



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

NANOCARREADORES LIPÍDICOS APLICADOS À MOLÉCULA CANABIDIOL

Ízola Morais de Medeiros Ramalho

Natal - RN

2022

Ízola Morais de Medeiros Ramalho

NANOCARREADORES LIPÍDICOS APLICADOS À MOLÉCULA CANABIDIOL

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN como requisito para defesa do Doutorado em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Eryvaldo Sócrates Tabosa do Egito

Coorientador: Prof. Dr. Éverton do Nascimento Alencar

Natal - RN

2022

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
Sistema de Bibliotecas - SISBI
Catalogação de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial do Centro Ciências da Saúde - CCS

Ramalho, Ízola Morais de Medeiros.

Nanocarreadores lipídicos aplicados à molécula canabidiol /
Ízola Morais de Medeiros Ramalho. - 2023.
54f.: il.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do
Norte, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-graduação em
Ciências da Saúde. Natal, RN, 2023.

Orientador: Eryvaldo Sócrates Tabosa do Egito.

1. Canabidiol - Microemulsão - Tese. 2. Estabilidade - Tese.
3. Liofilização - Tese. 4. Revisão - Tese. 5. Via oral - Tese.
I. Egito, Eryvaldo Sócrates Tabosa do. II. Título.

RN/UF/BS-CCS

CDU 582.635.38



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Coordenador (a) do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde
Prof. Dr. Eryvaldo Sócrates Tabosa do Egito

Ízola Morais de Medeiros Ramalho

NANOCARREADORES LIPÍDICOS APLICADOS À MOLÉCULA CANABIDIOL

APROVADO EM: 19 de dezembro de 2022.

Banca examinadora

Presidente da Banca:

Prof. Dr. Eryvaldo Sócrates Tabosa do Egito – UFRN – Orientador

Membros da banca:

Prof. Dr. Éverton do Nascimento Alencar – UFRN – Coorientador

Prof. Dra. Ana Katherine da Silveira Gonçalves de Oliveira – UFRN

Prof. Dr. Aldo da Cunha Medeiros – UFRN

Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso – UnB

Prof. Dr. Henrique Rodrigues Marcelino – UFBA

RESUMO

O canabidiol (CBD) é um dos metabolitos especiais presente na *Cannabis sativa* que não causa os típicos efeitos alucinógenos apresentados pelo Delta-9-Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), mas que apresenta vários efeitos farmacológicos com aplicações de interesse terapêutico. Embora o CBD tenha um potencial clínico promissor, com destaque para sua utilização em certos distúrbios psiquiátricos e neurológicos, essa molécula apresenta limitações quando a sua baixíssima biodisponibilidade, alta lipofilicidade, instabilidade no pH gástrico e susceptibilidade ao metabolismo de primeira passagem. Tais características limitam o desenvolvimento de uma formulação para sua administração por uma via amplamente utilizada, segura, econômica, e confortável, como a via oral. Nesse contexto, o presente trabalho tem como objetivo desenvolver uma microemulsão (ME) para veiculação do CBD por via oral com embasamento teórico em uma revisão da literatura. Todos os estudos científicos relacionados ao desenvolvimento de sistemas avançados de liberação de fármacos contendo CBD que foram publicados até janeiro de 2020 e que atenderam aos critérios de inclusão foram revisados abordando as estratégias de desenvolvimento da formulação, suas limitações e perspectivas futuras em relação à proteção da propriedade intelectual. Concomitantemente, uma microemulsão contendo CBD (CBD-ME) foi desenvolvida e caracterizada quando ao aspecto macroscópico, pH, isotropia, condutividade, tensão superficial, distribuição de tamanho de gotícula e eficiência de incorporação. Além disso, a CBD-ME foi liofilizada e sua estabilidade em fluidos gástricos e intestinais simulados e ao longo do período de 90 dias também foram analisadas através de medidas de tamanho de gotícula e índice de polidispersão. Por conseguinte, um sistema microemulsionado contendo CBD para administração pela via oral e uma revisão da literatura foram obtidos. Os resultados mostraram que não houve diferenças significativas nos parâmetros avaliados na ME após a incorporação de aproximadamente 1,65 mg de CBD/ml de fase oleosa ($p > 0,05$). ME e CBD-ME se mostraram sistemas opticamente claros, homogêneos e transparentes, de coloração levemente amarelada, sem nenhum precipitado ou fenômeno de separação de fases. Além disso, eles se apresentaram escuros sob microscopia de luz polarizada (sem birrefringência) e tinham índices de refração de $1,3894 \pm 0,0001$ e $1,3879 \pm 0,0001$, respectivamente. ME e CBD-ME apresentaram pH de $6,2 \pm 0,07$ e $6,1 \pm 0,09$, respectivamente, considerados fisiologicamente aceitáveis para administração por via oral. A condutividade elétrica e a tensão superficial da ME e CBD-ME foram de 148 ± 22 e $140 \pm 16 \mu\text{S/cm}$ e $40,53 \pm 1,8$ e $41,98 \pm 2,1$ dines/cm, respectivamente. O tamanho médio das gotículas foi de $20 \pm 0,4$ nm com Pdl de $0,151 \pm 0,07$ e $22 \pm 0,6$ nm com Pdl de $0,127 \pm 0,08$ (valores de $p > 0,05$) para ME e CBD-ME, respectivamente. As médias de tamanho de gotículas e Pdl do ME e CBD-ME antes e após a liofilização não apresentaram alterações significativas após diluição e incubação nos fluidos gastrointestinais simulados ($p > 0,05$). A CBD-ME liofilizada e armazenada a 4°C exibiu a maior estabilidade com um tamanho de $21,4 \pm 0,4$, um Pdl de $0,205 \pm 0,003$ e uma eficiência de encapsulamento de $98,8 \pm 0,9\%$ após o final do período de 90 dias deste estudo. Portanto, nossos resultados apontam que a CBD-ME armazenada nestas condições é potencialmente adequado para uso como um sistema oral de liberação de CBD.

Palavras-chaves: Revisão; Microemulsão; Liofilização; Estabilidade; Canabidiol; Via oral; Fluidos gastrointestinais simulados.

ABSTRACT

Cannabidiol (CBD) is one of the special metabolites present in *Cannabis sativa* that does not cause the typical hallucinogenic effects shown by Delta-9-Tetrahydrocannabinol (Δ 9-THC); however, it has several pharmacological effects with applications of therapeutic interest. Although CBD has promising clinical potential, with emphasis on its use in certain psychiatric and neurological disorders, this molecule has limitations due to its very low bioavailability, high lipophilicity, instability in gastric pH and susceptibility to first-pass metabolism. Such characteristics limit the development of a formulation for its administration by a widely used, safe, economical, and comfortable route, such as the oral route. In this context, this work aims to develop a microemulsion system for CBD oral delivery with theoretical basis in a literature review. All scientific studies related to the development of advanced drug delivery systems containing CBD that were published up to January 2020 and that met the inclusion criteria were reviewed addressing formulation development strategies, their limitations, and future perspectives regarding protection of intellectual property. Simultaneously, a microemulsion containing CBD (CBD-ME) was developed and characterized in terms of macroscopic aspect, pH, isotropy, conductivity, surface tension, droplet size distribution and encapsulation efficiency. In addition, the microemulsion was lyophilized and its stability in simulated gastric and intestinal fluids and for 90 days were also analyzed through measurements of droplet size and polydispersity index. Therefore, a microemulsion system containing CBD for oral administration and a review of the literature were obtained. The results showed that there were no significant differences in the parameters evaluated in the ME after the incorporation of approximately 1.65 mg CBD/ml oil phase ($p > 0.05$). ME and CBD-ME were optically clear, homogeneous, and transparent systems, with a slightly yellowish color, without any precipitate or phenomenon of phase separation. In addition, they appeared dark under polarized light microscopy (no birefringence) and had refractive indices of 1.3894 ± 0.0001 and 1.3879 ± 0.0001 , respectively. ME and CBD-ME had a pH of 6.2 ± 0.07 and 6.1 ± 0.09 , respectively, considered physiologically acceptable for oral administration. The electrical conductivity and surface tension of ME and CBD-ME were 148 ± 22 and 140 ± 16 μ S/cm and 40.53 ± 1.8 and 41.98 ± 2.1 dynes/cm, respectively. The mean droplet size was 20 ± 0.4 nm with Pdl of 0.151 ± 0.07 and 22 ± 0.6 nm with Pdl of 0.127 ± 0.08 (p -values > 0.05) for ME and CBD-ME, respectively. Mean droplet size and Pdl of ME and CBD-ME before and after lyophilization did not show significant changes after dilution and incubation in simulated gastrointestinal fluids ($p > 0.05$). CBD-ME lyophilized and stored at 4°C exhibited the highest stability with a size of 21.4 ± 0.4 , a Pdl of 0.205 ± 0.003 and an encapsulation efficiency of $98.8 \pm 0.9\%$ after finishing of the 90-day period of this study. Therefore, our results indicate that CBD-ME stored under these conditions is potentially suitable for use as an oral CBD delivery system.

Keywords: Review; Microemulsion; Lyophilization; Stability; Cannabidiol; Oral Route; Simulated Gastrointestinal Fluids.

LISTA DE ABREVIações

Canabidiol (CBD)

Delta-9-Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC)

Eficiência de incorporação (EI)

Microemulsão contendo CBD (CBD-ME)

Microemulsões (ME)

Potencial hidrogeniônico (pH)

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Figure 1. Encapsulation efficiency of the microemulsion system at different concentrations of CBD

FIGURA 2 - Figure 2. Evaluation of physicochemical stability in simulated gastrointestinal fluids at 37 °C by measuring droplet size and polydispersity index of the microemulsion (ME) and the cannabidiol-loaded microemulsion (CBD-ME) before lyophilization and after lyophilization and resuspension (n=3).

FIGURA 3 - Figure 3. Evaluation of physicochemical stability by measuring droplet size and polydispersity index of the microemulsion (ME) and the cannabidiol-loaded microemulsion (CBD-ME) at 4 and 25 °C for 90 days (n=3).

FIGURA 4 - Figure 4. Evaluation of encapsulation efficiency the cannabidiol-loaded microemulsion (CBD-ME) stored at 4 and 25 °C (4 °C, Dark grey column; 25 °C Light grey column) for 90 days (n=3).

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Table 1: Droplet size and polydisperse index before and after the freeze-drying process (mean \pm SD).

SUMÁRIO

RESUMO	V
ABSTRACT	VI
LISTA DE ABREVIACÕES	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABELAS	VIII
SUMÁRIO	X
1. INTRODUÇÃO	11
2. JUSTIFICATIVA	13
3. OBJETIVOS	15
3.1. OBJETIVO GERAL.....	15
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
4. METODOLOGIA	16
4.1. REVISÃO DA LITERATURA.....	16
4.2. OBTENÇÃO DO SISTEMA MICROEMULSIONADO	16
4.3. LIOFILIZAÇÃO DA MICROEMULSÃO	17
4.4. CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA MICROEMULSIONADO	17
4.4.1. Aspecto macroscópico, avaliação de pH, isotropia, condutividade e análise de tensão superficial	17
4.4.2. Análise de distribuição de tamanho de gotícula	18
4.4.3. Desenvolvimento do método de doseamento espectrofotométrico ..	18
4.4.4. Doseamento e eficiência de incorporação.....	18
4.5. ESTABILIDADE DO SISTEMA MICROEMULSIONADO.....	19
4.5.1. Estabilidade em fluidos gástricos e intestinais simulados	19
4.5.2. Estabilidade ao longo do tempo	19
4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	20
5. ARTIGOS PRODUZIDOS	21
6. CONCLUSÕES	49
7. PERSPECTIVAS FUTURAS	50
REFERÊNCIAS	51
ANEXO	54
ANEXO 1 – Normas da revista <i>Pharmaceutics</i>	54

1. INTRODUÇÃO

A *Cannabis sativa* é uma planta que contém mais de 400 compostos, dos quais 66 são fitocanabinoides (1). Delta-9-Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) é o metabólito especial majoritário, sendo esse também o principal responsável pelos efeitos alucinógenos notados pelos usuários dessa planta que é uma das mais utilizadas no mundo (2). O canabidiol (CBD) é o segundo maior metabólito especial e, diferente do THC, não causa os típicos efeitos alucinógenos (1).

O CBD foi isolado a partir da *Cannabis sativa* em 1940 por Adams, Hunt e Clark nos EUA, e por Jacob e Todd no Reino Unido (3, 4). Sua estrutura química foi elucidada em 1963, e sua configuração completamente esclarecida em 1967 (5, 6). Em apenas pouco mais de meio século de pesquisas relacionadas ao CBD, vários efeitos farmacológicos da molécula foram encontrados, muitos dos quais com aplicações de interesse terapêutico (7).

Dentre as propriedades terapêuticas do CBD podemos destacar seus efeitos ansiolíticos em ensaios clínicos (7, 8), antipsicóticos em estudos *in vivo* (2, 9), antidepressivos em estudos *in vivo* (1, 2), reguladores dos ciclos do sono em ensaios clínicos (10), antiepiléptico em ensaios clínicos (11, 12), anti-inflamatório em estudos *in vivo* (13), e analgésico em estudos *in vivo* (14, 15), além de diminuir os sintomas do mal de Parkinson em ensaios clínicos (16). Assim, o CBD apresenta um potencial clínico promissor, com destaque para sua utilização em certos distúrbios psiquiátricos e neurológicos. Entretanto, essa molécula apresenta limitações quando a sua baixíssima biodisponibilidade, alta lipofilicidade, instabilidade no pH gástrico e susceptibilidade ao metabolismo de primeira passagem (17-21). Tais características tornam o desenvolvimento de uma formulação farmacêutica para a administração do CBD por uma via amplamente utilizada, segura, econômica, e confortável, como a via oral, um desafio. Portanto, uma forma farmacêutica capaz de superar as limitações impostas pela molécula para administração por via oral se faz necessária.

O desenvolvimento de nanocarreadores lipídicos visando a veiculação do CBD é um processo que continua crescendo na pesquisa farmacêutica devido as diversas vantagens destes sistemas, como: proteção do fármaco contra instabilidades no organismo, redução da toxicidade como consequência da vetorização de fármacos à alvos específicos e menor exposição aos tecidos saudáveis, liberação controlada de

fármacos, possibilidade de incorporação de outras substâncias e adjuvantes hidrofílicos e lipofílicos, diminuição da dose e número de administrações e por fim, maior adesão do paciente à terapia (22).

Diversos sistemas de liberação de fármacos têm sido explorados visando a administração do CBD (23). Contudo, apesar das microemulsões (ME) exercerem um papel de destaque como um sistema de liberação de fármacos e apresentarem um potencial relevante de aplicabilidade na área farmacêutica, estas ainda não foram estudadas como veículo para o CBD. As ME são capazes de melhorar a eficácia através de propriedades como o aumento na solubilidade e proteção dos fármacos devido ao seu tamanho nanométrico das gotículas e grande área de interface, melhorando o perfil de dissolução e aumentando a biodisponibilidade de fármacos (24-26). Portanto, tais propriedades conferem às ME a capacidade de incorporar moléculas insolúveis que dificilmente seriam incorporadas em formulações convencionais, como o CBD.

Neste contexto, o presente trabalho visou melhorar a absorção por via oral do CBD através do desenvolvimento de uma ME contendo CBD (CBD-ME) para sua administração com embasamento teórico em uma revisão da literatura dos diversos sistemas de liberação de fármacos já estudados para veiculação do CBD.

2. JUSTIFICATIVA

Apesar do promissor uso terapêutico dos metabolitos da *Cannabis sativa*, a proibição do uso desses metabolitos em diversos países limita a realização de pesquisas científicas dificultando a elucidação dos seus mecanismos de ação e interação com outros fármacos, a realização dos estudos de segurança em longo prazo, a determinação das propriedades farmacocinéticas e o desenvolvimento de formas farmacêuticas (27). Outro fator limitante para o desenvolvimento de formulações farmacêuticas para o CBD é o fato desta ser uma substância instável, lipofílica e significativamente suscetível ao efeito de primeira passagem, sendo assim classificada na classe II de fármacos de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutico e pelo Sistema de Classificação Biofarmacêutica pela Disposição de Fármacos (28-32).

Dentre as diversas vias exploradas para administração dos sistemas de liberação contendo o CBD, a via oral é considerada uma das vias mais atrativas e preferíveis (23). Entretanto, esta via apresenta barreiras físicas e bioquímicas para a absorção de fármacos resultando em uma baixa biodisponibilidade e eficácia limitada de formulações administradas oralmente (33, 34). Assim, o desenvolvimento de formas farmacêuticas para veiculação do CBD necessita sobrepor as limitações impostas pelas características físico-químicas do CBD garantindo um perfil farmacocinético satisfatório após administração oral (35).

Uma das alternativas utilizadas para aumentar a biodisponibilidade de fármacos lipofílicos ou fármacos classe II, como o CBD, é a sua incorporação em formulações lipídicas (23, 35-37). Dentre as formulações lipídicas, os nanocarreadores lipídicos como as ME, nanopartículas lipídicas têm se destacado como sistemas carreadores de fármacos com grande potencial de aplicabilidade na área farmacêutica, pois são capazes de melhorar a eficácia através de propriedades como o aumento na solubilidade e proteção dos fármacos, tamanho nanométrico das gotículas, baixa tensão interfacial, grande área de interface, melhora do perfil de dissolução, liberação controlada de fármacos e aumento da biodisponibilidade (25, 26).

Sabendo que as dificuldades para veiculação do CBD em formas farmacêuticas orais são um obstáculo na investigação de novas aplicações terapêuticas dessa molécula, esse estudo se propôs a realizar uma revisão teórica dos diversos sistemas de liberação de fármacos estudados para veiculação do CBD, possibilitando o

desenvolvimento de uma formulação que permita a veiculação adequada do CBD para sua aplicação em pesquisas farmacológicas de distúrbios psiquiátricos e neurológicos, com futura aplicação clínica.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Melhorar a absorção por via oral do CBD através do desenvolvimento da CBD-ME para administração oral com embasamento teórico em uma revisão da literatura dos diversos sistemas de liberação de fármacos já estudados para veiculação do CBD.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Revisar a literatura acadêmica para estruturação conceitual da pesquisa;
- Desenvolver um sistema microemulsionado para administração via oral do CBD;
- Desenvolver metodologia para quantificação do CBD na ME;
- Realizar a caracterização físico-química do sistema obtido;
- Avaliar a estabilidade físico-química e em fluidos fisiológicos simulados desses sistemas;
- Avaliar a estabilidade da ME antes e após liofilização;

4. METODOLOGIA

4.1. REVISÃO DA LITERATURA

Todos os estudos científicos relacionados ao desenvolvimento de sistemas avançados de liberação de fármacos contendo CBD que foram publicados até janeiro de 2020 e que atenderam aos critérios de inclusão foram revisados. Para isso, uma busca foi conduzida nas bases de dados 'Web of Science', 'PubMed' e 'Science Direct' com as seguintes palavras-chave: 'Cannabidiol' e 'formulation' ou 'nanoparticles'; 'microparticles'; 'microemulsion'; 'nanoemulsions'; 'liposomes'; 'nanosystems'; 'nanocarrier'; 'cyclodextrin'; 'drug delivery'; 'drug delivery systems'; 'drug targeting'; 'nanotechnology'; 'nanomedicine'; e 'nanostructures'. Estudos que objetivassem (i) desenvolver um sistema de liberação avançado contendo CBD e (ii) utilizar esse sistema para aplicações medicinais foram incluídos na revisão. Os estudos que (i) não relataram dados experimentais e (ii) estavam em outros idiomas que não o inglês foram excluídos. Além disso, foram abordadas as estratégias de desenvolvimento das formulações, suas limitações e perspectivas futuras em relação à proteção da propriedade intelectual.

Várias abordagens tecnológicas foram utilizadas no desenvolvimento de sistemas de liberação contendo CBD que foram revisados, os quais foram categorizados de acordo com os sistemas estudados em sistemas com base lipídica, sistemas poliméricos microparticulados, complexos de inclusão e outros sistemas. Mais da metade dos estudos relacionados ao desenvolvimento de sistemas de liberação contendo CBD estão focados no desenvolvimento de sistemas lipídicos, dentre os quais estão as nanopartículas lipídicas e os sistemas vesiculares. A este respeito, várias abordagens farmacêuticas aplicadas para desenvolver estratégias de formulação para a liberação de CBD foram discutidas e evidenciaram que apesar da relevância das ME como um sistema de liberação de fármacos, seu potencial ainda não foi explorado como veículo para o CBD.

4.2. OBTENÇÃO DO SISTEMA MICROEMULSIONADO

Visando a obter ME, o método de formação espontânea por agitação magnética foi utilizado após adaptação da metodologia de desenvolvimento da ME previamente desenvolvida pelo grupo de pesquisa (38). Inicialmente, o Lipoid® S100 (6,3%) foi disperso em etanol sob agitação magnética. Após a dispersão completa do Lipoid® S100,

Miglyol® 812 N (11%) foi adicionado, constituindo a fase oleosa. O Tween® 80 (14,7%) foi dissolvido em água purificada (68%) sob agitação magnética, constituindo a fase aquosa. Em seguida, a fase aquosa foi vertida na fase oleosa sob agitação magnética e aquecida a 70 °C até a formação da ME e evaporação do etanol. Por fim, a ME foi resfriada até 25 °C sob agitação magnética e teve seu volume final ajustado pela adição de água ultrapura. Para a incorporação do CBD (> 90.5% (-)-trans CBD, <0.01% TCH, BSPG/Trigal Pharm, Sandwich, Kent, United Kingdom), esse foi adicionado à ME previamente formulada sob agitação magnética durante 12 horas. As formulações foram preparadas em volumes de 10 a 100ml de acordo com a necessidade das análises a serem realizadas.

4.3. LIOFILIZAÇÃO DA MICROEMULSÃO

Amostras da ME e CBD-ME foram liofilizados seguindo o método de liofilização previamente otimizado para ME (39). Inicialmente, o crioprotetor, maltose 5% (p/p), foi adicionado à formulação final. Em seguida, alíquotas foram colocadas em criotubos e congeladas a -80 °C em ultracongelador Glacier NU-9438 ULT Freezer (NuAire, Inc., MN, EUA) por 24 h. Finalmente, as formulações foram liofilizadas utilizando um liofilizador Christ Alpha 1-2 LD a 0,0005 mBar, -80 °C, por 24h (Martin Christ efiertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Germany). Após o processo de liofilização, as ME foram reconstituídas para análise adicionando-se a mesma quantidade de água ultrapura perdida durante o processo, seguido de aquecimento das formulações até 70 °C e agitação em vortex por 10 min. Após a reconstituição, as formulações foram caracterizadas quanto ao diâmetro hidrodinâmico das gotículas, a eficiência de incorporação e a estabilidade da formulação.

4.4. CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA MICROEMULSIONADO

4.4.1. Aspecto macroscópico, avaliação de potencial hidrogeniônico, isotropia, condutividade e análise de tensão superficial

As médias dos índices de condutividade, potencial hidrogeniônico (pH) e refração foram feitas usando um medidor de condutividade pré-calibrado MC 226 (Toledo/Mettler, Brasil), um medidor de pH (modelo HI 221, instrumentos Hanna, Brasil) e um refratômetro Abbe (Analytik Jena AG, Alemanha), respectivamente.

O comportamento isotrópico do sistema foi avaliado por meio de microscopia de luz com polarização cruzada (BX-50, Olympus Start, Tóquio, Japão). Uma gota da amostra foi colocada em uma lâmina de vidro, que foi coberta com uma lamínula e então examinada em um microscópio de luz polarizada.

O ensaio de tensão superficial foi realizado em tensiômetro SensaDyne (modelo QC-6000, Research Corp., EUA) utilizando a técnica de bolha de pressão máxima, utilizando nitrogênio como fase gasosa (40). O tensiômetro foi conectado a um computador e controlado pelo software SensaDyne Tensiometer, versão 1.21.

4.4.2. Análise de distribuição de tamanho de gotícula

O diâmetro hidrodinâmico das gotículas das formulações (n=3) e o índice de polidispersão foram avaliados por espalhamento dinâmico de luz usando um Zetasizer® Nano ZS (Malvern PCS Instruments, Reino Unido) com ângulo fixo de 173 °C. Amostras da ME foram previamente diluídas em água ultrapura (1:40 v/v). Cada amostra foi equilibrada antes do experimento por 60 segundos e todas as análises foram conduzidas em triplicata à temperatura ambiente (25 °C).

4.4.3. Desenvolvimento do método de doseamento espectrofotométrico

A curva analítica espectrofotométrica foi desenvolvida a partir de uma solução estoque de CBD dissolvido em metanol (5 mg/mL) (n = 3). Para determinar o comprimento de onda de absorção máximo do espectro de CBD, uma varredura de espectroscopia UV-Vis (Biochrom®, Libra® S32, Cambourne, Reino Unido) desta solução foi conduzida na faixa de 200–500 nm. Posteriormente, a solução estoque foi diluída em metanol para obter soluções de amostra na faixa de concentrações de 100-400 µg/mL. Cada solução foi analisada por espectroscopia UV-Vis a 274 nm (n = 3). Em seguida, a curva analítica foi obtida por regressão linear a partir das concentrações e absorbâncias de cada solução amostral.

4.4.4. Doseamento e eficiência de incorporação

Para doseamento do CBD, alíquotas de 50 µL da CBD-ME foram diluídas em metanol (1:59 v/v) e analisadas por espectroscopia UV-Vis a 274 nm (n = 3) utilizando a curva analítica previamente descrita. Em seguida, com o objetivo de determinar a eficiência de incorporação após a adição de diferentes concentrações de CBD na ME

(2,5 a 25 mg/ml), cada formulação foi centrifugada (Gusto Mini Centrifuge, Fisherbrand®, Chicago, Illinois, EUA) a 9.000 g por 10 minutos e tiveram a concentração de CBD no sobrenadante determinada seguindo a mesma metodologia de doseamento (41). Assim, a eficiência de incorporação (EI) foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$EI = \frac{[CBD]_{DC}}{[CBD]_{AC}} \times 100,$$

Onde: EI, Eficiência de incorporação em porcentagem. [CBD] DC: Concentração de CBD no sobrenadante da ME depois da centrifugação. [CBD] AC: Concentração de CBD na ME antes da centrifugação.

4.5. ESTABILIDADE DO SISTEMA MICROEMULSIONADO

4.5.1. Estabilidade física em fluidos gástricos e intestinais simulados

Para avaliar a estabilidade da ME e CBD-ME após administração oral, foram preparados fluidos gástricos simulados (FGS, pH 1,2 e 4) e intestinais (FIS, pH 6,8) sem enzimas de acordo com a Farmacopeia Americana. Amostras da ME e CBD-ME (n=3) antes e após a liofilização foram incubados em frascos com fluidos simulados a 37 °C em agitador orbital (TE-420, Tecnal®, São Paulo, SP, Brasil) a 100 RPM. As formulações liofilizadas foram reconstituídas antes da incubação. As amostras foram coletadas periodicamente por até 2 horas quando incubadas em FGS (0,2 mL fluido/1mL ME) ou por 6 horas quando incubadas em FIS (1,2 mL fluido/1mL ME) para análises de distribuição de tamanho de gotícula de acordo com os métodos descritos na seção 4.3.2. O tempo de leitura zero (T0) foi adotado como a diluição de ME nos fluidos sem incubação.

4.5.2. Estabilidade físico-química ao longo do tempo

A estabilidade da ME e CBD-ME antes e após a liofilização à temperatura ambiente (25 °C) e sob refrigeração (4 °C) foram monitoradas por análise da distribuição de tamanho de gotícula, doseamento e eficiência de incorporação de acordo com os métodos descritos nas seções 4.3.2 e 4.3.4, respectivamente. As formulações liofilizadas foram reconstituídas antes das medidas de tamanho de gotícula e índice de polidispersão. Este estudo foi realizado em triplicata ao longo de 90 dias.

4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas no software Prism 5 (GraphPad, Califórnia, EUA). Diferenças diferentes foram avaliadas por meio de análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Bonferroni, em que valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Os resultados serão expressos em termos do valor médio seguido do desvio padrão da média.

5. ARTIGOS PRODUZIDOS

Artigo 1 (Publicado)

Título: Current trends on cannabidiol delivery systems: where are we and where are we going?

DOI: 10.1080/17425247.2021.1952978

Periódico: *Expert Opinion Drug Delivery*

Data da publicação: 19/07/2021

Fator de impacto: 6.648 (2020-2021)

Qualis A1 na área de medicina II

Artigo 2 (Para submissão)

Título: Lyophilized Oil-Water Microemulsion as an Advanced Oral Drug Delivery System for Cannabidiol

DOI: 10.3390/xxxxx

Periódico: *Pharmaceutics*

Data da publicação: __/__/____

Fator de impacto: 6.32 (2020-2021)

Qualis B1 na área de Ciências biológicas I

ARTIGO 1

Current trends on cannabidiol delivery systems: where are we and where are we going?

REVIEW



Current trends on cannabidiol delivery systems: where are we and where are we going?

Ízola Moraes de Medeiros Ramalho ^a, Daniel Torres Pereira ^a, Giovanna Brunelly Lima Galvão ^b,
Danielle Teixeira Freire ^b, Lucas Amaral-Machado ^{a,b}, Éverton do Nascimento Alencar ^{b,c}
and Eryvaldo Socrates Tabosa do Egito ^{a,b,c}

^aGraduate Program in Health Sciences (Ppgcsa), Federal University of Rio Grande Do Norte (UFRN), Natal, Brazil; ^bDepartment of Pharmacy, Federal University of Rio Grande Do Norte (UFRN), Natal, Brazil; ^cGraduate Program in Pharmaceutical Nanotechnology (Ppgnanofarma), Federal University of Rio Grande Do Norte (UFRN), Natal, Brazil

ABSTRACT

Introduction: Cannabidiol (CBD), a phytocannabinoid from *Cannabis sativa*, has several therapeutic properties. However, its high lipophilicity, metabolism, and instability impair its bioavailability and translational use in clinical settings. Several advanced drug delivery systems (ADDs) have been evaluated as CBD carriers to overcome these drawbacks. These systems can improve the CBD dissolution profile, protect it against metabolism, and produce a site-specific release, increasing its bioavailability and making CBD administration clinically effective.

Areas covered: This review summarizes scientific reports on cannabidiol advanced delivery systems (CBD-ADSs) that have been (i) developed, and (ii) applied therapeutically; reports published in the main scientific databases until January 2020 were included. Studies without experimental data and/or published in languages other than English were excluded. Moreover, pharmaceutical technology tools in CBD therapeutic use have been discussed, emphasizing the clinical translation of CBD carrier use.

Expert opinion: Studies reporting CBD-ADS use for medicinal applications were reviewed and revealed multifaceted systems that can overcome the physicochemical drawbacks of CBD and improve its biological activities. Therefore, researchers concluded that the developed CBD-ADS can be used as an alternative to traditional formulations because they show comparable or superior effectiveness in treatment protocols. Although several criteria remain to be met, our findings emphasize the potential of CBD-ADSs for translational therapeutics, particularly for neurological disorders.

ARTICLE HISTORY

Received 21 February 2021
Accepted 5 July 2021

KEYWORDS

Nanoliposomes;
ethosomes; microparticles;
inclusion complex;
conjugates; nanoparticles;
nanocrystals

1. Introduction

Cannabidiol (CBD), the second-largest component of *Cannabis sativa* and the most promising phytocannabinoid, has been widely explored because of its numerous therapeutic properties (such as anxiolytic, antioxidant, neuroprotective, antitumor, antiemetic, antidepressant, antipsychotic, anti-inflammatory, and analgesic properties). *C. sativa* has been used for centuries for both recreational and medicinal purposes. However, the utility of CBD in medical practice is still broadly debated.

Scientific data regarding the pharmaceutical potential of CBD have increased over the years. Several studies have reported that CBD is a safe compound because of its low toxicity, high tolerability, non-hallucinogenic effects, and lack of side effects, even after chronic administration of high doses [1–3]. Moreover, legislation has changed due to its widespread use, and worldwide regulatory agencies have recently addressed CBD use regulation as a medicine, requiring licenses that assure safety, efficacy, and quality standards to safeguard public health. Therefore, public and scientific community opinions concerning CBD effectiveness in various medical conditions have been amended, and various CBD dosage forms have been developed [4].

In this regard, several studies have sought to elucidate the physical, chemical, and biopharmaceutical characteristics of CBD. CBD is reported to be a small, water-insoluble (water solubility = 12.6 mg/L), and lipophilic molecule (log P = 6.3). It is unstable in gastric pH, highly susceptible to first-pass metabolism, and is insignificantly susceptible to renal excretion [5–7]. Therefore, CBD is classified as a Class II drug due to its low water solubility and high permeability by both the Biopharmaceutical Classification System and the Biopharmaceutical Drug Classification System. The Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System also classifies CBD as a Class II compound because of its low water solubility and metabolic elimination [7–9]. Due to the above-mentioned properties, CBD shows low and unpredictable oral bioavailability that further complicates formulation development [6,10].

Currently, Sativex® (nabiximols), a cannabis extract formulated as a buccal spray loaded with CBD and delta-9 tetrahydrocannabinol (THC) (1:1), although not approved in the United States, has regulatory approval in more than 25 countries for the treatment of spasticity (muscle stiffness/spasm) related to multiple sclerosis [11]. In 2018, a pharmaceutical-

CONTACT Eryvaldo Socrates Tabosa do Egito  socratesegito@gmail.com; socrates@ufrnet.br  Graduate Program in Health Sciences (Ppgcsa), Federal University of Rio Grande Do Norte (UFRN), Natal, Brazil

© 2021 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

ARTIGO 2
Lyophilized Oil-Water Microemulsion as an Advanced Oral Drug Delivery System for
Cannabidiol

Lyophilized Oil-Water Microemulsion as an Advanced Oral Drug Delivery System for Cannabidiol

Ízola Morais de Medeiros Ramalho ¹, Éverton do Nascimento Alencar ² and Eryvaldo Socrates Tabosa do Egito ^{1,2,*}

¹ Graduate Program in Health Sciences (PPgCSA), Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, RN, Brazil; izola.ramalho@hotmail.com

² Department of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, RN, Brazil; everton_alencar@hotmail.com

* Correspondence: socratesegito@gmail.com; Tel.: +55 84 994318816

Abstract: Cannabidiol (CBD) has a significant pharmacological potential limited by its high lipophilicity and low erratic oral bioavailability. Microemulsions have showed significant applications for improving the oral bioavailability of hydrophobic drugs, such as CBD. Therefore, this study aimed to develop a CBD microemulsion (CBD-ME) expected to improve the oral bioavailability of CBD. The microemulsion was formulated using Lipoid® S100 and Tween® 80 as surfactants, Miglyol® 812 N as the oil phase and ethanol as a co-solvent. The obtained systems were freeze dried and physico-chemically characterized regarding their macroscopic aspect, pH, isotropy, conductivity, surface tension, and size distribution. Additionally, the encapsulation efficiency, stability in simulated gastrointestinal fluids and stability over time in different storage conditions were accomplished. Lyophilized ME and CBD-ME stored at 4°C exhibited the most outstanding stability over the 90 days period of this study. Due to the physico-chemical characteristics of CBD-ME, high encapsulation efficiency, stability in gastrointestinal conditions, the improvement of the stability of the formulation by lyophilization, this system is potentially suitable for use as an oral advanced CBD delivery system.

Keywords: microemulsion; lyophilization; stability; cannabidiol; oral route; simulated gastrointestinal fluids

Citation: Ramalho, I.M.M.; Alencar, E.N.; Egito, E.S.T. Lyophilized Oil-Water Microemulsion as an Advanced Oral Drug Delivery System for Cannabidiol. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor: Firstname
Lastname

Received: date

Accepted: date

Published: date

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Cannabidiol (CBD) is the second most abundant phytocannabinoid from the *Cannabis sativa* plant. Since CBD was first synthesized [1,2] and isolated [3], an exponential interest in its therapeutic potential began to emerge [4]. Various studies have suggested CBD pharmacological potential as anxiolytic, antioxidant, neuroprotective, antitumor, antiemetic, antidepressant, antipsychotic, anti-inflammatory, analgesic, antiarthritic, and anticonvulsant, showing beneficial effects in the management of several neurological disorders such as epilepsy, multiple sclerosis, Parkinson's disease, and Alzheimer's disease [5-8]. Moreover, CBD has been reported to be safe, well-tolerated, and non-hallucinogenic. Despite the versatile pharmacological profile and safety of CBD, it has a low and highly variable oral bioavailability due to its low water solubility (12.6 mg/L), high lipophilicity (log P = 6.3), instability in gastric pH, and high susceptibility to first-pass metabolism and renal excretion [9-11].

6. CONCLUSÕES

O conjunto de tarefas realizados nessa tese permitiu concluir que:

- O desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos adequados para o CBD é necessário para que todo o seu potencial farmacológico possa ser utilizado na prática clínica de acordo com a resultados obtidos através da revisão da literatura.
- O uso de tecnologia para desenvolver formulações contendo CBD podem mudar completamente o cenário terapêutico.
- Existe a possibilidade de diminuir o regime posológico em distúrbios neurológicos, melhorando a segurança e eficácia terapêutica do CBD, e diminuindo seus efeitos colaterais, impactando assim a saúde de milhares de pacientes.
- A ME contendo CBD foi desenvolvida eficientemente por formação espontânea utilizando agitação magnética com características físico-químicas compatíveis com a molécula e a via de administração.
- A ME foi capaz de incorporar o CBD de forma eficiente conforme analisado através da determinação da eficiência de incorporação utilizando o método de quantificação desenvolvido.
- O método de liofilização utilizando a maltose como crioprotetor se mostrou eficiente, permitindo a reconstituição das ME sem alterações significativas do tamanho de gotícula e Pdl.
- O sistema microemulsionado desenvolvido com ou sem CBD incorporado se mostrou estável fluidos gástricos e intestinais simulados antes e após a liofilização. Além disso, esse sistema
- O sistema microemulsionado desenvolvido com ou sem CBD incorporado após a liofilização e armazenado a 4°C mostrou a estabilidade mais notável durante o período de 90 dias deste estudo.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Diante dos resultados obtidos e visando explorar a aplicabilidade clínica da ME contendo CBD, o grupo de pesquisa pretende aprimorar as tecnologias de fabricação em escala dessa formulação, avaliar a segurança e eficácia das formulações através de estudos de toxicidade, e investigar no uso clínico dessa formulação como terapia em neuro-distúrbios. A possibilidade de diminuir o regime de dosagem de CBD em distúrbios neurológicos através do uso da CBD-ME, melhorando sua segurança e eficácia terapêutica e diminuindo seus efeitos colaterais impacta a saúde de milhares de pacientes. Portanto, o atual panorama da pesquisa enfatiza o potencial da CBD-ME e direciona para o estudo de seus efeitos relacionados a melhora de sintomas da doença de Parkinson, Alzheimer, autismo, esquizofrenia e distúrbios do sono, como também para sua aplicação no tratamento da ansiedade consequente a dor crônica e diabetes. Assim, esse progresso permitirá a transposição de formulações contendo CBD da bancada para a indústria e para o nível de aplicação clínica, fornecendo informações mais robustas para o direcionamento do desenvolvimento da CBD-ME. Certamente estamos apenas no estágio inicial de desenvolvimento indicando que essa abordagem atraente para a veiculação de CBD não apresenta um desfecho definitivo e deve ser fortemente encorajada.

REFERÊNCIAS

1. Schier ARdM, Ribeiro NPdO, Coutinho DS, Machado S, Arias-Carrión O, Crippa JA, et al. Antidepressant-like and anxiolytic-like effects of cannabidiol: a chemical compound of *Cannabis sativa*. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2014;13(6):953-60.
2. Breuer A, Haj CG, Fogaca MV, Gomes FV, Silva NR, Pedrazzi JF, et al. Fluorinated Cannabidiol Derivatives: Enhancement of Activity in Mice Models Predictive of Anxiolytic, Antidepressant and Antipsychotic Effects. *PLoS One*. 2016;11(7):e0158779.
3. Adams R, Hunt M, Clark JH. Structure of Cannabidiol, a Product Isolated from the Marijuana Extract of Minnesota Wild Hemp. I. *Journal of the American Chemical Society*. 1940;62(1):196-200.
4. Jacob A, Todd AR. *Cannabis indica*. Part II. Isolation of cannabidiol from Egyptian hashish. Observations on the structure of cannabinol. *J Chem Soc*. 1940(0):649-53.
5. Mechoulam RF, Gaoni Y. The absolute configuration of delta-1-tetrahydrocannabinol, the major active constituent of hashish. *Tetrahedron Lett*. 1967;12(0040-4039 (Print)):1109-11.
6. Mechoulam RF, Shvo Y. Hashish. I. The structure of cannabidiol. *Tetrahedron*. 1963;19(12):2073-8.
7. Zuardi AW, Rodrigues NP, Silva AL, Bernardo SA, Hallak JEC, Guimaraes FS, et al. Inverted U-shaped dose-response curve of the anxiolytic effect of cannabidiol during public speaking in real life. *Front Pharmacol*. 2017;8(2017):259.
8. Crippa JA, Zuardi AW, Hallak JE. Therapeutical use of the cannabinoids in psychiatry. *Braz J Psychiatry*. 2010;32(1):S56-66.
9. Zuardi AW, Rodrigues JF, Cunha JM. Effects of cannabidiol in animal models predictive of antipsychotic activity. *Psychopharmacology (Berl)*. 1991;104(2):260-4.
10. Chagas MH, Eckeli AL, Zuardi AW, Pena-Pereira MA, Sobreira-Neto MA, Sobreira ET, et al. Cannabidiol can improve complex sleep-related behaviours associated with rapid eye movement sleep behaviour disorder in Parkinson's disease patients: a case series. *J Clin Pharm Ther*. 2014;39(5):564-6.
11. Devinsky O, Marsh E, Friedman D, Thiele E, Laux L, Sullivan J, et al. Cannabidiol in patients with treatment-resistant epilepsy: an open-label interventional trial. *Lancet Neurol*. 2016;15(3):270-8.
12. Crippa JAS, Crippa ACS, Hallak JEC, Martín-Santos R, Zuardi AW. Δ^9 -THC Intoxication by Cannabidiol-Enriched Cannabis Extract in Two Children with Refractory Epilepsy: Full Remission after Switching to Purified Cannabidiol. *Front Pharmacol*. 2016;7:359.
13. Vuolo F, Petronilho F, Sonai B, Ritter C, Hallak JE, Zuardi AW, et al. Evaluation of Serum Cytokines Levels and the Role of Cannabidiol Treatment in Animal Model of Asthma. *Mediators Inflamm*. 2015;2015(1466-1861 (Electronic)):538670.
14. Boychuk DG, Goddard G, Mauro G, Orellana MF. The effectiveness of cannabinoids in the management of chronic nonmalignant neuropathic pain: a systematic review. *J Oral Facial Pain Headache*. 2015;29(1):7-14.
15. Genaro K, Fabris D, Arantes ALF, Zuardi AW, Crippa JAS, Prado WA. Cannabidiol Is a Potential Therapeutic for the Affective-Motivational Dimension of Incision Pain in Rats. *Front Pharmacol*. 2017;8(1663-9812 (Print)):391.

16. Chagas MH, Zuardi AW, Tumas V, Pena-Pereira MA, Sobreira ET, Bergamaschi MM, et al. Effects of cannabidiol in the treatment of patients with Parkinson's disease: an exploratory double-blind trial. *J Psychopharmacol*. 2014;28(11):1088-98.
17. Franco V, Gershkovich P, Perucca E, Bialer M. The Interplay Between Liver First-Pass Effect and Lymphatic Absorption of Cannabidiol and Its Implications for Cannabidiol Oral Formulations. *Clin Pharmacokinet*. 2020;59:1493-500.
18. Eisenberg E, Ogintz M, Almog S. The pharmacokinetics, efficacy, safety, and ease of use of a novel portable metered-dose cannabis inhaler in patients with chronic neuropathic pain: a phase 1a study. *J Pain Palliat Care Pharmacother*. 2014;28(3):216-25.
19. Grotenhermen F. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids. *Clin Pharmacokinet*. 2003;42(0312-5963 (Print)):327-60.
20. Mechoulam R, Hanus L. Cannabidiol: an overview of some chemical and pharmacological aspects. Part I: chemical aspects. *Chem Phys Lipids*. 2002;121(1-2):35-43.
21. Zgair A, Wong JC, Lee JB, Mistry J, Sivak O, Wasan KM, et al. Dietary fats and pharmaceutical lipid excipients increase systemic exposure to orally administered cannabis and cannabis-based medicines. *Am J Transl Res*. 2016;8(8):3448-59.
22. Gordillo-Galeano A, Mora-Huertas CE. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: A review emphasizing on particle structure and drug release. *Eur J Pharm Biopharm*. 2018;133(1873-3441 (Electronic)):285-308.
23. Ramalho ÍMM, Pereira DT, Galvão GBL, Freire DT, Amaral-Machado L, Alencar ÉN, et al. Current trends on cannabidiol delivery systems: where are we and where are we going? *Expert Opin Drug Deliv*. 2021;18(11):1577-87.
24. Cavalcanti AL, Reis MY, Silva GC, Ramalho Í M, Guimarães GP, Silva JA, et al. Microemulsion for topical application of pentoxifylline: In vitro release and in vivo evaluation. *Int J Pharm*. 2016;506(1873-3476 (Electronic)):351-60.
25. Egito EST, Amaral-Machado L, Alencar EN, Oliveira AG. Microemulsion systems: from the design and architecture to the building of a new delivery system for multiple-route drug delivery. *Drug Deliv Transl Res*. 2021;11(5):2108-33.
26. Ramalho ÍMM, Bezerra GS, Ostrosky EA, Ferrari M, Oliveira VS, Wanderley Neto AO, et al. Chrysin-Loaded Microemulsion: Formulation Design, Evaluation and Antihyperalgesic Activity in Mice. *Appl Sci*. 2022;12(1):477.
27. Friedman D, Sirven JI. Historical perspective on the medical use of cannabis for epilepsy: Ancient times to the 1980s. *Epilepsy Behav*. 2017(1525-5069 (Electronic)):298-301.
28. Perucca E, Bialer M. Critical Aspects Affecting Cannabidiol Oral Bioavailability and Metabolic Elimination, and Related Clinical Implications. *CNS Drugs*. 2020;34(8):795-800.
29. Wu C, Benet L. Predicting Drug Disposition via Application of BCS: Transport/Absorption/ Elimination Interplay and Development of a Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System. *Pharm Res*. 2005;22(1):11-23.
30. Amidon G, Lennernas H, Shah V, Crison J. A theoretical basis for biopharmaceutics drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm Res*. 1995;12:413-20.
31. de la Ossa DHP, Lorente M, Gil-Alegre ME, Torres S, García-Taboada E, Aberturas MR, et al. Local delivery of cannabinoid-loaded microparticles inhibits tumor

- growth in a murine xenograft model of glioblastoma multiforme. *PLoS One*. 2013;8(1):e54795.
32. de la Ossa DHP, Ligresti A, Gil-Alegre ME, Aberturas MR, Molpeceres J, Di Marzo V, et al. Poly- ϵ -caprolactone microspheres as a drug delivery system for cannabinoid administration: Development, characterization and in vitro evaluation of their antitumoral efficacy. *J Control Release*. 2012;161(3):927-32.
 33. Yáñez JA, Wang SWJ, Knemeyer IW, Wirth MA, Alton KB. Intestinal lymphatic transport for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011;63(10):923-42.
 34. Lam PL, Gambari R. Advanced progress of microencapsulation technologies: In vivo and in vitro models for studying oral and transdermal drug deliveries. *J Control Release*. 2014;178:25-45.
 35. Cherniakov I, Izgelov D, Domb AJ, Hoffman A. The effect of Pro NanoLipospheres (PNL) formulation containing natural absorption enhancers on the oral bioavailability of delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD) in a rat model. *Eur J Pharm Sci*. 2017;109(1879-0720 (Electronic)):21-30.
 36. Elgart A, Cherniakov I, Aldouby Y, Domb AJ, Hoffman A. Lipospheres and pro-nano lipospheres for delivery of poorly water soluble compounds. *Chem Phys Lipids*. 2012;165(4):438-53.
 37. Elgart A, Cherniakov I, Aldouby Y, Domb AJ, Hoffman A. Improved oral bioavailability of BCS class 2 compounds by self nano-emulsifying drug delivery systems (SNEDDS): the underlying mechanisms for amiodarone and talinolol. *Pharm Res*. 2013;30(1573-904X (Electronic)):3029-44.
 38. Silveira WL, Damasceno BP, Ferreira LF, Ribeiro IL, Silva KS, Silva AL, et al. Development and Characterization of a Microemulsion System Containing Amphotericin B with Potential Ocular Applications. *Curr Drug Deliv*. 2016;13(6):982-93.
 39. Morais AR, Alencar ÉN, Xavier Júnior FH, de Oliveira CM, Marcelino HR, Barratt G, et al. Freeze-drying of emulsified systems: A review. *Int J Pharm*. 2016;503(1-2):102-14.
 40. Oliveira Wanderley Neto A, Moura EF, Júnior HS, Dantas TNdC, Neto AAD, Gurgel A. Preparation and application of self-assembled systems containing dodecylammonium bromide and chloride as corrosion inhibitors of carbon-steel. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2012;398:76-83.
 41. Oliveira WN, Amaral-Machado L, Alencar EN, Marcelino HR, Genre J, Silva-Rocha WP, et al. Getting the Jump on the Development of Bullfrog Oil Microemulsions: a Nanocarrier for Amphotericin B Intended for Antifungal Treatment. *AAPS PharmSciTech*. 2018;19(6):2585-97.

ANEXO

ANEXO 1 – Normas da revista *Pharmaceutics*