



UFPB

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS
BIOATIVOS

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR CROMATOGRAFIA
LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA DA *CANNABIS* SPP.

CARLOS ESPÍNOLA NETO SEGUNDO

JOÃO PESSOA – PB

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS
BIOATIVOS

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR CROMATOGRAFIA
LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA DA *CANNABIS* SPP.

CARLOS ESPÍNOLA NETO SEGUNDO

Dissertação de Mestrado Acadêmico em
Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do
centro de Ciências da Saúde da
Universidade Federal da Paraíba,
apresentada como requisito para obtenção
do grau de mestre em produtos naturais e
sintéticos bioativos.

Orientador: Dr. Jose Maria Barbosa Filho
Co-Orientador: Dr. Sócrates Golzio dos Santos

JOÃO PESSOA – PB

2023

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

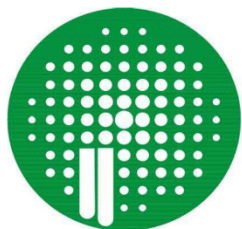
E77d Espínola Neto Segundo, Carlos.
Desenvolvimento e validação de metodologia analítica
por cromatografia líquida de alta eficiência da
Cannabis SPP. / Carlos Espínola Neto Segundo. - João
Pessoa, 2023.
88 f. : il.

Orientação: Jose Maria Barbosa Filho.
Coorientação: Sócrates Golzio dos Santos.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Cannabis spp. 2. Canabidiol. 3. Cromatografia. 4.
Metodologia analítica. I. Barbosa Filho, Jose Maria.
II. Santos, Sócrates Golzio dos. III. Título.

UFPB/BC

CDU 582.635.38(043)



PgPNSB

Pós Graduação em Produtos Naturais
e Sintéticos Bioativos

Ata da 471ª (quadringentésima septuagésima primeira) Dissertação de Mestrado do aluno do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos **Carlos Espínola Neto Segundo**, candidato ao Título de “Mestre” em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacoquímica.

Às quatorze horas (14h00) do dia trinta e um de março do ano de dois mil e vinte e três (31/03/2023), em ambiente virtual de videoconferência através do aplicativo Google Meet, Link: <https://meet.google.com/tjx-bywx-zur>, reuniram-se em caráter de Solenidade Pública os membros da Comissão designada para examinar o aluno **Carlos Espínola Neto Segundo**, candidato ao Título de “MESTRE” em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacoquímica. Foram componentes da Comissão Examinadora os pesquisadores Umberto Pereira Souza Júnior, Ph.D em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos, Yuri Mangueira do Nascimento, Ph.D em Farmacoquímica, José Maria Barbosa Filho, Ph.D em Química Orgânica e Sócrates Gólzio dos Santos, Ph.D em Farmacoquímica. Sendo o primeiro, integrante do corpo de pesquisadores da Associação Brasileira de Apoio a Cannabis Esperança; e os demais, integrantes do corpo docente da Universidade Federal da Paraíba. Dando início aos trabalhos, o Presidente da Comissão, professor José Maria Barbosa Filho, após declarar os objetivos da reunião, apresentou o candidato **Carlos Espínola Neto Segundo**, a quem concedeu a palavra para que dissertasse oral e sucintamente sobre o tema apresentado e intitulado “Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica por Cromatografia Líquida de alta eficiência da *Cannabis* spp”. Após discorrer sobre o referido tema durante cerca de quarenta minutos, o candidato foi arguido pelos examinadores na forma regimental. Em seguida, passou a comissão, em caráter secreto, a proceder à avaliação e julgamento do trabalho, concluindo por atribuir-lhe o conceito APROVADO. Em face da aprovação, declarou o Presidente achar-se o examinado **Carlos Espínola Neto Segundo** legalmente habilitado a receber o Título de “MESTRE” em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, na área de concentração Farmacoquímica, cabendo a Universidade Federal da Paraíba, providências, como de direito, a expedição do Diploma que o mesmo faz jus. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da Comissão e pelo(a) discente.

Documento assinado digitalmente

Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho (Orientador)



JOSE MARIA BARBOSA FILHO
Data: 31/03/2023 16:44:01-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Sócrates Gólzio dos Santos (Coorientador)

Prof. Dr. Yuri Mangueira do Nascimento (Examinador)

Prof. Dr. Umberto Pereira Souza Júnior (Examinador)



Documento assinado digitalmente
UMBERTO PEREIRA SOUZA JUNIOR
Data: 10/10/2023 13:03:21-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Carlos Espínola Neto Segundo (Discente)



Documento assinado digitalmente
CARLOS ESPINOLA NETO SEGUNDO
Data: 25/01/2024 21:41:29-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>



Dedico à minha esposa Thayse Tanouss por todo carinho e dedicação e por ter sido ela quem verdadeiramente me incentivou e me apoiou durante todo o meu trajeto. Dedico também a minha filha Júlia que é a fonte de toda minha força de vontade e perseverança.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a minha querida esposa Thayse Tanouss por ter me apoiado desde o início deste trabalho, acreditando em mim incondicionalmente, mesmo nos momentos em que eu mesmo duvidei. Sou muito grato por todo amor, carinho, companheirismo e principalmente paciência dedicados a mim.

A minha filha Júlia Espínola, que é a fonte de toda minha vontade de vencer, seja qual for o obstáculo. Para ela dedico todas as minhas conquistas e para quem tento ser uma pequena fagulha que desperte a vontade de superar todos os meus passos e ir muito além.

Agradeço aos meus pais Angela Denise e José Eduardo por não terem medido esforços para me proporcionar a melhor qualificação e me dar oportunidades de sonhar alto.

Aos meus irmãos Kaká e Marília por enfrentarem, junto a mim, todas as dificuldades da vida e por me ensinarem, a cada dia, que podemos nos tornar pessoas melhores. Vocês me inspiram.

Aos meus amigos e colegas de trabalho da ABRACE, que me incentivaram incansavelmente. Eles não só me auxiliaram como profissionais técnicos na execução de todas as etapas deste trabalho, mas principalmente em momentos em que eu precisei de uma injeção de ânimo e de um ombro amigo. Eles foram também meus professores, doando um pouco de suas experiências como mestres e doutores, enriquecendo ainda mais este trabalho. Agradeço por serem pessoas excepcionais desde sempre.

A Associação Brasileira de Apoio Cannabis Esperança por ter me dado a oportunidade de desenvolver este projeto em seu laboratório, bem como a oportunidade de, desde 2018, aprender todos os dias sobre esta planta e ver a cada dia na prática como salva a vida de tantas famílias no Brasil inteiro.

Ao meu orientador professores Doutor José Maria Barbosa Filho e meu co-orientador Professor Doutor Sócrates Golzio dos Santos, que apesar das dificuldades inerentes de pesquisas com esta planta toparam enfrentar comigo os desafios que estavam por vir.

Aos Doutores Umberto Pereira Souza Júnior, Solomon Kweku Sagoe Amoah, Yuri Manguera do Nascimento e Francisco Humberto Xavier Junior por comporem a banca examinadora deste trabalho.

A todos os docentes do programa que conseguem passar seus conhecimentos com excelência e formam profissionais capacitados para atuar no mercado de trabalho.

A todos os funcionários do programa por terem dado todo o auxílio, paciência e compreensão necessária a mim e a todos os outros alunos do programa.

A todos os amigos e colegas que contribuíram de forma direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho.

A todos, muito obrigado.

“Emancipate yourselves from mental slavery
None but ourselves can free our minds”

(Bob Marley)

“Emancipe-se da escravidão mental
Ninguém, além de nós mesmos, pode libertar
nossa mente”

(Bob Marley)

RESUMO

ESPINOLA C.N.S. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA DA *CANNABIS* SPP. 90 p., Dissertação de Mestrado (Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos – Farmacoquímica), Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2023.

Com o aumento de evidências científicas sobre as propriedades terapêuticas da *Cannabis*, cresceu também a demanda por medicamentos contendo os seus princípios ativos. Devido a burocracia e legislação ainda em construção no Brasil e no mundo, muitas famílias buscam esse tratamento através de medicamentos ainda não registrados onde muitos não cumprem as normas de boas práticas de fabricação, colocando em risco a saúde do paciente. Diante desse cenário, é importante o desenvolvimento de técnicas de controle de qualidade que visam reduzir os riscos para a população que necessita deste tratamento. A *Cannabis* spp. possui em sua composição mais de 565 substâncias e devido a sua importância terapêutica se faz necessário o desenvolvimento de métodos analíticos eficientes para realizar a separação e posterior identificação e quantificação dos compostos presentes nela. Este trabalho teve por objetivo desenvolver um método de análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para 3 dos principais marcadores fitocanabinoides da *Cannabis* spp. bem como validá-lo de acordo com o regulamentado pela ANVISA através da RDC 166/2017 e assim ser usado no controle de qualidade desses medicamentos. Foram utilizados padrões cromatográficos de referência do Δ^9 -tetra-hidrocanabinol (Δ^9 -THC), Canabidiol (CBD) e Canabinol (CBN), e os óleos fornecidos pela Associação Brasileira de Apoio Cannabis Esperança, que se trata de uma solução oleosa de extrato de *Cannabis* spp. ricos em Δ^9 -THC e CBD, padronizados da seguinte forma: Óleo CBD 20mg/mL (clássico e gold) Óleo Δ^9 -THC 15mg/mL (clássico e gold) e Óleo Δ^9 -THC:CBD 15mg/mL (clássico e gold), para o desenvolvimento e validação do método. O CBN é um importante marcador para a estabilidade dos produtos a base de Cannabis por se tratar do produto de degradação do Δ^9 -THC. Após todos os parâmetros avaliados, foi possível concluir que metodologia para quantificação de canabinoides CBD, CBN e Δ^9 - Δ^9 -THC em produtos oleosos que utilizam óleo de milho como veículo foi validada de acordo com a RDC 166/2017. O método pode ser utilizado para dosear os canabinoides nos óleos com uma precisão e exatidão adequada a partir de 1,5 μ g/mL.

Palavras-chave: *Cannabis* spp.. validação de método. metodologia analítica. Cromatografia. Δ^9 -tetra-hidrocanabinol. Canabidiol.

ABSTRATCT

ESPÍNOLA C.N.S. DEVELOPMENT AND VALIDATION OF ANALYTICAL METHODOLOGY BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY FOR CANNABIS SPP. 90 p., Dissertação de Mestrado (Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos – Farmacoquímica), Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2023.

With the increase in the scientific evidence on the therapeutic properties of Cannabis, the demand for medicines containing its active ingredients has also increased. Due to the bureaucracy and legislation still under construction in Brazil and worldwide, many families seek this treatment through unregistered medicines where many do not meet the standards of good manufacturing practices, putting the patient's health at risk. In this context, it is important to develop quality control techniques aimed at reducing the risks for the population requiring this treatment. Cannabis spp. has in its composition over 565 substances and because of its therapeutic relevance, it is necessary to develop efficient analytical methods to separate and subsequently identify and quantify the compounds present in it. Hence, this work aimed to develop a high-performance liquid chromatography (HPLC) analytical method for 3 of the main phytocannabinoid markers of Cannabis spp. as well as to validate it according to what is regulated by ANVISA through RDC 166/2017 and thus be used in the quality control of these medicines. Reference chromatographic standards of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), Cannabidiol (CBD), and Cannabinol (CBN), and the oils provided by the Associação Brasileira de Apoio Cannabis Esperança, which are oily solutions of Cannabis spp. extracts rich in Δ^9 -THC and CBD, standardized as follows: CBD oil 20mg/mL (classic and gold) Δ^9 -THC oil 15mg/mL (classic and gold) and Δ^9 -THC:CBD oil 15mg/mL (classic and gold), were used for the method development and validation. CBN is an important marker for the stability of cannabis products because it is the degradation product of Δ^9 -THC. After all parameters were evaluated, it was concluded that the methodology for the quantification of cannabinoids CBD, CBN and Δ^9 - Δ^9 -THC in the oil products was validated according to RDC 166/2017. The method can be used to quantify cannabinoids in oils with adequate precision and accuracy at a concentration of 1.5 μ g/mL and above.

Keywords: Cannabis spp.; method validation; analytical methodology; Chromatography; Δ^9 -tetrahydrocannabinol; Cannabidiol.

SUMÁRIO

<u>1. Introdução</u>	22
<u>2. Fundamentação Teórica</u>	24
<u>2.1 <i>Cannabis</i> spp.</u>	24
<u>2.2 Fitocanabinóides: Classe de moléculas bioativas da <i>Cannabis</i> spp.</u>	25
<u>2.3 Importância dos produtos da <i>Cannabis</i> spp. na saúde pública:</u>	26
<u>2.4 Métodos de Análises para os produtos da <i>Cannabis</i> spp.</u>	27
<u>2.5 Importância do Desenvolvimento de Métodos para as Análises:</u>	28
<u>3. Objetivos</u>	29
<u>3.1 Gerais</u>	29
<u>3.2 Objetivos Específicos:</u>	29
<u>4. Materiais e Métodos</u>	30
<u>4.1 Padrões analíticos utilizados:</u>	30
<u>4.1.1 Padrão Canabidiol (CRM): 1 mg/mL</u>	30
<u>4.1.3 Padrão Canabinol (CRM): 1 mg/mL</u>	30
<u>4.2 Produto analisado:</u>	30
<u>4.2.1 Óleo CBD 20 mg/mL (Clássico e Gold) – solução oleosa de extrato de <i>Cannabis</i> spp., com marcador padronizado em 20 mg/mL de CBD;</u>	30
<u>4.2.2 Óleo Δ^9-THC 15 mg/mL (Clássico e Gold) - solução oleosa de extrato de <i>Cannabis</i> spp., com marcador padronizado em 15 mg/mL de Δ^9-THC;</u>	31
<u>4.2.3 Óleo CBD:Δ^9-THC 15 mg/mL (Clássico e Gold) - solução oleosa de extrato de <i>Cannabis</i> spp., com marcador padronizado em 15 mg/mL de CBD + 15 mg/mL de Δ^9-THC;</u>	31
<u>4.3 Reagentes:</u>	31
<u>4.4 Equipamentos:</u>	31
<u>4.5 Materiais e vidrarias:</u>	32
<u>4.6 Validação do Método de Análise Cromatográfica:</u>	32

<u>4.7 Metodologia do estudo:</u>	35
<u>4.7.1. Preparo de soluções:</u>	35
<u>4.7.1.1 Preparo da fase móvel A:</u>	35
<u>4.7.1.2 Preparo da fase móvel B:</u>	35
<u>4.7.1.5 Preparo da solução de lavagem:</u>	35
<u>4.7.2 Condições cromatográficas:</u>	36
<u>4.7.3 Cálculos:</u>	36
<u>4.8 Execução dos testes de validação analítica:</u>	37
<u>4.8.1 Adequabilidade:</u>	37
<u>4.8.1.1 Preparo do controle negativo:</u>	37
<u>4.8.1.2 Preparo da Solução Padrão de Canabidiol, Δ^9-tetrahydrocannabinol, cannabinol (18 $\mu\text{g/mL}$):</u>	37
<u>4.8.2 Seletividade:</u>	37
<u>4.8.2.2 Preparo do Controle negativo 2 (matriz da amostra):</u>	38
<u>4.8.2.3 Preparo da Solução Padrão:</u>	38
<u>4.8.2.3.1 Preparo da Solução Padrão de Canabidiol, Δ^9-tetrahydrocannabinol, Cannabinol (18 $\mu\text{g/mL}$):</u>	38
<u>4.8.2.4 Preparo da solução amostra:</u>	39
<u>4.8.2.4.1 Preparo da solução amostra Canabidiol (20 $\mu\text{g/mL}$):</u>	39
<u>4.8.2.4.2 Preparo da solução amostra Δ^9-tetrahydrocannabinol (15 $\mu\text{g/mL}$):</u>	39
<u>4.8.2.4.3 Preparo da solução amostra Canabidiol: Δ^9-tetrahydrocannabinol (15 $\mu\text{g/mL}$: 15 $\mu\text{g/mL}$):</u>	39
<u>4.8.2.5 Preparo da solução Matriz e Padrão em solução Matriz:</u>	39
<u>4.8.2.5.1 Preparo da Solução Matriz:</u>	39
<u>4.8.2.5.2 Preparo da Solução Padrão de Canabidiol, Δ^9-tetrahydrocannabinol, cannabinol em solução Matriz (18 $\mu\text{g/mL}$):</u>	40
<u>4.8.3 Linearidade e Faixa de Trabalho:</u>	40
<u>4.8.3.1 Solução Padrão (Solução mãe):</u>	40

<u>4.8.3.2.2 Preparo da solução 25%:</u>	41
<u>4.8.3.2.3 Preparo da solução 50%:</u>	41
<u>4.8.3.2.4 Preparo da Solução 60%:</u>	41
<u>4.8.3.2.5 Preparo da Solução 70%:</u>	41
<u>4.8.3.2.6 Preparo da Solução 80%:</u>	42
<u>4.8.3.2.7 Preparo da Solução 90%:</u>	42
<u>4.8.3.2.8 Preparo da Solução 100%:</u>	42
<u>4.8.3.2.9 Preparo da Solução 110%:</u>	42
<u>4.8.3.2.10 Preparo da Solução 120%:</u>	42
<u>4.8.4 Efeito Matriz:</u>	43
<u>4.8.4.5 Preparo da solução da matriz:</u>	43
<u>4.8.4.6 Preparo da solução mãe com solução matriz:</u>	43
<u>4.8.4.7 Preparo das soluções com solução matriz (7,5% - 120%):</u>	44
<u>4.8.4.7.1 Preparo da solução com solução matriz 7,5%:</u>	44
<u>4.8.4.7.2 Preparo da solução com solução matriz 25%:</u>	44
<u>4.8.4.7.3 Preparo da solução com solução matriz 50%:</u>	44
<u>4.8.4.7.4 Preparo da solução com solução matriz 60%:</u>	44
<u>4.8.4.7.5 Preparo da solução com solução matriz 70%:</u>	44
<u>4.8.4.7.6 Preparo da solução com solução matriz 80%:</u>	45
<u>4.8.4.7.7 Preparo da solução com solução matriz 90%:</u>	45
<u>4.8.4.7.8 Preparo da solução com solução matriz 100%:</u>	45
<u>4.8.4.7.9 Preparo da solução com solução matriz 110%:</u>	45
<u>4.8.4.7.10 Preparo da solução com solução matriz 120%:</u>	45
<u>4.8.5 Precisão (repetibilidade) e Precisão intermediária:</u>	46
<u>4.8.5.1 Preparo das soluções Padrões:</u>	46
<u>4.8.5.1.1 Preparo da solução Padrão com concentração baixa (12 µg/mL):</u>	46
<u>4.8.5.1.2 Preparo da Solução Padrão com concentração média (18 µg/mL):</u>	47
<u>4.8.5.1.3 Preparo da Solução Padrão com concentração alta (24 µg/mL):</u>	47

<u>4.8.5.2 Repetibilidade:</u>	47
<u>4.8.5.3 Precisão intermediária:</u>	48
<u>4.8.6 Exatidão:</u>	48
<u>4.8.6.1 Preparo da solução Matriz:</u>	48
<u>4.8.6.2 Preparo da Solução Padrão (Solução mãe) com matriz:</u>	48
<u>4.8.6.3 Preparo das soluções para testes de Exatidão (12 µg/mL, 18 µg/mL, 24 µg/mL):</u>	49
<u>4.8.6.3.1 Preparo das soluções para Exatidão 12 µg/mL:</u>	49
<u>4.8.6.3.2 Preparo das soluções para Exatidão 18 µg/mL:</u>	49
<u>4.8.6.3.3 Preparo das soluções para Exatidão 24 µg/mL:</u>	49
<u>4.8.7 Limite de Detecção (LD):</u>	50
<u>4.8.8 Limite de Quantificação (LQ):</u>	50
<u>4.8.9 Robustez:</u>	51
<u>4.8.10 Avaliação das amostras dos lotes dos produtos: Óleos Canabidiol (20 mg/mL), Δ^9-tetrahydrocannabinol (15 mg/mL) e Canabidiol: Δ^9-tetrahydrocannabinol (1:1, 15 mg/mL + 15 mg/mL):</u>	53
<u>4.8.10.1 Preparo da solução amostra: Produto óleo de Canabidiol CBD (20 mg/mL). Concentração final: 20 µg/mL.</u>	53
<u>4.8.10.2 Preparo da solução amostra: Produto óleo de Δ^9-tetrahydrocannabinol Δ^9-THC (15 mg/mL). Concentração final: 15 µg/mL.</u>	53
<u>4.8.10.3 Preparo da solução amostra: Produto óleo de Canabidiol : Δ^9-tetrahydrocannabinol CBD : Δ^9-THC (15 mg/mL + 15 mg/mL). Concentração final: 15 µg/mL de CBD + 15 µg/mL de Δ^9-THC.</u>	53
<u>4.8.10.4 Análise e quantificação das soluções das amostras dos Produtos (lotes) dos óleos Canabidiol (20 mg/mL), Δ^9-tetrahydrocannabinol (15 mg/mL) e Canabidiol: Δ^9-tetrahydrocannabinol (1:1; 15 mg/mL+15 mg/mL).</u>	54
<u>5. Resultados e Discussão:</u>	55
<u>5.1 Adequabilidade:</u>	56
<u>5.2 Seletividade:</u>	58

<u>5.3. Linearidade e Faixa de Trabalho:</u>	60
<u>5.4 Efeito Matriz:</u>	63
<u>5.5 Precisão:</u>	66
5.5.1 Repetibilidade:	66
5.5.2 Precisão intermediária:	67
<u>5.6 Exatidão:</u>	72
<u>5.7 Limite de Detecção (LD):</u>	73
<u>5.8 Limite de Quantificação (LQ):</u>	74
<u>5.9 Robustez:</u>	76
5.9.1 Robustez – Fluxo:	76
5.9.2 Robustez – Temperatura:	77
5.9.3 Robustez - composição dos eluentes:	78
5.9.4 Robustez - coluna com lote diferente	80
5.9.5 Robustez - Tempo de análise das amostras após preparo	80
<u>5.10 Doseamento das amostras dos lotes dos óleos de Canabidiol (20 mg/mL), Δ^9-tetrahydrocannabinol (15 mg/mL) e Canabidiol: Δ^9-tetrahydrocannabinol (15 mg/mL):</u>	83
<u>6. Conclusão</u>	86
<u>7. Perspectivas</u>	86
<u>REFERÊNCIAS:</u>	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Alguns canabinoides naturais da planta <i>Cannabis</i> spp. (GONÇALVES et al., 2019).	26
Figura 2: Cromatograma obtido das soluções dos analitos Canabidiol (CBD), Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) e canabinol (CBN) durante avaliação de adequabilidade.	57
Figura 3: Imagem da sobreposição dos cromatogramas do controle negativo 1 (CN1), controle negativo 2 e a solução do padrão no óleo de milho (matriz -PM	59
Figura 4: Imagem da sobreposição dos cromatogramas das amostras de óleos de Canabidiol (20 $\mu\text{g/mL}$ - PRO0070822117, PRO 0080822117), Δ^9 -tetrahydrocannabinol (15 $\mu\text{g/mL}$ - PRO0250522117, PRO0070522117), Canabidiol: Δ^9 -tetrahydrocannabinol (15 $\mu\text{g/mL}$ - PRO0031022117, PRO0041022117) e a solução padrão (18 $\mu\text{g/mL}$).	60
Figura 5: Gráficos das áreas dos picos cromatográficos em função da concentração dos analitos em solvente etanol: a) CBD, b) CBN e c) Δ^9 -THC.	61
Figura 6: Representação gráfica dos resíduos da regressão das curvas analíticas construídas em solvente a) CBD, b) CBN, c) Δ^9 -THC.	61
Figura 7: Gráficos das áreas dos picos cromatográficos em função da concentração dos analitos em solução matriz: a) CBD, b) CBN e c) Δ^9 -THC.	64
Figura 8: Cromatograma ampliado dos analitos Canabidiol, Canabinol e Δ^9 -tetrahydrocannabinol na concentração de 0,16 $\mu\text{g/mL}$.	74

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Condições cromatográficas para análise dos óleos de <i>Cannabis</i> spp.	36
Quadro 2: Quadro mostrando os dados obtidos durante a avaliação de Adequabilidade.....	58
Quadro 3: Dados de avaliação de limite de quantificação (LQ) de Canabidiol (CBD) nas concentrações 0,50 µg/mL, 1,00 µg/mL, 1,25 µg/mL, 1,45 µg/mL, 1,50 µg/mL e 2,00 µg/mL.	75
Quadro 4: Dados de avaliação de limite de quantificação (LQ) de canabinol (CBN) nas concentrações 0,50 µg/mL, 1,00 µg/mL, 1,25 µg/mL, 1,45 µg/mL, 1,50 µg/mL e 2,00 µg/mL.	75
Quadro 5: Dados de avaliação de limite de quantificação (LQ) de Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) nas concentrações 0,50 µg/mL, 1,00 µg/mL, 1,25 µg/mL, 1,45 µg/mL, 1,50 µg/mL e 2,00 µg/mL.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Descrição dos parâmetros avaliados na robustez:	52
Tabela 2: Dados estatísticos de regressão para Canabidiol (CBD):	62
Tabela 3: Dados estatísticos de regressão para canabinol (CBN):	62
Tabela 4: Dados estatísticos de regressão para Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC):	63
Tabela 5: Dados de inclinação da curva de Canabidiol (CBD), canabinol (CBN) e Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) em etanol e solução matriz e os seus efeitos matrizes.	64
Tabela 6: Os resultados de teste T dos dados da curva de Canabidiol (CBD) em etanol e em solução matriz.	65
Tabela 7: Os resultados de teste T dos dados da curva de canabinol (CBN) em etanol e em solução matriz.	65
Tabela 8: Os resultados de teste T dos dados da curva de Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) em etanol e em solução matriz.	65
Tabela 9: Dados de repetibilidade das soluções de Canabidiol (CBD) nas concentrações 12 $\mu\text{g/mL}$, 18 $\mu\text{g/mL}$ e 24 $\mu\text{g/mL}$	66
Tabela 10: Dados de repetibilidade das soluções de Canabinol (CBN) nas concentrações 12 $\mu\text{g/mL}$, 18 $\mu\text{g/mL}$ e 24 $\mu\text{g/mL}$	66
Tabela 11: Dados de repetibilidade das soluções de Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) nas concentrações 12 $\mu\text{g/mL}$, 18 $\mu\text{g/mL}$ e 24 $\mu\text{g/mL}$	67
Tabela 12: Dados de precisão intermediária das soluções de Canabidiol (CBD) nas concentrações 12 $\mu\text{g/mL}$, 18 $\mu\text{g/mL}$ e 24 $\mu\text{g/mL}$	68
Tabela 13: Tabela de Teste-t dos dados de concentração teórico e experimental para precisão intermediária para Canabidiol (CBD). Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes	69
Tabela 14: Dados de precisão intermediária das soluções de Canabinol (CBN) nas concentrações 12 $\mu\text{g/mL}$, 18 $\mu\text{g/mL}$ e 24 $\mu\text{g/mL}$	69
Tabela 15: Tabela de Teste-t dos dados de concentração teórico e experimental para precisão intermediária para canabinol (CBN).....	70

Tabela 16: Dados de precisão intermediária das soluções de Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) nas concentrações 12 µg/mL, 18 µg/mL e 24 µg/mL	71
Tabela 17: Tabela de Teste-t dos dados de concentração teórico e experimental para precisão intermediária para Δ^9 -tetrahydrocannabinol.....	72
Tabela 18: Dados de exatidão das soluções de Canabidiol (CBD) nas concentrações 12 µg/mL, 18 µg/mL e 24 µg/mL.	73
Tabela 19: Dados de exatidão das soluções de Canabinol (CBN) nas concentrações 12 µg/mL, 18 µg/mL e 24 µg/mL.	73
Tabela 20: Dados de exatidão das soluções de Δ^9 -tetrahydrocannabinol (CBN) nas concentrações 12 µg/mL, 18 µg/mL e 24 µg/mL.	73
Tabela 21: Dados de robustez em relação aos fluxos 1,425 mL/min e 1,575 mL/min na avaliação dos canabinoides na concentração de 18 µg/mL.	77
Tabela 22: Dados de robustez em relação às temperaturas 38 °C e 42 °C na avaliação dos canabinoides na concentração de 18 µg/mL.	78
Tabela 23: Dados de robustez em relação às composições de eluentes na avaliação de Canabidiol (CBD) na concentração de 18 µg/mL.	79
Tabela 24: Dados de robustez em relação às composições de eluentes na avaliação de canabinol (CBN) na concentração de 18 µg/mL.....	79
Tabela 25: Dados de robustez em relação às composições de eluentes na avaliação de Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) na concentração de 18 µg/mL.	79
Tabela 26: Dados de robustez em relação à coluna com lote 17436, na avaliação de Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) na concentração de 18 µg/mL.....	80
Tabela 27: Dados de robustez em relação ao tempo de análise das amostras após preparo: a) dados de Canabidiol (CBD); b) dados de canabinol (CBN); c) dados de Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC).	81
Tabela 28: Dados de doseamento dos canabinoides nos lotes de óleos CBD 20 mg/mL.	83
Tabela 29: Dados de doseamento dos canabinoides nos lotes de óleos Δ^9 -THC 15 mg/mL.	84

Tabela 30: Dados de doseamento dos canabinoides nos lotes de óleos CBD/ Δ^9 -THC
15 mg/mL. 84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-AG	2-Aracdonoilglicerol
AEA	Anandamida
CBD	Canabidiol
CBDA	Ácido Canabidiólico
CBG	Canabigerol
CBGA	Ácido Canabigerólico
CBN	Canabinol
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DPR	Desvio Padrão Relativo
FAAH	Amida hidrolase de ácidos graxos
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de Quantificação
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
MAGL	Lipase monoacilglicerol
SE	Sistema Endocanabinoide
SQR	Substância química de referência
Subsp	Subespécie
Δ^8-THC	Δ^8 -Tetrahydrocanabinol
Δ^9-THC	Δ^9 -Tetrahydrocanabinol
Δ^9-THCA	Ácido Δ^9 -Tetrahydrocanabinolico

1. Introdução

A *Cannabis* spp. é uma planta herbácea da família das Canabaceas (Cannabaceae). Está entre as primeiras plantas cultivadas pela humanidade, e era utilizada para múltiplos propósitos, dentre eles o uso como alimentos, medicamentos e as fibras que eram extraídas do caule (JIANG et al., 2006). A civilização mais antiga a relatar o uso da *Cannabis* spp. foi a China, onde achados arqueológicos e históricos evidenciaram o uso de fibras desde 4.000 a.C. Os chineses utilizavam as fibras para fabricar fios, cordas, tecidos e até papel, como os que foram achados na tumba do imperador Wu (104-87 aC) da dinastia Han. O uso medicinal da *Cannabis* spp. foi relatado pela primeira vez na Pen-Ts'ao Ching, considerada a primeira farmacopeia conhecida do mundo que foi escrita entre 200 e 250 d.C., porém há relatos do uso desde o tempo do imperador Shen-Nung que viveu em 2700 a.C. As indicações do uso da *Cannabis* spp. incluíam: dores reumáticas, constipação intestinal, distúrbios do aparelho reprodutor feminino e malária (ZUARDI, 2006).

No oriente médio, há evidências do uso da *Cannabis* spp. para o tratamento de convulsões noturna dentre outras doenças pelos sumérios e acadianos por volta dos 1.800 a.C. No Egito foram encontrados em papiros, indicações da *Cannabis* spp. para diversas doenças como infecções, analgesia e contrações vaginais aproximadamente nesse mesmo período (FRIEDMAN; SIRVEN, 2017).

No início do século 19 ocorreram os primeiros estudos com animais e humanos, realizados pelo médico irlandês William O'Shaughnessy, que viajou para Índia para estudar as tradições médicas locais e voltou para a Europa com um grande suprimento de *Cannabis* spp., com o qual publicou seus estudos para doenças como reumatismo, tétano, cólera e convulsões infantis. No final do século 19, várias farmacopeias no mundo continham o extrato/tintura de *Cannabis* spp., porém no início do século 20 houve um declínio no uso da terapia com *Cannabis* spp. devido ao surgimento de medicamentos com substâncias isoladas, muitas vezes sintéticas, no ocidente. Logo em seguida, houve proibições internacionais do uso da *Cannabis* spp., bem no início da era dos estudos científicos, relegando as evidências das terapias a base desta planta (FRIEDMAN; SIRVEN, 2017).

No início dos anos 1960, o químico israelense Raphael Mechoulam e seus colaboradores isolaram e identificaram as principais moléculas presentes na *Cannabis* spp., os fitocanabinoides: Canabidiol (CBD) e Δ^9 -tetra-hidrocanabinol (Δ^9 -THC) (MECHOULAM; SHVO, 1963 e GAONI; MECHOULAM, 1964).

2. Fundamentação Teórica

2.1 *Cannabis* spp.

A *Cannabis* spp. é uma planta ereta, anual e dioica (raramente monoica) e pode chegar até a 6 metros de altura. Possui caule verde, cilíndricos, ocos e estriados longitudinalmente. As folhas são em formato de palma com 3 a 9 lóbulos estreitamente oblongo-lanceolados com 2 a 20 cm de comprimento e de 1 a 8 centímetros de largura, verde escuro acima e mais claro abaixo, base atenuada, caudado-acuminado no ápice e serrilhado ao longo das margens (CHANDRA et al., 2017; RAMAN et al., 2017).

As flores masculinas nascem em plantas diferentes das flores femininas, e são nascidas em panículas cimosas axilares frouxamente ramificadas. Cada flor consiste em cinco tépalas, cinco estames e um pedicelo delgado. Já as flores femininas nascem aos pares, e estão intimamente agregadas no ápice das inflorescências pontiagudas curtas formadas nas axilas superiores dos ramos. Elas são compostas por um ovário com um estilete, que termina em um par de estigmas longos e delgados de penas no ápice, um perianto membranoso envolvendo o ovário e uma bráctea. Os canabinoides são sintetizados e armazenados em estruturas glandulares nomeados de tricomas glandulares dessas estruturas (RAMAN et al., 2017).

O fruto é um elipsoide aquênio, levemente comprimido e liso, medindo aproximadamente 2 a 5 mm de comprimento de cor acastanhado e mosqueado. Contém uma única semente com uma casca dura e é firmemente coberta pela parede fina do ovário (FARAG; KAYSER, 2017).

A *Cannabis* spp. possui diferentes variedades, como resultado da criação e seleção que foram desenvolvidas ao longo de muitos séculos. Devido a isso, esse assunto gera muitos debates sobre sua classificação botânica, e não há um consenso sobre a classificação taxonômica de vários grupos dentro do gênero *Cannabis*. O UNODC (BREDEMANN, 1956) dividiu a *Cannabis* spp. domesticada em três diferentes grupos:

- Cânhamo de fibra: plantas longas e não ramificadas com baixa produção de sementes;

- Cânhamo de óleo de semente: plantas curtas e de maturação precoce, com rica produção de sementes;
- Cânhamo medicinal: plantas curtas e fortemente ramificadas, com pequenas folhas verde-escuras.

Posteriormente foram distinguidas três espécies dentro do gênero: *Cannabis sativa* L., *Cannabis indica* Lam. e *Cannabis ruderalis*. Dentro da subespécie *sativa*, as variedades domesticadas e selvagens são: *Cannabis sativa* subsp. *sativa* var. *sativa* (domesticada), *Cannabis sativa* subsp. *sativa* var. *spontana* (selvagem), *Cannabis sativa* subsp. *indica* var. *indica* (domesticada) e *Cannabis sativa* subsp. *indica* var. *kafiristanica* (selvagem). No entanto, é comumente aceito que a *Cannabis* seja monotípica e consiste apenas em uma única espécie: *Cannabis sativa* (FARAG; KAYSER, 2017; BREDEMANN, 1956).

2.2 Fitocanabinóides: Classe de moléculas bioativas da *Cannabis* spp.

Metabólitos secundários das plantas são de grande importância para a sobrevivência e são responsáveis por atrair polinizadores e defender contra predadores e doenças. Devido a seu potencial bioativo, são explorados para fins farmacêuticos. Além de medicamentos, os metabólitos secundários como alcalóides, antocianinas, flavonóides, quinonas, lignanas, esteróides e terpenóides, são utilizados na indústria como corantes, flavorizantes, aromatizantes e inseticidas (VERPOORTE; CONTIN; MEMELINK, 2002).

O número de compostos identificados na *Cannabis* spp. vem aumentando no decorrer das décadas, sendo relatado na literatura, identificação de mais de 565 compostos. Os mais estudados são os fitocanabinóides que já somam 120 identificados (ELSOHLY et al., 2017).

Os fitocanabinóides representam os compostos mais estudados da *Cannabis* spp., e são compostos terpeno-fenólicos com 22 carbonos ou 21 carbonos na forma neutra. Dentre os mais de 100 fitocanabinóides que já foram identificados, o que possui a mais potente ação psicoativa é o Δ^9 -tetra-hidrocanabinol (Δ^9 -THC). Outros fitocanabinóides encontrados na planta também possuem efeitos farmacológicos como o canabidiol (CBD) e o canabinol (CBN), além de outros (Figura 1) (GONÇALVES et al., 2019). Além dos fitocanabinóides, outros metabólitos

secundários estão presentes na *Cannabis* spp., dentre eles estão: flavonoides, estibenoides, terpenoides, alcaloides e lignanas (ELSOHLY et al., 2017; JOSEFINA; VERPOORTE, 2008). Os efeitos farmacológicos atribuídos a *Cannabis* spp. se deve principalmente a presença de canabinóides, farmacologicamente responsáveis pela ativação dos receptores CB1 e CB2, que junto com os endocanabinoides compõe o Sistema Endocanabinoides (SE), sendo os efeitos mais citados os: antinociceptivos, antiepiléticos, cardiovasculares, imunossupressores, antieméticos, estimulantes do apetite, antineoplásicos, antimicrobianos, anti-inflamatórios, antioxidantes neuroprotetores, antidepressivos, ansiolíticos e reguladores do sono (JOSEFINA; VERPOORTE, 2008).

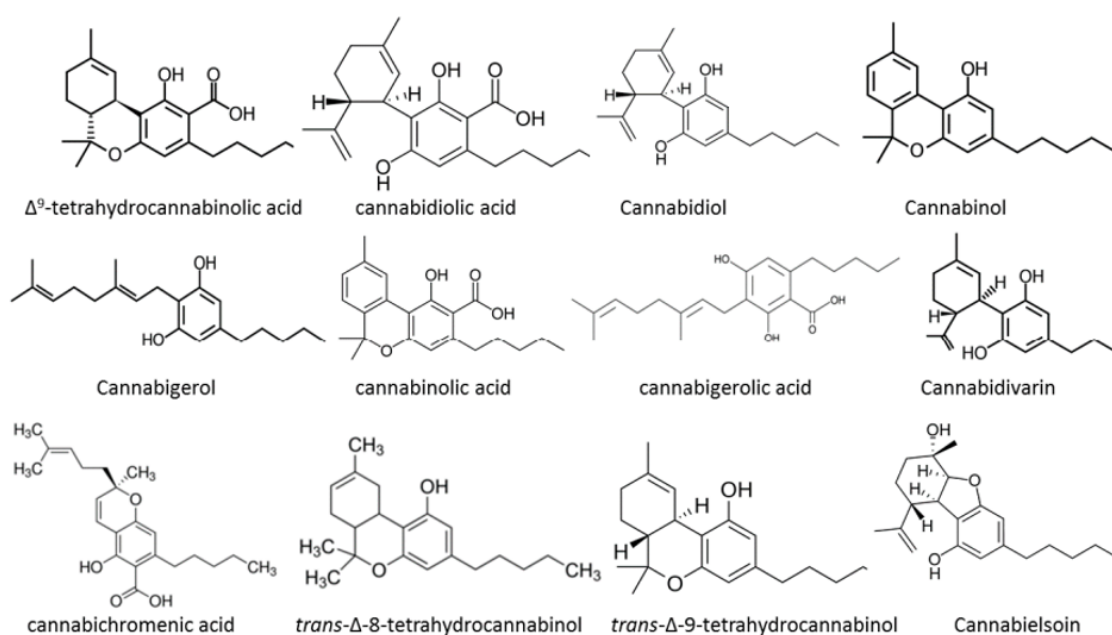


Figura 1: Alguns canabinoides naturais da planta *Cannabis* spp. (GONÇALVES et al., 2019).

2.3 Importância dos produtos da *Cannabis* spp. na saúde pública:

Em 1980, um estudo brasileiro liderado pelo pesquisador Elisaldo Carlini, revelou o efeito anticonvulsivante do CBD (CUNHA et al., 1980) mas foi somente em 1988 que foi evidenciada a existência do receptor CB1 e a existência do Sistema Endocanabinoide (SE) (DEVANE et al., 1988; DEVANE et al., 1992).

O SE é composto pelos receptores CB1 e CB2, seus ligantes endógenos (endocanabinoides) anandamida (AEA) e 2-Aracdonoilglicerol (2-AG) e ainda enzimas responsáveis pela degradação desses ligantes: Amida hidrolase de ácidos graxos

(FAAH) e Lipase monoacilglicerol (MAGL) (CRISTINO; BISOGNO; DI MARZO, 2020). Os receptores CB1 e CB2 estão amplamente expressos por todo o corpo, como no sistema nervoso periférico, glândulas, órgãos, tecidos, sistema imunológico além do sistema nervoso central, sendo responsável por uma ampla gama de efeitos biológicos (JOSHI; ONAIVI, 2019).

Cientistas no mundo inteiro vem estudando e evidenciando os efeitos terapêuticos dos compostos encontrados na *Cannabis* spp. como alternativa para tratamento de doenças graves que causam um grande prejuízo à qualidade de vida e que cujas abordagens atuais já não são eficazes como: Alzheimer, Parkinson, epilepsia refratária, anorexia, dores neuropáticas, esclerose lateral amiotrófica, esclerose múltipla, depressão, ansiedade generalizada, esquizofrenia, insônia, náusea e vômito decorrentes da quimioterapia (PACHER; BÁTKEI; KUNOS, 2006) dentre outros.

2.4 Métodos de Análises para os produtos da *Cannabis* spp.

A cromatografia é o método de separação mais amplamente utilizado para análises químicas. É um processo físico de separação que é realizada com base na afinidade pelo analito de interesse, entre duas fases: A fase estacionária e a fase móvel. Ambas podem variar de acordo método de análise utilizado. Os principais tipos de cromatografia são: Cromatografia em papel, cromatografia de camada delgada, cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia gasosa. O tipo de cromatografia selecionado, assim como a fase estacionária e a fase móvel utilizada, depende do material a ser analisado (PERES, 2002).

A *Cannabis* spp. é uma planta quimicamente complexa, contendo em sua composição mais de 565 substâncias, dentre elas terpenos, carboidratos, ácidos graxos e seus ésteres, amidas, aminas, fitosteróis, compostos fenólicos e canabinoides (ELSOHLY et al., 2017). Para a caracterização e quantificação desses compostos, são necessários métodos cromatográficos específicos. Os compostos voláteis, como os terpenos, são analisados através do método da cromatografia gasosa (IBRAHIM et al., 2019) enquanto os Fitocannabinoides e demais compostos podem ser analisados através da cromatografia líquida (DE BACKER et al., 2009).

Para a ANVISA, o conceito de marcadores é determinante no processo de desenvolvimento, registro, fabricação e vigilância de produtos farmacêuticos a base de plantas medicinais. Marcadores são substância ou classe de substâncias (ex.: alcaloides, flavonoides, ácidos graxos, etc.) utilizada como referência no controle da qualidade da matéria-prima vegetal e do fitoterápico, preferencialmente tendo correlação com o efeito terapêutico. O marcador pode ser do tipo ativo, quando relacionado com a atividade terapêutica do fitocomplexo, ou analítico, quando não demonstrada, até o momento, sua relação com a atividade terapêutica do fitocomplexo (BRASIL, 2014a).

A partir da publicação da RDC 26, de 13 de maio de 2014, a autarquia regulamenta a obrigatoriedade das análises dos marcadores nesse tipo de produto, sendo eles marcadores ativos ou analíticos, e estão diretamente relacionados com a certificação de controle de qualidade dos medicamentos (BRASIL, 2014a).

2.5 Importância do Desenvolvimento de Métodos para as Análises:

O aumento do uso da *Cannabis* spp. para fins medicinais vem crescendo em todo o mundo. A *Cannabis* spp. contém diversas substâncias que possuem efeitos farmacológicos e tratam várias doenças de difícil tratamento, despertando um grande interesse por parte da indústria farmacêutica (LIMA; ALEXANDRE; SANTOS, 2021).

Devido a importância terapêutica e econômica da *Cannabis* spp., se faz necessário o desenvolvimento de métodos analíticos eficientes para realizar a separação e posterior identificação e quantificação dos compostos presentes nela.

3. Objetivos

3.1 Gerais

Desenvolver um método de análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para 3 dos principais marcadores da *Cannabis* spp.: canabidiol, Δ^9 -tetrahydrocannabinol e canabinol, que possibilite identificar e quantificar estes fitocanabinoides.

3.2 Objetivos Específicos:

- Desenvolver método cromatográfico por CLAE para 3 dos principais fitocanabinoides (canabidiol, Δ^9 -tetrahydrocannabinol e canabinol) presentes na *Cannabis* spp, utilizados como marcadores;
- Validar o método cromatográfico de análise desses fitocanabinoides;
- Identificar e quantificar os fitocanabinoides nas amostras de produtos à base de *Cannabis* spp.;

4. Materiais e Métodos

4.1 Padrões analíticos utilizados:

4.1.1 Padrão Canabidiol (SQR): 1 mg/mL

Lote: 0618580

Referência: ISO 60156

Fabricante: Cayman Chemical Company

4.1.2 Padrão Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (SQR): 1 mg/mL.

Lote: 0635461

Referência: ISO 60157

Fabricante: Cayman Chemical Company

4.1.3 Padrão Canabinol (SQR): 1 mg/mL

Lote: 0633316

Referência: ISO 60183

Fabricante: Cayman Chemical Company

4.2 Produtos analisados:

4.2.1 Óleo CBD 20 mg/mL (Clássico e Gold) – solução oleosa de extrato de *Cannabis* spp., com marcador padronizado em 20 mg/mL de CBD;

Lote: PRO 0070822117 – Clássico

Lote: PRO 0080822117 – Gold

Data de fabricação: 08/2022

Validade: 08/2023

Fabricante: ABRACE ESPERANÇA

4.2.2 Óleo Δ^9 -THC 15 mg/mL (Clássico e Gold) - solução oleosa de extrato de *Cannabis* spp., com marcador padronizado em 15 mg/mL de Δ^9 -THC;

Lote: PRO 0070522117 – Clássico

Lote: PRO 0250522117 – Gold

Data de fabricação: 05/2022

Validade: 05/2023

Fabricante: ABRACE ESPERANÇA

4.2.3 Óleo CBD: Δ^9 -THC 15 mg/mL (Clássico e Gold) - solução oleosa de extrato de *Cannabis* spp., com marcador padronizado em 15 mg/mL de CBD + 15 mg/mL de Δ^9 -THC;

LOTE: PRO 0231122117 - Clássico 15 mg/ml;

LOTE: PRO 0241122117 - Gold 15 mg/ml;

Fabricação: 11/2022;

Validade: 11/2023.

Fabricante: ABRACE ESPERANÇA

4.3 Reagentes:

- Acetonitrila (grau HPLC); Kasvi; Lote interno: 8000001-16-09-22/4; Retest 02/2025;
- Metanol (grau HPLC); Dinamica; Lote interno: 1041117/7; Validade 03/2026;
- Isopropanol (grau HPLC); Dinamica; Lote interno:120144/4; Validade 03/2026;
- Etanol (grau HPLC); Dinamica; Lote interno: 1040117/3; Validade 12/2025;
- Acetato de amônio; Moderna; Lote interno: 12177; Validade 07/2027;
- Ácido acético Glacial; Moderna; Lote interno: 12843; Validade 07/2027;
- Hidróxido de amônio; Moderna; Lote interno: 12715; Validade 02/2025;
- Óleo de milho; Distriol; Lote interno: 01122020/25297; Validade 02/2023;
- Água ultrapura;

4.4 Equipamentos:

- Balança analítica ME 204 Mettler Toledo;

- Vortex Kasvi K40-10208;
- Banho ultrassônico lojanetlab;
- Sistema de purificação de água aquapur Evolution AQ 3000;
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 series - DAD;
- pHmetro FiveEasy Mettler Toledo;

4.5 Materiais e vidrarias:

- Coluna Thermo Scientific Hypersil Gold 5 μ , tamanho de poro 175 Å, 250x4,6 mm, C-18 fase reversa;
- Filtro de sering PVDF hidrofóbico 0,22 μ m 13 mm;
- Seringas;
- Balões volumétricos de 5, 10, 25, 50 e 1000 mL;
- Pipeta pipet-lite xls Rainin de 10,0 – 100,0 μ L;
- Pipeta pipet-lite xls Rainin de 100,0 – 1000 μ L;
- Béqueres 50, 100 e 500 mL;
- Proveta de vidro 20, 100, 500, 1000 mL;
- Vidros de relógio;
- Funis de vidro;
- Espátulas de aço inox;
- Aparato de filtração;
- Vials.

4.6 Validação do Método de Análise Cromatográfica:

Segundo a classificação para os testes analíticos, descritos na Farmacopeia Brasileira sexta edição (BRASIL, 2019b), e na RDC/ANVISA 166 de 24 de julho de 2017 (BRASIL, 2017), que dispõe sobre a validação de métodos analíticos que tem por objetivo demonstrar que o método analítico produz resultados confiáveis e é adequado à finalidade a que se destina, de forma documentada e mediante critérios objetivos, os parâmetros a serem alcançados serão:

Adequabilidade: Serão avaliados a resolução e o fator de cauda. A resolução, R , é função da eficiência da coluna, N , e é especificada para garantir que substâncias eluídas próximas uma da outra, apresentem separação satisfatória sem interferências mútuas. Replicatas de injeções da solução padrão são trabalhadas, estatisticamente, para verificar se os requerimentos para a precisão da análise foram atingidos. São utilizados os dados de cinco replicatas de injeções para calcular o desvio padrão relativo (DPR), se a especificação for igual ou inferior a 2,0%. O fator de cauda, T , que indica a simetria do pico, é igual a 1 para picos perfeitamente simétricos e maior que 1 para picos que apresentam assimetria.

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. No caso de métodos cromatográficos, deve ser comprovada a pureza cromatográfica do sinal do analito, exceto para produtos biológicos.

Linearidade: A linearidade de um método deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra, utilizando no mínimo, 5 (cinco) concentrações diferentes da substância química de referência (SQR) para as soluções preparadas em, no mínimo, triplicata. O coeficiente de correlação deve ser no mínimo 0,99. A homoscedasticidade dos dados deve ser investigada para a utilização do modelo adequado.

Efeito Matriz: O efeito matriz deve ser determinado por meio da comparação entre os coeficientes angulares das curvas de calibração construídas com a SQR do analito em solvente com a amostra fortificada com a SQR do analito. O paralelismo das retas é indicativo de ausência de interferência dos constituintes da matriz e a sua demonstração deve ser realizada por meio de avaliação estatística adequada.

Intervalo: Intervalo de concentração de trabalho, com precisão, exatidão e linearidade aceitáveis.

Precisão: Deverá ser demonstrada através da repetibilidade e precisão intermediária:

Repetibilidade: Utilizar, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, 3 (três) concentrações: baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas em cada nível ou 6 (seis) réplicas a 100% (cem por cento) da concentração do teste individualmente preparadas.

Precisão Intermediária: Expressar a proximidade entre os resultados obtidos da análise de uma mesma amostra, no mesmo laboratório, em pelo menos dois dias diferentes, realizada por operadores distintos; e contemplar as mesmas concentrações e o mesmo número de determinações descritas na avaliação da repetibilidade.

Exatidão: A exatidão deve ser verificada a partir de, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, 3 (três) concentrações: baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas em cada nível. A exatidão deve ser expressa pela relação percentual de recuperação do analito de concentração conhecida adicionado à amostra ou pela relação entre a concentração média, determinada experimentalmente, e a concentração teórica correspondente. Deve ser calculado o desvio padrão relativo (DPR) para cada concentração.

Limite de Detecção: O limite de detecção é determinada pela menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser detectado, porém, não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. A razão sinal/ruído deve ser maior ou igual a 2:1.

Limite de Quantificação: O limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. A razão sinal/ruído deve ser no mínimo de 10:1.

Robustez: A robustez é um parâmetro tipicamente realizado no desenvolvimento do método analítico que indica a sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações das condições analíticas, avaliando variação do pH da fase móvel, variação na composição da fase móvel, temperatura ou fluxo da fase móvel, ou outros possíveis interferentes do método.

4.7 Metodologia do estudo:

4.7.1 Preparo de soluções:

4.7.1.1 Preparo da fase móvel A:

Em uma proveta de 1000 mL, mediu-se 1000 mL de água ultrapura e transferiu-se aproximadamente 800 mL para um balão volumétrico de 1000 mL. Com auxílio de uma pipeta, mediu-se 2,0 mL de ácido acético e transferiu-se para o balão. Completou-se o volume com a água ultrapura e foi homogeneizado. Filtrou-se em membrana de 47,00 µm x 45,00 mm e transferiu-se para uma garrafa de fase móvel de 1000 mL com tampa rosqueada e rotulou-se como Fase Móvel A, água+0,20% ácido acético. Foi colocado no canal A do CLAE.

4.7.1.2 Preparo da fase móvel B:

Em uma proveta de 1000 mL, mediu-se 1000 mL de acetonitrila e transferiu-se aproximadamente 800 mL para um balão volumétrico de 1000 mL. Com auxílio de uma pipeta, mediu-se 1,5 mL de ácido acético e transferiu-se para o balão. Completou-se o volume com a acetonitrila e foi homogeneizado. Filtrou-se em membrana de 47,00 µm x 45,00 mm e transferiu-se para a garrafa de fase móvel de 1000 mL. Fechou-se com a tampa e foi rotulado como Fase Móvel B, Acetonitrila + 0,15% de ácido acético. Foi colocada no canal B do CLAE.

4.7.1.5 Preparo da solução de lavagem:

Com o auxílio de uma proveta de 250 mL, mediu-se 180 mL de água ultrapura e adicionou-se 20 mL de isopropanol. Homogeneizou-se com um bastão de vidro e filtrou-se em membrana de 47,00 µm x 45,00 mm. Transferiu-se a solução para uma garrafa de fase móvel, fechou-se a tampa e foi rotulado como Solução de lavagem, 90% água+10% metanol.

4.7.2 Condições cromatográficas:

Descrição das condições cromatográficas para análise das amostras se encontra no quadro 1:

Quadro 1: Condições cromatográficas para análise dos óleos de *Cannabis* spp.

ITEM	DESCRIÇÃO
Coluna	Thermo Scientific Hypersil GOLD 5μ, tamanho de poro 175 Å, 250x4,6mm, C-18 fase reversa
Fase móvel	Fase Móvel A, água+0,20% ácido acético; Fase Móvel B, Acetonitrila+0,15% ácido acético
Temperatura do forno	40 °C
Comprimento de onda	220 nm
Fluxo	1,5 mL/min
Substâncias	Canabidiol (CBD), Δ ⁹ Tetrahydrocannabinol (Δ ⁹ -THC) e Canabinol (CBN).
Tempo de análise	30 minutos
Método	0 min (62% B); 2 min (62% B); 9,5 min (75% B); 17 min (95% B); 23 min (95% B); 24 min (62% B); 30 min (STOP RUN)

4.7.3 Cálculos:

O teor de cada canabinoide em mg/mL nos óleos foi realizado conforme a fórmula abaixo:

$$\text{Teor de cada canabinoide (mg/mL)} = \frac{A_a \times C_p}{A_p} \times F_d$$

Onde:

A_a = área do pico do canabinoide na amostra

A_p = área do pico do padrão do canabinoide

C_p = Concentração do padrão μg/mL

$Fd = \text{Fator de diluição} = 1000 = (25 \text{ mL} \div 0,025 \text{ mL})$

25 mL = volume final da amostra preparada

0,025 mL = volume da alíquota da amostra pipetada para o doseamento.

4.8 Execução dos testes de validação analítica:

4.8.1 Adequabilidade:

4.8.1.1 Preparo do controle negativo:

Com auxílio de proveta mediu-se 25 mL de etanol absoluto e transferiu-se para um balão de 25 mL. Retirou-se uma alíquota de 1 mL e filtrou-se para um vial utilizando um filtro de seringa PVDF Hidrofóbico 0,22 µm 13 mm. Injetou-se o etanol em quintuplicata no CLAE nas condições cromatográficas, conforme item 4.7.2.

4.8.1.2 Preparo da Solução Padrão de Canabidiol, Δ^9 -tetrahydrocannabinol, cannabinol (18 µg/mL).

Com o auxílio de uma pipeta automática, pipetou-se 90 µL do padrão de referência Canabidiol, 90 µL do padrão de referência Δ^9 -tetrahydrocannabinol e 90 µL do padrão de referência cannabinol, para um balão de 5 mL respectivamente. Adicionou-se etanol absoluto no balão volumétrico para completar-se o volume e homogeneizou-se por aproximadamente 30 segundos. Retirou-se uma alíquota de 1,0 mL e filtrou-se para um vial utilizando um filtro de seringa PVDF Hidrofóbico 0,22 µm 13 mm. Injetou-se a solução padrão em quintuplicata no CLAE nas condições cromatográficas, conforme item 4.7.2.

4.8.2 Seletividade:

Este parâmetro foi avaliado por meio da análise de cinco tipos de amostras:

Amostra 1: Controle negativo 1 (etanol);

Amostra 2: Controle negativo 2 (Matriz da amostra);

Amostra 3: Controle positivo tipo 1 (Solução Padrão);

Amostra 4: Controle positivo tipo 2 (Padrão na solução matriz).

Amostra 5: Solução Amostra

4.8.2.1 Preparo do controle negativo 1:

Com auxílio de proveta, mediu-se 25 mL de etanol absoluto e transferiu-se para um balão de 25 mL. Retirou-se uma alíquota de 1 mL e filtrou-se para um vial utilizando um filtro de seringa PVDF Hidrofóbico 0,22 um 13 mm. Injetou-se o etanol em triplicata no CLAE nas condições cromatográficas, conforme item 4.7.2.

4.8.2.2 Preparo do Controle negativo 2 (matriz da amostra):

Com auxílio de uma balança analítica pesou-se 0,023 g de óleo de milho em um balão volumétrico de 25 mL. Adicionou-se etanol para fazer volume e homogeneizou-se com o vórtex Kasvi K40-10208. Retirou-se uma alíquota de 1 mL e filtrou-se para um vial utilizando um filtro de seringa PVDF Hidrofóbico 0,22 um 13 mm. Injetou-se a matriz da amostra em triplicata no CLAE nas condições cromatográficas conforme item 4.7.2.

4.8.2.3 Preparo da Solução Padrão:

4.8.2.3.1 Preparo da Solução Padrão de Canabidiol, Δ^9 -tetrahydrocannabinol, Canabinol (18 $\mu\text{g/mL}$):

Com o auxílio de uma pipeta automática, pipetou-se 90 μL do padrão de referência Canabidiol, 90 μL do padrão de referência Δ^9 -tetrahydrocannabinol e 90 μL do padrão de referência Canabinol para um balão de 5 mL respectivamente. Adicionou-se etanol absoluto no balão volumétrico para completou-se o volume e homogeneizou-se por aproximadamente 30 segundos. Retirou-se uma alíquota de 1,0 mL e filtrou-se para um vial utilizando um filtro de seringa PVDF Hidrofóbico 0,22 um 13 mm. Injetou-se a solução padrão em triplicata no CLAE nas condições cromatográficas, conforme item 4.7.2.

4.8.2.4 Preparo da solução amostra:

4.8.2.4.1 Preparo da solução amostra Canabidiol (20 µg/mL):

Com auxílio de uma balança, pesou-se 0,023 g de amostra de óleo de Canabidiol (20 mg/mL) em um balão volumétrico de 25 mL. Adicionou-se etanol absoluto para completar o volume, e homogeneizou-se com o vórtex Kasvi K40-10208. Retirou-se uma alíquota de 1 mL e filtrou-se para um vial, utilizando um filtro de seringa PVDF Hidrofóbico 0,22 µm 13 mm. Injetou-se a amostra em triplicata no CLAE nas condições cromatográficas, conforme item 4.7.2.

4.8.2.4.2 Preparo da solução amostra Δ^9 -tetrahydrocannabinol (15 µg/mL):

Com auxílio de uma balança, pesou-se 0,023 g de amostra de óleo de Δ^9 -tetrahydrocannabinol (15 mg/mL) em um balão volumétrico de 25 mL. Adicionou-se etanol absoluto para fazer volume e homogeneizou-se com o vórtex Kasvi K40-10208. Retirou-se uma alíquota de 1 mL e filtrou-se para um vial utilizando um filtro de seringa PVDF Hidrofóbico 0,22 µm 13 mm. Injetou-se a amostra em triplicata no CLAE nas condições cromatográficas, conforme item 4.7.2.

4.8.2.4.3 Preparo da solução amostra Canabidiol: Δ^9 -tetrahydrocannabinol (15 µg/mL: 15 µg/mL):

Com auxílio de uma balança, pesou-se 0,023 g de amostra de óleo de Canabidiol : Δ^9 -tetrahydrocannabinol (15 mg/mL : 15 mg/mL) em um balão volumétrico de 25 mL. Adicionou-se etanol para fazer volume e homogeneizou-se com o vórtex Kasvi K40-10208. Retirou-se uma alíquota de 1 mL e filtrou-se para um vial utilizando um filtro de seringa PVDF Hidrofóbico 0,22 µm 13 mm. Injetou-se a amostra em triplicata no CLAE nas condições cromatográficas, conforme item 4.7.2.

4.8.2.5 Preparo da solução Matriz e Padrão em solução Matriz:

4.8.2.5.1 Preparo da Solução Matriz:

Com auxílio de uma balança, pesou-se 0,023 g de óleo de milho em um balão volumétrico de 25 mL. Adicionou-se etanol para fazer volume e homogeneizou-se com

o vórtex Kasvi K40-10208. Retirou-se uma alíquota de 1 mL e filtrou-se para um vial utilizando um filtro de seringa PVDF Hidrofóbico 0,22 µm 13 mm. Injetou-se a matriz da amostra em triplicata no CLAE nas condições cromatográficas conforme item 4.7.2.

4.8.2.5.2 Preparo da Solução Padrão de Canabidiol, Δ^9 -tetrahydrocannabinol, cannabinol em solução Matriz (18 µg/mL):

Com o auxílio de uma pipeta automática, pipetou-se 90 µL do padrão de referência Canabidiol, 90 µL do padrão de referência Δ^9 -tetrahydrocannabinol e 90 µL do padrão de referência cannabinol para um balão de 5 mL respectivamente. Adicionou-se a solução matriz preparado no item 4.2.5.1 no balão volumétrico, e completou-se o volume. Homogeneizou-se por aproximadamente 30 segundos. Retirou-se uma alíquota de 1,0 mL e filtrou-se para um vial utilizando um filtro de seringa PVDF Hidrofóbico 0,22 µm 13 mm. Injetou-se a solução padrão em triplicata no CLAE nas condições cromatográficas, conforme item 4.7.2.

4.8.3 Linearidade e Faixa de Trabalho:

Este parâmetro foi avaliado por meio da análise de 10 soluções dos padrões Canabidiol, Δ^9 -tetrahydrocannabinol e cannabinol nas seguintes concentrações: 7,5%; 25%; 50%; 60%; 70%; 80%; 90%; 100%; 110%; 120% usando 20 µg/mL como 100%. Estas foram obtidas, por meio de diluições, a partir de uma solução mãe.

4.8.3.1 Solução Padrão (Solução mãe):

Com auxílio de uma pipeta automática, mediu-se 1,0 mL de cada padrão (Canabidiol, Δ^9 -tetrahydrocannabinol e cannabinol - 1mg/mL) e transferiu-se cada um para um balão volumétrica de 5 mL. Completou-se o volume para 5 mL com etanol absoluto para obter uma concentração final de 200 µg/mL de solução de cada canabinoide.

Pipetou-se 0,0375 mL (37,5 µL) da solução padrão mãe de cada canabinoide respectivamente e transferiu-se para um balão volumétrico de 5,0 mL. Completou-se o volume com etanol absoluto para obter a solução com concentração final dos

canabinoides (Canabidiol, Δ^9 -tetrahydrocannabinol e cannabinol) de 1,5 $\mu\text{g/mL}$ (0,0015 mg/mL).

4.8.3.2.2 Preparo da solução 25%:

Pipetou-se 0,125 mL (125 μL) da solução padrão mãe de cada canabinoide respectivamente e transferiu-se para um balão volumétrico de 5,0 mL. Completou-se o volume com etanol absoluto para obter a solução com concentração final dos canabinoides (Canabidiol, Δ^9 -tetrahydrocannabinol e cannabinol) de 5 $\mu\text{g/mL}$ (0,005 mg/mL).

4.8.3.2.3 Preparo da solução 50%:

Pipetou-se 0,25 mL (250 μL) da solução padrão mãe de cada canabinoide respectivamente e transferiu-se para um balão volumétrico de 5,0 mL. Completou-se o volume com etanol absoluto para obter a solução com concentração final dos canabinoides (Canabidiol, Δ^9 -tetrahydrocannabinol e cannabinol) de 10 $\mu\text{g/mL}$ (0,010 mg/mL).

4.8.3.2.4 Preparo da Solução 60%:

Pipetou-se 0,30 mL (300 μL) da solução padrão mãe de cada canabinoide respectivamente, transferiu-se para balão volumétrico de 5,0 mL. Completou-se o volume com etanol absoluto para obter a solução com concentração final dos canabinoides (Canabidiol, Δ^9 -tetrahydrocannabinol e cannabinol) de 12 $\mu\text{g/mL}$ (0,012 mg/mL).

4.8.3.2.5 Preparo da Solução 70%:

Pipetou-se 0,35 mL (350 μL) da solução padrão mãe de cada canabinoide respectivamente, transferiu-se para balão volumétrico de 5,0 mL. Completou-se o volume com etanol absoluto para obter a solução com concentração final dos canabinoides (Canabidiol, Δ^9 -tetrahydrocannabinol e cannabinol) de 14 $\mu\text{g/mL}$ (0,014 mg/mL).

4.8.3.2.6 Preparo da Solução 80%:

Pipetou-se 0,40 mL (400 µL) da solução padrão mãe de cada canabinoide respectivamente, transferiu-se para balão volumétrico de 5,0 mL. Completou-se o volume com etanol absoluto para obter a solução com concentração final dos canabinoides (Canabidiol, Δ^9 tetrahydrocannabinol e cannabinol) de 16 µg/mL (0,016 mg/mL).

4.8.3.2.7 Preparo da Solução 90%:

Pipetou-se 0,45 mL (450 µL) da solução padrão mãe de cada canabinoide respectivamente, transferiu-se para balão volumétrico de 5,0 mL. Completou-se o volume com etanol absoluto para obter a solução com concentração final dos canabinoides (Canabidiol, Δ^9 tetrahydrocannabinol e cannabinol) de 18 µg/mL (0,018 mg/mL).

4.8.3.2.8 Preparo da Solução 100%:

Pipetou-se 0,50 mL (500 µL) da solução padrão mãe de cada canabinoide respectivamente, transferiu-se para balão volumétrico de 5,0 mL e completou-se o volume com etanol absoluto para obter a solução com concentração final dos canabinoides (Canabidiol, Δ^9 tetrahydrocannabinol e cannabinol) de 20 µg/mL (0,020 mg/mL).

4.8.3.2.9 Preparo da Solução 110%:

Pipetou-se 0,55 mL (550 µL) da solução padrão mãe de cada canabinoide respectivamente, transferiu-se para balão volumétrico de 5,0 mL e completou-se o volume com etanol absoluto para obter a solução com concentração final dos canabinoides (Canabidiol, Δ^9 tetrahydrocannabinol e cannabinol) de 22 µg/mL (0,022 mg/mL).

4.8.3.2.10 Preparo da Solução 120%:

Pipetou-se 0,60 mL (600 µL) da solução padrão mãe de cada canabinoide respectivamente, transferiu-se para balão volumétrico de 5,0 mL e completou-se o

volume com etanol absoluto para obter a solução com concentração final dos canabinoides (Canabidiol, Δ^9 -tetrahydrocannabinol e cannabinol) de 24 $\mu\text{g/mL}$ (0,024 mg/mL).

Após o preparo das amostras para análise, filtraram-se para os vials respectivos, utilizando um filtro de seringa PVDF Hidrofóbico 0,22 μm 13 mm ou equivalente. Injetou-se em triplicata as amostras no CLAE nas condições cromatográficas, conforme item 4.7.2.

4.8.4 Efeito Matriz:

Este parâmetro foi avaliado através da análise de 10 soluções dos padrões Canabidiol, Δ^9 -tetrahydrocannabinol e cannabinol na solução matriz nas seguintes concentrações: 7,5%; 25%; 50%; 60%; 70%; 80%; 90%; 100%; 110%; 120% usando 20 $\mu\text{g/mL}$ como 100%. Estas foram obtidas, por meio de diluições, a partir de uma solução mãe.

4.8.4.5 Preparo da solução da matriz:

Com auxílio de uma balança, pesou-se 0,092 g de óleo de milho em um balão volumétrico de 100 mL. Adicionou-se etanol para completar o volume e homogeneizou-se com o vórtex Kasvi K40-10208. Retirou-se uma alíquota de 1 mL e filtrou-se para um vial utilizando um filtro de seringa PVDF Hidrofóbico 0,22 μm 13 mm. Injetou-se a amostra da solução da matriz em triplicata no CLAE nas condições cromatográficas, conforme item 4.7.2.

4.8.4.6 Preparo da solução mãe com solução matriz:

Com auxílio de uma pipeta automática, mediu-se 1,0 mL de cada padrão (Canabidiol, Δ^9 -tetrahydrocannabinol e cannabinol - 1mg/mL) e transferiu-se cada um para um balão volumétrica de 5 mL. Fez-se o volume para 5 mL com a solução da matriz para obter uma concentração final de 200 $\mu\text{g/mL}$ de solução de cada canabinoide.

4.8.4.7 Preparo das soluções com solução matriz (7,5% - 120%):

4.8.4.7.1 Preparo da solução com solução matriz 7,5%:

Pipetou-se 0,0375 mL (37,5 µL) da solução padrão mãe com matriz (200 µg/mL) e transferiu-se para um balão volumétrico de 5,0 mL. Completou-se o volume com a solução matriz para obter uma concentração final dos canabinoides (canabidiol, Δ^9 -tetrahydrocannabinol e canabinol) de 1,5 µg/mL (0,0015 mg/mL).

4.8.4.7.2 Preparo da solução com solução matriz 25%:

Pipetou-se 0,125 mL (125 µL) da solução padrão mãe com matriz e transferiu-se para um balão volumétrico de 5,0 mL. Completou-se o volume com a solução matriz para obter uma concentração final dos canabinoides (Canabidiol, Δ^9 -tetrahydrocannabinol e canabinol) de 5 µg/mL (0,005 mg/mL).

4.8.4.7.3 Preparo da solução com solução matriz 50%:

Pipetou-se 0,25 mL (250 µL) da solução padrão mãe com matriz e transferiu-se para um balão volumétrico de 5,0 mL. Completou-se o volume com a solução matriz para obter uma concentração final dos canabinoides (Canabidiol, Δ^9 -tetrahydrocannabinol e canabinol) de 10 µg/mL (0,010 mg/mL).

4.8.4.7.4 Preparo da solução com solução matriz 60%:

Pipetou-se 0,30 mL (300 µL) da solução padrão mãe com matriz e transferiu-se para balão volumétrico de 5,0 mL. Completou-se o volume com a solução matriz para obter uma concentração final dos canabinoides (Canabidiol, Δ^9 -tetrahydrocannabinol e canabinol) de 12 µg/mL (0,012 mg/mL).

4.8.4.7.5 Preparo da solução com solução matriz 70%:

Pipetou-se 0,35 mL (350 µL) da solução padrão mãe com matriz e transferiu-se para balão volumétrico de 5,0 mL. Completou-se o volume com a solução matriz para obter uma concentração final dos canabinoides (Canabidiol, Δ^9 -tetrahydrocannabinol e canabinol) de 14 µg/mL (0,014 mg/mL).

4.8.4.7.6 Preparo da solução com solução matriz 80%:

Pipetou-se 0,40 mL (400 µL) da solução padrão mãe com matriz e transferiu-se para balão volumétrico de 5,0 mL. Completou-se o volume com a solução matriz para obter uma concentração final dos canabinoides (Canabidiol, Δ^9 -tetrahydrocannabinol e canabinol) de 16 µg/mL (0,016 mg/mL).

4.8.4.7.7 Preparo da solução com solução matriz 90%:

Pipetou-se 0,45 mL (450 µL) da solução padrão mãe com matriz e transferiu-se para balão volumétrico de 5,0 mL. Completou-se o volume com a solução matriz para obter uma concentração final dos canabinoides (Canabidiol, Δ^9 -tetrahydrocannabinol e canabinol) de 18 µg/mL (0,018 mg/mL).

4.8.4.7.8 Preparo da solução com solução matriz 100%:

Pipetou-se 0,50 mL (500 µL) da solução padrão mãe com matriz e transferiu-se para balão volumétrico de 5,0 mL. Completou-se o volume com a solução matriz para obter uma concentração final dos canabinoides (Canabidiol, Δ^9 -tetrahydrocannabinol e canabinol) de 20 µg/mL (0,020 mg/mL).

4.8.4.7.9 Preparo da solução com solução matriz 110%:

Pipetou-se 0,55 mL (500 µL) da solução padrão mãe com matriz e transferiu-se para balão volumétrico de 5,0 mL. Completou-se o volume com a solução matriz para obter uma concentração final dos canabinoides (Canabidiol, Δ^9 -tetrahydrocannabinol e canabinol) de 22 µg/mL (0,022 mg/mL).

4.8.4.7.10 Preparo da solução com solução matriz 120%:

Pipetou-se 0,60 mL (600 µL) da solução padrão mãe com matriz e transferiu-se para balão volumétrico de 5,0 mL. Completou-se o volume com a solução matriz para obter uma concentração final dos canabinoides (Canabidiol, Δ^9 -tetrahydrocannabinol e canabinol) de 24 µg/mL (0,024 mg/mL).

Após o preparo das amostras para análise, filtraram-se para os vials respectivos, utilizando um filtro de seringa PVDF Hidrofóbico 0,22 µm 13 mm ou

equivalente. Injetou-se em triplicata as amostras no CLAE nas condições cromatográficas, conforme item 4.7.2.

O cálculo para a avaliação do efeito matriz foi realizado utilizando a equação abaixo:

$$C\% = 100 \times (1 - S_m/S_s)$$

Onde:

S_m = inclinação da curva obtida pela injeção das amostras de soluções estoque de cada analito, preparados na matriz;

S_s = inclinação da curva obtida pela injeção das amostras de soluções estoque de cada analito, preparados no solvente.

O efeito matriz é considerado baixo para intervalos entre $-20\% < C\% < 20\%$, médio para os intervalos $-50\% < C\% < -20\%$ ou $20\% < C\% < 50\%$, e elevado para os intervalos $C\% < -50\%$ ou $C\% > 50\%$ (CERQUEIRA et al., 2011).

Além disso, os dados das duas curvas foram avaliados estatisticamente ($p < 0,05$) pelo teste T de Student pelo modelo bicaudal.

4.8.5 Precisão (repetibilidade) e Precisão intermediária:

Para avaliação de repetibilidade e precisão intermediária, foram avaliadas as concentrações: baixa (12 $\mu\text{g/mL}$), média (18 $\mu\text{g/mL}$) e alta (24 $\mu\text{g/mL}$) dos canabinoides Canabidiol, canabinol e Δ^9 -tetrahydrocanabinol.

4.8.5.1 Preparo das soluções Padrões:

4.8.5.1.1 Preparo da solução Padrão com concentração baixa (12 $\mu\text{g/mL}$):

Preparou-se a solução Padrão mãe dos canabinoides (CBD, CBN, Δ^9 -THC) na concentração 200 $\mu\text{g/mL}$ conforme item 4.8.3.1. Subsequentemente, pipetou-se 0,30 mL (300 μL) da solução padrão mãe de cada canabinoide respectivamente, transferiu-se para balão volumétrico de 5,0 mL. Completou-se o volume com etanol absoluto para obter a solução com concentração final dos canabinoides (Canabidiol, Δ^9 -

tetrahydrocannabinol e cannabinol) de 12 µg/mL (0,012 mg/mL) e homogeneizou-se por aproximadamente 30 segundos com o vórtex Kasvi K40-10208. Retirou-se uma alíquota de 1,0 mL e filtrou-se para um vial utilizando um filtro de seringa PVDF Hidrofóbico 0,22 µm 13 mm.

4.8.5.1.2 Preparo da Solução Padrão com concentração média (18 µg/mL):

Com o auxílio de uma pipeta automática, pipetou-se 0,45 mL (450 µL) da solução padrão mãe de cada canabinoide respectivamente, preparada conforme o item 4.8.3.1, e transferiu-se para balão volumétrico de 5,0 mL. Completou-se o volume com etanol absoluto para obter a solução com concentração final dos canabinoides (Canabidiol, Δ^9 -tetrahydrocannabinol e cannabinol) de 18 µg/mL (0,018 mg/mL) e homogeneizou-se por aproximadamente 30 segundos com o vórtex Kasvi K40-10208. Retirou-se uma alíquota de 1,0 mL e filtrou-se para um vial utilizando um filtro de seringa PVDF Hidrofóbico 0,22 µm 13 mm.

4.8.5.1.3 Preparo da Solução Padrão com concentração alta (24 µg/mL):

Com o auxílio de uma pipeta automática, pipetou-se 0,6 mL (600 µL) da solução padrão mãe de cada canabinoide respectivamente, preparada conforme o item 4.8.3.1, e transferiu-se para balão volumétrico de 5,0 mL. Completou-se o volume com etanol absoluto para obter a solução com concentração final dos canabinoides (Canabidiol, Δ^9 -tetrahydrocannabinol e cannabinol) de 24 µg/mL (0,024 mg/mL) e homogeneizou-se por aproximadamente 30 segundos com o vórtex Kasvi K40-10208. Retirou-se uma alíquota de 1,0 mL e filtrou-se para um vial utilizando um filtro de seringa PVDF Hidrofóbico 0,22 µm 13 mm.

4.8.5.2 Repetibilidade:

A repetibilidade do método foi avaliada através de 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, nas concentrações 12 µg/mL, 18 µg/mL e 24 µg/mL, com 3 (três) réplicas, o mesmo analista e mesma instrumentação das soluções dos itens 4.8.5.1.1, 4.8.5.1.2, 4.8.5.1.3.

4.8.5.3 Precisão intermediária:

A determinação da precisão intermediária foi realizada por um segundo e terceiro analistas, respectivamente nos dois dias seguintes da repetibilidade. Foram realizadas 9 determinações das soluções dos itens 4.8.5.1.1, 4.8.5.1.2, 4.8.5.1.3 (concentrações 12 µg/mL, 18 µg/mL e 24 µg/mL) utilizando a mesma instrumentação e método analítico. Os resultados foram avaliados considerando a área do pico referente a cada canabinoide e o desvio padrão relativo (DPR) referente a três repetições, com critério de aceitação $\leq 2\%$ (BRASIL, 2017). Os cálculos de concentração dos marcadores serão realizados conforme item 4.7.3. Os resultados da precisão 1, 2 e 3 foram estatisticamente avaliados através do teste T de Student pelo modelo bicaudal ($p < 0,05$).

4.8.6 Exatidão:

Para avaliar esse parâmetro foram preparadas 3 amostras, em triplicata, nas concentrações 12 µg/mL, 18 µg/mL e 24 µg/mL. Para análise deste parâmetro, a solução padrão dos canabinoides foram preparadas na matriz de óleo de milho. A exatidão foi então avaliada através da percentagem de recuperação dos canabinoides marcadores (Canabidiol, Δ^9 -tetrahydrocannabinol, cannabinol), diluídos na matriz do produto. O ensaio foi realizado conforme descrito abaixo.

4.8.6.1 Preparo da solução Matriz:

Com auxílio de uma balança, pesou-se 0,023 g de óleo de milho em um balão volumétrico de 25 mL. Adicionou-se etanol para completar o volume e homogeneizou-se com o vórtex Kasvi K40-10208. Retirou-se uma alíquota de 1 mL e filtrou-se para um vial utilizando um filtro de seringa PVDF Hidrofóbico 0,22 µm 13 mm.

4.8.6.2 Preparo da Solução Padrão (Solução mãe) com matriz:

Com auxílio de uma pipeta automática, mediu-se 1,0 mL de cada padrão analítico (Canabidiol, Δ^9 -tetrahydrocannabinol e cannabinol, com sua concentração original de 1mg/mL) e transferiu-se cada um para um balão volumétrico de 5 mL. Completou-se o volume para 5 mL com etanol absoluto, obtendo assim uma concentração final de 200 µg/mL de solução de cada canabinoide.

4.8.6.3 Preparo das soluções para testes de Exatidão (12 µg/mL, 18 µg/mL, 24 µg/mL):

4.8.6.3.1 Preparo das soluções para Exatidão 12 µg/mL:

Pipetou-se 0,30 mL (300 µL) da solução padrão mãe dos canabinoides com solução matriz e transferiu-se para balão volumétrico de 5,0 mL. Completou-se o volume com a solução matriz do item 4.8.6.1 para obter a solução com concentração final dos canabinoides (Canabidiol, Δ^9 -tetrahydrocannabinol e cannabinol) de 12 µg/mL (0,012 mg/mL).

4.8.6.3.2 Preparo das soluções para Exatidão 18 µg/mL:

Pipetou-se 0,45 mL (450 µL) da solução padrão mãe dos canabinoides com solução matriz e transferiu-se para balão volumétrico de 5,0 mL. Completou-se o volume com a solução matriz do item 4.8.6.1 para obter a solução com concentração final dos canabinoides (Canabidiol, Δ^9 -tetrahydrocannabinol e cannabinol) de 18 µg/mL (0,018 mg/mL).

4.8.6.3.3 Preparo das soluções para Exatidão 24 µg/mL:

Pipetou-se 0,6 mL (600 µL) da solução padrão mãe dos canabinoides com solução matriz e transferiu-se para balão volumétrico de 5,0 mL. Completou-se o volume com a solução matriz do item 4.8.6.1 para obter a solução com concentração final dos canabinoides (Canabidiol, Δ^9 -tetrahydrocannabinol e cannabinol) de 24 µg/mL (0,024 mg/mL).

Após o preparo das amostras, filtrou-se para os vials, utilizando um filtro de seringa PVDF Hidrofóbico 0,22 µm 13 mm ou equivalente. Injetou-se em triplicata as amostras no CLAE nas condições cromatográficas, conforme item 4.7.2. O cálculo de concentração dos marcadores (fitocannabinoides) será realizado conforme item 4.7.3. O critério de conformidade será de 90 a 110 % de recuperação.

4.8.7 Limite de Detecção (LD):

O limite de detecção (LD) foi determinado baseada nos parâmetros da curva analítica, e foi calculado pela fórmula:

$$LD = \frac{3,3 \cdot \sigma}{IC}$$

Onde σ é o desvio padrão do intercepto com o eixo Y e IC a inclinação da curva de calibração.

O resultado obtido foi confirmado pelo sinal/ruído, onde a razão foi de pelo menos 2:1.

Para confirmar o valor obtido por sinal/ruído, a concentração do limite de detecção encontrada pela curva analítica, foi preparada através da solução mãe do padrão e injetada em triplicata no CLAE nas condições cromatográficas, conforme item 4.7.2.

4.8.8 Limite de Quantificação (LQ):

O limite de quantificação (LQ) foi determinado baseada nos parâmetros da curva analítica, e foi calculado através da fórmula:

$$LQ = \frac{10 \cdot \sigma}{IC}$$

Onde σ é o desvio padrão do intercepto com o eixo Y, e IC a inclinação da curva de calibração.

O resultado obtido foi confirmado pelo sinal/ruído, onde a razão foi de pelo menos 10:1. Para confirmar o valor obtido por sinal/ruído, a concentração do limite de quantificação encontrada pela curva analítica, foi preparada através da solução mãe do padrão e injetada em triplicata no CLAE nas condições cromatográficas, conforme item 4.7.2.

4.8.9 Robustez:

Esse parâmetro foi realizado com 05 variações cromatográficas para a concentração de 100% da amostra e padrão, conforme descritas na tabela 1.

Tabela 1: Descrição dos parâmetros avaliados na robustez:

PARÂMETROS		CONDIÇÕES DO MÉTODO	VARIÇÕES									
Fase móvel A	Água + Ácido Acético %(AA)	0,20% AA	0,20% AA	0,20% AA	0,19% AA	0,21%AA	0,21% AA	0,21% AA	0,19%AA	0,19%AA		
Fase móvel B	Acetonitrila + AA%	0,15% AA	0,1425%AA	0,1575% AA	0,15% AA	0,15% AA	0,1425% AA	0,1575% AA	0,1575%AA	0,1425%AA		
Temperatura		40 °C	38 °C					42 °C				
Fluxo da fase móvel		1,5 mL/min	1,425 mL/min					1,575 mL/min				
Tempo de Análise das amostras após preparo		Imediato	1º DIA	2º DIA	3º DIA	6º DIA	7º DIA	14º DIA	21º DIA	28º DIA		
Diferentes lotes ou fabricantes de colunas		Thermo Scientific Hypersil Gold 5µ, 250x4,6mm Ref. 25005-254630 Lote: 20379	Thermo Scientific Hypersil Gold 5µ, 250x4,6mm Ref. 25005-254630 Lote: 17436									

4.8.10 Avaliação das amostras dos lotes dos produtos: Óleos Canabidiol (20 mg/mL), Δ^9 -tetrahydrocannabinol (15 mg/mL) e Canabidiol: Δ^9 -tetrahydrocannabinol (1:1, 15 mg/mL + 15 mg/mL):

4.8.10.1 Preparo da solução amostra: Produto óleo de Canabidiol CBD (20 mg/mL). Concentração final: 20 μ g/mL.

Com auxílio de uma pipeta automática e balança analítica, pesou-se 0,023 g de amostra de óleo de Canabidiol (20 mg/mL) em um balão volumétrico de 25 mL. Adicionou-se etanol para completar o volume e homogeneizou-se com o vórtex Kasvi K40-10208. Retirou-se uma alíquota de 1 mL e filtrou-se para um vial utilizando um filtro de seringa PVDF Hidrofóbico 0,22 μ m 13 mm.

4.8.10.2 Preparo da solução amostra: Produto óleo de Δ^9 -tetrahydrocannabinol Δ^9 -THC (15 mg/mL). Concentração final: 15 μ g/mL.

Com auxílio de uma pipeta automática e balança analítica, pesou-se 0,023 g de amostra de óleo de Δ^9 -tetrahydrocannabinol (15 mg/mL) em um balão volumétrico de 25 mL. Adicionou-se etanol para completar o volume e homogeneizou-se com o vórtex Kasvi K40-10208. Retirou-se uma alíquota de 1 mL e filtrou-se para um vial utilizando um filtro de seringa PVDF Hidrofóbico 0,22 μ m 13 mm.

4.8.10.3 Preparo da solução amostra: Produto óleo de Canabidiol : Δ^9 -tetrahydrocannabinol CBD : Δ^9 -THC (15 mg/mL + 15 mg/mL). Concentração final: 15 μ g/mL de CBD + 15 μ g/mL de Δ^9 -THC.

Com auxílio de uma pipeta automática e balança analítica, pesou-se 0,023 g de amostra de óleo de Canabidiol : Δ^9 -tetrahydrocannabinol (15 mg/mL + 15 mg/mL) em um balão volumétrico de 25 mL. Adicionou-se etanol absoluto para completar o volume e homogeneizou-se com o vórtex Kasvi K40-10208. Retirou-se uma alíquota de 1 mL e filtrou-se para um vial utilizando um filtro de seringa PVDF Hidrofóbico 0,22 μ m 13 mm.

4.8.10.4 Análise e quantificação das soluções das amostras dos Produtos (lotes) dos óleos Canabidiol (20 mg/mL), Δ^9 -tetrahydrocannabinol (15 mg/mL) e Canabidiol: Δ^9 -tetrahydrocannabinol (1:1; 15 mg/mL+15 mg/mL).

Injetou-se em triplicata as amostras dos itens 4.8.10 no CLAE, nas condições cromatográficas, conforme item 4.7.2. O cálculo de concentração dos analitos foi realizado conforme item 4.7.3. O critério de conformidade foi de 90 a 110 % de recuperação.

5. Resultados e Discussão:

Até recentemente a *Cannabis* spp. constava na lista IV da Convenção de 1961 da Organização das Nações Unidas (ONU) que trata sobre o controle de substâncias entorpecentes, onde se enquadrava na mesma categoria de drogas potencialmente perigosas para a saúde pública e, portanto, sujeita a controles e restrições com relação as atividades de cultivo, comercialização, posse e uso (UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME, 2013). Porém, diante das crescentes evidências científicas sobre as propriedades terapêuticas das substâncias ativas da *Cannabis* spp. no tratamento de doenças refratárias a tratamentos convencionais (LIMA;ALEXANDRE;SANTOS, 2021; PACHER; BÁTKAI; KUNOS, 2006), em 2019 o Comitê de Especialistas em Dependência de Drogas da Organização Mundial da Saúde recomendou a remoção da *Cannabis* spp. da lista IV da convenção da ONU de 1961 (EXPERT COMMITTEE ON DRUG DEPENDENCE, 2019) e em dezembro de 2020 foi oficializado a exclusão da *Cannabis* spp.e a resina de *Cannabis* spp. da lista IV (UNITED NATIONS COMMISSION ON NARCOTIC DRUGS, 2020).

No Brasil, desde 2015, com o aumento do uso desses medicamentos, houveram avanços regulatórios no que diz respeito aos produtos à base de *Cannabis* spp.. Em 2019 foi publicado, pela ANVISA, a RDC 327/2019 que 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* spp. para fins medicinais (BRASIL, 2019a). há também, tramitando no Congresso Nacional, um Projeto de Lei, o PL399/2015 (BRASIL, 2015) que visa facilitar o acesso ao tratamento medicinal com a *Cannabis* spp. e a regulamentação do cultivo desta planta no país.

Com o aumento das evidências científicas cresceu o uso da *Cannabis* spp. para fins medicinais no Brasil. Devido a burocracia na obtenção desses medicamentos bem como os altos custos de importação, muitas famílias buscam os medicamentos ainda não registrados, os quais, na maioria das vezes, não cumprem com as normas de Boas Práticas de Fabricação estabelecidas pela ANVISA, não garantindo a padronização das dosagens e o controle microbiológico, pondo em risco a saúde dessas pessoas. Diante desse fato é importante o desenvolvimento de técnicas de

controle de qualidade que visam reduzir os riscos para a população que necessita deste tratamento (DA COSTA,2022).

A *Cannabis* spp. contém 565 substâncias (ELSOHLY et al., 2017) e muitas possuem efeitos farmacológicos e tratam várias doenças refratárias aos tratamentos convencionais, despertando um grande interesse por parte da indústria farmacêutica (LIMA; ALEXANDRE; SANTOS, 2021). Devido à semelhança estrutural entre os fitocanabinoides e a complexidade das matrizes vegetais, torna-se mais complicado o desenvolvimento de métodos cromatográficos eficientes na separação e identificação desses compostos (GONÇALVES et al., 2019).

O método desenvolvido neste trabalho foi obtido através de experimentações buscando obter maior resolução dos picos cromatográficos dos 3 marcadores alvos, Δ^9 -tetra-hidrocanabinol (Δ^9 -THC), Canabidiol (CBD) e Canabinol (CBN), tendo em vista a semelhança estrutural entre eles. A escolha dos marcadores Δ^9 -THC e CBD se deu devido à maior abundância desses compostos na *Cannabis* spp. e por serem os compostos mais estudados, em suas propriedades farmacológicas, desta planta (PACHER; BÁTKAI; KUNOS, 2006). O Canabinol (CBN) é um marcador importante para o desenvolvimento deste método por se tratar do produto de degradação do canabinoide Δ^9 -THC (DE BACKER et al., 2009) e, portanto, um importante marcador para o estudo de estabilidade dos produtos farmacêuticos a base de *Cannabis* spp. Vários outros trabalhos de desenvolvimento de método cromatográfico por CLAE também utilizaram esses 3 marcadores entre outros (DE BACKER et al., 2009; NAHAR; ONDER; SARKER,2020; CARVALHO et al,2020; DE SOUZA et al, 2022) Os parâmetros avaliados, e seus resultados, para a validação deste método foram:

5.1 Adequabilidade:

A injeção das soluções de 18 µg/mL de cada marcador (Canabidiol (CBD), Δ^9 -tetrahidrocanabinol (Δ^9 -THC) e canabinol (CBN)) indicou a adequabilidade do sistema de CLAE. As análises foram feitas em quintuplicata. A figura 02 mostra o cromatograma de uma das injeções.

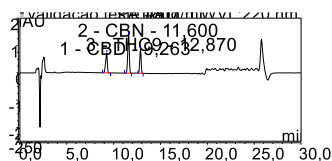


Figura 2: Cromatograma obtido das soluções dos analitos Canabidiol (CBD), Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) e canabinol (CBN) durante avaliação de adequabilidade.

O Quadro 2 mostra o tempo de retenção, a área obtida, o prato teórico, a resolução, assimetria dos picos e o desvio padrão relativo para cada analito. O tempo de retenção apresentou-se numa média de 9,27 min, 11,61 min, 12,88 min para CBD, CBN e Δ^9 -THC respectivamente, com desvios padrões relativos de 0,07%, 0,08% e 0,08% respectivamente.

A resolução foi > 2 e o efeito de cauda foi < 2 para todos os analitos conforme exigido pela farmacopeia brasileira sexta edição (BRASIL, 2019b). O desvio padrão relativo das cinco réplicas de injeções dos analitos foram inferiores a 0,5%. Estes dados analíticos obtidos então indicam que o equipamento está apto para fazer as análises adequadamente conforme a citada farmacopeia (BRASIL, 2019b).

Quadro 2: Dados obtidos durante a avaliação de Adequabilidade:

		Tempo de retenção	Area	Assimetria do pico	Pratos Teóricos	Resolução
CBD	Média	9,27	15,34	0,80	11036,90	7,12
	DP	0,01	0,05	0,00	61,23	0,02
	DPR	0,07	0,32	0,56	0,55	0,30
CBN	Média	11,61	26,57	0,89	22930,42	4,36
	DP	0,01	0,03	0,00	147,57	0,01
	DPR	0,08	0,12	0,50	0,64	0,24
Δ^9-THC	Média	12,88	15,25	0,93	34566,57	4,36
	DP	0,01	0,02	0,00	57,65	0,01
	DPR	0,08	0,16	0,48	0,17	0,24

5.2 Seletividade:

Foram avaliados: o controle negativo 1 (etanol-CN1); o controle negativo 2 (óleo de milho em etanol-solução matriz -CN2); o controle positivo 1 (padrão em etanol-P); controle positivo 2 (o padrão em solução matriz-PM). Essas análises foram feitas em triplicata, para demonstrar que a matriz não interfere com o tempo de retenção dos analitos.

A figura 3 apresenta a sobreposição dos cromatogramas CN1, CN2, e PM. O tempo de retenção de CBD, CBN e Δ^9 -THC foram 9,28 min, 11,62 min e 12,89 min respectivamente, valores semelhantes aos dados especificados na adequabilidade. Percebe-se que a matriz não interfere com o tempo de retenção dos analitos.

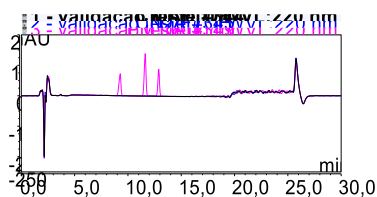


Figura 3: Imagem da sobreposição dos cromatogramas do controle negativo 1 (CN1), controle negativo 2 e a solução do padrão no óleo de milho (matriz -PM)

Além disso, as análises das amostras dos produtos: óleos de Canabidiol (20 µg/mL - PRO0070822117, PRO 0080822117), óleo de Δ^9 -tetrahydrocannabinol (15 µg/mL - PRO0250522117, PRO0070522117) e óleo de Canabidiol: Δ^9 -tetrahydrocannabinol (15 µg/mL + 15 µg/mL – PRO 0231122117 e PRO 0241122117) mostraram a presença de CBD, Δ^9 -THC e CBD: Δ^9 -THC, respectivamente, como substâncias majoritárias (figura 04).

A sobreposição dos cromatogramas destes produtos (óleos) junto com o cromatograma da solução do padrão na concentração de 18 µg/mL mostra que a matriz não interfere com o tempo de retenção dos analitos.

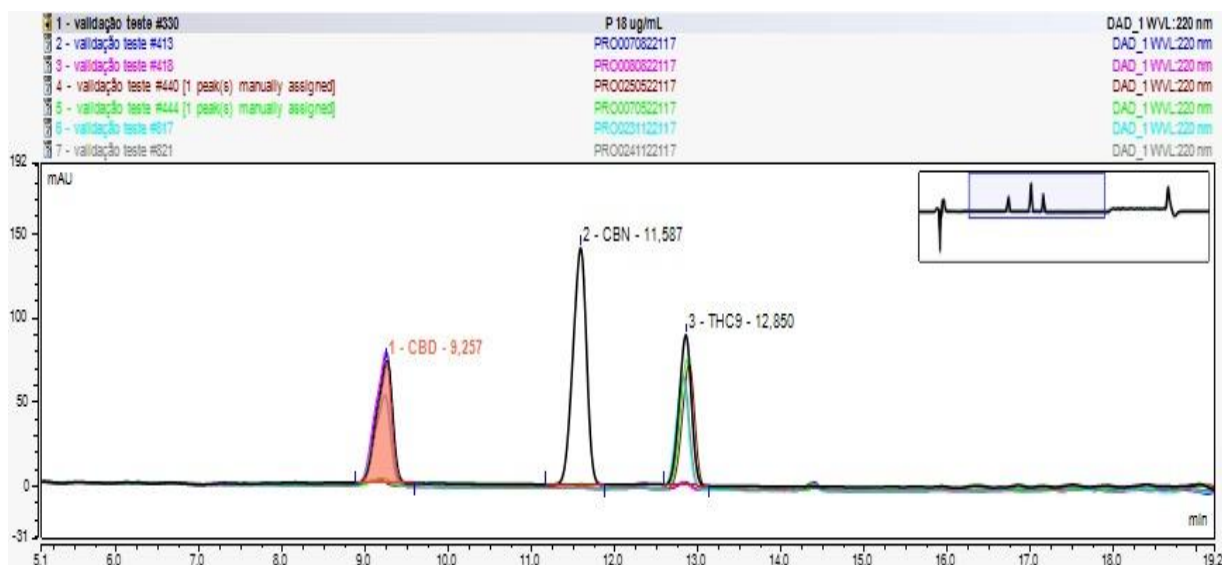


Figura 4: Imagem da sobreposição dos cromatogramas das amostras de óleos de Canabidiol (20 µg/mL- PRO0070822117, PRO 0080822117), Δ^9 -tetrahydrocannabinol (15 µg/mL - PRO0250522117, PRO0070522117), Canabidiol: Δ^9 -tetrahydrocannabinol (15 µg/mL - PRO0031022117, PRO0041022117) e a solução padrão (18 µg/mL).

5.3. Linearidade e Faixa de Trabalho:

As curvas analíticas avaliadas por meio da análise de 10 soluções dos padrões CBD, CBN e Δ^9 -THC, nas concentrações 7,5%; 25%; 50%; 60%; 70%; 80%; 90%; 100%; 110%; 120%, usando 20 µg/mL como 100%, mostraram-se linear, com um coeficiente de determinação (R^2) de 0,9996 para CBD, 0,9998 para CBN e 0,9996 para Δ^9 -THC. Em estudos semelhantes, Carvalho e colaboradores (2020) apresentaram os resultados de 0,999651 para CBD, 0,999548 para CBN e 0,998592 para Δ^9 -THC e de Souza e colaboradores (2022) apresentaram os resultados de 0,9998 para o CBD, 0,9993 para o CBN e 0,9995 para o Δ^9 -THC, obtendo valores análogos a este trabalho, o que demonstra a importância de um coeficiente de linearidade próximo a 1,0 para um método ser considerado linear.

A figura 5 mostra os gráficos das respostas em função da concentração dos analitos CBD (a), CBN (b) e Δ^9 -THC (c) respectivamente e as suas equações da reta de regressão. Além disso, a figura 6 mostra o gráfico de resíduos da curva dos analitos em solvente, etanol. As tabelas 2, 3 e 4 elucidam os dados estatísticos de regressão

das curvas de CBD, CBN e Δ^9 -THC respectivamente. A partir desses dados, percebe-se que os valores-P foram menores que o $\alpha = 0,05$.

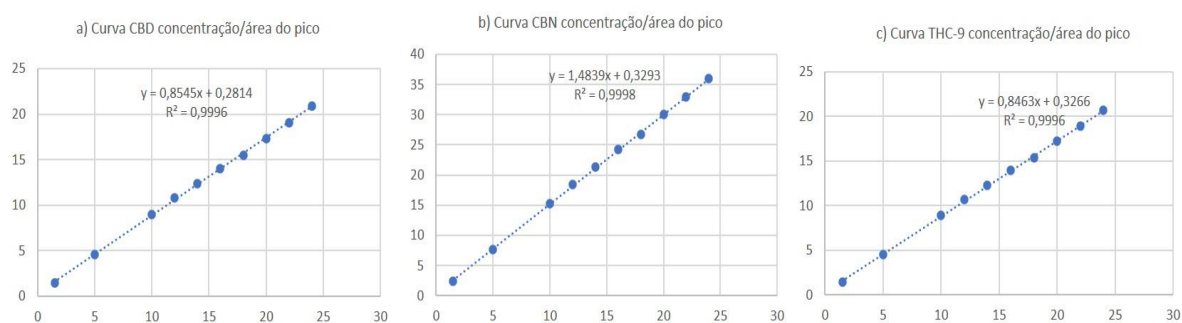


Figura 5: Gráficos das áreas dos picos cromatográficos em função da concentração dos analitos em solvente etanol: a) CBD, b) CBN e c) Δ^9 -THC.

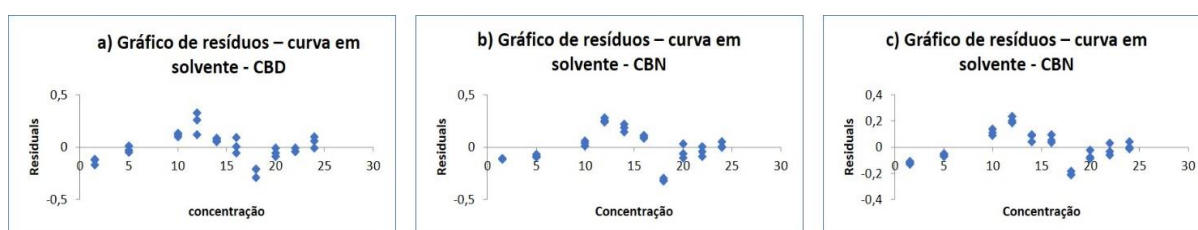


Figura 6: Representação gráfica dos resíduos da regressão das curvas analíticas construídas em solvente a) CBD, b) CBN, c) Δ^9 -THC.

Tabela 2: Dados estatísticos de regressão para Canabidiol (CBD):

<i>Estadística de regressão para Canabidiol (CBD)</i>						
R múltiplo	0,99975383					
R-Quadrado	0,999507721					
R-quadrado ajustado	0,999490139				Alfa = 0,05	
Erro padrão	0,135510743					
Observações	30					
ANOVA						
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>	
Regressão	1	1043,950525	1043,950525	56850,26141	7,3375E-48	
Resíduo	28	0,514168519	0,018363161			
Total	29	1044,464693				
	<i>Coeficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>
Interseção	0,281354514	0,056744465	4,958272343	3,10854E-05	0,165118745	0,397590282
Concentração Teórica (ug/mL)	0,854458397	0,003583643	238,4329285	7,34E-48	0,847117638	0,861799156

Tabela 3: Dados estatísticos de regressão para canabinol (CBN):

<i>Estadística de regressão para canabinol (CBN)</i>						
R múltiplo	0,999885961					
R-Quadrado	0,999771936					
R-quadrado ajustado	0,999763791				Alfa = 0,05	
Erro padrão	0,160158184					
Observações	30					
ANOVA						
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>	
Regressão	1	3148,47601	3148,476	122744,5222	1,53931E-52	
Resíduo	28	0,718218025	0,025651			
Total	29	3149,194228				
	<i>Coeficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>
Interseção	0,329324296	0,067065462	4,91049	3,54241E-05	0,191946925	0,466701666
Concentração Teórica (ug/mL)	1,48388812	0,004235455	350,3491	1,53931E-52	1,475212183	1,492564056

Tabela 4: Dados estatísticos de regressão para Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC):

<i>Estatística de regressão para delta-9-tetrahydrocannabinol (THC-9)</i>						
R múltiplo	0,999804858					
R-Quadrado	0,999609754					
R-quadrado ajustado	0,999595816					
Erro padrão	0,119493518					
Observações	30					
ANOVA						
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>	
Regressão	1	1024,090186	1024,09	71721,52358	2,84E-49	
Resíduo	28	0,399803626	0,014279			
Total	29	1024,489989				
	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>
Interseção	0,326610386	0,050037331	6,527334	4,48249E-07	0,22411356	0,429107211
Concentração Teórica (ug/mL)	0,846291669	0,00316006	267,8087	2,83994E-49	0,83981858	0,852764758

Neste sentido, como a *F de significância* dos dados estatísticos das regressões foram $7,33375 \times 10^{-48}$ para CBD; $1,53931 \times 10^{-52}$ para CBN e $2,84 \times 10^{-49}$ para Δ^9 -THC, valores que são inferiores a $\alpha=0,05$, as regressões foram satisfatórias e significativas, cumprindo as exigências da RDC 166/2017 (BRASIL,2017).

5.4 Efeito Matriz:

As curvas analíticas avaliadas por meio da análise de 10 soluções dos padrões CBD, CBN e Δ^9 -THC na solução matriz e nas concentrações: 1,5 $\mu\text{g/mL}$; 5 $\mu\text{g/mL}$; 10 $\mu\text{g/mL}$; 12 $\mu\text{g/mL}$; 14 $\mu\text{g/mL}$; 16 $\mu\text{g/mL}$; 18 $\mu\text{g/mL}$; 20 $\mu\text{g/mL}$; 22 $\mu\text{g/mL}$; 24 $\mu\text{g/mL}$, mostraram-se linear, com um coeficiente de determinação (R^2) de 0,9992 para CBD, 0,9992 para CBN e 0,9971 para Δ^9 -THC. A figura 7 mostra os gráficos das respostas em função da concentração dos analitos CBD (a), CBN (b) e Δ^9 -THC (c) respectivamente e as suas equações da reta de regressão.

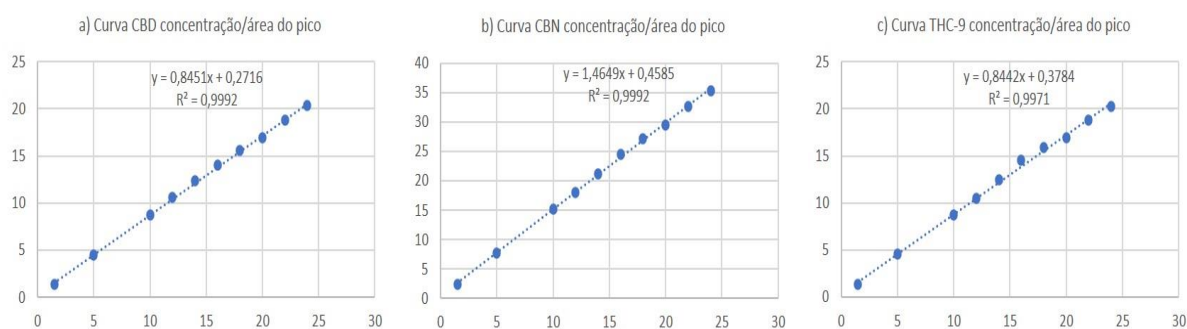


Figura 7: Gráficos das áreas dos picos cromatográficos em função da concentração dos analitos em solução matriz: a) CBD, b) CBN e c) Δ^9 -THC.

Os valores de efeito matriz (C%) dos analitos (CBD – 1,10%, CBN – 1,28% e Δ^9 -THC – 0,25%) foram menores que 20% indicando que o efeito matriz para estes analitos é considerado baixo (CERQUEIRA et al., 2011). A tabela 5 mostra os dados de inclinação para os analitos em etanol e em solução matriz e os dados de matriz.

Tabela 5: Dados de inclinação da curva de Canabidiol (CBD), canabinol (CBN) e Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) em etanol e solução matriz e os seus efeitos matrizes.

Analito	Inclinação da Curva		Efeito Matriz (C%)
	Em etanol	Em solução matriz	
Canabidiol (CBD)	0,8545	0,8451	1,10
Canabinol (CBN)	1,4839	1,4649	1,28
Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC)	0,8463	0,8442	0,25

Além disso, o estudo estatístico teste T de Student (bicaudal) das duas curvas (tabelas 6, 7 e 8) mostrou que o Stat t para CBD, CBN e Δ^9 -THC foram 0,0156, 0,0294 e -0,0081 respectivamente, valores menores que o t-crítico bicaudal (2,1009). Isso infere que os dados das áreas dos picos dos analitos em etanol e em solução matriz podem ser considerados equivalentes. O paralelismo entre curvas analíticas matriciais e não matriciais é considerado indicativo da ausência de interferências da matriz (BRASIL, 2017).

Tabela 6: Os resultados de teste T dos dados da curva de Canabidiol (CBD) em etanol e em solução matriz.

Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes		
	AREA DO PICO DE CBD EM ETANOL (Média)	AREA DO PICO DE CBD EM MATRIZ (Média)
Média	12,45738667	12,31450667
Variância	38,68190859	37,85398884
Observações	10	10
Variância agrupada	38,26794872	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	18	
Stat t	0,051646257	
P(T<=t) uni-caudal	0,479689697	Alfa = 0,05
t crítico uni-caudal	1,734063607	
P(T<=t) bi-caudal	0,959379395	Alfa = 0,05
t crítico bi-caudal	2,10092204	

Tabela 7: Os resultados de teste T dos dados da curva de canabinol (CBN) em etanol e em solução matriz.

Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes		
	AREA DO PICO DE CBN EM ETANOL (Média)	AREA DO PICO DE CBN EM MATRIZ (Média)
Média	21,47473	21,33352
Variância	116,6360284	113,7429181
Observações	10	10
Variância agrupada	115,1894733	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	18	
Stat t	0,029420094	
P(T<=t) uni-caudal	0,488426646	Alfa = 0,05
t crítico uni-caudal	1,734063607	
P(T<=t) bi-caudal	0,976853293	Alfa = 0,05
t crítico bi-caudal	2,10092204	

Tabela 8: Os resultados de teste T dos dados da curva de Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) em etanol e em solução matriz.

Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes		
	AREA DO PICO DE THC-9 EM ETANOL (Média)	AREA DO PICO DE THC-9 EM MATRIZ (Média)
Média	12,38626667	12,40853333
Variância	37,94353091	37,85278382
Observações	10	10
Variância agrupada	37,89815737	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	18	
Stat t	-0,008087814	
P(T<=t) uni-caudal	0,496817947	Alfa = 0,05
t crítico uni-caudal	1,734063607	
P(T<=t) bi-caudal	0,993635893	Alfa = 0,05
t crítico bi-caudal	2,10092204	

5.5 Precisão:

5.5.1 Repetibilidade:

Foram avaliadas as soluções nas concentrações 12 µg/mL, 18 µg/mL e 24 µg/mL que correspondem a 60%, 90% e 120% respectivamente, usando 20 µg/mL como 100%. O desvio padrão relativo (DPR) das amostras dos canabinoides CBD, CBN e Δ^9 -THC foram abaixo de 0,5% bem abaixo dos 2% tolerados (BRASIL, 2017).

Em estudo semelhante de validação, Carvalho e colaboradores (2020) obtiveram os resultados de DPR para o Δ^9 -THC de 2,97% e para o CDB de 6,21%. As tabelas 9, 10 e 11 elucidam os dados obtidos para cada um dos canabinoide e seus desvios padrões relativos.

Tabela 9: Dados de repetibilidade das soluções de Canabidiol (CBD) nas concentrações 12 µg/mL, 18 µg/mL e 24 µg/mL.

CBD	Concentração (µg/mL)	Area 1	Area 2	Area 3	Média	^a DP	^b DPR
60%	12	10,5315	10,5278	10,4538	10,50437	0,043831	0,42
90%	18	15,4179	15,4909	15,4873	15,46537	0,041147	0,27
120%	24	21,3731	21,369	21,3114	21,35117	0,0345	0,16

^aDesvio Padrão, ^bDesvio Padrão Relativo.

Tabela 10: Dados de repetibilidade das soluções de Canabinol (CBN) nas concentrações 12 µg/mL, 18 µg/mL e 24 µg/mL.

CBN	Concentração (µg/mL)	Area 1	Area 2	Area 3	Média	^a DP	^b DPR
60%	12	18,139	18,1062	18,1049	18,1167	0,019323	0,11
90%	18	26,5769	26,6444	26,7038	26,6417	0,063493	0,24
120%	24	36,6819	36,6596	36,6871	36,6762	0,014609	0,04

^aDesvio Padrão, ^bDesvio Padrão Relativo.

Tabela 11: Dados de repetibilidade das soluções de Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) nas concentrações 12 $\mu\text{g/mL}$, 18 $\mu\text{g/mL}$ e 24 $\mu\text{g/mL}$.

Δ^9 -THC	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Area 1	Area 2	Area 3	Média	^a DP	^b DPR
60%	12	10,4131	10,429	10,4346	10,42557	0,011154	0,11
90%	18	15,293	15,3192	15,3749	15,32903	0,041826	0,27
120%	24	21,1235	21,0875	21,1045	21,10517	0,018009	0,09

^aDesvio Padrão, ^bDesvio Padrão Relativo.

5.5.2 Precisão intermediária:

Foram avaliadas as soluções nas concentrações 12 $\mu\text{g/mL}$, 18 $\mu\text{g/mL}$ e 24 $\mu\text{g/mL}$ por um segundo e terceiro analistas, nos dois dias seguintes da repetibilidade respectivamente. O desvio padrão relativo (DPR) das amostras dos marcadores CBD, CBN e Δ^9 -THC foram abaixo dos 2%, ou seja, abaixo dos valores tolerados (BRASIL, 2017). As tabelas 12, 14 e 16 elucidam os dados obtidos de cada canabinoide. Além disso, os dados de teste t bicaudal mostraram que os dados teóricos e experimentais de CBD, CBN e Δ^9 -THC são equivalentes (tabelas 13,15, e 17 respectivamente), já que os seus valores de Stat t, estão menores que os valores de t-crítico bicaudal. Carvalho e colaboradores (2020) obtiveram resultados de DPR para o Δ^9 -THC de 7,24% e para o CBD de 6,42%. Devido aos dados de repetibilidade e precisão intermediária comparados, pode-se afirmar que o método desenvolvido neste trabalho apresenta maior precisão para os canabinoides Δ^9 -THC e CBD. Os valores de precisão para o CBN não foram avaliados por Carvalho e colaboradores (2020).

Tabela 12: Dados de precisão intermediária das soluções de Canabidiol (CBD) nas concentrações 12 µg/mL, 18 µg/mL e 24 µg/mL.

CBD Concentração (µg/mL)	Área Do Pico	Dado Experimental Concentração (µg/mL)	Dado Experimental Concentração (µg/mL) média	DP	DPR
12	10,5315	12,00	11,96	0,06	0,46
12	10,5278	11,99			
12	10,4538	11,90			
12	10,1251	11,52	11,41	0,09	0,83
12	10,0057	11,38			
12	9,9747	11,34			
12	10,5551	12,02	12,03	0,04	0,34
12	10,591	12,07			
12	10,5286	11,99			
18	15,4179	17,71	17,77	0,05	0,29
18	15,4909	17,80			
18	15,4873	17,80			
18	14,5896	16,74	16,78	0,06	0,36
18	14,5945	16,75			
18	14,6778	16,85			
18	15,9702	18,36	18,41	0,10	0,55
18	15,9624	18,35			
18	16,1117	18,53			
24	21,3731	24,68	24,66	0,04	0,16
24	21,369	24,68			
24	21,3114	24,61			
24	20,576	23,75	23,72	0,05	0,22
24	20,4967	23,66			
24	20,5786	23,75			
24	19,9356	23,00	22,97	0,09	0,40
24	19,9755	23,05			
24	19,8256	22,87			

Tabela 13: Tabela de Teste-t dos dados de concentração teórico e experimental para precisão intermediária para Canabidiol (CBD). Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes

	Concentração Teórico ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração Experimental ($\mu\text{g/mL}$)
Média	18	17,7465401
Variância	24,92307692	25,20258865
Observações	27	27
Variância agrupada	25,06283279	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	52	
Stat t	0,186020608	
P(T<=t) uni-caudal	0,426576187	Alfa = 0,05
t crítico uni-caudal	1,674689154	
P(T<=t) bi-caudal	0,853152373	Alfa = 0,05
t crítico bicaudal	2,006646805	

Tabela 14: Dados de precisão intermediária das soluções de Canabinol (CBN) nas concentrações 12 $\mu\text{g/mL}$, 18 $\mu\text{g/mL}$ e 24 $\mu\text{g/mL}$.

CBN Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Área	Dado Experimental Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Dado Experimental Concentração ($\mu\text{g/mL}$) média	DP	DPR
12	18,139	12,00	11,99	0,01	0,10
12	18,1062	11,98			
12	18,1049	11,98			
12	17,2401	11,40	11,37	0,04	0,38
12	17,2343	11,39			
12	17,1273	11,32			
12	18,1028	11,98	11,98	0,02	0,13
12	18,0966	11,97			
12	18,1295	12,00			
18	26,5769	17,69	17,73	0,04	0,23
18	26,6444	17,73			
18	26,7038	17,77			
18	25,2278	16,78	16,75	0,03	0,17

18	25,1504	16,73			
18	25,1533	16,73			
18	27,3377	18,20			
18	27,3462	18,21	18,23	0,05	0,27
18	27,4731	18,29			
24	36,6819	24,50			
24	36,6596	24,48	24,49	0,01	0,05
24	36,6871	24,50			
24	35,2601	23,54			
24	35,3087	23,57	23,56	0,02	0,07
24	35,2984	23,57			
24	34,0346	22,71			
24	34,0349	22,71	22,72	0,02	0,08
24	34,0773	22,74			

Tabela 15: Tabela de Teste-t dos dados de concentração teórico e experimental para precisão intermediária para canabinol (CBN).

Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes		
	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Dado Experimental ($\mu\text{g/mL}$)
Média	18	17,64733572
Variância	24,92307692	24,49796538
Observações	27	27
Variância agrupada	24,71052115	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	52	
Stat t	0,260667808	
P(T<=t) uni-caudal	0,397689108	Alfa = 0,05
t crítico uni-caudal	1,674689154	
P(T<=t) bi-caudal	0,795378216	Alfa = 0,05
t crítico bicaudal	2,006646805	

Tabela 16: Dados de precisão intermediária das soluções de Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) nas concentrações 12 $\mu\text{g/mL}$, 18 $\mu\text{g/mL}$ e 24 $\mu\text{g/mL}$

Δ^9 -THC Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Área	Dado Experimental Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Dado Experimental Concentração ($\mu\text{g/mL}$) média	DP	DPR
12	10,4131	11,92	11,93	0,01	0,10
12	10,429	11,94			
12	10,4346	11,94			
12	9,9338	11,35	11,31	0,03	0,28
12	9,8847	11,29			
12	9,8916	11,30			
12	10,4631	11,98	11,99	0,01	0,08
12	10,4709	11,99			
12	10,4783	12,00			
18	15,293	17,68	17,72	0,05	0,28
18	15,3192	17,72			
18	15,3749	17,78			
18	14,5113	16,76	16,74	0,01	0,07
18	14,4965	16,74			
18	14,494	16,74			
18	15,8342	18,32	18,37	0,07	0,39
18	15,8353	18,33			
18	15,9425	18,45			
24	21,1235	24,57	24,55	0,02	0,08
24	21,0875	24,53			
24	21,1045	24,55			
24	20,2867	23,59	23,69	0,13	0,53
24	20,3332	23,64			
24	20,4924	23,83			
24	19,729	22,93	22,93	0,05	0,2
24	19,7627	22,97			
24	19,6902	22,88			

Tabela 17: Tabela de Teste-t dos dados de concentração teórico e experimental para precisão intermediária para Δ^9 -tetrahydrocannabinol.

Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes		
	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Dado Experimental ($\mu\text{g/mL}$)
Média	18	17,69320484
Variância	24,92307692	25,1636561
Observações	27	27
Variância agrupada	25,04336651	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	52	
Stat t	0,225252193	
P(T<=t) uni-caudal	0,411332997	Alfa = 0,05
t crítico uni-caudal	1,674689154	
P(T<=t) bi-caudal	0,822665993	Alfa = 0,05
t crítico bicaudal	2,006646805	

5.6 Exatidão:

A avaliação das soluções do padrão na solução matriz nas concentrações 12 $\mu\text{g/mL}$, 18 $\mu\text{g/mL}$ e 24 $\mu\text{g/mL}$ demonstrou uma exatidão entre 97% a 106% para todos os analitos (marcadores), estando entre 90% e 110% como estabelecido no protocolo deste trabalho, o que demonstra a exatidão do método. Além disso, os desvios padrão relativo (DPR) das concentrações para todos os analitos foram menores que 0,5%. As tabelas 18, 19 e 20 mostram os dados obtidos para cada marcador (analito). Para efeito de comparação, em trabalho semelhante, Carvalho e colaboradores (2020) obtiveram os seguintes dados para a exatidão: 117,45% para CBD, 99,49% para o Δ^9 -THC, e 90,34% para o CBN.

Tabela 18: Dados de exatidão das soluções de Canabidiol (CBD) nas concentrações 12 µg/mL, 18 µg/mL e 24 µg/mL.

CBD	Concentração (Conc.) (µg/mL)	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Conc. Média	Desvio Padrão	Desvio Padrão Relativo	EXATIDÃO
	12	12,54	12,51	12,55	12,53	0,03	0,20	104,5
	18	17,52	17,49	17,62	17,54	0,07	0,37	97,5
	24	25,34	25,38	25,38	25,37	0,02	0,09	105,7

Tabela 19: Dados de exatidão das soluções de Canabinol (CBN) nas concentrações 12 µg/mL, 18 µg/mL e 24 µg/mL.

CBN	Concentração (Conc.) (µg/mL)	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Conc. Média	Desvio Padrão	Desvio Padrão Relativo	EXATIDÃO
	12	12,55	12,56	12,56	12,55	0,01	0,06	104,6
	18	17,47	17,48	17,52	17,49	0,02	0,14	97,2
	24	25,23	25,24	25,24	25,24	0,01	0,02	105,2

Tabela 20: Dados de exatidão das soluções de Δ^9 -tetrahydrocannabinol (CBN) nas concentrações 12 µg/mL, 18 µg/mL e 24 µg/mL.

Δ^9 - THC	Concentração (Conc.) (µg/mL)	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Conc. Média	Desvio Padrão	Desvio Padrão Relativo	EXATIDÃO
	12	12,41	12,44	12,46	12,44	0,02	0,17	103,6
	18	17,34	17,37	17,38	17,36	0,02	0,14	96,5
	24	25,00	25,01	25,00	25,00	0,01	0,03	104,2

5.7 Limite de Detecção (LD):

Baseado nos parâmetros obtidos da curva analítica, os limites de detecção do Canabidiol, canabinol e Δ^9 -tetrahydrocannabinol foram: 0,16 µg/mL; 0,02 µg/mL e 0,03 µg/mL respectivamente. Entretanto, na análise de confirmação destes limites de detecção dos analitos, percebeu-se que as concentrações dos analitos necessários para obter um valor de sinal/ruído de 3:1 (BRASIL,2017) foi 0,16 µg/mL para cada um deles. O cromatograma abaixo (figura 8) mostra os picos dos analitos nas concentrações de 0,16 µg/mL. Para efeito de comparação, os limites de

detecção obtidos por De Souza e colaboradores (2022) foi de 3,6 µg/mL para CBD, 4,2 µg/mL para Δ^9 -THC e 4,1 µg/mL para CBN.

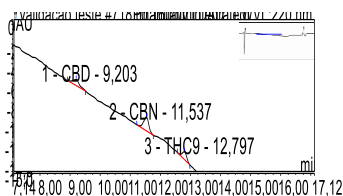


Figura 8: Cromatograma ampliado dos analitos Canabidiol, Canabinol e Δ^9 -tetrahydrocanabinol na concentração de 0,16 µg/mL.

5.8 Limite de Quantificação (LQ):

Baseado nos parâmetros obtidos da curva analítica, os limites de quantificação do Canabidiol, canabinol e Δ^9 -tetrahydrocanabinol foram 0,50 µg/mL; 0,06 µg/mL e 0,1 µg/mL respectivamente. Entretanto, segundo a Anvisa (BRASIL, 2017), o limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Neste sentido, foi avaliado estas concentrações dos analitos. No entanto, não foi possível alcançar a exatidão da especificação. Portanto, foram avaliadas as concentrações 0,5 µg/ml, 1,0 µg/mL, 1,25 µg/mL, 1,45 µg/mL, 1,5 µg/mL e 2,0 µg/mL. Consequentemente, observou-se que somente a partir da concentração de 1,5 µg/mL que foi possível obter uma precisão (DPR) e exatidão satisfatórios: 1,34% e 89,27% para CBD; 0,1% e 94,96% para CBN e 1,36% e 90,63% para Δ^9 -THC

respectivamente. Comparado aos dados obtidos por De Souza e colaboradores (2022), que foram de 10,8 µg/mL para CBD, 12,6 µg/mL para Δ^9 -THC e 12,5 µg/mL para CBN, os resultados obtidos pelo presente trabalho foram mais próximos dos valores especificados.

A RDC 327/2019 (BRASIL, 2019a) preconiza que os produtos à base de *Cannabis* spp., devem possuir, em sua composição, majoritariamente CBD e não mais que 0,2% de o Δ^9 -THC. Tendo em vista que o limite de detecção obtido para este método foi de 1,5 µg/mL, pode-se afirmar que este método está apto, com exatidão e precisão adequada, a analisar os produtos que atendem a legislação de produtos à base de *Cannabis* spp. vigente no país. O quadro 19 mostra a precisão (DPR) e exatidão de Δ^9 -THC na concentração de 2 µg/mL.

Quadro 1: Dados de avaliação de limite de quantificação (LQ) de Canabidiol (CBD) nas concentrações 0,50 µg/mL, 1,00 µg/mL, 1,25 µg/mL, 1,45 µg/mL, 1,50 µg/mL e 2,00 µg/mL.

CBD	Concentração (µg/mL)	Area 1	Area 2	Area 3	Média	DP	DPR	Conc. Média	EXATIDÃO
	0,50	0,3924	0,4462	0,441	0,426533	0,029674	6,96	0,17	33,97
	1,00	0,7578	0,7957	0,7982	0,7839	0,022638	2,89	0,59	58,81
	1,25	0,9784	0,9951	0,9858	0,986433	0,008368	0,85	0,83	66,01
	1,45	1,0977	1,0688	1,091	1,085833	0,015127	1,39	0,94	64,92
	1,50	1,4372	1,3931	1,4465	1,4256	0,028527	2,00	1,34	89,27
	2,00	1,8223	1,872	1,8404	1,8449	0,025154	1,36	1,83	91,49

Quadro 2: Dados de avaliação de limite de quantificação (LQ) de canabinol (CBN) nas concentrações 0,50 µg/mL, 1,00 µg/mL, 1,25 µg/mL, 1,45 µg/mL, 1,50 µg/mL e 2,00 µg/mL.

CBN	Concentração (µg/mL)	Area 1	Area 2	Area 3	Média	DP	DPR	Conc. Média	EXATIDÃO
	0,50	0,8226	0,7841	0,7647	0,790467	0,02947	3,73	0,31	39,32
	1,00	1,5355	1,5226	1,5431	1,533733	0,010364	0,68	0,81	81,17
	1,25	1,954	1,9608	1,9772	1,964	0,011926	0,61	1,10	88,13
	1,45	2,1357	2,1425	2,1225	2,133567	0,010169	0,48	1,22	83,85
	1,50	2,4448	2,444	2,4402	2,443	0,002458	0,10	1,42	94,96
	2,00	3,2237	3,2957	3,2261	3,2485	0,040894	1,26	1,97	98,36

Quadro 3: Dados de avaliação de limite de quantificação (LQ) de Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) nas concentrações 0,50 µg/mL, 1,00 µg/mL, 1,25 µg/mL, 1,45 µg/mL, 1,50 µg/mL e 2,00 µg/mL.

Δ^9 -THC	Concentração (µg/mL)	Area 1	Area 2	Area 3	Média	DP	DPR	Conc. Média	EXATIDÃO
	0,50	0,4498	0,4525	0,4442	0,448833	0,004234	0,94	0,14	28,89
	1,00	0,8717	0,8664	0,8645	0,867533	0,003731	0,43	0,64	63,92
	1,25	1,1011	1,0981	1,0902	1,096467	0,005631	0,51	0,91	72,77
	1,45	1,2092	1,2099	1,2038	1,207633	0,003338	0,28	1,04	71,80
	1,50	1,4879	1,4657	1,4776	1,477067	0,01111	0,75	1,36	90,63
	2,0	1,9932		1,989	1,9911	0,00297	0,15	1,97	98,34

5.9 Robustez:

Para a robustez, os parâmetros avaliados foram: fluxo, temperatura, composição dos eluentes na variação de $\pm 5\%$ da condição original do método, e uma coluna cromatográfica de diferente lote.

5.9.1 Robustez – Fluxo:

Foram avaliados os fluxos 1,425 mL/min e 1,525 mL/min. Os valores de precisão para os analitos na concentração de 18 µg/mL foram entre 0,1% a 0,70%, dados considerados satisfatórios, pois são menores que 2%.

Entretanto, os dados de exatidão para os analitos foram entre 100,88% a 114,64%, onde o dado superior está acima da especificação do protocolo deste trabalho (BRASIL, 2017) que é de 90% a 110%. Os valores que foram acima de 110% foram dos analitos CBN (114,30%) e Δ^9 -THC (114,64%) para o fluxo 1,425 mL/min. No entanto, estes valores de exatidão estão abaixo do valor estipulado pela ANVISA através da IN04/2014 para fitoterápicos (BRASIL, 2014b) cujo texto prevê um limite máximo de variação de 15% (85% a 115%) do marcador para a liberação do lote. Já o USP Herbal Medicine Compendium (UNITED STATES OF AMERICA, 2022), indica que o teor da concentração especificada do canabinoide em um extrato deve estar

entre 80% - 120%. A tabela 21 apresenta os resultados obtidos para a robustez do método, em relação às variações de fluxo.

Tabela 21: Dados de robustez em relação aos fluxos 1,425 mL/min e 1,575 mL/min na avaliação dos canabinoides na concentração de 18 µg/mL.

CBD Fluxo (mL/min)	Concentração (µg/mL)	Area 1	Area 2	Area 3	Média	DP	DPR	Conc. Média	EXATIDÃO
1,425	18	16,9809	16,9633	17,0152	16,98647	0,026394	0,16	19,55	108,61
1,575	18	15,7214	15,8275	15,8432	15,79737	0,066256	0,42	18,16	100,88
CBN Fluxo (mL/min)	Concentração (µg/mL)	Area 1	Area 2	Area 3	Média	DP	DPR	Conc. Média	EXATIDÃO
1,425	18	30,8158	30,8425	30,9193	30,8592	0,053733	0,17	20,57	114,30
1,575	18	28,3793	28,4537	28,464	28,43233	0,046216	0,16	18,94	105,21
THC Fluxo (mL/min)	Concentração (µg/mL)	Area 1	Area 2	Area 3	Média	DP	DPR	Conc. Média	EXATIDÃO
1,425	18	17,773	17,79	17,8074	17,79013	0,0172	0,10	20,64	114,64
1,575	18	16,413	16,6351	16,473	16,50703	0,114895	0,70	19,12	106,22

5.9.2 Robustez – Temperatura:

Foram avaliadas as temperaturas a 38 °C e 42 °C. Os valores de precisão para os analitos na concentração de 18 µg/mL foram entre 0,15% a 0,58%, dados considerados satisfatórios, pois estão menores que 2%. Entretanto, os valores de exatidão para os mesmos variaram entre 106,06% a 112,56%, onde este último encontra-se acima da especificação do protocolo deste trabalho (BRASIL, 2017). Os valores que foram acima de 110% foram dos analitos CBN (110,73% para 38 °C; 111,13% para 42 °C) e Δ^9 -THC (112,18% para 38 °C; 112,56% para 42 °C). No entanto esses valores estão abaixo das especificações da ANVISA que permite a variação de 85% a 115% para fitoterápicos (BRASIL, 2014^a) e da USP (UNITED STATES OF AMERICA, 2022) que para o extrato, permite variação de 80% a 120%. A tabela 22 mostra os dados de robustez em relação às variações de temperatura.

Tabela 22: Dados de robustez em relação às temperaturas 38 °C e 42 °C na avaliação dos canabinoides na concentração de 18 µg/mL.

CBD	Concentração (µg/mL)	Area 1	Area 2	Area 3	Média	DP	DPR	Conc. Média	EXATIDÃO
38 °C	18	16,5667	16,5698	16,6476	16,5947	0,045839	0,28	19,09	106,06
42 °C	18	16,5991	16,5426	16,6599	16,60053	0,058663	0,35	19,10	106,10
CBN	Concentração (µg/mL)	Area 1	Area 2	Area 3	Média	DP	DPR	Conc. Média	EXATIDÃO
38 °C	18	29,8605	29,9103	29,9484	29,9064	0,04408	0,15	19,93	110,73
42 °C	18	29,9108	30,0258	30,0986	30,01173	0,094687	0,32	20,00	111,13
THC	Concentração (µg/mL)	Area 1	Area 2	Area 3	Média	DP	DPR	Conc. Média	EXATIDÃO
38 °C	18	17,4351	17,4506	17,3615	17,41573	0,047603	0,27	20,19	112,18
42 °C	18	17,4705	17,3725	17,5761	17,47303	0,101824	0,58	20,26	112,56

5.9.3 Robustez - composição dos eluentes:

Foram avaliados oito tipos de composições dos eluentes (tabelas 23, 24 e 25). Os valores de precisão para os analitos na concentração de 18 µg/mL foram entre 0,01% a 0,95%, dados considerados satisfatórios, pois estão menores que 2%. Ademais, os dados de exatidão para os analitos foram entre 95,21% a 104,50%, valores de acordo com a especificação do protocolo deste trabalho (BRASIL, 2017). As tabelas 23, 24 e 25 mostram em detalhes dados de precisão e exatidão de robustez em relação às variações nas composições dos eluentes.

Tabela 23: Dados de robustez em relação às composições de eluentes na avaliação de Canabidiol (CBD) na concentração de 18 µg/mL.

CBD	Concentração (µg/mL)	Area 1	Area 2	Area 3	Média	DP	DPR	Conc. Média	EXATIDÃO
H2O 0,2% ACN 0,1425%	18	15,4356	15,4771	15,6063	15,50633	0,089026	0,57	17,82	98,99
H2O 0,2% ACN 0,1575%	18	15,2688	15,2142	15,3352	15,27273	0,060596	0,40	17,54	97,47
H2O 0,19% ACN 0,15%	18	14,9788	15,0964	15,0049	15,0267	0,061757	0,41	17,26	95,87
H2O 0,21% ACN 0,15%	18	15,0251	15,0187	14,9672	15,00367	0,031743	0,21	17,23	95,72
H2O 0,21% ACN 0,1425%	18	15,3498	15,3725	15,3375	15,35327	0,017756	0,12	17,64	97,99
H2O 0,21% ACN 0,1575%	18	15,0947	15,1193	15,0477	15,08723	0,036379	0,24	17,33	96,26
H2O 0,19% ACN 0,1575%	18	14,8946	14,957	14,9264	14,926	0,031202	0,21	17,14	95,21
H2O 0,19% ACN 0,1425%	18	14,9871	15,2074	15,2566	15,15037	0,143517	0,95	17,40	96,67

Tabela 24: Dados de robustez em relação às composições de eluentes na avaliação de canabinol (CBN) na concentração de 18 µg/mL.

CBN	Concentração (µg/mL)	Area 1	Area 2	Area 3	Média	DP	DPR	Conc. Média	EXATIDÃO
H2O 0,2% ACN 0,1425%	18	27,5676	27,5865	27,6626	27,60557	0,050288	0,18	18,38	102,12
H2O 0,2% ACN 0,1575%	18	27,4087	27,4051	27,4877	27,43383	0,046685	0,17	18,27	101,48
H2O 0,19% ACN 0,15%	18	27,1046	27,1464	27,1324	27,1278	0,021276	0,08	18,06	100,33
H2O 0,21% ACN 0,15%	18	27,1162	27,1214	27,0844	27,10733	0,02003	0,07	18,05	100,25
H2O 0,21% ACN 0,1425%	18	27,8655	27,8705	27,8038	27,8466	0,03715	0,13	18,54	103,02
H2O 0,21% ACN 0,1575%	18	27,4973	27,5027	27,4845	27,49483	0,009347	0,03	18,31	101,70
H2O 0,19% ACN 0,1575%	18	27,254	27,3048	27,2903	27,28303	0,026168	0,10	18,16	100,91
H2O 0,19% ACN 0,1425%	18	27,9935	28,0978	28,0699	28,05373	0,053997	0,19	18,68	103,80

Tabela 25: Dados de robustez em relação às composições de eluentes na avaliação de Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) na concentração de 18 µg/mL.

THC-9	Concentração (µg/mL)	Area 1	Area 2	Area 3	Média	DP	DPR	Conc. Média	EXATIDÃO
H2O 0,2% ACN 0,1425%	18	16,0967	16,1123	16,1202	16,10973	0,011958	0,07	18,65	103,61
H2O 0,2% ACN 0,1575%	18	15,8671	15,883	15,9437	15,89793	0,040425	0,25	18,40	102,22
H2O 0,19% ACN 0,15%	18	15,6475	15,6585	15,6632	15,6564	0,008058	0,05	18,11	100,63
H2O 0,21% ACN 0,15%	18	15,6407	15,6614	15,6232	15,64177	0,019122	0,12	18,10	100,54
H2O 0,21% ACN 0,1425%	18	16,1704	16,1785	16,1266	16,1585	0,027921	0,17	18,71	103,93
H2O 0,21% ACN 0,1575%	18	15,8547	15,8553	15,8521	15,85403	0,001701	0,01	18,35	101,93
H2O 0,19% ACN 0,1575%	18	15,6615	15,6873	15,6893	15,67937	0,015505	0,10	18,14	100,78
H2O 0,19% ACN 0,1425%	18	16,2287	16,2668	16,2427	16,24607	0,019272	0,12	18,81	104,50

5.9.4 Robustez - coluna com lote diferente

A robustez foi avaliada através da coluna cromatográfica Thermo Scientific Hypersil GOLD 5 μ , tamanho de poro 175 Å, 250x4,6mm com lote número 17436, diferente daquela utilizada nos demais ensaios de validação. Os valores de precisão para os analitos na concentração de 18 μ g/mL foram entre 0,05% e 0,15%, dados considerados satisfatórios. Ademais, os dados de exatidão para os analitos foram entre 101,02% e 106,86%, valores de acordo com a especificação do protocolo deste trabalho (BRASIL, 2017). A tabela 26 mostra os dados de robustez em relação a coluna com número de lote diferente.

Tabela 26: Dados de robustez em relação à coluna com lote 17436, na avaliação de Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) na concentração de 18 μ g/mL.

CBD	Concentração (μg/mL)	Area 1	Area 2	Area 3	Média	DP	DPR	Conc. Média	EXATIDÃO
COLUNA LOTE 17436	18	15,8375	15,7919	15,8275	15,81897	0,023968	0,15	18,18	101,02
CBN	Concentração (μg/mL)	Area 1	Area 2	Area 3	Média	DP	DPR	Conc. Média	EXATIDÃO
COLUNA LOTE 17436	18	28,7971	28,8223	28,8206	28,81333	0,014084	0,05	19,20	106,64
THC	Concentração (μg/mL)	Area 1	Area 2	Area 3	Média	DP	DPR	Conc. Média	EXATIDÃO
COLUNA LOTE 17436	18	16,6093	16,6132	16,5946	16,6057	0,009809	0,06	19,24	106,86

5.9.5 Robustez - Tempo de análise das amostras após preparo

As soluções do padrão na concentração 18 μ g/mL avaliadas em relação ao tempo de análise após o preparo, nos tempos 0 dia, 1º dia, 2º dia, 3º dia, 6º dia, 7º dia, 14º dia, 21º dia e 28º dia, demonstraram-se estáveis durante o período. Os valores de precisão para os analitos na concentração de 18 μ g/mL foram entre 0,05% e 0,70%, dados considerados satisfatórios. Ademais, os dados de exatidão para os analitos foram entre 96,78% e 108,73%, valores de acordo com a especificação do protocolo

deste trabalho (BRASIL, 2017). A tabela 27 mostra os dados de robustez em relação ao tempo de análise das amostras após preparo, indicando os valores de precisão e exatidão de cada analito.

Tabela 27: Dados de robustez em relação ao tempo de análise das amostras após preparo: a) dados de Canabidiol (CBD); b) dados de canabinol (CBN); c) dados de Δ^9 -tetrahydrocanabinol (Δ^9 -THC).

a) Dados de Canabidiol – CBD									
Tempo	Concentração Teórica (µg/mL)	Area 1	Area 2	Area 3	Média	DP	DPR	Conc. Média Experimental	Exatidão
0 dia	18	15,4946	15,4738	15,4804	15,48293	0,010629	0,07	17,79	98,83
1º dia	18	15,29	15,3001	15,3484	15,31283	0,031213	0,20	17,59	97,73
2º dia	18	16,2211	16,2488	16,3963	16,28873	0,094179	0,58	18,73	104,07
3º dia	18	16,4207	16,235	16,1932	16,28297	0,121098	0,74	18,73	104,03
6º dia	18	15,29	15,3184	15,2796	15,296	0,020084	0,13	17,57	97,62
7º dia	18	15,2179	15,2345	15,2039	15,21877	0,015318	0,10	17,48	97,12
14º dia	18	15,2093	15,2556	15,3625	15,2758	0,078572	0,51	17,55	97,49
21º dia	18	15,2273	15,2388	15,2225	15,22953	0,008376	0,06	17,49	97,19
28º dia	18	15,16	15,1083	15,2348	15,1677	0,063601	0,42	17,42	96,78
b) Dados de canabinol – CBN									
TEMPO	Concentração Teórica (µg/mL)	Area 1	Area 2	Area 3	Média	DP	DPR	Conc. Média Experimental	Exatidão
0 dia	18	27,4301	27,4664	27,454	27,45017	0,018451	0,07	18,28	101,54

1º dia	18	27,240 5	27,2421	27,339 2	27,273 93	0,0565 28	0,21	18,16	100,88
2º dia	18	29,283 9	29,2659	29,257 9	29,269 23	0,0133 17	0,05	19,50	108,35
3º dia	18	29,204 7	29,1934	29,242 9	29,213 67	0,0259 4	0,09	19,47	108,14
6º dia	18	27,205 5	27,227	27,320 2	27,250 9	0,0609 71	0,22	18,14	100,79
7º dia	18	27,200 2	27,2361	27,241 6	27,225 97	0,0224 83	0,08	18,13	100,70
14º dia	18	27,508 1	27,5448	27,585 1	27,546	0,0385 14	0,14	18,34	101,90
21º dia	18	27,305 3	27,4321	27,308 4	27,348 6	0,0723 3	0,26	18,21	101,16
28º dia	18	27,284 2	27,1764	27,344 8	27,268 47	0,0852 95	0,31	18,15	100,86

c) Dados de Δ^9 -tetrahydrocannabinol – Δ^9 -THC

Tempo	Concentração Teórica (µg/mL)	Area 1	Area 2	Area 3	Média	DP	DPR	Conc. Média Experimental	Exatidão
0º dia	18	15,965	15,9841	15,968	15,972 37	0,0102 71	0,06	18,49	102,71
1º dia	18	15,823 3	15,8208	15,858 1	15,834 07	0,0208 51	0,13	18,32	101,80
2º dia	18	16,903 2	16,89	16,874 9	16,889 37	0,0141 61	0,08	19,57	108,73
3º dia	18	16,973 5	16,8439	16,836 1	16,884 5	0,0771 75	0,46	19,57	108,69
6º dia	18	15,823	15,8613	15,877 3	15,853 87	0,0279 03	0,18	18,35	101,93
7º dia	18	15,769 7	15,7921	15,796 3	15,786 03	0,0143	0,09	18,27	101,48
14º dia	18	15,860 6	15,8788	15,891 9	15,877 1	0,0157 19	0,10	18,37	102,08
21º dia	18	15,800 2	15,9962	15,809 6	15,868 67	0,1105 47	0,70	18,36	102,03

28º dia	18	15,787 4	15,7639	15,840 7	15,797 33	0,0393 52	0,25	18,28	101,56
---------	----	-------------	---------	-------------	--------------	--------------	------	-------	--------

5.10 Doseamento das amostras dos lotes dos óleos de Canabidiol (20 mg/mL), Δ^9 -tetrahydrocannabinol (15 mg/mL) e Canabidiol: Δ^9 -tetrahydrocannabinol (15 mg/mL):

As amostras dos lotes dos óleos de Canabidiol (20 mg/mL), Δ^9 -tetrahydrocannabinol (15 mg/mL) e Canabidiol: Δ^9 -tetrahydrocannabinol (15 mg/mL) foram preparados conforme item 4.8.10.

Todos os lotes apresentaram teores satisfatórios, com precisão e exatidão adequadas. Os teores foram: 20,31 mg/mL; 20,57 mg/mL (CBD); 15,23 mg/mL; 15,27 mg/mL (Δ^9 -THC); 13,86 mg/mL / 13,65 mL (CBD/ Δ^9 -THC); e 13,99 mg/mL / 13,61 mg/mL (CBD/ Δ^9 -THC); para os lotes PRO0070822117, PRO0080822117, PRO0070522117, PRO0250522117, PRO0231122117 e PRO0241122117 respectivamente. Os dados de teores, desvio padrão relativo e exatidão dos canabinoides dos lotes de óleos de Canabidiol (20 mg/mL), Δ^9 -tetrahydrocannabinol (15 mg/mL) e Canabidiol: Δ^9 -tetrahydrocannabinol (15 mg/mL) encontram-se descritos nas tabelas 28, 29 e 30. Como pode-se observar nos dados, o DPR só não foi satisfatório nos casos em que a concentração do canabinoide foi inferior a 1,5 µg/mL, não respeitando assim o limite de quantificação (LQ) determinado para este método.

Tabela 28: Dados de doseamento dos canabinoides nos lotes de óleos CBD 20 mg/mL.

LOTE:PRO0070822117 - CBD CLÁSSICO 20 mg/mL								
ÓLEO CBD CLÁSSICO (20 mg/mL)	ANALITO	Teor 1	Teor 2	Teor 3	Teor Médio	Desvio Padrão	Desvio Padrão Relativo	EXATIDÃO
	CBD	20,32	20,28	20,33	20,31	0,03	0,13	101,6
	CBN	n.d*	n.d*	n.d*	n.d*	-	-	
	Δ^9 -THC	0,58	0,54	0,60	0,57	0,03	5,33	
LOTE:PRO0080822117 - CBD GOLD 20 mg/mL								
ÓLEO CBD GOLD (20 mg/mL)	ANALITO	Teor 1	Teor 2	Teor 3	Teor Médio	Desvio Padrão	Desvio Padrão Relativo	EXATIDÃO

	CBD	20,52	20,55	20,63	20,57	0,06	0,28	102,6
	CBN	n.d*	n.d*	n.d*	n.d*	-	-	
	Δ⁹-THC	0,57	0,59	0,58	0,58	0,01	1,72	

*n.d. não detectado

Tabela 29: Dados de doseamento dos canabinoides nos lotes de óleos Δ^9 -THC 15 mg/mL.

LOTE:PRO0070522117 - Δ ⁹ -THC GOLD 15 mg/mL								
ÓLEO Δ ⁹ - THC GOLD (15 mg/mL)	ANALITO	Teor 1	Teor 2	Teor 3	Teor Médio	Desvio Padrão	Desvio Padrão Relativo	EXATIDÃO
	Δ ⁹ -THC	15,25	15,25	15,21	15,23	0,02	0,15	101,5
	CBN	0,11	0,11	0,11	0,11	0,00	2,71	
	CBD	1,16	1,10	1,13	1,13	0,03	2,66	
LOTE:PRO0250522117 - Δ ⁹ -THC CLÁSSICO 15 mg/mL								
ÓLEO Δ ⁹ - THC CLÁSSICO (15 mg/mL)	ANALITO	Teor 1	Teor 2	Teor 3	Teor Médio	Desvio Padrão	Desvio Padrão Relativo	EXATIDÃO
	Δ ⁹ -THC	15,27	15,25	15,29	15,27	0,02	0,16	101,8
	CBN	n.q**	n.q**	n.q**	n.q**	-	-	
	CBD	0,74	0,68	0,76	0,73	0,04	5,51	

**n.q. não quantificado

Tabela 30: Dados de doseamento dos canabinoides nos lotes de óleos CBD/ Δ^9 -THC 15 mg/mL.

LOTE:PRO0231122117 - CBD/Δ ⁹ -THC CLÁSSICO 15 mg/mL								
ÓLEO CBD/Δ ⁹ -THC CLÁSSICO (15 mg/mL)	ANALITO	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Conc. Média	Desvio Padrão	Desvio Padrão Relativo	EXATIDÃO
	CBD	13,86	13,85	13,80	13,84	0,03	0,22	92,2
	CBN	n.d	n.d	n.d	n.d	-	-	
	Δ ⁹ -THC	13,65	13,60	13,58	13,61	0,04	0,28	90,7
LOTE:PRO0241122117 - CBD/Δ ⁹ -THC GOLD 15 mg/mL								

ÓLEO CBD/ Δ^9 -THC GOLD (15 mg/mL)	ANALITO	Conc. 1	Conc. 2	Conc3	Conc. Média	Desvio Padrão	Desvio Padrão Relativo	EXATIDÃO
	CBD	13,99	13,76	13,90	13,88	0,11	0,82	92,6
	CBN	n.d	n.d	n.d	n.d	-	-	
	Δ^9-THC	13,61	13,59	13,56	13,59	0,03	0,21	90,6

6. Conclusão

O método apresentado para doseamento dos canabinoides nos óleos de *Cannabis* spp. por CLAE foi adequadamente avaliado e validado. Este método atende a todos os requisitos de adequação do sistema e de acordo com a RDC/ANVISA 166 de 24 de julho de 2017 (BRASIL, 2017). É importante ressaltar que a temperatura ideal e fluxo ideal para análise é 40 °C e 1,5 mL/min respectivamente. A metodologia para quantificação de canabinoides CBD, CBN e Δ^9 -THC em produtos oleosos que utilizam óleo de milho como veículo está validada. O método pode ser utilizado para dosear os canabinoides nos óleos com uma precisão e exatidão adequada a partir de 1,5 µg/mL.

7. Perspectivas

Desenvolver e validar outro método contemplando outros fitocanabinoides como o CBDA, Δ^9 -THCA, CBG, CBGA, Δ^8 -THC dentre outros, que atenda todas as normas da RDC 166/2017.

REFERÊNCIAS:

- BRASIL. 2014a. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC N. 26, de 13 de maio de 2014.** Disponível em: <http://antigo.anvisa.gov.br/legislacao#/visualizar/29200>
- BRASIL. 2014b. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Instrução Normativa nº 04, de 20 de junho de 2014.** Disponível em: <http://antigo.anvisa.gov.br/legislacao/?inheritRedirect=true#/visualizar/29135>
- BRASIL. 2017. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC N. 166, de 24 de julho de 2017.** Disponível em: <http://antigo.anvisa.gov.br/legislacao#/visualizar/353660>.
- BRASIL. 2019a. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC N. 327, de 09 de dezembro de 2019.** Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-da-diretoria-colegiada-rdc-n-327-de-9-de-dezembro-de-2019-232669072>.
- BRASIL, 2019b. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério da saúde. **Farmacopeia Brasileira**, 6ª edição, v.1, Métodos Gerais de Controle de Qualidade. Brasília, 2019.
- BRASIL. CÂMARA DOS DEPUTADOS. **PROJETO DE LEI Nº 399 de 02 de fevereiro de 2015.** 2015, p. 1–4.
- BREDEMANN G., FR. S. R. VON S. H. **Problems of modern hemp breeding, with particular reference to the breeding of varieties of hemp containing little or no hashish.** p. 31-35, 1956. Disponível em: https://www.unodc.org/unodc/en/data-and-analysis/bulletin/bulletin_1956-01-01_3_page007.html.
- CARVALHO, Virgínia; AGUIAR, Andrey; BARATTO, Leopoldo; SOUZA, Fábio; ROCHA, Ernesto. QUANTIFICAÇÃO DE CANABINOIDES EM EXTRATOS MEDICINAIS DE Cannabis POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA. **Química nova**, [S. l.], 2020. DOI: 10.21577/0100-4042.20170457. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170457>.
- CERQUEIRA, Maristela Barnes Rodrigues et al. Validação de método para determinação de ácidos orgânicos voláteis em efluentes de reatores anaeróbios empregando cromatografia líquida. *Química Nova*, v. 34, p. 156-159, 2011.
- CHANDRA, Suman; LATA, Hemant; KHAN, Ikhlas A.; ELISOHLY, Mahmoud A. *Cannabis sativa* L.: Botany and Horticulture. In: CHANDRA, Suman; LATA, Hemant; ELISOHLY, Mahmoud A. (org.). **Cannabis sativa L. - Botany and Biotechnology**. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 79–100.

DOI: 10.1007/978-3-319-54564-6_3. Disponível em:
<http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-54564-6>.

CRISTINO, Luigia; BISOGNO, Tiziana; DI MARZO, Vincenzo. Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. **Nature Reviews Neurology**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 9–29, 2020. DOI: 10.1038/s41582-019-0284-z. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41582-019-0284-z>.

CUNHA, Jomar M.; CARLINI, E. A.; PEREIRA, Aparecido E.; RAMOS, Oswaldo L.; PIMENTEL, Camilo; GAGLIARDI, Rubens; SANVITO, W. L.; LANDER, N.; MECHOULAM, R. Chronic Administration of Cannabidiol to Healthy Volunteers and Epileptic Patients. **Pharmacology**, [S. l.], v. 21, n. 3, p. 175–185, 1980. DOI: 10.1159/000137430. Disponível em:
<https://www.karger.com/Article/FullText/137430>.

DA COSTA, Pâmela Aparecida. **QUANTIFICAÇÃO QUÍMICA DE CBD E Δ⁹-THC E ANÁLISE BACTERIOLÓGICA DE EXTRATOS ARTESANAIS DE CANNABIS Sativa: A IMPORTÂNCIA DA REGULAMENTAÇÃO**. 31 de Outubro de 2022. UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA - PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, Palhoça - SANTA CATARINA, 31 de Outubro de 2022.

DE BACKER, Benjamin; DEBRUS, Benjamin; LEBRUN, Pierre; THEUNIS, Laetitia; DUBOIS, Nathalie; DECOCK, Lies; VERSTRAETE, Alain; HUBERT, Philippe; CHARLIER, Corinne. Innovative development and validation of an HPLC/DAD method for the qualitative and quantitative determination of major cannabinoids in *Cannabis* plant material. **Journal of Chromatography B**, [S. l.], v. 877, n. 32, p. 4115–4124, 2009. DOI: 10.1016/j.jchromb.2009.11.004. Disponível em:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023209007545>.

DE SOUZA, Maíra Ribeiro; KOETZ, Mariana; LIMBERGER, Renata Pereira; HENRIQUES, Amélia Teresinha. DoE-assisted development and validation of a stability-indicating HPLC-DAD method for simultaneous determination of five cannabinoids in Cannabis sativa L. based on analytical quality by design (AQbD) concept. **Phytochemical analysis: PCA**, [S. l.], v. 33, n. 7, p. 999–1017, 2022. DOI: 10.1002/pca.3154. Disponível em:
<http://dx.doi.org/10.1002/pca.3154>.

DEVANE, W. A.; DYSARZ, F. A.; JOHNSON, M. R.; MELVIN, L. S.; HOWLETT, A. C. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. **Molecular pharmacology**, [S. l.], v. 34, n. 5, p. 605–13, 1988. Disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2848184>.

DEVANE, W. et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. **Science**, [S. l.], v. 258, n. 5090, p. 1946–1949, 1992. DOI: 10.1126/science.1470919. Disponível em:
<https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.1470919>.

- ELSOHLY, Mahmoud A.; RADWAN, Mohamed M.; GUL, Waseem; CHANDRA, Suman; GALAL, Ahmed. Phytochemistry of *Cannabis sativa* L. In: [s.l.] : CRC Press, 2017. p. 1–36. DOI: 10.1007/978-3-319-45541-9_1. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-45541-9_1#citeas.
- EXPERT COMMITTEE ON DRUG DEPENDENCE. **Annex 1 – Extract from the Report of the 41 st Expert Committee on Drug Dependence: Cannabis and cannabis-related substances.** p. 1–8, 2019.
- FARAG, S.; KAYSER, O. The Cannabis Plant: Botanical Aspects. In: Handbook of Cannabis and **Related Pathologies**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 3–12.
- FRIEDMAN, Daniel; SIRVEN, Joseph I. Historical perspective on the medical use of *Cannabis* for epilepsy: Ancient times to the 1980s. **Epilepsy and Behavior**, [S. l.], v. 70, p. 298–301, 2017. DOI: 10.1016/j.yebeh.2016.11.033. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yebeh.2016.11.033>.
- GAONI, Y.; MECHOULAM, 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, J. et al. Cannabis and Its Secondary Metabolites: Their Use as Therapeutic Drugs, Toxicological Aspects, and Analytical Determination. **Medicines**, v. 6, n. 1, p. 31, 23 fev. 2019.
- IBRAHIM, Elsayed et al. Analysis of Terpenes in *Cannabis sativa* L. Using GC/MS: Method Development, Validation, and Application. **Planta Medica**, [S. l.], v. 85, n. 05, p. 431–438, 2019. DOI: 10.1055/a-0828-8387. Disponível em: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/a-0828-8387>.
- JIANG, Hong En et al. A new insight into *Cannabis sativa* (Cannabaceae) utilization from 2500-year-old Yanghai Tombs, Xinjiang, China. **Journal of Ethnopharmacology**, [S. l.], v. 108, n. 3, p. 414–422, 2006. DOI: 10.1016/j.jep.2006.05.034.
- JOSEFINA, Isvett; VERPOORTE, Flores-sanchez Æ. Robert. Secondary metabolism in *Cannabis*. [S. l.], n. April, p. 615–639, 2008. DOI: 10.1007/s11101-008-9094-4.
- JOSHI, Neal; ONAIVI, Emmanuel S. Endocannabinoid System Components: Overview and Tissue Distribution. In: J COSTAIN, Willard; B LAPRAIRIE, Robert (org.). **Recent Advances in Cannabinoid Research**. [s.l.] : IntechOpen, 2019. p. 1–12. DOI: 10.1007/978-3-030-21737-2_1. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/recent-advances-in-cannabinoid-research>.
- LIMA, A. A. DE; ALEXANDRE, U. C.; SANTOS, J. S. O uso da maconha (*Cannabis sativa* L.) na indústria farmacêutica: uma revisão. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 12, p. e46101219829, 13 set. 2021.

- MECHOULAM, R.; SHVO, Y. Hashish-I. The structure of Cannabidiol. **Tetrahedron**, [S. l.], v. 19, n. 12, p. 2073–2078, 1963. DOI: 10.1016/0040-4020(63)85022-X.
- NAHAR, Lutfun; ONDER, Alev; SARKER, Satyajit D. A review on the recent advances in HPLC, UHPLC and UPLC analyses of naturally occurring cannabinoids (2010-2019). **Phytochemical analysis: PCA**, [S. l.], v. 31, n. 4, p. 413–457, 2020. DOI: 10.1002/pca.2906. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/pca.2906>.
- PACHER, Pál; BÁTKAI, Sándor; KUNOS, George. The Endocannabinoid System as an Emerging Target of Pharmacotherapy. **Pharmacological Reviews**, [S. l.], v. 58, n. 3, p. 389–462, 2006. DOI: 10.1124/pr.58.3.2. Disponível em: <http://pharmrev.aspetjournals.org/lookup/doi/10.1124/pr.58.3.2>.
- PERES, Terezinha Bonanho. Noções básicas de cromatografia. **Biológico**, [S. l.], v. 64, n. 2, p. 227–229, 2002.
- RAMAN, Vijayasankar; LATA, Hemant; CHANDRA, Suman; KHAN, Ikhlal A.; ELISOHLI, Mahmoud A. Morpho-Anatomy of Marijuana (*Cannabis sativa* L.). In: **Cannabis sativa L. - Botany and Biotechnology**. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 123–136. DOI: 10.1007/978-3-319-54564-6_5. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-54564-6_5.
- VERPOORTE, R.; CONTIN, A.; MEMELINK, J. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. **Phytochemistry Reviews**, v. 1, n. 1, p. 13–25, jan. 2002.
- UNITED STATES OF AMERICA. Cannabis Species Inflorescence Proposed For Comment Version 0.1, In: Herbal Medicines Compendium/ The United States Pharmacopeial Convention. USP. Sep 21, 2022
- UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. **The International Drug Control Conventions**. New York: UODC, 2013.
- UNITED NATIONS COMMISSION ON NARCOTIC DRUGS. **Report on the reconvened sixty-third session (2–4 December 2020)**. New York: [s.n.]. Disponível em: <<https://undocs.org/E/2020/28/Add.1>>. Acesso em: 10 Jan. 2023.
- 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.