

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Desenvolvimento de proposta de monografia farmacopeica de inflorescências de
Cannabis sativa L.

MAÍRA RIBEIRO DE SOUZA

PORTO ALEGRE, 2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Desenvolvimento de proposta de monografia farmacopeica de inflorescências de
Cannabis sativa L.

Tese apresentada por **Maíra Ribeiro de Souza**, critério necessário para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Amélia Teresinha Henriques

Porto Alegre, 2022

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em nível de Doutorado Acadêmico, e aprovada em 12.05.2022, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Andreas Sebastian Loureiro Mendez
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Luiz Carlos Klein Júnior
Universidade do Vale do Itajaí

Prof. Dr. Ricardo Dinis Oliveira
Cooperativa de Ensino Superior Politécnico e Universitário - Portugal

Souza, Máira Ribeiro de
Desenvolvimento de proposta de monografia
farmacopeica de inflorescências de Cannabis sativa L.
/ Máira Ribeiro de Souza. -- 2022.
273 f.
Orientadora: Amélia Teresinha Henriques.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. Cannabis sativa. 2. Regulação. 3. Controle da qualidade. 4. Desenho experimental. 5. AQB. I. Henriques, Amélia Teresinha, orient. II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Análises e Pesquisas em Toxicologia (Labtoxico) e no Laboratório de Farmacognosia e Controle da Qualidade de Fitoterápicos (Qualifito) da Faculdade de Farmácia da UFRGS, com orientação da Prof^a Dr^a Renata Pereira Limberger de setembro de 2018 a junho de 2021 e da Prof^a Dr^a Amélia Teresinha Henriques, até o momento de sua finalização. O trabalho teve o apoio da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), que concedeu afastamento à autora de suas funções laborais durante o período de condução das atividades pertinentes ao curso de doutorado. A autora não recebeu bolsa de agências de fomento.

Este trabalho é dedicado a todos os pacientes em condições clínicas debilitantes que poderiam encontrar no tratamento com medicamentos obtidos a partir da *Cannabis sativa* algum alívio do seu sofrimento.

AGRADECIMENTOS

Às professoras Amélia Teresinha Henriques e Renata Pereira Limberger, pela confiança que tiveram em mim, pelos ensinamentos, pela convivência agradável e pela oportunidade que me proporcionaram de realizar este trabalho;

À professora Lilian Auler Mentz, pela importante colaboração em relação à identificação botânica do material vegetal, pelos ensinamentos, pela gentileza e acessibilidade;

À Anvisa, e pessoalmente aos gestores que autorizaram o meu afastamento temporário do trabalho para que eu pudesse me dedicar a este estudo, entendendo a potencial relevância do tema para a Agência;

Aos colegas dos laboratórios de Toxicologia e de Farmacognosia pelo companheirismo, pelas amizades que se formaram, pelas trocas e pelos momentos agradáveis durante esse período em que convivemos, especialmente à Mariana Koetz pela colaboração e parceria;

Aos meus pais, Roseli e Saturnino, pelo incentivo, apoio e amor que sempre me dedicaram, fazendo com que eu tivesse segurança para seguir o caminho profissional que escolhi.

*"O principal flagelo da humanidade não é a ignorância, mas
a recusa em saber"*

Simone de Beauvoir

RESUMO

A espécie vegetal *Cannabis sativa* L. tem acompanhado o desenvolvimento da humanidade desde os seus primórdios, sendo utilizada para diversas finalidades e em diversos contextos socioculturais, destacando-se as aplicações terapêuticas e medicinais. Ao longo do século XX, no entanto, diversos controles e restrições sobre as atividades envolvendo a espécie foram estabelecidos internacionalmente. Apesar disso, o uso medicinal da *Cannabis* e de seus derivados tem ganhado interesse nas últimas décadas, especialmente por pacientes com doenças debilitantes e refratários às alternativas terapêuticas existentes. Como consequência, diversos modelos regulatórios têm sido desenvolvidos ao redor do mundo a fim de possibilitar o acesso à espécie para fins medicinais. No Brasil, o marco regulatório referente a esse tema tem evoluído notavelmente desde 2015, embora vários aspectos ainda estejam pendentes de regulamentação. Diante disso, nota-se a necessidade de definição de especificações de qualidade relevantes de modo a reduzir os riscos associados ao uso dos produtos da *Cannabis* e possibilitar a caracterização adequada de medicamentos a serem avaliados em estudos clínicos. Nesse contexto, a aplicação de ferramentas de Qualidade Analítica por *Design* (AQbD, sigla em inglês), incluindo os desenhos experimentais (DoE, sigla em inglês), pode permitir contornar os desafios analíticos envolvidos na obtenção de métodos adequados a tais finalidades. Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo desenvolver métodos analíticos e especificações aplicados ao controle da qualidade de inflorescências de *C. sativa*, a fim de possibilitar a elaboração de uma monografia a ser incluída na Farmacopeia Brasileira. Também foi elaborada uma revisão dos principais marcos regulatórios referentes ao uso medicinal da espécie ao redor do mundo, com o intuito de contribuir para a evolução futura do marco regulatório nacional, com ênfase na definição de critérios técnicos e de qualidade harmonizados com os já aplicados em outros países. Em relação às especificações de qualidade, foram propostos critérios referentes à identificação botânica macroscópica e microscópica do material de interesse, com a elaboração de ilustrações pertinentes, a serem incluídas na proposta de monografia. Além disso, um método por cromatografia em camada delgada (TLC, sigla em inglês) também foi proposto para a identificação e monitoramento do perfil cromatográfico

do material vegetal. Para tanto, um estudo para otimização da fase móvel foi conduzido com aplicação de um desenho experimental de mistura. As condições otimizadas possibilitaram a obtenção de cromatogramas que refletem o perfil de canabinoides majoritários das amostras, além de permitir a discriminação entre os principais quimiotipos da espécie. O método foi validado em relação à sua seletividade, precisão e robustez. Por fim, um método por cromatografia em fase líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (HPLC-DAD, sigla em inglês) foi proposto para quantificação simultânea de cinco canabinoides majoritários (ácido canabidiólico, canabidiol, ácido tetraidrocanabinólico, Δ^9 -tetraidrocanabinol e canabinol) em inflorescências de *C. sativa*. O processo de desenvolvimento analítico envolveu a aplicação de uma abordagem orientada por AQbD. As variáveis experimentais críticas relativas ao preparo da amostra e às condições cromatográficas foram otimizadas utilizando a Metodologia de Superfície de Resposta (RSM, sigla em inglês). A aplicação das condições experimentais otimizadas possibilitou a resolução de 12 canabinoides no nível da linha de base em uma análise de 35 min. O método foi validado segundo as diretrizes da legislação nacional vigente de forma a demonstrar sua seletividade, linearidade, precisão, exatidão e robustez. O potencial do método como indicativo de estabilidade também foi avaliado por meio de estudo de degradação forçada, com resultados satisfatórios. Assim, com a combinação dos métodos por HPLC-DAD e TLC, é possível obter informações suficientes para a caracterização adequada do perfil de constituintes da amostra. A aplicação de desenhos experimentais durante o desenvolvimento dos métodos supracitados também permitiu um melhor entendimento do comportamento cromatográfico dos analitos em função das variáveis experimentais, o que pode facilitar o processo de adaptações futuras desses métodos para atender às necessidades específicas de laboratórios distintos. Como produto deste estudo, foi elaborada uma proposta de monografia referente às inflorescências de *C. sativa*, apresentada em anexo, a ser submetida à avaliação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para inclusão na Farmacopeia Brasileira.

Palavras-chave: *Cannabis sativa*; regulação; controle da qualidade; identificação; quantificação de canabinoides; desenho experimental; AQbD.

ABSTRACT

The plant species *Cannabis sativa* L. has accompanied humankind since ancient times, being used for different purposes and in different sociocultural contexts, among which one can highlight its therapeutic and medicinal applications. Nonetheless, throughout the 20th century, a series of controls and restrictions on activities involving the species began to be adopted internationally. Despite that, medical uses of Cannabis and its derivatives have gained interest in recent decades, especially among patients with debilitating diseases for which the existing therapeutic alternatives are limited. As a consequence, a diversity of regulatory models which allow access to medical Cannabis have been developed around the world. In Brazil, an evolution of the regulatory framework has been noticeable since 2015, although several aspects are still to be addressed. Accordingly, the need for defining relevant quality specifications so as to reduce the risks associated with the use of those products and favor the appropriate characterization of the medicines to be evaluated in clinical studies is worthy of being highlighted. It should be noted, however, that the complexity of plant matrices and the structural similarity between cannabinoids make analytical development a challenging task. In this scenario, the application of Analytical Quality by Design (AQbD) tools, including Design of Experiments (DoE), can favor the development of fit-for-purpose analytical methods. In view of the above, this study aims to develop analytical methods and specifications for quality control of *C. sativa* inflorescences in order to enable the elaboration of a monograph to be included in the Brazilian Pharmacopoeia. An overview of the main regulatory frameworks for medical Cannabis around the world is also presented with the aim of contributing to the future evolution of the national regulatory framework, with an emphasis on the definition of technical and quality criteria harmonized with those already applied in other countries. Regarding the quality specifications, acceptance criteria for macroscopic and microscopic botanical identification of the material of interest, along with pertinent illustrations, were proposed to be included in the monograph draft. Furthermore, a Thin Layer Chromatography (TLC) method was proposed for the identification and monitoring of the chromatographic profile of the herbal material. A Mixture experimental design was applied for optimization of the mobile phase. The optimized conditions allowed obtaining chromatograms that reflect the samples' cannabinoids profile, in

addition to enabling the discrimination between the main chemotypes of the species. The method was validated regarding its selectivity, precision, and ruggedness. Finally, a High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector (HPLC-DAD) method for simultaneous quantification of five major cannabinoids (cannabidiolic acid, cannabidiol, tetrahydrocannabinolic acid, Δ^9 -tetrahydrocannabinol and cannabinol) in *C. sativa* samples was developed by applying an AQbD-driven approach. The critical experimental variables regarding sample preparation and chromatographic conditions were optimized using Response Surface Methodology (RSM). Baseline resolution of 12 cannabinoids was achieved in a 35 min-chromatographic analysis applying the optimized experimental conditions. The method was fully validated according to the current national guidelines in order to demonstrate its selectivity, linearity, precision, accuracy, and ruggedness. The stability-indicating properties of the method were also verified by performing a forced degradation study. Wherefore, the combination of the HPLC-DAD and TLC methods would provide enough information for the appropriate characterization of the sample's constituents' profile. It should also be noted that the application of experimental designs during the development of the aforementioned methods allowed for a better understanding of the chromatographic behavior of the analytes as a function of the experimental variables, which favors further adaptations to meet the specific needs of individual laboratories. As a product of this study, a monograph draft for *C. sativa* inflorescences was prepared (presented in the annex) to be submitted for evaluation by the Brazilian Health Regulatory Agency (ANVISA) for inclusion in the Brazilian Pharmacopoeia.

Keywords: *Cannabis sativa*; regulatory framework; quality control; identification; cannabinoid determination; design of experiments; AQbD.

LISTA DE TABELAS

Table 3 1: Experimental variables included in ruggedness assessment, along with their respective levels, and experimental matrix created according to the Youden design	146
Table 3 2: Exposure conditions applied during the forced degradation study	148
Table 3 3: Fit indicators of the proposed polynomial models referring to the assessed response variables	151
Table 3 4: Rf values obtained for the selected markers, THCA and Δ^9 -THC, in repeatability analyses	159
Table 3 5: Rf values obtained for the selected markers, THCA and Δ^9 -THC, in intermediate precision analyses	160
Table 4 1: Verification of the predictive capabilities of mathematical models and the validity of optimized chromatographic conditions for obtaining the desirable responses	195
Table 4 2: Verification of the predictive capabilities of mathematical models and the validity of optimized extraction conditions for obtaining the desirable responses	200
Table 4 3: Selectivity assessment results regarding the analysis of mixed cannabinoid standard solution A (CS.A)	202
Table 4 4: Concentration decay of analytes of interest as a function of degrading conditions and spectral purity of the corresponding analytical signals	203
Table 4 5: Analytical curves coefficients obtained from linear regression analysis applying the weighted least squares method	205
Table 4 6: Comparison between the angular coefficients of the analytical curves obtained in the presence and absence of matrix constituents	205
Table 4 7: Results from precision assessment	206
Table 4 8: Results from the assessment of systematic errors related to the instrumental step	207
Table 4 9:: Results from the assessment of CBD extraction recovery	208
Table 4 10: Estimated Relative Response Factors (RRF) and Correction Factors against CBD	209
Table 4 11: Comparison between the analytes' concentrations determined against the CBD external standard and those calculated using the respective analytical curves	209

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Classificação de <i>Cannabis sativa</i> quanto aos seus quimiotipos predominantes	43
Quadro 2: Resumo das atividades relatadas para os principais canabinoides sobre diferentes receptores e alvos farmacológicos.	51
Quadro 3: Métodos analíticos voltados ao monitoramento do perfil de canabinoides por cromatografia em camada delgada	61
Quadro 4: Métodos aplicáveis à determinação do teor de canabinoides em inflorescências de <i>Cannabis sativa</i> por cromatografia em fase líquida	64
Quadro 5: Quadro comparativo entre os testes voltados ao monitoramento de impurezas e respectivos critérios de aceitação preconizados em monografias de <i>Cannabis sativa</i> (inflorescências)	67

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Classificação de *C. sativa* proposta por Small & Cronquist (1976). Fonte: Adaptado de Small (2015) 36
- Figura 2: Aspectos morfológicos de *C. sativa*. 38
- Figura 3: Principais canabinoides encontrados em *Cannabis sativa* e suas rotas de formação. 40
- Figura 4: Principais alegações terapêuticas de *C. sativa* e seus derivados relatadas na literatura agrupadas segundo os níveis das evidências de eficácia que as suportam. 53
- Figura 5: Fluxo típico de um processo de desenvolvimento analítico abrangendo os elementos do AQB 71
- Figure 1 1: Regulatory models regarding access to medical cannabis around the world and their classification according to the types of available Cannabis-based pharmaceutical products. 89
- Figure 1 2: Legal status of medical cannabis and Cannabis-based pharmaceutical products around the world. 90
- Figure 1 3: Classification of the assessed regulatory models with regard to the possibility of access to herbal cannabis. 92
- Figure 1 4: Classification of the assessed regulatory models with regard to the possibility of medical cannabis cultivation and the purposes of that activity. 94
- Figura 2 1: Registros fotográficos de detalhes das estruturas encontradas em inflorescências femininas de *C. sativa*. 134
- Figura 2 2: Aspectos macroscópicos, microscópicos e microscópicos do pó em *Cannabis sativa* 136
- Figure 3 1: Contour plots indicating the variations in resolutions between the critical pairs of cannabinoids as a function of the mobile phase composition. 152
- Figure 3 2: Contour plot indicating the variation of the Ideal Separation (IS) function within the experimental domain. 153
- Figure 3 3: Chromatograms obtained after applying the optimized experimental conditions to the analysis of cannabinoid standards and *C. sativa* samples. 157
- Figure 3 4: Overlay of the densitograms obtained during the precision assessment (repeatability). 159
- Figure 4 1: Contour plots showing the relationship between the resolution of the critical pair CBD/CBG and evaluated CMV. 192

Figure 4 2: Contour plots showing the relationship between the resolution of the critical pair Δ^9 -THC/ Δ^8 -THC and evaluated CMV. 193

Figure 4 3: Chromatogram obtained from the CS.A analysis applying the optimized chromatographic conditions. 195

Figure 4 4: Contour plots indicating the effects of the evaluated CMV on the extraction efficiency of THCA, Δ^9 -THC and CBN. 199

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AQbD	<i>Analytical Quality by Design</i>
BBD	<i>Box-Behnken Design</i>
CB1/CB2	Receptores canabinoides dos tipos 1 e 2, respectivamente
CBC	Canabicromeno
CBD	Canabidiol
CBDA	Ácido canabidiólico
CBDV	Canabidivarina
CBDVA	Ácido canabidivarínico
CBG	Canabigerol
CBGA	Ácido canabigerólico
CBN	Canabinol
CCD	<i>Central Composite Design</i>
CMA	<i>Critical Method Attributes</i>
CMV	<i>Critical Method Variables</i>
DoE	<i>Design of Experiments</i>
HPLC-DAD	<i>High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector</i>
HPTLC	<i>High-Performance Thin Layer Chromatography</i>
ICH	<i>International Conference on Harmonization (of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use)</i>
QbD	<i>Quality by Design</i>
RSM	<i>Response Surface Methodology</i>
SEC	Sistema Endocanabinoide
Δ^8 -THC	Δ^8 -tetraidrocanabinol
Δ^9 -THC	Δ^9 - tetraidrocanabinol
THCA	Ácido tetraidrocanabinolico
THCV	Tetraidrocanabivarina
TLC	<i>Thin Layer Chromatography</i>
UN	<i>United Nations</i>
UNODC	<i>United Nations Office on Drugs and Crime</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	29
OBJETIVOS	33
Objetivo Geral	33
Objetivos Específicos	33
REFERENCIAL TEÓRICO	35
1. A espécie vegetal <i>Cannabis sativa</i> L.	35
1.1. Taxonomia	35
1.2. Características morfológicas	37
1.3. Perfil fitoquímico	39
1.3.1. Canabinoides	39
1.3.2. Terpenoides	41
1.3.3. Outros constituintes	41
1.4. Quimiotipos	42
1.5. Atividades farmacológicas e potenciais terapêuticos	43
1.5.1. Δ^9 -tetraidrocanabinol (Δ^9 -THC)	44
1.5.2. Canabidiol (CBD)	45
1.5.3. Outros canabinoides	47
1.5.4. Extratos e canabinoides em associação	52
1.5.5. Perfil de segurança e efeitos adversos	54
2. Métodos analíticos e parâmetros de qualidade aplicados à <i>Cannabis sativa</i>	55
2.1. Métodos de extração e preparo de amostra	56
2.2. Identificação	57
2.3. Teor	62
2.4. Impurezas	66
3. Aplicação de análises multivariadas ao desenvolvimento analítico	69
3.1. O paradigma do “ <i>Analytical Quality by Design</i> ” (AQbD)	69
3.2. Desenho de experimentos (DoE)	72
CAPÍTULO 1: MANUSCRITO I	75
1. BACKGROUND	78
1.1. Historical overview	78
1.2. Summary of existing scientific evidence	83
2. MEDICAL CANNABIS REGULATION AROUND THE WORLD	86
2.1. Product types and access	90
2.2. Cultivation and supply regulation	93

2.3.	Technical requirements	96
3.	MEDICAL CANNABIS IN BRAZIL: STATUS AND PERSPECTIVES	97
4.	CONCLUSION	100
5.	METHODS	102
6.	REFERENCES	105
	SUPPLEMENTARY MATERIAL	111
	CAPÍTULO 2: Proposta de especificações para os testes de identificação botânica macroscópica e microscópica da droga vegetal	127
1.	INTRODUÇÃO	129
2.	OBJETIVOS	130
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	130
3.1.	Material vegetal	130
3.2.	Análise macroscópica	131
3.3.	Análise microscópica	131
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	131
4.1.	Análise macroscópica	131
4.2.	Análise microscópica	132
	CAPÍTULO 3: MANUSCRITO II	137
1.	INTRODUCTION	140
2.	MATERIAL AND METHODS	142
2.1.	Chemicals and reagents	142
2.2.	Plant material	143
2.3.	Reference solutions preparation	143
2.4.	Sample preparation	143
2.5.	Chromatography	144
2.6.	Software	144
2.7.	Method optimization	145
2.8.	Method validation	146
3.	RESULTS AND DISCUSSION	149
3.1.	Method optimization	149
3.2.	Method validation	154
4.	CONCLUSIONS	160
5.	REFERENCES	162
	SUPPLEMENTARY MATERIAL	165
	CAPÍTULO 4: MANUSCRITO III	173
1.	INTRODUCTION	176
2.	EXPERIMENTAL	180

2.1.	Materials	180
2.2.	Optimization of chromatographic conditions	182
2.3.	Optimization of sample preparation	183
2.4.	Method validation	184
2.5.	Statistical analysis	187
3.	RESULTS AND DISCUSSION	188
3.1.	Definition of Analytical Target Profile (ATP)	189
3.2.	Definition of Critical Method Attributes (CMA) and Critical Method Variables (CMV)	189
3.3.	Optimization of chromatographic conditions	190
3.4.	Extraction optimization	196
3.5.	Method validation	200
4.	REFERENCES	211
	SUPPLEMENTARY MATERIAL	215
	DISCUSSÃO GERAL	241
	CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS	249
	REFERÊNCIAS	251

APRESENTAÇÃO

De acordo com as orientações do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) para elaboração de teses e dissertações, a estrutura da presente tese segue um modelo de apresentação em capítulos, sendo o conteúdo do trabalho organizado da seguinte forma:

1. Introdução, voltada à contextualização do trabalho
2. Objetivos
3. Revisão bibliográfica do tema
4. Capítulo 1: Manuscrito I, intitulado “*Medical cannabis regulation: An overview of models around the world with emphasis on the Brazilian scenario*”
5. Capítulo 2: Proposta de especificações para os testes de identificação botânica macroscópica e microscópica da droga vegetal
6. Capítulo 3: Manuscrito II, intitulado “*DoE-assisted development and validation of a thin layer chromatography method for optimized separation of major cannabinoids in Cannabis sativa L. samples*”
7. Capítulo 4: Manuscrito III, intitulado “*DoE-assisted optimization and validation of a stability-indicating HPLC-DAD method for simultaneous determination of five cannabinoids in Cannabis sativa L. samples based on Analytical Quality by Design (AQbD) concept*”
8. Discussão geral, abordando todas as etapas do trabalho
9. Conclusão geral e perspectivas futuras
10. Referências

INTRODUÇÃO

A espécie vegetal *Cannabis sativa* L. (Cannabaceae) tem acompanhado o desenvolvimento da humanidade desde os seus primórdios, sendo utilizada para diversas finalidades e em diversos contextos socioculturais, destacando-se as suas aplicações terapêuticas e medicinais [1–3]. No entanto, durante as primeiras décadas do século XX, houve um declínio no interesse pela utilização medicinal da espécie, principalmente devido à falta de padronização dos produtos medicinais disponíveis até então, ao surgimento de alternativas terapêuticas de origem sintética e às dificuldades de acesso decorrentes da implementação de políticas proibicionistas de alcance internacional [2,3].

Apesar das restrições de acesso, o conhecimento científico a respeito da constituição química e das propriedades farmacológicas de *C. sativa* evoluiu significativamente a partir da segunda metade do século XX, o que contribuiu para a renovação do interesse pelos potenciais usos medicinais da espécie e de seus derivados [2–4]. Desde então, diversos estudos não clínicos e clínicos têm apontado para a eficácia extratos de *C. sativa* ou de seus canabinoides majoritários no tratamento de condições patológicas como epilepsia refratária, esclerose múltipla e dor neuropática crônica [4–7]. Diante do aumento da demanda por produtos à base de *Cannabis*, muitos países têm destinado esforços para estabelecer regulamentações que permitam o acesso a esses produtos [4,8,9]. As características dos modelos regulatórios adotados variam consideravelmente conforme o país, refletindo aspectos históricos, socioeconômicos e culturais [1,10,11].

No Brasil, a espécie *C. sativa* consta na Lista “E” (Lista de plantas proscritas que podem originar substâncias entorpecentes e/ou psicotrópicas) da Portaria SVS/MS nº 344/1998 [12]. Até 2015, todas as substâncias obtidas a partir dessa espécie também eram consideradas proscritas, porém, com a publicação da RDC/ANVISA nº 03/2015, o canabidiol (CBD) foi retirado da lista “F” (substâncias de uso proscrito no Brasil) e incluído na Lista “C1” (Lista das outras substâncias sujeitas a controle especial) da referida Portaria [13]. Ainda em 2015, a importação de produtos contendo CBD foi simplificada com a publicação da RDC/ANVISA nº

17/2015 [14], fato motivado pelos resultados de estudos que apontam para a eficácia desse canabinoide no tratamento de epilepsia refratária [15].

Em 2017, foi aprovado o registro do medicamento Mevatyl® (tetraidrocanabinol, 27 mg/mL + canabidiol, 25 mg/mL), indicado para o tratamento sintomático da espasticidade relacionada à esclerose múltipla [16]. Com a publicação da RDC/ANVISA nº 327/2019 [17], foi estabelecida a categoria de “Produtos de Cannabis”, para os quais passou a ser possível obter Autorização Sanitária de forma simplificada, válida por até 5 anos, motivada principalmente pelo aumento da demanda pela disponibilização desses produtos no mercado nacional. A referida norma estabelece alguns requisitos mínimos para a Autorização desses produtos, como a certificação das Boas Práticas de Fabricação da unidade fabril e a avaliação de determinados parâmetros de qualidade. Porém, as empresas responsáveis ficaram temporariamente isentas da apresentação de provas de segurança e eficácia. A venda desses produtos é condicionada à prescrição por profissional habilitado, sendo atribuída a este a responsabilidade de definição das indicações e modo de uso, conforme o quadro clínico do paciente. A prescrição de produtos com teor de Δ^9 -tetraidrocanabinol (Δ^9 -THC) superior a 0,2% é limitada a pacientes terminais ou que tenham esgotado as alternativas terapêuticas de tratamento. A RDC supracitada também preconiza o cumprimento das especificações previstas em monografias dos insumos que venham a ser publicadas na Farmacopeia Brasileira ou em outras Farmacopeias reconhecidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o que ilustra a importância da condução de estudos que subsidiem a definição de especificações de qualidade apropriadas para os insumos e produtos em questão.

Além da aquisição dos produtos autorizados nos termos da RDC/ANVISA nº 327/2019, é possível obter autorizações individuais para importação de “Produtos derivados de *Cannabis*”, conforme disposto na RDC/ANVISA nº 335/2020 [18]. Entretanto, muitos desses produtos não são registrados como medicamentos no país de origem e, portanto, podem ter sido disponibilizados sem a devida avaliação de parâmetros relevantes para assegurar a sua qualidade, segurança e eficácia. Entre os riscos associados ao uso de produtos dessa natureza, destacam-se os efeitos tóxicos potenciais do Δ^9 -THC e de outros canabinoides psicoativos, cujos teores não são devidamente controlados [19]. Convém ressaltar, ainda, que,

apesar das abordagens adotadas nos últimos anos no sentido de ampliar a disponibilidade de produtos à base de *Cannabis* no Brasil, o acesso de grande parte da população aos produtos tecnicamente elaborados ainda é limitado, principalmente por fatores como custo e disponibilidade. Em razão disso, muitos pacientes ainda recorrem a estratégias alternativas como o autocultivo ou a obtenção de extratos por meio de redes clandestinas de distribuição [15], o que implica riscos devido à falta de controle dos processos de obtenção e dos parâmetros de qualidade dos produtos obtidos.

Atualmente, encontra-se em tramitação no Congresso Nacional o Projeto de Lei (PL) 399/2015, que tem por objetivo viabilizar a comercialização de medicamentos que contenham insumos ativos obtidos a partir de *C. sativa* [20]. Ademais, o texto atual do PL supracitado prevê a regulamentação de atividades relacionadas ao cultivo da espécie no território nacional por pessoas jurídicas autorizadas, o que poderá favorecer o acesso aos insumos ativos farmacêuticos obtidos a partir delas pelos fabricantes dos produtos e medicamentos em questão.

Dada a complexidade do tema e a sua relevância em termos de Saúde Pública, o aprimoramento do marco regulatório nacional no que diz respeito ao uso medicinal de *C. sativa*, amparado em bases científicas, de forma a favorecer o acesso a produtos que possam consistir em alternativas terapêuticas confiáveis para a população, é ainda um desafio para os próximos anos. Para tanto, é necessário o engajamento de diferentes atores, incluindo membros da comunidade acadêmica, agentes reguladores, profissionais prescritores e pacientes. Nesse contexto, o desenvolvimento de monografias farmacopeicas para insumos obtidos a partir de *C. sativa* poderá contribuir para a definição de especificações de qualidade relevantes, principalmente no que diz respeito à sua identidade, perfil químico, pureza e teor; bem como para reduzir a possibilidade de adulterações e prevenir o uso de materiais contaminados [21,22].

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Desenvolver métodos analíticos e propor especificações para controle da qualidade de inflorescências de *Cannabis sativa* L. e seus derivados visando à elaboração de uma proposta de monografia farmacopeica.

Objetivos Específicos

- a) Realizar o levantamento bibliográfico de práticas e abordagens adotadas internacionalmente na regulamentação e controle de medicamentos obtidos a partir de *C. sativa* e seus constituintes, de forma a subsidiar a elaboração de critérios de qualidade harmonizados com aqueles já definidos em outros países.
- c) Propor especificações para os testes de identificação botânica, macroscópica e microscópica, aplicados à droga vegetal.
- b) Desenvolver e validar um método analítico aplicado à identificação e monitoramento do perfil cromatográfico de inflorescências de *C. sativa* e seus derivados com emprego de técnica de TLC associada à densitometria.
- e) Desenvolver e validar um método analítico destinado à determinação de teor de canabinoides em inflorescências de *C. sativa* com emprego de técnica de HPLC-DAD.
- f) Propor especificações de qualidade aplicadas às drogas vegetais obtidas a partir das inflorescências de *C. sativa* visando a sua utilização como insumos farmacêuticos ativos;
- g) Elaborar uma proposta de monografia da droga vegetal (inflorescências de *Cannabis sativa*), a ser submetida à avaliação da ANVISA para inclusão na Farmacopeia Brasileira.

REFERENCIAL TEÓRICO

1 A espécie vegetal *Cannabis sativa* L.

1.1 Taxonomia

O gênero *Cannabis* pertence à família Cannabaceae e tem sido considerado como monoespecífico de acordo com o entendimento predominante atualmente, sendo representado pela espécie *Cannabis sativa* L., suas subespécies e variedades [23], embora o debate acerca dessa classificação ainda permaneça em aberto [21,24–26].

Ao longo de séculos de domesticação pelo ser humano, diferentes características fenotípicas de *C. sativa*, incluindo aspectos morfológicos e fitoquímicos, foram selecionadas artificialmente, buscando atender a finalidades utilitárias [24]. Dessa forma, foram originados grupos diversos, que têm sido classificados em subespécies, variedades, cultivares e quimiotipos [24,26]. No entanto, as diferenças fenotípicas passíveis de subsidiar essa classificação nem sempre são claras [24,27]. Além disso, a plasticidade fenotípica da espécie, relacionada à capacidade dos indivíduos de adaptar-se em resposta a fatores ambientais, também contribui para uma maior diversidade intraespecífica, impondo dificuldades adicionais ao estabelecimento de um sistema de classificação taxonômica [24]. Em razão disso, alguns autores têm sugerido revisões da taxonomia do gênero *Cannabis* com base em critérios genéticos [27]. Modelos de classificação aplicados a plantas cultivadas, governados pelo Código Internacional de Nomenclatura para Plantas Cultivadas (ICNCP, sigla em inglês) também podem ser alternativas viáveis para a classificação de *C. sativa* de forma condizente com o conhecimento atual, embora esse tipo de nomenclatura não seja baseada em critérios filogenéticos propriamente ditos [26].

Um modelo de classificação de *C. sativa* guiado pelo *International Code of Nomenclature for Cultivated Plants* (INCP) foi proposto por Small & Cronquist (1976) (Figura 1), dividindo a espécie primeiramente em dois grupos ou “subespécies”: *C. sativa* subsp. *indica*, caracterizada por teores de Δ^9 -THC mais elevados (tipicamente acima de 1%); e *C. sativa* subsp. *sativa*, caracterizada por baixos teores desse canabinoide (tipicamente abaixo de 0,3%).

A segunda subdivisão proposta considera aspectos morfológicos dos aquênios que permitem diferenciar variedades cultivadas de outras de ocorrência silvestre, resultando na seguinte classificação: *C. sativa* subsp. *sativa* var. *sativa*, que corresponde à variedade comumente cultivada para obtenção de fibra ou óleo; *C. sativa* subsp. *sativa* var. *spontanea*, que corresponde a uma variedade silvestre com baixo teor de Δ^9 -THC; *C. sativa* subsp. *indica* var. *indica*, que corresponde à variedade cultivada utilizada comumente como droga psicoativa; e *C. sativa* subsp. *indica* var. *kafiristanica*, que corresponde a uma variedade silvestre rica em Δ^9 -THC [24,28].

Embora esse modelo apresente limitações [24], ele pode ser útil do ponto de vista prático, pois enfatiza características relevantes para a utilização medicinal da espécie e pode ser correlacionado aos principais quimiotipos conhecidos (vide item 1.4).

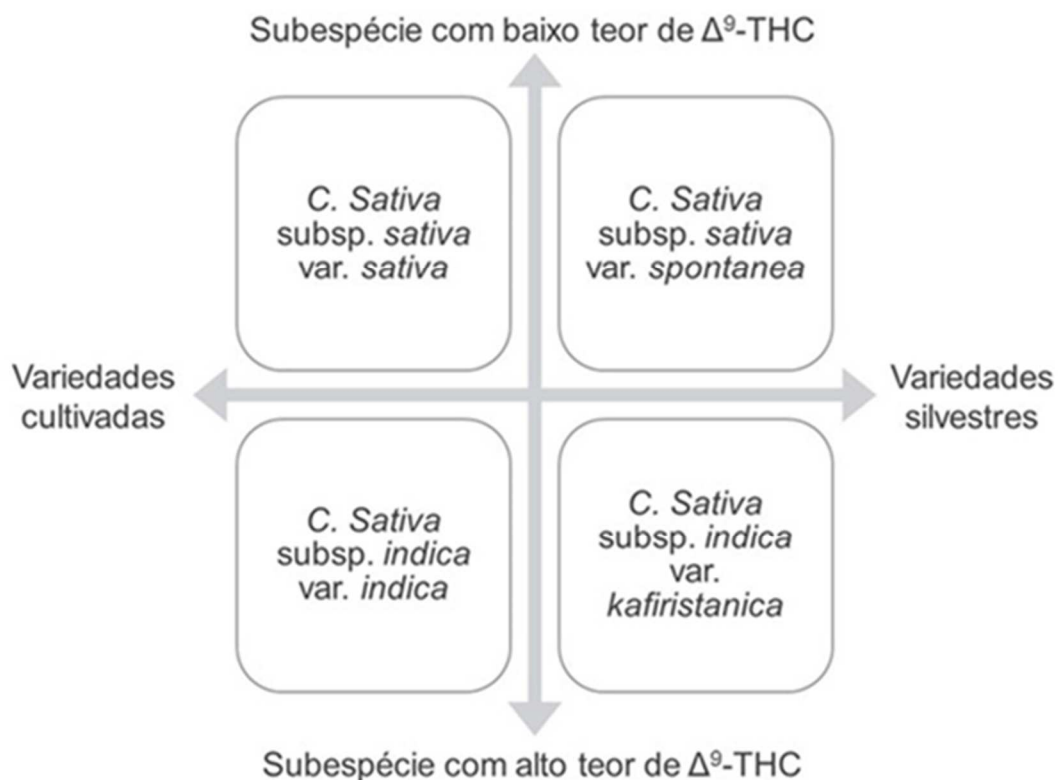


Figura 1: Classificação de *C. sativa* proposta por Small & Cronquist (1976). Fonte: Adaptado de Small (2015) [24].

1.2 Características morfológicas

Cannabis sativa L. é uma espécie anual, predominantemente dioica, de hábito arbustivo, geralmente alcançando 1-3 m de altura, podendo chegar a 6 m [26,29], sendo que a altura e o grau de ramificação dos indivíduos dependem de fatores genéticos e ambientais [29]. Geralmente, as plantas estaminadas (masculinas) são mais altas e menos robustas em relação às plantas pistiladas (femininas) [26].

O caule é ereto, sulcado, geralmente oco. As folhas são compostas palmadas, com 5 a 11 folíolos, e apresentam disposição alterna ou oposta. Os folíolos são geralmente lanceolados, usualmente medindo 7-15 x 0.5-1,5 cm, sendo o maior deles situado centralmente; apresentam margens serrilhadas e ápice acuminado [26]. A superfície abaxial das folhas é de coloração verde-esbranquiçada, pilosa e com pontos resinosos de cor branca a marrom, distribuídos de forma esparsa. A superfície adaxial apresenta coloração mais escura, com tricomas cistolíticos [26].

As inflorescências masculinas apresentam-se como panículas de disposição axial ou terminal, medindo até 5 cm. As flores masculinas são compostas por 5 sépalas imbricadas, membranosas, de formato ovalado a lanceolado, medindo 2,5-4 mm, com tricomas prostrados esparsos; e pedicelo medindo 2-4 mm. As pétalas são ausentes. Os estames apresentam filamento reto, medindo 0,5-1 mm, e anteras oblongas [26].

As inflorescências femininas apresentam-se como pseudoespigas congestionadas, sendo comum a presença de brácteas e bractéolas, de formato semelhante às folhas, densamente recobertas por tricomas glandulares. As flores femininas são sésseis, com duas longas projeções estigmáticas lineares e caducas, medindo 5-10 mm de comprimento, raramente mais, sendo envoltas na porção inferior por uma bractéola pilosa, de formato ovalado com ápice afilado, medindo geralmente de 5-8 mm. O ovário é séssil, subgloboso, unilocular, medindo cerca de 1-2 mm [21,26,29].

Os frutos são aquênios de formato lenticular, medindo cerca de 2-5 mm, protegidos pelo cálice fundido persistente envolto por brácteas. Geralmente

apresentam coloração branca esverdeada ou amarronzada. Possuem uma única semente envolta por pericarpo seco e frágil, finamente reticulado [26,29].



Figura 2: Aspectos morfológicos de *C. sativa* L. A) Inflorescência masculina (estaminada). B) Planta feminina (pistilada) em frutificação. 1. Flor estaminada. 2. Estame (antera e filamento). 3. Estame. 4. Grãos de pólen. 5. Flor pistilada com bráctea. 6. Flor pistilada sem bráctea. 7. Flor pistilada em corte longitudinal para visualização do ovário. 8. Fruto (aquênio) com bráctea. 9. Fruto (aquênio) sem bráctea. 10. Aquênio (visão lateral). 11. Aquênio (corte transversal) 12. Aquênio (corte longitudinal). 13. Semente (remoção do pericarpo). Fonte: Müller (1887) [30]

1.3 Perfil fitoquímico

O perfil de constituintes de *Cannabis sativa* é complexo e bastante variado, incluindo terpenos, esteroides, alcaloides, flavonoides e outros polifenóis [31–33]. Destes, os mais conhecidos e mais característicos da espécie são os canabinoides, substâncias terpenofenólicas com um esqueleto formado por 21 carbonos, com origem biossintética híbrida, envolvendo as vias do mevalonato e dos policetídeos [31,34].

1.3.1 Canabinoides

Mais de 100 canabinoides já foram identificados em *C. sativa*, porém, poucos são acumulados em quantidades significativas no vegetal [34,35]. Entre os canabinoides majoritários, destacam-se o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), o canabidiol (CBD), o canabigerol (CBG), o canabicromeno (CBC) e o canabinol (CBN) [34,36]. O perfil de canabinoides é bastante variável entre os diferentes quimiotipos da espécie (*vide* item 1.4), sendo determinadas principalmente por fatores genéticos [24,37], embora também seja influenciado por fatores como a maturidade da planta, as condições ambientais e pelas etapas de coleta e processamento [26,38].

Os canabinoides são sintetizados e acumulados na planta em suas formas ácidas. O ácido canabigerólico (CBGA) é o precursor biossintético dos ácidos tetrahydrocannabinólico (Δ^9 -THCA), canabidiólico (CBDA) e canabicromênico (CBCA). Estes, por sua vez, podem ser convertidos a Δ^9 -THC, CBD e CBC, respectivamente, por processos de descarboxilação (Figura 3) favorecidos pelo aquecimento do material vegetal [29,36,39,40]. Muitos canabinoides minoritários encontrados na planta seca ou em extratos da espécie são reportados como artefatos gerados a partir de canabinoides majoritários por processos oxidativos que culminam, por vezes, na formação de canabinoides aromáticos como o CBN, um conhecido produto de degradação do Δ^9 -THC [33,34,40].

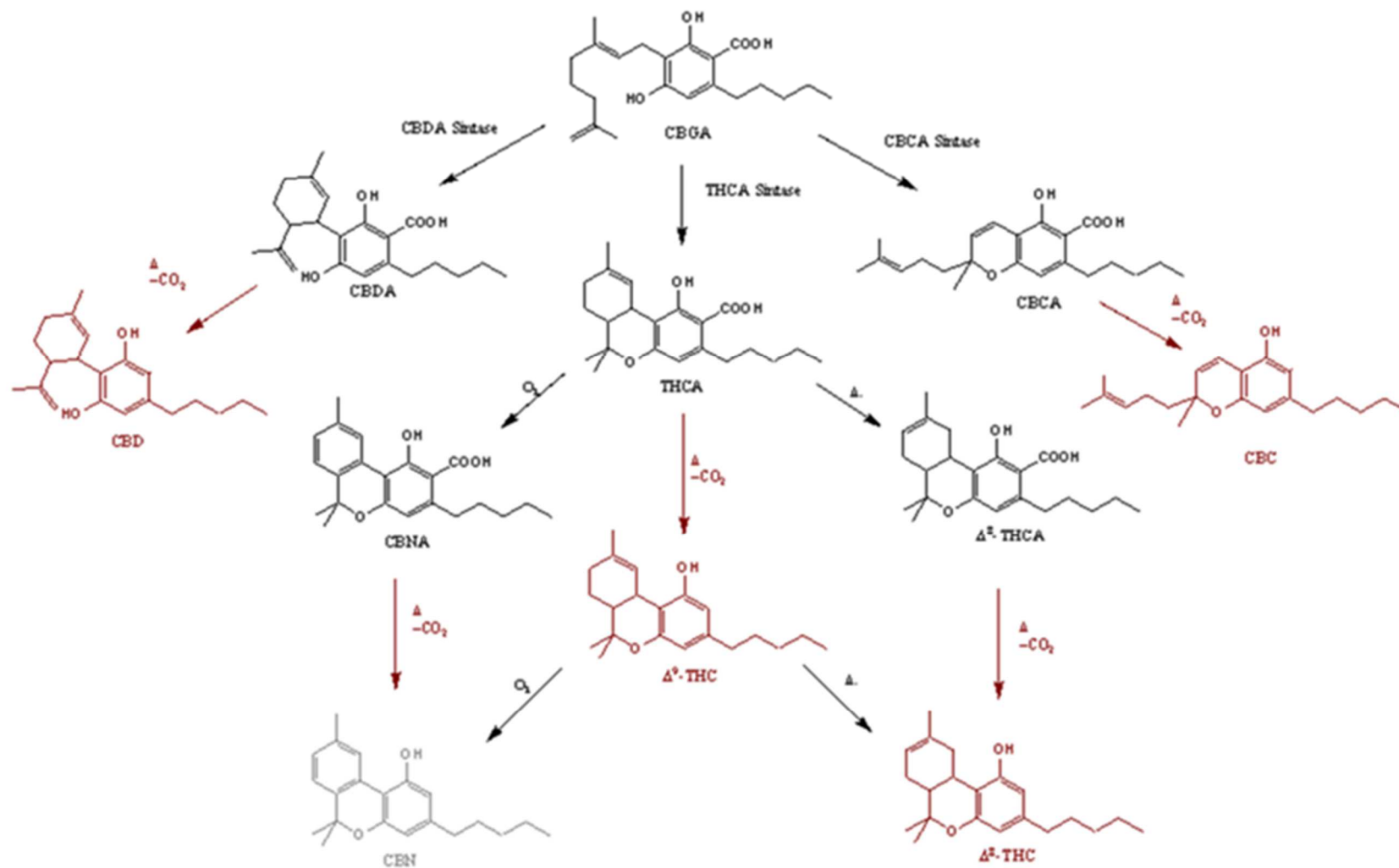


Figura 3: Principais canabinoides encontrados em *Cannabis sativa* e suas rotas de formação. O₂: Oxidação; Δ : Aquecimento; -CO₂: Descarboxilação.
 Fonte: Elaborado pela autora com adaptações a partir de Hartsel *et al.* (2016) [40].

1.3.2 Terpenoides

Os terpenoides possuem precursores biossintéticos comuns em relação aos canabinoides [39,41] e, assim como estes últimos, são acumulados nos tricomas glandulares de *C. sativa*, chegando a representar 10% de seu conteúdo [26,39]. Como os canabinoides são inodoros, acredita-se que os terpenoides sejam os principais responsáveis pelo aroma característico da espécie [26].

O perfil qualitativo e quantitativo de terpenoides em *C. sativa* é variável entre os quimiotipos [21] e fortemente influenciado pelas condições ambientais, bem como pelo processamento e armazenamento do material vegetal [26]. Entre os terpenoides comumente encontrados em *C. sativa*, destacam-se monoterpenos, como d-limoneno, β -mirceno, γ -terpinoleno, *cis*-ocimeno, linalool, α e β -pineno; e sesquiterpenos, como β -cariofileno, α -humuleno, α e δ -guaieno, α -bergamoteno, e óxido de cariofileno [21,26,39,41]. Sarma *et al.* (2020) reportam uma tendência de ocorrência de dominância ou codominância de alguns desses constituintes, observada a partir da análise de um conjunto extenso de amostras da espécie. Os autores relatam que a codominância envolve tipicamente os pares β -mirceno/d-limoneno, d-limoneno/ β -cariofileno e β -mirceno/ β -cariofileno, ou a tríade β -mirceno /d-limoneno / β -cariofileno [21].

1.3.3 Outros constituintes

Enquanto as inflorescências femininas de *C. sativa* são ricas em tricomas glandulares e, conseqüentemente, concentram os canabinoides e terpenoides acumulados nestes, outras partes da planta apresentam perfis fitoquímicos distintos, incluindo constituintes com potencial farmacológico ainda pouco explorado [26,42].

Diversos flavonoides já foram identificados na espécie, sendo encontrados principalmente nas partes aéreas, entre os quais se destacam as flavonas preniladas cannaflavina A, B e C; que são características da espécie [26,42].

Alcaloides como canabisativina e anidrocanabisativina, também característicos da espécie, já foram encontrados nas raízes da planta, porém, em concentrações consideradas baixas [26,42]. Também a partir das raízes foram isolados triterpenos como a friedelina e o epifriedelanol [42].

A complexidade do perfil de constituintes da espécie, bem como dos insumos vegetais obtidos a partir dela, aponta para a necessidade de utilização de condições controladas de cultivo, processamento e extração, a fim de assegurar a constância da composição dos insumos ativos vegetais obtidos [21,38].

1.4 Quimiotipos

A categorização dos indivíduos da espécie *C. sativa* em quimiotipos tem sido embasada no perfil de canabinoides majoritários, determinado por fatores genéticos. É relatada a existência de três quimiotipos predominantes, que diferem entre si quanto às concentrações absolutas e relativas de Δ^9 -THC e CBD, considerando também as suas respectivas formas carboxiladas [21,26]. Alguns autores consideram que o teor de CBN deve ser avaliado conjuntamente ao de Δ^9 -THC para fins de caracterização do quimiotipo, por se tratar de um produto de degradação deste [29], porém, este entendimento não é unânime.

O quimiotipo THC-dominante (I) abrange as variedades comumente utilizadas por suas propriedades psicotrópicas, sendo ainda proscrito na maioria dos países [43]. Esse quimiotipo tem potencial aplicação terapêutica em condições que requeiram a predominância dos efeitos do THC sobre receptores CB (*vide* seção 1.5). Já o quimiotipo intermediário (II) é caracterizado por apresentar teores semelhantes de Δ^9 -THC e CBD. Por fim, o quimiotipo CBD-dominante (III) abrange as variedades popularmente conhecidas como cânhamo, com potencial interesse comercial para obtenção de fibra, utilizada na indústria têxtil; e óleos, com aplicações nas indústrias cosmética e alimentícia [43]. Esse quimiotipo também possui potencial uso medicinal no tratamento de condições para as quais a predominância dos efeitos exercidos pelo CBD em relação aos do Δ^9 -THC seja requerida (*vide* seção 1.5). O cultivo de *C. sativa* do quimiotipo III é permitido em alguns países, sob condições controladas, dado o seu baixo potencial psicotrópico [29,43]. A legislação desses países determina um limite máximo para o teor de Δ^9 -THC para a droga vegetal [43]. Na União Europeia, esse limite é de 0,2% p/p, considerando a planta seca [43–45].

Outros quimiotipos menos comuns também são descritos, incluindo o perfil CBG-dominante, o THCV-dominante ou, ainda, o quimiotipo caracterizado pela

ausência de canabinoides em teores expressivos [21,26]. Como o conhecimento acerca das atividades farmacológicas desses canabinoides ainda é limitado se comparado ao Δ^9 -THC e ao CBD, o potencial de uso medicinal desses quimiotipos menos comuns ainda é pouco explorado (*vide* item 1.5).

A definição de critérios claros para delimitação dos quimiotipos supracitados, no entanto, não é um consenso [21]. Hillig e Mahlberg (2004) aplicaram métodos estatísticos para a avaliação de um conjunto de amostras representativo dos três quimiotipos predominantes, provenientes de diferentes cultivares [46], e observaram que as proporções entre as concentrações de Δ^9 -THC e CBD não se enquadravam nas faixas definidas pela UNODC [29]. Outros autores relataram valores distintos para as proporções desses canabinoides nos três quimiotipos predominantes [21,26,47] (Quadro 1). Apesar de não haver consenso quanto à delimitação dos quimiotipos, a proporção entre Δ^9 -THC e CBD tem sido considerada uma informação crítica, dada relevância para caracterização dos efeitos farmacológicos e toxicológicos da espécie [21].

Quadro 1: Classificação de *Cannabis sativa* quanto aos seus quimiotipos predominantes

Quimiotipo	Razão entre as concentrações de Δ^9 -THC e CBD			
	> 10	~ 50	>>1	≥ 5
I	> 10	~ 50	>>1	≥ 5
II	0,2-10	0,25-2	~1	0,2-5
III	< 0,2	< 0,2	< 1	≤ 0,2
Referência	[46]	[26,47]	[29]	[21]

1.5 Atividades farmacológicas e potenciais terapêuticos

A maioria dos efeitos biológicos de *Cannabis sativa* são relacionados à sua ação sobre o chamado “sistema endocanabinoide” (SEC) [42], que é composto pelos receptores canabinoides (CB); por seus ligantes endógenos (endocanabinoides), como a anandamida e o 2-araquidonoil glicerol, ambos derivados do ácido araquidônico; bem como pelas enzimas responsáveis pela biossíntese e inativação destes últimos [48,49]. Os componentes do SEC estão relacionados a diversos processos de neuromodulação e seu desequilíbrio pode estar associado ao desenvolvimento de distúrbios psiquiátricos como a esquizofrenia [49].

Os receptores CB são membros da superfamília de receptores acoplados à proteína G. Os primeiros receptores desse grupo a serem identificados foram os CB1, localizados predominantemente em células neuronais do sistema nervoso central; seguidos dos receptores CB2, localizados predominantemente em células do sistema imune e do sistema nervoso periférico [48,50,51]. Ambos CB1 e CB2 são acoplados à proteína $G_{i/o}$, cuja ativação leva à inibição da enzima adenilato ciclase, com consequente redução dos níveis de monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) intracelulares; bem como à ativação de MAP-quinases intracelulares e, no caso dos receptores CB1, de certos canais de cálcio dependentes de voltagem [48,49,51]. Estudos mais recentes têm apontado a existência de um terceiro tipo de receptor canabinoide (GPR55, também denominado CB3 por alguns autores), embora as funções dos endocanabinoides e possíveis efeitos dos fitocanabinoides sobre este receptor ainda necessitem ser melhor elucidados [51]. Acredita-se que este receptor atue principalmente por meio da ativação da proteína G_q , levando, portanto, à ativação da via da fosfolipase C/DAG /IP3, que resulta no aumento dos níveis de cálcio intracelulares [51].

Os mecanismos de atuação dos diferentes canabinoides sobre o SEC são variados, podendo envolver a atuação direta sobre receptores CB, ou ainda efeitos indiretos, por meio da modulação da atuação de endocanabinoides, resultando em diferentes perfis de efeitos farmacológicos [42,52,53]. Ademais, nas últimas décadas, outros efeitos farmacológicos mediados por mecanismos independentes do SEC têm sido reportados para diversos canabinoides [51–53].

1.5.1 Δ^9 -Tetraidrocannabinol (Δ^9 -THC)

O Δ^9 -THC é possivelmente o canabinoide cujos efeitos farmacológicos e clínicos são melhor caracterizados até então [42,54]. Essa substância atua como um agonista parcial dos receptores CB1 e CB2 (Quadro 2), sendo a sua atuação sobre o primeiro comumente relacionada aos efeitos psicotrópicos de *C. sativa* [4,52,53,55]. A atuação desse canabinoide sobre alvos fora do SEC, a exemplo de outros receptores acoplados à proteína G (GPR), ou de receptores

pertencentes a outras famílias, como PPAR, TRP e 5-HT₃¹ ; também já foi demonstrada *in vitro* [42,52,53] (Quadro 2).

Os efeitos terapêuticos mais conhecidos do Δ^9 -THC são aqueles relacionados ao seu potencial de reduzir efeitos adversos como náuseas e vômitos em pacientes submetidos à quimioterapia para tratamento de câncer, sendo que a nabilona (Cesamet[®]), um análogo sintético desse canabinoide, é aprovada pelo FDA para essa finalidade [4,34,55–57], embora revisões sistemáticas recentes tenham considerado que o nível de evidências que subsidiam essa indicação é fraco [58,59] (Figura 4). O dronabinol (Δ^9 -THC de origem sintética) também é aprovado pelo FDA como estimulante do apetite em casos de anorexia relacionada a HIV/AIDS [55,57] (Figura 4). Cabe mencionar, porém, que a demanda por essa alternativa terapêutica sofreu um decréscimo significativo nos últimos anos graças à disponibilidade de novos agentes antirretrovirais potentes; e que as evidências de eficácia do dronabinol como estimulante de apetite em outras condições patológicas não são suficientes [58]. Os mecanismos de ação envolvidos nos efeitos supracitados não estão completamente elucidados [22,55], embora acredite-se que a atuação do Δ^9 -THC sobre os receptores CB e 5-HT₃ possa estar envolvida [42,52].

Além dos efeitos sobre o sistema nervoso central, o Δ^9 -THC também apresenta atividades anti-inflamatória, analgésica, hepatoprotetora, antitumoral, relaxante muscular e antiespasmódica, conforme demonstrado por estudos não clínicos [39,42,56].

1.5.2 Canabidiol (CBD)

O CBD tem pouca atividade direta sobre os receptores canabinoides CB1 e CB2, mas é capaz de atuar como um modulador alostérico negativo de ambos [60,61] (Quadro 2), sendo capaz de minimizar os possíveis efeitos ansiogênicos e psicoativos associados à atuação do Δ^9 -THC sobre receptores CB1 [39,42,50,53,62]. Além disso, o CBD é capaz de inibir a recaptação de anandamida, bem como a sua degradação pela hidrolase de amidas de ácidos

¹ GPR: G-protein-coupled receptor; PPAR: peroxisome proliferator activated receptor; TRP: transient receptor potential; 5-HT: 5-hydroxytryptamine receptor.

graxos (FAAH, sigla em inglês), potencializando, assim, os efeitos deste endocanabinoide [53,55,61].

Este canabinoide também apresenta propriedades mediadas por mecanismos independentes do sistema endocanabinoide [4,42,50,55,60,61], incluindo efeitos agonistas sobre receptores de potencial transitório do tipo vaniloide (TRPV², sigla em inglês), e efeito agonista indireto sobre receptores 5-HT_{1A} [42,53,60,61] (Quadro 2).

Estudos não clínicos e clínicos demonstraram que o CBD apresenta atividades anticonvulsivante, analgésica, anti-inflamatória, antiemética, relaxante muscular, ansiolítica e antipsicótica [4,39,42,55,61], além de demonstrar potencial citotóxico para linhagens tumorais, sem afetar as células normais [39]. Destacam-se, ainda, os efeitos neuroprotetores desse canabinoide, provavelmente mediados pela sua capacidade de modular a concentração de cálcio intracelular por um mecanismo que envolve a ativação dos canais TRP [4,50,55].

Ademais, tendo em vista a atual conjuntura da pandemia de COVID-19 e seus impactos na saúde pública, cabe destacar que o potencial de uso do CBD para o tratamento dessa patologia tem sido explorado em estudos recentes. Nguyen *et al.* [63] concluíram que o CBD seria capaz de inibir a replicação do vírus SARS-CoV-2 tanto em células do epitélio pulmonar humano quanto em camundongos, propondo mecanismos relacionados à imunidade inata do hospedeiro [63]. Extratos ricos em CBD também se mostraram capazes de modular a expressão da ECA2, uma das proteínas envolvidas no processo de entrada do vírus na célula a ser infectada [64]. Apesar de promissores, esses resultados ainda necessitam ser confirmados por um número adequado de estudos clínicos adequadamente desenhados. Atualmente, existem alguns estudos clínicos em andamento voltados à avaliação da eficácia desse canabinoide no tratamento da COVID-19 e suas patologias relacionadas [61]. O potencial do CBD para tratamento de síndrome de *burn out* e exaustão emocional em profissionais de saúde atuantes na linha de frente da pandemia também foi investigado em um estudo clínico exploratório [65].

² Os receptores do tipo TRPV1, também conhecidos como receptores de capsaicina, são expressos em neurônios do SNC e neurônios nociceptores periféricos. Esses receptores são ativados pelo endocanabinoide anandamida, assim como por diversos fitocanabinoides, o que tem sido relacionado a um potencial efeito antinociceptivo em processos de dor neuropática [53].

O potencial de uso do CBD isolado na terapêutica da esquizofrenia também já foi demonstrado por meio de estudos clínicos, sendo essa atividade possivelmente relacionada à inibição da degradação e da recaptação de anandamida e à atuação sobre receptores 5-HT_{1A} e TRPV₁ [55,61,66]. Além disso, dados de estudos não clínicos e clínicos demonstram a eficácia de CBD na redução do número de crises em pacientes com epilepsia refratária, especialmente para os portadores das síndromes de Dravet e Lennox-Gastaut [6,57,58,61,67,68], o que embasou a aprovação do registro do medicamento Epidiolex[®] (canabidiol 100 mg/mL, solução oral) nos Estados Unidos [69] e, posteriormente, na União Europeia [70] como terapia adjuvante para essa indicação (Figura 4). Nessas duas situações, o CBD é geralmente considerado como uma opção terapêutica melhor quando comparado a outros insumos ativos obtidos a partir de *C. sativa* que contenham Δ^9 -THC, dados os potenciais efeitos indesejáveis deste último, que podem agravar o quadro patológico subjacente [4,19,55,62].

1.5.3 Outros canabinoides

Embora a farmacologia dos canabinoides minoritários tenha sido menos estudada em comparação ao Δ^9 -THC e ao CBD, sabe-se que algumas dessas substâncias apresentam atividades farmacológicas notáveis (*vide* Quadro 2), que podem contribuir para os efeitos terapêuticos de alguns tipos de extratos da espécie vegetal [53,54,71,72].

O Δ^8 -THC apresenta atividade agonista parcial sobre os receptores canabinoides CB1 e CB2 (Quadro 2), resultando em efeitos farmacológicos similares aos de seu isômero Δ^9 -THC. Dados sobre atividades desse canabinoide sobre receptores fora do SEC ainda são pouco comuns na literatura [53].

O THCA apresenta atividade agonista fraca sobre os receptores CB1 e CB2 (Quadro 2), porém, não apresenta os efeitos psicotrópicos análogos aos do seu produto de descarboxilação Δ^9 -THC *in vivo* [42]. O acesso do THCA, assim como de outros canabinoides ácidos, ao sistema nervoso central é limitado pela barreira hematoencefálica, o que pode explicar, ao menos em partes, a não observação de efeitos psicotrópicos, ainda que esse canabinoide apresente potencial efeito agonista sobre os receptores CB1 [42]. A capacidade do THCA de modular a

disponibilidade de endocanabinoides também foi observada [42]. Além disso, esse canabinoide apresentou atividade antiemética em modelos animais, provavelmente mediada por receptores CB. Foi demonstrado que esse efeito não é relacionado à formação do Δ^9 -THC [42]. O potencial de atuação sobre alvos fora do SEC, como a modulação de canais TRP, a inibição de enzimas ciclooxigenases e da liberação de mediadores inflamatórios como o TNF- α , também já foi demonstrada [42]. Estudos não clínicos têm apontado para o potencial imunomodulatório, antiinflamatório, antitumoral e neuroprotetor do THCA [26,42]. A melhor compreensão dos aspectos farmacológicos desse canabinoide é de grande relevância, dado o fato de ser o canabinoide majoritário em muitos insumos ativos obtidos a partir de *C. sativa* comumente presentes em produtos utilizados por via oral, condição em que a descarboxilação não é significativa [26,73–75].

O CBDA apresenta atividades sobre diversos canais TRP, mesmo em baixas concentrações. Em concentrações mais altas, esse canabinoide é capaz de inibir enzimas responsáveis pela degradação de endocanabinoides[42]. A capacidade de inibição das ciclooxigenases 1 e 2 também já foi relatada. Além disso, o CBDA possui efeito agonista sobre receptores 5-HT_{1A} (Quadro 2), sendo relatada maior afinidade em comparação com o seu correspondente neutro CBD [42]. Estudos *in vivo* apontaram potenciais efeitos antieméticos desse canabinoide [42].

O CBG, apresenta afinidade pelos receptores CB1 e CB2 [39,53,71], sendo seu efeito relatado como agonista parcial fraco [42] ou antagonista competitivo de CB1 [71] e agonista parcial de CB2 [72]. Esse canabinoide também é capaz de atuar em alvos fora do SEC, mostrando-se um agonista potente de receptores α 2-adrenérgicos e um antagonista moderado de receptores 5-HT_{1A} [42,53,71,72] (Quadro 2). O seu potencial de inibição de recaptção da noradrenalina também foi relatado pelos mesmos autores [71]. Em concentrações relativamente elevadas, o CBG mostrou-se capaz de inibir a recaptção de GABA [39]. Além disso, foram relatados efeitos de ativação sobre diversos receptores da família TRP e de inibição sobre receptores PPAR γ [42] (Quadro 2). O potencial citotóxico desse canabinoide para algumas linhagens de células tumorais também foi demonstrado experimentalmente [39,42]. O CBG também apresenta atividades analgésica, anti-hipertensiva, neuroprotetora e antidepressiva *in vivo*, bem como atividade inibitória sobre a proliferação de queratinócitos humanos [39,42,71,72]. Efeitos psicotrópicos não foram observados para esse canabinoide [42].

Por sua vez, o CBC apresenta alguma atividade agonista sobre receptores CB2, mas não sobre CB1[42]. Esse canabinoide também apresenta atividade agonista sobre receptores do tipo TRP [42,53] (Quadro 2), além de ser capaz de inibir a recaptção da anandamida [53]. O CBC apresentou atividades anti-inflamatória e analgésica em modelos *in vivo*; possivelmente por mecanismos independentes do SEC, como a atuação em receptores TRP; sendo capaz de potencializar os efeitos analgésicos do THC [42], bem como de reduzir efeitos tóxicos deste em camundongos [39]. Outras atividades, como antibiótica e antifúngica, também foram relatadas [39]

A tetraidrocanabivarina (THCV) apresenta afinidade pelos receptores CB, agindo como um antagonista dos receptores CB1 em baixas doses, e como agonista desses mesmos receptores em doses mais elevadas [39,50,53], sendo capaz de modular os efeitos do Δ^9 -THC [39,71]. Esse canabinoide também atua como agonista parcial dos receptores CB2 [50] (Quadro 2). Estudos *in vivo* também indicaram que esse canabinoide apresenta atividades anticonvulsivante, analgésica, anti-inflamatória, e antiobesidade [39,50,71].

Já a canabidivarina (CBDV) apresenta potencial de modulação da disponibilidade de endocanabinoides por meio das atividades das enzimas DAG-lipase e Amilase ácida hidrolisante de N-aciletanolamina (NAAA, sigla em inglês), além de ser capaz de inibir a recaptção de anandamida [42]. A atuação desse canabinoide sobre receptores do tipo TRP também já foi relatada [42,53] (Quadro 2). A CBDV apresenta atividade anticonvulsivante marcante, comparável àquela do seu análogo CBD em algumas condições [39,42].

Por fim, o CBN, um produto da oxidação do Δ^9 -THC, apresenta afinidade baixa por receptores canabinoides, tendo maior afinidade pelos receptores CB2 [53]. Alguns autores relatam que o CBN mantém cerca de 1/4 da potência do Δ^9 -THC sobre os receptores canabinoides [42] (Quadro 2). Apesar de atividades sobre os receptores canabinoides terem sido demonstradas *in vitro* [53], o CBN não apresentou efeitos psicotrópicos quando administrado isoladamente a voluntários humanos [39]. Porém, quando administrado em conjunto com o Δ^9 -THC, foi capaz de potencializar o efeito sedativo deste [39]. O CBN também apresentou efeito agonista dos receptores TRPV2, TRPA1, e antagonista de TRPM8 [53] (Quadro 2), e mostrou-se capaz de inibir a proliferação de queratinócitos de forma independente dos efeitos sobre receptores CB, tendo

potencial utilidade no tratamento de queimaduras [39]. O potencial de inibição de diversas enzimas, incluindo ciclooxigenases e lipooxigenases, também foi relatado [42]. Esse canabinoide apresentou atividades anti-inflamatória, sedativa e anticonvulsivante em modelos animais, sendo que a atividade anticonvulsivante foi demonstrada também em humanos [42].

Quadro 2: Resumo das atividades relatadas para os principais canabinoides sobre diferentes receptores e alvos farmacológicos. Fonte: Elaborado pela autora a partir de dados da literatura [42,51,53,60,61,72,76,77].

	Alvo	Δ^9 -THC	Δ^8 -THC	THCA	CBN	THCV	CBD	CBDA	CBDV	CBG	CBC
Receptores acoplados à proteína G	CB ₁	↑	↑	↑	↑	↓	↘			↓	
	CB ₂	↑	↑	↑	↑	↑	↘			↑	↑
	α_7									↑	
	5-HT _{1A}					↗	↑	↑		↓	
	GPR55 (CB3)	↑					↓		↓		
	GPR18	↑									
	D2						↑				
Canais de íons mediados por ligante	5-HT _{3A}	↓					↘				
	GABA _A						↓				
Canais de cátions ativados por voltagem	TRPA1	↑		↑	↑		↑	↑	↑	↑	↑
	TRPV1					↑	↑	↑	↑	↑	
	TRPV2	↑			↑		↑		↑		↓
	TRPV3	↑				↑	↑		↓		↑
	TRPV4	↑				↑	↑		↓	↑	↑
	TRPM8	↓		↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	
Outros receptores	PPAR γ	↑		↑		↑				↑	
Outros alvos	eNOS						●				
	iNOS									●	
	COX-1	●		●				●		●	
	COX-2	●		●				●		●	
	PLA2									●	
	AchE	●									

↑ Agonista ou agonista parcial

↓ Antagonista

↗ Modulação positiva

↘ Modulação negativa

↓ Dessensibilização (após ativação)

● Redução da expressão

● Inibição

PPAR γ : Peroxisome proliferator- activated receptor gamma

TRPA1: Transient receptor potential ankyrin 1

TRPM8: Transient receptor potential melastatin 8

TRPV: Transient receptor potential vanilloid

GPCR55: G protein-coupled receptor 55 IP3

GABA_A: γ -aminobutyric acid type A (GABA_A) receptor

D2: Dopamine receptor 2

1.5.4 Extratos e canabinoides em associação

O potencial de uso de *C. sativa* e de canabinoides isolados ou em associação no tratamento da dor crônica, especialmente de origem neuropática, já foi demonstrado [55,58], embora as evidências clínicas de eficácia para essa indicação ainda sejam limitadas [58] (Figura 4).

Uma série de estudos não clínicos e clínicos demonstraram, ainda, que Δ^9 -THC e CBD em associação (Nabiximols[®]) são capazes de reduzir a espasticidade e a dor neuropática relacionadas à esclerose múltipla (EM) [4,55,57] e de promover melhoras de alguns indicadores relacionados à dor crônica refratária em pacientes oncológicos em estágio avançado [7,39,59]. De acordo com revisões sistemáticas recentes dos estudos clínicos conduzidos com essa associação, o nível de evidência em relação a essas indicações é considerado moderado [58,59] (Figura 4), embora a magnitude do efeito terapêutico tenha sido descrita como modesta [58]. Acredita-se que a modulação do sistema imune, por meio da atuação do Δ^9 -THC sobre receptores CB2, seja um dos mecanismos envolvidos na melhora sintomática dos pacientes com EM [55]. O potencial de modulação do componente psicológico da dor parece também estar envolvido no alívio desse sintoma relatado pelos pacientes [4]. Atualmente, um medicamento contendo uma associação de Δ^9 -THC (27 mg/mL) e CBD (25 mg/mL) em solução spray (Mevatyl[®]/Sativex[®]) tem seu registro aprovado em diversos países, inclusive no Brasil, para o tratamento sintomático da espasticidade relacionada à esclerose múltipla [16].

Apesar da plausibilidade farmacológica e da existência de relatos clínicos favoráveis ao uso de produtos obtidos a partir de *C. sativa* no tratamento de uma série de outras condições patológicas, incluindo distúrbios neurológicos e psicológicos, como ansiedade, transtorno do estresse pós-traumático, transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) e depressão; distúrbios neurodegenerativos, como a esclerose lateral amiotrófica (ELA) e as doenças de Parkinson e Alzheimer; e distúrbios inflamatórios intestinais e cuidados paliativos de pacientes oncológicos, os estudos clínicos referentes a essas alegações terapêuticas são, em sua maioria, de baixa qualidade ou mesmo ausentes [57,58,78] (Figura 4). Portanto, faz-se necessária a condução de estudos clínicos

bem desenhados, envolvendo extratos e produtos adequadamente caracterizados, a fim de confirmar a eficácia destes para as condições supracitadas.

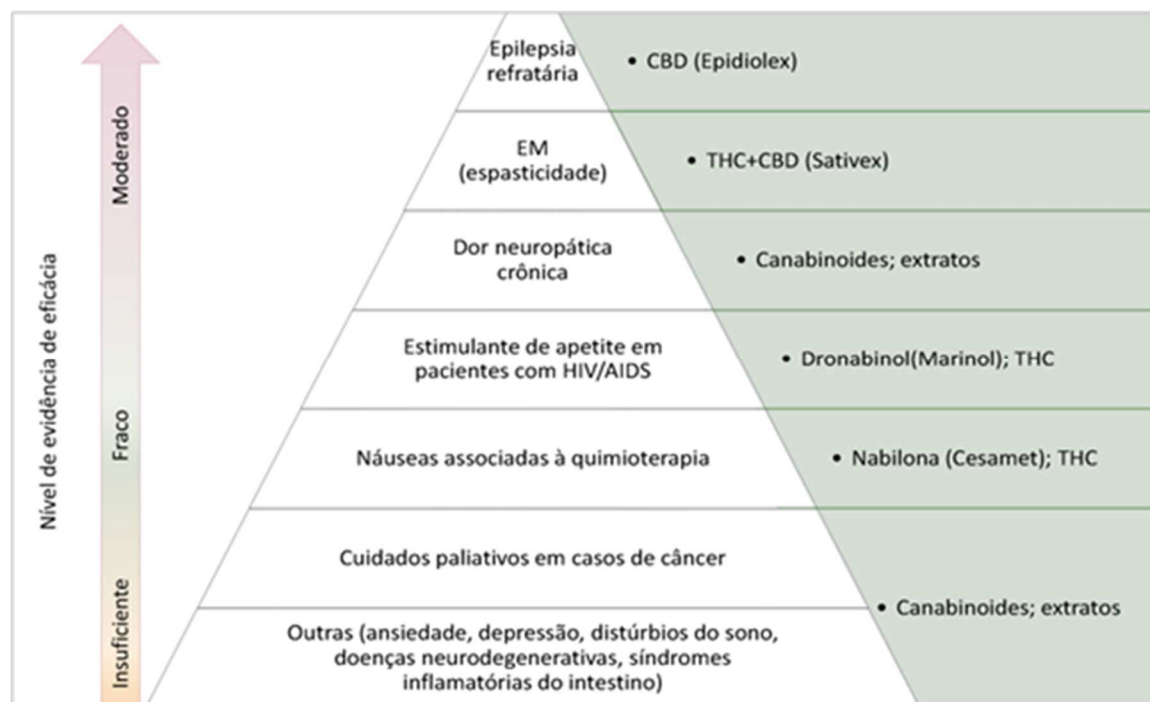


Figura 4: Principais alegações terapêuticas de *C. sativa* e seus derivados relacionadas na literatura agrupadas segundo os níveis das evidências de eficácia que as suportam. EM: Esclerose múltipla. A qualidade das evidências clínicas existentes é bastante variável, a depender do tipo de produto e da indicação em questão, sendo que as condições patológicas para as quais existem evidências satisfatórias de eficácia de medicamentos obtidos a partir da espécie ainda são restritas, apesar de relevantes. Fonte: Elaborado pela autora a partir de informações da literatura [6,16,55,57–59,61,67,68,78].

Cabe ressaltar, ainda, que o potencial de interação entre Δ^9 -THC e CBD, bem como de modulação dos efeitos destes por outros canabinoides minoritários, torna complexa a interpretação dos resultados dos estudos conduzidos com extratos obtidos a partir de *C. sativa* [4,21]. Além disso, dados experimentais sugerem a existência de interações farmacológicas, incluindo efeitos sinérgicos, envolvendo diferentes canabinoides e substâncias de outras classes encontradas na espécie vegetal, como os terpenoides, embora os mecanismos envolvidos ainda necessitem ser melhor elucidados [4,39,79].

Entre os metabólitos secundários de outras classes com potencial contribuição para os efeitos farmacológicos de *C. sativa*, destaca-se o β -cariofileno, um dos terpenoides majoritários na espécie. Além de ser conhecida por suas atividades analgésica e anti-inflamatória, essa substância apresenta efeito agonista sobre receptores CB2, mas não sobre CB1, [39,80], o que tem sido

relacionado a um potencial de promover efeitos analgésicos sem causar os efeitos psicoativos indesejados dos agonistas CB1 [80]. Por sua vez, o óxido de cariofileno, formado a partir da oxidação do β -cariofileno, não apresenta afinidade por receptores canabinoides, embora apresente atividades analgésica e anti-inflamatória mediadas por outras vias [80].

Cabe ressaltar, porém, que, apesar da plausibilidade biológica de algumas interações entre canabinoides e terpenoides (também chamada de efeito *entourage*) ter sido apontada por estudos não clínicos [79], as evidências clínicas que suportam essa alegação ainda são insuficientes. À parte isso, destaca-se a importância de monitoramento de outros constituintes da espécie, além dos canabinoides majoritários (Δ^9 -THC e CBD), em insumos e produtos obtidos a partir de *C. sativa* a fim de assegurar a constância da qualidade e dos efeitos farmacológicos esperados [4].

1.5.5 Perfil de segurança e efeitos adversos

Entre os principais efeitos adversos associados ao uso em curto prazo de medicamentos contendo *C. sativa* ou derivados, destacam-se sonolência, tontura, desorientação, euforia e boca seca, com efeitos adversos graves raramente relatados em estudos clínicos [58,81,82]. Assim, o perfil de segurança desses produtos pode ser considerado satisfatório, sendo análogo ao de outros medicamentos disponíveis comercialmente para uso em condições semelhantes. Por outro lado, os riscos de longo prazo são menos conhecidos, sendo necessários mais estudos clínicos para gerar evidências suficientes [58,81].

Nesse contexto, cabe mencionar os riscos associados ao uso de longo prazo de produtos contendo teores de Δ^9 -THC notavelmente superiores aos de CBD, entre os quais destaca-se o aumento do risco de desenvolvimento de transtornos psiquiátricos, incluindo esquizofrenia, principalmente em indivíduos susceptíveis; além do potencial de causar dependência e de contribuir para o desenvolvimento de deficiências cognitivas, especialmente em crianças e adolescentes, cujo sistema nervoso central ainda está em desenvolvimento [19,57,81–83]. Além disso, efeitos adversos cardiovasculares potencialmente graves em pacientes portadores de fatores de risco têm sido reportados para produtos contendo Δ^9 -THC, o que sinaliza a necessidade de cautela nesses casos [82]. Em razão disso,

abordagens de definição de posologia por titulação lenta de doses têm sido indicadas como forma de evitar efeitos adversos, especialmente para produtos contendo Δ^9 -THC [82].

Diante do exposto, evidencia-se a necessidade de condução de um número maior de estudos clínicos de boa qualidade metodológica, abrangendo a diversidade de medicamentos à base de *C. sativa* e seus derivados, para validar cientificamente grande parte das alegações terapêuticas comumente relatadas, bem como para elucidar melhor o perfil de segurança da espécie e de seus constituintes [54,58,81,84]. Ademais, a definição de diretrizes que subsidiem a escolha das melhores alternativas terapêuticas entre os diferentes produtos disponíveis, bem como a definição das doses e esquemas posológicos mais adequados a cada indicação terapêutica, respeitando as variabilidades individuais dos pacientes, ainda são desafios para pesquisadores, médicos, e autoridades governamentais envolvidas na elaboração de políticas públicas referentes ao acesso a *C. sativa* para fins medicinais [4,58].

2 Métodos analíticos e parâmetros de qualidade aplicados à *Cannabis sativa*

A crescente demanda por produtos obtidos a partir de *C. sativa* para uso medicinal tem colocado em evidência a necessidade de definição de parâmetros adequados de identidade, teor e pureza, a fim de prevenir os riscos associados à exposição dos pacientes a produtos de baixa qualidade, adulterados ou contaminados [21]. Além disso, a padronização de atributos de qualidade, aplicada no contexto das Boas Práticas de Fabricação, é etapa fundamental para assegurar a congruência dos resultados observados em diferentes estudos não clínicos e clínicos, bem como a reprodutibilidade dos efeitos terapêuticos entre diferentes lotes [85].

Dessa forma, uma série de métodos analíticos quantitativos ou qualitativos aplicados a amostras vegetais de *C. sativa* têm sido desenvolvidos de forma a atender à demanda supracitada [86]. Nesse sentido, cabe destacar o desenvolvimento de algumas monografias de qualidade referentes à *C. sativa*, incluindo a monografia da Farmacopeia Alemã [87] e as especificações de qualidade adotadas oficialmente pelas Agências ou órgãos governamentais

responsáveis pela *Cannabis* medicinal na Holanda [88], na Dinamarca [89] e na Nova Zelândia [90]. A monografia publicada pela *American Herbal Pharmacopoeia* (AHP) [26] também é uma referência comumente utilizada, principalmente no âmbito dos Estados Unidos.

Para os insumos de *Cannabis*, assim como para outros insumos farmacêuticos vegetais, é necessário que os métodos e especificações envolvam aspectos críticos como a identificação do material, incluindo a diferenciação de espécies semelhantes ou adulterantes conhecidos; a determinação quantitativa dos canabinoides majoritários, dada a sua relevância para o perfil farmacológico; e o monitoramento de impurezas e contaminantes, como micro-organismos, metais pesados, micotoxinas e resíduos de agrotóxicos [21,91]. Diversas abordagens analíticas são possíveis para atender a esses objetivos, porém, é necessário que os métodos desenvolvidos provem ser adequados à finalidade pretendida [21,86].

2.1 Métodos de extração e preparo de amostra

O preparo da amostra é uma etapa crítica para a análise de materiais vegetais, uma vez que o perfil de constituintes que serão disponibilizados para as etapas analíticas seguintes pode ser significativamente influenciado pelas características do processo extrativo, tanto do ponto de vista qualitativo quanto quantitativo [86,92,93]. A escolha da técnica de extração e das condições experimentais deve levar em consideração fatores como a natureza da amostra, as características físico-químicas dos analitos de interesse, a compatibilidade com as etapas analíticas posteriores e os objetivos do método analítico como um todo [92].

Em relação às amostras de inflorescências de *C. sativa*, a maioria dos métodos de preparo reportados na literatura envolve extrações líquido-sólido [86], destacando-se a extração assistida por ultrassom (UAE, sigla em inglês), utilizada nos métodos preconizados nas monografias de *Cannabis sativa* (*Cannabis flos*) da Farmacopeia Alemã (*draft*) [87] e da American Herbal Pharmacopoeia [26]; bem como no guia publicado pelo United Nations Office on Drugs and Crime [29]. Essa técnica apresenta a vantagem de proporcionar extrações relativamente rápidas, geralmente com bom rendimento e baixo consumo de solvente [94]. Além disso,

considerando a necessidade de monitoramento tanto dos canabinoides neutros quanto de seus correspondentes ácidos (carboxilados), dados os seus perfis farmacológicos distintos (*vide* item 1.5), é desejável que sejam evitadas condições extrativas que envolvam exposição a temperaturas muito elevadas devido ao risco de ocorrência de reações de descarboxilação. Quanto aos solventes utilizados, os mais comuns são solventes orgânicos polares ou moderadamente polares, como etanol, metanol, acetato de etila ou clorofórmio, ou misturas destes, devido à sua capacidade de extração tanto dos canabinoides ácidos quanto dos neutros [86]. Outros métodos extrativos, a exemplo das extrações com CO₂ supercrítico, também são relatados como alternativas capazes de promover uma boa recuperação tanto de canabinoides quanto de terpenoides, utilizando condições que preservam a estabilidade dos analitos fotossensíveis e termolábeis presentes nas amostras da espécie [86].

2.2 Identificação

As abordagens mais comuns utilizadas para identificação de amostras de inflorescências de *C. sativa* envolvem um conjunto de testes, incluindo a caracterização botânica do material do ponto de vista macroscópico e microscópico e a determinação do quimiotipo por meio de testes cromatográficos voltados à avaliação do perfil de constituintes característicos da espécie [21,26,29]. Cabe ressaltar que o conjunto de testes de identificação deve ser capaz de assegurar a autenticidade do material, diferenciando-o de espécies relacionadas que possam ser usadas como adulterantes ou substituintes [21].

As análises macroscópicas de identificação botânica são aplicáveis às amostras íntegras (não cominuídas), que permitam a observação dos aspectos morfológicos característicos da espécie (*vide* item 1.2 e Capítulo 2) [21,29]. As análises microscópicas, por sua vez, são também aplicáveis a materiais cominuídos, incluindo amostras pulverizadas. Nesse caso, a observação da morfologia dos tricomas glandulares desempenha um papel importante para caracterização da espécie, podendo auxiliar a sua diferenciação de espécies semelhantes [29,95].

Para amostra de materiais submetidos a algum tipo de processamento que inviabilize a realização de testes de identificação botânica, a caracterização do

perfil de constituintes, em especial o de canabinoides, torna-se ainda mais crítica para embasar a autenticação do material [21,29].

Entre as técnicas cromatográficas mais utilizadas para monitoramento do perfil qualitativo ou semiquantitativo de canabinoides, necessário à caracterização do quimiotipo, destaca-se a cromatografia em camada delgada (TLC, sigla em inglês) [21,26,29,86]. Entre as principais vantagens dessa técnica estão a rapidez, o baixo custo relativo e a possibilidade de análise de várias amostras em paralelo [96]. No entanto, os métodos tradicionais, por serem majoritariamente manuais, são sujeitos à interferência de uma série de variáveis experimentais de difícil controle, incluindo temperatura, umidade e saturação da câmara de eluição, o que se reflete em problemas de reprodutibilidade [86,97]. Além disso, a resolução de analitos estruturalmente semelhante pode não ser alcançada devido às limitações de modo de eluição (isocrático) e às características da fase estacionária.

Muitas dessas limitações podem ser contornadas com a aplicação da cromatografia em camada delgada de alta eficiência (HPTLC, sigla em inglês), caracterizada pelo emprego de fases estacionárias com menor espessura (<150µm) e tamanho de partícula reduzido (<10µm), além de instrumentos que permitem a automatização de etapas analíticas como aplicação de amostra, eluição e detecção [96]. A aplicação de métodos ortogonais envolvendo técnicas cromatográficas distintas, como HPLC-DAD, também é uma abordagem útil para contornar as limitações da TLC, permitindo obter informações complementares entre si quanto ao perfil de constituintes das amostras de interesse.

Diversos métodos voltados ao monitoramento de canabinoides em amostras de *C. sativa* ou seus derivados, envolvendo tanto técnicas de TLC tradicional quanto de HPTLC, são descritos na literatura [21,26,29,98–101], sendo objeto de um artigo de revisão específico [99]. São reportadas diferentes condições cromatográficas, envolvendo fases estacionárias normais, como a sílica gel, ou reversas, como C-18; e diferentes sistemas eluentes e reveladores (Quadro 3) [21,29,99]

A separação dos canabinoides neutros Δ^9 -THC, Δ^8 -THC, CBN e CBD em sistemas de TLC tradicionais tem sido considerada complexa, nem sempre proporcionando resultados satisfatórios [101]. Nesse sentido, sistemas envolvendo o uso de fase reversa (C-18) têm sido relatados como mais eficientes para a resolução de alguns conjuntos de canabinoides [99]. Porém, as placas

cromatográficas de fase reversa apresentam custo mais elevado em relação às placas convencionais de sílica, o que torna necessária a avaliação da relação custo-benefício, considerando os objetivos da análise e os recursos disponíveis.

Quanto aos sistemas reveladores, os mais comumente utilizados são Vanilina sulfúrica SR e Anisaldeído SR, considerados universais, ou um agente derivarizante obtido a partir do sal Fast Blue B, considerado específico para canabinoides (Quadro 3). Enquanto o uso de reveladores universais pode ser vantajoso no sentido de possibilitar o monitoramento de constituintes de outras classes que sejam relevantes para a qualidade do material vegetal, o uso do revelador específico pode proporcionar informações adicionais, já que podem ser obtidos sinais de coloração distinta conforme as características estruturais do canabinoide avaliado, permitindo a confirmação da atribuição de sinais cromatográficos em determinadas condições. Nesse sentido, a condução de análises paralelas, utilizando sistemas reveladores distintos, é uma abordagem comumente utilizada [29,100] a fim de se obter o máximo possível de informações a partir dos resultados do teste. No entanto, cabe observar que o uso do Fast Blue B requer cuidados adicionais devido à sua toxicidade, ressaltando-se seu potencial carcinogênico [86,102], devendo ser evitado se possível.

A Farmacopeia Alemã, nas monografias referentes à droga vegetal (inflorescências) [87] e aos extratos obtidos a partir de *C. sativa* [103], recomenda um método por cromatografia em camada delgada com fase reversa (C-18) com revelação por Vanilina sulfúrica SR como um dos testes de identificação. Porém, no caso da droga vegetal, o teste envolve a utilização de padrões de referência de CBD e THCA apenas. Por sua vez, a monografia referente aos extratos de *C. sativa* preconiza a utilização de soluções de referência de CBN, CBD e Δ^9 -THC, apenas. As especificações propostas nessas monografias não favorecem a identificação de outros canabinoides relevantes nos cromatogramas das amostras de interesse.

A monografia da espécie vegetal publicada na American Herbal Pharmacopoeia (AHP) também preconiza um teste de identificação por cromatografia em camada delgada com fase reversa, utilizando condições bastante semelhantes ao teste preconizado na Farmacopeia Alemã, com revelação por Vanilina sulfúrica ou Fast Blue B [26]. Porém, nessa monografia,

outros canabinoides têm seus valores típicos de R_f informados, permitindo a identificação de um maior número de constituintes no cromatograma da amostra.

Um outro método por HPTLC em fase reversa, bastante semelhante aos dois supracitados, foi proposto por um painel de especialistas da Farmacopeia dos Estados Unidos [21]. Assim como no caso do método indicado pela AHP, os valores típicos de um conjunto maior de canabinoides são informados, permitindo a caracterização qualitativa do perfil de canabinoides das amostras avaliadas de forma mais completa.

A UNODC, por sua vez, preconiza a realização do teste de identificação por TLC em fase normal (sílica), apresentando três sistemas eluentes alternativos, com níveis diferentes de polaridade [29]. A monografia de inflorescências de *C. sativa* adotada oficialmente na Holanda [88] preconiza a utilização de um dos métodos recomendados pela UNODC para monitoramento do perfil de canabinoides. Outros métodos de TLC em fase normal são descritos na literatura, envolvendo geralmente sistemas eluentes compostos majoritariamente por hexano [104] ou clorofórmio [98,100]. O número de canabinoides identificados é variável conforme o sistema utilizado.

A possibilidade de detecção de outros grupos de constituintes de *C. sativa* por TLC, como os terpenoides, é ainda pouco mencionada na literatura [99]. Nesse caso, as condições analíticas envolvem o uso de fase estacionária polar (sílica gel 60) e sistemas eluentes de baixa polaridade, com agentes derivatizantes universais (Quadro 3).

Quadro 3: Métodos analíticos voltados ao monitoramento do perfil de canabinoides por cromatografia em camada delgada

Fase móvel	Fase estacionária	Revelador	Analitos/ padrões ³	Referência
Metanol: Água: Ácido acético 99% (70:15:15)	C-18	Vanilina sulfúrica SR	Canabinoides/ CBD, Δ^9 -THC	[87,103]
Metanol: Água: Ácido acético 99% (80:10:10)	C-18	Vanilina sulfúrica SR	Canabinoides/ CBD, Δ^9 -THC	[21]
Metanol: Ácido acético 0,1% (75:25)	C-18	Vanilina sulfúrica SR Fast Blue B	CBC, Δ^9 -THC, CBN, CBG, CBD, THCV, THCA, CBDA	[26]
A) Éter de petróleo 60/90: Éter etílico (80:20)	Sílica gel 60	Fast Blue B ⁴	CBN, Δ^9 -THC, CBD, THCA, CBDA	[29,88]
Cicloexano: Éter isopropílico: Dietilamina (52:40:8)	Sílica gel 60	Fast Blue B ⁴	CBN, Δ^9 -THC, CBD, THCA	[29]
Hexano: Dioxana: Metanol (70: 20:10)				
Hexano: éter etílico (80:20); Hexano: dioxana (90:10)	Sílica gel 60	Fast Blue B + NaOH	Canabinoides/ Timol (1mg/mL) e Δ^9 -THC (200 μ g/mL)	[104]
Clorofórmio	Sílica gel 60 (HPTLC)	Fast Blue B	CBD, Δ^9 -THC, Δ^8 -THC, CBN, THCV, CBG e CBC	[98]
A) Metanol: Ácido acético (19:1) B) Clorofórmio: Metanol (19:1)	A) C-18; B) Sílica gel 60 (F254)	Anisaldeído; Fast Blue B + NaOH; UV 254 nm	CBDA, CBGA, CBG, CBD, CBN, Δ^9 -THC, Δ^8 -THC, THCA, CBC, CBCA	[100]
Heptano: éter etílico: ácido fórmico (75:25:0.3)	Sílica gel 60 (HPTLC)	Fast Blue B	CBN, Δ^9 -THC, CBD, THCA	[105]
Tolueno: acetato de etila (95:5)	Sílica gel 60	Anisaldeído	Terpenoides/ linalool, mirceno	[99]
Cicloexano: acetona (1:1)	Sílica gel 60	Vanilina SR	Terpenoides	[106]

³ O volume de aplicação é dependente das concentrações das soluções dos padrões e amostras, sendo que a maioria das referências preconiza a aplicação de volumes da ordem de 5 μ L

⁴ 50 mg em 20 ml de NaOH 0.1 N ou em 1 ml de água + 20 ml de metanol (adicionados em seguida)

2.3 Teor

As análises quantitativas aplicadas a amostras de *C. sativa* de grau farmacêutico e seus derivados têm sido principalmente voltadas à determinação dos canabinoides majoritários, dada a sua relevância para caracterização dos quimiotipos da espécie e contribuição para o perfil farmacológico observado [21]. Diversos métodos analíticos com essa aplicação são reportados na literatura, sendo objetos de alguns trabalhos de revisão [35,86,107,108]. No entanto, o número de publicações que relatam a condução de estudos de validação em conformidade com os guias atuais pertinentes à indústria farmacêutica é reduzido.

Entre as diferentes técnicas cromatográficas passíveis de serem utilizadas para essa finalidade, destacam-se a cromatografia em fase gasosa (GC, sigla em inglês), principalmente associada a detectores de ionização em chama (FID, sigla em inglês) ou espectrometria de massas (MS, sigla em inglês); e a cromatografia em fase líquida (LC, sigla em inglês), principalmente associada a detectores de ultravioleta (UV) ou arranjo de diodos (DAD, sigla em inglês), ou ainda à espectrometria de massas [21,26,35,86,107].

Entre as técnicas supracitadas, a LC apresenta algumas vantagens, entre as quais destacam-se a baixa probabilidade de degradação dos analitos, devido às condições mais brandas de análise em relação à GC, e a possibilidade de determinação direta dos canabinoides ácidos, sem a necessidade de etapas de derivatização, o que possibilita a obtenção de resultados que refletem melhor o perfil de constituintes da amostra [21,26,35,86]. No entanto, devido à semelhança estrutural de alguns canabinoides, a resolução completa de alguns pares, como CBD/CBG, CBDA/CBGA e Δ^9 -THC/ Δ^8 -THC, pode ser difícil de ser alcançada [86,109]. Cabe observar que, como os espectros de absorção no UV-visível são praticamente idênticos entre os componentes dos pares supracitados, essas coeluições não são passíveis de serem resolvidas com o uso de detectores DAD [109], o que torna necessária a utilização de estratégias de desenvolvimento analítico apropriadas a fim de se obter métodos seletivos utilizando esse tipo de detector.

O uso de detectores por espectrometria de massas pode proporcionar níveis satisfatórios de seletividade, mesmo que a resolução cromatográfica dos analitos de interesse não tenha sido completamente alcançada, porém, o alto custo

envolvido na aquisição desse tipo de equipamento, associado à maior complexidade de operação, tornam a sua aplicação mais limitada em análises de rotina [86,109]. O uso de sistemas de cromatografia em fase líquida de ultra-eficiência (UPLC, sigla em inglês), em substituição aos sistemas tradicionais de HPLC, também tem sido uma estratégia utilizada para possibilitar a obtenção de uma separação satisfatória dos canabinoides de interesse em intervalos de tempo menores, embora essa abordagem também acarrete um custo adicional de análise [86,108],

A maioria dos métodos para quantificação de canabinoides por LC descritos na literatura envolve a utilização de fases estacionárias do tipo C-18 [35,86,108]. O uso de colunas com partículas de núcleo sólido com revestimento poroso e diâmetro reduzido tem sido relatado como uma estratégia útil para contornar as dificuldades analíticas supracitadas por proporcionar uma melhor resolução entre pares críticos de canabinoides se comparadas às partículas porosas convencionais de 5 μ m [86]. Em relação aos sistemas eluentes, a maioria dos métodos descritos relata a utilização de eluição em gradiente, já que o modo isocrático dificilmente permite alcançar uma separação adequada entre todos os analitos de interesse em um tempo de análise razoável [86]. Observa-se ainda que o pH da fase móvel é capaz de interferir nos tempos de retenção relativos dos canabinoides ácidos, mas não dos canabinoides neutros. Em razão disso, a maioria dos métodos propostos utiliza sistemas tamponantes ou agentes modificadores de pH, de forma a controlar esse fator e evitar alterações indesejadas dos tempos de retenção desses analitos [86]. Alguns métodos voltados à determinação do teor de canabinoides por LC publicados em monografias de inflorescências *C. sativa* para fins medicinais ou documentos análogos são listados no Quadro 4.

Quadro 4: Métodos aplicáveis à determinação do teor de canabinoides em inflorescências de *Cannabis sativa* por cromatografia em fase líquida

Coluna	Fase móvel/ modo de eluição	Configurações	Deteção	Padrões/ analitos	Faixa de concentração	Referência
C18, (150 x 4,6 mm, 3,0 µm) + pré-coluna	A) Solução aquosa de ácido fosfórico (8,64 g/L); B) Acetonitrila Eluição gradiente: 0-35 min, 65-70% B; 35-37 min, 70-80% B; 37-40 min, 80% B; 40-42 min, 80-65% B, 42-45 min 65% B	Volume de injeção: 20 µL Temperatura: 40°C; Fluxo: 1,0 ml/min	DAD (225 e 306 nm)	CBD, Δ ⁹ -THC, Δ ⁸ -THC, THCA, CBDA, CBN	1 a 50 µg/mL	[87]
Waters XTerra [®] MS C18 (5µm, 250 x2.1 mm); pré-coluna: Waters XTerra [®] MS C18 (5µm, 10 x 2.1mm)	A) Metanol B) Tampão formiato de amônio 50mM (pH 5,19). Eluição gradiente. 0-25 min, 68-90,5% A; 25-26 min; 90,5-95% A; 26-29min, 95% A; 29-30 min: 95-68% A; seguido de equilíbrio por 6 min.	Volume de injeção: 30 µL Temperatura: 30°C; Fluxo: 0,3 ml/min	DAD (200–400 nm)	THCA, Δ ⁹ -THC, CBD-A, CBD, GBGA, CBG, Δ ⁸ -THC, CBN	0.375 a 50 µg/mL.	[109]
LiChrospher [®] RP-8 (250x4 mm, 5 µm) + pré-coluna	Acetonitrila : Água (8:2), Eluição isocrática (8 minutos).	Volume de injeção: 10 µL Temperatura: 30°C; Fluxo: 1,0 ml/min	DAD (220 e 240 nm)	CBD, CBN, Δ ⁹ -THC, THCA	1 a 100 µg/mL	[29]
Waters X-Bridge [®] C-18 (150x4,6 mm, 3,5 µm) + pré-coluna Opti-Guard [®]	A) Tampão formiato de amônio 50mM (pH 3,75) : acetonitrila (90:10) ; B) Acetonitrila: água (90:10). Eluição gradiente. 0-15 min, 70- 90% B; 15-30 min; 90% B; 30-31min, 90-70% B; 31-40 min: 70% B.	Volume de injeção: 30 µL Temperatura: 30°C; Fluxo: 1,0 ml/min	DAD (228 e 270 nm)	CBDA, CBD, Δ ⁹ -THC, THCA, CBN, CBGA e CBG	2 a 100 µg/mL	[110]

C-18 Core-Shell (150x 4,6mm, 2,7 µm), Restek ARC-18 ou similar	A) Água + ácido fórmico (0,1%), B) Acetonitrila + ácido fórmico (0,1%). Eluição gradiente. 0-3,5min, 74% B, 3,5-6,5 min 74-85% B; 6,5-7,0 min 85% B; 7-7,01 min 85-74% B, 7,01-8,5 min 74% B.	Volume de injeção: 5 µL Temperatura: 40°C; Fluxo: 1,5 ml/min	DAD (222 nm)	CBDVA, CBDV, CBDA, CBGA, CBG, CBD, THCV, THCVA, CBN, Δ ⁹ -THC, Δ ⁸ -THC, CBC, THCA	Não informado	[21]
Waters Aquity® C-18 (150 x 2,1 mm, 1,7 µm) (UHPLC)	A) B) Acetonitrila + ácido fórmico (0,1%), B) Água + ácido fórmico (0,1%). Eluição gradiente. 0-6 min, 70% A, 6-10,5 min 70-100% A; 10,5-10,7 min 100% A; 11-12,5 min 70%A	Volume de injeção: 10 µL Temperatura: 30°C; Fluxo: 0,4 ml/min	DAD (228 nm)	CBDA, CBD, Δ ⁹ -THC, THCA, CBN, Δ ⁸ -THC	Não informado	[88,89] ⁵

⁵ Pequenas diferenças são observadas entre as monografias quanto à forma de descrição dos parâmetros do método e as formas de cálculo para determinação das concentrações dos analitos de interesse.

2.4 Impurezas

O monitoramento de impurezas e contaminantes em insumos farmacêuticos obtidos a partir de *C. sativa* é parte integrante da avaliação da qualidade destes, sendo preconizada em compêndios oficiais e diretrizes emitidas por entidades governamentais de forma a limitar a exposição dos pacientes a agentes considerados nocivos [21,26,88,89,111]. Os testes preconizados para essa finalidade geralmente incluem limites microbianos, água/perda por dessecação, cinzas, metais pesados, resíduos de agrotóxicos e micotoxinas [21,26]. Os limites estabelecidos para cada uma das categorias de impurezas supracitadas são na maioria das vezes embasados nos critérios de aceitação gerais definidos em compêndios oficiais aplicáveis a insumos de origem botânica [21,26], embora, em alguns casos, o estabelecimento de critérios específicos seja pertinente, com base em análises de risco e no princípio da precaução, considerando fatores como as particularidades da amostra, a população alvo e as formas de uso pretendidas [21,26].

Alguns produtos de degradação conhecidos dos canabinoides majoritários, a exemplo do CBN, formado a partir da oxidação do Δ^9 -THC, também podem ser controlados como impurezas, sendo relevantes como indicativos da idade e da estabilidade do material [21]. Algumas monografias estabelecem um limite máximo de concentração para esse canabinoide [89]. Outros canabinoides minoritários são geralmente monitorados, porém, os dados de farmacologia existentes ainda são insuficientes para embasar o estabelecimento de critérios de aceitação para as concentrações destes no material vegetal [21]. Assim, algumas referências preconizam apenas que o teor dos canabinoides minoritários seja reportado se estiver acima de limites pré-estabelecidos [21,88,89]. Uma comparação entre os principais testes de impurezas e os respectivos critérios de aceitação estabelecidos em algumas monografias de inflorescências de *C. sativa* é apresentada no Quadro 5.

Quadro 5: Quadro comparativo entre os testes voltados ao monitoramento de impurezas e respectivos critérios de aceitação preconizados em monografias de *Cannabis sativa* (inflorescências)

Teste		Critérios de aceitação					
Substâncias relacionadas/ produtos de degradação	Canabinoil	≤ 2,0% do conteúdo de THC	Limite não especificado ⁶	Devem ser reportados se acima de 0,05%	≤ 1,0%	≤ 1,0%	Devem ser reportados se acima de 1%
	Outros	Devem ser reportados se acima de 1%			Devem ser reportados se acima de 0,05%	Limite não especificado	
Limites microbianos	Bactérias aeróbias totais	≤ 10 ⁵ UFC	≤ 10 ⁵ UFC	Critérios não mencionados na monografia ⁷	Conforme Farmacopeia Europeia	Testes e critérios não mencionados na monografia ⁷	Conforme Farmacopeia Europeia
	Fungos e leveduras	≤ 10 ⁴ UFC	≤ 10 ⁴ UFC				
	Coliformes totais	-	≤ 10 ³ UFC				
	Gram-negativas bile-tolerantes	≤ 10 ³ UFC	≤ 10 ³ UFC				
	Patógenos específicos	Ausência de <i>Salmonella spp.</i> e <i>Escherichia coli</i> em 1g ⁸	Ausência de <i>Salmonella spp.</i> e <i>Escherichia coli</i> em 1g	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i> (10g)			
Metais pesados	Arsênio	0,2 µg/g ⁹	10 µg/dose/dia	Indicativo	-	Testes e critérios não mencionados na monografia ⁷	3,0 ppm
	Cádmio	0,2 µg/g	4,1 µg/dose/dia	0,5 ppm	1 ppm		0,5 ppm
	Chumbo	0,5 µg/g	6 µg/dose/dia	20 ppm	5 ppm		5,0 ppm
	Mercúrio	0,1 µg/g	2 µg/dose/dia ¹⁰	0,5 ppm	0,1 ppm		0,5 ppm

⁶ Canabinoides minoritários, incluindo CBN, não são tratados como produtos de degradação

⁷ Entende-se que são aplicáveis os limites estabelecidos na Farmacopeia Europeia

⁸ A investigação de *Aspergillus spp.* é recomendada pelo painel de especialistas caso o material seja destinado a uso por via inalatória.

⁹ Limite indicados considerando o potencial uso inalatório do material.

¹⁰ Como metil-mercúrio. Os limites estabelecidos na AHP são baseados nas recomendações gerais para produtos de origem vegetal nos EUA.

Matérias estranhas	Hastes	≤ 5% (d ≥3mm)	≤ 5% (d ≥3mm)	-	≤ 2% (≥2cm); ≤ 20% (≥1,5cm) ¹¹	-	
	Outros	≤ 2% ¹²	≤ 2%	-	≤ 2% ¹²	-	≤ 2%
Água/ umidade		a.a. 0,6±0,5	≤ 15%	-	-	Testes e critérios não mencionados na monografia ⁷	-
Perda por dessecação		-	≤ 10%	≤ 10% ¹³	≤ 10% ¹³		≤ 10%
Cinzas totais		≤ 20%	≤ 20%	-	-		≤ 20%
Cinzas insolúveis em ácido		≤ 4%	≤ 4%	-	-		-
Resíduos de agrotóxicos		Conforme capítulo geral USP <561> ¹⁴	¹⁵	Conforme Farmacopeia Europeia (método geral)	Conforme Farmacopeia Europeia (método geral)	Testes e critérios não mencionados na monografia ⁷	Conforme Farmacopeia Europeia (método geral) ¹⁶
Micotoxinas	Aflatoxinas	B1, B2, G1 e G2: ≤ 20 ppb (total) B1: ≤ 5 ppb ¹⁷	-	B1, B2, G1 e G2: ≤ 4 ppb ¹⁸	B1: ≤ 2 ppb ¹⁸	Testes e critérios não mencionados na monografia ⁷	B1, B2, G1 e G2: ≤ 4 ppb; B1: ≤ 2 ppb
	Ocratoxinas	¹⁹	-	-	-		A: ≤ 20 ppb
	Vomitoxinas		-	-	-		-
Referência		[21]	[26]	[88]	[89]	[87]	[112]

¹¹ Para flores inteiras também se aplica: nenhuma folha pode se projetar além de 20% do comprimento da flor.

¹² Ausência de mofo, insetos, partes podres e outras sujidades.

¹³ Determinado sob vácuo na presença de pentóxido de fósforo, com aquecimento brando (40° C), durante 24h.

¹⁴ Limites mais restritivos podem ser aplicados em alguns casos

¹⁵ Uma lista não exaustiva dos agrotóxicos mais comumente utilizados, acompanhados da indicação das técnicas mais apropriadas para detecção, é fornecida. Não são especificados limites individuais.

¹⁶ As listas dos agrotóxicos que devem ser investigados diferem conforme a origem do material. Para os insumos importados, considera-se o disposto no capítulo geral da Farmacopeia Europeia. Para os de origem nacional, há uma lista específica de agrotóxicos com os respectivos limites.

¹⁷ Conforme USP <561>

¹⁸ Conforme Farmacopeia Europeia

¹⁹ Apenas citadas como potencialmente relevantes pelo painel de especialistas

3 Aplicação de análises multivariadas ao desenvolvimento analítico

3.1 O paradigma do “*Analytical Quality by Design*” (AQbD)

O conceito de *Quality by Design* (QbD) foi originalmente proposto a partir do entendimento de que a qualidade dos produtos farmacêuticos deve ser construída ao longo do processo de desenvolvimento e produção, e não apenas avaliada ao final deste, sendo abordado no Guia do *International Council for Harmonisation* (ICH) - *Pharmaceutical Development* - Q8 [113]. Posteriormente, esse conceito foi ampliado, por analogia, para aplicação a outras áreas das ciências farmacêuticas, incluindo o desenvolvimento analítico, para o qual o termo *Analytical Quality by Design* (AQbD) tem sido utilizado [114,115].

Os processos de desenvolvimento analíticos orientados pela filosofia do AQbD envolvem a aplicação de abordagens sistemáticas, baseadas em análise de risco e no método científico, de forma a subsidiar o entendimento dos parâmetros críticos e das fontes de variabilidade, a fim de ampliar a probabilidade de obtenção de métodos robustos e adequados às finalidades pretendidas, o que se traduz na obtenção de resultados analíticos mais confiáveis [116]. Esse tipo de abordagem contrasta com as estratégias tradicionais de desenvolvimento, que geralmente envolvem a avaliação empírica de determinados parâmetros analíticos de forma isolada e têm a avaliação do desempenho do método centralizada nos estudos de validação, o que dificulta a compreensão dos potenciais impactos dos fatores experimentais sobre a qualidade dos resultados analíticos [116]. Ademais, os elementos do AQbD abrangem todo o ciclo de vida do método (Figura 5), não se limitando às etapas iniciais de desenvolvimento, o que proporciona maior flexibilidade para adaptações e melhorias [115–117].

O fluxo de um processo de desenvolvimento embasado em AQbD tem início com a definição do Perfil Analítico Alvo (ATP, sigla em inglês), que consiste em um resumo prospectivo das finalidades pretendidas do método, fundamentada no Estado da Arte do conhecimento a respeito das amostras e dos analitos de interesse [115–117]. O ATP tipicamente abrange fatores como os analitos a serem avaliados, a matriz em que o método será aplicado, as faixas de concentração e critérios de aceitação [118].

A segunda etapa no processo de desenvolvimento orientado por AQBd é a definição dos atributos críticos do método (CMA, sigla em inglês) que devem ser mantidos dentro de certos limites a fim de que o ATP seja alcançado, assim como das variáveis analíticas críticas (CMV, sigla em inglês) que apresentam potencial impacto sobre os CMA e, portanto, devem ser identificadas para posterior análise de risco [115,117]. Os CMA geralmente abrangem um conjunto de indicadores relevantes para avaliação da seletividade do método, incluindo a eficiência da separação cromatográfica, quando aplicável; além de aspectos mais gerais, como a reprodutibilidade dos resultados obtidos e outros parâmetros de adequabilidade do sistema [115,116,118]. Uma vez que os CMA e CMV tenham sido identificados, a aplicação de ferramentas de análise de risco é uma estratégia frequentemente utilizada para embasar a seleção e categorização das CMV a serem priorizadas para avaliação experimental nas etapas seguintes, bem como para definição das variáveis resposta a partir dos CMA [115,116].

A etapa de otimização das condições analíticas geralmente envolve a aplicação de Desenhos de Experimentos (DoE, sigla em inglês) que possibilitam a avaliação simultânea dos efeitos de um conjunto de variáveis experimentais selecionadas sobre uma ou mais variáveis resposta de interesse [115,119,120]. Dessa forma, é possível obter informações que permitem compreender melhor os potenciais impactos das variáveis sobre o desempenho do método utilizando um número reduzido de experimentos em comparação às abordagens tradicionais envolvendo análises univariadas empíricas [115,120]. As principais abordagens utilizadas para otimização de métodos cromatográficos utilizando DoE serão abordadas no item 3.2.

A partir dos resultados experimentais, é possível definir, por meio da aplicação de ferramentas estatísticas apropriadas, uma região correspondente à combinação multidimensional entre as variáveis experimentais que proporcionam a obtenção de um desempenho adequado do método analítico, ou seja, o *Analytical Design Space* (ADS) ou *Method Operability Design Region* (MODR) [115,116]. A MODR pode ser entendida como a região de robustez do método, dentro da qual se assume, com um nível de probabilidade aceitável, que os critérios de aceitação pré-estabelecidos para os CMA são atendidos [115,116]. Dessa forma, as mudanças realizadas dentro do espaço definido pela MODR não são consideradas modificações do método analítico, o que confere maior

flexibilidade para adaptações do ponto de vista regulatório [115,116]. Antes da condução do estudo de validação propriamente dito, seleciona-se um ponto específico dentro do MODR (*working point*) para definição das condições analíticas que serão aplicadas nas análises de rotina. A definição do *working point* pode levar em consideração diversos critérios, como tempo de análise, custos, conveniência ou maior probabilidade de atender aos parâmetros de adequabilidade do método [115].

Uma vez que as condições analíticas tenham sido definidas, um estudo de validação, envolvendo a avaliação dos parâmetros pertinentes à categoria do método em questão, deve ser conduzido a fim de demonstrar a sua adequabilidade à finalidade pretendida. Nas abordagens guiadas pelo AQbD, a validação analítica pode ser compreendida como uma etapa integrada ao processo de desenvolvimento, sendo os seus parâmetros típicos (e.g., precisão, exatidão, seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação) considerados parte dos CMA [118]. Por fim, são definidas estratégias de controles apropriadas para monitoramento do desempenho do método ao longo de seu ciclo de vida, de forma a possibilitar a detecção de eventuais desvios nos parâmetros de adequabilidade pré-definidos, bem como a investigação de suas causas e a adoção de medidas corretivas cabíveis [115,116].

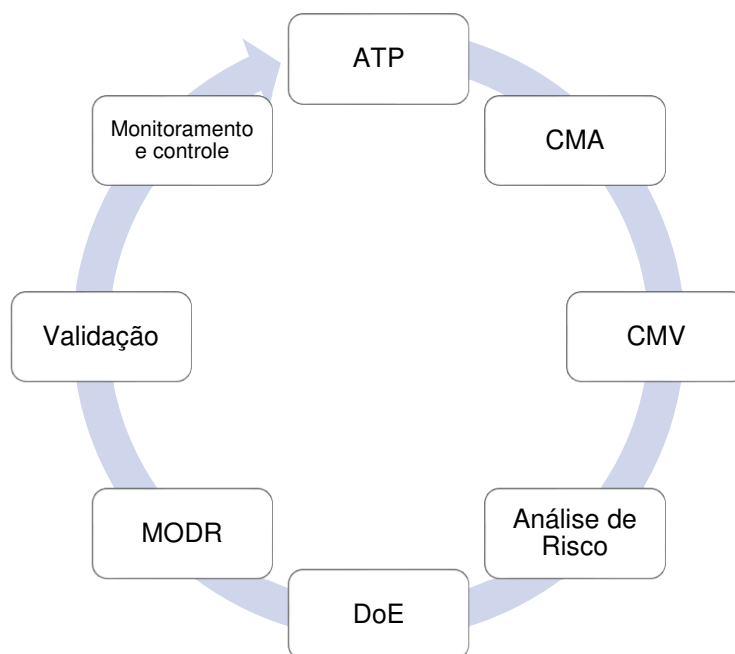


Figura 5: Fluxo típico de um processo de desenvolvimento analítico abrangendo os elementos do AQbD. ATP: *Analytical Target Profile*. CMA: *Critical Method Attributes*. CMV: *Critical Method Variables*. DoE: *Design of Experiments*. MODR: *Method Operable Design Region*.

3.2 Desenho de experimentos (DoE)

A aplicação de desenhos experimentais em estudos de desenvolvimento de métodos analíticos envolvendo técnicas cromatográficas tem sido uma estratégia frequentemente utilizada por possibilitar a otimização dos parâmetros analíticos relevantes utilizando um número reduzido de experimentos [119,120]. Ademais, esse tipo de abordagem possibilita, muitas vezes, a detecção de eventuais interações entre as variáveis experimentais avaliadas, gerando um conjunto maior de informações a respeito das potenciais influências destas sobre as variáveis resposta de interesse [109,119–123].

A maioria das abordagens de DoE envolve uma etapa de triagem, direcionada à identificação dos parâmetros mais críticos considerando as respostas avaliadas, seguida de uma etapa de otimização das condições analíticas [120].

Os desenhos experimentais utilizados nas etapas de triagem permitem a avaliação simultânea de um número relativamente grande de variáveis, sejam elas categóricas, discretas ou contínuas, utilizando um número reduzido de experimentos [115,124]. Essa etapa permite identificar parâmetros que não apresentam influência significativa sobre as variáveis de interesse, que podem ser mantidos em um nível fixo nas etapas posteriores, além de apontar tendências que permitem a pré-seleção dos níveis mais adequados para alguns dos parâmetros influentes, que também possam ser fixados, reduzindo, assim, o número de fatores a serem incluídos nos desenhos experimentais da fase de otimização e, conseqüentemente, o número de experimentos necessários [115]. Além disso, as informações obtidas nessa fase podem ser úteis para definição de níveis experimentais mais adequados para as variáveis a serem avaliadas na fase de otimização, maximizando assim a probabilidade de obtenção de resultados satisfatórios [115].

Entre os tipos de desenhos experimentais mais utilizados na etapa de triagem, destacam-se os desenhos fatoriais (FD, sigla em inglês), fracionados ou não, e os desenhos do tipo Plackett-Burman (PBD, sigla em inglês), sendo tipicamente concebidos com dois níveis (+1 e -1) para cada fator [115,124]. A seleção do desenho experimental mais adequado depende principalmente do número de variáveis em estudo e da extensão em que se pretende estimar os

possíveis efeitos de interações entre elas [124]. Em alguns casos, a fase de triagem pode ser suprimida do estudo de desenvolvimento, desde que as informações disponíveis, adquiridas, por exemplo, a partir da literatura técnica ou de experimentos exploratórios preliminares, sejam suficientes para embasar o planejamento da etapa de otimização dentro de um domínio experimental apropriado [115].

A fase de otimização normalmente envolve a aplicação de metodologias de superfície de resposta (RSM, sigla em inglês), que possibilitam estabelecer uma correlação das variáveis experimentais (independentes) a uma ou mais variáveis respostas por meio de modelos matemáticos polinomiais (geralmente quadráticos) [115,119]. Nessa etapa, os fatores selecionados são avaliados em pelo menos três níveis (-1, 0 e +1), o que permite a estimativa da curvatura da superfície de resposta, bem como a exploração dos efeitos de interações entre os fatores [115,124]. A partir dos modelos polinomiais gerados, é possível obter gráficos de superfície de resposta ou de contorno, que fornecem estimativas do comportamento das variáveis resposta de interesse ao longo do domínio experimental [115,119].

Entre os desenhos experimentais aplicados nas análises de otimização por RSM, destacam-se os desenhos fatoriais completos de três níveis, os desenhos do composto central (CCD, sigla em inglês) e os desenhos do tipo Box-Behnken (BBD, sigla em inglês). Destes, os desenhos do tipo CCD e BBD possuem a vantagem de possibilitar uma redução expressiva do número de experimentos em relação aos desenhos fatoriais de três níveis, sendo, portanto, mais utilizados [119,124].

Os desenhos do tipo CCD são caracterizados pela combinação de um desenho fatorial completo de dois níveis com um desenho do tipo “estrela”, com replicatas do ponto central (geralmente 3 a 5). Os pontos correspondentes ao desenho fatorial abrangem os níveis +1 e -1 das variáveis em estudo, enquanto os pontos “estrela” abrangem níveis $-\alpha$ e $+\alpha$ (sendo $\alpha \geq 1$), e o ponto central é formado pela combinação de todos os fatores no nível 0. Se $\alpha=1$, tem-se um tipo particular de desenho denominado “centrado na face” (fcCCD, sigla em inglês), enquanto os desenhos mais comuns, com $|\alpha| > 1$, são denominados “circunscritos” (cCCD, sigla em inglês) [124].

Os desenhos BBD, por sua vez, são caracterizados pela disposição dos pontos experimentais de maneira equidistante em relação ao ponto central. Ao contrário dos CCD, os BBD não abrangem pontos com combinações de níveis extremos das variáveis estudadas [119,125], o que pode ser uma característica desejável nos casos em que tais condições experimentais poderiam levar a resultados insatisfatórios. Independentemente do tipo de desenho utilizado, a inclusão de replicatas do ponto central é necessária para estimativa do erro experimental [115,124].

A partir dos resultados experimentais, os modelos polinomiais pertinentes a cada variável resposta são construídos. Tipicamente, os modelos gerados incluem um intercepto; os termos referentes aos efeitos principais das variáveis e às interações entre elas; e os termos quadráticos, quando aplicáveis (Equação 1:).

Equação 1:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^f \beta_i x_i + \sum_{1 \leq i < j}^f \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^f \beta_{ii} x_i^2$$

Onde: y : resposta; β_0 : intercepto; β_i : coeficiente principal correspondente à variável independente x_i ; β_{ij} : coeficiente de interação de duas variáveis (x_i e x_j); e β_{ii} : coeficiente quadrático.

Durante essa etapa, podem ser aplicadas ferramentas de seleção de termos (e.g.: *Backward elimination*; *Stepwise*) para que apenas os termos significativos sejam incluídos ou mantidos no modelo [124]. A validade dos modelos obtidos deve ser testada por meio de métodos estatísticos apropriados (e.g.: ANOVA) [115,124]

Uma vez que os modelos polinomiais tenham sido obtidos, o comportamento das variáveis resposta em função dos fatores experimentais pode ser interpretado com auxílio dos gráficos de superfície de resposta ou de contorno [115] e as condições analíticas ótimas podem ser estimadas diretamente a partir dos gráficos, nos casos mais simples, ou, ainda, a partir da aplicação de métodos multicritério de tomada de decisão, a exemplo das funções de *desirability* de Derringer, que permitem otimizar diversas variáveis resposta simultaneamente [124,126].

Medical cannabis regulation: An overview of models around the world with emphasis on the Brazilian scenario

O Capítulo 1 é constituído por um artigo científico aceito para publicação (DOI: 10.1186/s42238-022-00142-z) na revista *Journal of Cannabis Research* (BMC, Springer Nature), que, no texto completo da tese defendida, ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 77 a 125²⁰. Trata-se de uma revisão crítica das abordagens regulatórias aplicadas ao uso medicinal de *Cannabis sativa* no Brasil e ao redor do mundo, abrangendo dados obtidos até março de 2021, com o intuito de fornecer elementos e discussões que possam contribuir para o aprimoramento do marco regulatório brasileiro.

²⁰O texto do artigo incluído na tese completa corresponde à versão apresentada à banca na ocasião da defesa, quando o artigo ainda passava pelo processo de avaliação pelos revisores da revista, podendo, portanto, diferir em relação ao artigo final publicado.

Capítulo 2 : Proposta de especificações para os testes de identificação botânica macroscópica e microscópica da droga vegetal

O Capítulo 2 trata das análises botânicas de amostras de inflorescências de *Cannabis sativa* que subsidiaram, juntamente com a revisão da literatura técnica pertinente, a formulação das descrições das características macroscópicas e microscópicas relevantes para identificação da droga vegetal, bem como a elaboração de uma ilustração científica em nanquim das principais estruturas observadas, que deverá acompanhar as descrições supracitadas na proposta de monografia farmacopeica.

A Prof^ª. Dr^ª. Lilian Auler Mentz participou ativamente de todas as etapas do trabalho relatadas nesse capítulo, sendo sua colaboração essencial para o cumprimento dos objetivos propostos.

1 INTRODUÇÃO

O exame visual dos aspectos morfológicos macroscópicos e microscópicos de drogas vegetais possui um papel de grande relevância no contexto do controle da qualidade desses materiais, complementando os ensaios voltados ao monitoramento qualitativo do perfil de constituintes químicos no sentido de assegurar a autenticidade e pureza do material de interesse [93,127–129].

Nesse sentido, os critérios de aceitação estabelecidos devem ser definidos de forma a refletir, tanto quanto possível, os aspectos característicos da espécie vegetal de interesse que possam favorecer a sua distinção em relação a outras espécies semelhantes e a eventuais adulterantes [128,130]. Além disso, a comparação da amostra de interesse com um material de referência farmacopeico, ou amostra devidamente autenticada de acordo com critérios farmacopeicos, é recomendada [129] a fim de reduzir a subjetividade da avaliação dos aspectos morfológicos.

As análises botânicas microscópicas são especialmente relevantes nos casos que envolvem amostras previamente submetidas a processos de cominuição, para as quais a observação dos aspectos macroscópicos é dificultada ou mesmo inviabilizada [128–130]. Assim, as especificações da droga vegetal em relação aos seus aspectos botânicos devem, idealmente, contemplar também esse tipo de material com maior grau de cominuição, com indicação das estruturas microscópicas passíveis de serem observadas nesses casos.

Em relação à espécie *Cannabis sativa*, a avaliação morfológica das inflorescências femininas em amostras íntegras é capaz de apontar uma série de características diagnósticas da espécie [21,29], dado que a estrutura floral é o principal elemento que embasa os critérios de classificação em taxonomia vegetal [130]. Além do aspecto geral da inflorescência e da morfologia das partes florais primárias, a observação de estruturas acessórias como as brácteas e bractéolas também é bastante útil para fins de identificação (ver item 1.2 do Referencial Teórico).

Do ponto de vista microscópico, a morfologia dos tricomas glandulares presentes nas brácteas e bractéolas é um dos principais elementos diagnósticos da espécie [21,26,29,95]. Três tipos principais de tricomas glandulares podem ser observados nas brácteas e bractéolas presentes nas inflorescências: Tricomas

sésseis com cabeça multicelular, geralmente encontrados na epiderme inferior; tricomas glandulares bulbosos pequenos com hastes geralmente uni ou bicelulares e cabeças com uma a quatro células; e tricomas pedunculados com cabeça multicelular e pedicelo pluricelular e plurisseriado, sendo estes últimos abundantes nas bractéolas que circundam as flores femininas [21,26,29].

Os tipos e a distribuição dos tricomas tectores também são aspectos relevantes para identificação do material, assim como a presença de cristólitos de carbonato de cálcio em alguns desses tricomas [21,26]. Nesse sentido, a presença simultânea de tricomas tectores cristolíticos curtos, de formato curvo e base alargada, na superfície adaxial e de tricomas tectores não cristolíticos de formato alongado, acompanhados de tricomas glandulares sésseis, na superfície abaxial dos folíolos é considerada uma característica diagnóstica de *C. sativa* [21,26,29].

Outros elementos comumente descritos em monografias da droga vegetal são as papilas estigmáticas, que também podem ser facilmente observadas no material pulverizado [21,26,87].

2 OBJETIVOS

Apresentar descrições dos principais aspectos macroscópicos e microscópicos das inflorescências femininas de *C. sativa* que sejam relevantes para fins de identificação da droga vegetal e, conseqüentemente, para a elaboração da proposta de monografia analítica que é objeto do presente estudo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

As amostras utilizadas foram provenientes de apreensões pela Polícia Federal – RS, através do Convênio de Cooperação Técnico-Científica vigente entre a UFRGS, Laboratório de Análises e Pesquisa em Toxicologia (LABTOXICO) da Faculdade de Farmácia, e a Superintendência Regional de Polícia Federal do Rio Grande do Sul (SR/PF/RS), renovado sob Processo nº 23078.007718/2018-66, sendo constituídos de amostras secas. Os materiais recebidos foram triados para seleção de elementos que preservassem as características morfológicas das inflorescências da espécie.

3.2 Análise macroscópica

As amostras foram inicialmente observadas sem tratamento prévio em microscópio estereoscópico (lupa) WILD Heerbrugg M5A, sendo analisadas quanto à forma, tamanho, cor, aspecto da superfície e textura. Posteriormente, foram destacadas da inflorescência algumas partes florais primárias, além de brácteas e bractéolas, para observação individual. Foram feitos registros fotográficos dos materiais utilizando lente macro (10x) acoplada a smartphone, ou ainda utilizando a câmera do smartphone em associação com o microscópio estereoscópico, a fim de subsidiar a posterior elaboração das ilustrações.

3.3 Análise microscópica

Para as análises microscópicas, os materiais foram previamente hidratados em água morna. Após hidratação e amolecimento, foram realizados os cortes histológicos (secções à mão livre) ou a separação das estruturas de interesse do material, sendo os cortes mais finos selecionados para montagem das lâminas. As lâminas foram montadas colocando-se o material entre lâmina e lamínula com duas a três gotas de água destilada e, em seguida, observadas em microscópio óptico Olympus CBA utilizando as lentes objetivas de 10x ou 40x.

Nos casos em que a observação das estruturas de interesse não foi viável a partir do material obtido diretamente após hidratação, foram preparadas novas lâminas com materiais previamente submetidos à diafanização com solução aquosa de hipoclorito de sódio (1:1 v/v).

Os rascunhos das ilustrações foram elaborados com auxílio de câmara clara acoplada ao microscópio óptico. Além disso, foram feitos registros fotográficos dos materiais observados em microscópio após diafanização a fim de subsidiar a elaboração de ilustrações de aspectos da superfície de algumas estruturas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise macroscópica

As peças de inflorescências pistiladas secas são compactas e glomeruliformes, de coloração esverdeada, medindo de 4 a 6 cm de comprimento e largura semelhante, apresentando brácteas ligeiramente salientes (Figura 2-1-

A), sendo condizentes com as descrições encontradas na literatura consultada [21,26,87].

As brácteas são de formato lanceolado semelhante às folhas, com bordas lisas a levemente serrilhadas, podendo ser simples ou recortadas, até visivelmente tripartidas, medindo de 7 a 12 mm de comprimento (Figura 2-2-B). Apresentam coloração verde, podendo assumir tonalidades medianas até mais escuras. Sua superfície é recoberta por tricomas glandulares resinosos, de pedicelos curtos a longos, além de tricomas não glandulares simples (Figura 2-2-E). As bractéolas são ovaladas e de ápice afilado, com bordas inteiras, medindo cerca de 3 a 5 mm, raro mais (Figura 2-2-C). Apresentam coloração verde clara a verde amarelada. São densamente recobertas por tricomas glandulares resinosos em sua superfície (Figura 2-1-F e Figura 2-2-E).

As flores femininas geralmente ocorrem em pares, sendo cada uma envolta em sua base por uma bractéola (Figura 2-2-D e F). Cada flor mede cerca de 5 a 10 mm de comprimento total e é constituída por um ovário unilocular, de coloração esbranquiçada, medindo cerca de 1 a 2 mm, continuado por duas ramificações estigmáticas filiformes, de coloração alaranjada a amarronzada, medindo cerca de 3 a 7 mm de comprimento cada (Figura 2-1-D e Figura 2-2-F), com superfície densamente recoberta por papilas estigmáticas (Figura 2-2-F). No material observado, as ramificações estigmáticas apresentavam coloração escurecida, indicando tratar-se de inflorescências em estado de maturação já avançado [21]. Não foram observados frutos no material analisado.

4.2 Análise microscópica

A epiderme adaxial das brácteas é composta por células poligonais, apresentando estrias epicuticulares (Figura 2-2-G). São observados tricomas tectores curtos unicelulares, de formato cônico e curvo, contendo inclusões cistolíticas em sua base (Figura 2-2-H4). Tricomas multicelulares pedunculados (Figura 2-2-H6 e H7) também podem ser observados. Já na face abaxial, são encontrados tricomas tectores longos unicelulares de paredes espessadas (Figura 2-2-H1 e H2), de formato reto ou levemente curvado, algumas vezes apresentando uma inclusão cistolítica na base (Figura 2-2-H3). São observados, ainda, diversos tricomas glandulares com cabeças multicelulares, com células secretórias

dispostas radialmente, e pedicelo pluricelular e plurisseriado (Figura 2-2-H6 e H7); além de tricomas glandulares sésseis com cabeças multicelulares semelhantes às dos tricomas pedunculados (Figura 2-2-H9). Pequenos tricomas glandulares bulbosos (Figura 2-2-H5) também podem estar presentes.

Tais características são condizentes com relatos da literatura [21,26,29], sendo a morfologia dos tricomas glandulares considerada um diferencial da espécie em relação a outras da mesma família [131].

As ramificações estigmáticas das flores femininas são recobertas por diversas papilas de paredes finas e formato cilíndrico com ápice arredondado (Figura 2-2-F1). Papilas estigmáticas destacadas também são comumente observadas no material vegetal.

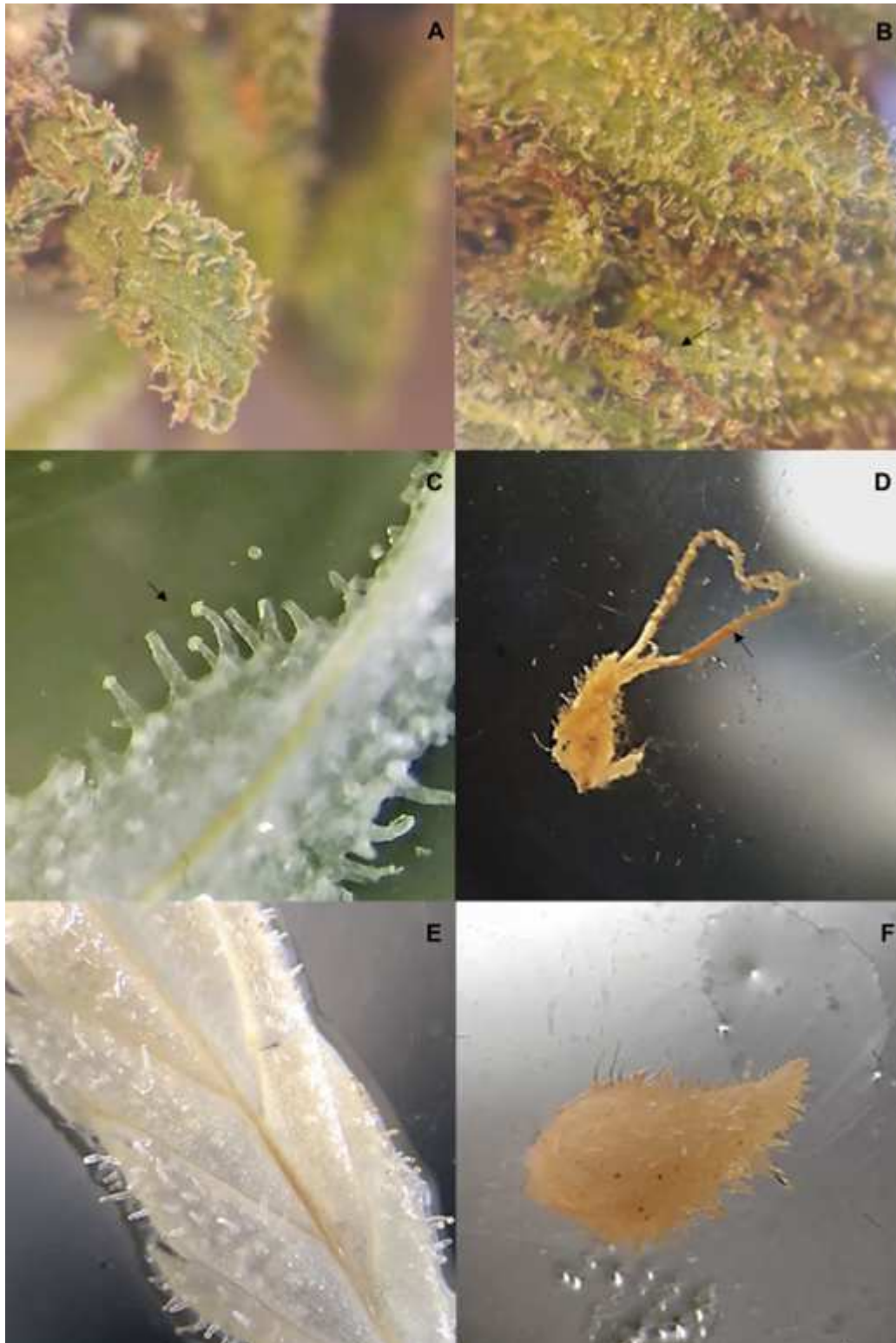


Figura 2-1: Registros fotográficos de detalhes das estruturas encontradas em inflorescências femininas de *Cannabis sativa*. A) Detalhe da superfície adaxial de folíolo recoberta por tricomas; B) Brácteas com superfície recoberta por tricomas glandulares repletos de conteúdo secretório e ramificações estigmáticas senescente de coloração amarronzada (ponta da seta); C) Detalhe de bractéola após processo de diafanização evidenciando tricomas glandulares multicelulares pedunculados (seta) e pedúnculos de tricomas glandulares; D) Flor feminina envolta por bractéola após processo de diafanização evidenciando duas projeções estigmáticas (seta); E) Detalhe da superfície adaxial de bráctea após processo de diafanização; F) Detalhe de bractéola após processo de diafanização. Aumentos: Em A, B e D: 12x; em E e F: 25x; em C: 50x.

Uma ilustração original dos aspectos morfológicos das inflorescências da espécie é apresentada na Figura 2-2. Esta imagem deverá acompanhar as descrições dos aspectos macroscópicos e microscópicos da droga vegetal na proposta de monografia a ser apresentada à Farmacopeia Brasileira (Apêndice I), a fim de auxiliar no processo de interpretação das características observadas no material vegetal durante as análises de rotina.

No presente estudo, não foi possível obter imagens de qualidade de secções transversais das brácteas e bractéolas devido à dificuldade em se realizar cortes de espessura adequada em razão das características do material trabalhado (inflorescências secas), que tornam difícil a sua manipulação, mesmo após hidratação. Por esse motivo, a representação desse corte não foi incluída na ilustração dos aspectos morfológicos da droga vegetal (Figura 2-2). No entanto, a descrição do material a ser apresentada na proposta de monografia (Apêndice I) contempla os aspectos morfológicos que se espera observar a partir desse corte, levantados a partir de descrições disponíveis na literatura [21,26,29]. De forma análoga, algumas outras estruturas que não puderam ser observadas diretamente a partir da análise das secções das amostras do material disponível, mas que são relatadas de forma consistente na literatura consultada, foram incluídas nas descrições dos aspectos morfológicos do material da proposta de monografia a fim de torná-las abrangentes em relação às estruturas passíveis de serem observadas durante as análises de rotina. Por sua vez, a ilustração apresentada na Figura 2-2 foi elaborada de forma a refletir apenas as estruturas observadas durante a condução do presente trabalho.

Dessa forma, espera-se que o conjunto de informações disponibilizadas na proposta de monografia possa fornecer elementos suficientes para identificação inequívoca do material vegetal, tanto na forma íntegra quanto cominuída, a partir do conjunto de testes propostos.

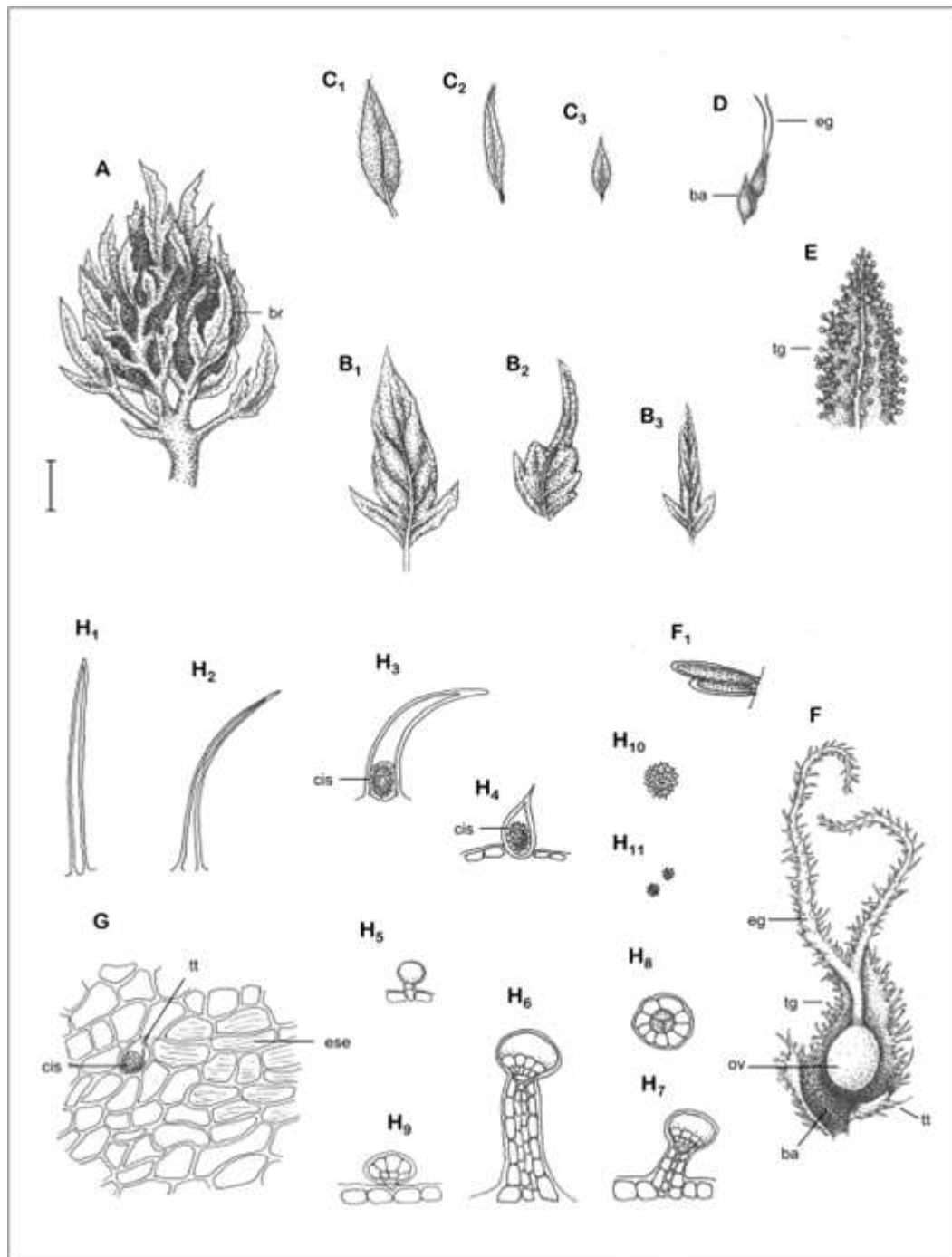


Figura 2-2: Aspectos macroscópicos, microscópicos e microscópicos do pó em *Cannabis sativa*. A escala corresponde em A a 1 cm; em B1 e B2 a 3 mm, B3, C1, C2 e C3 a 2 mm; em D a 3 mm; em E e F a 500 micrômetros; em F1, G e H a 50 micrômetros. A - aspecto geral da inflorescência feminina: bráctea (br). B - aspecto geral de brácteas da inflorescência feminina. C - aspecto geral de bractéolas da inflorescência feminina; D - aspecto geral de flor feminina: projeções estigmáticas (eg); bractéola (ba). E - extremidade de uma bractéola observada em microscopia óptica: tricomas glandulares (tg). F - flor feminina observada em microscopia óptica: ovário (ov), projeções estigmáticas (eg); bractéola (ba); tricomas tectores (tt) e tricomas glandulares da bractéola (tg). F1 - detalhe das papilas estigmáticas. G - detalhe da face adaxial da epiderme de uma bráctea da inflorescência, em vista frontal, mostrando células epidérmicas com estrias epicuticulares (ese) e tricoma curto (tt) com cystólito (cis). H - tricomas e inclusões sólidas de uma bráctea; H1 - tricoma simples unicelular, de paredes espessadas; H2 - tricoma simples unicelular, de paredes mais finas; H3 - tricoma simples, longo, com um cystólito basal (cis); H4 - tricoma simples, curto, com um cystólito grande (cis); H5 - tricoma glandular bulboso com cabeça unicelular; H6 - tricoma glandular com pedicelo longo, pluricelular e plurisseriado; H7 - tricoma glandular com pedicelo curto, pluricelular e plurisseriado; H8 - cabeça de tricoma glandular em vista frontal; H9 - tricoma glandular sésseil; H10 - cystólito de carbonato de cálcio; H11 - cristais de oxalato de cálcio (drusas).

DoE-assisted development and validation of a thin layer chromatography method for optimized separation of major cannabinoids in *Cannabis sativa* L. samples

O Capítulo 3 é constituído por um artigo científico aceito para publicação (DOI: 10.1080/10826076.2022.2086566) na revista *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* (Taylor & Francis), que, no texto completo da tese defendida, ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 139 a 171. Trata-se do desenvolvimento e validação de um método analítico voltado à identificação e monitoramento qualitativo do perfil de canabinoides em amostras de *Cannabis sativa* L. por cromatografia em camada delgada de sílica utilizando uma abordagem assistida por desenhos experimentais.

DoE-assisted optimization and validation of a stability-indicating HPLC-DAD method for simultaneous determination of five cannabinoids in *Cannabis sativa* L. samples based on Analytical Quality by Design (AQbD) concept

O Capítulo 4 é constituído por um artigo científico aceito para publicação (DOI: 10.1002/pca.3154) na revista *Phytochemical Analysis* (Wiley), que, no texto completo da tese defendida, ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 175 a 239. Trata-se do desenvolvimento e validação de um método analítico voltado à quantificação simultânea de cinco diferentes canabinoides em amostras de *Cannabis sativa* L. por cromatografia em fase líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD) aplicando ferramentas de *Analytical Quality by Design (AQbD)*.

DISCUSSÃO GERAL

Atualmente, a espécie *Cannabis sativa* consta na Lista I da Convenção de 1961 da Organização das Nações Unidas (ONU) sobre o controle de estupefacientes, sendo, portanto, sujeita a uma série de controles e restrições estabelecidos internacionalmente no que concerne às atividades de cultivo, comercialização, posse e utilização [132]. Até recentemente, a espécie também constava na Lista IV da referida Convenção, o que corresponde a uma classificação reservada às substâncias particularmente nocivas [133], incluindo aquelas que apresentam potencial de causar dependência ou risco de uso abusivo não compensado por vantagens terapêuticas, ou, ainda, aquelas cuja exclusão da prática clínica seria desejável devido ao risco para a saúde pública [134]. No entanto, diante da evolução do conhecimento científico acerca das propriedades terapêuticas da espécie e das evidências clínicas de eficácia de alguns medicamentos obtidos a partir dela para o tratamento de uma série de condições patológicas, incluindo epilepsia refratária, esclerose múltipla e dor neuropática crônica [3,6,58,135] (Figura 4); a referida classificação mostrou-se questionável.

Em 2019, o Comitê de Especialistas em Dependência de Drogas (ECDD, sigla em inglês) da Organização Mundial da Saúde (OMS), após ponderar sobre as possibilidades de revisão do escopo dos controles aplicados à *C. sativa* e seus derivados, recomendou a remoção da espécie da Lista IV da Convenção da ONU de 1961 [136]. Tal recomendação foi acatada pela Comissão das Nações Unidas sobre Entorpecentes (CND, sigla em inglês) que, em dezembro de 2020, oficializou a exclusão de *cannabis* e da resina de *cannabis* da Lista IV [137,138].

Embora essa decisão represente um avanço no sentido do reconhecimento do potencial terapêutico da espécie pela ONU, cabe ressaltar que ela não se deu de forma unânime, com posicionamentos contrários de 25 entre os 53 países representados, incluindo o Brasil [138]. Além disso, as outras recomendações da OMS, a exemplo da inclusão de uma Nota explicitando que as preparações contendo apenas canabidiol não seriam sujeitas ao controle internacional de drogas, foram rejeitadas pela CND [138]. Tal resistência à revisão das classificações aplicáveis à *C. sativa* e seus derivados recomendadas pela OMS ilustra a influência das ideologias, preconceitos e convicções de uma sociedade

no processo de tomada de decisões políticas [139], sendo que, neste caso, o estigma criado sobre a espécie prejudica o reconhecimento dos benefícios já comprovados cientificamente de seu uso em determinadas condições clínicas.

Por outro lado, a crescente demanda pelo uso medicinal de *C. sativa*, principalmente por parte de pacientes portadores de condições graves e refratárias às alternativas terapêuticas existentes, tem impulsionado o desenvolvimento de políticas de acesso à espécie para fins medicinais em diversos países [2,8,81,140,141], além de fomentar interesses capitalistas na exploração do mercado consumidor em potencial [141].

Cabe ressaltar, porém, que a regularização de produtos à base de *cannabis* pelas vias convencionais aplicáveis a medicamentos é, em muitas ocasiões, dificultada pela escassez de evidências clínicas para as alegações terapêuticas propostas [58,81]. Esse cenário é ainda mais complexo quando se trata do uso de produtos obtidos fora de ambientes de Boas Práticas de Fabricação, cuja constância dos efeitos terapêuticos não pode ser assegurada de forma apropriada [142]. Nesse contexto, grande parte da população tende a identificar os requisitos regulatórios como entraves meramente “burocráticos”, que limitam o acesso à *cannabis* medicinal, ao passo que, muitas vezes, as principais limitações à disponibilização desses produtos no mercado são, na verdade, decorrentes da falta de provas suficientes de segurança, eficácia e qualidade [81].

Ademais, muitas das limitações do referencial científico disponível atualmente para suportar o uso terapêutico de produtos obtidos a partir de *C. sativa* advém das dificuldades de acesso à espécie em razão das medidas restritivas ainda vigentes nacional e internacionalmente [57]. Ressalta-se, portanto, a necessidade de estabelecimento de instrumentos normativos para regulamentação do uso da espécie para fins medicinais e de pesquisa e da revisão de medidas de controle existentes, a fim de favorecer a condução de estudos científicos de qualidade sobre o tema. Outra limitação comumente encontrada é a falta de padronização dos insumos e produtos estudados clinicamente em termos das proporções relativas entre os diferentes canabinoides e do perfil de constituintes de outras classes de metabólitos secundários que possam ter relevância farmacológica, como os terpenoides, o que dificulta a comparação entre resultados obtidos em diferentes estudos e sua consequente interpretação [21,57].

A observação das experiências internacionais indica que um dos maiores desafios envolvidos no processo de regulamentação da *cannabis* medicinal é alcançar um equilíbrio entre a promoção do acesso dos pacientes a produtos que atendam às suas necessidades e o controle dos riscos inerentes ao uso destes [11]. No Brasil, uma evolução do quadro regulatório tem sido perceptível desde 2015. A publicação da RDC/ANVISA nº 327/2019, possibilitando a regularização de Produtos de *Cannabis* para fins medicinais no país [17], representou um avanço no sentido do atendimento das demandas de parte da população. Entretanto, o marco regulatório atual prevê a concessão de Autorização Sanitária desses produtos por um prazo limitado de forma não condicionada à apresentação de provas de segurança e eficácia, o que pode ser entendido como um cenário ainda de transição, com margens para aprimoramentos. A referida norma preconiza que os Produtos de *Cannabis* deverão ser regularizados pela via convencional de registro de medicamentos até o prazo de vencimento de sua autorização [17]. Assim, é esperado que, nos próximos anos, sejam conduzidos estudos clínicos que permitam a comprovação da segurança e eficácia desses produtos, de forma a suprir essa necessidade. Além disso, a perspectiva de aprovação do PL 399/2015 [20], atualmente em tramitação no Congresso Nacional, poderá viabilizar novos avanços em relação à promoção do acesso à *C. sativa* para fins medicinais e de pesquisa no Brasil, com espaços para a regulamentação efetiva de questões relevantes, como o cultivo da espécie em território nacional.

Diante da perspectiva de aumento do número de produtos e medicamentos obtidos a partir de *C. sativa* disponibilizados no país, ressalta-se a necessidade de estabelecimento de especificações de qualidade relevantes, de forma a reduzir os riscos associados ao uso desses produtos pela população e favorecer a caracterização apropriada dos medicamentos a serem submetidos a estudos clínicos, permitindo, assim, a obtenção de resultados reprodutíveis e comparáveis entre si [21,85]. Nesse contexto, o desenvolvimento de monografias farmacopeicas pode contribuir para o alcance desses objetivos com a definição de um conjunto de métodos analíticos e especificações harmonizados e apropriados ao monitoramento da qualidade de produtos farmacêuticos e insumos ativos obtidos a partir da espécie [21,22].

O presente trabalho envolveu o desenvolvimento de métodos analíticos a serem incluídos em uma proposta de monografia de inflorescências de *C. sativa* a ser submetida à avaliação para inclusão na Farmacopeia Brasileira. Para tanto, buscou-se abranger aspectos relevantes para a caracterização do material vegetal quanto à identidade, perfil fitoquímico e teor de canabinoides. Outros testes, voltados principalmente ao monitoramento de impurezas como metais pesados, resíduos de agrotóxicos, micotoxinas e contaminantes biológicos, também foram incluídos posteriormente na proposta de monografia, embasados nos Métodos Gerais farmacopeicos aplicáveis. Os critérios de aceitação propostos para cada um desses testes foram embasados, sempre que possível, nos critérios estabelecidos em outras monografias de qualidade referentes a esse insumo ativo vegetal [26,87–89] (*vide* item 2.4 do Referencial Teórico).

Os canabinoides são constituintes característicos de *C. sativa*, sendo considerados importantes marcadores de identidade da espécie [21,31,34]. Em razão disso, combinação de métodos cromatográficos que permitam evidenciar a presença desses constituintes no material vegetal com métodos de identificação botânica voltados ao reconhecimento dos aspectos macroscópicos e microscópicos característicos das inflorescências femininas seria, a princípio, suficiente para a identificação inequívoca de amostras da droga vegetal em questão [21]. Essa abordagem está presente nas monografias de qualidade consultadas [26,87–89], sendo também proposta no presente trabalho.

Outro aspecto importante considerado durante o desenvolvimento dos métodos analíticos propostos neste trabalho foi a necessidade de diferenciação entre os principais quimiotipos de *C. sativa* (THC-dominante, CBD-dominante e intermediário), uma vez que a proporção relativa entre esses canabinoides é um fator determinante para as propriedades terapêuticas dos insumos ativos vegetais obtidos a partir da espécie [21,42,61]. Além disso, a necessidade de monitoramento de um grupo maior de canabinoides, tendo em vista a relevância da caracterização do perfil de constituintes dessa classe para assegurar a constância da qualidade do material vegetal, também foi considerada.

Cabe observar, porém, que a semelhança estrutural entre os canabinoides e a complexidade das matrizes vegetais tornam o processo de desenvolvimento de métodos cromatográficos aplicados à determinação desses analitos particularmente desafiador [86,109]. Nesse sentido, a aplicação de abordagens

sistemáticas, incluindo a aplicação de desenhos experimentais, tem se mostrado útil para auxiliar a contornar esses desafios, permitindo um melhor entendimento da influência dos fatores experimentais sobre o comportamento cromatográfico dos analitos [86,109]. Neste trabalho, tanto o método proposto para determinação do teor de canabinoides por HPLC-DAD quanto o método voltado ao monitoramento do perfil de constituintes por TLC foram desenvolvidos com o auxílio de desenhos experimentais, utilizando abordagens distintas, conforme as características de cada técnica analíticas e as aplicações pretendidas.

O método por HPLC-DAD foi concebido para permitir a quantificação simultânea de quatro canabinoides majoritários (CBDA, CBD, THCA e Δ^9 -THC), selecionados por sua relevância tanto para o perfil farmacológico da espécie quanto para a caracterização de seus quimiotipos [21,26,29,31,86]; além do CBN, principal produto de degradação do Δ^9 -THC, por ser considerado relevante para o acompanhamento das alterações ocorridas com o material vegetal ao longo dos estudos de estabilidade [21]. Além disso, a possibilidade de aplicação do método para o monitoramento qualitativo de outros canabinoides passíveis de serem encontrados na espécie também foi considerada em sua concepção. Para tanto, os canabinoides CBDVA, CBDV, THCV, CBG, CBN, Δ^8 -THC e CBC foram incluídos no processo de desenvolvimento analítico a fim de permitir a definição das condições experimentais mais apropriadas à obtenção de perfis cromatográficos de qualidade apropriada, com resolução satisfatória de todos os analitos avaliados.

A abordagem utilizada para o desenvolvimento desse método foi baseada na filosofia do AQbD, incluindo a aplicação de ferramentas típicas desse tipo de estudo. A análise de riscos apontou a existência de variáveis críticas tanto na fase de preparo da amostra (processo extrativo) quanto na fase instrumental do método. Dessa forma, essas duas etapas foram contempladas nos estudos de otimização, com a condução de dois estudos paralelos envolvendo desenhos experimentais distintos. As condições otimizadas permitiram a obtenção de perfis cromatográficos satisfatórios, com resolução dos 12 canabinoides avaliados no nível da linha de base alcançada em um tempo de análise razoável (35 minutos) comparado a outros métodos descritos em literatura (*vide* item 2.3 do Referencial Teórico). Além disso, a abordagem utilizada permitiu uma melhor compreensão do comportamento cromatográfico dos analitos de interesse em função das

variáveis experimentais. Esse tipo de conhecimento facilita a realização de eventuais adaptações do método proposto, ou mesmo o desenvolvimento de novos métodos baseados nele, de forma a atender às necessidades específicas individuais dos laboratórios que venham a aplicá-lo. Tal característica pode ser considerada uma vantagem por se tratar de um candidato a método farmacopeico.

Os resultados do estudo de validação do método em questão indicaram que ele é suficientemente seletivo em relação aos cinco analitos avaliados quantitativamente, não sendo constatadas interferências de substâncias estruturalmente relacionadas, produtos de degradação ou constituintes da matriz sobre as respostas analíticas de interesse. As curvas analíticas construídas para cada um desses canabinoides apresentaram bons ajustes ao modelo linear no intervalo avaliado (10 a 100 µg/mL), atendendo a todos os pressupostos estatísticos pertinentes. O método também se mostrou suficientemente preciso, com erro aleatório da ordem de 5%; e exato, com os resultados indicando um erro sistemático inferior a 10% para todos os analitos. Além disso, a recuperação extrativa do canabidiol foi superior a 90%. O método também apresentou robustez satisfatória em relação à maioria dos fatores avaliados utilizando o modelo de Youden. Alguns fatores como o fluxo da fase móvel e o lote da coluna devem ser mantidos sob controle e devidamente avaliados em caso de adaptações ou transferências analíticas. Os critérios de aceitação definidos no Protocolo de Validação foram, portanto, atendidos para todos os parâmetros supracitados. Por fim, os fatores de resposta relativos (FRR) e fatores de correção ($F_c=1/FRR$) estimados para cada um dos canabinoides de interesse frente ao CBD foram condizentes com os valores reportados em literatura, sendo confirmados experimentalmente durante o estudo de validação. Assim, a determinação da concentração dos analitos de forma indireta, utilizando um único padrão analítico (CBD) mostrou-se uma abordagem viável para aplicação nas análises de rotina, não gerando desvios expressivos em relação aos resultados que seriam obtidos de forma direta. Dessa forma, optou-se por incluir essa abordagem na proposta de monografia a fim de reduzir os custos e simplificar as análises.

Em relação ao método proposto para identificação e monitoramento do perfil cromatográfico do material vegetal por TLC, optou-se por priorizar condições analíticas simples e de custo relativamente baixo, sem, no entanto, renunciar aos atributos de performance desejáveis para o atendimento ao propósito do método.

Nesse sentido, foram utilizadas placas de sílica gel 60 convencionais para TLC, de forma a reduzir os custos de análise em relação a outros métodos reportados em literatura que preconizam o uso de placas de sílica octadecilsilanizada ou de placas de HPTLC. Além disso, a escolha dos solventes também priorizou aqueles mais acessíveis e com menor risco de exposição ocupacional. Cabe ressaltar, porém, que tais escolhas representam também desafios analíticos maiores em função das limitações da técnica de TLC convencional (*vide* item 2.2 do Referencial Teórico). Assim, uma das estratégias adotadas durante a fase de desenvolvimento foi a aplicação de um desenho experimental para otimização da composição do sistema eluente, o que permitiu a definição de condições experimentais que possibilitam a obtenção de perfis cromatográficos de qualidade satisfatória, com resolução adequada de todos os 8 canabinoides avaliados, selecionados de forma a representar os constituintes dessa classe mais comumente encontrados na espécie. Além disso, foi possível compreender melhor a influência da composição do sistema eluente no comportamento cromatográfico dos analitos de interesse, o que poderá favorecer adaptações futuras do método que se façam necessárias.

A abordagem utilizada durante o estudo de validação desse método foi planejada de forma a contemplar algumas particularidades da técnica analítica, considerando também os objetivos propostos para o método. Cabe ressaltar que os testes voltados ao monitoramento de perfis cromatográficos em insumos e produtos de origem vegetal não possuem apenas o objetivo de contribuir para a identificação desses materiais, mas também de possibilitar o monitoramento de alterações nos perfis de constituintes de interesse lote a lote e ao longo dos estudos de estabilidade [93,143]. Nesse sentido, o estudo de validação foi delineado de forma a abranger não apenas a avaliação de sua seletividade, parâmetro tipicamente previsto nos guias de validação no que diz respeito aos métodos de identificação [144,145], mas também da precisão sob uma perspectiva qualitativa, buscando avaliar a reprodutibilidade dos perfis cromatográficos obtidos, além da robustez, buscando compreender a susceptibilidade do método a variações de fatores ambientais e experimentais [143].

Os resultados obtidos durante a validação foram satisfatórios, indicando que o método é capaz de indicar a presença dos canabinoides avaliados nas amostras de interesse, além de permitir inferir sobre suas proporções relativas por meio da

comparação das intensidades das bandas formadas, sendo, portanto, útil para a distinção entre amostras de diferentes quimiotipos. O método proposto também apresentou potencial para distinção entre amostras recentes e antigas conforme os padrões de bandas dos respectivos perfis cromatográficos, o que foi confirmado experimentalmente por meio da condução de um estudo de degradação forçada. Em relação à robustez, foi aplicada uma análise multivariada baseada no desenho experimental de Youden para avaliação simultânea de um conjunto de variáveis experimentais selecionadas. Os resultados apontaram alguns fatores críticos, com potencial de interferir significativamente na qualidade dos resultados analíticos. Esse conhecimento foi utilizado para a definição de alguns controles, com inclusão das informações pertinentes na proposta de monografia, a fim de assegurar que o método possa ser reproduzível. Por fim, os perfis cromatográficos obtidos em análises independentes e dias distintos foram satisfatoriamente semelhantes em relação aos indicadores avaliados, indicando que o método apresenta reprodutibilidade satisfatória, desde que as condições experimentais sejam devidamente controladas em relação aos fatores mais críticos.

Ainda em relação ao método proposto para avaliação do perfil de canabinoides por TLC, observou-se que o uso de sistemas reveladores distintos, incluindo o reagente o uso do Fast Blue B, permitiu uma melhor diferenciação entre canabinoides com valores de R_f próximos. Porém, cabe ponderar que o uso deste revelador requer cuidados adicionais em relação à segurança do analista (ex.: uso de equipamentos de proteção individual) devido à sua maior toxicidade, e, se possível, deve ser evitado em análises de rotina. Nesse sentido, o uso da Vanilina sulfúrica isoladamente pode ser considerado suficiente, principalmente nos casos em que são utilizados métodos ortogonais envolvendo outras técnicas cromatográficas (e.g.: HPLC-DAD), permitindo, assim, a identificação inequívoca do quimiotipo da amostra e a obtenção de um panorama mais completo em relação ao seu perfil de constituintes. Enfatiza-se, portanto, o caráter complementar dos dois métodos propostos no presente estudo, envolvendo as técnicas de TLC e HPLC-DAD, para fins de identificação e monitoramento do perfil de canabinoides das amostras de interesse.

CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS

Os produtos farmacêuticos obtidos a partir de *C. sativa*, como quaisquer outros medicamentos, devem ser caracterizados pela constância de sua qualidade, de forma a minimizar os riscos relacionados ao seu uso e assegurar que as necessidades dos pacientes que recorrem a essas alternativas terapêuticas sejam atendidas. Nesse sentido, destaca-se a importância da definição de especificações de qualidade harmonizadas, incluindo um conjunto integrado de testes, abrangendo os aspectos de identidade, teor e pureza; com métodos analíticos validados e critérios de aceitação relevantes.

O método desenvolvido no presente trabalho para quantificação dos canabinoides CBDA, CBD, THCA, Δ^9 -THC e CBN por HPLC-DAD mostrou-se adequado à finalidade proposta. A aplicação de uma abordagem de desenvolvimento guiada pelo conceito de AQBd favoreceu a definição das condições mais adequadas para maximizar as probabilidades de obtenção da performance desejada do método. O referido método foi validado conforme as diretrizes previstas na RDC 166/2017 da Anvisa e no Guia ICH Q2 (R1), incluindo a demonstração de seu potencial indicativo de estabilidade, atendendo, portanto, aos requisitos regulatórios vigentes para o setor farmacêutico. A reprodutibilidade do método em laboratório distinto será avaliada em uma próxima etapa, não incluída no escopo do presente trabalho, mas integrada a este.

O método proposto para avaliação do perfil cromatográfico do material vegetal por TLC também apresentou uma performance dentro dos critérios desejáveis, considerando a aplicação proposta. Dadas as particularidades da técnica analítica, é necessário que algumas precauções sejam adotadas para assegurar a qualidade e a reprodutibilidade dos resultados, conforme descrito na proposta de monografia em anexo. Entende-se que a combinação dos testes de identificação botânica macroscópica e microscópica com os métodos propostos por TLC e HPLC-DAD para monitoramento do perfil de constituintes das amostras de interesse é capaz de proporcionar um conjunto de informações que permite a identificação da droga vegetal em questão de forma confiável.

Além disso, foram incluídos na proposta de monografia testes voltados ao monitoramento das principais impurezas e contaminantes passíveis de serem encontrados em inflorescências de *C. sativa*, conforme informações disponíveis na literatura e em outras monografias de qualidade da droga vegetal. Entende-se que os critérios de aceitação propostos para esses testes sejam suficientes para minimizar o risco potencial aos pacientes de exposição a esses agentes.

Assim, o presente trabalho buscou propor um conjunto de especificações de qualidade pertinentes para o material em questão, com embasamento nas informações acessadas a partir da literatura técnico-científica disponível à época e nos conhecimentos práticos adquiridos durante a condução do estudo, sintetizando-as na primeira versão da minuta de monografia (Apêndice I), que deverá ser apresentada à Anvisa para avaliação. Cabe ressaltar, porém, que a referida minuta deverá passar ainda por diversas fases antes de sua aprovação, incluindo avaliação de especialistas do Comitê Técnico Temático da Farmacopeia Brasileira e submissão à consulta pública, sendo possível que ocorram adaptações e modificações ao longo dessas etapas, principalmente no que diz respeito aos critérios de aceitação propostos.

Por fim, espera-se que o presente estudo possa fornecer subsídios também para o desenvolvimento futuro de outras monografias referentes a insumos ativos vegetais distintos obtidos a partir da mesma espécie (e.g.: extratos e canabinoides isolados), mediante adaptações dos métodos já desenvolvidos às novas matrizes de interesse e complementações do conjunto de especificações propostas, considerando as peculiaridades de cada material.

REFERÊNCIAS

- [1] BONINI, S. A. et al. *Cannabis sativa*: A comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 227, May, p. 300–315, 5 Dec. 2018.
- [2] PISANTI, S.; BIFULCO, M. Modern History of Medical Cannabis: From Widespread Use to Prohibitionism and Back. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 38, n. 3, p. 195–198, 1 Mar. 2017.
- [3] KALANT, H.; PORATH-WALLER, A. J. **Dissiper la fumée entourant le cannabis : Usage de cannabis et de cannabinoïdes à des fins médicales**. Centre canadien sur les dépendances et l'usage de substances. 2016. Disponível em: <https://www.ccsa.ca/fr/dissiper-la-fumee-entourant-le-cannabis-usage-de-cannabis-et-de-cannabinoïdes-des-fins-medicales>. Acesso em: 30 mar. 2019,
- [4] KOWAL, M.; HAZEKAMP, A.; GROTENHERMEN, F. Review on clinical studies with cannabis and cannabinoids 2010-2014. **Multiple sclerosis**, v. 6, n. February, p. 1515, 2016.
- [5] MADRAS, B. K. Update of Cannabis and its medical use. **Alcohol and drug abuse research**, v. 5, n. 37, p. 1–41, 2015.
- [6] STOCKINGS, E. et al. Evidence for cannabis and cannabinoids for epilepsy: A systematic review of controlled and observational evidence. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 89, n. 7, p. 741–753, 1 Jul. 2018.
- [7] LICHTMAN, A. H. et al. Results of a Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Study of Nabiximols Oromucosal Spray as an Adjunctive Therapy in Advanced Cancer Patients with Chronic Uncontrolled Pain. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 55, n. 2, p. 179- 188.e1, 1 Feb. 2018.
- [8] ABUHASIRA, R.; SHBIRO, L.; LANDSCHAFT, Y. Medical use of cannabis and cannabinoids containing products – Regulations in Europe and North America. **European Journal of Internal Medicine**, v. 49, p. 2–6, 1 Mar. 2018.
- [9] MACKAY, R.; PHILLIPS, K. **La réglementation de la marijuana au Canada et ailleurs dans le monde**. Ottawa, Canada: Bibliothèque du Parlement, 2016.
- [10] WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cannabis and cannabis resin. Report of the Thirty-sixth Meeting of the WHO Expert Committee on Drug Dependence**. [s.l: s.n.]. 2014.
- [11] BELACKOVA, V.; SHANAHAN, M.; RITTER, A. Mapping regulatory models for medicinal cannabis: A matrix of options. **Australian Health Review**, v. 42, n. 4, p. 403–411, 2018.
- [12] BRASIL. MINISTÉRIO DAS SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Portaria n. 344, de 12 de maio de 1998**. Aprova o Regulamento Técnico sobre substâncias e medicamentos sujeitos a controle especial. **Diário**

Oficial da União, [S. l.: s. n.], 1998. Seção c, p. 29.

[13] AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **RDC nº 03 de 26 de janeiro de 2015**. Dispõe sobre a atualização do Anexo I, Listas de Substâncias Entorpecentes, Psicotrópicas, Precursoras e Outras sob Controle Especial, da Portaria SVS/MS nº 344, de 12 de maio de 1998 e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF: n. 19, 2015a. Seção 1, p. 53.

[14] AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **RDC nº 17 de 6 de maio de 2015**. Define os critérios e os procedimentos para a importação, em caráter de excepcionalidade, de produto à base de Canabidiol em associação com outros canabinóides, por pessoa física, para uso próprio, mediante prescrição de profissional legalmente habilitado, para tratamento de saúde (Revogado pela RDC/ANVISA no 335 de 24/01/2020). **Diário Oficial da União**, Brasília, DF: n. 86, 2015b. Seção 1, p. 50.

[15] OLIVEIRA, M. B. A regulamentação do canabidiol no Brasil: como nasce a expertise leiga | Cannabidiol regulation in Brazil: how lay expertise is born. **Liinc em Revista**, v. 13, n. 1, p. 190–204, 6 Jun. 2017.

[16] AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Nota Técnica nº 01/2017/GMESP/GGMED/ANVISA**. Brasília: [s. n.], 2017.

[17] AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **RDC n. 327 de 9 de dezembro de 2019**. Dispõe sobre os procedimentos para a concessão da Autorização Sanitária para a fabricação e a importação, bem como estabelece requisitos para a comercialização, prescrição, a dispensação, o monitoramento e a fiscalização de produtos de Cannabis para fins medicinais, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF: n. 239, 2019. Seção 1, p. 194.

[18] AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **RDC n. 335 de 24 de janeiro de 2020**. Define os critérios e os procedimentos para a importação de Produto derivado de Cannabis, por pessoa física, para uso próprio, mediante prescrição de profissional legalmente habilitado, para tratamento de saúde. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, Brasil: n. 18, 2020. Seção 1, p. 54.

[19] CRIPPA, J. A. S. et al. Δ^9 -THC intoxication by cannabidiol-enriched cannabis extract in two children with refractory epilepsy: Full remission after switching to purified cannabidiol. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, n. SEP, p. 1–6, 2016.

[20] BRASIL. CÂMARA DOS DEPUTADOS. PROJETO DE LEI Nº 399 de 02 de fevereiro de 2015. 2015, p. 1–4.

[21] SARMA, N. D. et al. Cannabis Inflorescence for Medical Purposes: USP Considerations for Quality Attributes. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 4, p. 1334–1351, 13 Apr. 2020.

[22] GIANCASPRO, G. I. et al. Stimuli to the revision process: The advisability and feasibility of developing USP standards for medical cannabis. **Pharmacopeial Forum**, v. 42, n. 1, p. 1–8, 2016.

[23] **The Plant List**. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/>>. Acesso em: 25

jan. 2021.

[24] SMALL, E. Evolution and Classification of *Cannabis sativa* (Marijuana, Hemp) in Relation to Human Utilization. **The Botanical Review**, v. 81, n. 3, p. 189–294, 19 Sep. 2015.

[25] CLARKE, R. C.; MERLIN, M. D. Cannabis Taxonomy: The ‘Sativa’ Vs. ‘Indica’ Debate. **HerbalGram**, v. 110, n. January, p. 44–49, 2016.

[26] UPTON, R. et al. Cannabis Inflorescence and Leaf. In: **American Herbal Pharmacopoeia**. [s.l: s.n.]. 2013. p. 1–64.

[27] HILLIG, K. W. Genetic evidence for speciation in *Cannabis* (Cannabaceae). **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 52, n. 2, p. 161–180, 2005.

[28] SMALL, E.; CRONQUIST, A. A Practical and Natural Taxonomy for Cannabis. **Taxon**, v. 25, n. 4, p. 405–435, Aug. 1976.

[29] UNODC. **Recommended Methods for the Identification and Analysis of Cannabis and Cannabis Products**. [s.l: s.n.], 2013.

[30] MÜLLER, W. O. **Illustration of *Cannabis sativa* L.** Disponível em: <<http://www.illustratedgarden.org>>. Acesso em: 28 jan. 2021.

[31] LEWIS, M. M. et al. Chemical Profiling of Medical Cannabis Extracts. **ACS Omega**, v. 2, n. 9, p. 6091–6103, 2017.

[32] ELSOHLY, M. A.; SLADE, D. Chemical constituents of marijuana: The complex mixture of natural cannabinoids. **Life Sciences**, v. 78, n. 5, p. 539–548, 2005.

[33] ELSOHLY, M. A. et al. Phytochemistry of *Cannabis sativa* L. **Progress in the chemistry of organic natural products**, v. 103, p. 1–36, 2017.

[34] HANUŠ, L. O. et al. Phytocannabinoids: A unified critical inventory. **Natural product reports**, v. 33, n. 12, p. 1357-1392, 2016.

[35] MICALIZZI, G. et al. *Cannabis Sativa* L.: a comprehensive review on the analytical methodologies for cannabinoids and terpenes characterization. **Journal of Chromatography A**, v. 1637, 25 Jan. 2021.

[36] ATAKAN, Z. Cannabis, a complex plant: Different compounds and different effects on individuals. **Therapeutic Advances in Psychopharmacology**, v. 2, n. 6, p. 241–254, 2012.

[37] ONOFRI, C.; MEIJER, E. P. M. DE; MANDOLINO, G. Sequence heterogeneity of cannabidiolic- and tetrahydrocannabinolic acid-synthase in *Cannabis sativa* L. and its relationship with chemical phenotype. **Phytochemistry**, v. 116, n. 1, p. 57–68, Aug. 2015.

[38] POTTER, D. J. A review of the cultivation and processing of cannabis (*Cannabis sativa* L.) for production of prescription medicines in the UK. **Drug**

Testing and Analysis, v. 6, n. 1–2, p. 31–38, 2014.

[39] RUSSO, E. B. Taming THC: Potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. **British Journal of Pharmacology**, v. 163, n. 7, p. 1344–1364, 2011.

[40] HARTSEL, J. A. et al. **Cannabis sativa and Hemp**. [s.l.] Elsevier Inc., 2016.

[41] CALVI, L. et al. Comprehensive quality evaluation of medical *Cannabis sativa* L. inflorescence and macerated oils based on HS-SPME coupled to GC–MS and LC-HRMS (q-exactive orbitrap®) approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 150, p. 208–219, Feb. 2018.

[42] RUSSO, E. B.; MARCU, J. Cannabis Pharmacology: The Usual Suspects and a Few Promising Leads. In: **Advances in Pharmacology**. [s.l.] Academic Press Inc., 2017. v. 80p. 67–134.

[43] BROSÉUS, J.; ANGLADA, F.; ESSEIVA, P. The differentiation of fibre- and drug type Cannabis seedlings by gas chromatography/mass spectrometry and chemometric tools. **Forensic Science International**, v. 200, n. 1–3, p. 87–92, 2010.

[44] CONSEIL DE L'UNION EUROPÉENNE. Proposition de règlement (CE) du Conseil modifiant le règlement (CE) no 1251/1999. . 29 Feb. 2000.

[45] COMMISSION DES COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES. **Règlement (CE) n° 327/2002 de la commission** **Journal officiel des Communautés européennes**, 22 Feb. 2002.

[46] HILLIG, K. W.; MAHLBERG, P. G. A chemotaxonomic analysis of cannabinoid variation in Cannabis (Cannabaceae). **American Journal of Botany**, v. 91, n. 6, p. 966–975, 2004.

[47] GALAL, A. M. et al. Naturally occurring and related synthetic cannabinoids and their potential therapeutic applications. **Recent Patents on CNS Drug Discovery**, v. 4, n. 2, p. 112–136, 2009.

[48] MARZO, V. DI; BIFULCO, M.; PETROCELLIS, L. DE. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 9, p. 771–784, 2004.

[49] LU, H.-C.; MACKIE, K. An Introduction to the Endogenous Cannabinoid System. **Biological Psychiatry**, v. 79, n. 7, p. 516–525, 2016.

[50] PERTWEE, R. G. The diverse CB 1 and CB 2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: Δ^9 -tetrahydrocannabinol, cannabidiol and Δ^9 -tetrahydrocannabivarin. **British Journal of Pharmacology**, v. 153, n. 2, p. 199–215, Jan. 2008.

[51] AMIN, M. R.; ALI, D. W. Pharmacology of Medical Cannabis. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1162, p. 151–165, 2019.

- [52] TURNER, S. E. et al. Molecular Pharmacology of Phytocannabinoids. In: **Phytocannabinoids: Unraveling the Complex Chemistry and Pharmacology of *Cannabis sativa***. [s.l.], 2017, p. 61–101.
- [53] KINGHORN, A. D. et al. **Phytocannabinoids**. Cham: Springer International Publishing, 2017. v. 103
- [54] RUSSO, E. B. Current therapeutic cannabis controversies and clinical trial design issues. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, n. 309, 14 Sep. 2016.
- [55] HAZEKAMP, A.; GROTENHERMEN, F. Review on clinical studies with cannabis and cannabinoids. **Cannabinoids**, v. 5, p. 1–21, 2010.
- [56] KUMAR VERMA, N.; SINGH, A. K.; MAURYA, A. Pharmacological Properties of $\Delta(9)$ - Tetrahydrocannabinol: A Review. **EAS Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 3, n. 1, p. 13–20, 2021.
- [57] LEGARE, C. A.; RAUP-KONSAVAGE, W. M.; VRANA, K. E. Therapeutic Potential of Cannabis, Cannabidiol, and Cannabinoid-Based Pharmaceuticals. **Pharmacology**, v. 107, n. 3–4, p. 131–149, 2022.
- [58] EUROPEAN MONITORING CENTRE FOR DRUGS AND DRUG ADDICTION (EMCDDA). **Medical use of cannabis and cannabinoids: questions and answers for policymaking** Publications Office of the European Union, Luxembourg. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <http://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/10171/20185584_TD0618186ENN_PDF.pdf>. Acesso em: 1 fev. 2021.
- [59] WHITING, P. F. et al. Cannabinoids for Medical Use A Systematic Review and Meta-analysis. **JAMA**, v. 313, n. 24, p. 2456–2473, 23 Jun. 2015.
- [60] PERTWEE, R. **Handbook of Cannabis**. [s.l.] Oxford University Press, 2014.
- [61] PENG, J. et al. A narrative review of molecular mechanism and therapeutic effect of cannabidiol (CBD). **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, 2022.
- [62] BHATTACHARYYA, S. et al. Induction of psychosis by Δ^9 -tetrahydrocannabinol reflects modulation of prefrontal and striatal function during attentional salience processing. **Archives of General Psychiatry**, v. 69, n. 1, p. 27–36, 2012.
- [63] NGUYEN, L. C. et al. Cannabidiol inhibits SARS-CoV-2 replication through induction of the host ER stress and innate immune responses. **Science Advances**, v. 8, n. 8, p. 6110, 25 Feb. 2022.
- [64] WANG, B. et al. In search of preventive strategies: novel high-CBD *Cannabis sativa* extracts modulate ACE2 expression in COVID-19 gateway tissues. **Ageing**, v. 12, n. 22, p. 22425–22440, 2020.
- [65] CRIPPA, J. A. S. et al. Efficacy and safety of cannabidiol plus standard care vs standard care alone for the treatment of emotional exhaustion and burnout among frontline health care workers during the COVID-19 pandemic. **JAMA**

Network Open, v. 4, n. 8, p. e2120603, 13 Aug. 2021.

[66] ZUARDI, A. W. et al. Cannabidiol, a Cannabis sativa constituent, as an antipsychotic drug. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, n. 4, p. 421–429, 2006.

[67] BERKOVIC, S. F. Cannabinoids for Epilepsy - Real Data, at Last. **New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 21, p. 2075–2076, 2017.

[68] DEVINSKY, O. et al. Trial of cannabidiol for drug-resistant seizures in the dravet syndrome. **New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 21, p. 2011–2020, 2017.

[69] FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Approval Letter. Application number 210365Orig1s000.** Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2018/210365Orig1s000A_pprov.pdf>. Acesso em 15 fev. 2021.

[70] EUROPEAN MEDICINES AGENCY. **Epidiolex Assessment Report**, 2019.

[71] CASCIO, M. G. et al. Evidence that the plant cannabinoid cannabigerol is a highly potent α 2-adrenoceptor agonist and moderately potent 5HT 1A receptor antagonist. **British Journal of Pharmacology**, v. 159, n. 1, p. 129–141, 2010.

[72] NACHNANI, R.; RAUP-KONSAVAGE, W. M.; VRANA, K. E. The Pharmacological Case for Cannabigerol. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 376, n. 2, p. 204–212, Feb. 2021.

[73] PESCHEL, W. Quality control of traditional Cannabis tinctures: Pattern, markers, and stability. **Scientia Pharmaceutica**, v. 84, n. 3, p. 567–584, 2016.

[74] RUSSO, E.; GROTENHERMEN, F. **The Handbook of Cannabis Therapeutics: From Bench to Bedside**. Routledge: 2014, 496 p.

[75] PESCHEL, W. **Cannabis extracts for medicinal use - chemical profiling and *in vitro* anti-inflammatory and cytotoxic effects**. 2009. University of London. 2009.

[76] ALVES, P. et al. *Cannabis sativa*: Much more beyond Δ^9 -tetrahydrocannabinol. **Pharmacological Research**, v. 157, n. February, p. 104822, 2020.

[77] KLUMPERS, L. E.; THACKER, D. L. A Brief Background on Cannabis: From Plant to Medical Indications. **Journal of AOAC International**, v. 102, n. 2, p. 412–420, 1 Mar. 2019.

[78] BLACK, N. et al. Cannabinoids for the treatment of mental disorders and symptoms of mental disorders: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Psychiatry**, v. 6, n. 12, p. 995–1010, 1 Dec. 2019.

[79] KOLTAI, H.; NAMDAR, D. Cannabis Phytomolecule “Entourage”: From Domestication to Medical Use. **Trends in Plant Science**, v. 25, n. 10, p. 976–984,

1 Oct. 2020.

[80] FIDYT, K. et al. β -caryophyllene and β -caryophyllene oxide - natural compounds of anticancer and analgesic properties. **Cancer Medicine**, v. 5, n. 10, p. 3007–3017, 1 Oct. 2016.

[81] HEALTH PRODUCTS REGULATORY AUTHORITY. **Cannabis for Medical Use - A Scientific Review**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.hpra.ie/homepage/about-us/publications-forms/newsletters/item?id=7cb50726-9782-6eee-9b55-ff00008c97d0>>. Acesso em 15 fev 2021.

[82] BROWN, J. D. et al. Natural and Synthetic Cannabinoids: Pharmacology, Uses, Adverse Drug Events, and Drug Interactions. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 61, n. S2, p. S37–S52, 15 Aug. 2021.

[83] FORTI, M. DI et al. The contribution of cannabis use to variation in the incidence of psychotic disorder across Europe (EU-GEI): a multicentre case-control study. **The Lancet Psychiatry**, v. 6, n. 5, p. 427–436, 1 May 2019.

[84] DINIS-OLIVEIRA, R. J. The clinical toxicology perspective on the therapeutic use of cannabis and cannabinoids. **Acta Medica Portuguesa**, v. 32, n. 2, p. 87–90, 1 Feb. 2019.

[85] FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Botanical Drug Development - Guidance for industry. . 2016, p. 1–30.

[86] CITTI, C. et al. Pharmaceutical and biomedical analysis of cannabinoids: A critical review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 147, p. 565–579, 2018.

[87] DEUTSCHES ARZNEIBUCH. **Monographien Cannabisblüten-Cannabis Flos**, 2018.

[88] BUREAU VOOR MEDICINALE CANNABIS. **Monograph Cannabis Flos Versión 7.1**. Disponível em: <<https://www.cannabisbureau.nl/arts-en-apotheker/documenten/richtlijnen/2017/12/01/monograph-cannabis-flos>>. Acesso em: 8 fev. 2021.

[89] SUNDHEDS-OG ÆLDREMINISTERIET. **Cannabisblomst (Cannabis flos)**. Disponível em: <<https://www.retsinformation.dk/eli/Ita/2019/151>>. Acesso em: 8 fev. 2021.

[90] NEW ZEALAND. **Misuse of Drugs (Medicinal Cannabis) Regulations 2019** Ministry of Health, , 16 Dec. 2019. Disponível em: <<https://www.legislation.govt.nz/regulation/public/2019/0321/latest/d17025431e88.html>>. Acesso em: 15 fev. 2021

[91] UPTON R.H. Traditional Herbal Medicine, Pharmacognosy, and Pharmacopoeial Standards. In: **Evidence-Based Validation of Herbal Medicine**. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 45–85.

- [92] BELWAL, T. et al. A critical analysis of extraction techniques used for botanicals: Trends, priorities, industrial uses and optimization strategies. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 100, p. 82–102, 2018.
- [93] KLEIN-JUNIOR, L. C. et al. Quality Control of Herbal Medicines: From Traditional Techniques to State-of-the-art Approaches. **Planta Medica**, v. 87, n. 12/13, p. 964–988, 19 Oct. 2021.
- [94] OJHA, K. S. et al. Ultrasound technology for the extraction of biologically active molecules from plant, animal and marine sources. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 122, 2020.
- [95] HAMMOND, C. T.; MAHLBERG, P. G. Morphology of Glandular Hairs of *Cannabis sativa* from Scanning Electron Microscopy. **American Journal of Botany**, v. 60, n. 6, p. 524, 1973.
- [96] MEIER, B.; SPRIANO, D. Modern HPTLC - A perfect tool for quality control of herbals and their preparations. **Journal of AOAC International**, v. 93, n. 5, p. 1399–1409, 2010.
- [97] UPTON, R. et al. Botanical ingredient identification and quality assessment: strengths and limitations of analytical techniques. **Phytochemistry Reviews**, v. 19, n. 5, p. 1157–1177, 2020.
- [98] FISCHEDICK, J. T. et al. A qualitative and quantitative HPTLC densitometry method for the analysis of cannabinoids in *Cannabis sativa* L. **Phytochemical Analysis**, v. 20, n. 5, p. 421–426, 2009.
- [99] SHERMA, J.; RABEL, F. Thin layer chromatography in the analysis of cannabis and its components and synthetic cannabinoids. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 42, n. 19–20, p. 613–628, 2019.
- [100] HAZEKAMP, A. et al. Chromatographic and spectroscopic data of cannabinoids from *Cannabis sativa* L. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 28, n. 15, p. 2361–2382, 2005.
- [101] GALAND, N. et al. Separation and Identification of Cannabis Components by Different Planar Chromatography Techniques (TLC, AMD, OPLC). **Journal of Chromatographic Science**, v. 42, n. 3, p. 130–134, 2004.
- [102] NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **PubChem Compound LCSS for CID 16219275, Fast Blue B Salt**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Fast-Blue-B-Salt#datasheet=LCSS>>. Acesso em: 11 mai. 2021.
- [103] DEUTSCHES ARZNEIBUCH. **Monographien Eingestellter Cannabis Extrakt-Cannabis Extractum Normatum**, 2019.
- [104] WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas**. Second edi ed. [s.l.] Springer, 1996.
- [105] HPTLC ASSOCIATION. **HPTLC Association: Methods**. Disponível em:

<<https://www.hptlc-association.org/methods/methods.cfm>>. Acesso em: 5 feb. 2021.

[106] JIANG, Z.; KEMPINSKI, C.; CHAPPELL, J. Extraction and Analysis of Terpenes/Terpenoids. **Current Protocols in Plant Biology**, v. 1, n. 2, p. 345–358, 1 Mar. 2016.

[107] BORILLE, B. et al. Cannabis sativa: A systematic review of plant analysis. **Drug Analytical Research**, v. 1, n. 1, p. 1–23, 28 Aug. 2017.

[108] NAHAR, L.; ONDER, A.; SARKER, S. D. A review on the recent advances in HPLC, UHPLC and UPLC analyses of naturally occurring cannabinoids (2010–2019). **Phytochemical Analysis**, v. 31, n. 4, p. 413–457, 17 Jul. 2020.

[109] BACKER, B. DE et al. 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: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 877, n. 32, p. 4115–4124, 2009.

[110] SWIFT, W. et al. Analysis of Cannabis Seizures in NSW, Australia: Cannabis Potency and Cannabinoid Profile. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e70052, 24 Jul. 2013.

[111] SLIJKHUIS, C. et al. **Quality Standards for Medicinal Cannabis (Kwaliteitsnormen Medicinale Cannabis)**. March, 2004.

[112] MEDICINAL CANNABIS AGENCY. **Guideline on the Regulation of Medicinal Cannabis in New Zealand**. [s.l: s.n.].

[113] INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE (ICH). **Pharmaceutical Development Q8(R2)**, Aug. 2009.

[114] PASQUINI, B. et al. Quality by Design as a risk-based strategy in pharmaceutical analysis: Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of nintedanib and its impurities. **Journal of Chromatography A**, v. 1611, p. 460615, Jan. 2020.

[115] DEIDDA, R. et al. Risk-based approach for method development in pharmaceutical quality control context: A critical review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 161, p. 110–121, 2018.

[116] CHAVES, J. A. P. **Aplicação do princípio de *Quality by Design* no processo de desenvolvimento analítico de métodos indicativos de estabilidade**. Rio de Janeiro: [s.n.].

[117] RAMAN, N. V. V. S. S.; MALLU, U. R.; BAPATU, H. R. Analytical Quality by Design Approach to Test Method Development and Validation in Drug Substance Manufacturing. **Journal of Chemistry**, v. 2015, 2015.

[118] ROZET, E. et al. Analytical procedure validation and the quality by design paradigm. **Journal of Biopharmaceutical Statistics**, v. 25, n. 2, p. 260–268,

2015.

[119] BEZERRA, M. A. et al. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, n. 5, p. 965–977, 2008.

[120] SAHU, P. K. et al. An overview of experimental designs in HPLC method development and validation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 147, p. 590–611, Jan. 2018.

[121] DEBRUS, B. et al. A new method for Quality by Design robust optimization in liquid chromatography. **LC-GC Europe**, n. July, p. 2–8, 2013.

[122] LEBRUN, P. et al. Development of a new predictive modelling technique to find with confidence equivalence zone and design space of chromatographic analytical methods. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 91, n. 1, p. 4–16, 2008.

[123] NOVAES, C. G. et al. A review of multivariate designs applied to the optimization of methods based on inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES). **Microchemical Journal**, v. 128, p. 331–346, 2016.

[124] DEJAEGHER, B.; HEYDEN, Y. VANDER. The use of experimental design in separation science. **Acta Chromatographica**, v. 21, n. 2, p. 161–201, 2009.

[125] FERREIRA, S. L. C. et al. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 597, n. 2, p. 179–186, 2007.

[126] BREITKREITZ, M. C.; JARDIM, I. C. S. F.; BRUNS, R. E. Combined column-mobile phase mixture statistical design optimization of high-performance liquid chromatographic analysis of multicomponent systems. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 9, p. 1439–1449, 2009.

[127] WHO. Quality control methods for medicinal plant materials World Health Organization Geneva. **Who**, 1998.

[128] WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Good Pharmacopoeial Practices: Chapter on monographs on herbal medicines**. Geneva: World Health Organization, 2020.

[129] BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia Brasileira**. 6^a Edição ed. [s.l.] Agência Nacional de Vigilância Saniitária, 2019. v. 1

[130] UNITED STATES PHARMACOPOEIAL CONVENTION. Identification of Articles of Botanical Origin. In: **USP-NF**. Rockville, MD: United States Pharmacopeia, 2020.

[131] NASCIMENTO, I. C. DO. **Tricomas secretores em espécies de Cannabaceae e Ulmaceae**. 2017. 78 f. Universidade de São Paulo. 2017.

[132] UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. **The International**

Drug Control Conventions. New York: UODC, 2013.

[133] CSETE, J. et al. Public health and international drug policy. **The Lancet**, v. 387, n. 10026, p. 1427–1480, Apr. 2016.

[134] UNITED NATIONS. **Commentary on the Single Convention on narcotic drugs, 1961.** New York, 1973. Disponível em: <<https://trove.nla.gov.au/work/10876569>>. Acesso em: 14 set. 2020

[135] CAMPBELL, G.; STOCKINGS, E.; NIELSEN, S. Understanding the evidence for medical cannabis and cannabis-based medicines for the treatment of chronic non-cancer pain. **European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience**, v. 269, n. 1, p. 135–144, 1 Feb. 2019.

[136] 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.

[137] UNITED NATIONS COMMISSION ON NARCOTIC DRUGS. **CND Press Statement.** Disponível em: <https://www.unodc.org/documents/commissions/CND/CND_Sessions/CND_63Reconvened/Press_statement_CND_2_December.pdf>. Acesso em: 14 dez. 2020.

[138] 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: 25 fev. 2021.

[139] ALVES, M. The Natural Fallacy in a Post-Truth era. **EMBO reports**, v. 21, n. 2, p. e49859, 5 Feb. 2020.

[140] BAPTISTA-LEITE, R.; PLOEG, L. The Road towards the Responsible and Safe Legalization of Cannabis Use in Portugal. **Acta Médica Portuguesa**, v. 31, n. 2, p. 115, 28 Feb. 2018.

[141] SEDDON, T.; FLOODGATE, W. **Regulating Cannabis.** Cham: Springer International Publishing, 2020.

[142] DINIS-OLIVEIRA, R. J. A Perspetiva da Toxicologia Clínica Sobre a Utilização Terapêutica da Cannabis e dos Canabinoides. **Acta Médica Portuguesa**, v. 32, n. 2, p. 87, 28 Feb. 2019.

[143] REICH, E.; SCHIBLI, A.; DEBATT, A. Validation of High-Performance Thin-Layer Chromatographic Methods for the Identification of Botanicals in a cGMP Environment. **Journal of AOAC International**, v. 91, n. 1, p. 13–20, 1 Jan. 2008.

[144] AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **RDC nº 166, de 24 de julho de 2017.** Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF: n. 141, 2017. Seção 1, p.87.

[145] ICH. **ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology** International Conference on Harmonization. ICH, 2005.

APÊNDICE I

PROPOSTA DE MONOGRAFIA PARA A FARMACOPEIA BRASILEIRA

Canabis, Inflorescência

Cannabis flos

A droga vegetal consiste de inflorescências femininas e secas, inteiras ou fragmentadas, de *Cannabis sativa* L., contendo no mínimo 80 % e no máximo 120% dos valores declarados dos canabinoides Δ^9 -tetraidrocanabinol ($C_{21}H_{30}O_2$, 314,5), canabidiol ($C_{21}H_{30}O_2$, 314,5), ácido tetraidrocanabinólico ($C_{22}H_{30}O_4$, 358,5) e ácido canabidiólico ($C_{22}H_{30}O_4$, 358,5); e não mais que 1% de canabinol ($C_{21}H_{26}O_2$, 310,4), em relação à droga seca.

IDENTIFICAÇÃO

A. Descrição macroscópica

Inflorescência feminina em cimeira compacta parecendo glomeruliforme, esverdeada a marrom-esverdeada, medindo de 1 cm a 6 cm de comprimento e aproximadamente igual largura, com inúmeras flores femininas axilares, sésseis, agrupadas e escondidas por numerosas pequenas brácteas foliáceas de coloração verde pálida, mais algumas longas e mais escuras, que se sobressaem da inflorescência. Inflorescências bem floridas deixam expostas as projeções estigmáticas alaranjadas a amarronzadas das flores femininas. Brácteas foliáceas inteiras e lanceoladas a romboedro-longo-apiculadas ou recortadas, então com uma ou mais expansões basais laterais, até visivelmente trifolioladas, com bordos levemente serreados, cobertas ao longo da lâmina e de seus bordos por tricomas glandulares pegajoso-resinosos, de pedicelos curtos a longos, além de tricomas simples, rijos, mais longos do que os glandulares, dispostos nos bordos e lâminas da porção mediano-basal de cada bráctea. As bractéolas têm bordos inteiros a levemente serrados e apresentam tricomas glandulares principalmente nos bordos e lâminas. Cada flor é formada por um ou dois ovários envolvidos por um involúcro cupuliforme, sendo cada ovário continuado pelo estigma que, por sua vez, apresenta duas longas ramificações filiformes alaranjadas a amarronzadas, articulados na base, e cobertos por numerosas papilas. A flor feminina mede de 5 mm a 9 mm de comprimento no total, raro mais, sendo que o ovário mede até 2 mm e os estiletos de 3 mm a 7 mm, raro mais. Frutos, quando presentes, são aquênios ovoides a quase globosos, uniloculares, monospermicos, medindo cerca de 2 mm de diâmetro, com coloração branca esverdeada ou amarronzada.

B. Descrição microscópica

As brácteas da inflorescência, em vista frontal, mostram, na face superior ou adaxial da epiderme, células poligonais com estrias epicuticulares e raros tricomas unicelulares curtos e volumosos, de paredes espessadas, com inclusões sólidas do tipo cistólito de carbonato de cálcio. A face inferior ou abaxial da epiderme apresenta células menores do que a adaxial, com paredes anticlinais bastante sinuosas, estômatos anomocíticos, tricomas glandulares de pedicelo pluricelular e plurisseriado, terminado por 2 a 4 células, que suportam uma cabeça globulosa formada por 8 a 16 células, com disposição radial, além de pequenos tricomas glandulares de pedicelo unicelular e cabeça com poucas células, tricomas sésseis de cabeça glandular, e tricomas tectores unicelulares, longos, de paredes espessadas, não cistolíticos ou mais raro com um cistólito na base. Em secção transversal, a face adaxial da epiderme das brácteas é uniestratificada, com tricomas glandulares pequenos e esparsos tricomas cistolíticos; abaixo um tecido clorenquimático de aspecto paliçádico denso, onde podem ser vistos numerosos cristais de oxalato de cálcio do tipo drusas, isolados ou agrupados. O parênquima descrito pode ser seguido ou não de algumas células arredondadas. A face abaxial da epiderme também é uniestratificada, com numerosos estômatos; tricomas glandulares de pedicelo curto ou longo; tricomas glandulares sésseis; e tricomas simples, de paredes espessas, retos ou levemente curvados, com ou sem cistólitos na sua porção basal. As bractéolas têm aspecto muito semelhante nas epidermes, células de tecido clorenquimático de aspecto paliçádico menos visível e tricomas como os descritos.

C. Descrição microscópica do pó

A amostra atende a todas as exigências estabelecidas para a espécie, exceto os caracteres macroscópicos. A observação microscópica do pó torna-se mais clara quando utilizado hipoclorito de sódio SR. São características: coloração esverdeada a amarronzada; porções de ramificações estigmáticas recobertas de papilas estigmáticas alongadas, de paredes finas, arredondadas na porção apical; porções de células da epiderme com restos de parênquima clorofílico; porções de células da epiderme com tricomas unicelulares grandes, de paredes espessadas, contendo cistólitos, aprofundados em relação às demais células; porções da epiderme com tricomas glandulares como os descritos; porções de epiderme com tricomas simples, como os descritos; porções do invólucro cupuliforme do ovário com epiderme de células pequenas, poligonais ou sinuosas, de paredes muito finas; tricomas glandulares e tricomas tectores, cistolíticos ou simples, esparsos no pó; porções de cabeças glandulares e porções de pedicelos pluricelulares e plurisseriados de tricomas, separados da cabeça glandular; numerosas porções de papilas estigmáticas; cristais de oxalato de cálcio e cistólitos de carbonato de cálcio esparsos no pó ou em restos de tecidos.

D. Proceder conforme descrito em *Cromatografia em camada delgada* (5.2.17.1)

Fase estacionária: Sílica-gel G F₂₅₄ (0,2 mm).

Fase móvel: Hexano, acetato de etila e metanol (85:10:5), acidificada com ácido acético glacial (0,2% v/v).

Solução amostra: Utilizar a *solução amostra* preparada conforme descrito em *Doseamento para ácido canabidiólico, ácido tetraidrocanabinólico, canabidiol e Δ^9 -tetraidrocanabinol*

Solução de referência: Preparar uma solução mista dos padrões dos canabinoides ácido canabidiólico (CBDA), ácido tetraidrocanabinólico (THCA), canabinol (CBN), canabidiol (CBD) e Δ^9 -tetraidrocanabinol (Δ^9 -THC), a 25 $\mu\text{g/mL}$, em metanol.

Procedimento: Pré-condicionar a cromatoplaça realizando uma etapa de eluição prévia com metanol PA. Levar a cromatoplaça à estufa (100 a 110°C) até completa secagem e utilizar em seguida. Aplicar na cromatoplaça, separadamente, 10 μL da *Solução amostra* e 25 μL da *Solução referência*, em forma de bandas (6 a 8 mm de largura), respeitando o espaçamento mínimo de 3mm entre as bandas, de 10 mm da base e de 15 mm das laterais da placa. Desenvolver o cromatograma em câmara de eluição previamente saturada, sem utilizar papel de filtro. Remover a cromatoplaça, deixar secar ao ar e, em seguida, examinar sob luz ultravioleta (254 nm). A seguir, nebulizar a cromatoplaça com *vanilina sulfúrica SR* e aquecer em estufa entre 100 e 105°C durante 5 minutos. Examinar sob luz visível.

Crítérios de aceitação: O esquema a seguir apresenta os padrões de zonas que se espera observar nos cromatogramas correspondentes à *Solução de referência* e à *Solução amostra*, sendo que, para esta última, o perfil cromatográfico observado é dependente do quimiotipo. No caso das amostras pertencentes ao quimiotipo I (THC-dominante), a zona correspondente ao canabinol (CBN) pode não ser observada, principalmente em amostras recentes. Quando presente, é geralmente menos intensa em comparação à zona correspondente ao Δ^9 -tetraidrocanabinol (Δ^9 -THC), sendo o aumento de sua intensidade indicativo de degradação. Outras zonas podem, ocasionalmente, estar presentes. Entre os outros constituintes passíveis de detecção, destacam-se o ácido canabigerólico (CBGA), que apresenta fator de retenção inferior ao do ácido canabidiólico; o canabigerol (CBG), que apresenta fator de retenção intermediário entre o do ácido tetraidrocanabinólico e o do canabinol; e o Δ^8 -tetraidrocanabinol (Δ^8 -THC), que apresenta fator de retenção ligeiramente superior ao do Δ^9 -tetraidrocanabinol.

Parte superior da placa			
Δ^9 -THC: zona de coloração violeta CBD: zona de coloração violeta CBN: zona de coloração rosada	zona de coloração violeta zona de coloração rosada	zona de coloração violeta zona de coloração violeta	zona de coloração violeta
THCA: zona de coloração violeta CBDA: zona de coloração violeta	zona de coloração violeta intensa	zona de coloração violeta intensa zona de coloração violeta intensa	zona de coloração violeta intensa
Solução de referência	Solução amostra (quimiotipo I, THC-dominante)	Solução amostra (quimiotipo II, intermediário)	Solução amostra (quimiotipo III, CBD-dominante)

Adequabilidade do sistema: O cromatograma correspondente à *Solução de referência* deve apresentar, após revelação com *vanilina sulfúrica SR*, cinco zonas distintas e bem resolvidas, de intensidades semelhantes, com o padrão de distribuição indicado no esquema acima.

E.Proceder conforme descrito em *Cromatografia a líquido de alta eficiência* (5.2.17.4), utilizando as condições descritas em *Doseamento para ácido canabidiólico, ácido tetraidrocanabinólico, canabidiol e Δ^9 -tetraidrocanabinol*. Registrar os cromatogramas correspondentes à solução amostra e à solução de referência (2) e obter os espectros de absorção no ultravioleta/visível na faixa de 200 a 400 nm para os sinais majoritários com tempos de retenção (t_R) entre 4 e 30 minutos. Examinar os perfis cromatográficos obtidos.

Critérios de aceitação:

Amostras pertencentes ao quimiotipo I (THC-dominante): Os perfis cromatográficos típicos apresentam um sinal majoritário em aproximadamente 12,5 minutos; com espectro de absorção no ultravioleta caracterizado por uma banda intensa com máximo em aproximadamente 220 nm e duas outras bandas de menor intensidade, com máximos em aproximadamente 260 e 300 nm; correspondente ao ácido tetraidrocanabinólico. Também pode ser observado um sinal menos intenso em aproximadamente 26,3 minutos; com espectro de absorção no ultravioleta caracterizado por uma banda principal com máximo em aproximadamente 215 nm; correspondente ao Δ^9 -tetraidrocanabinol. Um sinal menos intenso, em aproximadamente 24,8 minutos; com espectro de absorção no ultravioleta caracterizado por duas bandas com máximos de absorção em aproximadamente 220 e 275 nm; correspondente ao canabinol, também pode estar presente, além de outros sinais minoritários com espectros de absorção semelhantes aos do ácido tetraidrocanabinólico ou do Δ^9 -tetraidrocanabinol, sendo indicativos da presença de outros canabinoides ácidos ou neutros, respectivamente (Figura 1).

Amostras pertencentes ao quimiotipo II (intermediário): Os perfis cromatográficos típicos apresentam, além dos sinais em aproximadamente 12,5 minutos e 26,3 minutos, descritos para as *amostras pertencentes ao quimiotipo I*, outros sinais notáveis em aproximadamente 6,7 minutos e 18,8 minutos; com espectros de absorção no ultravioleta semelhantes aos do ácido tetraidrocanabinólico e do Δ^9 -tetraidrocanabinol, respectivamente; sendo o primeiro correspondente ao ácido canabidiólico e o segundo ao canabidiol. Outros sinais minoritários com espectros de absorção semelhantes aos descritos também podem estar presentes, sendo indicativos da presença de outros canabinoides (Figura 1).

Amostras pertencentes ao quimiotipo III (CBD-dominante): Os perfis cromatográficos típicos apresentam um sinal majoritário em aproximadamente 6,7 minutos, correspondente ao ácido canabidiólico, sendo seu espectro de absorção semelhante ao descrito para o ácido tetraidrocanabinólico. Também pode ser observado um sinal menos intenso em aproximadamente 18,8 minutos, correspondente ao canabidiol, sendo seu espectro de absorção no ultravioleta semelhante ao descrito para o Δ^9 -tetraidrocanabinol. Outros sinais minoritários com espectros de absorção semelhantes aos descritos também podem estar presentes, sendo indicativos da presença de outros canabinoides (Figura 1).

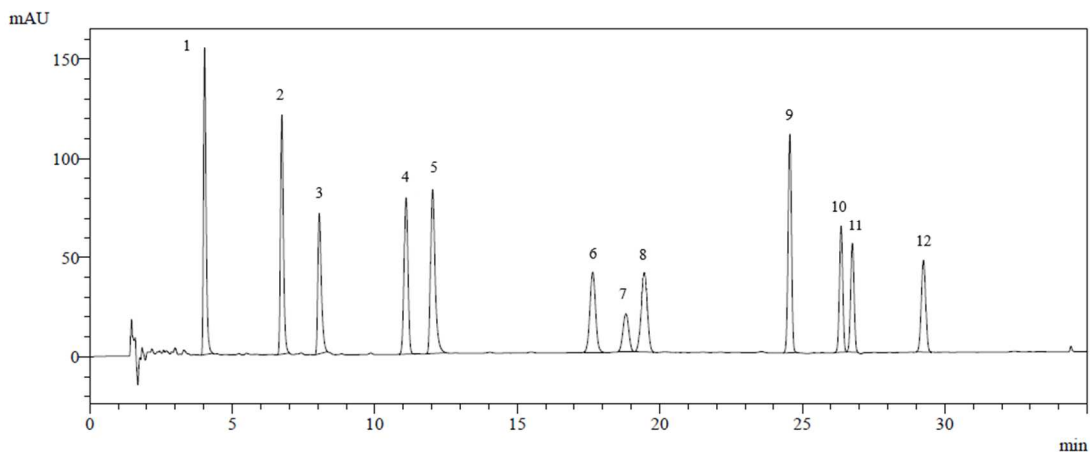


Figura 1: Cromatograma ilustrativo obtido por cromatografia a líquido de alta eficiência acoplada a detector de arranjos de diodos indicando a distribuição dos sinais analíticos correspondentes aos principais canabinoides passíveis de serem encontrados em *Cannabis sativa* L. 1- ácido canabidivarínico; 2- ácido canabidiólico; 3- ácido canabigerólico; 4- canabidivarina; 5- ácido tetraidrocanabinólico; 6- tetraidrocanabivarina; 7- canabidiol; 8- canabigerol; 9- canabinol; 10- Δ^9 -tetraidrocanabinol; 11- Δ^8 -tetraidrocanabinol; 12- canabicromeno.

TESTES

Matéria estranha (5.4.1.3). No máximo 5% de hastes com diâmetro igual ou superior a 3mm e no máximo 2% de outras matérias estranhas, incluindo frutos (aquênios). Ausência de mofo, insetos, partes podres e outras sujidades.

Cinzas totais (5.4.1.5.1). No máximo 20%

Cinzas insolúveis em ácido (5.4.1.5.3). No máximo 4%.

Perda por dessecação (5.2.9.1). Método gravimétrico. Determinar em 1,0 g da amostra em dessecador sob pressão reduzida, até peso constante. No máximo 10%.

Contagem do número de micro-organismos mesófilos (5.5.3.1.2). Cumpre o teste.

Pesquisa de micro-organismos patogênicos (5.5.3.1.3). Cumpre o teste.

Aflatoxinas (5.4.4). Cumpre o teste.

Metais pesados (5.3.2.3). Cumpre o teste.

Resíduos de agrotóxicos (5.4.3). Cumpre o teste.

Canabinol

Proceder conforme descrito em descrito em *Cromatografia a líquido de alta eficiência* (5.2.17.4), utilizando as condições descritas em *Doseamento para ácido canabidiólico, ácido tetraidrocanabinólico, canabidiol e Δ⁹-tetraidrocanabinol*. Registrar os cromatogramas e integrar a área do pico correspondente ao canabinol. O tempo de retenção médio desse analito é de aproximadamente 24,8 minutos. Calcular o teor de canabinol na amostra, utilizando seu fator de correção frente ao canabidiol ($F_c= 0,60$) e considerando a média dos resultados, segundo a expressão:

$$T_a (\%) = \frac{A_a \times 0,60 \times C_p}{10 \times A_p}$$

Em que

T_a = teor percentual do canabinol na amostra (m/m);

A_a = área do sinal analítico referente ao canabinol no cromatograma correspondente à *solução amostra*;

A_p = área do sinal analítico correspondente ao canabidiol no cromatograma correspondente à *solução de referência*;

C_p = concentração da *solução de referência* de canabidiol, em µg/mL;

10= fator de diluição, considerando a relação droga:extrato da solução amostra igual a 1 mg/mL;

0,60 = fator de correção do canabinol frente ao canabidiol, correspondente a 1/1/Fator de Resposta Relativo (FRR).

DOSEAMENTO

Ácido canabidiólico, ácido tetraidrocanabinólico, canabidiol e Δ⁹-tetraidrocanabinol

Proceder conforme descrito em *Cromatografia a líquido de alta eficiência* (5.2.17.4). Utilizar cromatógrafo provido de detector de arranjo de diodos, selecionando o comprimento de onda de 220 nm para registro dos cromatogramas; pré-coluna com sílica octadecilsilanizada e coluna de 150 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, empacotada com partículas de núcleo sólido (*core shell*) revestido por sílica octadecilsilanizada (2,6 µm), mantida a 25±1°C. Fluxo da fase móvel: 0,8 mL/minuto.

Eluente (A): mistura de água e ácido acético glacial (100:0,05), ajustar o pH para 4,40±0,05 utilizando hidróxido de amônio.

Eluente (B): acetonitrila

Tempo (minutos)	Eluente (A) (%)	Eluente (B) (%)	Eluição
0-15	44→39	56→61	gradiente linear
15-19	39	61	isocrática
19-23	39→25	61→75	gradiente linear
23-30	25	75	isocrática
30-31	25→44	75→56	gradiente linear
31-35	44	56	isocrática

Solução amostra: Pesar com exatidão 20 mg da amostra triturada e homogeneizada (granulometria entre 180 e 250 μ m), descontando-se o teor de água, e transferir para um tubo de ensaio com tampa de rosca. Adicionar 4 mL de metanol P.A., tampar o recipiente e levar a banho de ultrassom por 10 minutos. Centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos. Transferir o sobrenadante para balão volumétrico de vidro âmbar de 20 mL, preservando o material vegetal contido no tubo. Repetir o procedimento com o material reservado, utilizando o mesmo volume de solvente e o mesmo tempo de extração. Na última etapa extrativa, filtrar o conteúdo do tubo em papel de filtro, de forma a remover eventuais resíduos do material vegetal. Reunir os extratos obtidos no balão volumétrico de vidro âmbar. Completar o volume com metanol P.A. (Relação droga: extrato final: 1 mg/mL). Filtrar 2,0 mL da solução obtida em unidade filtrante de PTFE de 0,45 μ m, desprezando os primeiros 0,5 mL e transferindo o restante para um *vial* de vidro âmbar.

Solução estoque: Pesar com exatidão 20 mg do padrão analítico de canabidiol, corrigindo-se o valor conforme a pureza declarada pelo fabricante se necessário, e transferir para balão volumétrico de 2,0 mL. Adicionar 1,0 mL de metanol e levar ao banho de ultrassom durante 10 minutos ou até completa solubilização. Completar o volume com o mesmo solvente e homogeneizar. Filtrar em unidade filtrante de PTFE de 0,45 μ m, transferir a solução para frasco de vidro âmbar e vedar adequadamente. Armazenar em congelador até o momento do uso (concentração final: 10 mg/mL).

Solução de referência (1): Transferir 120 μ L da *solução estoque* de canabidiol para balão volumétrico de 20 mL. Completar o volume com metanol e homogeneizar. Filtrar a solução em unidade filtrante de PTFE de 0,45 μ m e transferir para *vial* de vidro âmbar (concentração final: 60 μ g/mL).

Solução de referência (2): Preparar uma solução contendo 25 μ g/mL de cada um dos seguintes canabinoides: ácido canabidiólico, ácido canabigerólico, ácido tetraidrocanabinólico, tetraidrocanabivarina, canabidiol, canabigerol, canabinol, Δ^9 -tetraidrocanabinol e Δ^8 -tetraidrocanabinol em acetonitrila. Transferir para um *vial* de vidro âmbar.

Procedimento: Após estabilização do sistema cromatográfico, efetuar a análise da *Solução de referência (2)* em, no mínimo, triplicata, utilizando volume de injeção de 5µL. Os critérios de aceitação descritos em *adequabilidade do sistema* devem ser atendidos nessa etapa. Efetuar as análises da *Solução de referência (1)* e da *solução amostra*, com injeções em triplicata, utilizando volume de injeção de 5µL em ambos os casos. Registrar os cromatogramas e integrar as áreas dos picos correspondentes aos canabinoides ácido canabidiólico, ácido tetraidrocanabinólico, canabidiol e Δ⁹-tetraidrocanabinol, se presentes. Os tempos de retenção médios desses analitos são de aproximadamente 6,7 minutos; 12,5 minutos; 18,8 minutos e 26,3 minutos, respectivamente. Calcular o teor dos analitos supracitados, utilizando os respectivos fatores de correção frente ao canabidiol e considerando a média dos resultados, segundo a expressão:

$$T_a (\%) = \frac{A_a \times F_c \times C_p}{10 \times A_p}$$

Em que

T_a = teor percentual do canabinoide de interesse na amostra (m/m);

A_a = área do sinal analítico de interesse no cromatograma correspondente à *solução amostra*;

A_p = área do sinal analítico correspondente ao canabidiol no cromatograma correspondente à *solução de referência*;

C_p = concentração da *solução de referência* de canabidiol, em µg/mL;

10 = fator de diluição, considerando a relação droga:extrato da solução amostra igual a 1 mg/mL;

F_c = fator de correção do canabinoide de interesse frente ao canabidiol, correspondente a 1/Fator de Resposta Relativo (FRR).

Analito	Fator de correção (F_c)
Ácido canabidiólico	0,73
Ácido tetraidrocanabinólico	0,78
Canabidiol	1,00
Canabinol	0,60
Δ ⁹ -tetraidrocanabinol	1,04

Adequabilidade do sistema

Resolução entre os picos: *Solução de referência (2)*, no mínimo 1,5 entre os pares de canabinoides canabidiol/canabigerol e Δ⁹-tetraidrocanabinol/Δ⁸-tetraidrocanabinol e no mínimo 2,0 entre os demais canabinoides.

Fator de cauda: *Solução de referência (2)*, no máximo 1,5.

Desvio padrão relativo (DPR): *Solução de referência (2)*, no máximo 2,0% para as áreas e tempos de retenção dos picos registrados nas diferentes replicatas de análise.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Em recipiente hermeticamente fechado ao abrigo da luz e do calor em temperatura inferior a 25 °C.

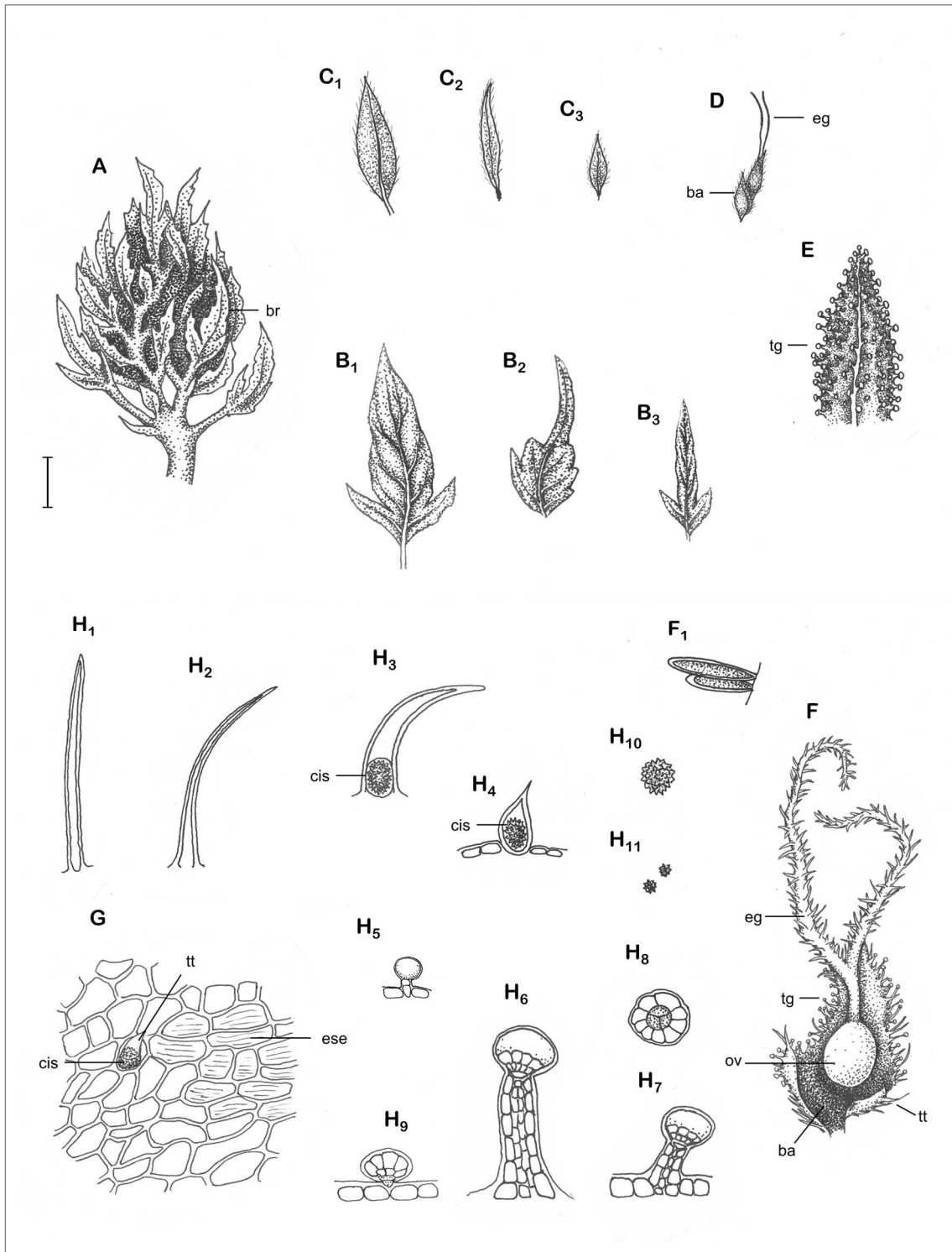


Figura 2: Aspectos macroscópicos, microscópicos e microscópicos do pó em *Cannabis sativa* L.

Complemento da legenda da **Figura 2**. A escala corresponde em **A** a 1 cm; em **B1** e **B2** a 3 mm, **B3**, **C1**, **C2** e **C3** a 2 mm; em **D** a 3 mm; em **E** e **F** a 500 micrômetros; em **F1**, **G** e **H** a 50 micrômetros.

A – aspecto geral da inflorescência feminina: bráctea (br). **B** – aspecto geral de brácteas da inflorescência feminina. **C** – aspecto geral de bractéolas da inflorescência feminina; **D** – aspecto geral de flor feminina: projeções estigmáticas (eg); bractéola (ba). **E** - extremidade de uma bractéola observada em microscopia óptica: tricomas glandulares (tg). **F** – flor feminina observada em microscopia óptica: ovário (ov); projeções estigmáticas (eg); bractéola (ba); tricomas tectores (tt) e tricomas glandulares da bractéola (tg). **F1**- detalhe das papilas estigmáticas. **G** - detalhe da face adaxial da epiderme de uma bráctea da inflorescência, em vista frontal, mostrando células epidérmicas com estrias epicuticulares (ese) e tricoma curto (tt) com cistólito (cis). **H** - tricomas e inclusões sólidas de uma bráctea; **H1**- tricoma simples unicelular, de paredes espessadas; **H2** - tricoma simples unicelular, de paredes mais finas; **H3** – tricoma simples, longo, com um cistólito basal (cis); **H4** – tricoma simples, curto, com um cistólito grande (cis); **H5** – tricoma glandular bulboso com cabeça unicelular; **H6** – tricoma glandular com pedicelo longo, pluricelular e plurisseriado; **H7** - tricoma glandular com pedicelo curto, pluricelular e plurisseriado; **H8** – cabeça de tricoma glandular, em vista frontal; **H9** tricoma glandular sésstil; **H10** – cistólito de carbonato de cálcio; **H11** – cristais de oxalato de cálcio (drusas)