas zonas espectroscópicas referentes a cada canabinóide em estudo (Tabela 3.4).

Tabela 3.3– Características empregues na técnica FTIR-ATR.

Características FTIR-ATR	
Nº de Scans	32
Resolução	4 cm ⁻¹
Comprimento de Onda	800 - 4000 cm ⁻¹

Tabela 3.4 – Zonas espectroscópicas dos diversos canabinóides (adaptado de (Cirrincione et al., 2021)).

Canabinóide	Banda FTIR-ATR
CBD	3085 - 3060 cm ⁻¹
CBDA	982 - 959 cm ⁻¹

3.2.6.3 Espectroscopia de Raio-X por dispersão em energia

Relativamente à caracterização química a nível elementar utilizou-se o método de espectroscopia de Raio-X por dispersão em energia, o EDX, da Bruker 129 eV. Esta técnica refere-se à análise, a nível elementar, associada ao SEM, que permite determinar a presença dos diversos elementos presentes numa dada amostra e em que proporções (Scimeca, Bischetti, Lamsira, Bonfiglio, & Bonanno, 2018). Posto isto, as sementes de cânhamo foram analisadas utilizando o EDX de modo a identificar os diversos elementos presentes na sua constituição.

3.2.7 Simulação Computacional

No estudo, identificação e otimização da quantidade de fibras de *Cannabis* a utilizar na elaboração dos DDS, de forma a obter uma proporção ideal, bem como a análise destas fibras quando conjugadas com outros tipos de fibras, foi utilizado um simulador, o *Voxelfiber*, desenvolvido e validado por (Conceição, Curto, Simões, & Portugal, 2010; J.M.R. Curto, Conceição, Portugal, & Simões, 2011) capaz de simular computacionalmente a rede celulósica 3D produzida por estas fibras, com sua programação em MATLAB® versão (R 2022a).

O simulador é baseado num autómato celular, no qual existe uma divisão cartesiana celular, fazendo com que cada fibra seja representada como uma sequência de voxéis, onde cada uma ocupa um volume pré-estabelecido (Flávia P. Morais & Curto, 2022). Através deste simulador, é possível obter uma modelagem 3D das estruturas fibrosas produzidas por cada fibra individual, ou conjugada, podendo manipular as diversas características presentes nas fibras, das quais, os seus comprimentos e larguras, a sua flexibilidade, espessura da parede da fibra, espessura do lúmen e sua resolução (Flávia P. Morais, Carta, et al., 2020b, 2020a).

3.2.8 Análise Estatística

Todos os dados obtidos ao longo do estudo, bem como as informações obtidas para cada estrutura de fibra de celulose refinada em malha, foram analisadas e validadas utilizando o programa Microsoft Office Excel 2016.

Capítulo IV

Resultados e Discussão

4. Resultados e Discussão

No presente capítulo serão apresentados e discutidos, inicialmente, os resultados obtidos da caracterização do óleo e das fibras de *Cannabis* obtidos por processos distintos. Também será demonstrada uma abordagem experimental e computacional para o design, desenvolvimento e otimização de DDS com diferentes propostas de aplicação. A Figura 4.1 apresenta um esquema da metodologia realizada com os resultados apresentados em cada etapa.

Na Figura 4.1 é evidenciado os diversos métodos aplicados no desenvolvimento dos DDS e dos óleos de interesse, bem como as diversas informações obtidas ao longo de cada etapa do estudo.

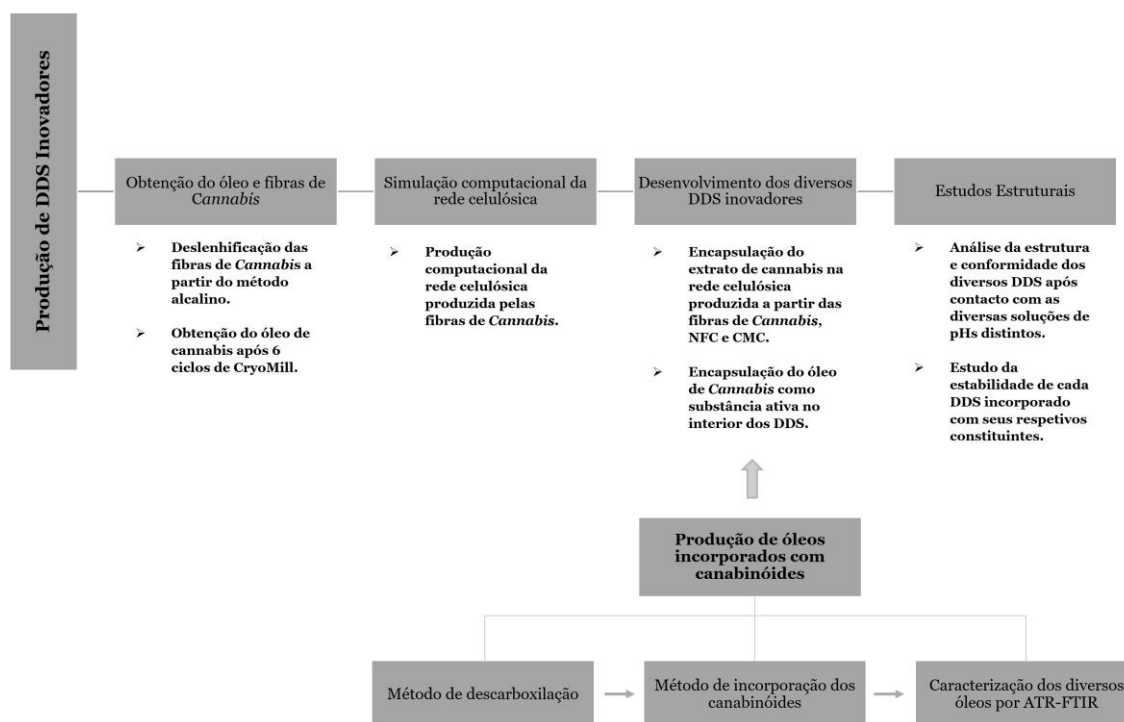


Figura 4.1 – Esquema das diversas metodologias aplicadas ao longo do estudo e informações relativas a cada etapa efetuada.

4.1. Obtenção e caracterização do óleo de Cannabis

4.1.1. Processo de crio-moagem

De forma a produzir os diversos DDS de interesse, inicialmente foi necessário a obtenção do óleo de Cannabis. Para tal, foram comercialmente obtidas sementes de cânhamo e posteriormente realizado 6 ciclos de CryoMill® atendendo às diversas características empregues por esta técnica (Figura 4.2).

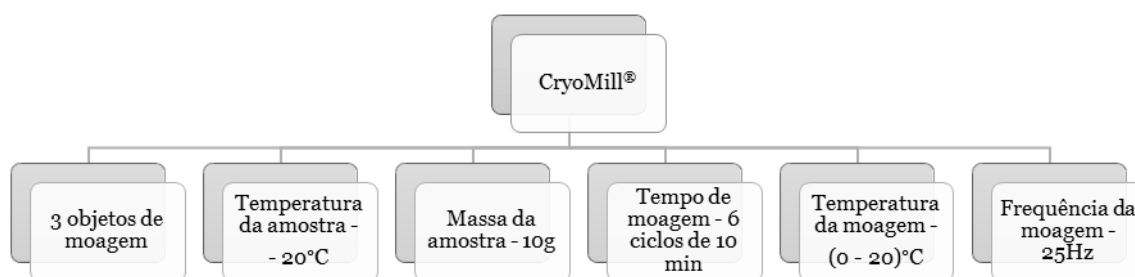


Figura 4.2 – Características utilizadas nas sementes de cânhamo provenientes da técnica CryoMill®.

Ao longo dos diversos ciclos de moagem foram verificadas diferenças na textura do óleo de Cannabis, indicando desta forma uma proporcionalidade direta entre a quantidade de ciclos efetuados no CryoMill® e a textura do óleo obtido. Esta técnica implica uma moagem a baixas temperaturas evitando deste modo variações de temperatura da amostra durante o processo de moagem, preservando deste modo a constituição das sementes de cânhamo (Harman, 1956).

Na Figura 4.3 está esquematizado todos os ciclos realizados, evidenciando as notáveis diferenças de textura do óleo de Cannabis ao longo de todo o processo de moagem.

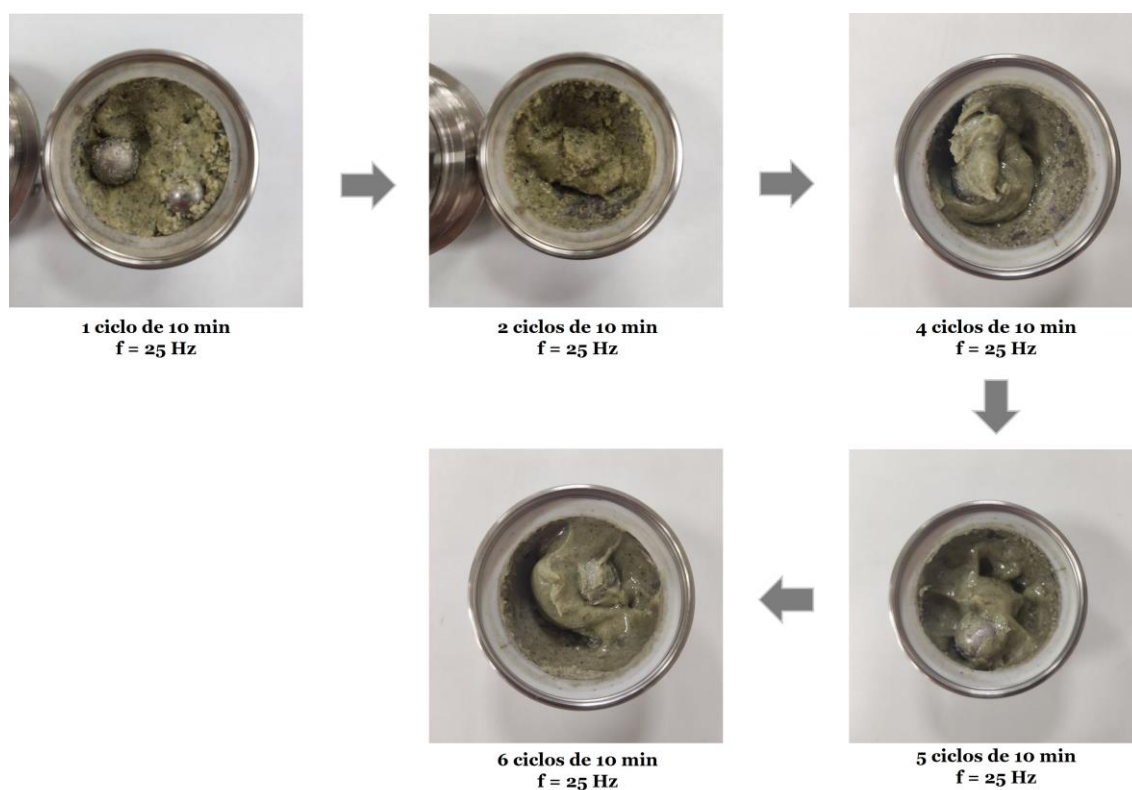


Figura 4.3 – Esquema dos diversos ciclos CryoMill® realizados em sementes de cânhamo.

4.1.2. EDX das sementes de cânhamo

Adicionalmente, as sementes de cânhamo foram submetidas à técnica EDX a fim de analisar a sua constituição elementar, através do estudo e quantificação dos elementos químicos também presentes.

As sementes de cânhamo apresentam na sua constituição inúmeros elementos químicos característicos de produtos alimentares, dos quais, carbono (C), oxigênio (O), potássio (K), enxofre (S), fósforo (P) e magnésio (Mg). Apesar de estas sementes terem sido comercialmente obtidas, apresentando um rótulo BIO (Figura 3.1), pretendeu-se através do EDX analisar a constituição elementar das sementes de cânhamos crio-móidas, e desta forma provar que as mesmas não apresentam nenhuma taxa de impurezas.

Através do espectro EDX (Figura 4.4) é possível concluir a existência de todos os elementos químicos característicos das sementes de cânhamo sem a presença de nenhuma taxa de impureza. O pico referente ao átomo de azoto (N) deve-se ao processo de crio-moagem que as sementes de cânhamo foram sujeitas.

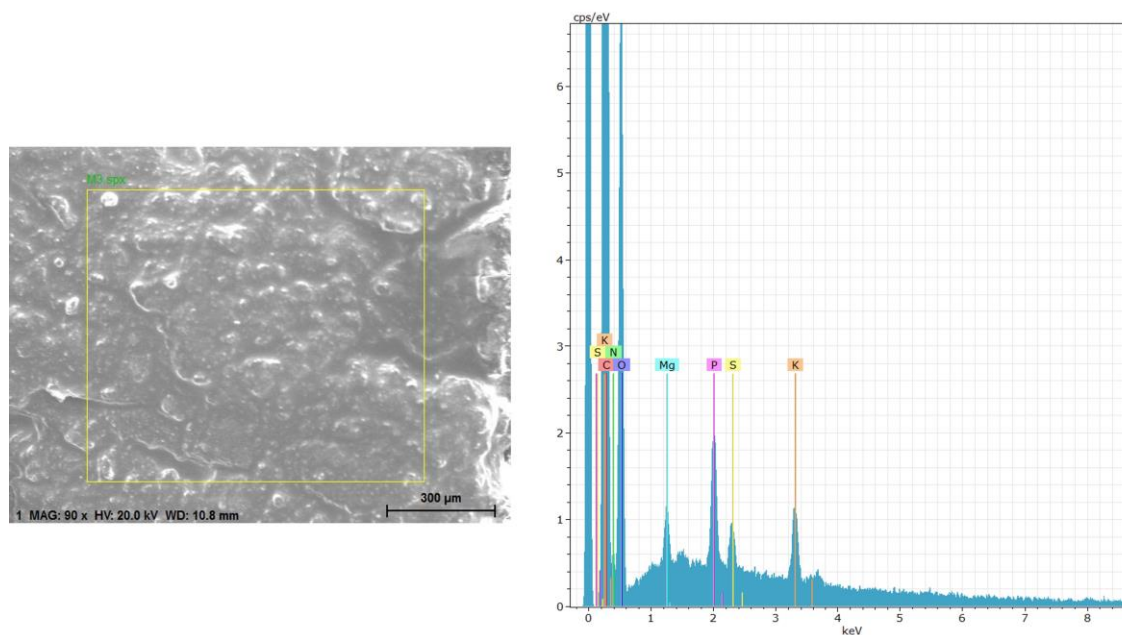


Figura 4.4 – Imagem SEM (esquerda) e espectro de análise EDX (direita) das sementes de cânhamo criomóidas.

4.2. Obtenção e caracterização das fibras de *Cannabis* a partir do Processo Alcalino

Nesta etapa foram obtidas e caracterizadas as fibras de *Cannabis*, a partir dos caules, usando o Processo Alcalino como meio de obtenção. Este processo é subdividido em duas etapas: (1) uma etapa inicial com a finalidade de eliminar a lenhina presente nos caules e desta forma deslenhificar as fibras de *Cannabis*, processo de cozimento, e (2) uma etapa final utilizando um branqueador de forma a branquear as fibras de *Cannabis* e eliminar resíduos de lenhina presentes nestas, processo de branqueamento (Figura 4.5).

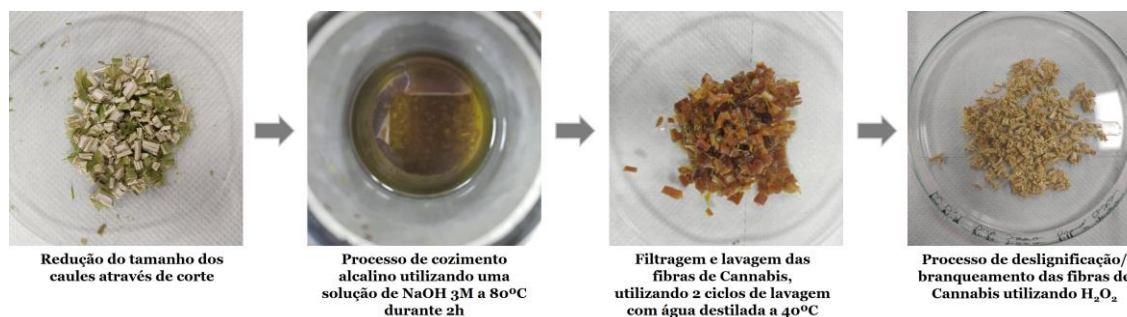


Figura 4.5 – Esquema ilustrativo das diversas etapas empregues na obtenção das fibras de *Cannabis*.

4.2.1. Caracterização das fibras de Cannabis por Microscopia Ótica

Após a secagem total das fibras de Cannabis, estas foram analisadas através da técnica de Microscopia Ótica acoplada ao programa LARSX. Este programa tem como finalidade a obtenção de imagens das fibras de Cannabis com uma resolução adequada, face à amostra a analisar, com posterior análise do número de fibras, medição dos seus comprimentos e diâmetros, bem como a medição da largura da parede celular de cada fibra.

No total, foram analisadas individualmente cerca de 114 fibras de modo obter uma análise completa da lâmina (Figura 4.6). Diversas medições dos números, comprimentos e diâmetros das fibras foram realizadas de modo a proporcionar o desenvolvimento de um histograma (Figura 4.7) relacionado o número médio de fibras e os seus respetivos diâmetros, com o intuito de inferir sobre a eficácia do método de deslenhificação das fibras obtidas através do Processo Alcalino.

Os resultados indicaram que 22% da população de fibras apresentaram diâmetros superiores a 40 μm , 29% diâmetros entre 20 e 40 μm , 43% entre 10 e 20 μm , e por fim 6% inferiores a 10 μm . Destes dados conclui-se que a maioria das fibras de Cannabis analisadas (cerca de 50 fibras, das 114 analisadas) apresentam um diâmetro compreendido entre 10-20 μm , demonstrando desta forma um tamanho reduzido, indicativo da eficácia da deslenhificação das fibras através do Processo Alcalino.

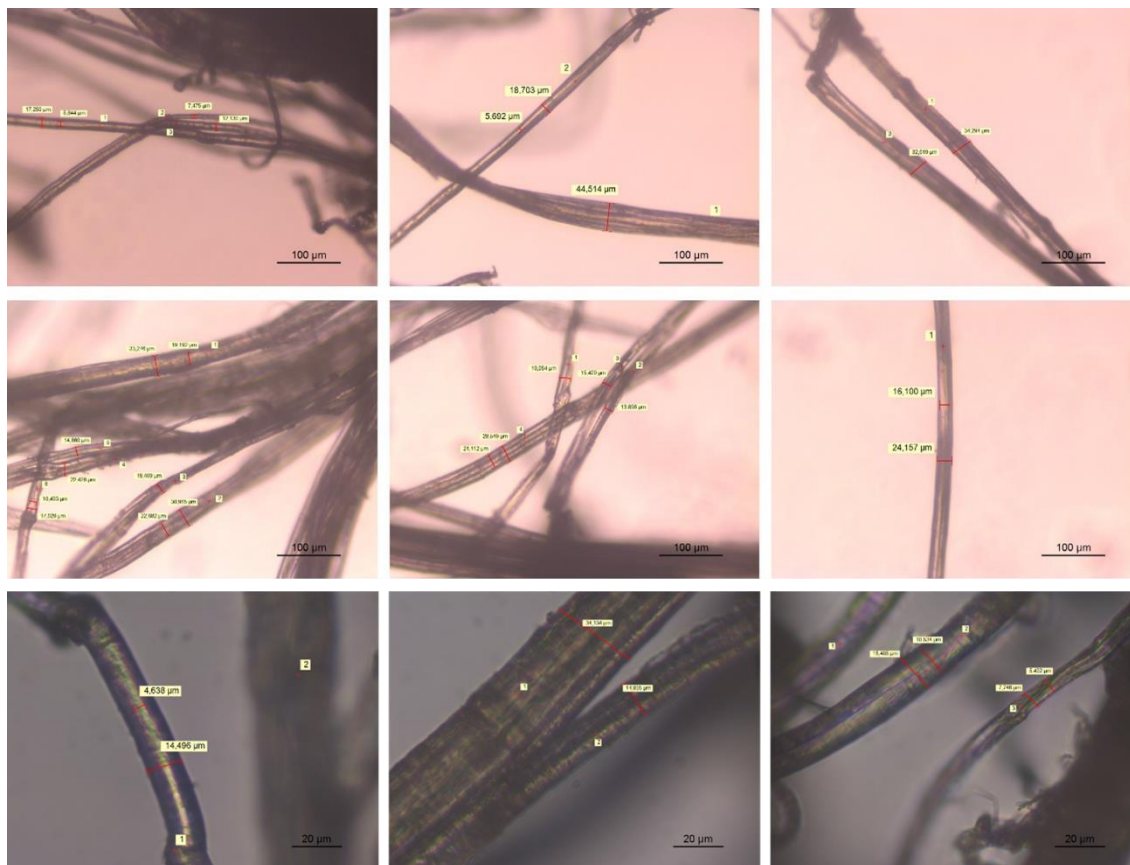


Figura 4.6 – Imagens microscópicas das fibras de Cannabis obtidas através do processo alcalino. Foram utilizadas 2 óticas distintas de modo obter imagens diferenciadas e objetivas: 10x nas primeiras seis imagens e ótica 40x nas restantes.

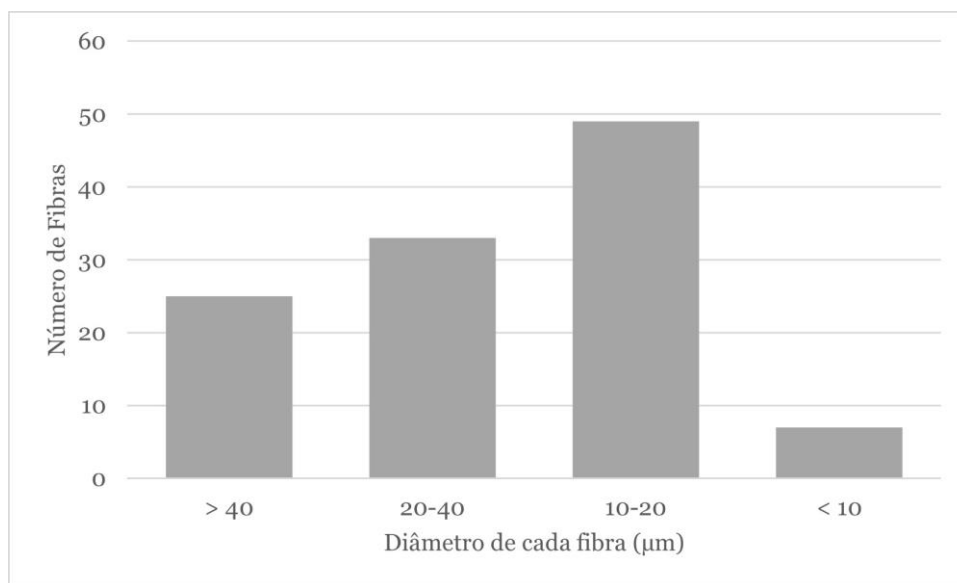


Figura 4.7 – Histograma relacionando os diâmetros médios das fibras de Cannabis observadas microscopicamente, com o número médio de fibras analisadas. No total, foram analisadas 114 fibras ao longo de toda a lâmina.

4.2.2. Caracterização das fibras de Cannabis por SEM

O SEM foi utilizado de modo obter imagens das fibras de Cannabis, com uma maior resolução em comparação com a técnica de Microscopia Ótica, estando totalmente independentes da rugosidade da superfície da amostra em análise (Vernon-Parry, 2000). Através desta técnica foi possível obter imagens de elevada resolução das fibras de Cannabis (Figura 4.8), nas quais é visível a morfologia das fibras em detalhe. Através de uma análise individual de cada imagem obtida das fibras de Cannabis por este método, é notável o sucesso do Processo Alcalino, na deslenhificação destas fibras, obtendo imagens claras de ótima resolução de fibras de Cannabis de reduzido tamanho.

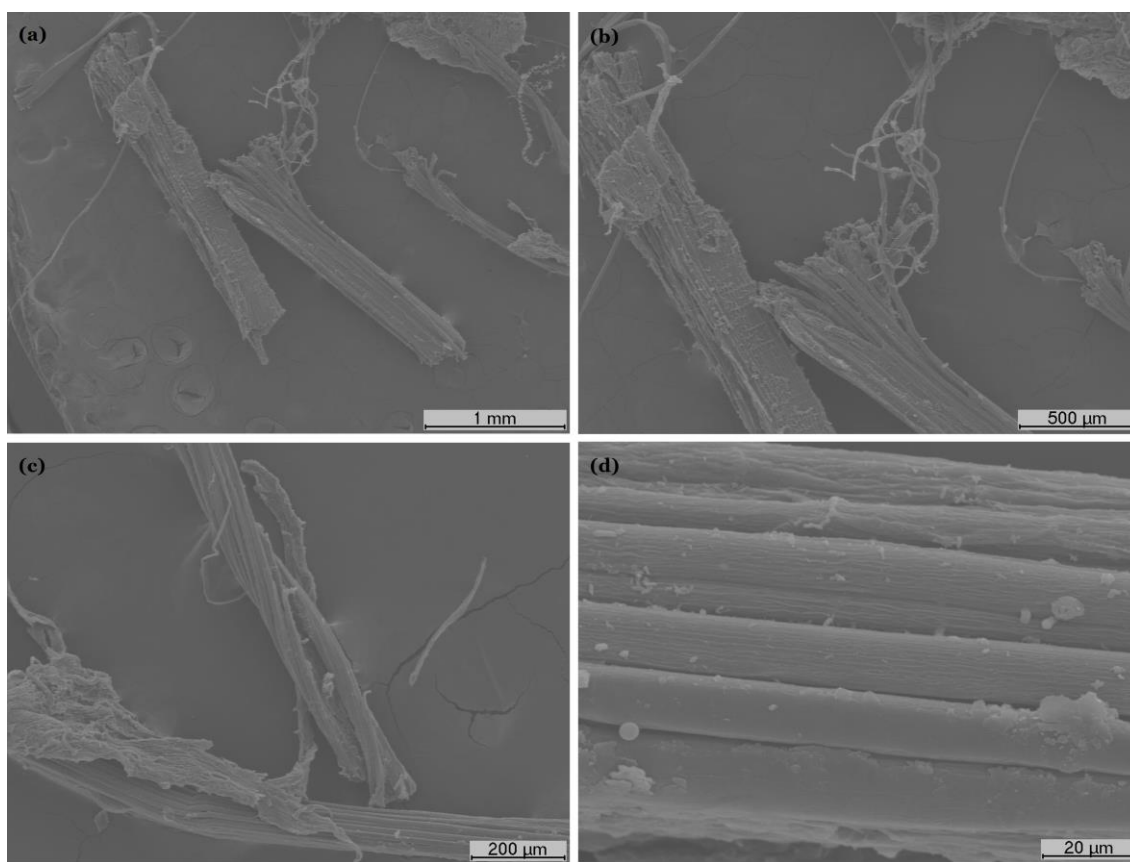


Figura 4.8 – Imagens SEM das fibras de Cannabis obtidas através do processo alcalino, com ampliação de 30x (a), 50x (b), 100x (c) e 1000x (d).

4.3. Desenvolvimento de DDS inovadores

A Figura 4.9 apresenta o esquema dos DDS desenvolvidos no presente estudo, consoante a sua área final de aplicabilidade.

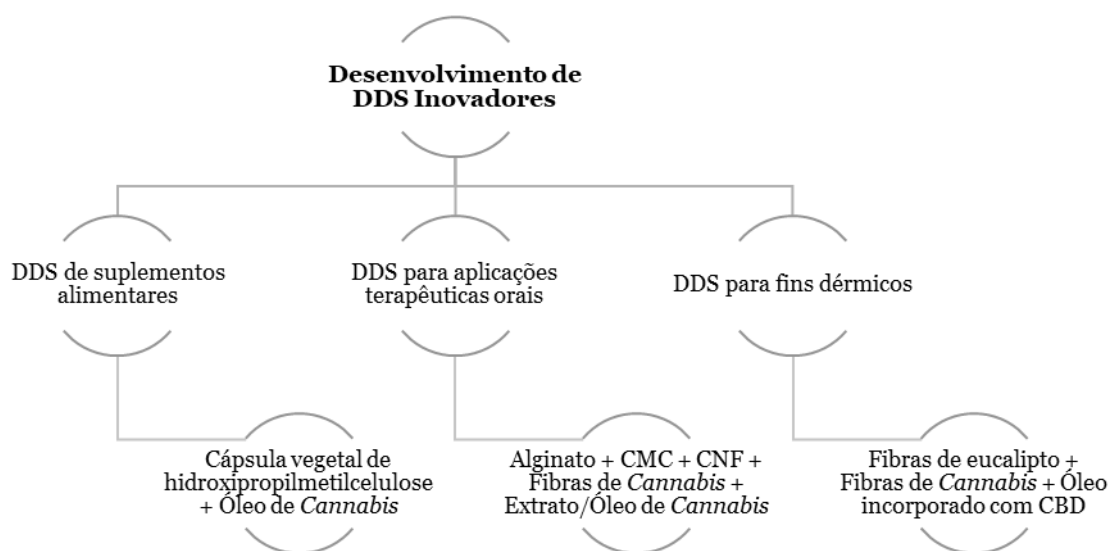


Figura 4.9 – Esquema ilustrativo da constituição dos diversos DDS inovadores produzidos.

4.3.1. DDS de suplementos alimentares

As sementes de cânhamo contêm grandes quantidades de nutrientes, proteínas, fibras, minerais e ácidos gordos insaturados, o que as torna um bom componente fortificante numa dieta alimentar (Teterycz, Sobota, Przygodzka, & Lysakowska, 2021). Desta forma, a incorporação destas sementes na alimentação torna-se um importante fator. Contudo, diversas patologias dificultam a introdução destas sementes na alimentação, dos quais, a dispepsia, descrita como a sensação de ardor, dor e desconforto na parte superior do abdómen, normalmente associado a pacientes que apresentem problemas de digestão (Overland, 2014), e a doença do refluxo gastroesofágico, que consiste na passagem do conteúdo gástrico para o esófago, causando dor e inflamação constante da parede do esófago (Kellerman & Kintanar, 2017).

Atendendo a estas circunstâncias patológicas, foram produzidos DDS de suplementos alimentares contendo o óleo de Cannabis, laboratorialmente obtido, com a finalidade de serem facilmente ingeridos, sem provocar nem agravar nenhuma possível patologia existente, e deste modo serem totalmente absorvidos os constituintes presentes nas sementes de cânhamo.

No desenvolvimento destes DDS foram utilizados dois constituintes principais, o óleo de *Cannabis*, laboratorialmente obtido como descrito no subcapítulo 4.1, e uma cápsula vegetal de hidroxipropilmetilcelulose, de pequenas dimensões, facilmente ingerível. O DDS foi elaborado através da introdução do óleo de *Cannabis*, obtido após 6 ciclos no CryoMill®, na cápsula vegetal. De referir que as fibras de *Cannabis* poderiam ser incorporadas nestes DDS a fim de produzir uma rede celulósica 3D com a capacidade de reter e libertar retardada e prolongadamente o óleo de *Cannabis*.

4.3.2. DDS para aplicações terapêuticas orais






Nesta etapa foram elaborados diversos DDS para aplicações terapêuticas orais incorporados com a molécula ativa CBD, presente no extrato de *Cannabis*, como sua substância terapêutica.

Estes DDS administrados por via oral específicos para atuação no cólon, surgiram como um dos principais métodos terapêuticos inovadores no combate à doença inflamatória do intestino (Kotla et al., 2019). Uma vez que a molécula CBD apresenta elevadas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes (Franco & Perucca, 2019; Pellati et al., 2018), surgiu a hipótese do uso desta molécula como substância terapêutica retida no interior dos DDS de forma a combater a doença inflamatória do intestino ou outras patologias responsáveis pela inflamação do intestino.

Foram formulados diversos DDS distintos apresentando diversas proporções e constituintes (Tabela 4.1) de forma a realizar uma análise comparativa estrutural entre eles. Foram também elaborados dois DDS contendo o óleo de *Cannabis* como substância ativa, invés do extrato de *Cannabis*, de forma a estudar a eficácia do encapsulamento deste óleo no interior da rede celulósica produzida pelos DDS. Pela observação geral dos DDS, conclui-se o seguinte:

- A produção dos DDS esféricos foi eficaz;
- A incorporação e retenção do extrato e óleo de *Cannabis* na rede 3D foi eficaz, devido à coloração final de cada DDS produzido;
- A produção de uma rede celulósica a partir das fibras de *Cannabis*, CMC e NFC foi conseguida;
- A coloração dos DDS 2:1:1 foi distinta comparativamente com os restantes DDS incorporados com extrato de *Cannabis*, uma vez que estes apresentam uma menor proporção de CMC e, conseqüentemente, uma coloração mais acentuada;
- Foram encontradas diferenças nas dimensões entre os DDS 2:2:1 contendo fibras de *Cannabis* e os DDS 2:2:1 sem as fibras de *Cannabis* incorporadas;
- A produção de alguns DDS não esféricos foi também observável no caso dos DDS 2:2:0,5 em comparação aos DDS 2:2:0,1, devido à maior proporção de óleo de *Cannabis*, o que dificultou a pipetagem da formulação final na solução de CaCl₂.

Tabela 4.1 – Descrição dos diversos DDS elaborados no estudo. As proporções foram realizadas em termos de massa (Alg – Alginato, CMC – Carboximetilcelulose, FC – Fibras de *Cannabis*, NFC – Nano celulose).

DDS Formulados		
Proporção	Constituintes	Imagens
2:1:1	Alg, CMC e Extrato de <i>Cannabis</i>	
2:2:1	Alg, CMC e Extrato de <i>Cannabis</i>	
2:2:1	Alg, (CMC, FC, NFC) e Extrato de <i>Cannabis</i>	
2:2:0,1	Alg, CMC e Óleo de <i>Cannabis</i>	
2:2:0,5	Alg, CMC e Óleo de <i>Cannabis</i>	

Para o desenvolvimento destes DDS, a otimização dos constituintes incorporados na matriz 3D celulósica é essencial para a terapêutica específica a utilizar. Comparativamente com os restantes, o DDS 2:1:1 apresenta uma maior tonalidade devido à menor proporção de CMC no seu interior. Assim, a dosagem do extrato de *Cannabis* a utilizar pode também ser otimizada para diversas linhas de aplicação, com as respetivas folhas que contêm proporções de CBD e THC requeridas. Adicionalmente, as etapas de produção e desenvolvimento dos DDS podem também ser otimizadas, como o processo de ultrassonificação, que permitem a combinação e o controlo das substâncias ativas a serem encapsuladas, potenciando o efeito terapêutico desejado.

Através de um estudo proveniente de (Almeida, 2020), existem no mercado inúmeros fármacos contendo doses de CBD, utilizados em diversas patologias ou terapias. Através da junção de um desses fármacos no DDS, será possível potenciar o efeito terapêutico da substância ativa e deste modo despoletar um maior número ou taxa de eficácia terapêutica. Um exemplo para o design de novos DDS combinados é a encapsulação de medicamentos que ajudam a induzir o sono, como o *Cannabidiol Dormibidiol*[®] (Laboratórios Tego) que contém cerca de 10 mg de CBD em cada cápsula. Este medicamento pode sofrer ainda um processo de crio-moagem reduzindo o seu tamanho. A incorporação pode ser realizada com 10% deste *Cannabidiol Dormibidiol*[®] modificado, contendo 1 mg de CBD, em 45 g de CMC através do método de ultrassonificação. Posteriormente, esta solução homogeneizada é adicionada ao agente de reticulação alginato (45 g), de forma a desenvolver um DDS constituído com 10% da substância ativa, potenciando o efeito terapêutico.

Múltiplas combinações são possíveis de serem otimizadas utilizando vários constituintes da planta de *Cannabis*, aumentando os efeitos terapêuticos desejados. O design de DDS pode evidenciar (1) os efeitos nutricionais das sementes de *Cannabis*; (2) os efeitos terapêuticos da molécula ativa CBD, na sua forma biologicamente ativa, descarboxilada, ou neutra através de sua crio-moagem; e ainda (3) a conjugação dos efeitos terapêuticos da molécula CBD com os efeitos produzidos pelo *Cannabidiol Dormibidiol*[®].

Na Tabela 4.2 encontram-se referenciados possíveis conjugações na formulação de diversos DDS, para diversas áreas de interesse, tendo em conta diversas características, das quais: (1) a proporção de cada constituinte a utilizar; (2) a concentração de alginato a utilizar, podendo otimizar a conformidade e estrutura do DDS controlando deste modo a sua estabilidade, estando este diretamente relacionado com a libertação controlada e retardada das substância ativas presentes na interior da rede 3D; (3) as diversas fibras conjugadas entre si de forma a produzir uma rede celulósica, controlando e otimizando as suas diversas propriedades, das quais, comprimento e largura, porosidade, flexibilidade e espessura da sua parede; (4) a presença de uma ou várias substâncias ativas encapsuladas no interior da rede celulósica de forma a produzir e potenciar os efeitos terapêuticos e farmacológicos.

De referir ainda que o processo de ultrassonificação é previamente utilizado de modo a obter estas possíveis formulações, promovendo uma homogeneização ótima no desenvolvimento dos diversos DDS.

Tabela 4.2 - Possíveis conjugações dos constituintes empregues na formulação de DDS inovadores para diversas áreas de interesse.

	Proporção	Concentração de Alginato	Matriz 3D Celulósica	Substâncias Ativas	Área de Interesse
1	2:1:1	0,3% (m/v)	Fibras de Cannabis e NFC	50% óleo de Cannabis 50% sementes de Cannabis criomóidas	Alimentar
2	2:1:1	0,5% (m/v)	Fibras de Cannabis, NFC e CMC	30% Flor CBD descarboxilada 20% Flor CBD não descarboxilada 50% Fármaco Cannabidiol Dormibidiol®	Terapêutica
3	2:2:1	0,5% (m/v)	Fibras de Cannabis e fibras de Eucalyptus	50% Óleo de Cannabis 50% Flor CBD descarboxilada	Dérmica
4	2:2:1	0,3% (m/v)	Fibras de Cannabis, fibras de Eucalyptus, NFC e CMC	10% Fármaco Cannabidiol Dormibidiol® 85% Flor CBD descarboxilada 5% Flor CBD não descarboxilada	Terapêutica
5	3:2:1	0,5% (m/v)	Fibras de Cannabis, fibras de Eucalyptus e CMC	50% Sementes de Cannabis criomóidas 40% Flor CBD descarboxilada 10% Óleo de Cannabis	Alimentar

4.3.2.1. Análise estrutural dos diversos DDS

A análise estrutural dos diversos DDS poliméricos foi realizada com o intuito de compreender o comportamento de cada DDS após serem submetidos nas diversas soluções com pH específico, durante todo o ensaio. Para tal, foram preparados e realizados diversos ensaios de modo a proporcionar ambientes com pH equiparáveis aos *in vivo*.

Os ensaios foram realizados num tempo suficiente para a substância ativa presente (CBD) demonstrar efeito terapêutico (6h), sendo divididos em três etapas: (1) os DDS foram suspensos durante 2h numa solução de HCl, pH = 2, mimetizando a entrada dos DDS no estômago, (2) os DDS foram filtrados e colocados, durante outras 2h, numa solução tampão fosfato com pH = 6,6, mimetizando a passagem para o duodeno, e por fim (3) elevou-se o pH do meio para 7,4 mimetizando o pH da corrente sanguínea, onde os DDS se localizarão com destino ao intestino delgado.

Foram anotadas as diversas diferenciações visualizadas a cada 30 minutos do ensaio, nas diversas soluções.

4.3.2.1.1. DDS incorporados com extrato de Cannabis

As Figuras 4.10 a 4.12 apresentam os três DDS poliméricos produzidos incorporados com extrato de Cannabis, como sua substância ativa, ao longo do ensaio.

Através da visualização dos DDS desenvolvidos, é notável a diferença exercida pela presença das fibras de Cannabis e NFC na constituição interna do DDS em comparação com os restantes. A incorporação destas fibras no DDS potência a estabilidade, conformação e estruturação da rede celulósica produzida no seu interior, aumentando desta forma a sua resistência interna, inibindo assim a sua degradação ao longo de todo o estudo estrutural. Os DDS com apenas CMC como rede 3D mostraram uma baixa redução na sua estabilidade devido à perda acentuada no número de DDS esféricos quando submetidos à solução tampão fosfato pH = 7,4. As proporções utilizadas nos estudos também apresentaram grande influência na estrutura dos DDS. Os DDS 2:1:1 apresentaram uma coloração mais acentuada devido à menor quantidade de fibras no seu interior, em comparação com os restantes. De forma geral, os DDS apresentam algumas semelhanças ao longo do ensaio, tal como a coloração apresentada, foi verificada uma diminuição acentuada na coloração dos DDS após serem submetidos à solução HCl. Esta evidência deve-se ao facto de que em pH baixos, a camada de gel produzida pelo alginato é modificada devido à conversão deste em ácido algínico (Tønnesen & Karlsen, 2002). No caso da exposição a pH mais altos ocorre um aumento da porosidade dos DDS uma vez que o ácido algínico se transforma gradualmente num sal mais solúvel (Tønnesen & Karlsen, 2002), promovendo a libertação da substância ativa presente na rede 3D e a degradação gradual dos DDS. Este fundamento é confirmado pela observação da diminuição acentuada da coloração e conformidade dos DDS à medida que estes são sujeitos a soluções com um pH mais elevado, demonstrando deste modo a ocorrência da libertação das substâncias ativas presentes no interior da rede celulósica destes DDS poliméricos.

DDS 2:1:1

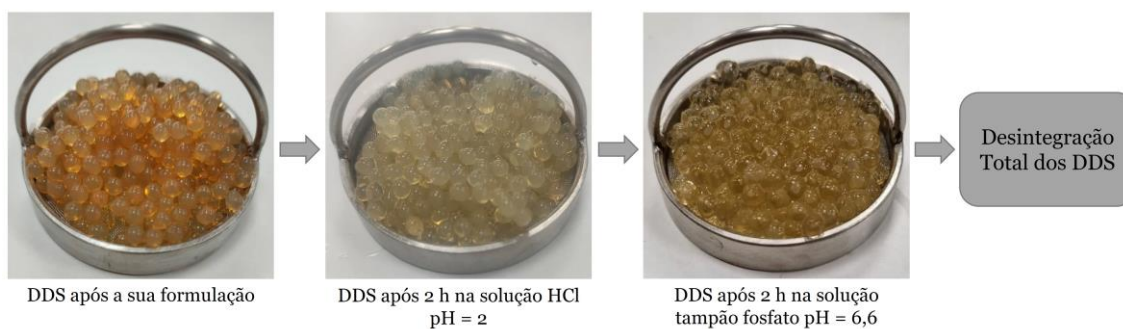


Figura 4.10 – Estudo estrutural dos DDS 2:1:1 após serem submetidos a diversas soluções com pH diferenciado.

DDS 2:2:1

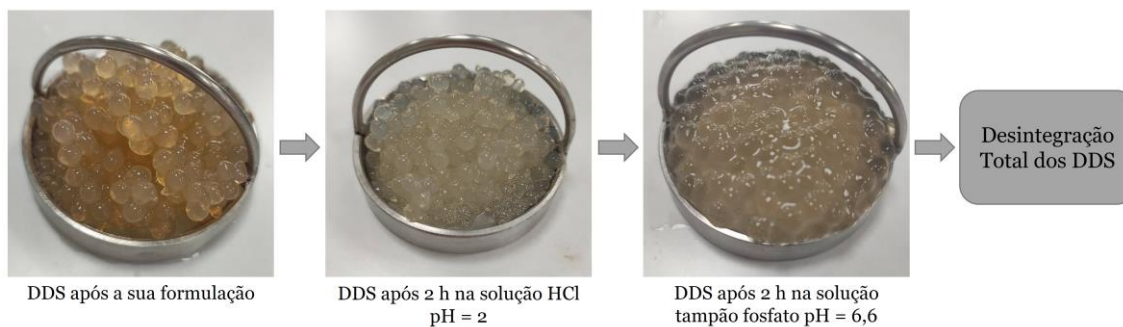


Figura 4.11 – Estudo estrutural dos DDS 2:2:1 após serem submetidos a diversas soluções com pH diferenciado.

DDS 2:2:1 c/ FC e NFC

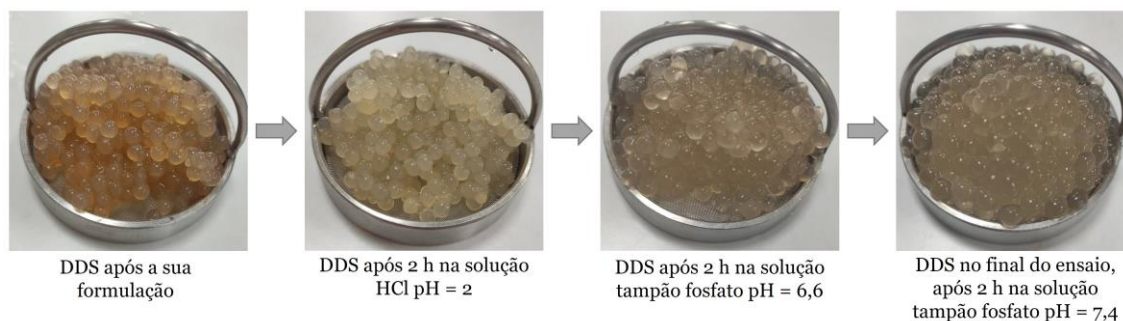


Figura 4.12 – Estudo estrutural dos DDS 2:2:1, contendo fibras de Cannabis (FC) e NFC na sua constituição, após serem submetidos a diversas soluções com pH diferenciado.

4.3.2.1.2. DDS incorporados com óleo de Cannabis

As Figuras 4.13 e 4.14 apresentam os DDS incorporados com o óleo de Cannabis, como substância ativa.

Através de vários ciclos de ultrassonificação, foi possível obter a junção do óleo de Cannabis no interior da rede celulósica, onde este se encontra na forma de micelas lipídicas (Torchilin, 2004). Foi procedido a um estudo estrutural dos diversos DDS contendo o óleo de Cannabis na sua constituição de modo a estudar a importância das diferenças de proporções relativas à quantidade de óleo a ser incorporada, bem como, o comportamento dos DDS quando submetidos a diversas soluções de pH diferenciados. Através de uma análise das diferenças visualizadas pelos DDS ao longo do estudo cinético, concluiu-se que a incorporação deste óleo na constituição dos DDS promove um aumento da sua resistência e conformidade, diminuindo, assim, a sua degradação ao longo de todo o estudo estrutural. As diferenças de coloração também são facilmente visíveis, demonstrando uma diminuição acentuada da coloração do DDS 2:2:0,1 no final do ensaio em comparação com o DDS 2:2:0,5. Esta facto deve-se à menor quantidade de óleo de Cannabis presente nos DDS. Em termos de estrutura, os DDS 2:2:0,5 apresentam alguns DDS esféricos mesmo após o estudo estrutural, contrariamente ocorridos nos restantes DDS formulados. Esta evidência é comprovada pela maior quantidade de óleo de Cannabis presente no interior destes DDS, conferindo uma elevada resistência para manter a estrutura esférica dos DDS, mas ao mesmo tempo inibe a libertação do óleo da rede celulósica 3D.

DDS 2:2:0,1

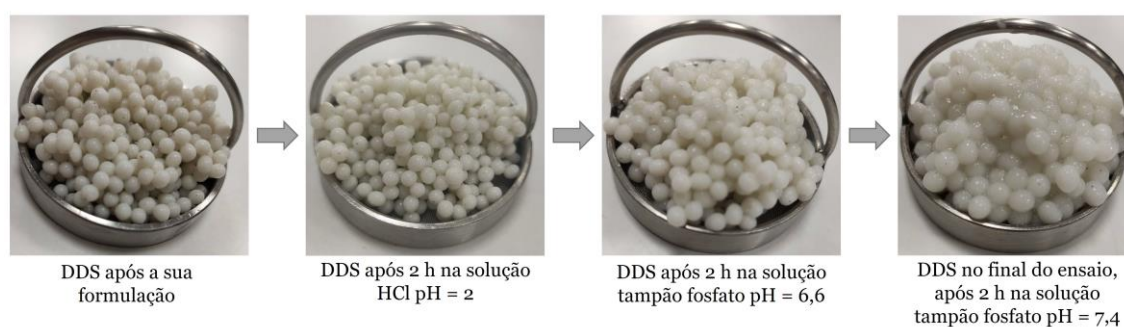


Figura 4.13 – Estrutura dos DDS 2:2:0,1, contendo o óleo de Cannabis como sua substância ativa, após serem submetidos a diversas soluções com pH diferenciado.

DDS 2:2:0,5

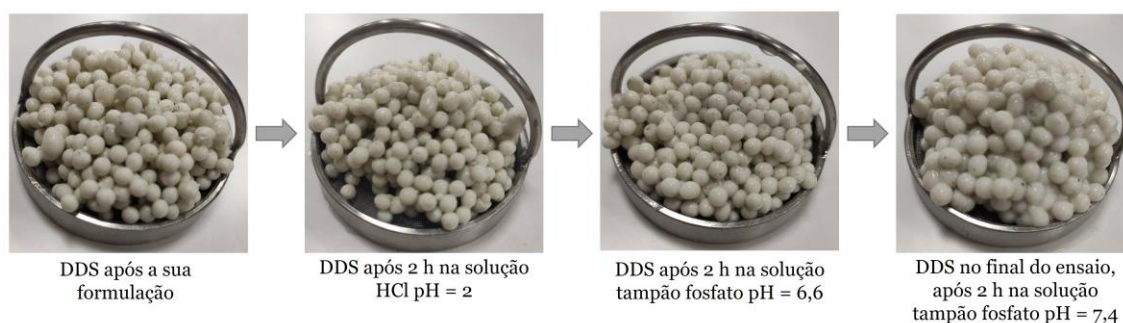


Figura 4.14 – Estudo estrutural dos DDS 2:2:0,5, contendo o óleo de *Cannabis* como sua substância ativa, após serem submetidos a diversas soluções com pH diferenciado.

4.3.3. DDS para aplicações dérmicas

Os materiais multi-estruturados podem ser utilizados no design e desenvolvimento de DDS para aplicações dérmicas uma vez que cada camada pode ser otimizada para uma funcionalidade específica. Foram desenvolvidos laboratorialmente matrizes 3D de fibras branqueadas de *Eucalyptus globulus* e não branqueadas de *Picea abies* (Figura 4.15a). Estas estruturas caracterizam-se por apresentarem uma rede 3D de fibras aleatória, uniforme e porosa, permitindo que as substâncias ativas fiquem retidas e se libertem prolongada e controladamente, conseguindo assim, atingir efeitos terapêuticos pretendidos de forma rápida e segura. Esta rede 3D pode ser utilizada como uma de três camadas para o desenvolvimento destes DDS.

Adicionalmente, estas fibras foram sujeitas a tratamentos mecânicos de refinação de 2500 revoluções, 4500 revoluções e 7500 revoluções PFI-mill (Figura 4.15b), a fim de avaliar o efeito do processo nas propriedades estruturais, e a sua viabilidade na otimização de estruturas fibrosas para aplicações dérmicas. Na finalidade de obter uma análise estatística comparativa, foram produzidas 10 estruturas para cada tipo de fibra refinada, com posterior medição de diferentes propriedades estruturais como massa, gramagem, espessura, densidade e porosidade (Anexo E). Os resultados indicaram que o aumento da refinação exercida nas fibras de celulose está diretamente relacionado com a diminuição da porosidade das estruturas, sendo esta uma característica de interesse na produção destes DDS dérmicos uma vez que as moléculas terapêuticas ficam retidas na matriz 3D produzida, libertando-se controladamente. A refinação a 4500 revoluções foi considerada como a refinação ótima, uma vez que apresenta propriedades estruturais requeridas para o desenvolvimento de DDS para aplicações dérmicas.

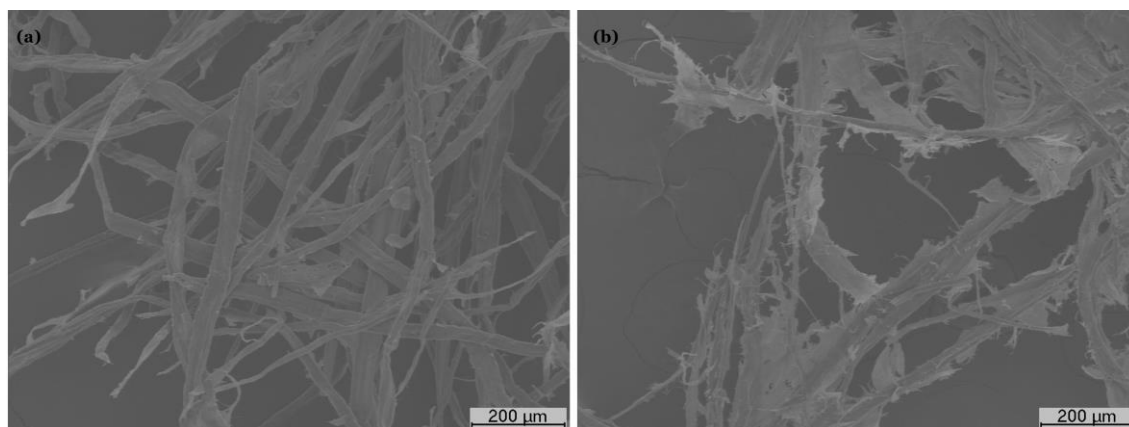


Figura 4.15 - Imagens SEM das fibras de *Picea abies* não-branqueadas sem refinação (a) e com refinação de 7500 revoluções PFI-mill (b), com uma ampliação de 100x.

Outras possibilidades são a utilização de matrizes 3D de fibras de nano celulose bacteriana (BNC) e fibras de *Cannabis*. Nicu et al., 2021, modelaram computacionalmente uma matriz 3D celulósica de BNC, como mostrado na Figura 4.16a. No presente estudo, a matriz 3D celulósica de fibras de *Cannabis* foi modelada e otimizada computacionalmente, utilizando um simulador de materiais fibrosos, *Voxelfiber*, em MATLAB® (Figura 4.16b). Os resultados indicaram que as fibras de *Cannabis* produzem uma matriz celulósica 3D uniforme e estável, com porosidade otimizada, capaz de reter, no seu interior, e libertar controladamente moléculas ativas, com aplicabilidade em DDS para fins dérmicos.

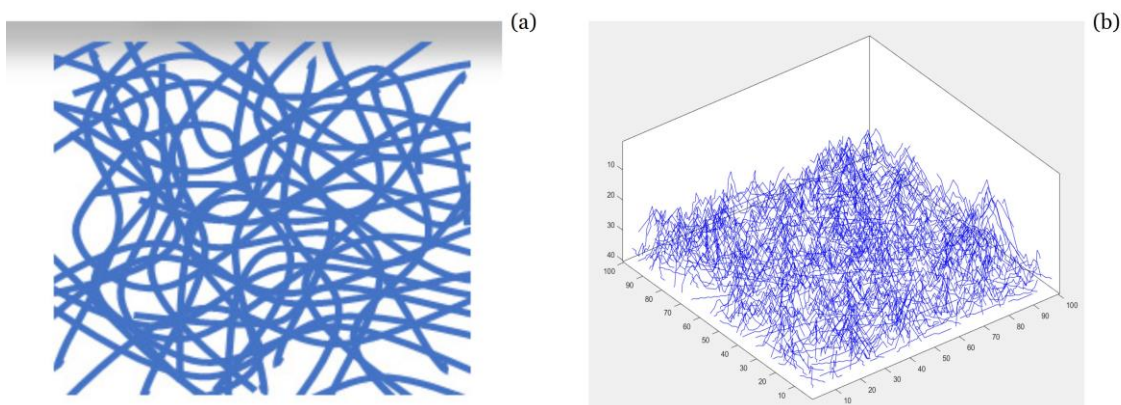


Figura 4.16 – Modelação computacional da matriz celulósica 3D de fibras de BNC (a), adaptado de (Nicu et al., 2021), e de fibras de *Cannabis* (b).

Nos estudos de (Nicu et al., 2021; Rostamitabar et al., 2021) foram formulados e caracterizados diferentes DDS para fins dérmicos, compostos por diversos constituintes, o que contribuiu para a abordagem proposta neste capítulo do uso de sistemas multi-camada, cada uma com funcionalidade específica. Os trabalhos desenvolvidos na nossa unidade de investigação por (J.M.R. Curto, 2012; Flávia P. Morais et al., 2019, 2021b, 2021a, 2021c; Flávia P. Morais & Curto, 2022) demonstraram que a otimização computacional de matrizes celulósicas 3D é crucial para o design e desenvolvimento de DDS dérmicos. As propriedades das fibras são modeladas com a finalidade de obter matrizes 3D com propriedades estruturais otimizadas, como a porosidade e a dimensão e distribuição dos poros, de forma que a migração das moléculas ativas através do material seja eficiente. A Figura 4.17 apresenta uma esquematização de um design para o desenvolvimento de sistemas dérmicos produzidos a partir de biomateriais celulósicos com três camadas diferenciadas. A camada exterior é caracterizada pelas propriedades de elevada hidrofobicidade e elasticidade, a fim de inibir possíveis interações com o meio envolvente e, conseqüentemente, a libertação das moléculas ativas presentes. A camada intermédia pode apresentar uma rede 3D com porosidades compreendidas entre 33-63% (Martins et al., 2018). A complexidade destes sistemas depende da irregularidade da distribuição e da dimensão dos poros que varia numa ampla gama e nos caminhos tortuosos que estes proporcionam para o fluxo das substâncias ativas (Neumann, Machado Charry, Zojer, & Schmidt, 2021). As moléculas retidas nesta camada necessitam de percorrer um caminho maior que uma linha reta entre o sistema e o local ativo/ alvo. Por fim, a camada permanentemente em contacto com a pele apresenta características de elevada suavidade e relativa porosidade de forma a permitir a deslocação do fármaco até ao seu local de ação, a derme.

Esta investigação proporciona o desenvolvimento de DDS 100% sustentáveis, biocompatíveis e biodegradáveis contendo uma matriz 3D à base de *Cannabis* e outras fibras celulósicas, e encapsulando moléculas ativas terapêuticas CBD no seu interior.

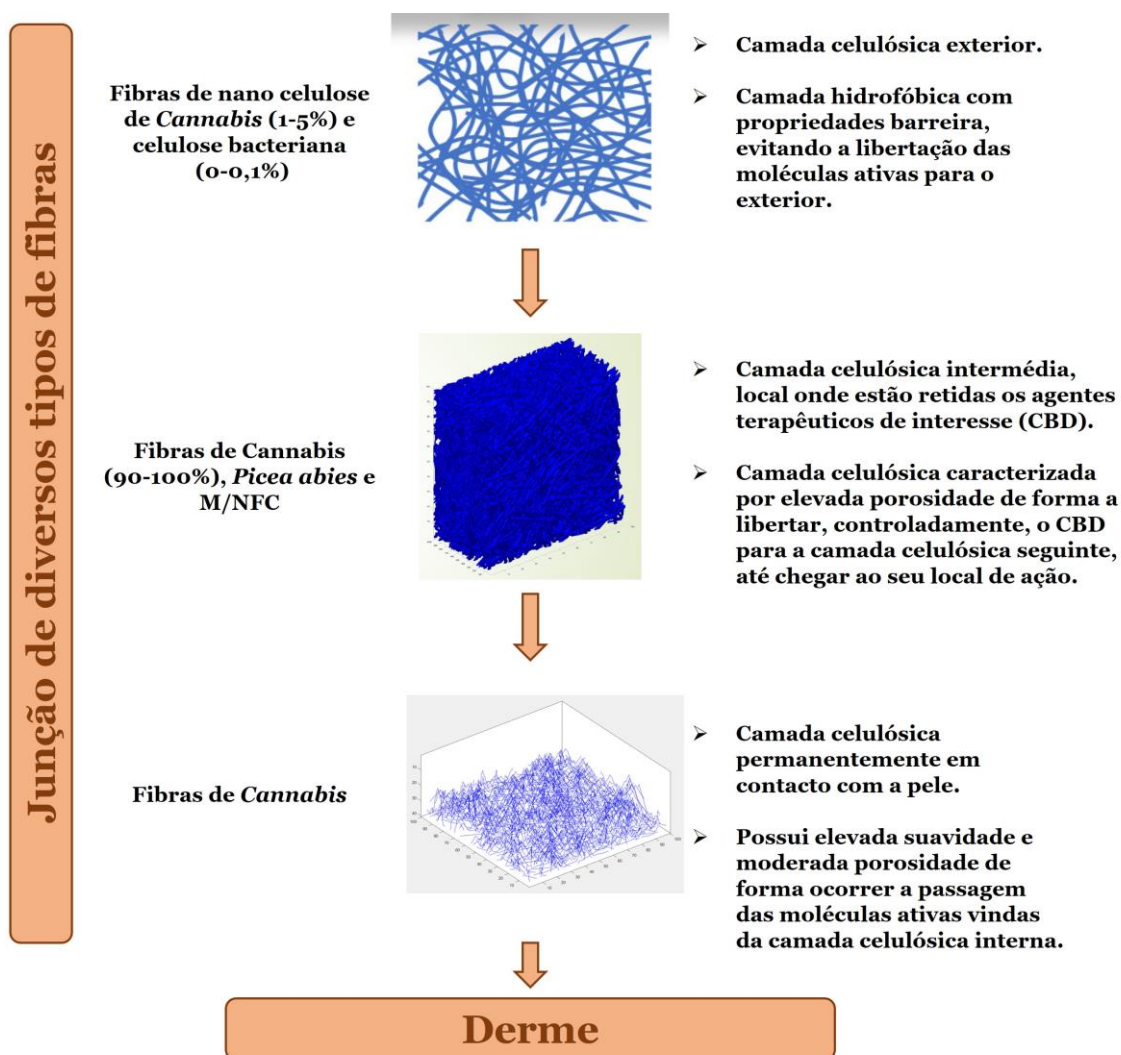


Figura 4.17 – Esquema exemplificativo das três camadas celulósicas que constituem os DDS para aplicações dérmicas, otimizados por métodos computacionais. A camada exterior caracteriza-se por ter reduzida porosidade, e propriedades barreira, obtida utilizando nano fibras de celulose vegetal, do caule de *Cannabis*, após nano fibrilação e celulose bacteriana (0-0,1%) enquanto as camadas intermédia e de contacto com a pele se otimizam para obter a porosidade e suavidade pretendidas, utilizando para o efeito a combinação ideal de fibras de *Cannabis* na escala micro (90-100%) e nano, na forma de *micro/nano fibrillated cellulose* (M/NFC), assim como percentagens estratégicas de fibras de *Picea abies*, e de *Eucalyptus globulus* (adaptado de (Martins et al., 2018; Morais, Flávia P., Curto, 2022; F P Morais & Curto, 2018; Flávia P. Morais & Curto, 2022; Flávia P. Morais, Simões, et al., 2020; Saraiva et al., 2022)).

O processo de descarboxilação permite obter a molécula CBD com maior taxa terapêutica, como referido na literatura (Booth et al., 2017; Rotherham & Harbison, 2011). Para aproveitar o seu maior potencial, este agente terapêutico descarboxilado foi conjugado com diferentes óleos, obtidos laboratorialmente, e posteriormente incorporados nestes sistemas dérmicos, potenciando desta forma as suas propriedades dérmicas (Santos et al., 2019). As formulações óleos/CBD foram aplicados na matriz 3D de fibras à base de celulose (camada intermédia), por adição na suspensão (*bulk*), bem como por aplicação de uma camada de revestimento

diretamente nas estruturas (por spray, por exemplo), ou através do uso de um instrumento que provoca uma pressão direta do óleo incorporado com CBD na cama intermédia celulósica.

A partir de toda esta informação, será possível a formulação de diversos DDS contendo uma matriz 3D celulósica incorporada com as diversas fibras de interesse, podendo desta forma, manipular as características morfológicas de cada camada celulósica e desta forma estudar, analisar e otimizar a taxa de libertação do agente terapêutico retido na camada intermédia, bem como o comportamento morfológico de cada camada dérmica individual.

4.3.3.1. Incorporação dos canabinóides em diversos óleos de interesse

Diferentes autores reportaram que a administração de preparados farmacêuticos de base lipídica contendo *Cannabis* apresentam um potencial para aumentar substancialmente a exposição a medicamentos à base de *Cannabis* administrados oralmente (Zgair et al., 2016). Com base nos resultados deste estudo e com o objetivo de investigar esta técnica, foram avaliados diversos óleos incorporados com os canabinóides provenientes de duas amostras de *Cannabis*, a fim de formular diversos preparados lípidos contendo as propriedades farmacológicas, terapêuticas e dérmicas presentes nos canabinóides.

Foram produzidos, no total, cinco óleos incorporados com canabinóides provenientes de duas amostras distintas de *Cannabis* (Tabela 4.3).

Tabela 4.3 - Diversos óleos utilizados no estudo. Os óleos foram utilizados em conjunto com duas amostras distintas de flor de *Cannabis*, A e B.

Diversos óleos incorporados		
Características do óleo	Flor	Área de interesse
Óleo de coco	Amostra A	Alimentar
Óleo de girassol	Amostra A	Alimentar
Óleo de coco e girassol, numa proporção 1:1	Amostra A	Alimentar
Óleo de coco	Amostra B	Dérmico
Óleo mineral	Amostra B	Dérmico

Todos os óleos utilizados inicialmente foram obtidos comercialmente. Como referido anteriormente, os processos de descarboxilação e incorporação foram realizados para obter estes óleos incorporados com canabinóides.

Importante também referir, que seria possível a incorporação de ambas as amostras A e B, na formulação dos óleos incorporados. Através desta informação, será possível a formulação de diversos óleos incorporados utilizando diversas amostras de *Cannabis* conjugadas entre si. Na

formulação destes óleos de interesse, também será possível a manipulação da dosagem/quantidade de cada amostra de *Cannabis* a incorporar, podendo esta se encontrar na sua forma descarboxilada ou natural.

O ratio de cada óleo a ser incorporado na amostra de *Cannabis* pós-descarboxilada, no processo de incorporação, foi calculado de modo a obter um ratio final compreendido entre 20-40 mg/mL (Anexo F).

4.3.3.2. Caracterização dos diversos óleos produzidos por FTIR-ATR

A técnica de FTIR-ATR foi utilizada para investigar a presença de canabinóides no óleo de interesse. Foram obtidos os espectros FTIR-ATR para os diversos óleos formulados. Os espectros referentes a cada óleo estão apresentados no Anexo G.

Os espectros dos óleos alimentares e dérmicos foram comparados e analisados entre si de modo obter um estudo comparativo entre estes. Adicionalmente, os resultados obtidos foram também comparados com um espectro de referência proveniente de (Siano et al., 2019) (Figura 4.18), bem como, nas zonas espectroscópicas referentes a cada canabinóide de interesse (CBD = [3085-3060] cm^{-1} ; CBDA = [982-959] cm^{-1}) (Cirrincione et al., 2021).

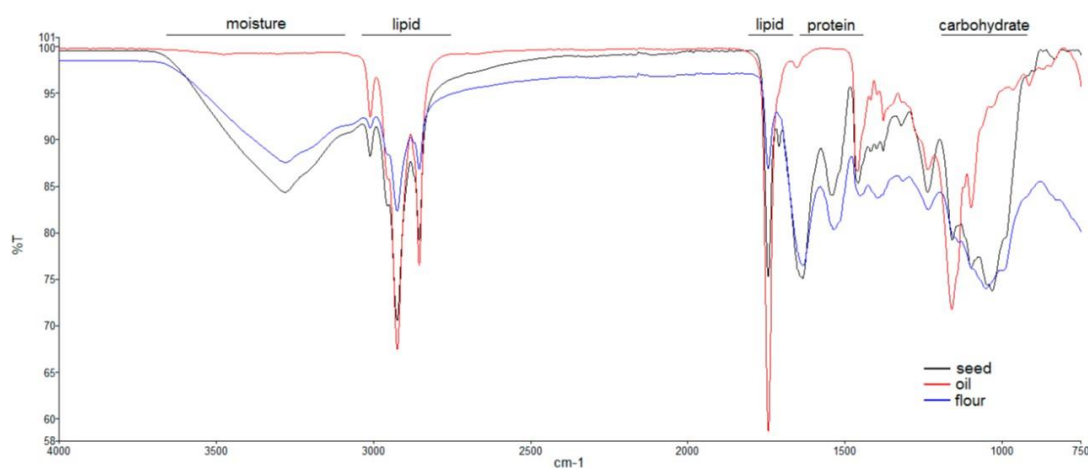


Figura 4.18 – Análise comparativa do espectro de três produtos alimentares provenientes da *Cannabis*: semente, óleo e farinha. As regiões espectrais dos macronutrientes estão indicadas na figura (adaptado de (Siano et al., 2019)).

4.3.3.2.1. Óleos alimentares incorporados com canabinóides provenientes da Amostra A da flor de Cannabis

Relativamente aos espectros correspondentes dos três óleos alimentares (Anexo G.1-G.3), todos evidenciam a presença das bandas características dos macronutrientes: proteínas, carboidratos e lípidos (Siano et al., 2018). Os resultados demonstraram a presença de uma banda carbonilo característica na região 1744 cm^{-1} , bem como uma banda típica na região $2700\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ caracterizada pela interação das ligações C-H (Siano et al., 2019). Como foram analisadas amostras lipídicas, é visível uma forte absorção nas regiões descritas anteriormente, principalmente para os óleos de coco e de coco e girassol numa proporção 1:1, comparativamente com o óleo de girassol. Através da técnica FTIR-ATR foi possível evidenciar a ausência de uma banda caracterizada pelas ligações amina na região 3280 cm^{-1} bem como uma fraca absorção na região dos carboidratos, $1200\text{-}700\text{ cm}^{-1}$, tal como descrito na literatura (Siano et al., 2019). Adicionalmente, os três espectros apresentam similaridades entre si, uma vez que demonstraram fortes absorções nas regiões lipídicas e fracas absorções na região dos carboidratos. Tanto o óleo de coco alimentar como o óleo de coco e girassol alimentar numa proporção 1:1 apresentaram uma maior absorção na região lipídica bem como uma menor absorção na região dos carboidratos.

Os espectros referentes aos dois canabinóides de interesse, CBD e CBDA, foram analisados de acordo com as suas regiões específicas: CBD = $[3085\text{-}3060]\text{ cm}^{-1}$ e CBDA = $[982\text{-}959]\text{ cm}^{-1}$ (Anexo G.4-G.5) (Cirrincione et al., 2021). O óleo de coco e girassol numa proporção 1:1 demonstrou ser o melhor óleo veicular, uma vez que este apresenta os maiores valores de absorção nas regiões dos dois canabinóides em estudo, revelando deste modo uma maior afinidade com a amostra de Cannabis no processo de incorporação. Por outro lado, o óleo de girassol alimentar apresenta uma menor afinidade com a amostra de Cannabis uma vez que este apresenta baixos valores de absorção nas regiões dos dois canabinóides. De referir ainda que os três óleos apresentaram valores de absorção significativos na região do CBDA, demonstrando a existência de alguma taxa de CBDA que não se converteu em CBD no processo de descarboxilação.

4.3.3.2.2. Óleos dérmicos incorporados com canabinóides provenientes da amostra B da flor de Cannabis

Ao contrário dos óleos alimentares, os dois óleos dérmicos analisados apresentam algumas diferenças facilmente observáveis (Anexo G.6-G.7). Ambos apresentam uma banda típica na região $2700\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$, responsável pela interação das ligações C-H (Siano et al., 2019), sendo o óleo de coco dérmico o que apresenta um maior pico de absorção. Contudo, ambos óleos dérmicos demonstram a ausência de uma banda significativa na região 1744 cm^{-1} caracterizada pelo seu grupo carbonilo (Siano et al., 2019).

Outra diferença é a presença de uma banda na região das amins proteicas e dos carboidratos no óleo mineral dérmico, o que não foi visível nas amostras de óleos alimentares. Com este resultado pode-se inferir diferenças encontradas no óleo mineral dérmico, pelo que a técnica FTIR-ATR é útil e viável neste tipo de análise. Contrariamente a este óleo, o óleo de coco dérmico apresenta um espectro semelhante aos encontrados na literatura, apresentando fortes picos de absorção na região lipídica e baixos picos de absorção na região dos carboidratos.

Os dois espectros dos óleos dérmicos foram também comparados nas regiões específicas a cada canabinóide de interesse (Anexo G.8-G.9). Considera-se que o óleo mineral dérmico apresenta uma maior afinidade com a amostra de *Cannabis*, uma vez que este apresenta maior absorção nas duas regiões em estudo comparativamente com o óleo de coco dérmico. Contudo, o óleo de coco dérmico também apresenta valores de absorção significativos nas duas regiões em estudo. Tal como evidenciado nos óleos alimentares, ambos os óleos dérmicos também apresentam alguma taxa de CBDA que não foi convertida em CBD.

Capítulo V
Conclusões e
Perspetivas Futuras

5. Conclusões e Perspetivas Futuras

O presente trabalho contribuiu para o design, desenvolvimento e otimização de DDS inovadores à base de *Cannabis*, para aplicações como (1) suplementos alimentares, (2) formulações orais e (3) sistemas dérmicos. A empresa colaborativa neste projeto, a *Canna Forest*[®], tem ao seu dispor informação relevante para o desenvolvimento de várias gamas de produtos, à base de biocompostos e biomateriais de *Cannabis*, com aplicação em diversas áreas de interesse.

Foi proposta e implementada uma metodologia experimental e computacional para produzir e otimizar os DDS de (1) suplementos nutricionais com óleo de *Cannabis*, (2) fibras de *Cannabis* e CBD, e ainda (3) diferentes fibras celulósicas, incluindo fibras de *Eucalyptus globulus*, *Picea abis* e *Cannabis*, bem como conjugação de óleos/CBD.

Os DDS de suplementos nutricionais foram preparados com incorporação do óleo de *Cannabis* obtido por crio-moagem a partir de sementes de *Cannabis*, numa cápsula vegetal de hidroxipropilmetilcelulose. As condições do processo de crio-moagem foram otimizadas utilizando 3 objetos de moagem, 6 ciclos de moagem numa frequência de 25 Hz e baixas temperaturas, de forma a preservar as moléculas nutricionais e obter um óleo de *Cannabis* com uma textura suave e ótima para incorporação no DDS. Os resultados mostraram que os DDS retêm os compostos bioativos dos constituintes presentes nas sementes e óleo de *Cannabis*. Concluiu-se que estes sistemas de entrega facilitam o uso destas sementes numa dieta nutricional, evitando os efeitos adversos associados a diferentes patologias que não permite a sua inserção na alimentação, como a dispepsia ou a doença do refluxo gastroesofágico.

De forma a potenciar o uso de DDS de terapêuticas orais em diversas áreas específicas de interesse, foram preparadas formulações com diferentes biomateriais poliméricos, em diferentes proporções, e características distintas, nomeadamente, um agente de reticulação, o alginato, responsável pela estrutura e conformidade dos DDS, e uma matriz fibrosa 3D feita a partir de fibras de *Cannabis*, CMC e NFC, na qual estão retidas as substâncias ativas de interesse, o extrato e o óleo de *Cannabis*. O processo alcalino de obtenção das fibras de *Cannabis* incluiu as etapas de cozimento e branqueamento, e os resultados indicaram que em 114 fibras analisadas, aproximadamente 42,9% da população fibrosa apresentaram diâmetros compreendidos entre 10 e 20 µm, evidenciando a eficácia da deslenhificação das fibras através destes métodos. Concluiu-se que esta metodologia apresenta viabilidade para ser adaptada industrialmente com o objetivo de reutilizar os caules da planta de *Cannabis sativa* L. e, conseqüentemente, produzir fibras de *Cannabis* viavelmente comercializadas em diversas áreas de interesse. Adicionalmente, o processo de ultrassonificação foi também eficaz na rápida homogeneização total do extrato e óleo de *Cannabis* com os diversos biomateriais poliméricos, demonstrando a utilidade e inovação deste método.

Assim, os DDS foram produzidos pela pitetagem das formulações preparadas numa solução de CaCl_2 que desencadeia um *crosslinking* ou reticulação das cadeias poliméricas do alginato, promovendo o desenvolvimento de DDS na sua forma esférica, e fixando a estrutura da matriz celulósica 3D com a substância ativa CBD retida no seu interior. Os resultados comparativos dos diferentes DDS mostraram a eficácia da (1) produção dos DDS esféricos, (2) a incorporação e retenção do extrato e óleo de Cannabis na matriz 3D, resultando numa coloração significativa, o que demonstrou a retenção das substâncias terapêuticas, e (3) a produção de uma rede celulósica de fibras de Cannabis, CMC e NFC. Foi demonstrado que as fibras de Cannabis contribuem para o desenvolvimento de uma matriz 3D otimizada em combinação com outros biomateriais usualmente utilizados em DDS. Concluiu-se que esta metodologia permitiu (1) o desenvolvimento de DDS inovadores encapsulando o extrato e o óleo de Cannabis; (2) a otimização das diferentes formulações, pelo que a dosagem de cada biomaterial está diretamente relacionada com a eficaz produção do DDS e da matriz 3D; e (3) a produção de uma matriz fibrosa 3D contendo fibras de Cannabis, com capacidade de reter moléculas ativas.

Adicionalmente, estes DDS foram submetidos a diferentes meios de pH específicos, mimetizando as condições corporais *in vivo*. Os resultados indicaram que os DDS contendo fibras e óleo de Cannabis resistiram aos diversos meios, contrariamente aos restantes. Esta evidência demonstra a utilidade e eficácia do uso das fibras de Cannabis no desenvolvimento de matrizes 3D, bem como no aumento da resistência e conformidade dos DDS, permitindo a libertação controlada e retardada do extrato de Cannabis ao longo do tempo do ensaio. De forma similar, o óleo de Cannabis apresentou, em ambas as proporções, resistência estrutural a todas as soluções com pH distintos, mantendo a sua estrutura esférica ao longo do ensaio. Concluiu-se, assim, que a incorporação deste óleo em DDS promove um aumento da resistência e conformidade da matriz celulósica 3D, inibindo a sua degradação ao longo do tempo.

Por fim, foi proposta uma metodologia para o desenvolvimento de DDS para fins dérmicos que consiste na otimização de materiais multi-estruturados, com diferentes camadas, cada uma com funcionalidades específicas. Uma destas camadas foi produzida laboratorialmente utilizando combinações de tratamentos mecânicos de refinação a fim de obter uma matriz 3D de fibras branqueadas de *Eucalyptus globulus* e não-branqueada de *Picea abis*, e uma outra camada contendo uma matriz de fibras de Cannabis foi modelada computacionalmente. Destes estudos de otimização concluiu-se que a porosidade e a dimensão e distribuição dos poros são propriedades estruturais fundamentais na migração do agente terapêutico de interesse incorporado, CBD, através da rede polimérica, a fim de alcançarem o local ativo de forma eficaz e controlada.

Foi também investigada a incorporação de formulações contendo uma combinação do CBD, obtido pelo processo de descarboxilação de duas amostras distintas de Cannabis, e de diversos óleos de interesse, nestas estruturas laboratorialmente obtidas, utilizando um instrumento que provoca uma pressão direta das formulações óleos/CBD na matriz 3D.

Através da caracterização química destas formulações concluiu-se que, de uma forma geral, (1) a incorporação dos canabinóides nos diversos óleos foi eficaz; (2) uma taxa de CBDA, em praticamente todos os óleos, não foi convertida em CBD; (3) o óleo de coco e girassol numa proporção 1:1 demonstrou ser o óleo alimentar com maior afinidade para os diversos canabinóides; e (4) o óleo mineral dérmico apresentou os maiores valores de absorção nas duas regiões específicas dos canabinóides CBD e CBDA, demonstrando ser o óleo dérmico com maior afinidade para esta amostra de *Cannabis*.

Em termos de perspetivas futuras, pretende-se continuar com os estudos de modelação computacional 3D com o intuito de otimizar diversas formulações de DDS contendo biomateriais celulósicos, incluindo fibras de *Cannabis*, e substâncias ativas de interesse, bem como quantificar a cinética de libertação destas. Pretende-se também, em condições laboratoriais adequadas, substituir e/ou complementar o agente terapêutico CBD com THC, de forma a desenvolver DDS com propriedades farmacológicas adequadas a outras situações terapêuticas. Para as aplicações dérmicas, propõe-se o design ou projeto de DDS 100% sustentáveis à base da *Cannabis*, proporcionando o desenvolvimento de estruturas fibrosas com uma matriz celulósica 3D uniforme e estável, tal como verificado nos estudos computacionais do presente trabalho, com posterior incorporação da molécula ativa terapêutica. Por fim, encontra-se também planeado o *scale-up* do processo, com passagem à escala piloto nas instalações da Unidade de Investigação em Materiais Fibrosos e Tecnologias Ambientais da Universidade da Beira Interior, FibEnTech-UBI, e posteriormente escala Industrial. Entre as diversas etapas do processo de desenvolvimento de linhas de produto com CBD e THC, identificam-se como fundamentais, o processo de descarboxilação e a otimização da matriz 3D de base celulósica do DDS, de forma a obter uma elevada taxa de conversão do CBDA em CBD e conseguir a sua preservação, retenção e entrega controlada e estável ao longo do tempo, e consequentemente, potenciar o efeito da molécula terapêutica no organismo humano.

Capítulo VI

Bibliografia

Bibliografia

- Abrams, D. I. (2018). The therapeutic effects of Cannabis and cannabinoids: An update from the National Academies of Sciences, Engineering and Medicine report. *European Journal of Internal Medicine*, 49, 7–11. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2018.01.003>
- Alava, M., & Niskanen, K. (2006). The physics of paper. *Reports on Progress in Physics*, 69(3), 669–723. <https://doi.org/10.1088/0034-4885/69/3/R03>
- Aliferis, K. A., Bernard-perron, D., Smith, D. L., & Stewart, D. (2020). Cannabinomics : Application of Metabolomics in Cannabis (Cannabis sativa L .) Research and Development, 11(May), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00554>
- Almeida, G. (2020). Canábis para fins terapêuticos e respetivo enquadramento regulamentar. Master Thesis. University of Beira Interior, Covilhã, Portugal.
- Andréasson, S., Allebeck, P., & Rydberg, U. (1989). Schizophrenia in users and nonusers of cannabis. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 79(5), 505–510. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0447.1989.tb10296.x>
- Atakan, Z. (2012). Cannabis, a complex plant: Different compounds and different effects on individuals. *Therapeutic Advances in Psychopharmacology*, 2(6), 241–254. <https://doi.org/10.1177/2045125312457586>
- Barnett, G., Chiang, C.-W. N., Perez-Reyes, M., & Owens, S. M. (1982). Kinetic study of smoking marijuana. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, 10(5), 495–506. <https://doi.org/10.1007/BF01059033>
- Baswan, S. M., Klosner, A. E., Glynn, K., Rajgopal, A., Malik, K., Yim, S., & Stern, N. (2020). Therapeutic potential of cannabidiol (CBD) for skin health and disorders. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 13, 927–942. <https://doi.org/10.2147/CCID.S286411>
- Booth, J. K., Page, J. E., & Bohlmann, J. (2017). Terpene synthases from Cannabis sativa. *PLoS ONE*, 12(3), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173911>
- Booz, G. W. (2012). CBD y estrés oxidativo, 51(5), 1054–1061. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.01.007>.Cannabidiol
- Borodulina, S., Motamedian, H. R., & Kulachenko, A. (2018). Effect of fiber and bond strength variations on the tensile stiffness and strength of fiber networks. *International Journal of Solids and Structures*, 154, 19–32. <https://doi.org/10.1016/j.ijsolstr.2016.12.013>
- Caffarel, M. M., Andradas, C., Mira, E., Pérez-Gómez, E., Cerutti, C., Moreno-Bueno, G., Flores J., García-Real I., Palacios J., Mañes S., Sánchez, C. (2010). Cannabinoids reduce ErbB2-driven breast cancer progression through Akt inhibition. *Molecular Cancer*, 9, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-196>
- Callaway, J. C. (2004). Hempseed as a nutritional resource: An overview. *Euphytica*, 140(1–2), 65–72. <https://doi.org/10.1007/s10681-004-4811-6>
- Callaway, J., Schwab, U., Harvima, I., Halonen, P., Mykkänen, O., Hyvönen, P., & Järvinen, T. (2005). Efficacy of dietary hempseed oil in patients with atopic dermatitis. *Journal of Dermatological Treatment*, 16(2), 87–94. <https://doi.org/10.1080/09546630510035832>
- Chakar, F. S., & Ragauskas, A. J. (2004). Review of current and future softwood kraft lignin process chemistry. *Industrial Crops and Products*, 20(2), 131–141. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2004.04.016>
- Cirrincone, M., Saladini, B., Brighenti, V., Salamone, S., Mandrioli, R., Pollastro, F., Pellati F., Protti M., Mercolini, L. (2021). Discriminating different Cannabis sativa L. chemotypes using attenuated total reflectance - infrared (ATR-FTIR) spectroscopy: A proof of concept. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 204, 114270. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114270>
- Conceição, E. L. T., Curto, J. M. R., Simões, R. M. S., & Portugal, A. A. T. G. (2010). Coding a Simulation Model of the 3D Structure of Paper (pp. 299–310). https://doi.org/10.1007/978-3-642-12712-0_27

- Conniot, J., Silva, J. M., Fernandes, J. G., Silva, L. C., Gaspar, R., Brocchini, S., Florindo H., Barata, T. S. (2014). Cancer immunotherapy: nanodelivery approaches for immune cell targeting and tracking. *Frontiers in Chemistry*, 2. <https://doi.org/10.3389/fchem.2014.00105>
- Curto, J.M.R. (2012). 3D Computational Simulation and Experimental Characterization of Polymeric Stochastic Network Materials : Case Studies in Reinforced Eucalyptus Office Paper and Nanofibrous Materials Engenharia do Papel. Doctoral Dissertation. University of Beira Interior, Covilhã, Portugal.
- Curto, J.M.R., Conceição, E. L. T., Portugal, A. T. G., & Simões, R. M. S. (2011). Three dimensional modelling of fibrous materials and experimental validation. *Materialwissenschaft Und Werkstofftechnik*, 42(5), 370–374. <https://doi.org/10.1002/mawe.201100790>
- Curto, J. M.R. (2017). Produção de Sistemas de Entrega de Fármacos (DDS) contendo materiais celulósicos poros, (11137), 1–6.
- D’Souza, D. C., Perry, E., MacDougall, L., Ammerman, Y., Cooper, T., Wu, Y., Braley G., Gueorguieva R., Krystal, J. H. (2004). The Psychotomimetic Effects of Intravenous Delta-9-Tetrahydrocannabinol in Healthy Individuals: Implications for Psychosis. *Neuropsychopharmacology*, 29(8), 1558–1572. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300496>
- Deferne, J., & Pate, D. W. (1996). Hemp seed oil: A source of valuable essential fatty acids. *Journal of the International Hemp Association*, 3(1), 1, 4–7.
- Demuner, I. F., Borges Gomes, F. J., Gomes, J. S., Coura, M. R., Borges, F. P., Macedo Ladeira Carvalho, A. M., & Silva, C. M. (2021). Improving kraft pulp mill sustainability by lignosulfonates production from processes residues. *Journal of Cleaner Production*, 317(February). <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.128286>
- Devinsky, O., Cilio, M. R., Cross, H., Fernandez-Ruiz, J., French, J., Hill, C., Katz R., Di Marzo V., Jutras-Aswad D., Notcutt W., Martinez-Orgado J., Robson P., Rohrback B., Thiele E., Whalley B., Friedman, D. (2014). Epilepsy and Other Neuropsychiatric Disorders. *Epilepsia*, 55(6), 791–802. <https://doi.org/10.1111/epi.12631>.Cannabidiol
- Devinsky, O., Cross, J. H., Laux, L., Marsh, E., Miller, I., Nabbout, R., Scheffer I., Thiele E., Wright, S. (2017). Trial of Cannabidiol for Drug-Resistant Seizures in the Dravet Syndrome. *New England Journal of Medicine*, 376(21), 2011–2020. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1611618>
- Dimić, E., Romanić, R., & Vujasinović, V. (2009). Essential fatty acids, nutritive value and oxidative stability of cold pressed hempseed (Cannabis sativa L.) oil from different varieties. *Acta Alimentaria*, 38(2), 229–236. <https://doi.org/10.1556/AAlim.2008.0035>
- Ditrói, K., Kleiner, D., Böszörményi, A., Szentmihályi, K., & Fébel, H. (2013). The alimentary impact of the hemp seed. *Acta Alimentaria*, 42(3), 410–416. <https://doi.org/10.1556/AAlim.42.2013.3.14>
- Dumont, G. J., Kramers, C., Sweep, F. C., Touw, D. J., Van Hasselt, J. G., De Kam, M., Van Gerven J., Buitelaar J., Verkes, R. J. (2009). Cannabis Coadministration Potentiates the Effects of “Ecstasy” on Heart Rate and Temperature in Humans. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 86(2), 160–166. <https://doi.org/10.1038/clpt.2009.62>
- El-Ridy, M. S., Abdelbary, A., Nasr, E. A., Khalil, R. M., Mostafa, D. M., El-Batal, A. I., & Abd El-Alim, S. H. (2011). Niosomal encapsulation of the antitubercular drug, pyrazinamide. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 37(9), 1110–1118. <https://doi.org/10.3109/03639045.2011.560605>
- Farinon, B., Molinari, R., Costantini, L., & Merendino, N. (2020). The seed of industrial hemp (Cannabis sativa l.): Nutritional quality and potential functionality for human health and nutrition. *Nutrients*, 12(7), 1–60. <https://doi.org/10.3390/nu12071935>
- Farokhzad, O. C., & Langer, R. (2009). Impact of nanotechnology on drug delivery. *ACS Nano*, 3(1), 16–20. <https://doi.org/10.1021/nn900002m>
- Fathordoobady, F., Singh, A., Kitts, D. D., & Pratap Singh, A. (2019). Hemp (Cannabis Sativa L.) Extract: Anti-Microbial Properties, Methods of Extraction, and Potential Oral Delivery. *Food Reviews International*, 35(7), 664–684. <https://doi.org/10.1080/87559129.2019.1600539>

- Fearon, O., Kuitunen, S., Ruuttunen, K., Alopaeus, V., & Vuorinen, T. (2020). Detailed Modeling of Kraft Pulping Chemistry. Delignification. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 59(29), 12977–12985. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.0c02110>
- Ferrari, M. (2005). Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nature Reviews Cancer*, 5(3), 161–171. <https://doi.org/10.1038/nrc1566>
- Franco, V., & Perucca, E. (2019). Pharmacological and Therapeutic Properties of Cannabidiol for Epilepsy. *Drugs*, 79(13), 1435–1454. <https://doi.org/10.1007/s40265-019-01171-4>
- Fu, Y., & Kao, W. J. (2010). Drug release kinetics and transport mechanisms of non-degradable and degradable polymeric delivery systems. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 7(4), 429–444. <https://doi.org/10.1517/17425241003602259>
- Gaston, T. E., & Friedman, D. (2017). Pharmacology of cannabinoids in the treatment of epilepsy. *Epilepsy and Behavior*, 70, 313–318. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2016.11.016>
- Gonza, M. L. (2002). 1-3 mm Alginate/Chitosan Particles with Diclofenac by Dropwise Addition to CaCl₂ Solution. *International Journal of Pharmaceutics*, 232, 225–234.
- González-Rodríguez, M., Holgado, M., Sánchez-Lafuente, C., Rabasco, A., & Fini, A. (2002). Alginate/chitosan particulate systems for sodium diclofenac release. *International Journal of Pharmaceutics*, 232(1–2), 225–234. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(01\)00915-2](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00915-2)
- Grotenhermen, F. (2003). Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Cannabinoids. *Clinical Pharmacokinetics*, 42(4), 327–360. <https://doi.org/10.2165/00003088-200342040-00003>
- Halldin, M. M., Widman, M., V Bahr, C., Lindgren, J. E., & Martin, B. R. (1982). Identification of in vitro metabolites of delta 1-tetrahydrocannabinol formed by human livers. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 10(4), 297–301. [https://doi.org/10.1016/0090-9556\(82\)90081-1](https://doi.org/10.1016/0090-9556(82)90081-1)
- Hampson, A. J., Grimaldi, M., Axelrod, J., & Wink, D. (1998). Cannabidiol and (-)Δ⁹-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(14), 8268–8273. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.14.8268>
- Harbige, L. S. (1998). Dietary n -6 and n -3 fatty acids in immunity and autoimmune disease . *Proceedings of the Nutrition Society*, 57(4), 555–562. <https://doi.org/10.1079/pns19980081>
- Harman, D. (1956). Aging: A theory based on free radical. *Journal of Gerontology*, 11(3), 298–300.
- Harvey, D. J. (1999). Absorption, Distribution, and Biotransformation of the Cannabinoids. In *Marihuana and Medicine* (pp. 91–103). Totowa, NJ: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59259-710-9_10
- Ho, N. A. D., & Leo, C. P. (2021). A review on the emerging applications of cellulose, cellulose derivatives and nanocellulose in carbon capture. *Environmental Research*, 197, 111100. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111100>
- House, J. D., Neufeld, J., & Leson, G. (2010). Evaluating the quality of protein from hemp seed (*Cannabis sativa* L.) products through the use of the protein digestibility-corrected amino acid score method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(22), 11801–11807. <https://doi.org/10.1021/jf102636b>
- Hua, S., Ma, H., Li, X., Yang, H., & Wang, A. (2010). pH-sensitive sodium alginate/poly(vinyl alcohol) hydrogel beads prepared by combined Ca²⁺ crosslinking and freeze-thawing cycles for controlled release of diclofenac sodium. *International Journal of Biological Macromolecules*, 46(5), 517–523. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.03.004>
- Huestis, M. A. (2007). Human cannabinoid pharmacokinetics. *Chemistry and Biodiversity*, 4(8), 1770–1804. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200790152>
- Hunt, C. A., & Jones, R. T. (1980). Tolerance and disposition of tetrahydrocannabinol in man. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 215(1), 35–44. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6256518>

- Ian J., M. (2005). Pharmacokinetics of cannabinoids. *Pain Research and Management*, 10(SUPPL. A), 15A-22A. Retrieved from <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L44796349>
- Irakli, M., Tsaliki, E., Kalivas, A., Kleisiaris, F., & Sarrou, E. (2019). antioxidants Effect of Genotype and Growing Year on the Nutritional , Phytochemical , and Antioxidant Properties of Industrial Hemp (Cannabis sativa L .) Seeds, 20–25.
- Jain, K. K. (2020). An Overview of Drug Delivery Systems. In *Drug Delivery Systems* (Third Edit, pp. 1–54). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9798-5_1
- Johansson, E., Agurell, S., Hollister, L. E., & Halldin, M. M. (2011). Prolonged apparent half-life of Δ^1 -tetrahydrocannabinol in plasma of chronic marijuana users. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 40(5), 374–375. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1988.tb05272.x>
- Kamel, S., Ali, N., Jahangir, K., Shah, S. M., & El-Gendy, A. A. (2008). Pharmaceutical significance of cellulose: A review. *Express Polymer Letters*, 2(11), 758–778. <https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2008.90>
- Karst, Matthias MD, PhD; Kahlid Salim, MS; Sumner Burstein, PhD; Ingomar Conrad, MD; Ludwig Hoy, PhD; Udo Schneider, MD, P. (2003). Analgesic Effect of the Synthetic Cannabinoid. *Journal of the American Medical Association*, 290(13), 1757–1762.
- Kellerman, R., & Kintanar, T. (2017). Gastroesophageal Reflux Disease. *Primary Care - Clinics in Office Practice*, 44(4), 561–573. <https://doi.org/10.1016/j.pop.2017.07.001>
- Kierys, A., Grochowicz, M., & Kosik, P. (2015). The release of ibuprofen sodium salt from permanently porous poly(hydroxyethyl methacrylate-co-trimethylolpropane trimethacrylate) resins. *Microporous and Mesoporous Materials*, 217, 133–140. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2015.06.009>
- Klajnert, B., & Bryszewska, M. (2001). Dendrimers: properties and applications. *Acta Biochimica Polonica*, 48(1), 199–208. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11440170>
- Kotla, N. G., Rana, S., Sivaraman, G., Sunnapu, O., Vemula, P. K., Pandit, A., & Rochev, Y. (2019). Bioresponsive drug delivery systems in intestinal inflammation : State-of-the-art and future perspectives ☆. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 146, 248–266. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.06.021>
- Kováčik, A., Kopečná, M., & Vávrová, K. (2020). Permeation enhancers in transdermal drug delivery: benefits and limitations. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 17(2), 145–155. <https://doi.org/10.1080/17425247.2020.1713087>
- Kriese, U., Schumann, E., Weber, W. E., Beyer, M., Brühl, L., & Matthäus, B. (2004). Oil content, tocopherol composition and fatty acid patterns of the seeds of 51 Cannabis sativa L. genotypes. *Euphytica*, 137(3), 339–351. <https://doi.org/10.1023/B:EUPH.0000040473.23941.76>
- Laprairie, R. B., Bagher, A. M., Kelly, M. E. M., & Denovan-Wright, E. M. (2015). Cannabidiol is a negative allosteric modulator of the cannabinoid CB1 receptor. *British Journal of Pharmacology*, 172(20), 4790–4805. <https://doi.org/10.1111/bph.13250>
- Law, B., Mason, P. A., Moffat, A. C., Gleadle, R. I., & King, L. J. (2011). Forensic aspects of the metabolism and excretion of cannabinoids following oral ingestion of cannabis resin. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 36(5), 289–294. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1984.tb04376.x>
- Lehmann, C., Fisher, N. B., Tugwell, B., Szczesniak, A., Kelly, M., & Zhou, J. (2017). Experimental cannabidiol treatment reduces early pancreatic inflammation in type 1 diabetes. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 64(4), 655–662. <https://doi.org/10.3233/CH-168021>
- Lembo, D., & Cavalli, R. (2010). Nanoparticulate Delivery Systems for Antiviral Drugs. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 21(2), 53–70. <https://doi.org/10.3851/IMP1684>
- Lu, H. C., & Mackie, K. (2021). Review of the Endocannabinoid System. *Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging*, 6(6), 607–615. <https://doi.org/10.1016/j.bpsc.2020.07.016>

- Lucas, C. J., Galettis, P., & Schneider, J. (2018). The pharmacokinetics and the pharmacodynamics of cannabinoids. *British Journal of Clinical Pharmacology*, *84*(11), 2477–2482. <https://doi.org/10.1111/bcp.13710>
- Lucas, C. J., Galettis, P., Song, S., Solowij, N., Reuter, S. E., Schneider, J., & Martin, J. H. (2018). Cannabinoid Disposition After Human Intraperitoneal Use: An Insight Into Intraperitoneal Pharmacokinetic Properties in Metastatic Cancer. *Clinical Therapeutics*, *40*(9), 1442–1447. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2017.12.008>
- Malfait, A. M., Gallily, R., Sumariwalla, P. F., Malik, A. S., Andreakos, E., Mechoulam, R., & Feldmann, M. (2000). The nonpsychoactive cannabis constituent cannabidiol is an oral anti-arthritic therapeutic in murine collagen-induced arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(17), 9561–9566. <https://doi.org/10.1073/pnas.160105897>
- Martin, J. H., Schneider, J., Lucas, C. J., & Galettis, P. (2018). Exogenous Cannabinoid Efficacy: Merely a Pharmacokinetic Interaction? *Clinical Pharmacokinetics*, *57*(5), 539–545. <https://doi.org/10.1007/s40262-017-0599-0>
- Martins, V. D. F., Cerqueira, M. A., Fuciños, P., Garrido-Maestu, A., Curto, J. M. R., & Pastrana, L. M. (2018). Active bi-layer cellulose-based films: development and characterization. *Cellulose*, *25*(11), 6361–6375. <https://doi.org/10.1007/s10570-018-2021-y>
- Matthäus, B., & Brühl, L. (2008). Virgin hemp seed oil: An interesting niche product. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *110*(7), 655–661. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200700311>
- Mayer, C. (2005). Nanocapsules as Drug Delivery Systems. *The International Journal of Artificial Organs*, *28*(11), 1163–1171. <https://doi.org/10.1177/039139880502801114>
- McPartland, J. M., Guy, G. W., & Hegman, W. (2018). Cannabis is indigenous to Europe and cultivation began during the Copper or Bronze age: a probabilistic synthesis of fossil pollen studies. *Vegetation History and Archaeobotany*, *27*(4), 635–648. <https://doi.org/10.1007/s00334-018-0678-7>
- Ming, R., Bendahmane, A., & Renner, S. S. (2011). Sex chromosomes in land plants. *Annual Review of Plant Biology*, *62*, 485–514. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103914>
- Mitra, A., Nan, A., Line, B., & Ghandehari, H. (2006). Nanocarriers for Nuclear Imaging and Radiotherapy of Cancer. *Current Pharmaceutical Design*, *12*(36), 4729–4749. <https://doi.org/10.2174/138161206779026317>
- Moon, R. J., Martini, A., Nairn, J., Simonsen, J., & Youngblood, J. (2011). Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. *Chemical Society Reviews*, *40*(7), 3941. <https://doi.org/10.1039/c0cs00108b>
- Morais, F. P., Curto, J. M. R. (2022). 3D Computational Simulation and Experimental Validation of Structured Materials: Case Studies of Tissue Papers. *BioResources*, *17*: 4206-4225. <https://doi.org/10.15376/biores.17.3.4206-4225>.
- Morais, F. P. (2017). Desenvolvimento de Sistemas de Entrega de Fármacos Inovadores utilizando Materiais Poliméricos Porosos contendo Nanocelulose Flávia Pinto Morais. Master Thesis. University of Beira Interior, Covilhã, Portugal.
- Morais, F. P., & Curto, J. M. R. (2018). Design of Porous Nano Cellulose Based Biopolymers for Nanomedicine Applications. *Current Scientific Research in Biomedical Sciences R*, *2018*(1), 180003. Retrieved from <https://chembiopublishers.com/CSRBS/>
- Morais, F. P., Bértolo, R. A. C., Curto, J. M. R., Amaral, M. E. C. C., Carta, A. M. M. S., & Evtugin, D. V. (2019). Comparative characterization of eucalyptus fibers and softwood fibers for tissue papers applications. *Materials Letters: X*, *4*, 100028. <https://doi.org/10.1016/j.mlblux.2019.100028>
- Morais, F. P., Carta, A. M. M. S., Amaral, M. E., & Curto, J. M. R. (2020a). 3D fiber models to simulate and optimize tissue materials. *BioResources*, *15*(4), 8833–8848. <https://doi.org/10.15376/biores.15.4.8833-8848>
- Morais, F. P., Carta, A. M. M. S., Amaral, M. E., & Curto, J. M. R. (2020b). Experimental 3D fibre data for tissue papers applications. *Data in Brief*, *30*, 105479.

<https://doi.org/10.1016/j.dib.2020.105479>

- Morais, F. P., Carta, A. M. M. S., Amaral, M. E., & Curto, J. M. R. (2021a). An Innovative Computational Strategy to Optimize Different Furnish Compositions of Tissue Materials Using Micro/Nanofibrillated Cellulose and Biopolymer as Additives. *Polymers*, *13*(15), 2397. <https://doi.org/10.3390/polym13152397>
- Morais, F. P., Carta, A. M. M. S., Amaral, M. E., & Curto, J. M. R. (2021b). Computational Simulation Tools to Support the Tissue Paper Furnish Management: Case Studies for the Optimization of Micro/Nano Cellulose Fibers and Polymer-Based Additives. *Polymers*, *13*(22), 3982. <https://doi.org/10.3390/polym13223982>
- Morais, F. P., Carta, A. M. M. S., Amaral, M. E., & Curto, J. M. R. (2021c). Micro/nano-fibrillated cellulose (MFC/NFC) fibers as an additive to maximize eucalyptus fibers on tissue paper production. *Cellulose*, *28*(10), 6587–6605. <https://doi.org/10.1007/s10570-021-03912-9>
- Morais, F. P., & Curto, J. M. R. (2022). Challenges in computational materials modelling and simulation: A case-study to predict tissue paper properties. *Heliyon*, *8*(5), e09356. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09356>
- Morais, F. P., Simões, R. M. S., & Curto, J. M. R. (2020). Biopolymeric Delivery Systems for Cosmetic Applications Using *Chlorella vulgaris* Algae and Tea Tree Essential Oil. *Polymers*, *12*(11), 2689. <https://doi.org/10.3390/polym12112689>
- Morales, P., Hurst, D. P., & Reggio, P. H. (2017). Molecular Targets of the Phytocannabinoids: A Complex Picture (pp. 103–131). https://doi.org/10.1007/978-3-319-45541-9_4
- Moreno, T., Dyer, P., & Tallon, S. (2020). Cannabinoid Decarboxylation: A Comparative Kinetic Study. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, *59*(46), 20307–20315. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.0c03791>
- Motamedian, H. R., Halilovic, A. E., & Kulachenko, A. (2019). Mechanisms of strength and stiffness improvement of paper after PFI refining with a focus on the effect of fines. *Cellulose*, *26*(6), 4099–4124. <https://doi.org/10.1007/s10570-019-02349-5>
- Müller, J. M., Santos, R. L. dos, & Brigido, R. V. (2011). Produção de alginato por microrganismos. *Polímeros*, *21*(4), 305–310. <https://doi.org/10.1590/S0104-14282011005000051>
- Neumann, M., Machado Charry, E., Zojer, K., & Schmidt, V. (2021). On Variability and Interdependence of Local Porosity and Local Tortuosity in Porous Materials: a Case Study for Sack Paper. *Methodology and Computing in Applied Probability*, *23*(2), 613–627. <https://doi.org/10.1007/s11009-019-09761-1>
- Newmeyer, M. N., Swortwood, M. J., Barnes, A. J., Abulseoud, O. A., Scheidweiler, K. B., & Huestis, M. A. (2016). Free and glucuronide whole blood cannabinoids' pharmacokinetics after controlled smoked, vaporized, and oral cannabis administration in frequent and occasional cannabis users: Identification of recent cannabis intake. *Clinical Chemistry*, *62*(12), 1579–1592. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2016.263475>
- Nichols, J. M., & Kaplan, B. L. F. (2020). Immune Responses Regulated by Cannabidiol. *Cannabis and Cannabinoid Research*, *5*(1), 12–31. <https://doi.org/10.1089/can.2018.0073>
- Nicu, R., Ciolacu, F., & Ciolacu, D. E. (2021). Advanced Functional Materials Based on Nanocellulose for Pharmaceutical/Medical Applications. *Pharmaceutics*, *13*(8), 1125. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13081125>
- Niskanen, K. J., & Alava, M. J. (1994). Planar Random Networks with Flexible Fibers. *Physical Review Letters*, *73*(25), 3475–3478. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.73.3475>
- Ohlsson, A., Lindgren, J.-E., Wahlén, A., Agurell, S., Hollister, L. E., & Gillespie, H. K. (1982). Single dose kinetics of deuterium labelled Δ^1 -tetrahydrocannabinol in heavy and light cannabis users. *Biological Mass Spectrometry*, *9*(1), 6–10. <https://doi.org/10.1002/bms.1200090103>
- Okuyama, H. (1996). Dietary fatty acids ? The n-6/n-3 balance and chronic elderly diseases. Excess linoleic acid and relative n-3 deficiency syndrome seen in Japan. *Progress in Lipid Research*, *35*(4), 409–457. [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(96\)00012-4](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(96)00012-4)

- Oliveira, M. F., Suarez, D., Rocha, J. C. B., de Carvalho Teixeira, A. V. N., Cortés, M. E., De Sousa, F. B., & Sinisterra, R. D. (2015). Electrospun nanofibers of polyCD/PMAA polymers and their potential application as drug delivery system. *Materials Science and Engineering: C*, *54*, 252–261. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.04.042>
- Onaivi, E. S., Ishiguro, H., Gong, J. P., Patel, S., Perchuk, A., Meozzi, P. A., Myers L., Mora Z., Tagliaferro P., Gardner E., Brusco A., Akinshola B., Liu Q., Hope B., Iwasaki S., Arinami T., Teasenfiz L., Uhl, G. R. (2006). Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1074*, 514–536. <https://doi.org/10.1196/annals.1369.052>
- Ostro, M. J., & Cullis, P. R. (1989). Use of liposomes as injectable-drug delivery systems. *American Journal of Hospital Pharmacy*, *46*(8), 1576–1587. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2672806>
- Overland, M. K. (2014). Dyspepsia. *Medical Clinics of North America*, *98*(3), 549–564. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2014.01.007>
- Panzarini, E., Inguscio, V., Tenuzzo, B., Carata, E., & Dini, L. (2013). Nanomaterials and Autophagy: New Insights in Cancer Treatment. *Cancers*, *5*(4), 296–319. <https://doi.org/10.3390/cancers5010296>
- Paolino, D., Sinha, P., Fresta, M., & Ferrari, M. (2006). Drug Delivery Systems. In *Encyclopedia of Medical Devices and Instrumentation*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/0471732877.emd274>
- Pellati, F., Borgonetti, V., Brighenti, V., Biagi, M., Benvenuti, S., & Corsi, L. (2018). Cannabis sativa L. and Nonpsychoactive Cannabinoids: Their Chemistry and Role against Oxidative Stress, Inflammation, and Cancer. *BioMed Research International*, *2018*. <https://doi.org/10.1155/2018/1691428>
- Perez-Reyes, M., Owens, S. M., & Di Guiseppi, S. (1981). The Clinical Pharmacology and Dynamics of Marijuana Cigarette Smoking. *The Journal of Clinical Pharmacology*, *21*(S1), 201S-207S. <https://doi.org/10.1002/j.1552-4604.1981.tb02596.x>
- Piomelli, D. (2003). The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nature Reviews Neuroscience*, *4*(11), 873–884. <https://doi.org/10.1038/nrn1247>
- Rajnish, K. N., Samuel, M. S., John J, A., Datta, S., Chandrasekar, N., Balaji, R., Jose S., Selvarajan, E. (2021). Immobilization of cellulase enzymes on nano and micro-materials for breakdown of cellulose for biofuel production-a narrative review. *International Journal of Biological Macromolecules*, *182*, 1793–1802. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.05.176>
- Retsch. (2020). General Catalogue, 50–54.
- Rodríguez-Muñoz, M., Onetti, Y., Cortés-Montero, E., Garzón, J., & Sánchez-Blázquez, P. (2018). Cannabidiol enhances morphine antinociception, diminishes NMDA-mediated seizures and reduces stroke damage via the sigma 1 receptor. *Molecular Brain*, *11*(1), 51. <https://doi.org/10.1186/s13041-018-0395-2>
- Rosenberg, E. C., Tsien, R. W., Whalley, B. J., & Devinsky, O. (2015). Cannabinoids and Epilepsy. *Neurotherapeutics*, *12*(4), 747–768. <https://doi.org/10.1007/s13311-015-0375-5>
- Rostamitabar, M., Subrahmanyam, R., Gurikov, P., Seide, G., Jockenhoevel, S., & Ghazanfari, S. (2021). Cellulose aerogel micro fibers for drug delivery applications. *Materials Science and Engineering C*, *127*(May), 112196. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112196>
- Rotherham, D., & Harbison, S. A. (2011). Differentiation of drug and non-drug Cannabis using a single nucleotide polymorphism (SNP) assay. *Forensic Science International*, *207*(1–3), 193–197. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2010.10.006>
- Russo, E. B. (2011). Taming THC: Potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *British Journal of Pharmacology*, *163*(7), 1344–1364. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01238.x>
- Russo, E. B., & McPartland, J. M. (2003). Cannabis is more than simply Δ9-tetrahydrocannabinol. *Psychopharmacology*, *165*(4), 431–432. <https://doi.org/10.1007/s00213-002-1348-z>

- Sampson, W. W. (2009). Materials properties of paper as influenced by its fibrous architecture. *International Materials Reviews*, 54(3), 134–156. <https://doi.org/10.1179/174328009X411154>
- Santos, A. C., Rodrigues, D., Sequeira, J. A. D., Pereira, I., Simões, A., Costa, D., Peixoto D., Costa G., Veiga, F. (2019). Nanotechnological breakthroughs in the development of topical phytocompounds-based formulations. *International Journal of Pharmaceutics*, 572(July), 118787. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118787>
- Saraiva, P., Moreira, J., Lopes, C., Silva, L., & Curto, J. M. R. (2022). Drug Delivery Systems (DDS) for oral and dermic applications using Cannabis fibres and Essential Oils. *Encontro Com a Ciência e Tecnologia Em Portugal 2022, CCL, Lisbon, May 16-18, 2022*, 1.
- Schoeler, T., Monk, A., Sami, M. B., Klamerus, E., Foglia, E., Brown, R., Camuri G., Altamura A., Murray R., Bhattacharyya, S. (2016). Continued versus discontinued cannabis use in patients with psychosis: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Psychiatry*, 3(3), 215–225. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(15\)00363-6](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(15)00363-6)
- Schultz, C. J., Lim, W. L., Khor, S. F., Neumann, K. A., Schulz, J. M., Ansari, O., Skewes M., Burton, R. A. (2020). Consumer and health-related traits of seed from selected commercial and breeding lines of industrial hemp, Cannabis sativa L. *Journal of Agriculture and Food Research*, 2(January), 100025. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2020.100025>
- Schurman, L. D., Lu, D., Kendall, D. A., Howlett, A. C., & Lichtman, A. H. (2019). Molecular Mechanism and Cannabinoid Pharmacology (pp. 323–353). https://doi.org/10.1007/164_2019_298
- Scimeca, M., Bischetti, S., Lamsira, H. K., Bonfiglio, R., & Bonanno, E. (2018). Energy dispersive X-ray (EDX) microanalysis: A powerful tool in biomedical research and diagnosis. *European Journal of Histochemistry*, 62(1), 89–99. <https://doi.org/10.4081/ejh.2018.2841>
- Seo, J. H., & Kim, H. J. (2015). Effect of H₂O₂ bleaching with ultrasonication on the properties of thermomechanical pulp and unbleached kraft pulp. *Ultrasonics Sonochemistry*, 23, 347–353. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.10.013>
- Siano, F., Moccia, S., Picariello, G., Russo, G. L., Sorrentino, G., Di Stasio, M., La Cara F., Volpe, M. G. (2019). Comparative study of chemical, biochemical characteristic and ATR-FTIR analysis of seeds, oil and flour of the edible Fedora cultivar hemp (Cannabis sativa L.). *Molecules*, 24(1), 1–13. <https://doi.org/10.3390/molecules24010083>
- Siano, F., Sorrentino, G., Riccardi, M., De Cunzo, F., Orefice, G., & Volpe, M. G. (2018). Chemical, nutritional, and spectroscopic characterization of typical ecotypes of Mediterranean area beans. *European Food Research and Technology*, 244(5), 795–804. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-3004-1>
- Silversides, F. G., & Lefrançois, M. R. (2005). The effect of feeding hemp seed meal to laying hens. *British Poultry Science*, 46(2), 231–235. <https://doi.org/10.1080/0071660500066183>
- Sindhu, K. A., Prasanth, R., & Thakur, V. K. (2014). Medical Applications of Cellulose and its Derivatives: Present and Future. In *Nanocellulose Polymer Nanocomposites* (pp. 437–477). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9781118872246.ch16>
- Singh, R., & Vyas, S. P. (1996). Topical liposomal system for localized and controlled drug delivery. *Journal of Dermatological Science*, 13(2), 107–111. [https://doi.org/10.1016/S0923-1811\(96\)00508-7](https://doi.org/10.1016/S0923-1811(96)00508-7)
- Sivakumar, P. A., Mythily, S., Alamelu, S., & Panduranga Rao, K. (1994). Liposome-ibuprofen conjugate and the release characteristics of ibuprofen. *Indian Drugs-Bombay-*, 31, 568.
- Stella, B., Baratta, F., Della Pepa, C., Arpicco, S., Gastaldi, D., & Dosio, F. (2021). *Cannabinoid Formulations and Delivery Systems: Current and Future Options to Treat Pain*. Drugs (Vol. 81). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/s40265-021-01579-x>
- Sulcova, A. (2019). Pharmacodynamics of cannabinoids. *Archives of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(1), 011–018. <https://doi.org/10.29328/journal.apps.1001013>

- Swapna, N., & Nadkarni, G. (1998). Effect of size and charge of liposomes on biodistribution of encapsulated ggmTc-DTPA in rats. *Indian Journal of Pharmacology*, 30(3), 199–202. Retrieved from <https://www.ijp-online.com/article.asp?issn=0253-7613>
- Tang, C. H., Ten, Z., Wang, X. S., & Yang, X. Q. (2006). Physicochemical and functional properties of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(23), 8945–8950. <https://doi.org/10.1021/jf0619176>
- Taura, F., Tanaka, S., Taguchi, C., Fukamizu, T., Tanaka, H., Shoyama, Y., & Morimoto, S. (2009). Characterization of olivetol synthase, a polyketide synthase putatively involved in cannabinoid biosynthetic pathway. *FEBS Letters*, 583(12), 2061–2066. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.05.024>
- Teterycz, D., Sobota, A., Przygodzka, D., & Lysakowska, P. (2021). Hemp seed (*Cannabis sativa* L.) enriched pasta: Physicochemical properties and quality evaluation. *PLoS ONE*, 16(3 March), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248790>
- Thomas, G., Kloner, R. A., & Rezkalla, S. (2014). Adverse Cardiovascular, Cerebrovascular, and Peripheral Vascular Effects of Marijuana Inhalation: What Cardiologists Need to Know. *The American Journal of Cardiology*, 113(1), 187–190. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2013.09.042>
- Tiwari, G., Tiwari, R., Bannerjee, S., Bhati, L., Pandey, S., Pandey, P., & Sriwastawa, B. (2012). Drug delivery systems: An updated review. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 2(1), 2. <https://doi.org/10.4103/2230-973x.96920>
- Tønnesen, H. H., & Karlsen, J. (2002). Alginate in drug delivery systems. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 28(6), 621–630. <https://doi.org/10.1081/DDC-120003853>
- Torchilin, V. P. (2004). Targeted polymeric micelles for delivery of poorly soluble drugs. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61(19–20), 2549–2559. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4153-5>
- Torchilin, V. P. (2006). Micellar Nanocarriers: Pharmaceutical Perspectives. *Pharmaceutical Research*, 24(1), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s11095-006-9132-0>
- Uekama, K., & Otagiri, M. (1987). Cyclodextrins in drug carrier systems. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 3(1), 1–40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3542243>
- Ujváry, I., & Hanuš, L. (2016). Human Metabolites of Cannabidiol: A Review on Their Formation, Biological Activity, and Relevance in Therapy. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 1(1), 90–101. <https://doi.org/10.1089/can.2015.0012>
- Vaccani, A., Massi, P., Colombo, A., Rubino, T., & Parolaro, D. (2005). Cannabidiol inhibits human glioma cell migration through a cannabinoid receptor-independent mechanism. *British Journal of Pharmacology*, 144(8), 1032–1036. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706134>
- Van Bakel, H., Stout, J. M., Cote, A. G., Tallon, C. M., Sharpe, A. G., Hughes, T. R., & Page, J. E. (2011). The draft genome and transcriptome of *Cannabis sativa*. *Genome Biology*, 12(10). <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-10-r102>
- Van den Elsen, G. A. H., Ahmed, A. I. A., Lammers, M., Kramers, C., Verkes, R. J., van der Marck, M. A., & Rikkert, M. G. M. O. (2014). Efficacy and safety of medical cannabinoids in older subjects: A systematic review. *Ageing Research Reviews*, 14(1), 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2014.01.007>
- Vernon-Parry, K. D. (2000). Scanning electron microscopy: an introduction. *III-Vs Review*, 13(4), 40–44. [https://doi.org/10.1016/S0961-1290\(00\)80006-X](https://doi.org/10.1016/S0961-1290(00)80006-X)
- Vijayalakshmi, K., Gomathi, T., & Sudha, P. N. (2014). Preparation and characterization of nanochitosan/sodium alginate/microcrystalline cellulose beads. *Der Pharmacia Lettre*, 6(4), 65–77.
- Vonapartis, E., Aubin, M. P., Seguin, P., Mustafa, A. F., & Charron, J. B. (2015). Seed composition of ten industrial hemp cultivars approved for production in Canada. *Journal of Food Composition and Analysis*, 39, 8–12. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2014.11.004>
- Wall, M. E., Sadler, B. M., Brine, D., Taylor, H., & Perez-Reyes, M. (1983). Metabolism, disposition, and kinetics of delta-9-tetrahydrocannabinol in men and women. *Clinical*

- Pharmacology and Therapeutics*, 34(3), 352–363. <https://doi.org/10.1038/clpt.1983.179>
- Williams, P. L., & Moffat, A. C. (2011). Identification in human urine of Δ^9 -tetrahydrocannabinol-11-oic acid glucuronide: a tetrahydrocannabinol metabolite. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 32(1), 445–448. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1980.tb12966.x>
- Zaami, S., Di Luca, A., Di Luca, N. M., & Montanari Vergallo, G. (2018). Medical use of cannabis: Italian and European legislation. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 22(4), 1161–1167. https://doi.org/10.26355/eurrev_201802_14405
- Zgair, A., Wong, J. C. M., Lee, J. B., Mistry, J., Sivak, O., Wasan, K. M., Henning I., Barrett D., Constantinescu C., Fischer P., Gershkovich, P. (2016). Dietary fats and pharmaceutical lipid excipients increase systemic exposure to orally administered cannabis and cannabis-based medicines. *American Journal of Translational Research*, 8(8), 3448–3459.
- Zhang, C., Mo, J., Fu, Q., Liu, Y., Wang, S., & Nie, S. (2021). Wood-cellulose-fiber-based functional materials for triboelectric nanogenerators. *Nano Energy*, 81, 105637. <https://doi.org/10.1016/j.nanoen.2020.105637>

Anexos

Anexo A. Comunicação Póster

A1. Comunicação Oral na forma de Póster científico apresentado no “Encontro com a Ciência e Tecnologia em Portugal 2022”, Fundação para a Ciência e Tecnologia:

Saraiva, P.N.C., Moreira, J., Lopes, C., Silva, L., Curto, J.M.R., Drug Delivery Systems (DDS) for oral and dermic applications using Cannabis fibres and Essential Oils, in: Encontro com a Ciência e Tecnologia em Portugal 2022, CCL, Lisbon, Portugal, May 16-18, 2022.

Abstract: The purpose of this study was to develop innovative biopolymeric Drug Delivery Systems (DDS) containing a 3D nano cellulose-based matrix to retain active molecules. Two main types of DDS were investigated for oral therapy and dermic applications. For oral therapy the DDS were made using Cannabis fibres to reinforce the 3D nano/micro cellulose matrix. For dermic applications the active molecules from *Mentha piperita* L essential oil were chosen and assembled using an oil in water emulsion. To improve the DDS cellulose-based matrix porosity and strength properties the optimization was carried out through 3D computational simulation studies. The results showed that the drug delivery systems are able to retain the active molecules under different pH conditions.

Introduction:

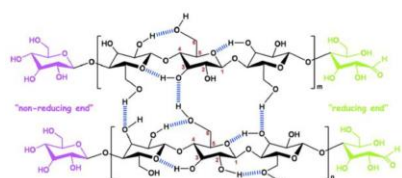


Fig 1 . Schematic representation of the chemical structure and intra- and inter-molecular hydrogen bonds in crystalline cellulose (Adapted from Lin and Dufresne 2014)

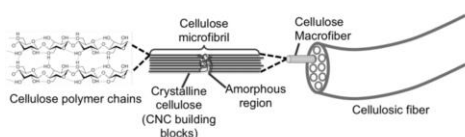


Fig 2. Hierarchical structure of cellulose fibers (Adapted from Parry, 2016)

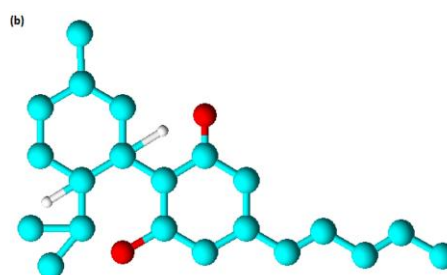
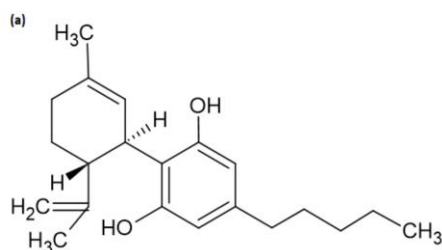
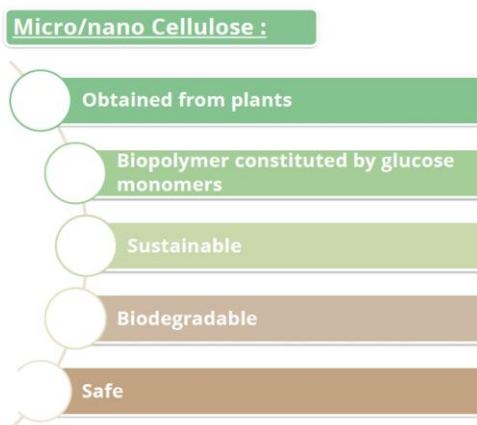


Fig 3. Molecular structure of cannabidiol CBD, in 2D (a) and in 3D (b) (elaborated in ChemSketch software)

Methodology:



Results:

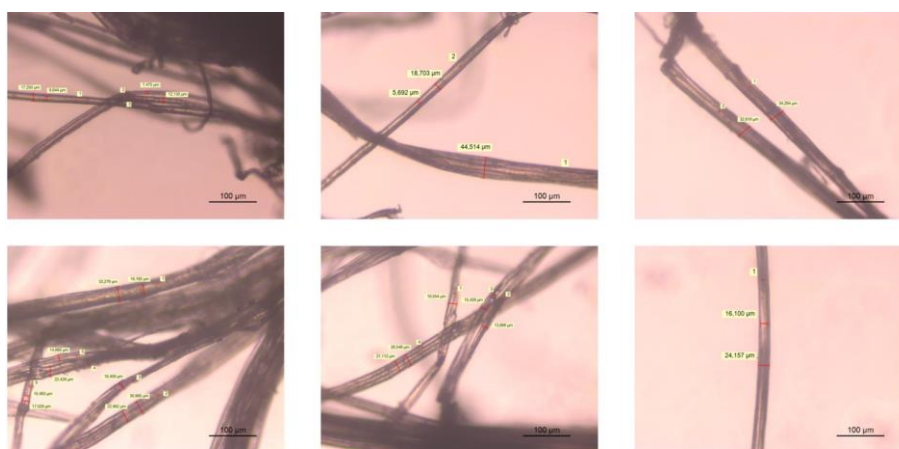


Fig 4. Microscopic images of Cannabis fibres obtained from a combination of alkaline and hydrogen peroxide delignification processes (images analysis obtained by LAS X software)

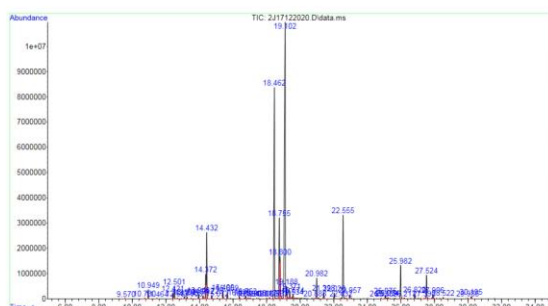


Fig. 5. Chromatogram representing the relative chemical composition of *Mentha piperita* L. essential oil molecules, obtained by GC-MS [9]

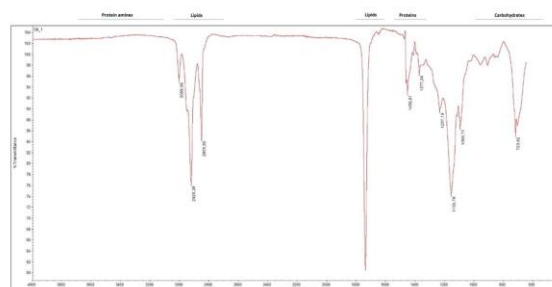


Fig. 6. FTIR-ATR spectrum of a sample of cannabis oil

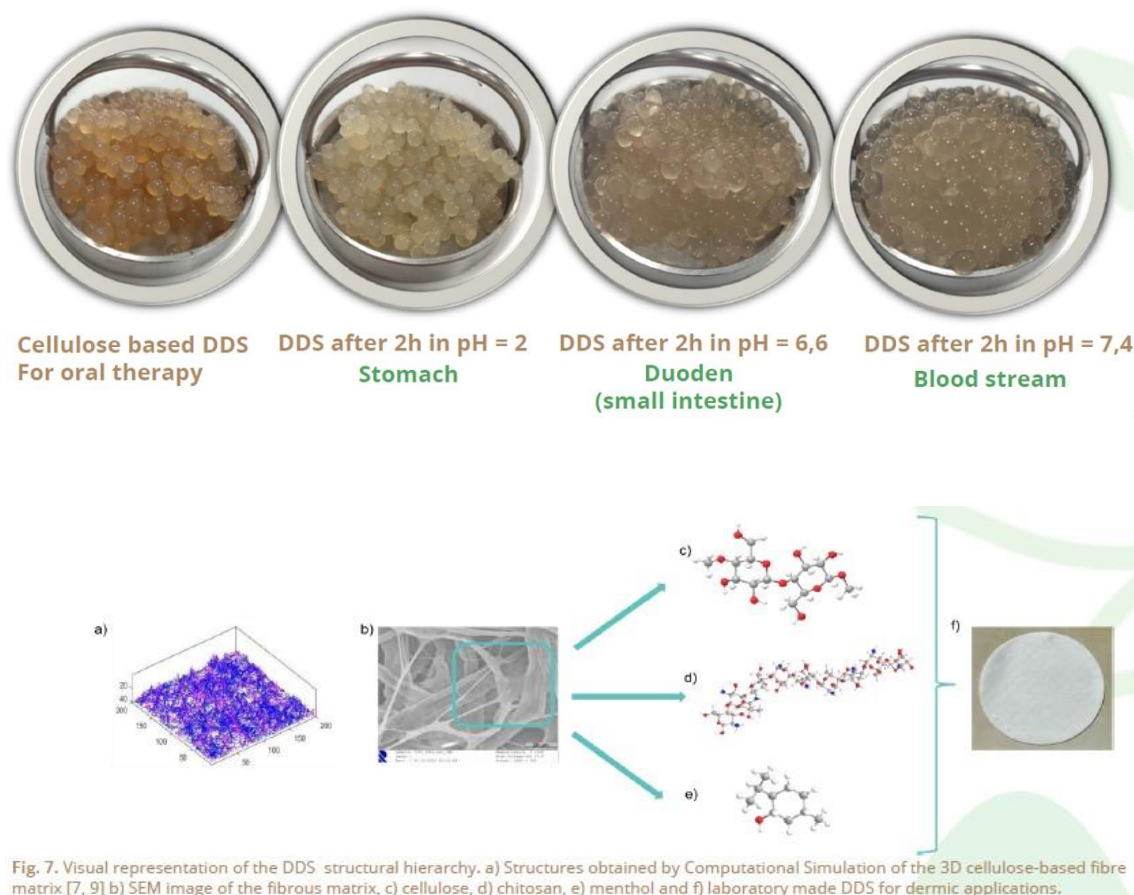



Fig. 7. Visual representation of the DDS structural hierarchy. a) Structures obtained by Computational Simulation of the 3D cellulose-based fibre matrix [7, 9] b) SEM image of the fibrous matrix, c) cellulose, d) chitosan, e) menthol and f) laboratory made DDS for dermic applications.

Conclusions: A 3D cellulose-based matrix was tailor-made for oral and dermic therapeutic applications using a combination of experimental and computational methodology. The results indicate that after optimization the DDS for oral therapy using Cannabis fibres are able to retain the active molecules under different pH conditions and that the DDS for dermic applications are able to retain and the active molecules form *Mentha piperita* L essential oil, and to maintain their stability during a period of time compatible to their application.


References:

- [1] Morais, F.M., Simões R.M.S, Curto, J.M., (2020). “Biopolymeric Delivery Systems for Cosmetic Applications Using *Chlorella vulgaris* Algae and Tea Tree Essential Oil”, *Polymers*, 12(11). <https://doi.org/10.3390/polym12112689>
- [2] Morais, F.P., Carta, A.M.M.S., Amaral, M.E., Curto, J.M.R. (2021). Micro/nano-fibrillated cellulose (MFC/NFC) fibers as an additive to maximize eucalyptus fibers on tissue paper production. *Cellulose*, 28, 6587–6605. <https://doi.org/10.1007/s10570-021-03912-9>
- [3] Morais, F.P., Carta, A.M.M.S., Amaral, M.E., Curto, J.M.R. (2021). Cellulose Fiber Enzymatic Modification to Improve the Softness, Strength, and Absorption Properties of Tissue Papers. *BioResources*, 16, 846-861.

- [4] Spiridon, I., Duarte, A. P., Curto, J. (2003). Influence of xylanase treatment on Pinus pinaster kraft pulp. Cellulose chemistry and technology, (37 (3-4))
- [5] Arias, M., López, A., Vilaseca, M., Vallès, B., Prieto, R., Simó, M., Valle, J., Valle, R., Bezerra, F., Bellalta, J. (2021). Influence of Chitosan Characteristics in the Microencapsulation of Essential Oils. Journal of Biomedical Science and Engineering, 14, 119-129. <https://doi.org/10.4236/jbise.2021.143012>.
- [6] Mota, A.S., Rosário Martins, M., Arantes, S., Lopes, V.R., Bettencourt, E., Pombal, S., Gomes, A.C., Silva, L.A., (2015). Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oils of Portuguese Foeniculum vulgare fruits, Natural Product Communications, 10 (4) 673-676.
- [7] Curto, J.M.R., Conceição, E.L.T., Portugal, A.T.G., Simões, R.M.S. (2011). Three-dimensional modelling of fibrous materials and experimental validation. Materialwissenschaft Und Werkstofftechnik, 42(5), 370–374. <https://doi.org/10.1002/mawe.201100790>.
- [8] Morais F.P., Carta A.M.M.S, Amaral M.E., Curto J.M.R. (2020). 3D Fiber Models to Simulate and Optimize Tissue Materials. BioResources 15, 8833-8848
- [9] Moreira, J., Lopes, C., Lis Arias, M.J., Silva, L., Curto, J.M.R. (2021). Development of Biodegradable, Cellulose-Based, Essential Oil and Chitosan Drug Delivery Systems for Cosmetic Mask Applications. In *Proceedings of the 1st International FibEnTech Congress - New opportunities for fibrous materials in the ecological transition*, Online Conference, 9-10 December 2021, *KnE Materials Science*. <https://doi.org/10.18502/5>
- [10] – Zhu, J.Y., Agarwal, U.P., Ciesielski, P.N., Himmel, M.E., Gao, R., Deng, Y., Morits, M., Österberg, M. (2021). Towards sustainable production and utilization of plant-biomass-based nanomaterials: a review and analysis of recent developments. *Biotechnology for Biofuels* .14, 114. <https://doi.org/10.1186/s13068-021-01963-5>



FACULDADE CIÊNCIAS
Departamento de Química



ENCONTRO COM A CIÊNCIA E TECNOLOGIA EM PORTUGAL
2023


Drug Delivery Systems (DDS) for oral and dermic applications using Cannabis fibres and Essential Oils

Paulo Saraiva¹, Joana Moreira¹, Catarina Lopes¹, Lúcia Silva¹, Joana Curto^{1,*}
¹FibEnTech-UBI, Fiber Materials and Environmental Technologies Research Unit, Chemistry Dep., UBI
 *Corresponding author: joanacurto@ubi.pt

Abstract

The purpose of this study was to develop innovative biopolymer Drug Delivery Systems (DDS) containing a 3D porous cellulose-based matrix to retain active molecules. Two main types of DDS were investigated for oral therapy and dermic applications. For oral therapy the DDS were made using Cannabis fibres to reinforce the 3D nanochitosan cellulose matrix. For dermic application the active molecules from Mentha piperita L. essential oil were chosen and associated using an oil in water emulsion. To improve the DDS cellulose-based matrix porosity and strength properties the optimization was carried out through 3D computational simulation studies. The results showed that the drug delivery systems are able to retain the active molecules under different pH conditions.

Introduction



Keywords: Cellulose;

- 1 Menthyl acetate
- 2 Menthyl salicylate
- 3 Cellulose
- 4 Nanochitosan
- 5 3D




Fig. 1 Chemical representation of the chemical structure and main active molecules (menthyl acetate and menthyl salicylate) extracted from Cannabis fibres (Lopes and Curto, 2022).

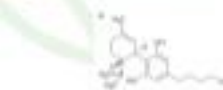


Fig. 2 3D schematic representation of cellulose fibres (Lopes and Curto, 2022).




Fig. 3 Chemical structure of menthyl acetate (C₁₅H₂₆O₂) (Lopes and Curto, 2022).

Results




Fig. 4 Microscopic images of Cannabis fibres (Lopes and Curto, 2022).

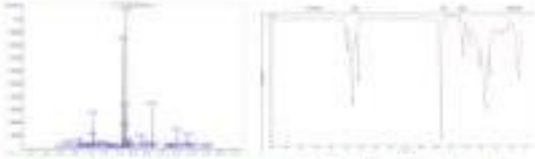


Fig. 5 FTIR spectra of cellulose and nanochitosan (Lopes and Curto, 2022).




Fig. 6 SEM images of cellulose-based matrices (Lopes and Curto, 2022).

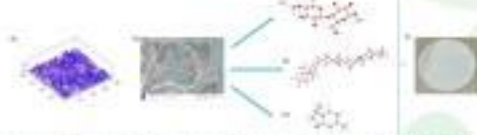



Fig. 7 3D schematic representation of cellulose-based matrices (Lopes and Curto, 2022).

Methodology



Conclusions

A 3D cellulose-based matrix was optimized for oral and dermic therapeutic applications using a combination of experimental and computational methodology. The results indicate that after optimization the DDS for oral therapy using Cannabis fibres are able to retain the active molecules under different pH conditions and that the DDS for dermic applications are able to retain and the active molecules from Mentha piperita L. essential oil, and to maintain their stability during a period of time compatible to their application.

References

[1] Moreira, P.M., Saraiva, P.M., Curto, J.M. (2022). Biopolymer Delivery Systems for Dermic Applications Using Cannabis vulgaris Fibres and Tea Tree Essential Oil. Polymers, 13(7), 1212. <https://doi.org/10.3390/polym13071212>

[2] Moreira, P.P., Curto, J.M., Saraiva, P.M., Curto, J.M. (2021). Cellulose-Based Nanochitosan Cellulose (NCC) Fibres as an additive in nanofibre synthesis: Fibre in fibre paper production. Cellulose, 28, 6687-6695. <https://doi.org/10.1007/s10570-021-02973-9>

[3] Moreira, P.P., Curto, J.M., Saraiva, P.M., Curto, J.M. (2021). Cellulose Fibre Synthesis: Modification to Improve the Softness, Strength, and Absorption Properties of Tissue Papers. Bioresources, 16, 888-907.

[4] Spinkov, L., Duarte, A.P., Curto, J. (2022). Influence of a Green treatment on Pirus (pear) kraft pulp. Cellulose chemistry and technology, 33(2)-42

[5] Aires, M., Lopes, A., Vileca, M., Vales, S., Fróis, S., Simó, M., Vales, J., Vales, A., Soares, F., Bellas, J. (2021) Influence of Chlorine Dioxide on the Microstructure of Essential Oils. Journal of Biomedical Science and Engineering, 14, 119-129. <https://doi.org/10.4236/jbse.2021.140212>

[6] Maia, S.S., Soares Martins, M., Avantes, S., Lopes, B.S., Bateman, B., Pereira, S., Gomes, A.C., Silva, L.A. (2017). Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oils of Portuguese *Franklinia jugosa* Engelm. Natural Product Communications, 10(10):479-479.

[7] Curto, J.M., Gonçalves, R.T., Portugal, A.T.S., Saraiva, P.M. (2021). Three-dimensional modeling of fibrous materials and experimental validation. Materials Research and Technological Reviews, 4(2), 370-375. <https://doi.org/10.1002/matr.202103076>

[8] Moreira P.P., Curto J.M., Saraiva P.M., Curto J.M. (2022). 3D Fiber Models in Emulsion and Cellulose Tissue Materials. Bioresources 15, 8831-8844

[9] Moreira, J., Lopes, C., Vales, M., Silva, L., Curto, J.M. (2021). Development of Biopolymer Cellulose-Based Fibrous and Cellulose Drug Delivery Systems for Cannabis Medicinal Applications. In Proceedings of the 1st International FibreTech Congress - New opportunities for fibrous materials in the emerging world, Online Conference, 9-10 December 2021. UBI Materials Science. <https://doi.org/10.1002/1522>

[10] Zhu, J.Y., Agarwal, U.P., Deswal, P.V., Hossain, M.S., Gan, R., Deng, H., Marks, M., Sauerbrey, M. (2021). Tissue-like sustainable production and utilization of plant biomass based nanomaterials: a review and analysis of recent developments. Biotechnology for Biofuels, 14, 116. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-02968-9>

Anexo B. Preparação das diversas soluções

B1. Cálculo da quantidade de NaOH 3 M a ser incorporado na etapa de obtenção das fibras de Cannabis

$$\begin{array}{l} 1 \text{ mol de NaOH} \text{ ————— } 40 \text{ g de NaOH} \\ 3 \text{ mol de NaOH} \text{ ————— } X \text{ g de NaOH} \end{array} \quad (\text{B1})$$

Onde, X = 120 g de NaOH colocados num balão volumétrico de 1L com posterior adição de água destilada.

B2. Cálculo da preparação dos diversos constituintes empregues na formulação dos DDS para aplicações terapêuticas orais

Alginato 2% (m/v):

$$\begin{array}{l} 100 \text{ mL de água destilada} \text{ ————— } 2 \text{ g de alginato} \\ 500 \text{ mL de água destilada} \text{ ————— } X \text{ de alginato} \end{array} \quad (\text{B2})$$

Onde, X = 10 g de alginato a serem incorporados em 500 mL de água destilada.

CMC 0,5% (m/v):

$$\begin{array}{l} 100 \text{ mL de água destilada} \text{ ————— } 0,5 \text{ g de CMC} \\ 500 \text{ mL de água destilada} \text{ ————— } X \text{ g de CMC} \end{array} \quad (\text{B3})$$

Onde, X = 2,5 g de CMC a serem incorporados em 500 mL de água destilada.

CaCl₂ 0,2M:

$$\begin{array}{l} 1 \text{ mol de CaCl}_2 \text{ ————— } 110,98 \text{ g de CaCl}_2 \\ 0,2 \text{ mol de CaCl}_2 \text{ ————— } X \text{ g de CaCl}_2 \end{array} \quad (\text{B4})$$

Onde, X = 22,196 g de CaCl₂ colocados num balão volumétrico de 1L com posterior adição de água destilada.

Extrato de Cannabis:

$$\text{Concentração} = \frac{\text{massa (extrato de Cannabis)}}{\text{Volume}} = \frac{1,563 \text{ g}}{0,5 \text{ L}} = 3,126 \text{ g/L} \quad (\text{B5})$$

B3. Cálculo da preparação dos diversos constituintes empregues nos estudos estruturais dos DDS

HCl 0,1M:

$$\begin{array}{l} 1 \text{ mol HCl} \text{ ————— } 36,458 \text{ g de HCl} \\ 0,1 \text{ mol HCl} \text{ ————— } X \text{ g de HCl} \end{array} \quad (\text{B6})$$

Onde, X = 3,6458 g de HCl colocados num balão volumétrico de 1L com posterior adição de água destilada.

K₂HPO₄ 0,1M:

$$\begin{array}{l} 1 \text{ mol K}_2\text{HPO}_4 \text{ ————— } 136,09 \text{ g de K}_2\text{HPO}_4 \\ 0,1 \text{ mol K}_2\text{HPO}_4 \text{ ————— } X \text{ g de K}_2\text{HPO}_4 \end{array} \quad (\text{B7})$$

Onde, X = 13,609 g de K₂HPO₄ colocados num balão volumétrico de 1L com posterior adição de água destilada.

Anexo C. Normas ISO

C1. Norma ISO 5263 – Desintegração e prensagem de uma pasta celulósica

1. Princípio

Este método refere que, uma amostra de pasta está desintegrada, quando esta ao ser submetida a um tratamento mecânico em água, as fibras interlaçadas, estejam novamente separadas umas das outras, sem que as suas propriedades estruturais tenham sido modificadas.

2. Preparação da Amostra

Determina-se o Teor de Matéria Seca (TMS) e pesa-se a massa correspondente a $30,0 \pm 0,5$ g de fibras de celulose o.d. (oven dried) ou absolutamente secas, isto é, sem água. Por exemplo, para um TMS de 93%, a massa utilizada é de 32,26 g. Antes do processo de desintegração, a pasta deve encontrar-se totalmente humedecida, onde para cada tipo de fibra, a duração do humedecimento é variável. Se a pasta se encontrar volumosa, é necessário rasgar a pasta em pedaços de $1,5 \times 1,5$ cm aproximadamente, antes de ser humedecida. Após preparação da pasta, as pastas com um teor em fibras absolutamente secas ou superior a 20% (m/m) devem ser embebidas em 2 L de água desmineralizada a $20 \pm 5^\circ\text{C}$ durante um tempo superior a 20h, designado *overnight*.

3. Execução

Após a pasta se encontrar totalmente humedecida, procede-se à desintegração da mesma através da inserção da pasta, juntamente com os 2 L de água desmineralizada, num desintegrador apropriado, isto é, tal como é referenciado nesta norma ISO. A concentração será então de cerca de 1,5%.

O número de revoluções empregues pelo desintegrador, encontra-se altamente dependente da percentagem de matéria seca inicial da pasta. Posto isto, para pastas com um TMS $> 20\%$ são empregues 30 000 revoluções e para pastas com um TMS compreendido entre 1,5 – 20% são empregues 10 000 revoluções.

Após conclusão da desintegração, verificar se a pasta se encontra totalmente desintegrada. Caso não estiver, procede-se novamente a outro ciclo de desintegração, contudo os resultados obtidos, não podem ser considerados como obedecendo às normas ISO para efeitos de determinação das propriedades das fibras.

Após desintegração total da pasta, utilizar 1 L de água desmineralizada, considerada de limpeza, de forma a retirar excessos de pastas retidos no balde desintegrados e nas lâminas.

C2. Norma ISO 5269/1 – Preparação de estruturas/folhas de laboratório para ensaios de caracterização. Método de formação utilizando um formador convencional referido nesta norma

O procedimento para preparação de estruturas feitas de fibras de celulose encontra-se descrito nesta norma ISO e pode ser sumariado nos passos seguintes.

1. Preparação da amostra

Dilui-se a suspensão de fibras para uma concentração entre 0,2 – 0,5%. Utiliza-se a suspensão de fibras de celulose proveniente do desintegrador, com uma consistência de 1,5%, com posterior diluição utilizando 6L de água desmineralizada num recipiente com agitação em pás apropriado para suspensões de fibras numa gama de rotações de 3000 rpm, que permita um vórtex apropriado para as fibras, sem ocorrer nenhum rasgamento nem alteração às mesmas.

2. Formação das folhas

Na formação das folhas, inicialmente é colocado a teia (filtro) no formador. Posteriormente, fecha-se a válvula de drenagem e o compartimento superior, e de seguida puxa-se a alavanca de entrada de água cobrindo a teia, até pelo menos, 50 mm de altura.

Depois adiciona-se a quantidade de suspensão correspondente para as folhas de $60 \pm 3,0$ g/m², que neste caso, seria 400,875 mL. Após incorporação da suspensão, eleva-se a água até à marca com posterior agitação da suspensão através de um agitador específico para esta norma ISO, movendo-o 6 vezes com vigorosidade suficiente para assegurar uma homogeneização ótima.

Seguidamente, após 10 segundos, abre-se a válvula de drenagem completamente com um movimento rápido, escoando toda a água da teia deixando num vácuo durante um período de tempo não superior a 5 s, com posterior fecho da válvula e abertura do compartimento superior.

De seguida, são colocados 3 mata-borrões, com o lado da teia virado para cima e centrados na folha húmida. Utiliza-se um cilindro no meio da folha com 3 a 4 prensagens, onde será retirada, cuidadosamente, a folha da teia posteriormente.

3. Empilhamento, prensagem, secagem e condicionamento

Após a produção das folhas segundo este método estas são submetidas a um processo de prensagem e empilhamento. Este processo consiste em empilhar papel mata-borrão com as folhas produzidas numa placa de secagem repetida várias vezes. Ao mesmo tempo, cada folha terá que sofrer um processo de prensagem exercendo uma pressão contínua de 400 ± 10 KPa na prensa durante $5 \text{ min} \pm 15 \text{ s}$. Após isto, estas placas juntamente com as folhas anexas do papel mata-borrão são separadas e colocadas nos anéis com a folhada virada para cima, formando uma pilha onde o último anel não deve conter nenhuma folha, uma vez que se coloca sobre este um peso de 20 kg. Posteriormente, a pilha é posicionada num laboratório condicionado, para que as folhas permaneçam em contacto com as suas placas de secagem durante todo o período de secagem. Este laboratório condicionado apresenta uma circulação de ar adequada, capaz de manter as mesmas condições atmosféricas de temperatura ($22 \text{ }^\circ\text{C}$) e humidade (50%).

C3. Norma ISO 534 – Caracterização da espessura, bulk, densidade das folhas celulósicas

1. Determinação da espessura da folha celulósica

Após secagem das diversas folhas elaboradas através da norma ISO 5269/1, procedeu-se à sua caracterização.

Inicialmente, recorreu-se à medição, em mm, da espessura de cada folha celulósica. Para tal, procedeu-se à verificação e calibração do micrómetro, como descrito nesta norma ISO.

Após calibração do aparelho, as medições de espessura foram efetuadas no local onde as folhas sofreram a sua secagem, de forma a não ocorrer nenhuma possível interação indesejada da folha com o meio exterior. De seguida, procede-se às leituras de espessura das diversas folhas preparadas através de 5 leituras de espessura, em 5 pontos distintos da folha, distanciados entre 40 – 80 mm entre si, obtendo um valor médio final referente à espessura.

2. Obtenção dos valores referentes às restantes características das folhas celulósicas

Após obtenção dos valores de espessura para cada folha celulósica, bem como dos valores da massa e área de cada folha, as restantes características das folhas (Bulk, densidade e porosidade) são calculáveis como descrito neste norma ISO.

C4. Norma TAPPI 240 om-88 – Determinação da consistência (concentração) de uma suspensão de pasta

A determinação da consistência fez-se utilizando o processo descrito na norma TAPPI 240 om-88. Retira-se um volume conhecido de suspensão, por exemplo 500 mL, e procede-se à elaboração de uma estrutura, seguindo a norma ISO 5269/1, no formador. Esta estrutura é seca num secador rápido, de forma que toda a água seja evaporada, com posterior determinação da sua massa. Com esta informação, passamos a conhecer o valor da consistência daquele recipiente. Por exemplo, se a massa for de 1,6 g em 500 mL, a consistência da suspensão em folhas de 60 g/m² será de 0,32% (m/m).

C5. Norma ISO 5264-2:2011 – Refinação das pastas celulósicas através de um refinador PFI-mill

De forma a estudar e analisar o impacto do processo de refinação mecânica na variação das propriedades das folhas celulósicas, procedeu-se a uma refinação mecânica utilizando um refinador apropriado, segundo esta norma ISO, o PFI-mill.

1. Preparação das diversas pastas celulósicas

As diversas soluções contendo as fibras celulósicas foram refinadas mecanicamente em 3 pontos diferentes: 2500, 4500 e 7500 revoluções. Inicialmente, as pastas celulósicas sofreram uma desintegração como descrito na norma ISO 5263. Seguidamente, as diversas pastas celulósicas desintegradas foram filtradas, utilizando um funil de Buchner, como descrito na respetiva norma ISO, obtendo desta forma uma estrutural global para cada fibra específica.

2. Processo de refinação

Inicialmente, é necessário ajustar a temperatura do PFI-mill, bem como das diversas pastas celulósicas desintegradas, não ultrapassando uma variação de 20 ± 5 °C. Após regulação da temperatura, liga-se o refinador com posterior implementação do número de revoluções requeridas.

Antes do processo de refinação, é necessário ter em consideração diversos aspetos de forma ocorrer uma correta refinação, dos quais, ter a certeza que o parafuso Vernier se encontra totalmente desenroscado e que o refinador se encontra limpo, não contendo resíduos de pastas celulósicas anteriores.

Após obtenção de todas as condições exigidas, procede-se ao método de refinação das diversas pastas celulósicas através do espalhamento da pasta uniformemente na parede do cilindro, de forma a não criar buracos sem pasta. Seguidamente, enrosca-se o parafuso Vernier, apertando deste modo o aparelho.

Posteriormente clica-se simultaneamente nos dois botões “Start” com a correta inserção da tampa do refinador. Verifica-se o correto posicionamento da tampa através de ligeiros toques na tampa, de modo a conferir a o correto posicionamento da tampa. É necessário também ter em conta o número de revoluções, anteriormente programado e iniciar o processo de refinação. Após início da refinação, desenroscasse o parafuso de Vernier, aproximando as lâminas do refinador, entrando estas em contacto com a pasta celulósica presente no seu interior, iniciando deste modo a refinação. Quando terminado, clicar no botão “Stop” de forma a levantar o braço do refinador com posterior aquisição das pastas celulósicas refinadas.

Por fim, as pastas celulósicas são re-suspendidas em 2000 ± 25 mL de água desmineralizada com posterior desintegração utilizando 10 000 revoluções, como descrito na norma ISO 5263. Após obtenção das fibras celulósicas refinadas desintegradas, procede-se ao desenvolvimento de folhas celulósicas, como descrito na norma ISO 5269/1, com futura análise das suas propriedades fibrosas, através da norma ISO 534.

Anexo D. Cálculo dos rendimentos

D1. Rendimento da quantidade de *Cannabis Sativa* L., proveniente da amostra A, após o processo de descarboxilação

$$\eta = \frac{m (\text{matéria orgânica pós descarboxilada})}{m (\text{matéria orgânica pré descarboxilação})} \times 100 = \frac{1,437}{1,578} \times 100 = 91,06\% \quad (\text{D1})$$

D2. Rendimento da quantidade de *Cannabis*, proveniente da amostra B, após o processo de descarboxilação

$$\eta = \frac{m (\text{matéria orgânica pós descarboxilada})}{m (\text{matéria orgânica pré descarboxilação})} \times 100 = \frac{0,897}{0,950} \times 100 = 94,42\% \quad (\text{D2})$$

Anexo E. Dados obtidos relativamente aos diversos tipos de estruturas em malha fibrosas celulósicas refinadas

E1. Fibras de celulose branqueadas refinadas a 2500 revoluções

<i>Folhas</i>	<i>Massa (g)</i>	<i>Área (m²)</i>	<i>Gramagem (g/m²)</i>	<i>Espessura (mm)</i>	<i>Bulk (cm³/g)</i>	<i>Densidade da folha (g/cm³)</i>	<i>Porosidade</i>
1	1,347	0,021	63	0,137	2,174	0,459	0,693
2	1,336	0,021	62,48	0,144	2,304	0,433	0,710
3	1,346	0,021	62,95	0,143	2,271	0,440	0,706
4	1,353	0,021	63,28	0,141	2,228	0,448	0,700
5	1,361	0,021	63,65	0,153	2,403	0,416	0,722
6	1,342	0,021	62,76	0,140	2,230	0,448	0,701
7	1,341	0,021	62,72	0,140	2,232	0,448	0,701
8	1,342	0,021	62,76	0,137	2,182	0,458	0,694
9	1,359	0,021	63,56	0,155	2,438	0,410	0,726
10	1,355	0,021	63,37	0,152	2,398	0,416	0,722
<i>Média</i>	1,346	0,021	62,98	0,142	2,263	0,442	0,705
<i>Desvio Padrão</i>	0,008		0,388	0,005	0,073	0,014	0,009

E2. Fibras de celulose branqueadas refinadas a 4500 revoluções

<i>Folhas</i>	<i>Massa (g)</i>	<i>Área (m²)</i>	<i>Gramagem (g/m²)</i>	<i>Espessura (mm)</i>	<i>Bulk (cm³/g)</i>	<i>Densidade da folha (g/cm³)</i>	<i>Porosidade</i>
1	1,347	0,021	63	0,102	1,618	0,617	0,588
2	1,333	0,021	62,34	0,100	1,603	0,623	0,584
3	1,361	0,021	63,65	0,098	1,539	0,649	0,566
4	1,340	0,021	62,67	0,099	1,579	0,633	0,577
5	1,359	0,021	63,56	0,101	1,588	0,629	0,580
6	1,366	0,021	63,89	0,099	1,549	0,645	0,569
7	1,366	0,021	63,89	0,102	1,596	0,626	0,582
8	1,362	0,021	63,70	0,101	1,585	0,630	0,579
9	1,342	0,021	62,76	0,100	1,593	0,627	0,581
10	1,356	0,021	63,42	0,099	1,560	0,640	0,572
<i>Média</i>	1,353	0,021	63,29	0,100	1,581	0,632	0,578
<i>Desvio Padrão</i>	0,011		0,552	0,001	0,024	0,009	0,006

E3. Fibras de celulose branqueadas refinadas a 7500 revoluções

<i>Folhas</i>	<i>Massa (g)</i>	<i>Área (m²)</i>	<i>Gramagem (g/m²)</i>	<i>Espessura (mm)</i>	<i>Bulk (cm³/g)</i>	<i>Densidade da folha (g/cm³)</i>	<i>Porosidade</i>
1	1,350	0,021	63,14	0,081	1,282	0,779	0,480
2	1,349	0,021	63,09	0,078	1,236	0,808	0,460
3	1,327	0,021	62,06	0,079	1,272	0,785	0,476
4	1,343	0,021	62,81	0,079	1,257	0,795	0,469
5	1,327	0,021	62,06	0,075	1,208	0,827	0,448
6	1,326	0,021	62,02	0,074	1,193	0,838	0,441
7	1,352	0,021	63,23	0,075	1,186	0,843	0,437
8	1,346	0,021	62,95	0,077	1,223	0,817	0,454
9	1,353	0,021	63,28	0,075	1,185	0,843	0,437
10	1,357	0,021	63,47	0,075	1,181	0,846	0,435
<i>Média</i>	1,343	0,021	62,81	0,076	1,222	0,818	0,454
<i>Desvio Padrão</i>	0,011		0,556	0,002	0,038	0,025	0,016

E4. Fibras de celulose não branqueadas refinadas a 2500 revoluções

<i>Folhas</i>	<i>Massa (g)</i>	<i>Área (m²)</i>	<i>Gramagem (g/m²)</i>	<i>Espessura (mm)</i>	<i>Bulk (cm³/g)</i>	<i>Densidade da folha (g/cm³)</i>	<i>Porosidade</i>
1	1,359	0,021	63,59	0,175	2,751	0,363	0,757
2	1,361	0,021	63,65	0,148	2,324	0,430	0,713
3	1,359	0,021	63,58	0,175	2,752	0,363	0,757
4	1,372	0,021	64,19	0,156	2,430	0,411	0,725
5	1,335	0,021	62,44	0,154	2,466	0,405	0,729
6	1,332	0,021	62,30	0,162	2,600	0,384	0,743
7	1,392	0,021	65,10	0,153	2,349	0,425	0,716
8	1,312	0,021	61,36	0,171	2,786	0,358	0,760
9	1,363	0,021	63,75	0,164	2,572	0,388	0,740
10	1,341	0,021	62,72	0,168	2,678	0,373	0,751
<i>Média</i>	1,352	0,021	63,27	0,162	2,571	0,390	0,739
<i>Desvio Padrão</i>	0,022		1,073	0,009	0,171	0,026	0,017

E5. Fibras de celulose não branqueadas refinadas a 4500 revoluções

Folhas	Massa (g)	Área (m²)	Gramagem (g/m²)	Espessura (mm)	Bulk (cm³/g)	Densidade da folha (g/cm³)	Porosidade
1	1,319	0,021	61,72	0,135	2,187	0,457	0,695
2	1,349	0,021	63,11	0,133	2,107	0,474	0,683
3	1,323	0,021	61,88	0,138	2,230	0,448	0,701
4	1,397	0,021	65,36	0,145	2,218	0,450	0,699
5	1,365	0,021	63,84	0,136	2,130	0,469	0,687
6	1,368	0,021	63,99	0,140	2,187	0,457	0,695
7	1,399	0,021	65,47	0,152	2,321	0,430	0,712
8	1,386	0,021	64,86	0,149	2,297	0,435	0,709
9	1,403	0,021	65,62	0,136	2,072	0,482	0,678
10	1,520	0,021	71,09	0,150	2,109	0,473	0,684
<i>Média</i>	1,383	0,021	64,69	0,141	2,186	0,458	0,694
<i>Desvio Padrão</i>	0,056		2,653	0,006	0,082	0,017	0,011

E6. Fibras de celulose não branqueadas refinadas a 7500 revoluções

Folhas	Massa (g)	Área (m²)	Gramagem (g/m²)	Espessura (mm)	Bulk (cm³/g)	Densidade da folha (g/cm³)	Porosidade
1	1,407	0,021	65,85	0,106	1,609	0,621	0,585
2	1,404	0,021	65,68	0,118	1,796	0,556	0,628
3	1,386	0,021	64,85	0,107	1,649	0,606	0,595
4	1,309	0,021	61,26	0,105	1,713	0,583	0,610
5	1,306	0,021	61,11	0,109	1,783	0,560	0,626
6	1,376	0,021	64,39	0,119	1,848	0,541	0,639
7	1,325	0,021	61,97	0,105	1,694	0,590	0,606
8	1,311	0,021	61,36	0,101	1,645	0,607	0,594
9	1,324	0,021	61,92	0,105	1,695	0,589	0,606
10	1,287	0,021	60,20	0,103	1,710	0,584	0,610
<i>Média</i>	1,344	0,021	62,86	0,107	1,714	0,584	0,610
<i>Desvio Padrão</i>	0,044		2,101	0,006	0,074	0,025	0,016

Anexo F. Cálculo do *Ratio* para cada óleo de interesse

Anexo F1. Óleo de coco alimentar

$$\text{Ratio (20 - 40)} = \frac{m \text{ (mg) Matéria Orgânica}}{m \text{ (g) Óleo Incorporado}} = \frac{479}{16,024} = 29,89 \quad (\text{F1})$$

Anexo F2. Óleo de girassol alimentar

$$\text{Ratio (20 - 40)} = \frac{m \text{ (mg) Matéria Orgânica}}{m \text{ (g) Óleo Incorporado}} = \frac{479}{15,985} = 29,96 \quad (\text{F2})$$

Anexo F3. Óleo de coco e girassol alimentar numa proporção 1:1

$$\text{Ratio (20 - 40)} = \frac{m \text{ (mg) Matéria Orgânica}}{m \text{ (g) Óleo Incorporado}} = \frac{446}{14,91} = 29,91 \quad (\text{F3})$$

Anexo F4. Óleo de coco dérmico

$$\text{Ratio (20 - 40)} = \frac{m \text{ (mg) Matéria Orgânica}}{m \text{ (g) Óleo Incorporado}} = \frac{440}{14,671} = 29,99 \quad (\text{F4})$$

Anexo F5. Óleo mineral dérmico

$$\text{Ratio (20 - 40)} = \frac{m \text{ (mg) Matéria Orgânica}}{m \text{ (g) Óleo Incorporado}} = \frac{380}{12,671} = 29,98 \quad (\text{F5})$$

Anexo G. Espectros FTIR-ATR dos diversos óleos incorporados com canabinóides

Anexo G1. Óleo de coco alimentar

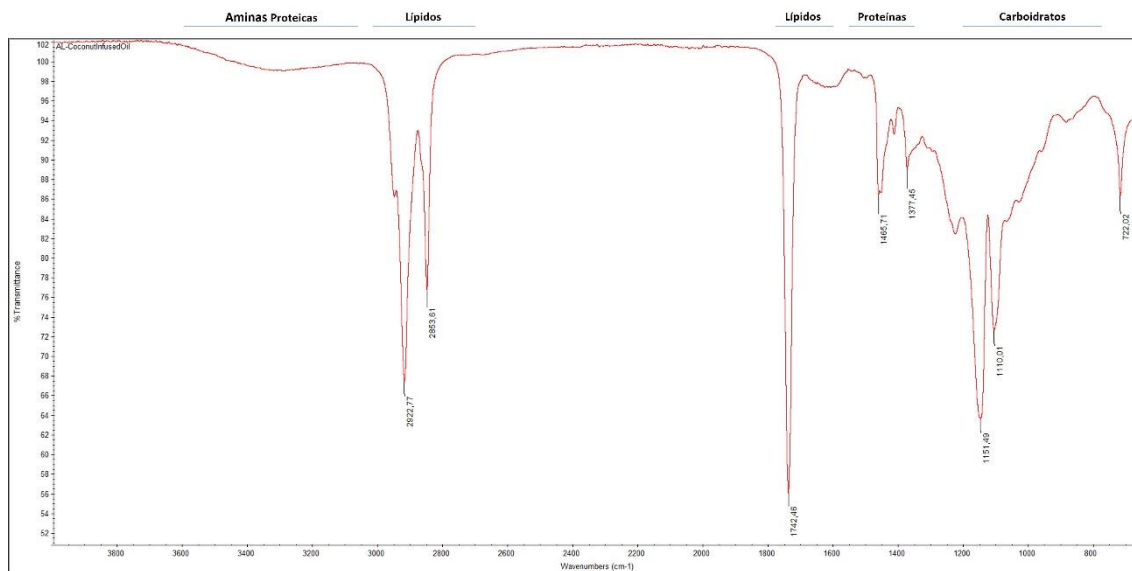


Figura G.1 – Espectro FTIR-ATR do óleo de coco alimentar incorporado com canabinóides provenientes da amostra A.

Anexo G2. Óleo de girassol alimentar

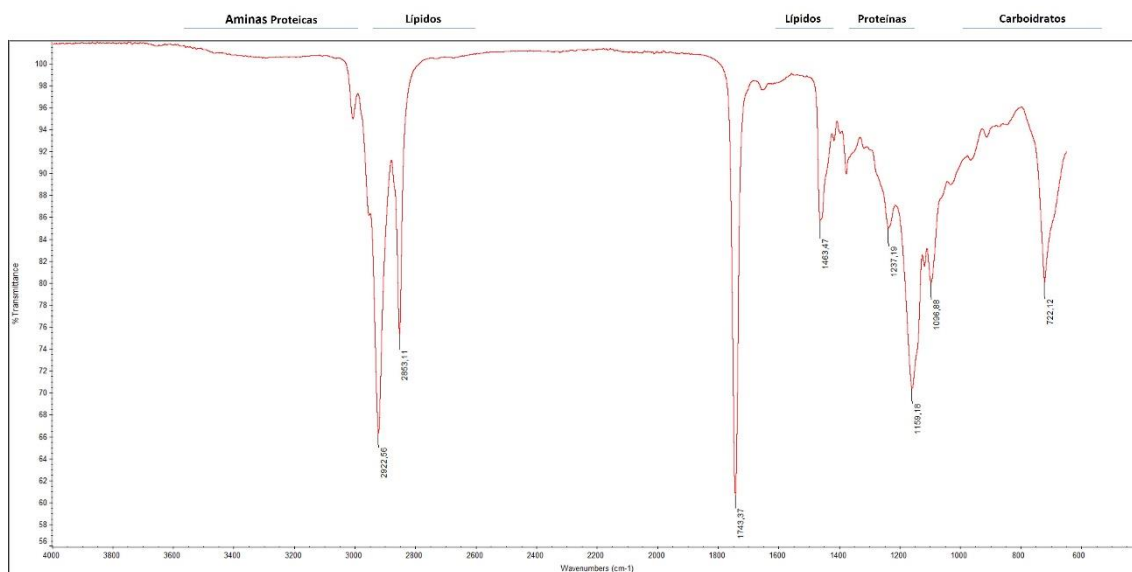


Figura G.2 – Espectro FTIR-ATR do óleo de girassol alimentar incorporado com canabinóides provenientes da amostra A.

Anexo G3. Óleo de coco e girassol alimentar numa proporção 1:1

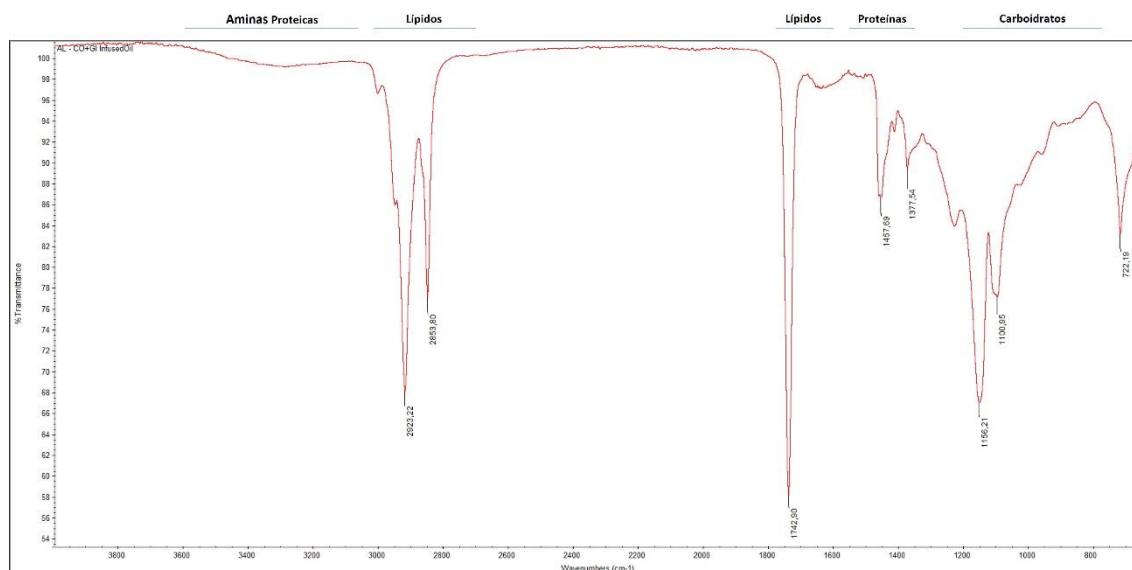


Figura G.3 – Espectro FTIR-ATR do óleo de coco e girassol alimentar numa proporção 1:1 incorporado com canabinóides provenientes da amostra A.

Anexo G4. Óleos alimentares na região espectral do canabinóide CBD

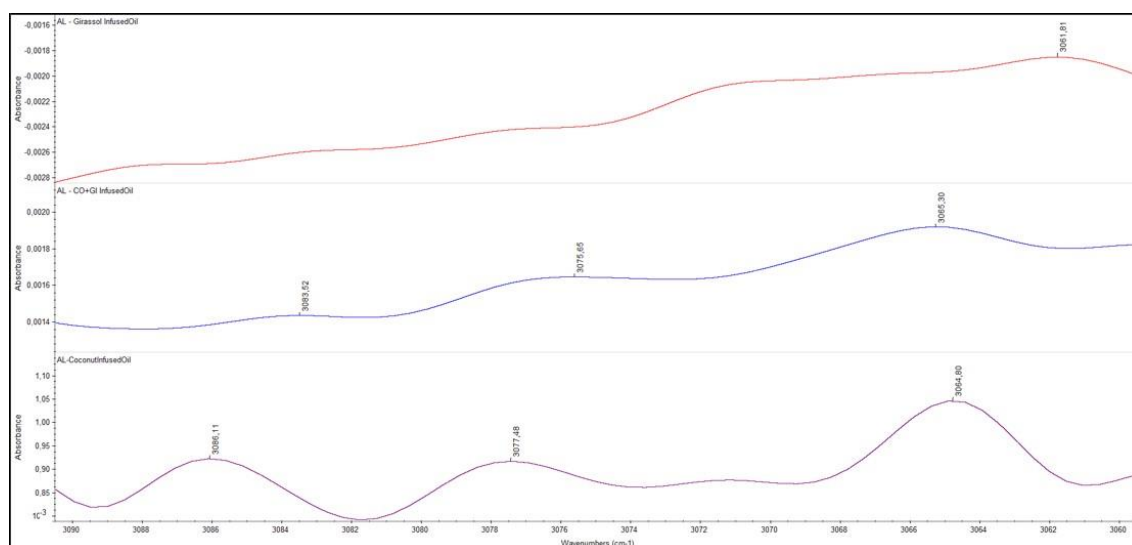


Figura G.4 – Análise comparativa do espectro FTIR-ATR de três óleos alimentares, na região espectral correspondente ao canabinóide CBD (3085-3060 cm⁻¹): óleo de coco alimentar (roxo), óleo de girassol alimentar (vermelho) e óleo de coco e girassol alimentar numa proporção de 1:1 (azul).

Anexo G5. Óleos alimentares na região espectral do canabinóide CBDA

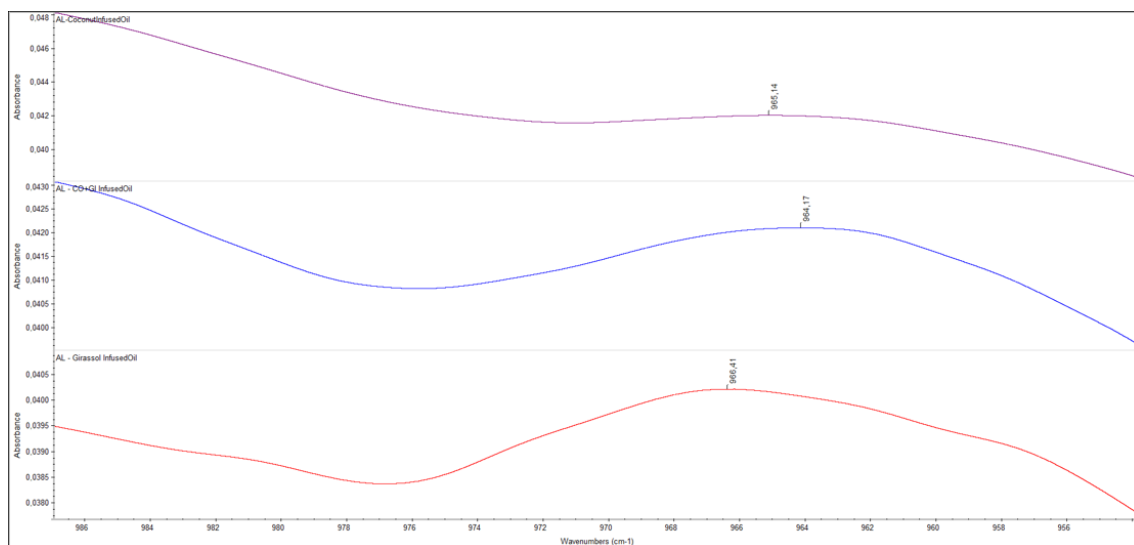


Figura G.5 - Análise comparativa do espectro FTIR-ATR de três óleos alimentares, na região espectral correspondente ao canabinóide CBDA (982-959 cm⁻¹): óleo de coco alimentar (roxo), óleo de girassol alimentar (vermelho) e óleo de coco e girassol alimentar numa proporção de 1:1 (azul).

Anexo G6. Óleo de coco dérmico

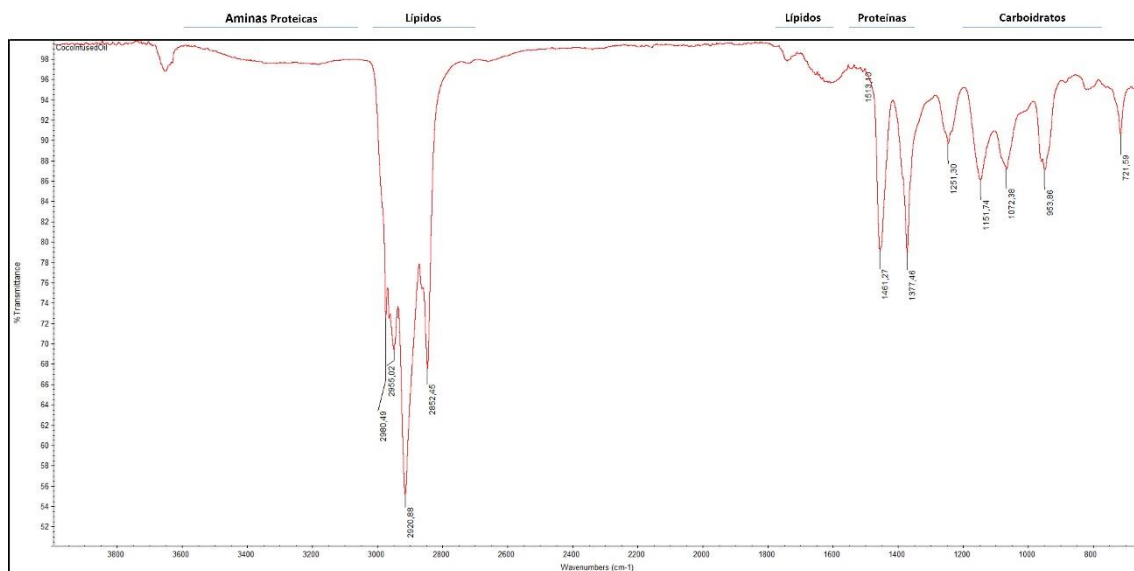


Figura G.6 – Espectro FTIR-ATR do óleo de coco dérmico incorporado com canabinóides proveniente da amostra B.

Anexo G7. Óleo mineral dérmico

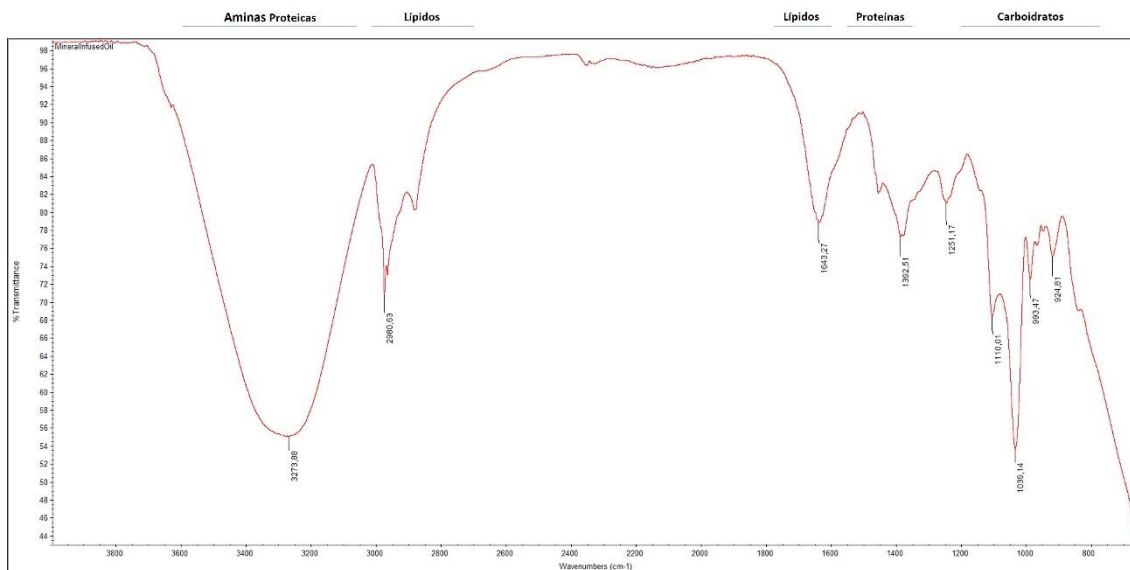


Figura G.7 – Espectro FTIR-ATR do óleo mineral dérmico incorporado com canabinóides provenientes da amostra B.

Anexo G8. Óleos dérmicos na região espectral do canabinóide CBD

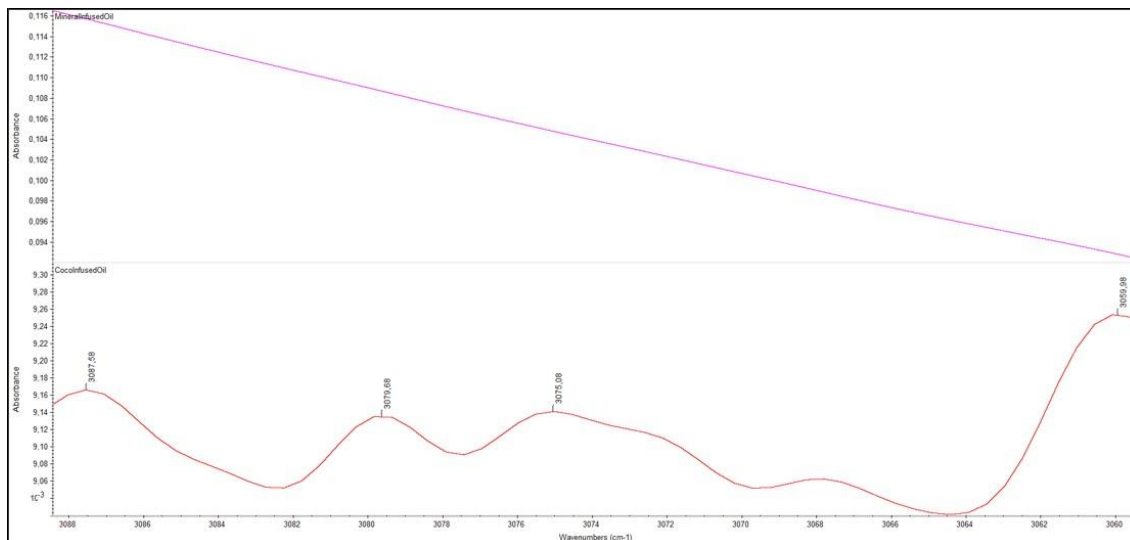


Figura G.8 - Análise comparativa do espectro FTIR-ATR dos dois óleos dérmicos, na região espectral correspondente ao canabinóide CBD (3085-3060 cm⁻¹): óleo de coco dérmico (vermelho) e óleo mineral dérmico (roxo).

Anexo G9. Óleos dérmicos na região espectral do canabinóide CBDA

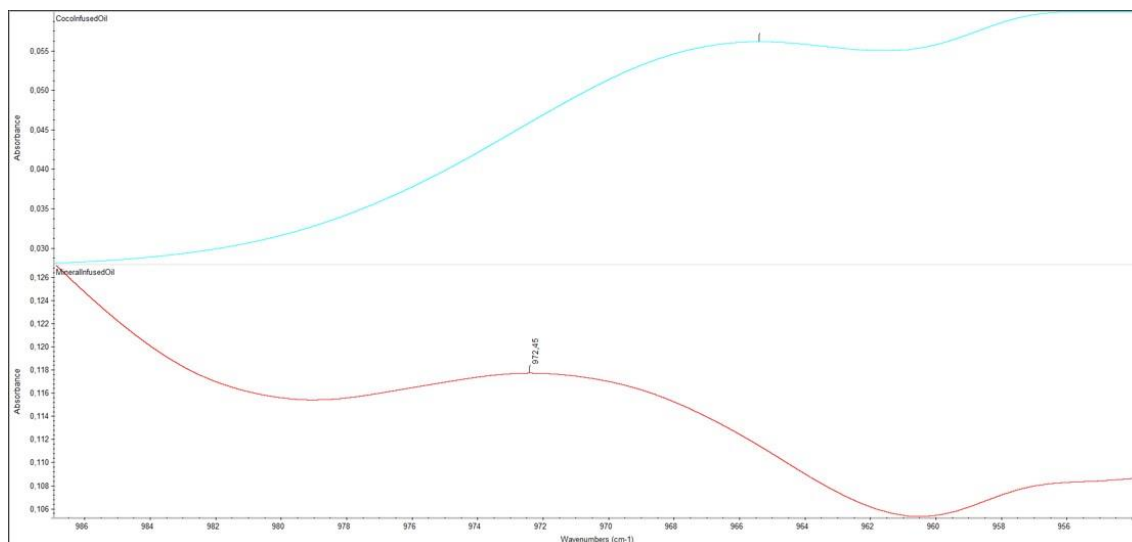


Figura G.9 - Análise comparativa do espectro FTIR-ATR dos dois óleos dérmicos, na região espectral correspondente ao canabinóide CBDA (982-959 cm^{-1}): óleo de coco dérmico (azul-claro) e óleo mineral dérmico (vermelho).