

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Anna Sophia Conhasco Lanzellotti Dantas

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE
CANABINOIDES EM PRODUTOS A BASE DE CANNABIS PARA FINS
MEDICINAIS**

RIO DE JANEIRO

2022

Anna Sophia Conhasco Lanzellotti Dantas

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE
CANABINOIDES EM PRODUTOS A BASE DE CANNABIS PARA FINS
MEDICINAIS

Monografia apresentada ao Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços, do Programa de Pós - Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para a obtenção do Certificado de conclusão do Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços.

Tutora: Mychelle Alves Monteiro

Preceptora: Soraya de Mendonça Ochs

RIO DE JANEIRO

2022

Catálogo na Fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Dantas, Anna Sophia

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE CANABINOIDES EM PRODUTOS A BASE DE CANNABIS PARA FINS MEDICINAIS. / Anna Sophia Dantas. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2022.
60 f. : fig. ; tab.

Monografia (Programa de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2022.

Tutora: Mychelle Alves Monteiro.
Preceptora: Soraya Mendonça Ochs.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Canabinoides. 2. Controle de Qualidade. 3. CLAE-UV . I.
Título.

DEVELOPMENT OF A METHODOLOGY FOR THE DETERMINATION OF CANNABINOIDS IN CANNABIS-BASED PRODUCTS FOR MEDICINAL PURPOSES.

Anna Sophia Conhasco Lanzellotti Dantas

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE
CANABINOIDES EM PRODUTOS A BASE DE CANNABIS PARA FINS
MEDICINAIS

Monografia apresentada ao Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços, do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para a obtenção do título de Especialista por ter concluído o Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços.

Aprovado em 21/02/2022.

BANCA EXAMINADORA

Magno Maciel Magalhães (Mestre)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Patrícia Condé de Lima (Mestre)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Virgínia Martins Carvalho (Doutora)
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Mychelle Alves Monteiro (Doutora) – (Tutora)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Soraya de Mendonça Ochs (Doutora) – (Preceptora)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família e aos meus amigos por todo apoio e incentivo.

À minha tutora Mychelle e preceptora Soraya pela orientação.

Aos professores da Pós-Graduação em Vigilância Sanitária por compartilharem o conhecimento.

A todos do Laboratório de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes, em especial aos amigos Matheus, Daniela, Maria Emanuelle, Patrícia, Ricardo e Laís, pela parceria e ajuda no desenvolvimento deste trabalho, muito obrigada!

RESUMO

A utilização de produtos com fins medicinais a base da planta *Cannabis sativa* tem sido cada vez mais estudada. Estão disponíveis no Brasil, atualmente, um medicamento e dez produtos de cannabis autorizados pela Anvisa, além dos produtos de importação individual e os fornecidos por associação de pacientes. Uma vez que são utilizados para fins terapêuticos, o controle de qualidade destes produtos é essencial para garantir que estes cumprem os requisitos de qualidade, pureza e segurança. Neste sentido, evidencia-se a importância de métodos para análise de teor dos princípios ativos canabidiol (CBD) e tetrahydrocannabinol (THC), além de suas substâncias relacionadas. Ressalta-se ainda, a importância do controle de THC, visto que é uma substância psicoativa. Apesar do crescente uso, não há monografia para avaliação de canabinoides na Farmacopeia Brasileira (FB) nem em outros compêndios aceitos no Brasil, de acordo com a RDC nº 511/2021. Portanto, este trabalho teve por objetivo desenvolver um método rápido e de fácil aplicação para quantificação de canabinoides em produtos para fins medicinais. O método foi desenvolvido por CLAE-UV, com fase estacionária C18 (150 x 4,6mm, 5µm), eluição em gradiente da fase móvel composta por 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila e em água, fluxo de 0,6 mL.min⁻¹ e detecção no comprimento de onda de 220nm, no qual foram possíveis resolver os picos de CBD, THC, ácido canabidiólico e canabinol. O preparo das amostras se deu pela utilização de etanol:água (95:5) como solvente de extração e etapas de agitação por inversão, vórtex e ultrassom, além de centrifugação. O método desenvolvido foi aplicado em dois produtos e cumpriu os requisitos estabelecidos de precisão, exatidão e seletividade. Visto a importância de um método farmacopeico para estabelecer requisitos mínimos de qualidade de medicamentos e produtos para fins medicinais e considerando a quantidade destes produtos disponíveis no Brasil, conclui-se que se faz importante a avaliação da implementação do método desenvolvido em outros produtos para uma futura validação, com intuito de sua inserção na FB.

Palavras-chave: Canabinoides. Controle de Qualidade. CLAE-UV

ABSTRACT

The use of medicinal products based on the *Cannabis sativa* plant has been increasingly studied. Products derived from this plant are available in Brazil, among them, one drug, ten cannabis products (CP) authorized by Anvisa, individual import products and those provided by patient associations. Once these products are used for therapeutic purposes, quality control of these products is essential to ensure that they meet the requirements of quality, purity, and safety. So, the importance of methods for analyzing the content of cannabidiol (CBD) and tetrahydrocannabinol (THC) active compounds and their related substances is evidenced. The importance of controlling THC is also highlighted, since it is a psychoactive substance. Despite the growing use, there is no monograph for the evaluation of cannabinoids in Brazilian Pharmacopoeia (BP) or in other compendia accepted in Brazil, according to the legislation RDC nº 511/2021. Therefore, this work aimed to develop a quick and easy method to quantify cannabinoids in products for medicinal purposes. The method was developed by HPLC-UV, with C18 stationary phase (150 x 4.6mm, 5µm), gradient elution of the mobile phase composed by 0.1% formic acid in acetonitrile and water, flow rate of 0.6 mL.min⁻¹ and 220nm wavelength detection, in which it was possible to resolve the peaks of CBD, THC, cannabidiolic acid and cannabinol. Sample preparation was carried out using ethanol:water (95:5) as extraction solvent and inversion, vortex and ultrasound agitation steps, in addition to centrifugation. The developed method was applied to two products and met the established requirements of precision, accuracy, and selectivity. Considering the importance of a pharmacopeial method to establish minimum quality requirements for medicines and products for medicinal purposes and considering the quantity of these products available in Brazil, it found that is important to evaluate the implementation of other products in the method developed for a future validation, in order to insert the method in BP.

Keywords: Cannabinoids. Quality control. HPLC-UV

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais canabinoides no controle de qualidade de produtos derivados da Cannabis sativa para fins medicinais.	21
Figura 2 - Cromatograma do teste Z em 25°C	40
Figura 3 - Cromatograma do teste Z em 37°C	40
Figura 4 – Espectro de absorção de CBDA na solução SQR	43
Figura 5 - Espectro de absorção de CBD na solução SQR	43
Figura 6 - Espectro de absorção de THC na solução SQR	44
Figura 7 - Espectro de absorção de CBN na solução SQR	44
Figura 8 – Relação da área obtida da SQR CBD pelo tempo no estudo de estabilidade	46
Figura 9 - Relação da área obtida da SQR THC pelo tempo no estudo de estabilidade	46
Figura 10 - Resultados de recuperação de CBD e THC nos produtos 1 e 2	48

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Produtos no estudo de desenvolvimento de método	26
Quadro 2 - Condições do preparo de amostra	29
Quadro 3 - Gradiente dos testes X e Z	39
Quadro 4 - Condições do método desenvolvido	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Recuperações médias no desenvolvimento da técnica de preparo da amostra	33
Tabela 2 – Resolução dos picos nos testes Z a 25°C e 37°C.	41
Tabela 3 – Valores de repetibilidade CBD e THC nos produtos 1 e 2	47
Tabela 4 - Valores de precisão intermediária de CBD e THC nos produtos 1 e 2	47
Tabela 5 – Dados do estudo de linearidade para CBD	48
Tabela 6 - Avaliação do estudo de linearidade para CBD	49
Tabela 7 – Dados do estudo de linearidade para THC	49
Tabela 8 - Avaliação do estudo de linearidade para THC	50
Tabela 9 - Avaliação do estudo de seletividade para CBD	50
Tabela 10 - Avaliação do estudo de seletividade para THC	50

LISTA DE SIGLAS

2AG	2-araquidonoilglicerol
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CBC	Canabicromeno
CBD	Canabidiol
CBDA	Ácido Canabidiólico
CBDV	Canabidivarina
CBG	Canabigerol
CBGA	Ácido Canabigerólico
CBN	Canabinol
CBO	Canabitriol
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CG	Cromatografia Gasosa
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DPR	Desvio Padrão Relativo
EM	Espectrometria de Massas
EUA	Estados Unidos da América
FB	Farmacopeia Brasileira
FE	Fase Estacionária
FM	Fase Móvel
Gelas	Gerência de Laboratórios de Saúde Pública
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Lacen	Laboratórios Centrais de Saúde Pública
PC	Produto(s) de Cannabis
THC	Tetrahydrocannabinol
THCA	Ácido Tetrahydrocannabinólico
THCV	Tetra-hidrocanabivarina
R	Coeficiente de correlação
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RNLVISA	Rede Nacional de Laboratórios de Vigilância Sanitária
SNVS	Sistema Nacional de Vigilância Sanitária
SQR	Substância Química de Referência

UV

Ultravioleta

VISA

Vigilância Sanitária

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Vigilância Sanitária	16
1.2 Cannabis Medicinal	17
1.3 Análise quantitativa de canabinoides	21
1.3.1 Preparo de amostra	21
1.3.2 Método analítico	22
1.4 Justificativa	23
2 OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo Geral	25
2.2 Objetivos Específicos	25
3 MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 Amostras	26
3.2 Equipamentos, materiais e reagentes	26
3.2.1 Equipamentos	26
3.2.2 Materiais e Reagentes	27
3.3 Otimização do preparo da amostra	27
3.4 Desenvolvimento do Método Analítico	28
3.5 Estabilidade das SQR CBD e THC	28
3.6 Parâmetros de avaliação do método	30
3.6.1 Precisão	30
3.6.2 Exatidão	30
3.6.3 Linearidade	31
3.6.4 Seletividade	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	33
4.1 Preparo de amostras	33
4.2 Desenvolvimento do Método Analítico	37
4.3 Estabilidade das SQR CBD e THC	45
4.4 Parâmetros de avaliação do método	46
4.4.1 Precisão	46
4.4.2 Exatidão	47
4.4.3 Linearidade	48
4.4.4 Seletividade	50

5 CONCLUSÃO	
REFERÊNCIAS	

	52
	53

1 INTRODUÇÃO

A *Cannabis sativa* e produtos derivados estão sendo cada vez mais pesquisados e utilizados para fins medicinais. O efeito psicoativo causado por um de seus constituintes, o tetrahydrocannabinol (THC), é o motivo pelo qual ela é utilizada de forma recreativa e por ser proscrita no Brasil. Apesar disto, desde 2015, produtos derivados da planta podem ser utilizados para fins medicinais de forma regulamentar. Existem indicativos do uso da *Cannabis* para diversas condições clínicas, entretanto, tais evidências ainda não comprovam sua segurança e eficácia a nível de utilização como um medicamento para todas elas (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2021; BRASIL, 1998, 2015).

Atualmente, no Brasil, apenas um produto, que contém como princípios ativos os canabinoides THC (27 mg.mL^{-1}) e canabidiol (CBD) (25 mg.mL^{-1}), é registrado como medicamento, o Mevatyl®, que em outros países possui o nome de Sativex®. Ele tem como indicação em bula o tratamento dos sintomas de pacientes adultos que apresentam espasmos, de moderados a graves, por causa da esclerose múltipla, que não apresentaram bons resultados após a utilização de outras medicações antiespásticas (BEAUFOUR IPSEN FARMACÊUTICA LTDA, 2021).

Além do Mevatyl®, brasileiros que necessitam dos canabinoides para tratamento de doenças podem ter acesso a produtos com fins medicinais destas substâncias através de prescrição médica, pela aquisição de produtos de âmbito sanitário regulados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa): produtos de importação individual e Produtos de Cannabis (PC) (BRASIL, 2019; BRASIL, 2020).

Apesar da disponibilidade destes produtos, devido ao valor elevado em que são comercializados, existem pacientes que fazem uso de produtos artesanalmente produzidos e fornecidos por associações de pacientes e familiares de usuários da cannabis medicinal, que possuem autorização da justiça para a atividade (CARVALHO, 2017).

Os produtos de importação individual foram inicialmente regulamentados pela Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 17/2015, publicada em 06 de maio de 2015, que define os critérios e os procedimentos para a importação, em caráter de excepcionalidade, de produto à base de CBD em associação com outros

canabinoides, por pessoa física, para uso próprio, mediante prescrição de profissional legalmente habilitado, para tratamento de saúde (BRASIL, 2015).

Nesta RDC foram apresentados os produtos que poderiam ser objeto de importação e explicitado que eles não eram registrados no Brasil, portanto, a Anvisa não havia avaliado sua segurança e eficácia. Esta Resolução foi alterada pela publicação da RDC nº 66/2016, que também alterou a Portaria 344/98, e incluiu na autorização de importação para uso médico pessoal a planta *Cannabis sativa* L., partes da planta e de seus compostos, incluindo o THC (BRASIL, 2015; BRASIL, 2016).

Em janeiro de 2020, a RDC nº 17/2015 foi revogada pela publicação da RDC nº 335/2020, que traz em seu *caput* a definição dos critérios e os procedimentos para a importação de Produto derivado de Cannabis, por pessoa física, para uso próprio, mediante prescrição de profissional legalmente habilitado, para tratamento de saúde, sendo esta, então, a base legal para importação destes produtos atualmente. As alterações em relação à resolução anterior foram principalmente relacionadas ao produto, que anteriormente deveria ser à base de CBD e agora são derivados da planta *Cannabis spp.* e à validade das autorizações de importação (BRASIL, 2020).

Já o PC é regulamentado pela RDC 327/2019, e tem por definição ser um produto industrializado, com Autorização Sanitária temporária concedida pela Anvisa, com finalidade medicinal. Estes produtos estão sujeitos ao monitoramento analítico por meio de um programa coordenado pela Gerência de Laboratórios de Saúde Pública (Gelas) da Anvisa, no qual, laboratórios oficiais ou credenciados devem realizar análises na modalidade de orientação ou fiscais. Portanto, além do controle de qualidade que deve ser realizado lote a lote pelo fabricante ou importador do produto, seus laudos devem ser avaliados através do programa (BRASIL, 2019).

A criação desta nova categoria regulatória pela agência tem como objetivo ampliar o acesso a produtos de qualidade com fins medicinais a pacientes com doenças, para as quais a utilização de canabinoides tem se mostrado promissora, e cujos tratamentos convencionais não são eficazes (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2021; BRASIL, 2019).

Os PC podem ter como ativo derivados vegetais ou fitofármacos da *Cannabis sativa*. Um derivado vegetal é um produto da extração da planta medicinal *in natura* ou da droga vegetal, podendo ocorrer na forma de extrato, tintura, alcoolatura, óleo

fixo e volátil, cera, exsudato e outros. Enquanto um fitofármaco é uma substância purificada e isolada, a partir de matéria-prima vegetal, com estrutura química definida e atividade farmacológica, que não tenha sofrido qualquer etapa de semi-síntese ou modificação de sua estrutura química. Portanto, o PC pode apresentar os princípios ativos de forma isolada ou não. Até o momento já foram autorizados dez PC, sendo seis fitofármacos e quatro derivados vegetais (BRASIL, 2011).

Apesar de não serem registrados como medicamentos, os PC devem atender aos mesmos requisitos, exceto por não necessitarem apresentar dados completos sobre segurança e eficácia. Findo o prazo da autorização, se houver interesse na continuidade de comercialização do produto no mercado, ele precisa ser registrado como medicamento. Dessa forma, torna-se obrigatório apresentar à agência estes dados completos, conforme descrito em legislação específica (BRASIL, 2019).

Estes produtos de âmbito sanitário precisam ter o controle de qualidade realizado para garantir que atendam aos requisitos de atividade, qualidade, pureza e inocuidade. Assim, são necessários métodos robustos e confiáveis para esta avaliação. Ressalta-se ainda a importância do controle do teor de THC, visto que é uma substância psicoativa. Atualmente, não existe uma monografia compendial para avaliação dos canabinoides e os métodos, até então utilizados, são os desenvolvidos e validados pelos próprios fabricantes (BRASIL, 1976; MECHOULAM et al., 1970).

1.1 Vigilância Sanitária

Produtos e serviços capazes de trazer riscos à saúde estão presentes de forma constante no dia a dia da população, como alimentos, cosméticos, produtos de limpeza e medicamentos. Estes produtos são considerados de interesse da vigilância sanitária (VISA), que tem como objetivo desenvolver ações para eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e intervir em problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde (BRASIL, 1990).

No âmbito dos medicamentos, as ações de VISA são aplicadas de acordo com a Lei 5.991 de 17 de dezembro de 1973, que dispõe sobre o controle sanitário do comércio de drogas, medicamentos, insumos farmacêuticos e correlatos e a Lei 6.360 de 23 de setembro de 1976, que dispõe sobre as normas de vigilância sanitária a que

ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, os cosméticos, saneantes e outros produtos. Além destas, de acordo com a complexidade e etapa do ciclo de vida do produto, outras legislações, como Portarias e Resoluções da Diretoria Colegiada (RDC) da Anvisa, são aplicáveis (BRASIL, 1973; BRASIL, 1976).

As ações de VISA são desempenhadas no âmbito do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS), definido pela Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999, a mesma legislação que criou a Anvisa. O SNVS abrange os serviços de VISA dos municípios, os órgãos de VISA das Secretarias Estaduais de Saúde e seus Laboratórios Centrais (Lacen) e no nível federal, a Anvisa e o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS). De forma descentralizada, neste sistema cada esfera possui suas atribuições e competências, portanto, o controle sanitário do medicamento é feito desde sua produção até o consumo pelo paciente (BRASIL, 1999).

Dentre as ações de VISA, avalia-se a qualidade de produtos através de análises que podem ser de natureza fiscal, de orientação ou de controle. Estas análises têm como objetivo diminuir a exposição da população a produtos que não atendam os requisitos de qualidade. São realizadas pela Rede Nacional de Laboratórios de Vigilância Sanitária (RNLVISA), na qual o INCQS está inserido. A partir dos resultados obtidos, os desdobramentos sanitários aplicáveis devem ser realizados pela parte do SNVS competente (CONASS, 2011).

Além das análises previstas em legislação, demandadas pelos órgãos de VISA, o INCQS também desenvolve, adequa e implanta metodologias analíticas aplicadas à verificação da qualidade de produtos de âmbito sanitário e assessora os laboratórios da RNLVISA (CONASS, 2011).

1.2 Cannabis Medicinal

Pertencente à família *Cannabaceae*, a *Cannabis sativa L.* é uma planta que possui apenas um gênero: *Cannabis*, uma espécie: *sativa*, e três subespécies: *sativa*, *indica* e *ruderalis*. Nativa da Ásia Central, é usada para fins terapêuticos há muitos anos (ELSOHLY; SLADE, 2005; GONÇALVES et al., 2019).

Muitas referências foram encontradas de que a planta havia sido usada para finalidades terapêuticas nos tempos faraônicos. Um dos documentos mais antigos, que data de 1700 anos a.C., relaciona seu uso ao tratamento de uma enfermidade, com descrição de utilização por via ocular que, poderia fazer referência a um tratamento para glaucoma ou como anti-inflamatório. Posterior a isto, outros documentos, que descreviam o uso terapêutico por outras vias e para diferentes indicações, também foram encontrados (RUSSO, 2007).

Seu uso foi descrito na farmacopeia mais antiga do mundo, baseada em usos tradicionais Chineses. Entre as indicações encontradas, estão o tratamento da dor reumática, constipação, distúrbios do sistema reprodutor feminino e malária. Esta mesma farmacopeia também fez referência a sua atividade psicoativa, hoje atribuída ao THC, entretanto, não são encontrados relatos da época de seu uso como alucinógeno (RUSSO, 2007; ZUARDI, 2006).

Na Índia, a planta era utilizada para fins psicoativos, religiosos, sendo considerada uma planta sagrada, além de seu uso medicinal. Era utilizada como analgésico, anticonvulsivante, hipnótico, ansiolítico, anestésico, anti-inflamatório, antibiótico, antiparasitário, antiespástico, digestivo, estimulante do apetite, diurético, expectorante (ZUARDI, 2006).

Desde então, outras evidências de seu uso medicinal e estudos relativos a este assunto também foram encontrados, inclusive, provenientes da medicina ocidental. Na segunda metade do século 19, mais de 100 artigos já haviam sido publicados na Europa e nos Estados Unidos da América (EUA) a respeito do potencial terapêutico da cannabis, que era comercializada também por laboratórios na forma de extrato e tintura (RUSSO, 2007; ZUARDI, 2006).

Apesar disso, em meados do século XX, houve uma redução de seu uso. Este fato é atribuído ao desenvolvimento de outros medicamentos no século anterior, cujos princípios ativos isolados eram mais facilmente entendidos e para os quais havia indicações semelhantes aos da cannabis que, até então, era oferecida medicinalmente na forma de extrato ou tintura. Ademais, um consenso sobre a quantidade necessária para efeitos clínicos e parâmetros de qualidade não havia sido estabelecido (RUSSO, 2007; ZUARDI, 2006).

Além do desenvolvimento de outros medicamentos, esta redução está extremamente associada à sua proibição, que limitou o uso medicinal e científico. A

proibição começou, inicialmente, nos EUA, pela cobrança de taxas de pessoas que utilizassem a planta de forma medicinal ou não. Caso o pagamento não fosse feito, eram aplicadas punições como multas ou reclusão. Posteriormente, a cannabis passou a ser banida dos EUA e, a partir de decisões tomadas em Convenções Internacionais, em outros países também. Por fim, em 1941, ela foi retirada da Farmacopeia Americana (BERTOLOTE, 2020; ZUARDI, 2006).

No Brasil, a cannabis começou a sofrer restrições pelo Decreto-lei nº 891 de 1936, que proibia em todo território nacional o plantio, a cultura, a colheita e a exploração desta e de outras plantas. Qualquer atividade relacionada a uma das plantas mencionadas no decreto deveria ser respaldada por licença da autoridade sanitária e visto da autoridade policial competente (BERTOLOTE, 2020).

Posteriormente, esta lei foi revogada pela publicação da Lei 6.368 de 1976, por fim pela Lei 11.343 de 2006, que vigora até a presente data, sendo conhecida como lei das drogas. Nesta última, caracterizam-se drogas, as substâncias entorpecentes, psicotrópicas, precursoras e outras sob controle especial, da Portaria SVS/MS nº 344, de 12 de maio de 1998 (BERTOLOTE, 2020; BRASIL, 1998, 2006).

Devido a estas dificuldades impostas pelas restrições legais, apenas após a identificação do THC em 1964, a descoberta do sistema endocanabinoide, formado pelos receptores CB1 e CB2 e seus ligantes endógenos, a anandamida e o 2-araquidonoilglicerol (2AG), que a pesquisa científica sobre a cannabis se intensificou. Por conseguinte, foram identificados mais de 323 constituintes químicos presentes na planta e houve aumento significativo das pesquisas sobre os efeitos terapêuticos (GAONI; MECHOULAM, 1964; MARTIN; MECHOULAM; RAZDAN, 1999; RADWAN et al., 2021; SAITO; WOTJAK; MOREIRA, 2010; ZUARDI, 2006).

Entre estes constituintes químicos da planta, estão presentes flavonoides, terpenos, alcaloides e canabinoides, sendo estes os mais conhecidos e produzidos exclusivamente pela *Cannabis sativa*. Também chamados de fitocannabinoides, devido a sua origem, eles são secretados em resina pelos tricomas, encontrados nas flores e em menor quantidade nas folhas do terço superior da planta (HAZEKAMP, 2007; RADWAN et al., 2021; SHOYAMA et al., 1975; ZUARDI, 2006).

Os canabinoides são metabólitos secundários da planta classificados quimicamente como terpenofenóis e são predominantemente apolares. Entre eles, os mais abundantes na planta são o ácido canabidiólico (CBDA) e ácido

tetrahidrocanabinólico (THCA), que após sofrerem descarboxilação apresentam-se em suas formas neutras como CBD e THC, respectivamente, sendo estes os mais estudados para efeitos medicinais (GONÇALVES et al., 2019; HAZEKAMP, 2007; RADWAN et al., 2021; SHOYAMA et al., 1975).

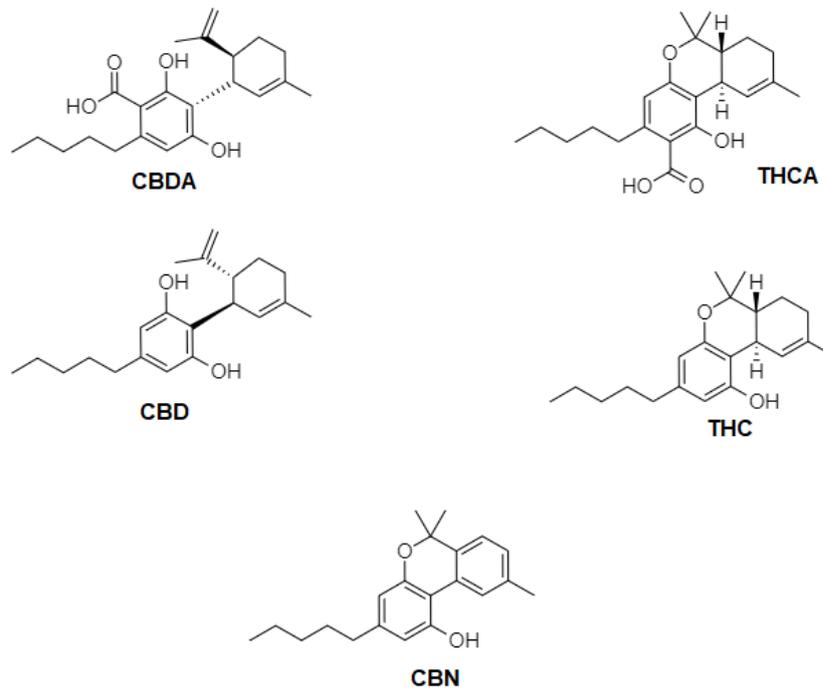
Na literatura, são encontradas evidências para o uso do CBD de forma isolada para o tratamento da epilepsia e redução de convulsões, principalmente, associadas a Síndromes de Lennox-Gastaut e Dravet. Além disso, também existem estudos clínicos que indicam seu potencial uso no tratamento da dor e inflamação, sintomas relacionados à esquizofrenia, Doença de Parkinson, transtorno de estresse pós-traumático, melhora na abstinência e nos transtornos causados pelo uso de opioides, nicotina, da própria cannabis de forma recreativa, e como ansiolítico (BARON, 2018; SHOLLER; SCHOENE; SPINDLE, 2020; WHITING et al., 2015).

Já o THC, de forma isolada, é indicado para prevenção de náuseas e vômito induzidos por quimioterapia e caquexia relacionada ao HIV ou câncer, e possui evidências de eficácia comprovadas em estudos clínicos para o tratamento da dor crônica. Combinado com o CBD, é indicado para o tratamento da dor e espasticidade na esclerose múltipla (LEVINSOHN; HILL, 2020; WHITING et al., 2015; BARON, 2018).

Mais recentemente, tem-se observado importante efeito terapêutico do Canabigerol (CBG), produto da descarboxilação do ácido canabigerólico (CBGA), substância precursora do CBDA e THCA. Apesar de não apresentar muita afinidade com os receptores do sistema endocanabinoide, apresenta efeitos antifúngicos, analgésico e antiemético, sendo estes dois últimos, aparentemente, superiores aos do THC (LIMA, 2019).

Portanto, para garantir a qualidade, eficácia e segurança dos produtos de âmbito sanitário a base de Cannabis, torna-se necessário quantificar os principais canabinoides utilizados para fins terapêuticos, CBD, THC, além dos canabinoides relacionados, como seus precursores, CBDA, THCA e o já conhecido produto de degradação do THC, o Canabinol (CBN), que pode ocorrer dependendo das condições de armazenamento, temperatura e tempo (LEWIS et al., 2017). (Figura 1).

Figura 1 - Principais canabinoides no controle de qualidade de produtos derivados da Cannabis sativa para fins medicinais.



Fonte: O autor, 2022.

1.3 Análise quantitativa de canabinoides

1.3.1 Preparo de amostra

Na análise de teor de um produto, o preparo da amostra é variável de acordo com a forma farmacêutica na qual o princípio ativo é veiculado e a técnica analítica a ser utilizada. Entre os processos podem estar presentes etapas de dispersão ou solubilização do analito de interesse; concentração; *clean up*, para remoção dos interferentes; filtração, para remoção de materiais insolúveis e, no caso de formas farmacêuticas sólidas, a redução do tamanho de partícula (NICKERSON, 2011).

No Brasil, os produtos derivados da Cannabis para fins medicinais são apresentados na forma de soluções orais. Geralmente, para esta forma, o preparo da amostra consiste apenas na diluição em solvente compatível com o método analítico empregado, uma vez que o princípio ativo já está solubilizado de forma homogênea no produto. Entretanto, os produtos em questão são veiculados em matrizes viscosas. Portanto, um preparo de amostra com mais etapas, como a agitação e centrifugação,

pode ser requerido para aumentar a eficiência no processo de extração do princípio ativo da amostra (NICKERSON, 2011; BU et al, 2011).

Neste caso, a escolha do solvente e a técnica de preparo, sobretudo a etapa de agitação, tornam-se críticos para garantir que todo o princípio ativo seja dissolvido e recuperado. A agitação deve ser capaz de extrair o princípio ativo para o diluente e garantir boa homogeneização. Ela pode ser feita de forma manual ou mecânica, por inversão, agitação magnética, movimento recíprocante, vórtex, onde a mistura é feita com movimentos circulares rápidos; ou, ainda, por sonicação (agitação promovida por energia ultrassônica), que é considerada uma técnica, tanto de agitação quanto de redução de partícula (NICKERSON; LUNG, 2011).

Na literatura, foram encontrados métodos para quantificação de canabinoides em diferentes tipos de produtos, principalmente em partes da planta, mas também em produtos derivados, como as apresentações veiculadas em óleo. Por possuírem matriz que pode ser extraída durante o processo, é necessário que o preparo da amostra seja capaz de reduzir possíveis interferentes e apresentar uma recuperação satisfatória para os analitos de interesse (CITTI et al., 2018a, 2018b; MICALIZZI et al., 2021; NEMEŠKALOVÁ et al., 2020).

Entre os canabinoides presentes nos procedimentos de extração desenvolvidos estavam CBD, CBDA, CBG, CBGA, CBN, THC, THCA. Quanto aos solventes de extração na literatura são encontradas referências a utilização de etanol, metanol, hexano, triclorometano, acetato de etila e propanol, separadamente ou em combinação. Os procedimentos utilizados no preparo destas amostras foram dispersão ou solubilização da amostra, que incluíam etapas de agitação em vórtex, banho de ultrassom e aquecimento, além de etapas de *clean up*, nas quais foram aplicadas refrigeração a -20°C, centrifugação e filtração (BRIGHENTI et al., 2017; CARVALHO et al., 2020; CIOLINO; RANIERI; TAYLOR, 2018; CITTI et al., 2018a).

1.3.2 Método analítico

Na avaliação analítica de canabinoides, foram encontrados métodos que utilizaram principalmente técnicas de cromatografia gasosa (CG) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por espectrometria de massas (EM) ou ultravioleta (UV). Para análise de produtos, a técnica de CLAE é a mais vantajosa,

uma vez que é possível analisar tanto os canabinoides ácidos como os neutros sem a necessidade de derivatização. Quanto aos detectores, EM é a melhor opção, devido a maior seletividade, importante quando os produtos são menos purificados (LAZARJANI et al., 2020).

As fases estacionárias mais reportadas na literatura foram as colunas C18, mas alguns métodos só obtiveram separação dos canabinoides com a utilização de colunas C18 com ligação a outros grupos funcionais. Já como fases móveis, acetonitrila e água com adição de ácido fórmico foram as mais utilizadas, mas além delas, também foram encontrados trabalhos que utilizaram metanol, ácido acético ou solução tampão. Grande parte destes utiliza eluição em gradiente (CIOLINO; RANIERI; TAYLOR, 2018; CITTI et al., 2018a, 2018b; FEKETE et al., 2018b; HÄDENER; KÖNIG; WEINMANN, 2019; LAZARJANI et al., 2020; PROTTI et al., 2019; WANG et al., 2018).

1.4 Justificativa

Os produtos que possuem canabinoides como princípios ativos, como os medicamentos, PC, produtos de importação ou os fornecidos por associações, possuem risco sanitário. Portanto, é necessário que sua qualidade seja verificada para garantir a eficiência dos tratamentos e a reduzir possíveis eventos adversos, através da quantificação de canabinoides nestes produtos.

Após a implementação do Programa de monitoramento pós mercado de PC e medicamentos contendo CBD/THC, o laboratório de Medicamentos do INCQS foi o integrante da RNLVISA que realizou as análises destes produtos. Essas análises foram feitas de acordo com o método do fabricante, pois, até o momento, não há monografias para canabinoides na Farmacopeia Brasileira (FB), o compêndio farmacêutico nacional que estabelece as exigências mínimas de qualidade, autenticidade e pureza de insumos farmacêuticos, de medicamentos e de outros produtos sujeitos à vigilância sanitária.

Além da FB, é estabelecido pela RDC 511/2021 que na ausência de monografia na FB, podem ser usadas outras Farmacopeias definidas nesta mesma resolução. Porém, nenhuma destas possui monografias para o doseamento de canabinoides em produtos derivados da Cannabis. Destas, apenas as Farmacopeias Japonesa e Alemã

possuem monografias para cannabis publicadas, mas para fruto e flores, respectivamente (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019; BRASIL, 2021).

As Farmacopeias Chinesa, Aiurveda, Indiana e Farmacopeia Americana de Fitoterápicos possuem monografias ou recomendações de qualidade para derivados ou partes da planta, entretanto, estas não são autorizadas pela legislação vigente. Além destes, são encontrados na literatura alguns métodos de quantificação de canabinoides, porém, não são muitos os trabalhos que apresentam estes métodos aplicados a produtos com fins medicinais (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2021; BRASIL, 2021).

Neste sentido, considerando que o INCQS é referência nacional para controle da qualidade de produtos vinculados à vigilância sanitária, e a importância da avaliação da qualidade analítica destes produtos pertencentes a diferentes categorias regulatórias, este trabalho visa o desenvolvimento de um método rápido e de fácil aplicação para quantificação de canabinoides em PC e medicamento a base de *Cannabis*. O método será posteriormente implementado e validado em outros produtos de âmbito sanitário, com o intuito de ser inserido na FB.

O desenvolvimento de um método farmacopeico se torna importante para estabelecer os requisitos mínimos de qualidade dos produtos que estão sendo comercializados no Brasil com fins terapêuticos, principalmente os produzidos de forma artesanal pelas associações de pacientes, e os de importação individual, que não são autorizados ou registrados pela Anvisa, portanto, não possuem qualidade, segurança e eficácia comprovados perante a agência. Sendo assim, a verificação analítica destes produtos auxiliará na redução dos possíveis riscos sanitários.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver metodologia por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) acoplada ao detector de arranjo de diodos (DAD) para determinação dos canabinoides CBD, THC, CBDA e CBN em produtos à base de Cannabis para fins medicinais.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar diferentes condições de preparo das amostras e estabelecer a mais adequada;
- Avaliar diferentes condições cromatográficas;
- Avaliar os parâmetros de precisão, exatidão, linearidade e seletividade do método para o ensaio de teor de CBD e THC;
- Aplicar metodologia desenvolvida em produtos derivados da cannabis para fins medicinais.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostras

Os produtos derivados de cannabis utilizados como amostras foram disponibilizados através do programa de monitoramento analítico pós-mercado de produtos da Cannabis e medicamentos contendo CBD/THC, coordenado pela Anvisa. Foram utilizados quatro lotes de produtos, de dois fabricantes, ambos formulados em solução oral (Quadro 1).

Quadro 1 - Produtos no estudo de desenvolvimento de método

Produto	Princípio ativo	Concentração (mg.mL ⁻¹)	Excipientes	Densidade (g/mL)
1	CBD	200	Óleo de milho e butil-hidroxianisol.	0,93
2	CBD e THC	25 e 27	Propilenoglicol, óleo de hortelã-pimenta, etanol anidro.	0,92 – 0,94

Fonte: O autor, 2022.

3.2 Equipamentos, materiais e reagentes

3.2.1 Equipamentos

- Agitador de tubos tipo vórtex individual. Fabricante DLAB, modelo MX-S.
- Balança analítica. Fabricante Mettler Toledo, modelo AG258.
- Banho ultrassom. Fabricante Branson, modelo 2510.
- Centrífuga. Fabricante Eppendorf, modelo 5804-R.
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência do fabricante Shimadzu, com injetor automático SIL-20A, bombas LC-10ADvp, forno CTO-20A e detector UV-VIS SPD-M10Avp. Software para controle do sistema, aquisição e análise de dados LabSolutions.
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência de módulo único Nexera-i LC2040c 3D Plus. Software para controle do sistema, aquisição e análise de dados LabSolutions.
- Sistema de purificação de água, fabricante Milipore, modelo Milli-Q Integral 10.

3.2.2 Materiais e Reagentes

- Coluna C18 (150 x 4,6 mm, 5 μ m). Fabricante: ACE, lote: V12-6628.
- Solventes grau CLAE: acetonitrila e metanol, grau P.A: *n*-hexano, etanol.
- Solução SQR THC. Teor: 0,995 mg.mL⁻¹. Fornecedor USP, lote: R045H0.
- Substância Química de Referência (SQR) CBD. Fornecedor: BSPG Laboratories, lote: 1188565.
- Solução SQR CBDA. Teor: 1,00 mg.mL⁻¹. Fornecedor Dr. Ehrenstorfer, lote 2-H388869AL.
- Solução SQR CBN. Teor: 1,00 mg.mL⁻¹. Fornecedor Lipomed, lote 377.1B16.112.
- Solução SQR contendo canabidivarina (CBDV), CBDA, CBG, CBD, CBO, tetra-hidrocanabivarina (THCV), CBN, 9-THC, 8-THC, canabicromeno (CBC), THCA. Fornecedor: fabricante do produto 2.
- Solução SQR CBD. Teor: 0,1012 mg.mL⁻¹. Fornecedor: fabricante do produto 2.
- Solução SQR THC. Teor: 0,0952 mg.mL⁻¹. Fornecedor: fabricante do produto 2.
- Solução SQR contendo CBG, CBN, CBC. Fornecedor: fabricante do produto 2.
- Solução SQR contendo CBDA, THCV, THCA. Fornecedor: fabricante do produto 2.
- Solução SQR contendo CBDV e CBO. Fornecedor: fabricante do produto 2.

3.3 Otimização do preparo da amostra

Os teores de princípio ativo dos produtos foram determinados através de análises de orientação ou fiscal, realizadas no âmbito do programa de monitoramento, de acordo com os métodos dos respectivos fabricantes, previamente transferidos, conforme descrito em procedimento operacional padrão (INCQS, 2021).

Com o objetivo de estabelecer uma técnica única de preparação das amostras, esta etapa descrita no método do produto 1 foi reproduzida e aplicada para o produto 2 e posteriormente, foram reproduzidas técnicas encontradas na literatura para ambos (CARVALHO et al., 2020; CIOLINO; RANIERI; TAYLOR, 2018).

A partir dos resultados foram propostas modificações para otimização no preparo de amostra. Os testes foram realizados em duplicata ou triplicata. As amostras foram submetidas por diferentes intervalos de tempo à agitação por vórtex, movimento recíprocante (shaker), ou ultrassom, além de refrigeração e centrifugação para

separação do veículo oleoso. Como solventes de extração foram testados metanol, metanol: água (9:1), metanol: *n*-hexano (9:1) e etanol: água (95:5) (Quadro 2). Por fim, as amostras foram analisadas por CLAE-UV nas condições cromatográficas descritas no método do fabricante do produto 1.

3.4 Desenvolvimento do Método Analítico

A técnica de CLAE com detecção por EM é considerada a melhor opção para a quantificação de canabinoides em produtos de cannabis, entretanto, este trabalho tem como objetivo desenvolver um método que possa ser extensamente utilizado, e a detecção por UV é de menor custo e mais presente nos laboratórios públicos e privados.

Portanto, o desenvolvimento do método analítico se deu por esta técnica, em equipamento de módulo único Nexera-i LC2040c 3D Plus, com fase estacionária (FE) octadecilsilano (C18) e soluções de SQR de canabinoides como amostras.

Com o objetivo de obter uma corrida cromatográfica com menor tempo possível e resolução suficiente entre os princípios ativos e as substâncias relacionadas, foram testadas diferentes condições cromatográficas.

Inicialmente buscou-se reproduzir métodos encontrados na literatura, e posteriormente foram feitas modificações conforme a necessidade. O método desenvolvido foi escolhido considerando os parâmetros de resolução entre os sinais dos canabinoides presentes na solução de SQR contendo 11 canabinoides, com ênfase em CBDA, CBD, CBN e Δ 9-THC.

3.5 Estabilidade das SQR de CBD e THC

Para verificar a estabilidade das SQR de CBD e THC, foram feitas 14 injeções de solução a $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ em etanol 95%, com intervalo de 54 minutos entre elas. A solução foi mantida no amostrador automático do cromatógrafo em temperatura de 10°C durante o período de realização do ensaio. As condições cromatográficas utilizadas foram as mesmas estabelecidas no desenvolvimento de método do presente trabalho.

Quadro 2 - Condições do preparo de amostra

Testes	Solvente de extração	Concentração de trabalho	Agitação por vórtex	Ultrassom	Centrífuga	Refrigeração (-20°C)	Agitador múltiplo	Shaker
A	Método do fabricante do produto 1							
B	Etanol 95%	100µg/mL	5 min	0, 15min ou 30min	-	-	-	-
C	Metanol:hexano (9:1)	100µg/mL	-	30min	1min (1286 x g) 20min (2571 x g)	30min	-	-
D	Metanol:hexano (9:1)	100µg/mL	5 min	15min	-	-	-	-
E	Metanol	100µg/mL	5min	15min	-	-	-	-
F	Metanol	100µg/mL	-	-	15min (3214 x g)	-	15 min	-
G	Metanol 90%	100µg/mL	-	15min	15min (3214 x g)	-	5min	15min
H	Etanol 95%	100µg/mL	5min	5min	10min (3214 x g)	-	-	-
I	Etanol 95%	100µg/mL	5min	-	10min (3214 x g)	-	-	-

Fonte: O autor, 2022.

3.6 Parâmetros de avaliação do método

Após a definição das condições de preparo das amostras e método analítico, avaliaram-se os parâmetros de precisão, exatidão, linearidade e seletividade do método para o ensaio de teor de CBD e THC, conforme preconizado na RDC nº 166 de 2017 (BRASIL, 2017).

3.6.1 Precisão

O parâmetro de precisão foi avaliado pelos resultados dos ensaios de repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade foi determinada pela injeção em triplicata de seis réplicas individualmente preparadas, nas condições preparo e método analítico estabelecidos no desenvolvimento da metodologia, a 100% da concentração de trabalho, pelo mesmo analista, com a mesma instrumentação em uma única corrida analítica.

Determinou-se a precisão intermediária através do mesmo procedimento descrito para repetibilidade, porém, o analista e dia do ensaio foram alterados. O critério de aceitação para estes ensaios é de Desvio Padrão Relativo (DPR) menor ou igual a 5,0%, para o teor das replicatas (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2021).

3.6.2 Exatidão

A exatidão foi avaliada pelos resultados de recuperação dos princípios ativos obtidos no ensaio de repetibilidade, de acordo com a equação abaixo. O critério de aceitação, de acordo com a concentração de trabalho é de 90 a 107% de recuperação média e 5,3% de DPR (AOAC, 2016).

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{Resposta da amostra} \times 100}{\text{Resposta do SQR}}$$

3.6.3 Linearidade

O ensaio para avaliação deste parâmetro foi realizado através da técnica de adição padrão, pois o desenvolvimento da metodologia foi feito no produto farmacêutico e não se tinha disponível os insumos farmacêuticos ativos, placebos e excipientes (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2021).

Soluções das amostras a 200% da concentração de trabalho, ou seja, 200 µg/mL, foram preparadas de acordo com o procedimento definido no método desenvolvido, assim como outras duas soluções contendo, 250% da concentração de trabalho de CBD e 250% da concentração de trabalho de CBD e THC (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2021).

Posteriormente, foram adicionadas alíquotas das soluções de SQR às soluções de amostras, e avolumadas com diluente, a fim de que fossem obtidas curvas de adição-padrão com pontos correspondentes a 50%, 75%, 100%, 125% e 150% da concentração de trabalho. Uma curva analítica com as mesmas concentrações foi preparada com o diluente.

A linearidade do método foi avaliada utilizando o *Software Action Stat®* conforme preconizado na RDC Nº 166/2017, pelos os seguintes parâmetros e critérios de aceitação:

- Teste do coeficiente angular – para avaliar a significância do modelo linear utilizou-se o teste F da Anova. Quando o p-valor do teste F da Anova < 0,05 o coeficiente angular é diferente de zero; demonstrando ser significativo, ao nível de significância de 5%. Se p-valor > 0,05, o coeficiente angular é igual ao zero e não é significativo ao nível de 95%.
- Coeficiente de correlação (r) $\geq 0,990$.
- Modelo Homocedástico - Teste de Breusch Pagan, p-valor > 0,05.
- Avaliação da Normalidade dos Resíduos - Teste de Shapiro Wilk, se p-valor > 0,05 verifica-se a distribuição normal.
- Teste de independência - Teste Durbin-Watson (MMQO), quando p-valor > 0,05, demonstra-se a independência das observações.

3.6.4 Seletividade

A seletividade do método analítico deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de identificar ou quantificar o analito de interesse, inequivocamente, na presença de componentes que podem estar presentes na amostra, como impurezas, diluentes e componentes da matriz (BRASIL, 2017).

Neste estudo as matrizes sem o analito não estavam disponíveis, portanto, a seletividade foi avaliada pela comparação das curvas de adição do padrão nas matrizes dos produtos 1 e 2 com a curva analítica dos padrões em cinco níveis, equivalentes a 50%, 75%, 100%, 125% e 150% da concentração de trabalho.

A seletividade do método foi avaliada utilizando o *Software Action Stat*®, onde avaliou-se os seguintes parâmetros e critérios de aceitação:

- Igualdade de intercepto, se p-valor > 0,05 verifica-se que as retas possuem o mesmo intercepto.
- Paralelismo, se p-valor > 0,05 verifica-se que as retas são paralelas.
- Coincidência, se p-valor > 0,05 verifica-se que as retas são coincidentes.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Preparo de amostras

As oito condições de preparo de amostra (testes A a I) foram avaliadas pelos resultados de recuperação dos princípios ativos CBD e THC (Tabela 1) estimados em relação aos valores de concentração estabelecidos pelos fabricantes. O valor de recuperação média utilizada como critério de aceitação, de acordo com a concentração de trabalho foi de 90% a 107% e 5,3% de DPR (AOAC, 2016).

Tabela 1 - Recuperações médias no desenvolvimento da técnica de preparo da amostra

Teste	Recuperação média (%)		
	CBD		THC
	Produto 1	Produto 2	Produto 2
A		112,15 ± 0,07	102,69 ± 0,19
B	0 min*	95,43 ± 9,54	104,38 ± 1,39
	15 min*	103,12	108,04 ± 7,43
	30 min*	103,19 ± 3,76	105,71 ± 5,11
B	0 min*	106,51 ± 2,79	108,99 ± 4,02
	15 min*	116,35 ± 0,59	104,81 ± 2,48
	30 min*	109,44 ± 3,31	103,96 ± 2,59
C		96,48 ± 5,55	109,69 ± 2,83
D		67,31 ± 3,79	78,50 ± 5,41
E		129,60 ± 5,95	101,71 ± 4,67
F		93,04 ± 4,72	106,00 ± 1,47
G		106,82 ± 2,23	
H		105,35 ± 0,56	104,07 ± 0,04
I		102,45 ± 4,32	104,25 ± 1,39

* Tempo no ultrassom

Fonte: O autor, 2022.

O teste A corresponde às condições do método analítico do fabricante do produto 1, portanto, o resultado do produto 2 neste método foi satisfatório para análise

de THC e insatisfatório para CBD, com valor superior ao estabelecido como critério de aceitação. No entanto, foi observada baixa variação de resposta entre as replicatas dos analitos.

As condições de análise do método do fabricante do produto 2 não puderam ser aplicadas ao produto 1, pois o solvente de extração não permitiu a solubilização da sua matriz oleosa.

Dois testes (B e C) correspondem a métodos descritos na literatura aplicados a produtos de interesse medicinal. O teste B foi o proposto no trabalho de Ciolino e colaboradores (2018), em que a amostra é transferida para um frasco contendo etanol 95%, misturada em vórtex para dispersar ou dissolver a matriz, e sonicadas por 30 minutos caso a matriz não tenha sido dissolvida.

Observou-se que em cinco minutos de agitação em vórtex foi obtida uma dispersão eficaz das amostras no solvente de extração, portanto, esta condição foi mantida para avaliação do método descrito neste artigo. Além da reprodução do método, avaliou-se a influência no tempo de ultrassom (0, 15 e 30 minutos) para a recuperação dos analitos.

Este teste foi realizado em duas ocasiões, na primeira avaliou-se apenas a recuperação de CBD e na segunda foram avaliadas as recuperações dos dois analitos. Para as três variações do tempo foram observadas recuperações, de $95,43 \pm 9,54\%$ até $116,35 \pm 0,59\%$ para CBD e de $103,28 \pm 2,82\%$ até $105,73 \pm 2,67\%$ para THC. A influência do tempo no ultrassom mostrou ser mais importante para o produto 1, formulado em óleo. Para as replicatas que não passaram pelo ultrassom foi observado uma recuperação menor, em relação as que permaneceram por 15 e 30 minutos.

O teste C foi o proposto no trabalho de Carvalho e colaboradores (2020). Conforme descrito no artigo, as amostras foram pesadas em tubos de centrífuga, o solvente de extração metanol: *n*-hexano (9:1 v/v) foi adicionado, a homogeneização foi feita em centrífuga a $1286 \times g$ por 1 minuto, em seguida, as amostras foram levadas para banho de ultrassom por 30 minutos, depois refrigeradas a -20°C por 30 minutos e centrifugadas a $2571 \times g$ por 20 minutos. O sobrenadante foi filtrado em membrana PTFE $0,22 \mu\text{m}$ e diluído conforme necessidade.

Os volumes das alíquotas foram medidos de modo gravimétrico, e valores de recuperação foram corrigidos de acordo com as densidades dos produtos. Pelos

resultados obtidos, o método foi mais adequado para o produto 2 do que para o 1, no qual o DPR foi maior do que 5%, entretanto, o valor de recuperação para CBD no produto 2 encontra-se acima de 107%.

A partir dos resultados obtidos com os métodos reproduzidos, foram propostas novas condições a serem testadas com os solventes de extração utilizados anteriormente no presente trabalho. Na literatura, solventes como triclorometano, acetato de etila e propanol, foram extensamente empregados no preparo de amostras semelhantes, porém estes não foram testados devido a boa recuperação já alcançada com os solventes utilizados nos métodos avaliados. Além disso, os solventes testados apresentam menor toxicidade e/ou maior disponibilidade no laboratório.

Valores de recuperações próximos à 100% foram obtidos para os dois produtos na reprodução dos métodos de Ciolino e colaboradores (2018) e Carvalho e colaboradores (2020). Porém, este último método emprega um longo processo de extração (aproximadamente 80 minutos), portanto, foi proposto um teste em que fosse utilizado o solvente de extração usado por Carvalho e colaboradores (2020) no procedimento descrito por Ciolino e colaboradores (2018) (Teste D).

No teste D, as amostras foram transferidas para um tubo contendo metanol:*n*-hexano (9:1), agitadas por inversão, posteriormente por vórtex durante cinco minutos e levadas ao ultrassom por 15 minutos, por fim, diluídas para obtenção de uma concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, filtradas e transferidas para vial. A proposta de alteração no método mostrou-se insatisfatória, porque as recuperações foram inferiores ao necessário para ambas as amostras.

O mesmo procedimento também foi testado alterando o solvente de extração para metanol (Teste E). Os resultados de recuperações médias foram próximos a 100%, entretanto, os coeficientes de variação ficaram próximos ao limite aceitável (5,00%).

Alterações nas condições analíticas do método do fabricante do produto 1 também foram propostas. Como a desvantagem observada no método original foi a realização de diversas etapas, que consomem mais de 60 minutos para execução, foi testada a adaptação do método condensando todas as etapas em apenas uma (Teste F). O resultado do teste foi satisfatório para os dois produtos, porém, o valor de DPR para o produto 1 foi próximo ao limite de 5,00%.

No teste G, propôs-se um novo procedimento, com metanol:água (9:1) como solvente de extração, e mais etapas de processo de extração da amostra, além da adição de uma etapa de centrifugação para redução de interferentes da matriz. Como o produto 1 foi o que apresentou desempenho inferior nos métodos testados anteriormente, apenas ele foi utilizado como amostra. Obteve-se como resultado valor de recuperação de CBD dentro do critério de aceitação.

Apesar dos bons resultados já obtidos, testou-se mais uma condição, com menor tempo de execução. Um volume de 100 µL das amostras foi transferido para um tubo de polipropileno, adicionou-se etanol 95%, agitou-se por inversão e depois em vórtex por cinco minutos, metade das replicatas ficaram por cinco minutos no ultrassom (Teste H) e a outra metade seguiu direto para a etapa seguinte (Teste I), em que todas foram centrifugadas a 3214 x g durante 10 minutos. Por fim, diluiu-se o sobrenadante à uma concentração de 100 µg.mL⁻¹ e filtrou-se a solução em membrana PTFE 0,22 µm para vial. O peso destas alíquotas foi registrado, e posteriormente os valores de recuperação foram corrigidos de acordo com a densidade. Os resultados de ambos os testes foram satisfatórios.

Nos testes B, D e E foram realizados os mesmos procedimentos de extração e centrifugação das amostras, variando apenas os solventes de extração, etanol 95%, metanol:*n*-hexano (9:1) e metanol, respectivamente. Observou-se que a extração com etanol:água (95:5) foi a mais eficiente, assim como observado por Ciolino e colaboradores (2018) e Brighenti e colaboradores (2017). Este resultado se deve a alta afinidade do etanol pela estrutura molecular dos canabinoides (CITTI et al., 2018a).

Ciolino e colaboradores (2018) avaliaram a eficiência de extração de quatro solventes, etanol, acetonitrila, etanol:água (95:5) e acetonitrila:água (95:5), frente aos canabinoides THCA, Δ9-THC, CBGA, CBD, CBDA e CBN presentes em amostras comerciais de planta e de óleo da planta. Já Brighenti e colaboradores (2017) observaram que em comparação com metanol, metanol:triclorometano (9:1), acetona e hexano, o etanol foi o que apresentou polaridade mais adequada para extração de canabinoides não psicoativos CBD, CBG, CBDA, CBGA em inflorescências da *Cannabis sativa* L.

Por fim, durante os testes para o desenvolvimento do método, foi possível notar que por se tratar de amostras com maior viscosidade, a alíquotagem em uma

micropipeta mecânica de deslocamento de ar não foi eficaz, pois a solução não consegue ser totalmente escoada da ponteira, o que pode ocasionar erros. Este problema pode ser solucionado com a utilização de pipeta e ponteira de deslocamento positivo ou, pela amostragem por medida gravimétrica, caso a densidade do produto seja conhecida.

Dentre os testes realizados, o teste H foi o que apresentou resultados de recuperação dentro dos limites estabelecidos, com baixo DPR e menor tempo de execução, além de ter sido um dos testes em que o volume das alíquotas foram também pesadas. Portanto, dentre os métodos testados, este foi o selecionado.

4.2 Desenvolvimento do Método Analítico

No desenvolvimento do método de análise de canabinoides por CLAE-UV, parâmetros como FE, Fase Móvel (FM), fluxo, modo de eluição, volume de injeção da amostra e comprimento de onda em que os analitos apresentam seus máximos de absorção foram avaliados e selecionados para estabelecer a melhor condição cromatográfica, em um intervalo de tempo razoável, capaz de resolver os sinais dos analitos presentes na solução de SQR, principalmente CBD, THC, CBDA e CBN.

Durante o desenvolvimento, utilizou-se como FE octadecilsilano (C18), que também foi a mais utilizada nos métodos descritos na literatura. Apesar de nestes métodos serem utilizadas majoritariamente colunas cromatográficas com tamanhos de partículas inferiores a 3 μm , que auxilia a eficiência de separação dos analitos, no presente trabalho utilizou-se uma com 5 μm devido a disponibilidade no laboratório (CITTI et al., 2018a; LAZARJANI et al., 2020; MICALIZZI et al., 2021).

As soluções de FM para o sistema cromatográfico mais utilizadas nos métodos da literatura foram de ácido fórmico em água e em acetonitrila. Contudo, alguns artigos obtiveram melhor resolução dos picos com a utilização de soluções tampão como FM (CITTI et al., 2018b; HÄDENER; KÖNIG; WEINMANN, 2019; MICALIZZI et al., 2021; PROTTI et al., 2019; WANG et al., 2018).

Križman (2020) ao desenvolver método para analisar CBDV, CBDA, CBGA, CBG, CBD, THCV, CBN, Δ^9 -THC, Δ^8 -THC, THCA e CBC, observou que a adição de formiato de amônio na solução de ácido fórmico com acetonitrila, pH aproximadamente 3,3, foi determinante na seletividade do método, por diminuir o

tempo de retenção de CBDA e CBGA e ao mesmo tempo aumentar o tempo de retenção de CBG e CBD. Assim como Križman (2020), Carvalho e colaboradores (2020) também utilizaram, como FM, solução tampão formiato de amônio para separação de CBDA, CBD, THCA, CBN e THC.

Para seleção da FM, Ciolino e colaboradores (2018) avaliaram soluções de acetonitrila e metanol e condições tamponantes com a adição de ácido acético, ácido fórmico ou ácido cítrico e pH entre 2,5 e 5,1. A fase que obteve melhor resultado para análise dos canabinoides foi acetonitrila: 0,5% ácido acético (66:34) pH 2,9, e a FM com ácido fórmico ocasionou muita retenção do pico de THCA devido ao seu pH mais baixo.

Fekete e colaboradores (2018) avaliaram a influência do pH de três tampões, formiato de amônio (pH 2,7), acetato de amônio (pH 5,0) e amônio (pH 8,9), e de dois modificadores orgânicos da FM, um prótico, etanol, e um aprótico, acetonitrila. Os pHs 5,0 e 8,9 foram os que apresentaram melhores resultados, sendo que, em pH 8,9, os compostos ácidos apresentaram formatos de picos mais largos e com cauda. Quanto aos solventes, foi escolhido a acetonitrila, que apresentou uma janela de eluição maior e uma capacidade de pico mais alta do que o etanol, apesar deste último promover maior seletividade.

No entanto, além das informações da literatura, considerou-se a praticidade no preparo das soluções e a compatibilidade das FM com CLAE acoplada a espectrometria de massas sequencial, caso posteriormente haja interesse de transferência do método para esta outra técnica analítica considerada mais eficiente na análise de produtos derivados da cannabis para fins medicinais.

Portanto, soluções a 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila e em água, utilizadas como FM A e B, respectivamente, foram testadas, em diferentes proporções e modos de eluição. Todos os testes foram realizados em fluxo de 0,6 mL.min⁻¹.

Foram testados gradientes iniciando com maior e menor porcentagem da FM aquosa, seguido de aumento da fase orgânica. Nas corridas em que esta porcentagem era maior do que 50%, foi observado que os picos não foram eluídos em corridas de até 20 minutos.

Os melhores resultados de resolução foram obtidos em eluições em gradiente, com proporção inicial de 50:50, com aumento da fase orgânica até 95%. Dentre estes gradientes, o utilizado no teste X (Quadro 3) foi o que apresentou melhor resultado de

resolução. Estas proporções também foram utilizadas por Protti e colaboradores (2019) para separação de CBD, THC, CBN, CBDA e THCA.

Quadro 3 - Gradiente dos testes X e Z

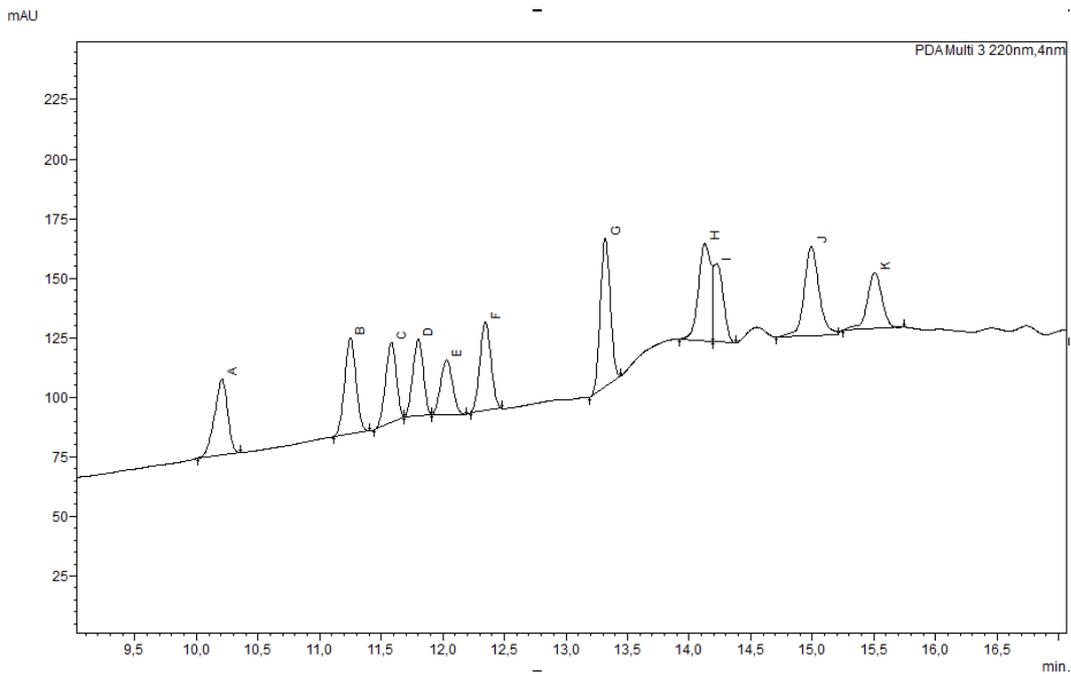
Tempo (min)	Gradiente X		Tempo (min)	Gradiente Z	
	FM A (%)	FM B (%)		FM A (%)	FM B (%)
0,0	50	50	0,0	50	50
10,0	95	5	10,0	95	5
20,0	95	5	16,0	95	5
22,0	50	50	17,0	50	50
26,0	50	50	18,0	50	50

Fonte: O autor, 2022.

No teste X, foi observado que os picos foram eluídos entre 10 e 16 minutos. Neste intervalo, a proporção da FM encontrava-se em 95:5. Portanto, também foi realizado teste em modo isocrático com esta proporção, entretanto, devido a força do eluente, alguns picos eluíram ainda no tempo morto e houve sobreposições de outros.

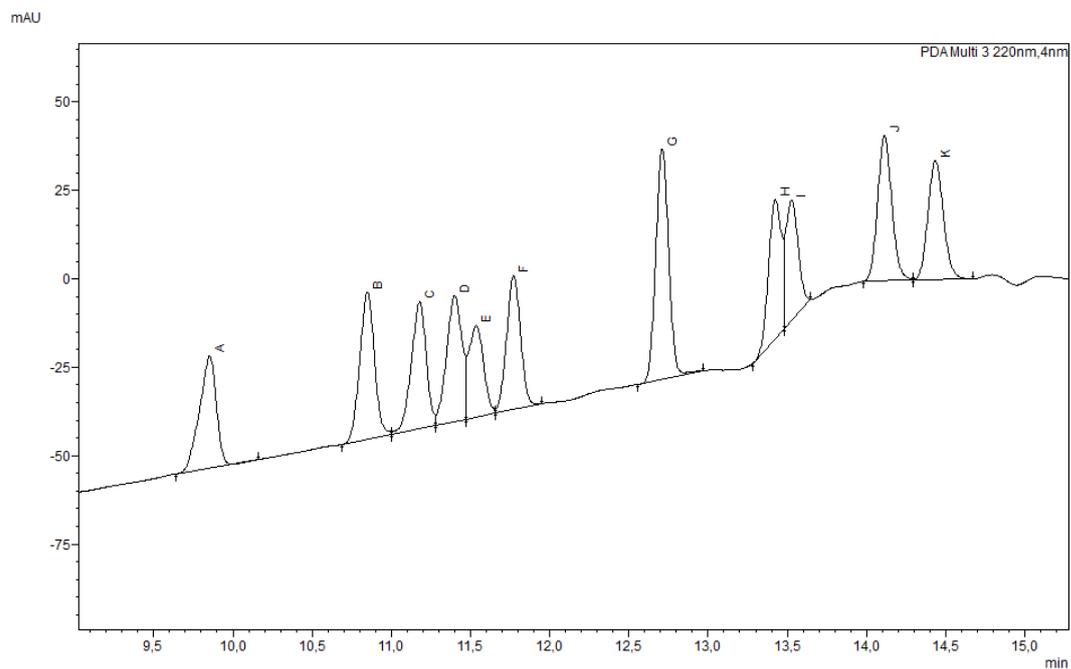
Deste modo, decidiu-se retornar para a condição do teste X, porém, reduziu-se o tempo de corrida, uma vez que os sinais foram eluídos em até 16 minutos, logo, uma corrida de 26 minutos mostrou-se desnecessária. Por conseguinte, a eluição em gradiente descrita no teste Z - Quadro 3, foi testado, com utilização do forno da coluna em 25°C e em 37°C (Figuras 2 e 3). Os sinais cromatográficos dos canabinoides foram eluídos entre 9 e 16 minutos, e nomeados de A – K.

Figura 2 - Cromatograma do teste Z em 25°C, com analitos na concentração de 0,002 mg.mL⁻¹



Fonte: O autor, 2022.

Figura 3 - Cromatograma do teste Z em 37°C, com analitos na concentração de 0,002 mg.mL⁻¹



Fonte: O autor, 2022.

A temperatura mais elevada reduziu a resolução de 7 dos 11 sinais cromatográficos (Tabela 2). Portanto, utilizando a condição com temperatura de 25°C, foram injetadas as soluções SQR de CBD, THC, CBDA e CBN para comparação dos

tempos de retenção, com o objetivo de identificar os picos correspondentes a estes canabinoides.

Os outros sinais foram deduzidos pela ordem de eluição através da comparação com o método do produto 2, que possui FM com composição semelhante a testada e pela comparação dos cromatogramas obtidos após injeção das três soluções contendo: CBG, CBN e CBC; CBDA, THCV e THCA; CBDV e CBO. Este recurso foi utilizado uma vez que os padrões destes canabinoides não estavam disponíveis de forma isolada.

A correspondência entre os sinais cromatográficos e cada canabinoide, além dos valores de resolução encontram-se na Tabela 2. Apesar de não ter sido possível obter resolução suficiente para os 11 canabinoides, considerou-se que a resolução entre os canabinoides do objetivo do presente trabalho é atingida.

Tabela 2 – Resolução dos picos nos testes Z a 25°C e 37°C.

Sinais cromatográficos	Canabinoides correspondentes	Resolução teste Z – 25°C	Resolução teste Z – 37°C
A	CBDV	-	-
B	CBDA	5,55	5,31
C	CBG	1,91	1,87
D	CBD	1,24	1,15
E	CBO	1,22	0,61
F	THCV	1,69	1,17
G	CBN	5,94	5,88
H	Δ 9-THC	3,60	4,10
I	Δ 8-THC	0,16	0,48
J	CBC	1,39	2,94
K	THCA	2,37	1,84

Fonte: O autor, 2022.

Os sinais que apresentaram resolução inferior a necessária para quantificação no teste foram CBD - CBG, CBO - CBD e Δ 8-THC - Δ 9-THC. As duplas CBD - CBG e Δ 8-THC – Δ 9-THC não apresentaram resolução de linha de base em nenhuma das condições testadas. A dificuldade na separação entre CBG e CBD também foi relatado

na literatura. Para resolver estes picos, Fekete e colaboradores (2018) utilizaram temperatura de 50°C e Križman (2020), 37°C, ambos utilizando como FE octadecilsilano, entretanto, também utilizaram soluções tampão como parte aquosa da FM.

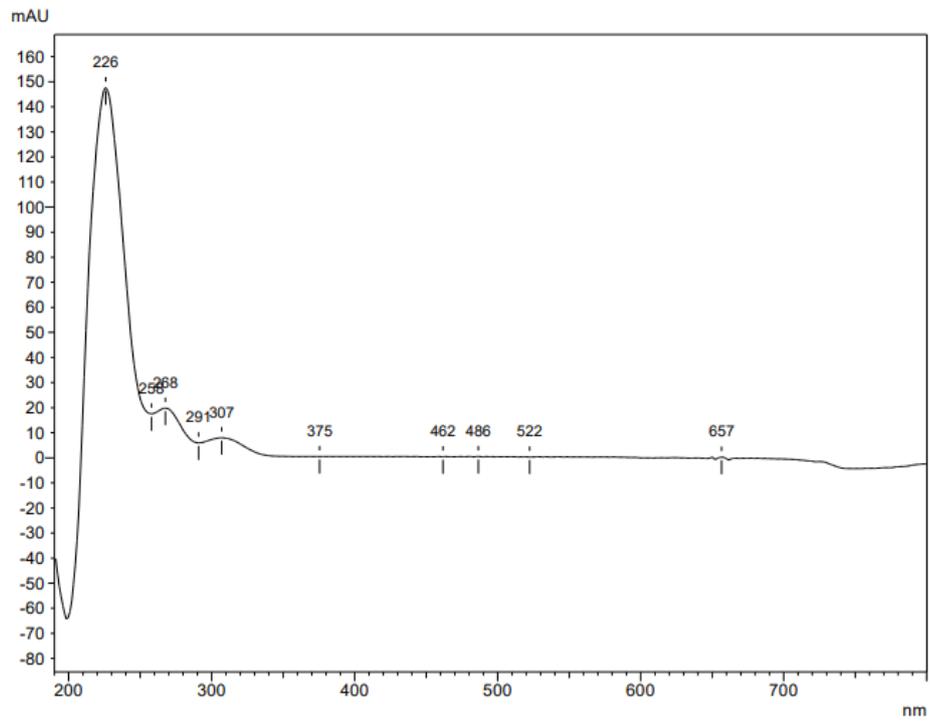
Citti e colaboradores (2018b) conseguiram obter resolução destes picos pela alteração do modo de eluição, de isocrático para gradiente, e pela troca do comprimento da coluna cromatográfica, de 50 mm para 100 mm, ambas C18, com o mesmo diâmetro e tamanhos de partícula, 3,0 mm e 2,7 µm, respectivamente. Nemeškalová e colaboradores (2020), também utilizaram como FE uma coluna C18 e modo de eluição em gradiente para tentar resolver os picos CBD, CBG, entretanto, não obtiveram sucesso e a separação foi considerada insuficiente para detecção apenas por UV.

No método do fabricante do produto 2, a dupla CBD – CBG, junto com CBG – CBDA e CBC – THCA são consideradas críticas para adequação do sistema. As resoluções que estas duplas obtiveram no método desenvolvido foram iguais ou superiores ao limite especificado pelo método do fabricante. Portanto, baseado no método desenvolvido, podem ser realizadas otimizações, a fim de conseguir melhor separação entre os onze picos presentes na solução.

Quanto a detecção, foi selecionado o comprimento de onda de 220 nm, uma vez que foi o valor aproximado de comprimento de onda com absorção máxima para os picos na solução de SQR e nas soluções de amostra, tanto para os canabinoides ácidos quanto para os neutros. Este comprimento de onda também foi utilizado nos métodos dos fabricantes 1 e 2.

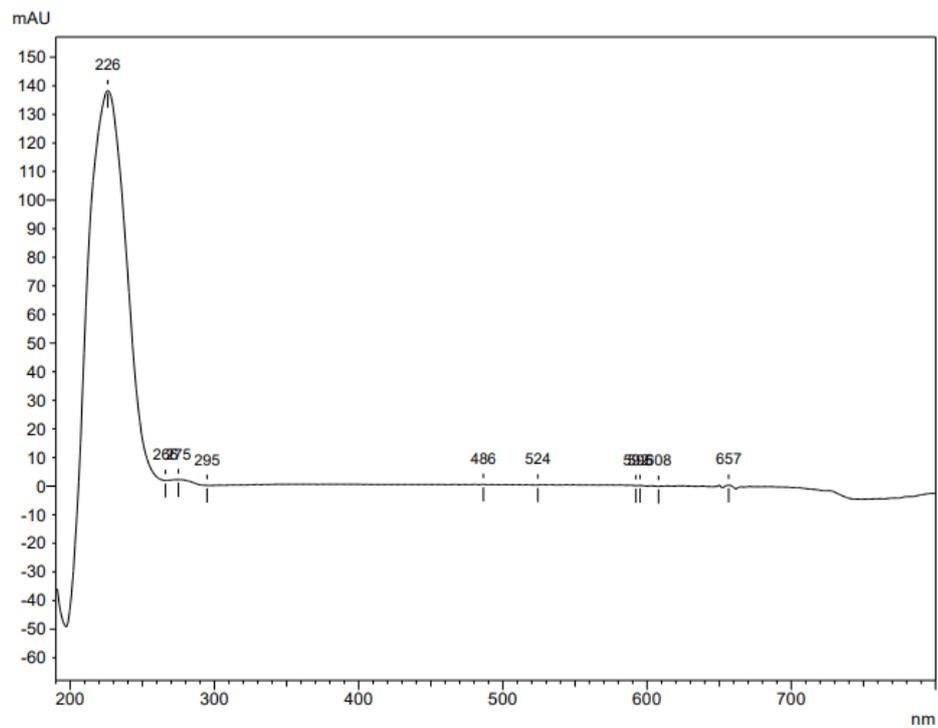
Assim como relatado na literatura, foi observado que os canabinoides ácidos também apresentaram picos de absorção entre 270 nm e 310 nm, o que pode ser observado na Figura 4. O perfil de absorção de CBD, Δ9-THC, CBN são apresentados nas Figuras 5 - 7 (CITTI et al., 2018a; LAZARJANI et al., 2020).

Figura 4 – Espectro de absorção de CBDA na solução SQR



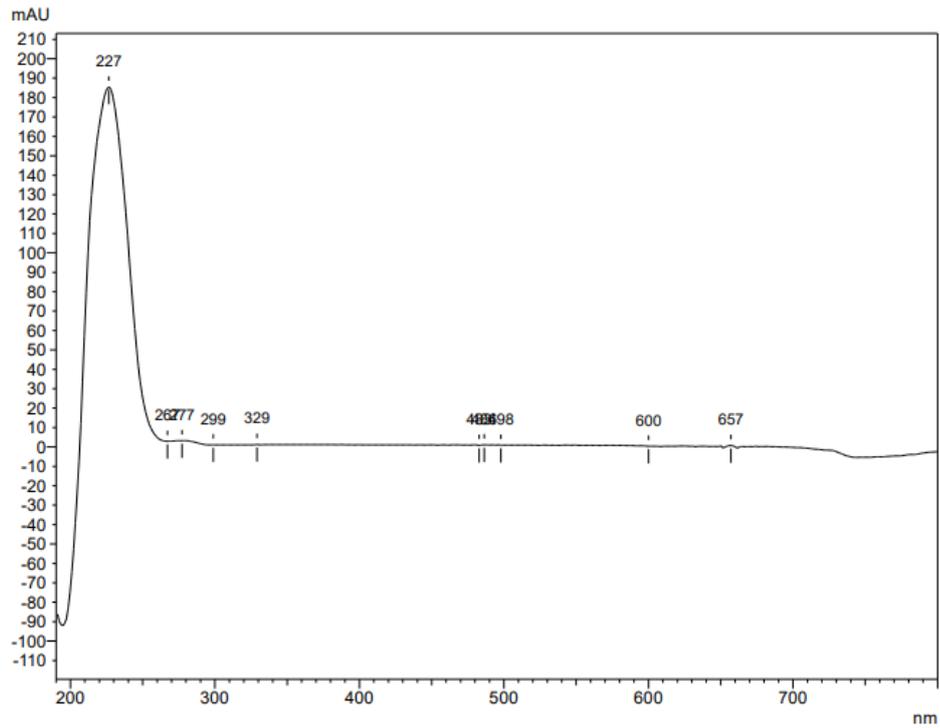
Fonte: O autor, 2022.

Figura 5 - Espectro de absorção de CBD na solução SQR



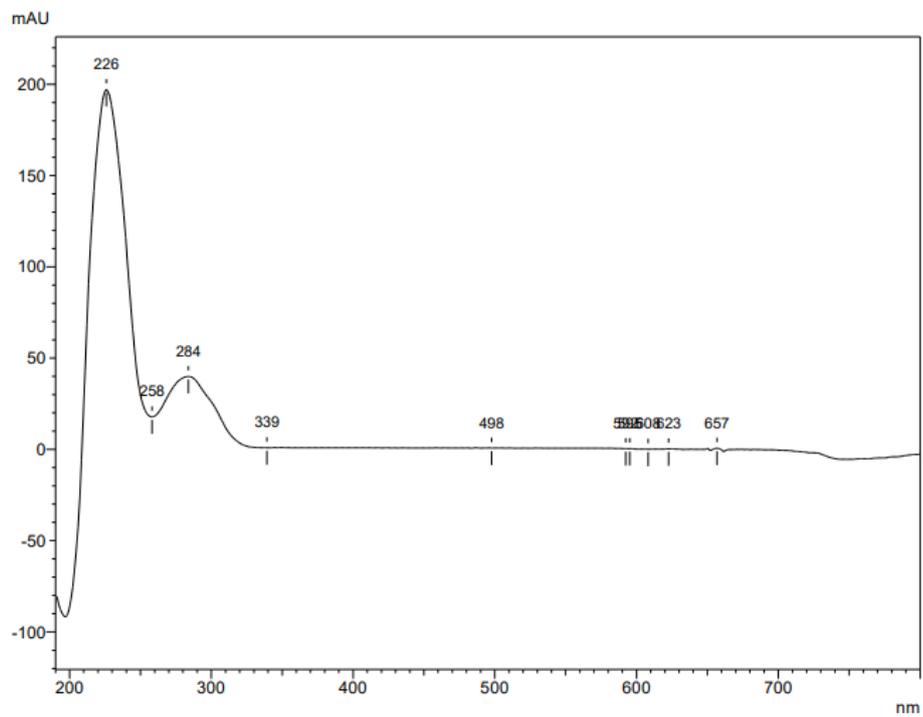
Fonte: O autor, 2022.

Figura 6 - Espectro de absorção de THC na solução SQR



Fonte: O autor, 2022.

Figura 7 - Espectro de absorção de CBN na solução SQR



Fonte: O autor, 2022.

As condições analíticas do método que ofereceu, dentre as condições testadas, valores de resolução suficientes e menor tempo de corrida, estão apresentadas no Quadro 4.

Quadro 4 - Condições do método desenvolvido

FE	C18, 5 μ m, (150 x 4,6)mm	
Detector	UV (220 nm)	
Fluxo	0,6 mL.min ⁻¹	
Volume de injeção	20 μ L	
FM	A: 0,1% ácido fórmico em acetonitrila B: 0,1% ácido fórmico em água	
Gradiente	0 min	50%B
	10 min	5%B
	16 min	5%B
	17 min	50%B
	18 min	50%B

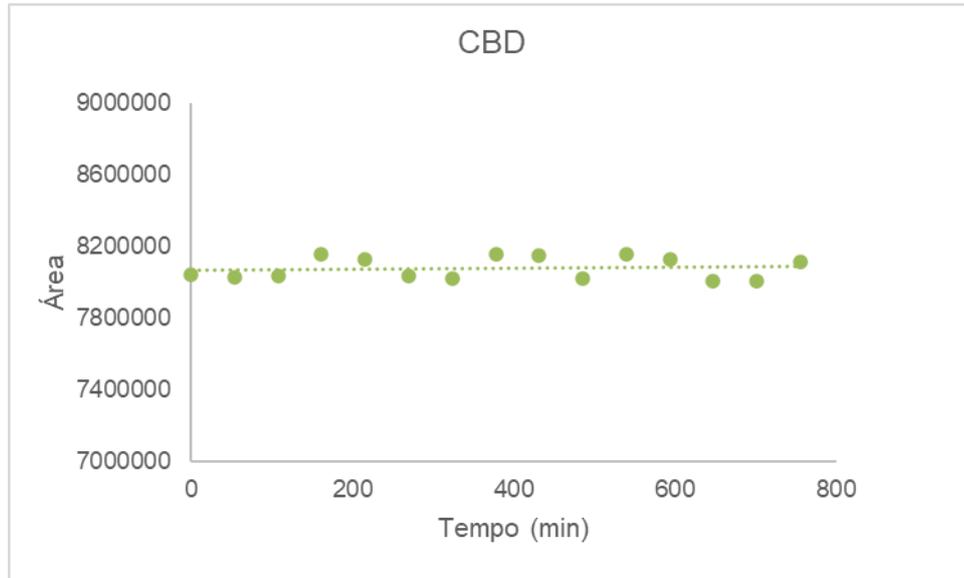
Fonte: O autor, 2022.

4.3 Estabilidade das SQR CBD e THC

A estabilidade das soluções SQR de CBD e THC em etanol 95% foi avaliada na mesma concentração de trabalho do método desenvolvido. O estudo se deu pelo armazenamento da solução durante as 14 horas em que o ensaio foi realizado, no menor valor de temperatura permitido (10°C).

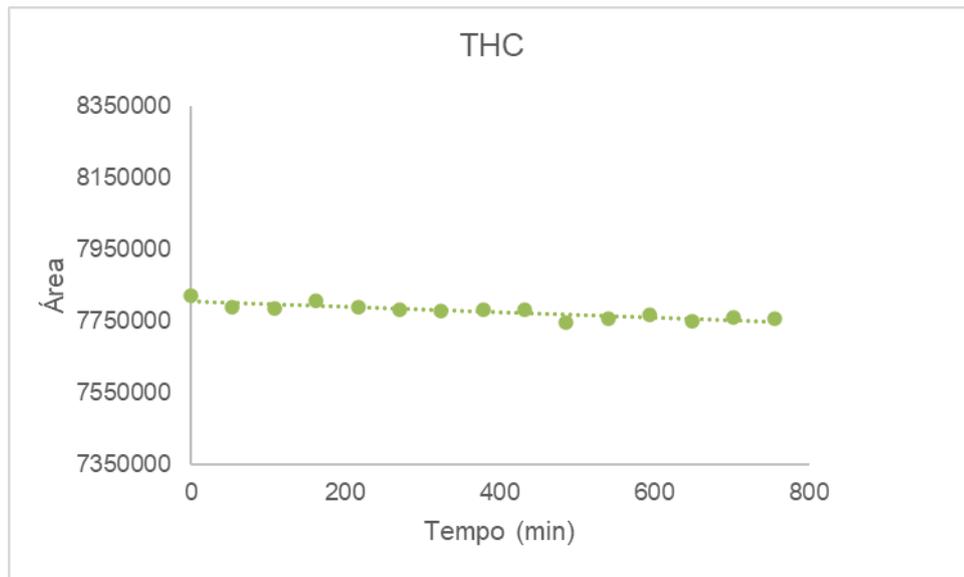
Nas Figuras 8 e 9 são apresentados os valores de áreas obtidos em função do tempo das injeções destas soluções, de CBD e THC, respectivamente. O DPR das áreas foi de 0,76% para CBD e 0,27% para THC, valores dentro do limite recomendado entre injeções, que é de 2%. Logo, a solução mostrou-se estável no período de 14 horas nesta temperatura.

Figura 8 – Relação da área obtida da SQR CBD pelo tempo no estudo de estabilidade



Fonte: O autor, 2022.

Figura 9 - Relação da área obtida da SQR THC pelo tempo no estudo de estabilidade



Fonte: O autor, 2022.

4.4 Parâmetros de avaliação do método

4.4.1 Precisão

O resultado do ensaio de repetibilidade do método para CBD e THC nos produtos 1 e 2 estão apresentados na Tabela 3 e os de precisão intermediária na

Tabela 4. Os valores calculados de DPR foram inferiores a 5,0%, tanto no ensaio de repetibilidade, quanto no de precisão intermediária, o que atesta a precisão do método.

Tabela 3 – Valores de repetibilidade CBD e THC nos produtos 1 e 2

CBD				THC	
Produto 1		Produto 2		Produto 2	
Replicata	Área média (n = 3)	Replicata	Área média (n = 3)	Replicata	Área média (n = 3)
TR1	7450861	TR1	7522577	TR1	8219004
TR2	7587761	TR2	7346501	TR2	7993089
TR3	7592263	TR3	7418798	TR3	8161716
TR4	7447707	TR4	7368649	TR4	8079844
TR5	7781164	TR5	7451000	TR5	8179851
TR6	7543314	TR6	7494959	TR6	8222836
DPR (%)	1,62	DPR (%)	0,93	DPR (%)	1,10

Fonte: O autor, 2022.

Tabela 4 - Valores de precisão intermediária de CBD e THC nos produtos 1 e 2

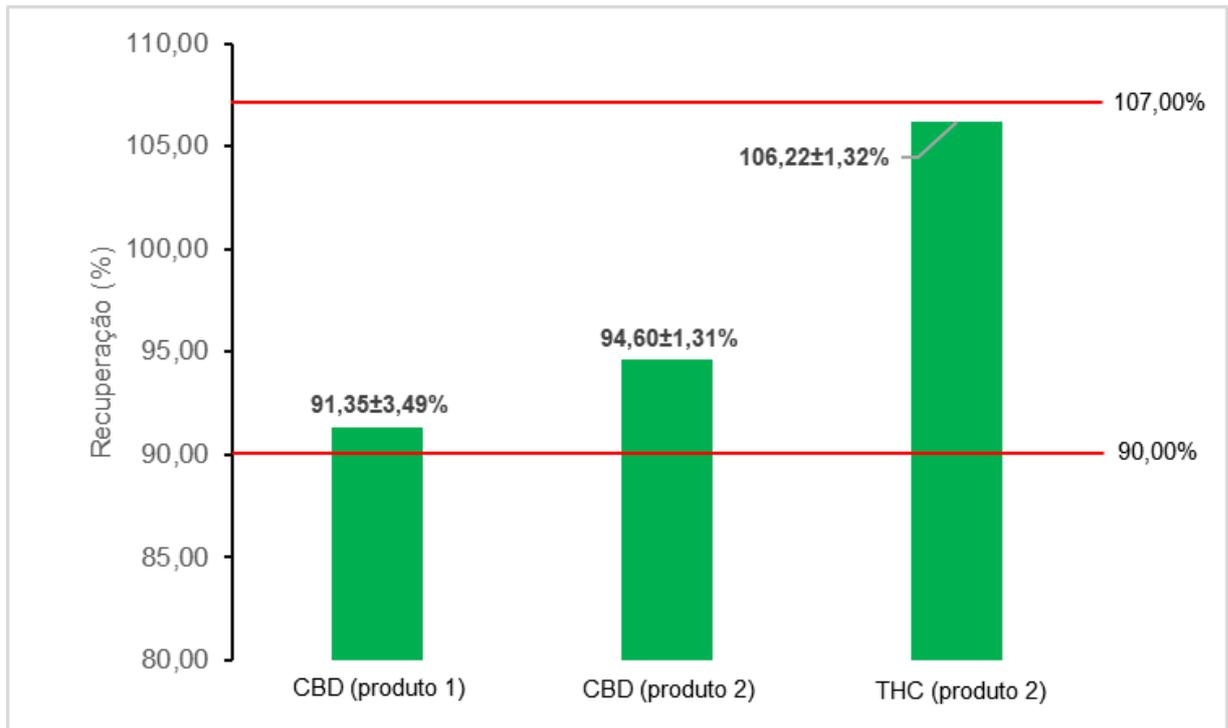
CBD				THC	
Produto 1		Produto 2		Produto 2	
Replicata	Área média (n = 3)	Replicata	Área média (n = 3)	Replicata	Área média (n = 3)
TR1	7025756	TR1	7643853	TR1	8328117
TR2	7562213	TR2	7603461	TR2	8295262
TR3	7267080	TR3	7713668	TR3	8396326
TR4	7274014	TR4	7673765	TR4	8378213
TR5	7181479	TR5	7488226	TR5	8186457
TR6	7722013	TR6	7470315	TR6	8121187
DPR (%)	3,49	DPR (%)	1,31	DPR (%)	1,32

Fonte: O autor, 2022.

4.4.2 Exatidão

Os resultados do ensaio de exatidão para CBD e THC nos produtos 1 e 2 são apresentados na Figura 10. De acordo com o critério definido, os resultados de recuperação e DPR encontram-se dentro das faixas de aceitabilidade, portanto, considera-se que o método possui exatidão.

Figura 10 - Resultados de recuperação de CBD e THC nos produtos 1 e 2



Fonte: O autor, 2022.

4.4.3 Linearidade

Os dados obtidos no ensaio de linearidade para CBD estão dispostos na Tabela 5, e os resultados da avaliação pelo *Software Action Stat®* na tabela 6.

Tabela 5 – Dados do estudo de linearidade para CBD

Concentração (mg.mL ⁻¹)	Curva analítica no diluyente	Curva de adição- padrão produto 1	Curva de adição- padrão produto 2
	Área média (n = 3)	Área média (n = 3)	Área média (n = 3)
0,050	5159794	4522805	4571544
0,075	6822220	6504010	6337182
0,100	7943369	7811874	7691343
0,125	8700938	8933920	8586285
0,150	9537860	9601698	9357452

Fonte: O autor, 2022.

Tabela 6 - Avaliação do estudo de linearidade para CBD

Matrizes avaliadas	Coefficiente angular (p-valor)	R	Homocedasticidade (p-valor)	Normalidade (p-valor)
Diluyente	0,002	0,9857	0,4867	0,5406
Produto 1	0,0028	0,9822	0,8238	0,0695
Produto 2	0,0023	0,9847	0,7704	0,4254

Fonte: O autor, 2022.

De acordo com os resultados, não foram rejeitados a significância do modelo linear pelo teste F da ANOVA, a hipótese de normalidade dos resíduos e a homocedasticidade da variância. Os valores dos coeficientes de correlação foram inferiores a 0,990, portanto, a linearidade da curva na faixa de 50% a 150% da concentração de trabalho não foi confirmada por este teste, apenas pelos outros três avaliados. Cabe ressaltar que apesar do coeficiente de correlação r ser amplamente empregado como indicação da qualidade do ajuste do modelo, o mesmo é interpretado equivocadamente como teste de linearidade por si e não deve ser usado isoladamente (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002). O coeficiente de correlação r deve ser usado somente para descrever o modelo de regressão.

Os dados obtidos no ensaio de linearidade para THC estão dispostos na Tabela 7, os resultados da avaliação pelo *Software Action Stat®* na tabela 8.

Tabela 7 – Dados do estudo de linearidade para THC

Concentração (mg.mL ⁻¹)	Curva analítica no diluyente	Curva de adição-padrão produto 2
	Área média (n = 3)	Área média (n = 3)
0,050	4773568	4958940
0,075	6438345	6670001
0,100	7774196	8041862
0,125	8756579	9091993
0,150	9724605	9947523

Fonte: O autor, 2022.

Tabela 8 - Avaliação do estudo de linearidade para THC

Matrizes avaliadas	Coefficiente angular (p-valor)	R	Homocedasticidade (p-valor)	Normalidade (p-valor)
Diluyente	0,0008	0,9924	0,6697	0,5779
Produto 2	0,0011	0,9905	0,8524	0,2514

Fonte: O autor, 2022.

De acordo com os resultados, não foram rejeitados a significância do modelo linear pelo teste F da ANOVA, a hipótese de normalidade dos resíduos e a homocedasticidade da variância. O valor dos coeficientes de correlação foram superiores 0,990, portanto, a linearidade da curva na faixa de 50% a 150% da concentração de trabalho foi confirmada.

4.4.4 Seletividade

Os resultados para o ensaio de seletividade para CBD nos produtos 1 e 2 são apresentados na tabela 9, e para THC no produto 2 na tabela 10.

Tabela 9 - Avaliação do estudo de seletividade para CBD

	Igualdade do Intercepto (p-valor)	Paralelismo (p-valor)	Coincidência (p-valor)
Diluyente – Produto 1	0,2502	0,3044	0,4781
Diluyente – Produto 2	0,284	0,4865	0,3395

Fonte: O autor, 2022.

Tabela 10 - Avaliação do estudo de seletividade para THC

	Igualdade do Intercepto (p-valor)	Paralelismo (p-valor)	Coincidência (p-valor)
Diluyente – Produto 2	0,9098	0,8999	0,9913

Fonte: O autor, 2022.

Na comparação entre as retas do diluente com os produtos 1 e 2 para o analito CBD e na comparação entre a reta do diluente com o produto 2 para THC, foi observado que elas possuem o mesmo intercepto, são paralelas e coincidentes. Portanto, foi possível constatar que o método é seletivo.

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi possível desenvolver uma metodologia para determinação de CBD, THC, CBDA e CBN por CLAE-UV. As condições cromatográficas otimizadas permitiram uma análise rápida, em tempo total de 18 minutos, e ótima resolução entre os picos cromatográficos.

Na avaliação de metodologias para preparo das amostras estudadas, concluiu-se que o procedimento que empregou etanol: água (95:5) como solvente de extração, etapas de agitação por inversão, por vórtex e ultrassom, além de centrifugação apresentou melhores resultados de recuperação em menor tempo de execução.

A metodologia otimizada (condições cromatográficas e preparo de amostra) foi aplicada a dois produtos, e através da avaliação de parâmetros de validação de método analítico, foi possível constatar que ela é precisa, exata, linear e seletiva para CBD e THC.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Autorização Sanitária de produtos de Cannabis**, Brasília, 09 ago. 2021. Disponível em:

[https://www.gov.br/anvisa/pt-](https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/educacaoepesquisa/webinar/medicamentos/medicamentos)

[br/assuntos/educacaoepesquisa/webinar/medicamentos/medicamentos](https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/educacaoepesquisa/webinar/medicamentos/medicamentos). Acesso em 24 out. 2021

AOAC INTERNATIONAL. Guidelines for Standard Method Performance Requirements (Appendix F).

Rockville: AOAC International, 2016.

BARON, Eric P. Medicinal Properties of Cannabinoids, Terpenes, and Flavonoids in Cannabis, and Benefits in Migraine, Headache, and Pain: An Update on Current Evidence and Cannabis Science. **Headache**, v. 58, n. 7, p. 1139–1186, 2018. DOI: 10.1111/head.13345.

BEAUFOUR IPSEN FARMACÊUTICA LTDA. **MEVATYL: Solução Spray THC 27 mg/mL + CBD 25 mg/mL**. Bulário Eletrônico ANVISA, 2021. Disponível em:

<https://consultas.anvisa.gov.br/#/bulario/q/?nomeProduto=Cerdelga>. Acesso em: 14 ago, 2021

BENVENUTI, Stefania. Development of a new extraction technique and HPLC method for the analysis of non-psychoactive cannabinoids in fibre-type Cannabis sativa L. (hemp). **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [S. l.], v. 143, p. 228–236, 2017. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.05.049.

BERTOLETE, José Manoel. **Aspectos históricos e sociais do uso de maconha no Brasil e no mundo**. In: Diehl, A.; Pillon, S. C. (org.). *Maconha: prevenção, tratamento e políticas públicas*. Porto Alegre: Artmed, 2021. Cap. 1

BRASIL. Lei nº 5.991, de 17 de dezembro de 1973. Dispõe sobre o controle sanitário do comércio de drogas, medicamentos, insumos farmacêuticos e correlatos, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. 17 dez. 1973, p. 13049

BRASIL. Lei nº 6360, de 23 de setembro de 1976. Dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos, e da outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. 24.set. 1976, pág 012647 Seção 1.

BRASIL. Lei nº 8080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. 20 set. 1990

BRASIL. Portaria/SVS nº 344, de 12 de maio de 1998. Aprova o Regulamento Técnico sobre substâncias e medicamentos sujeitos a controle especial. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n 91, p. 3, 15 mai. 1998

BRASIL. Lei nº 9.782 de 26 de janeiro de 1999. Define o sistema nacional de vigilância sanitária, cria a agência nacional de vigilância sanitária, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 27 jan. 1999

BRASIL. Lei nº 11.343, de 23 de agosto de 2006. Institui o Sistema Nacional de Políticas Públicas sobre Drogas - Sisnad; prescreve medidas para prevenção do uso indevido, atenção e reinserção social de usuários e dependentes de drogas; estabelece normas para repressão à produção não autorizada e ao tráfico ilícito de drogas; define crimes e dá outras providências. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, p. 2, 24 ago. 2006

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 24, de 14 de junho de 2011. Dispõe sobre o registro de medicamentos específicos. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n 116, p.79, 17 jun. 2011.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC Nº 17, de 6 de maio de 2015. Define os critérios e os procedimentos para a importação, em caráter de excepcionalidade, de produto à base de Canabidiol em associação com outros canabinóides, por pessoa física, para uso próprio, mediante prescrição de profissional legalmente habilitado, para tratamento de saúde. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n 86, p. 50, 08 mai. 2015. Revogada

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 66, de 18 de março de 2016. Dispõe sobre a atualização do Anexo I (Listas de Substâncias Entorpecentes, Psicotrópicas, Precursoras e Outras sob Controle Especial) da Portaria SVS/MS nº 344, de 12 de maio de 1998, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n 54, p. 28, 21 mar. 2016.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n 141, p. 87, 25 jul. 2017

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 327, de 9 de dezembro de 2019. Dispõe sobre os procedimentos para a concessão da Autorização Sanitária para a fabricação e a importação, bem como estabelece requisitos para a comercialização, prescrição, a dispensação, o monitoramento e a fiscalização de produtos de Cannabis para fins medicinais, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n 239, p. 194, 11 dez. 2019

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 335, de 24 de janeiro de 2020, 2020. Define os critérios e os procedimentos para a importação de Produto derivado de Cannabis, por pessoa física, para uso próprio, mediante prescrição de profissional legalmente habilitado, para tratamento de saúde. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n 18, p. 54, 27 jan. 2020

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 511, de 27 de maio de 2021. Dispõe sobre a admissibilidade de códigos farmacêuticos estrangeiros. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n 101, p. 146, 31 mai. 2021

BRIGHENTI, Virginia; PELLATI, Federica; STEINBACH, Marleen; MARAN, Davide; BENVENUTI, Stefania. Development of a new extraction technique and HPLC method for the analysis of non-psychoactive cannabinoids in fibre-type Cannabis sativa L. (hemp). **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [S. l.], v. 143, p. 228–236, 2017. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.05.049.

BU, Xin; CHANDRAN, Sachin; SPIRIG, John; WANG, Qinggang. Sample Preparation for Select Nonsolid Dosage Forms. In: NICKERSON, Beverly. **Sample Preparation of Pharmaceutical Dosage Forms: Challenges and Strategies for Sample Preparation and Extraction**. Boston: Springer, 2011. Chapter 8.

CARVALHO, Virgínia M.; BRITO, Margarete S.; GANDRA, Mário. Mães pela cannabis medicinal em um Brasil aterrorizado entre luzes e fantasmas. **Forum sociológico**, n. 30, p. 57-66, 2017.

CARVALHO, Virgínia M.; AGUIAR, Andrey F. L.; BARATTO, Leopoldo C.; SOUZA, Fábio L. C.; ROCHA, Ernesto D. QUANTIFICAÇÃO DE CANABINOIDES EM EXTRATOS MEDICINAIS DE Cannabis POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA. **Química Nova** [S. l.], v. 43, n. 1, p. 90–97, 2020. DOI: 10.21577/0100-4042.20170457

CIOLINO, Laura A.; RANIERI, Tracy L.; TAYLOR, Allison M. Commercial cannabis consumer products part 2: HPLC-DAD quantitative analysis of cannabis cannabinoids. **Forensic Science International**, [S. l.], v. 289, p. 438–447, 2018. DOI: 10.1016/j.forsciint.2018.05.033. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.05.033>.

CITTI, Cinzia; BRAGHIROLI, Daniela; VANDELLI, Maria Angela; CANNAZZA, Giuseppe. Pharmaceutical and biomedical analysis of cannabinoids: A critical review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [S. l.], v. 147, p. 565–579, 2018. a. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.06.003. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.06.003>.

CITTI, Cinzia; CICCARELLA, Giuseppe; BRAGHIROLI, Daniela; PARENTI, Carlo; VANDELLI, Maria Angela; CANNAZZA, Giuseppe. Medicinal cannabis: Principal cannabinoids concentration and their stability evaluated by a high performance liquid chromatography coupled to diode array and quadrupole time of flight mass spectrometry method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [S. l.], v. 128, p. 201–209, 2016. DOI: 10.1016/j.jpba.2016.05.033. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2016.05.033>.

CITTI, Cinzia; PACCHETTI, Barbara; VANDELLI, Maria Angela; FORNI, Flavio; CANNAZZA, Giuseppe. Analysis of cannabinoids in commercial hemp seed oil and decarboxylation kinetics studies of cannabidiolic acid (CBDA). **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [S. l.], v. 149, p. 532–540, 2018. b. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.11.044. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2017.11.044>.

Conselho Nacional de Secretários de Saúde (CONASS). **Vigilância em Saúde (Parte 2)**. Brasília, 2011. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/para_entender_gestao_sus_v.3.pdf. Acesso em 14 de outubro de 2021.

ELSOHLY, Mahmoud A.; SLADE, Desmond. Chemical constituents of marijuana: The complex mixture of natural cannabinoids. **Life Sciences**, [S. l.], v. 78, n. 5, p. 539–548, 2005. DOI: 10.1016/j.lfs.2005.09.011.

FARMACOPEIA Brasileira, 6 ed. Brasília: ANVISA, 2019. 2 v.

FEKETE, Szabolcs; SADAT-NOORBAKHS, Vida; SCHELLING, Cedric; MOLNÁR, Imre; GUILLARME, Davy; RUDAZ, Serge; VEUTHEY, Jean Luc. Implementation of a generic liquid chromatographic method development workflow: Application to the analysis of phytocannabinoids and Cannabis sativa extracts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [S. l.], v. 155, p. 116–124, 2018. DOI: 10.1016/j.jpba.2018.03.059.

GAONI, Y.; MECOULAM, R. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. **Journal of the American Chemical Society**, [S. l.], v. 86, n. 8, p. 1646–1647, 1964. DOI: 10.1021/ja01062a046.

GONÇALVES, Joana et al. Cannabis and Its Secondary Metabolites: Their Use as Therapeutic Drugs, Toxicological Aspects, and Analytical Determination. **Medicines**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 31, 2019. DOI: 10.3390/medicines6010031.

HÄDENER, Marianne; KÖNIG, Stefan; WEINMANN, Wolfgang. Quantitative determination of CBD and THC and their acid precursors in confiscated cannabis samples by HPLC-DAD. **Forensic Science International**, [S. l.], v. 299, p. 142–150, 2019. DOI: 10.1016/j.forsciint.2019.03.046. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.03.046>.

HAZEKAMP, Arno. **Cannabis: extracting the medicine**. 2007. 188 f. Tese - Instituto de Biologia de Leiden (IBL), Faculdade de Ciências, Universidade de Leiden. Países Baixos, 2007.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (Brasil). **POP 65.3110.079: VERIFICAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE MÉTODOS ANALÍTICOS NO SETOR DE MEDICAMENTOS**. Rev. 1. Rio de Janeiro: INCQS, 2021. 17 p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

KRIŽMAN, Mitja. A simplified approach for isocratic HPLC analysis of cannabinoids by fine tuning chromatographic selectivity. **European Food Research and Technology**, [S. l.], v. 246, n. 2, p. 315–322, 2020. DOI: 10.1007/s00217-019-03344-7. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03344-7>.

LAZARJANI, Masoumeh Pourseyed; TORRES, Stephanie; HOOKER, Thom; FOWLIE, Chris; YOUNG, Owen; SEYFODDIN, Ali. Methods for quantification of cannabinoids: a narrative review. **Journal of Cannabis Research**, [S. l.], v. 2, n. 1, 2020. DOI: 10.1186/s42238-020-00040-2.

LEVINSOHN, Erik A.; HILL, Kevin P. Clinical uses of cannabis and cannabinoids in the United States. **Journal of the Neurological Sciences**, [S. l.], v. 411, n. January, 116717, 2020. DOI: 10.1016/j.jns.2020.116717. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jns.2020.116717>.

LEWIS, Melissa M.; YANG, Yi; WASILEWSKI, Ewa; CLARKE, Hance A.; KOTRA, Lakshmi P. Chemical Profiling of Medical Cannabis Extracts. **ACS Omega**, [S. l.], v. 2, n. 9, p. 6091–6103, 2017. DOI: 10.1021/acsomega.7b00996.

LIMA, Inês Campos. Potenciais Terapêuticos da Canábis Medicinal. 2019. 55f. Monografia de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas - Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa. Portugal, 2019.

MARTIN, B. R.; MECHOULAM, R.; RAZDAN, R. K. Discovery and characterization of endogenous cannabinoids. **Life Sciences**, [S. l.], v. 65, n. 6–7, p. 573–595, 1999. DOI: 10.1016/S0024-3205(99)00281-7.

MATUSZEWSKI, B. K. Standard line slopes as a measure of a relative matrix effect in quantitative HPLC-MS bioanalysis. **J. Chromatogr. B**, v. 830, p. 293-3000, 2006.

MECHOULAM, Raphael; SHANI, Arnon; EDERY, Habib; GRUNFELD, Yona. Chemical basis of hashish activity. **Science**, [S. l.], v. 169, n. 3945, p. 611–612, 1970. DOI: 10.1126/science.169.3945.611.

MICALIZZI, Giuseppe; VENTO, Federica; ALIBRANDO, Filippo; DONNARUMMA, Danilo; DUGO, Paola; MONDELLO, Luigi. Cannabis Sativa L.: a comprehensive review on the analytical methodologies for cannabinoids and terpenes characterization. **Journal of Chromatography A**, [S. l.], v. 1637, p. 461864, 2021. DOI: 10.1016/j.chroma.2020.461864.

NEMEŠKALOVÁ, Alžběta; HÁJKOVÁ, Kateřina; MIKULŮ, Lukáš; SÝKORA, David; KUCHARŮ, Martin. Combination of UV and MS/MS detection for the LC analysis of cannabidiol-rich products. **Talanta**, [S. l.], v. 219, n. May, p. 121250, 2020. DOI: 10.1016/j.talanta.2020.121250.

NICKERSON, Beverly. Properties That Impact Sample Preparation and Extraction of Pharmaceutical Dosage Forms. In: NICKERSON, Beverly. **Sample Preparation of Pharmaceutical Dosage Forms: Challenges and Strategies for Sample Preparation and Extraction**. Boston: Springer, 2011. Chapter 1.

NICKERSON, Beverly; LUNG, K. Rick. Agitation and Particle Size Reduction Techniques. *In*: NICKERSON, Beverly. **Sample Preparation of Pharmaceutical Dosage Forms: Challenges and Strategies for Sample Preparation and Extraction**. Boston: Springer, 2011. Chapter 3.

PROTTI, Michele; BRIGHENTI, Virginia; BATTAGLIA, Maria Rita; ANCESCHI, Lisa; PELLATI, Federica; MERCOLINI, Laura. Cannabinoids from Cannabis sativa L.: A New Tool Based on HPLC-DAD-MS/MS for a Rational Use in Medicinal Chemistry. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, [S. l.], v. 10, n. 4, p. 539–544, 2019. DOI: 10.1021/acsmmedchemlett.8b00571.

RADWAN, Mohamed M.; CHANDRA, Suman; GUL, Shahbaz; ELSOHLI, Mahmoud A. Cannabinoids, phenolics, terpenes and alkaloids of cannabis. **Molecules**, [S. l.], v. 26, n. 9, 2021. DOI: 10.3390/molecules26092774.

RUSSO, Ethan B. History of cannabis and its preparations in saga, science, and sobriquet. **Chemistry and Biodiversity**, [S. l.], v. 4, n. 8, p. 1614–1648, 2007. DOI: 10.1002/cbdv.200790144.

SAITO, Viviane M.; WOTJAK, Carsten T.; MOREIRA, Fabrício A. Exploração farmacológica do sistema endocanabinoide: Novas perspectivas para o tratamento de transtornos de ansiedade e depressão? **Revista Brasileira de Psiquiatria**, [S. l.], v. 32, n. SUPPL. 1, p. 7–14, 2010. DOI: 10.1590/s1516-44462010000500004.

SANTANA, Daniela Silva. Verificação de métodos farmacopeicos na Vigilância Sanitária de medicamentos. 2020. 93 f. Monografia (Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2020.

SHOLLER, Dennis J.; SCHOENE, Lauren; SPINDLE, Tory R. Therapeutic Efficacy of Cannabidiol (CBD): a Review of the Evidence From Clinical Trials and Human Laboratory Studies. **Current Addiction Reports**, [S. l.], v. 7, n. 3, p. 405–412, 2020. DOI: 10.1007/s40429-020-00326-8.

SHOYAMA, Yukihiro; YAGI, Masahiro; NISHIOKA, Itsuo; YAMAUCHI, Tatsuo. Biosynthesis of cannabinoid acids. **Phytochemistry**, [S. l.], v. 14, n. 10, p. 2189–2192, 1975. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)91096-3.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized Guidelines for Single Laboratory Validation of Methods of Analysis (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.*, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

WANG, Yan Hong; AVULA, Bharathi; ELSOHLI, Mahmoud A.; RADWAN, Mohamed M.; WANG, Mei; WANAS, Amira S.; MEHMEDIC, Zlatko; KHAN, Ikhlas A. Quantitative Determination of Δ^9 -THC, CBG, CBD, Their Acid Precursors and Five Other Neutral Cannabinoids by UHPLC-UV-MS. **Planta Medica**, [S. l.], v. 84, n. 4, p. 260–266, 2018. DOI: 10.1055/s-0043-124873.

WHITING, Penny F. et al. Cannabinoids for medical use: A systematic review and meta-analysis. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, [S. l.], v. 313, n. 24, p. 2456–2473, 2015. DOI: 10.1001/jama.2015.6358.

ZUARDI, Antonio Waldo. History of cannabis as a medicine: A review. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, [S. l.], v. 28, n. 2, p. 153–157, 2006. DOI: 10.1590/S1516-44462006000200015.