



**INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

**MESTRADO EM TECNOLOGIAS LABORATORIAIS EM  
CIÊNCIAS FORENSES**

**DEVELOPMENT OF A CANNABIS-BASED  
FORMULATION/DESENVOLVIMENTO DE UMA FORMULAÇÃO  
À BASE DE CANÁBIS**

Trabalho submetido por  
**Joana Filipa Antunes Raimundo**  
para a obtenção do grau de Mestre em Tecnologias Laboratoriais em  
Ciências Forenses

**outubro de 2022**



**INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

**MESTRADO EM TECNOLOGIAS LABORATORIAIS EM  
CIÊNCIAS FORENSES**

**DEVELOPMENT OF A CANNABIS-BASED  
FORMULATION/DESENVOLVIMENTO DE UMA FORMULAÇÃO  
À BASE DE CANÁBIS**

Trabalho submetido por  
**Joana Filipa Antunes Raimundo**  
para a obtenção do grau de Mestre em Tecnologias Laboratoriais em  
Ciências Forenses

Trabalho orientado por  
**Mestre Amadeu Ribeiro**

e coorientado por  
**Mestre Paula Rato**  
**Doutora Isabel Margarida Costa**

**outubro de 2022**

## DEDICATÓRIA

À minha estrelinha que está no céu.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, queria agradecer aos meus orientadores, mestre Amadeu Ribeiro, mestre Paula Rato e ao Laboratório de Estudos Farmacêuticos (LEF) por me terem proporcionado esta oportunidade única de realizar o projeto de mestrado numa área da indústria farmacêutica que tanto me interessa, a canábis medicinal. À minha orientadora interna, prof. Doutora Isabel Margarida Costa, um agradecimento muito especial pela constante disponibilidade, prestabilidade e ajuda ao longo deste ano tão desafiante.

A todos os restantes colaboradores do LEF, nomeadamente, os analistas André Segurado, Camila Santos, Joana Martins e Rosana Fernandes pela paciência, disponibilidade e pelos conhecimentos transmitidos que, de certeza, serão muito úteis na minha carreira profissional. Aos funcionários do departamento da garantia da qualidade, Cátia Silva, Luís Santos e Soraia Bastos, e aos colaboradores do desenvolvimento farmacêutico e produção, controlo de qualidade e estabilidades, introdução de novos produtos e desenvolvimento e validação de métodos pela simpatia e boa disposição com que sempre me acolheram.

Ao meu coordenador de curso, prof. Doutor Alexandre Quintas pelo apoio prestado no decorrer deste segundo ciclo de estudos. Um obrigada a todos os meus professores do Instituto Universitário Egas Moniz por me terem transmitido os seus conhecimentos e a sua experiência nas mais variadas áreas do ramo forense. À minha instituição de ensino, Cooperativa de Ensino Superior Egas Moniz, pelo acolhimento durante estes cinco anos que me permitiram crescer a nível pessoal e profissional.

Às minhas amigas de longa data, Ana Catarina Ribeiro, Sofia Lopes e à família Sá Mendes, obrigada por estarem ao meu lado e me apoiarem durante as mais variadas etapas da minha vida. À Jéssica Chocho obrigada por me teres ensinado tanto em pouquíssimo tempo e por demonstrares ser uma verdadeira colega e amiga.

Por fim, quero agradecer aos meus pais, João Raimundo e Nídia Raimundo pelo apoio emocional e financeiro que me deram e por sempre acreditarem em mim.

## **Certificado de Originalidade**

Certifico que sou responsável pelo trabalho submetido nesta dissertação e que o trabalho é original, não sendo copiado ou plagiado de outra fonte, excetuando o especificado nas referências. Adicionalmente declaro que o trabalho em si contido não foi submetido anteriormente para qualquer outro propósito.

\_\_\_\_\_  
(Assinatura)

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

## RESUMO

A *Cannabis sativa* L. é uma planta conhecida em todo o mundo e embora seja mais frequentemente usada como droga ilícita, é uma planta medicinal altamente promissora.

Com o objetivo de desenvolver formulações à base de canábis (óleos), avaliou-se primeiramente a solubilidade dos dois extratos em três excipientes diferentes (A, B e C). No excipiente A, houve a formação de um precipitado, assim o excipiente é incompatível com os vários componentes da formulação. Os outros dois objetivos é realizar o estudo da estabilidade das formulações desenvolvidas e desenvolver e validar um método por HPLC-DAD que possa ser aplicado nas análises de rotina do Laboratório de Estudos Farmacêuticos (LEF) para o doseamento dos canabinóides  $\Delta^9$ -THC e CBD em amostras de óleo à base de canábis.

Relativamente ao estudo da estabilidade, as formulações foram desenvolvidas no excipiente B e C a 25°C e a 37°C. As formulações T0 foram analisadas por HPLC-DAD. Como se amostrou e dividiu cada formulação de modo a ser representativa de todo o lote, cada lote foi armazenado em três câmaras climáticas diferentes, a 5°C  $\pm$  3°C, a 25°C  $\pm$  2°C e a 40°C  $\pm$  2°C, durante 28 dias (T28). Por fim, nos estudos preliminares, o método analítico demonstrou ser seletivo. Os parâmetros da adequabilidade do sistema estão conforme os métodos de validação internos, à exceção do fator de simetria para o CBD. Os resultados obtidos para o THC estão dentro do intervalo aceite, à exceção dos valores 112.011, 116.39, 112.739 e 112.72 que correspondem às formulações 2B (25°C e 37°C), 3B (37°C) e 4B (25°C). No entanto, as concentrações obtidas para o CBD variam de 116.323 a 134.377, o que indica que todos os valores estão fora de especificação.

No doseamento das formulações T0, os resultados obtidos indicam que não é possível estimar qual é o melhor excipiente (B, C) nem a melhor temperatura de fabrico (25°C, 37°C) que devem ser aplicados no processo de fabrico dos óleos.

**Palavras-chave:** *Cannabis sativa* L.; formulações à base de canábis; canabinóides; HPLC-DAD.

## **ABSTRACT**

*Cannabis sativa* L. is a plant well known worldwide, and although it is mostly used as an illicit drug, it's also a highly promising plant medicine wise.

With the purpose of developing cannabis-based formulations (oils), it was firstly evaluated the solubility of two extracts in three separate excipients (A, B and C). On excipient A, a precipitate was formed, which indicates the excipient was incompatible with the various components of the formulation. The other two purposes are performing the study of stability of the formulations developed and validate a method by HPLC-DAD that can be applied in the routine analysis of Laboratório de Estudos Farmacêuticos (LEF) for the dosing of cannabinoids  $\Delta^9$ -THC and CBD in cannabis oil-based samples.

Regarding the stability study, the formulations were developed on the excipient B and C at 25°C and 37°C. The formulations T0 were analyzed by HPLC-DAD. The formulations were sampled and divided to represent the whole lot, and each lot was stored at three different climatic chambers, 5°C  $\pm$  3°C, 25°C  $\pm$  2°C e 40°C  $\pm$  2°C, for 28 days (T28). In the preliminary studies, the analytic method demonstrated to be selective. The parameters of the system suitability are according with the internal validation methods, except for the symmetry factor to the CBD. In the T0 formulations, the concentrations obtained for the THC are within the acceptable interval, except the values 112.011, 116.39, 112.739 and 112.72, which corresponds to the formulations 2B (25°C and 37°C), 3B (37°C) and 4B (25°C). Nonetheless, the concentrations obtained for the CBD varies between 116.323 and 134.377, which indicates that all values are outside of specification.

In the dosing of the T0 formulations, the results obtained indicate that it's not possible to estimate the best excipient (B, C) or the best manufactured temperature (25°C, 37°C) that should be applied in the oil manufacturing process.

**Keywords:** *Cannabis sativa* L.; cannabis-based formulations; cannabinoids; HPLC-DAD.

## ÍNDICE

<b>RESUMO</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	2
<b>ÍNDICE</b> .....	3
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	5
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b> .....	6
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	7
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
1. <i>Cannabis sativa</i> L.....	12
1.1. Características Morfológicas da Planta da Canábis.....	14
1.2. Composição da Planta da Canábis.....	15
1.3. Canabinóides e Sistema Endocanabinóide .....	16
2. Legislação.....	19
3. Medicamentos, preparações e substâncias à base da planta da canábis disponíveis no mercado .....	22
4. Revisão da Literatura.....	24
5. Propósitos e objetivos da dissertação .....	35
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	36
1. Revisão da Literatura.....	36
2. Reagentes, materiais e amostras .....	36
2.1. Acondicionamento dos extratos .....	37
2.2. Métodos .....	37
2.2.1. Preparação das formulações galénicas à base de canábis.....	37
2.2.2. Acondicionamento das formulações.....	39
2.2.3. Estudos preliminares.....	39
2.2.4. Estudo da estabilidade dos lotes laboratoriais .....	40
2.2.5. Desenvolvimento do método .....	43
2.2.6. Sistema de limpeza do equipamento HPLC-DAD .....	44
2.2.7. Validação do método .....	44
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	45
1. Formulações galénicas à base de canábis .....	45
2. Estudos preliminares .....	47
3. Desenvolvimento do método .....	49
<b>CONCLUSÃO</b> .....	69



<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	70
<b>ANEXOS</b> .....	81
<b>Anexo I (Estudos preliminares):</b> Tempo de retenção (TR) (min) e tempo de retenção médio (TR médio) (min) dos compostos THC e CBD na solução-padrão P1 .....	81
<b>Anexo II (Estudos preliminares):</b> Cromatogramas da solução-padrão P1 ao comprimento de onda $\lambda_1$ .....	81
<b>Anexo III (Estudos preliminares):</b> Cromatogramas dos solventes ao comprimento de onda $\lambda_1$ . <b>A</b> - Solvente do padrão P1; <b>B</b> – Solvente da amostra .....	81
<b>Anexo IV (Estudos preliminares):</b> Cromatogramas dos placebos ao comprimento de onda $\lambda_1$ . <b>A</b> – Veículo B; <b>B</b> – Veículo C; <b>C</b> – Veículo B com a essência; <b>D</b> – Veículo C com a essência .....	82
<b>Anexo V (Desenvolvimento do método):</b> Tempo de retenção (TR) (min) e área do pico (mV.s) usadas para a reta de calibração do THC.....	83
<b>Anexo VI (Desenvolvimento do método):</b> Tempo de retenção (TR) (min) e área do pico (mV.s) usadas para a reta de calibração do CBD .....	83
<b>Anexo VII (Desenvolvimento do método):</b> Cromatogramas das soluções-padrão ao comprimento de onda $\lambda_1$ . <b>A</b> - FS-CI; <b>B</b> – FS-CI D-Check; <b>C</b> - FS-CI D-End .....	84

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> <i>Cannabis sativa</i> L. (Fonte: Bonini et al., 2018) .....	15
<b>Figura 2:</b> Flor da planta <i>Cannabis sativa</i> L.....	15
<b>Figura 3:</b> Principais classes estruturais dos fitocanabinóides.....	17
<b>Figura 4:</b> Formulação-teste desenvolvida no excipiente C (4C).....	40
<b>Figura 5:</b> Formulações à base de canábis desenvolvidas no excipiente A. Da esquerda para a direita, o primeiro balão representa a formulação de CBD (1A) a uma determinada concentração e os três restantes são as formulações desenvolvidas a três concentrações diferentes de THC e CBD (2A, 3A, 4A) .....	45
<b>Figura 6:</b> Formulações à base de canábis desenvolvidas no excipiente B. Da esquerda para a direita, o primeiro balão representa a formulação de CBD (1B) a uma determinada concentração e os três restantes são as formulações desenvolvidas a três concentrações diferentes de THC e CBD (2B, 3B, 4B).....	46
<b>Figura 7:</b> Formulações à base de canábis desenvolvidas no excipiente C. Da esquerda para a direita, o primeiro balão representa a formulação de CBD (1C) a uma determinada concentração e os três restantes são as formulações desenvolvidas a três concentrações diferentes de THC e CBD (2C, 3C, 4C).....	46
<b>Figura 8:</b> Cromatogramas das amostras 1B, 1C, 2B e 2C ao comprimento de onda $\lambda_1$	47
<b>Figura 9:</b> Curva de calibração, concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ) versus área do pico (mV.s), para o THC .....	49
<b>Figura 10:</b> Curva de calibração, concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ) versus área do pico (mV.s), para o CBD.....	50
<b>Figura 11:</b> Cromatogramas das amostras 1B, 1C, 2B, 2C, 3B, 3C, 4B e 4C ao comprimento de onda $\lambda_1$ . A informação abaixo dos cromatogramas representa as tomas (T1, T2) e a temperatura de fabrico (25°C, 37°C) .....	61

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Legislação portuguesa em vigor para o uso recreativo e medicinal da planta da cânabís .....	21
<b>Tabela 2:</b> Medicamentos, preparações e substâncias à base da planta da cânabís aprovados em Portugal .....	23
<b>Tabela 3:</b> Métodos analíticos descritos para a análise de canabinóides em produtos medicinais à base da planta da cânabís ( <i>Cannabis sativa</i> L.).....	25
<b>Tabela 4:</b> Tempo de retenção (TR) (min) dos compostos THC e CBD nas amostras 1B, 1C, 2B e 2C .....	47
<b>Tabela 5:</b> Equação das retas de calibração e respetivos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) .....	50
<b>Tabela 6:</b> Critérios de aceitação da adequabilidade do sistema (eficiência, fator de simetria, RSD e recuperação) para o doseamento dos canabinóides THC e CBD.....	52
<b>Tabela 7:</b> Resultados da adequabilidade do sistema para o doseamento de THC.....	52
<b>Tabela 8:</b> Resultados da adequabilidade do sistema para o doseamento de CBD .....	53
<b>Tabela 9:</b> Intervalo de aceitação (%) para o doseamento dos canabinóides THC e CBD no produto final .....	54
<b>Tabela 10:</b> Tempo de retenção (TR) (min), área do pico (mV.s) e concentração (%) do THC e CBD nas amostras.....	55
<b>Tabela 11:</b> Diferença na concentração (%) dos API entre veículos (B e C) .....	59
<b>Tabela 12:</b> Diferença na concentração (%) dos API entre temperaturas de fabrico (25°C e 37°C) .....	60

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ACM** – Autorização de colocação no mercado;
- API** – Ingrediente farmacologicamente ativo, *Active pharmaceutical ingredient*;
- B-on** – Biblioteca do conhecimento online;
- CB<sub>1</sub>** – Recetor canabinóide tipo 1, *Cannabinoid receptor type 1*;
- CB<sub>2</sub>** – Recetor canabinóide tipo 2, *Cannabinoid receptor type 2*;
- CBD** – Canabidiol, *Cannabidiol*;
- CBDA** – Ácido canabidiólico, *Cannabidiolic acid*;
- CBC** – Canabicromeno, *Cannabichromene*;
- CBCA** – Ácido canabicromênico, *Cannabichromenic acid*;
- CBCN** – Canabicromanona, *Cannabichromanon*;
- CBCT** – Canabicitrano, *Cannabicitran*;
- CBDN** – Canabidinol, *Cannabidinol*;
- CBDV** – Canabidivarina, *Cannabidivarin*;
- CBDVA** – Ácido canabidivarínico, *Cannabidivarinic acid*;
- CBE** – Canabielsoína, *Cannabielsoin*;
- CBEA** – Ácido canabielsoínico, *Cannabielsoinic acid*;
- CBF** – Canabifurano, *Cannabifuran*;
- CBFA** – Ácido canabifurânico, *Cannabifuranic acid*;
- CBG** – Canabigerol, *Cannabigerol*;
- CBGA** – Ácido canabigerólico, *Cannabigerolic acid*;
- CBGM** – Éter monometílico de canabigerol, *Cannabigerol monomethyl ether*;
- CBGV** – Canabigerovarina, *Cannabigerovarin*;
- CBL** – Canabiciclol, *Cannabicyclol*;
- CBM** – Canabimovona, *Cannabimovon*;
- CBMP** - Produtos medicinais à base de canábis, *Cannabis-based medicinal products*;
- CBN** – Canabinol, *Cannabinol*;
- CBNA** – Ácido canabinólico, *Cannabinolic acid*;
- CBR** – Canabiripsol, *Cannabiripsol*;
- CBRA** – Ácido canabiripsol, *Cannabiripsolic acid*;
- CBT** – Canabitriol, *Cannabitriol*;
- CBTA** – Ácido canabitriólico, *Cannabitriolic acid*;

**CBTT** – Canabitetrol, *Canabitetrol*;

**CME** - Extratos de cânabís medicinal, *Cannabis medicinal extracts*;

**<sup>13</sup>C-NMR** – Ressonância magnética nuclear do átomo de carbono, *Carbon-13 nuclear magnetic resonance*;

**CNU** – Comissão das Nações Unidas;

**CO<sub>2</sub> – SFE** – Extração com CO<sub>2</sub> supercrítico, *Supercritical fluid extraction using supercritical carbon dioxide*;

**λ** – Comprimento de onda;

**DAD** – Detetor de rede de díodos, *Diode-array detection*;

**DCBF** – Dihidrocanabifurano, *Dehydrocannabifuran*;

**DCBFA** – Ácido dihidrocanabifurânico, *Dehydrocannabifuranic acid*;

**DRE** – Diário da república eletrónico;

**ELD** – Detetor eletroquímico, *Electronic leak detection*;

**ELSD** – Detetor evaporativo de dispersão de luz, *Evaporative light scattering detector*;

**EMA** – Agência europeia do medicamento, *European medicines agency*;

**EMCDDA** – Observatório europeu da droga e da toxicodependência, *European monitoring centre for drugs and drug addiction*;

**EtOAc** – Acetato de etilo;

**EtOH** – Etanol;

**EUA** – Estados Unidos da América;

**FDA** – *Food and drug administration*;

**FLD** – Detetor de fluorescência, *Fluorescence detector*;

**FT-NIR** – Espectroscopia de infravermelho próximo com transformada de *Fourier*, *Fourier transform near-infrared spectroscopy*;

**FT-NMR** – Ressonância magnética nuclear com transformada de *Fourier*, *Fourier transform nuclear magnetic resonance*;

**GC** – Cromatografia gasosa, *Gas chromatography*;

**GC-FID** – Cromatografia gasosa acoplada ao detetor de ionização de chama; *Gas chromatography coupled with flame ionization detection*;

**GC-MS** – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa, *Gas chromatography-mass spectrometry*;

**HIV** – Vírus da imunodeficiência humana, *Human immunodeficiency virus*;

**<sup>1</sup>H-NMR**– Ressonância magnética nuclear do átomo de hidrogénio, *Proton nuclear magnetic resonance*;

**HPLC** – Cromatografia líquida de alta eficiência, *High performance liquid chromatography*;

**HPLC-DAD** – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detetor de rede de díodos, *High performance liquid chromatography coupled with diode array detection*;

**HPLC-DAD-MS/MS** – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detetor de rede de díodos e à espectrometria de massa em tandem, *High performance liquid chromatography coupled with diode array detection and tandem mass spectrometry*;

**HPLC-FLD** – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detetor de fluorescência, *High performance liquid chromatography coupled with fluorescence detection*;

**HPLC-UV** – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detetor de ultravioleta, *High performance liquid chromatography coupled with ultraviolet detection*;

**HPLC-MS** – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa, *High performance liquid chromatography-mass spectrometry*;

**HPLC-MS/MS** – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa em tandem, *High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*;

**HPTLC** – Cromatografia em camada fina de alta eficiência, *High performance thin layer chromatography*;

**HS-SPME** – Microextração por fase sólida no modo *headspace*, *Headspace-solid phase microextraction*;

**ICH** – Conferência internacional de harmonização, *International conference on harmonization*;

**INFARMED** – Autoridade nacional do medicamento e produtos de saúde, I.P.;

**IR** – Infravermelho, *Infrared*;

**LC** – Cromatografia líquida, *Liquid chromatography*;

**LEF** – Laboratório de estudos farmacêuticos;

**LMD** – Microdissecação a laser, *Laser microdissection*;

**LOD** – Limite de detecção, *Limit of detection*;

**LOQ** – Limite de quantificação, *Limit of quantification*;

**LPE** – Extração em fase líquida, *Liquid phase extraction*;

**MAE** – Extração assistida por micro-ondas, *Microwave-assisted extraction*;

**MeOH** – Metanol;

**MS** – Espectrometria de massa, *Mass spectrometry*;

**N** – Eficiência, *Peak efficiency*;

**NIR** – Espectroscopia de infravermelho próximo, *Near infrared spectroscopy*;

**NMR** – Ressonância magnética nuclear, *Nuclear magnetic resonance*;

**p/p** – peso/peso;

**R** – Recuperação, *Recovery*;

**R<sup>2</sup>** – Coeficiente de determinação, *Coefficient of determination*;

**Rs** – Resolução, *Resolution*;

**RSD** – Desvio do padrão relativo, *Relative standard deviation*;

**SEM** – Microscopia eletrônica de varrimento, *Scanning electron microscope*;

**SFE** – Extração com fluido supercrítico, *Supercritical fluid extraction*;

**SIDA** – Síndrome da imunodeficiência adquirida;

**SLE** – Extração sólido-líquido, *Supported liquid extraction*;

**SPME** – Microextração em fase sólida, *Solid-phase microextraction*;

**T** – Fator de simetria, *Symmetry factor*;

**$\Delta^8$ -THC** -  $\Delta^8$ -Tetrahydrocannabinol,  *$\Delta^8$ -Tetrahydrocannabinol*;

**$\Delta^9$ -THC ou THC** -  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol,  *$\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol*;

**$\Delta^9$ -THCA ou THCA** -  $\Delta^9$ -Ácido Tetrahydrocannabinólico,  *$\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinolic acid*;

**THCOA** – Éster de acetato de THC, *THC acetate ester*;

**THCV** –  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabivarina,  *$\Delta^9$ -Tetrahydrocannabivarin*;

**THCVA** – Ácido tetrahydrocannabivarínico, *Tetrahydrocannabivarinic acid*;

**TLC** – Cromatografia em camada fina, *Thin layer chromatography*;

**TR** – Tempo de retenção;

**UAE** – Extração assistida por ultrassom, *Ultrasonic assisted extraction*;

**UE** – União Europeia;

**UHPLC** – Cromatografia líquida de ultra-alta eficiência, *Ultra-high performance liquid chromatography*;

**UHPLC-DAD** – Cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada ao detector de rede de díodos, *Ultra-high performance liquid chromatography coupled to diode array detection*;

**UHPLC-MS-DAD** – Cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada ao detector de rede de díodos e à espectrometria de massa, *Ultra-high performance liquid chromatography coupled to diode array detection and mass spectrometry*;

**UPLC** – Cromatografia líquida de ultra eficiência, *Ultra performance liquid chromatography*;

**UPLC-MS** – Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massa, *Ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry*;

**UPLC-MS/MS** – Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massa em tandem, *Ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*;

**UNODC** – Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime, *United Nations Office on Drugs and Crime*;

**UV** –Ultravioleta, *Ultraviolet*.



## INTRODUÇÃO

As plantas são usadas como medicamentos desde as civilizações antigas e com o auxílio da ciência moderna, continuam a ser a fonte comercial de produtos farmacêuticos de alto valor (Ozber et al., 2020). A *Cannabis sativa* L. é uma planta cujo cultivo remonta a vários milénios e faz há muito tempo parte da farmacopeia popular (Ozber et al., 2020; Chandiok et al., 2021).

Esta planta é quimicamente complexa, e é constituída por mais de 500 componentes químicos. Para monitorizar a composição da cânabís e garantir a qualidade, a eficácia e a segurança dos seus produtos derivados, a extração e análise dos canabinóides desempenha um papel crucial (Leghissa et al., 2018; Nahar et al., 2020; Brighenti et al., 2021).

### **1. *Cannabis sativa* L.**

A espécie *Cannabis sativa* L. (*C. sativa*) é uma planta dióica anual, que partilha as suas origens com o início das primeiras sociedades humanas agrícolas (Bonini et al., 2018). Embora tenha origem na Ásia Central (Índia e China), o seu cultivo foi iniciado em todo o mundo, sendo principalmente usada como fonte de fibras, sementes, alimentos, óleo e medicamentos, bem como para propósitos recreativos e religiosos (Bonini et al., 2018; Pan et al., 2021; Adamek et al., 2022). A *Cannabis* sp. tem uma elevada diversidade genética, o que torna a sua classificação taxonómica desafiadora (Kumar et al., 2021). A planta da cânabís pertence à ordem das Urticales e à família *Cannabaceae*, juntamente com o género *Humulus* (lúpulo) (Ternelli et al., 2020; Micalizzi et al., 2021). O género *Cannabis* foi inicialmente dividido em três espécies, *C. sativa*, *C. indica* e *C. ruderalis*, de acordo com as características botânicas específicas e com o nível do composto psicoativo  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) e do seu precursor ácido  $\Delta^9$ -ácido tetrahydrocannabinólico ( $\Delta^9$ -THCA) (Brighenti et al., 2021; Kumar et al., 2021). A *Cannabis sativa* é uma planta produtora de fibras é mais alta e mais altamente ramificada e a *Cannabis indica* é mais curta com folhas mais largas e tipicamente representa variedades usadas para propósitos recreativos ou medicinais, devido à alta concentração do composto psicoativo  $\Delta^9$ -THC (Fischedick et al., 2010; Kumar et al., 2021). A *Cannabis ruderalis* apresenta baixos níveis de canabinóides e tem aparência espessa (Fischedick et al., 2010). Na década de 1970, a classificação quimiotaxonómica da cânabís foi superada

por uma monotípica, como resultado do cruzamento contínuo entre espécies de canábis (Callado et al., 2018; Brighenti et al., 2021). Neste contexto, existem até ao momento cinco tipos de canábis, classificadas com base na proporção de  $\Delta^9$ -THC e canabidiol (CBD), sendo três os quimiotipos predominantes que podem ser identificados (Callado et al., 2018; Brighenti et al., 2021):

- uma proporção THC/CBD  $> 1.0$  é característica de plantas “tipo-droga” (quimiotipo I),
- uma proporção THC/CBD próxima de 1.0 é para plantas “tipo-intermediário” (quimiotipo II),
- e uma proporção THC/CBD  $< 1.0$  é característica de plantas “tipo-fibra” (quimiotipo III).

No entanto, a nomenclatura baseada na taxonomia, não é aplicada com frequência na indústria da canábis, pois o material da planta é rotulado principalmente de acordo com o seu uso final (Brighenti et al., 2021). Nesta perspetiva, a canábis recreativa (marijuana) é caracterizada por teores relativamente altos de THCA e/ou THC, pertence ao quimiotipo I e é vendida ilicitamente no mercado negro ou na *dark-net* (Ciolino et al., 2018a; Brighenti et al., 2021). As variedades de canábis medicinal têm teores médios a altos de THC ou conteúdos semelhantes de THC e CBD, no entanto recentemente tem havido um grande interesse em variedades com concentrações altas de CBD para uso medicinal (Ciolino et al., 2018a; Brighenti et al., 2021). Estas pertencem ao quimiotipo I e II e são cultivadas em condições padronizadas para manter um nível constante de compostos ativos e garantir o seu uso sob prescrição médica para o tratamento de patologias específicas (Ciolino et al., 2018a). As plantas que pertencem ao quimiotipo III são variedades de cânhamo (também conhecidas como cânhamo industrial) são caracterizadas por um alto conteúdo de CBDA e/ou CBD e um conteúdo total de THC abaixo do limite legal de 0.2-0.3% peso/peso (p/p), sendo que, este limite depende de cada país, e tem como finalidade obter um produto sem efeitos psicoativos (Ciolino et al., 2018a; Protti et al., 2019; Brighenti et al., 2021). Os extratos obtidos desta variedade têm um grande potencial para um possível uso em produtos farmacêuticos e nutracêuticos (Protti et al., 2019).

## **1.1. Características Morfológicas da Planta da Canábis**

A *Cannabis sativa* e a *Cannabis indica* são plantas herbáceas e podem crescer até 2-4 metros (Leghissa et al., 2018). No entanto, a *C. sativa* (figura 1) apresenta caules erguidos e dependendo das condições ambientais e da variedade genética, pode atingir até 5 metros (Bonini et al., 2018; Micalizzi et al., 2021). As folhas palmadas, geralmente compostas por cinco a sete folíolos, são linear-lanceoladas, afilando em ambas as extremidades e as margens acentuadamente serrilhadas (Bonini et al., 2018). As flores anuais (figura 2), contêm a maior percentagem dos componentes biologicamente ativos, florescem do final do verão até a meio do outono (Leghissa et al., 2018; Micalizzi et al., 2021). As flores ou inflorescências masculinas não apresentam pétalas, panículas axilares ou terminais, possuem cinco tépalas amarelas e cinco anteras, são ramificadas, têm menos folhas e morrem logo após a floração (Bonini et al., 2018; Leghissa et al., 2018). As flores fêmeas germinam nas axilas e terminalmente com um perianto ovular muito aderente, são extremamente frondosas, não ramificadas e vivem 3-5 semanas após a floração (Leghissa et al., 2018; Micalizzi et al., 2021). Estas, e em menor extensão, a folhagem das plantas fêmeas e masculinas são densamente cobertas de resina, um dos produtos mais valiosos com várias propriedades psicoativas e medicinais (Bonini et al., 2018). A resina é rica em tricomas, estruturas unicelulares ou multicelulares, que se desenvolvem a partir de células epidérmicas que cobrem as folhas, as brácteas e os caules da planta (Bonini et al., 2018; Braich et al., 2019; Micalizzi et al., 2021). Com base na capacidade de secreção e na morfologia, os tricomas são categorizados em tipos glandulares e não glandulares, e a canábis exhibe estes dois tipos (Braich et al., 2019). As células secretoras dentro dos tricomas glandulares são estruturas exclusivamente especializadas que sintetizam grandes quantidades de metabólitos secundários como os fitocanabinóides, as principais substâncias psicoativas e medicinais da canábis e responsáveis pela defesa e interação com herbívoros e pragas e os terpenos, que produzem o cheiro típico e único desta planta (Bonini et al., 2018; Braich et al., 2019; Micalizzi et al., 2021). As outras partes da planta, como as sementes, as raízes e o pólen, também produzem fitocanabinóides, mas em baixa quantidade e o único fruto pequeno, liso, cinza-acastanhado claro é produzido pela flor e propagado graças à predação das aves (Bonini et al., 2018; Braich et al., 2019).



**Figura 1:** *Cannabis sativa* L. (Fonte: Bonini et al., 2018).



**Figura 2:** Flor da planta *Cannabis sativa* L.

## 1.2. Composição da Planta da Canábis

Como mencionado anteriormente, a *Cannabis sativa* L. é uma planta conhecida em todo o mundo, devido à sua história, bioatividade e também impacto social (Brighenti et al., 2021). Esta espécie é caracterizada pela versatilidade dos produtos derivados, sendo usada no âmbito industrial, medicinal, alimentar, cosmético e têxtil no fabrico de cordas, papel, tecidos, fibras e óleos nutricionais (Kayser et al., 2009; Callado et al., 2018; Brighenti et al., 2021). Embora a canábis seja considerada uma planta medicinal

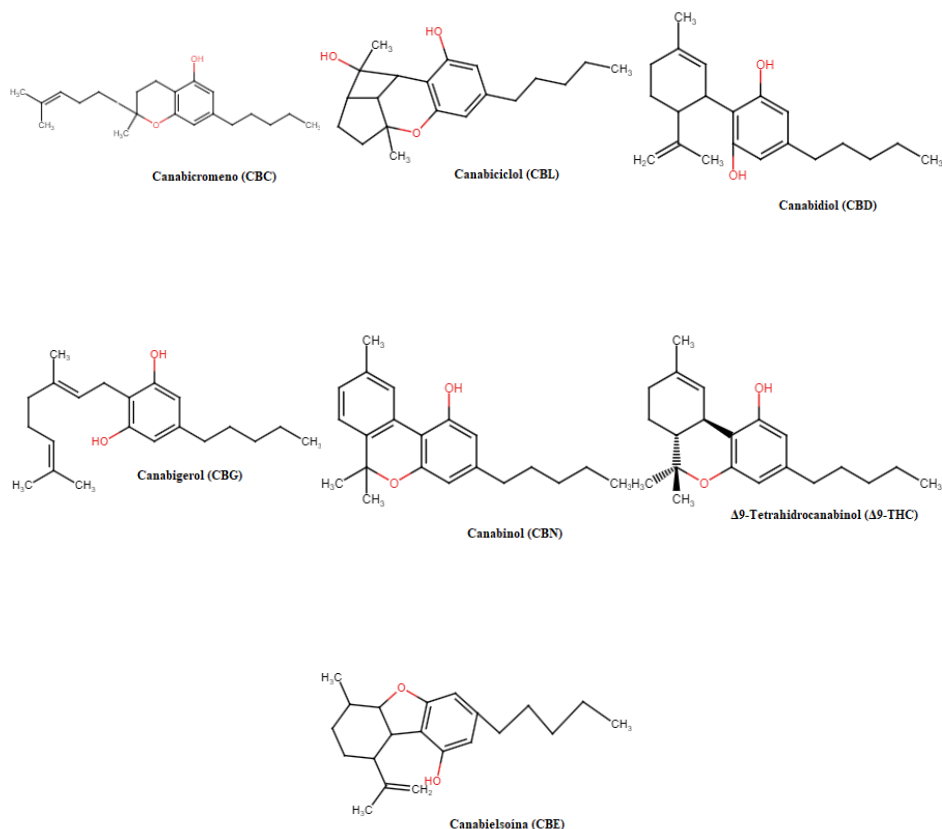
altamente promissora e com uma longa história de uso humano devido à sua suposta gama de propriedades terapêuticas é mais frequentemente usada como droga ilícita, sendo uma das substâncias de abuso mais consumidas em todo o mundo, com mais de 20 milhões de usuários nos Estados Unidos (EUA) e 78.5 milhões na Europa (Fischedick et al. 2009; Levene et al., 2019; OEDT, 2019; Qamar et al., 2021). A planta da cânabís é quimicamente complexa, o seu fitocomplexo é composto por mais de 500 substâncias que pertencem a diversas classes fitoquímicas, incluindo terpenos, flavonóides, estilbenóides, ácidos gordos e canabinóides (Calvi et al., 2018; Brighenti et al., 2021). Estes compostos estão associados a propriedades terapêuticas, são produzidos nos tricomas glandulares e a mínima variação na sua concentração pode resultar em efeitos terapêuticos distintos (Kumar et al., 2021; Adamek et al., 2022).

### **1.3. Canabinóides e Sistema Endocanabinóide**

Os canabinóides são substâncias orgânicas encontradas na planta da cânabís que atuam em recetores específicos no cérebro e no corpo humano e apresentam propriedades farmacológicas semelhantes às produzidas pela planta *Cannabis sativa* L. (Nahar et al., 2020; Wurglics & Ude, 2020). Estes compostos terpenofenólicos foram definidos por Gaoni e Mechoulam, em 1967, “como o grupo de compostos C<sub>21</sub> típicos da espécie *Cannabis sativa* L., incluindo os seus ácidos carboxílicos, análogos e produtos de transformação” (Leghissa et al., 2018; Callado et al., 2018). Os canabinóides também podem ser encontrados no corpo humano (endocanabinóides), mas aqueles consumidos para uso medicinal podem ter origem na planta da cânabís (canabinóides derivados de plantas, também conhecidos como fitocanabinóides) ou serem sintetizados em laboratório (canabinóides sintéticos) (Wurglics & Ude, 2020). Os canabinóides naturais ou fitocanabinóides são armazenados principalmente numa resina viscosa produzida predominantemente nos tricomas glandulares de *C. sativa*, e podem ser estruturalmente agrupados em pelo menos nove classes estruturais principais (figura 3) (Nahar et al., 2020):

- 1) canabicromenos (CBC),
- 2) canabiciclóis (CBL),
- 3) canabidióis (CBD),
- 4) canabigeróis (CBG),
- 5) canabinóis (CBN),

- 6) tetrahydrocannabinóis (THC),
- 7) canabielsoínas (CBE),
- 8) isotetrahydrocannabinóis,
- 9) canabicitranos.



**Figura 3:** Principais classes estruturais dos fitocannabinóides.

As moléculas de maior interesse farmacológico do ponto de vista dos seus efeitos e os dois principais canabinóides biossintetizados por *C. sativa* são o THC e o CBD. Assim os efeitos medicinais da planta da canábis dependem da concentração relativa destes dois compostos e a sua determinação nos medicamentos a serem administrados aos pacientes é um pré-requisito fundamental para garantir um produto consistente que forneça as propriedades adequadas e a qualidade necessária para os tratamentos (Nahar et al., 2020; Baratta et al., 2021; Adamek et al., 2022).

Embora o CBD e o THC tenham bastante relevância medicinal, estas moléculas não são biossintetizadas na planta, que em vez disso produz, as suas formas carboxiladas, o ácido canabidiólico (CBDA) e o ácido tetrahydrocannabinólico (THCA) (Citti et al., 2016; Citti

et al., 2018; Fletcher et al., 2022). Embora estes compostos possuam várias propriedades farmacológicas, eles não apresentam atividade psicotrópica simplesmente porque não são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica (Citti et al., 2016). Uma reação química desencadeada pelo calor leva à descarboxilação destes compostos para obter as espécies bioativas e descarboxiladas (ou neutras) correspondentes ao CBD e THC (Citti et al., 2018). Os produtos de degradação conhecidos incluem a canabielsoína (CBE) da pirólise do CBD, o canabicyclol (CBL) formado por fotólise durante o armazenamento e o CBN, da aromatização oxidativa do THC, e pode ser usado como uma caracterização do procedimento, armazenamento e administração de canábis como parâmetro de controlo de qualidade e apresenta potentes propriedades sedativas (Citti et al., 2018; Elkins et al., 2019; Borges et al., 2020).

No início da década de 1990, surgiu um aumento do interesse dos pacientes no uso da canábis que foi acompanhado por um interesse científico renovado pelas substâncias encontradas na planta da canábis, nomeadamente os canabinóides (Wurglics & Ude, 2020). Isto ocorreu após a descoberta, no início da década de 1990, de um sistema canabinóide no cérebro e no corpo humano e dos dois principais recetores endocanabinóides, o recetor canabinóide tipo 1 (CB<sub>1</sub>) e o recetor canabinóide tipo 2 (CB<sub>2</sub>) (Fischedick et al., 2010; Bonini et al., 2018; Wurglics & Ude, 2020). Os recetores CB<sub>1</sub> são amplamente expressos no hipocampo, gânglios basais, amígdalas, áreas corticais e cerebelo, todas as regiões que estão envolvidas no humor, funções cognitivas, controlo motor e áreas periféricas como no intestino, fígado, tecido adiposo e células imunes. Por outro lado, a expressão cerebral dos recetores CB<sub>2</sub> em condições fisiológicas é muito menor em comparação com os recetores CB<sub>1</sub>, no entanto, durante a inflamação, os níveis de recetores CB<sub>2</sub> aumentam drasticamente na microglia e noutras células gliais (Bonini et al., 2018).

O THC é o principal ingrediente psicoativo que atua principalmente como agonista parcial em ambos os recetores canabinóides, sendo o CB<sub>1</sub> um modulador dos efeitos psicoativos e analgésicos e o CB<sub>2</sub> um modulador de efeitos imunológicos e anti-inflamatórios (Bonini et al., 2018; Levene et al., 2019; Protti et al., 2019). Este canabinóide apresenta características farmacológicas e é utilizado para analgesia, estimulação do apetite, relaxamento muscular e como antiemético, porém os seus efeitos psicoativos podem causar intoxicação, ansiedade, paranoia, alterações perceptuais e défices cognitivos (Bonini et al., 2018; Braich et al., 2019; Capra et al., 2020). Por outro

lado, o CBD é um canabinóide não psicoativo e apesar da semelhança estrutural química com o THC, o CBD tem um baixo agonismo para os recetores canabinóides e não apresenta os efeitos psicotrópicos e tóxicos distintos do THC (Bonini et al., 2018; Braich et al., 2019; McGregor et al., 2020). Para além disto, ainda apresenta alta atividade antioxidante e anti-inflamatória, além das suas propriedades neuroprotetoras, antimicrobianas, ansiolíticas e anticonvulsivantes, sendo relevante no tratamento de várias patologias, que constam na deliberação N°11/CD/2019, a lista de indicações terapêuticas (Bonini et al., 2018; Braich et al., 2019; I.P., 2019; Protti et al., 2019). Esta lista inclui a esclerose múltipla, náuseas e vômitos (resultantes da quimioterapia, radioterapia e terapia combinada de HIV e medicação para hepatite C), estimulação do apetite em pacientes oncológicos ou com SIDA, dor crónica, síndrome de Gilles de la Tourette, epilepsia e glaucoma (Bonini et al., 2018; Braich et al., 2019; I.P., 2019; Protti et al., 2019). Em particular, as preparações com maior conteúdo de CBD são indicadas para a epilepsia, inflamação, psicose ou distúrbios mentais, doença inflamatória intestinal, enxaquecas, depressão e ansiedade, enquanto as preparações com maior conteúdo de THC para a dor, espasticidade muscular, glaucoma, insónia, caquexia, náuseas devido à quimioterapia e ansiedade (Palermi et al., 2021). Por fim, para o canabinol (CBN) foi observada uma baixa afinidade pelos recetores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> (Bonini et al., 2018).

## 2. Legislação

Apesar de países como a Índia e a China mencionarem o uso de canábis e dos seus componentes ativos, os canabinóides, na medicina tradicional e nas práticas sociais há milhares de anos e de a planta ter sido amplamente utilizada como terapia médica nos EUA no século XIX e de ter sido incorporada pela primeira vez na Farmacopeia dos Estados Unidos em 1850, foi fortemente proibida no século XX devido aos seus notáveis efeitos psicoativos (Bonini et al., 2018; Aguillón et al., 2021; Weisman & Rodríguez, 2021).

Em 1932 foi retirada da Farmacopeia Britânica e as primeiras restrições federais à canábis nos EUA ocorreram em 1937 com a aprovação da taxa de imposto sobre a marijuana, “*The Marihuana Tax Act*”, onde a produção, a posse, o seu uso ou venda foi fortemente regulamentado (Bonini et al., 2018; Weisman & Rodríguez, 2021). Assim, a planta da canábis foi retirada da Farmacopeia dos Estados Unidos em 1942 e as penalidades legais



pela sua posse aumentaram em 1951 e 1956 com a promulgação das Leis de *Boggs* e Narcóticos, respetivamente (Weisman & Rodríguez, 2021).

Em 1961, a inclusão da cânabís em acordos internacionais entre vários países, a *Single Convention on Narcotic Drugs* (alterada em 1972), restringiram o uso da cânabís e dos seus constituintes sob a perspetiva de que seriam um problema de saúde pública pelo seu alto risco de potencial de abuso e da falta de segurança aceite, encerrando assim, o seu uso medicinal nos países que assinaram o tratado e onde Portugal é um país signatário (Amending, Single, On, & Drugs, 1961; Nations, 2008; Wurglics & Ude, 2020; Aguillón et al., 2021). De acordo com este tratado, a cânabís é definida como a flor ou o fruto da planta da cânabís (excluindo as sementes e as folhas quando não estão presentes com a flor ou o fruto), da qual não se tenha extraído a resina (Nations, 2008). Esta lei internacional ainda define a planta da cânabís como “qualquer planta do género *Cannabis*”, para abranger as espécies *Cannabis indica* e *Cannabis sativa* e qualquer variedade descoberta no futuro e classifica a cânabís, a sua resina e os seus derivados (extratos e tinturas) ao *status* de Tabela I ou Tabela IV, o que impôs limitações à pesquisa ao restringir a aquisição da planta (Nations, 2008; European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA), 2018; Kumar et al., 2021; Weisman & Rodríguez, 2021). Na Tabela I, as substâncias têm propriedades aditivas, apresentam um sério risco de abuso e o controlo é muito rígido, por outro lado, a Tabela IV é a categoria mais restritiva, sendo proibida a produção, o fabrico, a exportação e a importação, o comércio, ou o uso, exceto em quantidades que possam ser necessárias para pesquisas médicas e científicas e as substâncias são consideradas as mais perigosas, são particularmente nocivas e de valor médico ou terapêutico extremamente limitado (Kumar et al., 2021; Weisman & Rodríguez, 2021; EMCDDA, 2022). No entanto, em 1971, a *Convention on Psychotropic Substances*, listou o THC na tabela I, o que significa, que a substância apresenta um alto risco de abuso, é uma ameaça particularmente grave para a saúde pública, tem muito pouco ou nenhum valor terapêutico e o seu uso é proibido, exceto para fins científicos ou medicinais muito restritos, apenas sob estrita supervisão dos governos ou órgãos aprovados (Khan, 1979; Kumar et al., 2021; EMCDDA, 2022). No entanto, em Dezembro de 2020, a Comissão das Nações Unidas (CNU) reclassificou a cânabís e a sua resina para reconhecer o seu valor medicinal (Weisman & Rodríguez, 2021).

Em Portugal (tabela 1), como a cânabís é uma substância ilícita e controlada, o seu uso para fins recreativos, encontra-se ao abrigo do Decreto-Lei nº15/93, de 22 de Janeiro, a “Lei de Combate à Droga” e no mesmo decreto está inserida na tabela I-C e está definida

como folhas e sumidades floridas ou frutificadas da planta *Cannabis sativa* L. da qual não se tenha extraído a resina (Decreto-Lei n.º 15/93, 1993). O Decreto-Regulamentar n.º61/94, de 12 de Outubro, procede à regulamentação do Decreto-Lei n.º15/93 (Regulamentar, Na, & Regulamentar, 2021). Recentemente, o renovado interesse global nas propriedades terapêuticas da canábida resultou numa mudança de atitudes e políticas legislativas em todo o mundo, o que levou o parlamento português, a aprovar a Lei n.º 33/2018, de 18 de Julho, que estabelece o quadro legal para a utilização de medicamentos, preparações e substâncias à base da planta da canábida, para fins medicinais, nomeadamente a sua prescrição e a sua dispensa em farmácia, tendo o Decreto-Lei n.º8/2019, de 15 de Janeiro, procedido à sua regulamentação (Assembleia da República, 2018; Ministério da Saúde, 2019; Weisman & Rodríguez, 2021). Para além desta legislação, ainda está em vigor, a Portaria n.º44-A/2019, de 31 de Janeiro, que regula o regime de preços das preparações e substâncias à base da planta da canábida para fins medicinais, a Portaria n.º83/2021, de 15 de Abril que define os requisitos e procedimentos relativos à concessão de autorizações para o exercício de atividades relacionadas com o cultivo, o fabrico, o comércio por grosso, o transporte, a circulação, a importação e a exportação de medicamentos, preparações e substâncias à base da planta da canábida e por fim, a deliberação n.º11/CD/2019 que define a lista das indicações terapêuticas apropriadas para as preparações e substâncias à base da planta da canábida (Assembleia da República, 2019; I.P., 2019; Regulamentar, Regulamentar, Regulamentar, & Adjunto, 2021). Toda a legislação relativa à canábida medicinal, encontra-se na página da autoridade nacional do medicamento e produtos de saúde I.P. (INFARMED), na secção “Canábida para fins medicinais” (INFARMED, 2022).

**Tabela 1:** Legislação portuguesa em vigor para o uso recreativo e medicinal da planta da canábida.

Uso	Legislação	Descrição
<b>Recreativo</b>	Decreto-Lei n.º15/93	“Lei de Combate à Droga”
	Decreto-Regulamentar n.º61/94	Regulamenta o Decreto-Lei n.º15/93
<b>Medicinal</b>	Lei n.º33/2018	Estabelece o quadro legal para a utilização de medicamentos, preparações e substâncias à base da planta da canábida, para fins medicinais, nomeadamente a sua prescrição e a sua dispensa em farmácia
	Decreto-Lei n.º8/2019	Regulamenta a Lei n.º33/2018
	Portaria n.º44-A/2019	Regula o regime de preços das preparações e substâncias à base da planta da canábida para fins medicinais
	Portaria n.º83/2021	Define os requisitos e procedimentos relativos à concessão de autorizações para o exercício de atividades relacionadas com o cultivo, o fabrico, o comércio por grosso, o transporte, a circulação, a importação e a exportação de medicamentos, preparações e substâncias à base da planta da canábida
	Deliberação n.º11/CD/2019	Define a lista das indicações terapêuticas consideradas apropriadas para as preparações e substâncias à base da planta da canábida

### **3. Medicamentos, preparações e substâncias à base da planta da cânabís disponíveis no mercado**

O “uso medicinal de cânabís e de canabinóides” pode-se referir a uma grande variedade de preparações e de produtos que podem conter diferentes ingredientes ativos e usar diferentes vias de administração (Wurglics & Ude, 2020). Os produtos medicinais à base de cânabís (CBMP) são um termo coletivo para descrever *uma preparação ou outro produto que contém cânabís ou os seus derivados para uso medicinal em humanos* (Banerjee et al., 2022). Estes produtos estão definidos de uma forma generalizada no artigo nº3 da Lei nº33/2018, mas no artigo nº2 do Decreto-Lei nº8/2019 está estabelecido que um medicamento à base da planta da cânabís é um medicamento que tenha exclusivamente como substâncias ativas (i) uma ou mais substâncias derivadas da planta da cânabís; (ii) uma ou mais preparações à base da planta da cânabís; ou (iii) uma ou mais substâncias derivadas da planta da cânabís em associação com uma ou mais preparações à base da planta da cânabís e que uma preparação à base da planta da cânabís é uma preparação obtida submetendo as substâncias derivadas da planta da cânabís a tratamentos como a extração, a destilação, a expressão, o fracionamento, a purificação, a concentração ou a fermentação, tais como substâncias derivadas da planta da cânabís pulverizadas ou em pó, tinturas, extratos, óleos essenciais, sucos espremidos ou exsudados transformados (Ministério da Saúde, 2019; Banerjee et al., 2022). Para além destes dois produtos, também existem as substâncias à base da planta da cânabís que são plantas da cânabís, ou partes destas, quer se encontrem inteiras, fragmentadas ou cortadas, bem como exsudados não sujeitos a tratamento específico, ou outras substâncias definidas através de parte da planta da cânabís utilizada e da taxonomia botânica, incluindo a espécie, a variedade e o autor (Ministério da Saúde, 2019).

Os CBMP representam um largo espectro de produtos farmacêuticos com farmacologia complexa e as formulações disponíveis variam de canabinóides únicos isolados a produtos de espectro completo contendo uma variedade de canabinóides, terpenos, flavonóides e outros compostos com propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas individuais (Erridge et al., 2021). As autoridades reguladoras de medicamentos em certos países já concederam autorizações de comercialização, com base numa ampla base de evidências em evolução, mas limitada, para uma ampla variedade de preparações contendo derivados de plantas e canabinóides sintéticos para várias indicações (Erku et al., 2021).

Em Setembro de 2019, a Agência Europeia de Medicamentos (EMA) aprovou o Epidiolex®, uma solução oral de CBD altamente purificada a 100 mg/mL derivada de plantas indicada para o tratamento de convulsões associadas à síndrome de Lennox-Gaustat ou síndrome de Dravet em pacientes com 2 anos de idade ou mais e o Sativex® (nabiximoles), uma solução para pulverização bucal, que contém aproximadamente quantidades iguais de THC e CBD (1:1) de dois extratos de cânabis e foi aprovado para o tratamento da espasticidade muscular resultante da esclerose múltipla (EMA, 2010; Ema, 2013, INFARMED, 2018; INFARMED, 2019; McGregor et al., 2020; Wurglics & Ude, 2020; Erridge et al., 2021; Palermi et al., 2021). A aprovação da EMA fornece a autorização de comercialização para todos os 28 países da UE, incluindo Portugal, o que levou o INFARMED a aprovar estes produtos medicinais, mais a Tilray Flor seca THC 18, uma substância de origem vegetal para inalação por vaporização que consiste em flores secas do género feminino da planta *Cannabis sativa* L. e contém uma variedade de substâncias ativas como o THC e o CBD (tabela 2) (INFARMED, 2018; INFARMED, 2021). Para além destes medicamentos, preparações e substâncias à base da planta de cânabis, existem outros produtos medicinais constituídos por canabinóides que foram autorizados para comercialização noutros países como o Marinol® e o Syndros® (dronabinol) que são cápsulas orais ou uma solução oral que contém THC sintético e é indicado para a anorexia associada à perda de peso em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) e náuseas e vómitos associados à quimioterapia do cancro e o Cesamet® e o Canemes® (nabilona) que são cápsulas orais que contém um canabinóide sintético semelhante ao THC e a principal indicação para o seu uso são náuseas e vómitos associados à quimioterapia (Wurglics & Ude, 2020). A *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o Epidiolex®, o Cesamet®, o Syndros® e o Marinol® (FDA, 2022).

**Tabela 2:** Medicamentos, preparações e substâncias à base da planta da cânabis aprovados em Portugal.

Autoridade Reguladora	Produto Medicinal	Via de administração	Substância(s) Ativa(s)	Dosagem (mg/mL)
INFARMED	Epidiolex®	Solução oral	CBD	100 mg/mL
	Sativex®	Solução para pulverização bucal	THC e CBD	27 mg/mL THC 25 mg/mL CBD
	Tilray Flor seca THC 18	Substância de origem vegetal para inalação por vaporização	THC e CBD	18% THC <1% CBD

**CBD** – Canabidiol; **INFARMED** – Autoridade nacional do medicamento e produtos de saúde, I.P.; **THC** -  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol.

#### **4. Revisão da Literatura**

A legalização da canábis e a expansão do uso de produtos de canábis levou a uma necessidade urgente de métodos analíticos validados para a quantificação de canabinóides em flores e produtos acabados de *Cannabis sativa* L. (Borges et al., 2020; Mudge & Brown, 2020). Desde a descoberta dos principais canabinóides e à medida que os países começaram a legalizar a marijuana medicinal e recreativa, aumentou a necessidade da sua análise, o que exigiu que os laboratórios analíticos se adaptassem rapidamente, recorressem às publicações existentes para obter orientação sobre o desenvolvimento de métodos e desenvolvessem metodologias capazes de realizar o controlo de qualidade nestas amostras (Steimling & Kahler, 2018; Borges et al., 2020). Vários métodos analíticos foram introduzidos para a deteção, identificação, quantificação e análise de vários canabinóides naturais, predominantemente da planta *C. sativa* e as abordagens analíticas consistem na melhor opção para este tipo de análise devido à sua alta sensibilidade e especificidade (Borges et al., 2020; Nahar et al., 2020).

Com o objetivo de desenvolver uma metodologia laboratorial que possa ser aplicada na análise de rotina de um laboratório de controlo de qualidade, foi realizada uma revisão dos métodos analíticos para o doseamento dos canabinóides THC e CBD presentes na planta *Cannabis sativa* L, tabela 3. Nesta tabela só foram considerados estudos que descrevam a análise dos analitos alvo em produtos medicinais à base da planta da canábis, inclusive a planta produzida através de produtores internacionais licenciados, independentemente do método de preparação de amostra e do equipamento analítico utilizado.

**Tabela 3:** Métodos analíticos descritos para a análise de canabinóides em produtos medicinais à base da planta da canábis (*Cannabis sativa* L.).

REFS	Objetivo(s)	Amostra(s)	Analito(s)	Método(s)
(Choi, Hazekamp, et al., 2004)	Isolamento e identificação dos principais canabinóides	Materiais da planta de <i>Cannabis sativa</i> L. (flores secas)	$\Delta^9$ -THC, THCA, $\Delta^8$ -THC, CBG, CBN, CBD e CBDA	$^1\text{H-NMR}$ $^{13}\text{C-NMR}$ FT-NMR
(Choi, Kim, et al., 2004)	Análise metabolómica de 12 cultivares de canábis	12 cultivares e extratos de <i>Cannabis sativa</i> (flores secas e folhas)	THCA, THC, CBN e CBDA	$^1\text{H-NMR}$
(Hazekamp et al., 2004)	Análise quantitativa de canabinóides puros e de canabinóides presentes no material da planta de <i>Cannabis sativa</i>	Material da planta de <i>Cannabis sativa</i> (4 cultivares diferentes) (flores secas)	CBN, THCA, THC, CBDA e CBD	$^1\text{H-NMR}$ GC-FID
(Stolker et al., 2004)	Quantificação e confirmação de canabinóides em produtos de canábis	Lúpulo e canábis	CBD, CBDA, CBN, THC e THCA	HPLC-MS Extração LPE
(Ilias et al., 2005)	Extração e análise de canabinóides diretamente da planta da canábis	3 séries de amostras de marijuana de 3 regiões diferentes da Suíça	CBD, THC e CBN	GC-MS Extração HS-SPME
(Hazekamp et al., 2007)	Estudar a composição canabinóide do chá em condições padronizadas e quantitativas	Canábis de alta qualidade disponível nas farmácias holandesas (1 flor fêmea seca)	THC e THCA	HPLC
(Politi et al., 2008)	Comparação de extratos e tinturas de canábis (diferenças quanto à sua composição geral)	Extratos e tinturas de canábis (material seco de canábis)	THC e THCA	$^1\text{H-NMR}$ $^{13}\text{C-NMR}$
(Fischedick et al., 2009)	Quantificação de $\Delta^9$ -THC e análise qualitativa dos outros principais canabinóides neutros da canábis	2 variedades diferentes: 1 variedade de $\Delta^9$ -THC total relativamente alta e uma variedade de $\Delta^9$ -THC total relativamente baixa (flores fêmeas secas)	CBD, $\Delta^9$ -THC, $\Delta^8$ -THC, CBN, THCV, CBG e CBC	HPLC-DAD HPTLC
(Kayser et al., 2009)	Investigação do estabelecimento de diferenças entre quimiotipos	2 chemotipos de <i>C. sativa</i> L. (flores secas)	$\Delta^9$ -THC, $\Delta^8$ -THC, CBG, CBD, CBC, CBN, CBNA, THCA, CBGA e CBDA	HPLC-DAD $^1\text{H-NMR}$
(Fischedick et al., 2010)	Impressão digital metabólica para o estudo da composição química e da variabilidade de terpenos e canabinóides	11 variedades da planta da canábis ( <i>buds</i> )	CBDV, THCV, CBD, CBC, CBGM, $\Delta^8$ -THC, $\Delta^9$ -THC, CBG e CBN	GC-FID GC-MS
	Estudo da variação no perfil químico da canábis	2 plantas canábis fêmea (flor seca e sementes)		

**Tabela 3 (CONT):** Métodos analíticos descritos para a análise de canabinóides em produtos medicinais à base da planta da cânabís (*Cannabis sativa* L.).

REFS	Objetivo(s)	Amostra(s)	Analito(s)	Método(s)
(Happyana et al., 2013)	Determinar a distribuição e densidade dos tricomas  Análise do perfil de canabinóides	Variedade medicinal Bediol® (Tricomas de vários tipos de <i>Cannabis sativa</i> L.).	THCA, CBDA, CBGA, THC, CBD, CBG, CBC e CBN	SEM LMD HPLC-MS ¹H-NMR
(Romano & Hazekamp, 2013)	Comparar métodos de preparação com base no conteúdo de canabinóides, terpenos e componentes de solventes residuais	Planta da cânabís (flores fêmeas secas)  Extratos concentrados de cânabís (óleos de cânabís)	THCA, THC, CBN, CBGA, CBG, CBCA e CBC	GC-FID HPLC-DAD ¹H-NMR
(Gul et al., 2015)	Deteção e quantificação dos 11 principais canabinóides	Biomassa e extratos de 3 variedades diferentes de cânabís (amostras secas de cânabís)	CBDA, CBGA, CBG, CBD, THCV, CBN, Δ⁹-THC, Δ⁸-THC, CBL, CBC e THCA	HPLC-DAD
(Hung et al., 2015)	Separação de canabinóides	Amostra de um concentrado de marijuana medicinal com alto teor de THC ( <i>bubble hash</i> )	THC, CBD, CBN, THCA e CBDA	HPLC-UV HPLC-DAD
(Peschel & Politi, 2015)	Distinguir quimiotipos e identificar extratos de polaridade diferente	4 tipos de <i>C. sativa</i> L. seca (flores fêmeas, folhas, caules superiores a 2 mm de diâmetro e sementes)	THC, CBD, CBG, THCA, CBDA, CBGA e CBN	¹H-NMR HPLC-DAD
(Citti et al., 2016)	Determinação qualitativa e quantitativa dos principais canabinóides  Avaliar a identidade e a pureza dos analitos  Avaliar a influência do solvente na taxa de degradação dos canabinóides  Avaliar a variação da composição dos terpenos	Extratos de cânabís medicinal (CME)	CBDA, CBD, CBN, THC e THCA	HPLC-DAD HPLC-MS GC-MS
(Mudge et al., 2017)	Quantificação de oito canabinóides	9 amostras secas de marijuana medicinal (flores secas) e 1 óleo de <i>Cannabis</i>	Δ⁹-THC, THCA, Δ⁸-THC, CBD, CBDA, CBG, CBN, CBC e THCV	HPLC-DAD
(Pacifi et al., 2017)	Avaliação da concentração e da estabilidade dos canabinóides	Preparações padronizadas de chá de cânabís e óleo de cânabís (flores secas)	THC, THCA, CBD, CBDA, CBN, CBG e CBC	UPLC-MS/MS
(Patel et al., 2017)	Medição, monitorização da potência e da estabilidade dos canabinóides	Material da planta da cânabís (flores, <i>buds</i> e caules) e 1 produto embalado acabado	CBDA, CBGA, CBD, CBG, THCA, CBN, Δ⁹-THC e Δ⁸-THC	HPLC-DAD

**Tabela 3 (CONT):** Métodos analíticos descritos para a análise de canabinóides em produtos medicinais à base da planta da canábis (*Cannabis sativa* L.).

REFS	Objetivo(s)	Amostra(s)	Analito(s)	Método(s)
(Calvi et al., 2018)	Perfil e impressão digital de compostos voláteis	2 variedades medicinais (Bedrocan® e Bediol®) de <i>Cannabis sativa</i> L. (inflorescências)	THC, CBD, THCA, CBDA, CBN, CBG e CBGA	GC-MS HPLC-MS
	Avaliar a viabilidade da espectrometria de massa de alta resolução	Óleos macerados		Extração HS-SPME
	Estabelecer um novo procedimento para a preparação de óleos macerados de canábis			
(Carcieri et al., 2018)	Avaliar a variabilidade das concentrações de canabinóides	201 preparações galénicas de óleo	THC, CBD, THCA, CBDA e CBN	UPLC-MS/MS
	Avaliar a variabilidade interlote e interlaboratorial no rendimento da extração e na composição da preparação			
(Ciolino et al., 2018a)	Análise qualitativa de canabinóides	5 variedades da planta da canábis ricas em THCA ( <i>buds</i> secos) 60 produtos comerciais (suplementos orais, alimentos, doces, bebidas, vapores/elíquidos e tópicos) 2 óleos de cânhamo, 2 óleos de haxixe	CBD, CBDA, $\Delta^9$ -THC, THCA, CBN, $\Delta^8$ -THC, CBG, CBGA, CBDV, THCV e CBC	GC-MS
		Cápsulas genéricas de dronabinol (dosagem 2.5 mg e 5.0 mg)		
(Ciolino et al., 2018b)	Determinação dos canabinóides da canábis em produtos de consumo comerciais e substâncias tradicionais relacionadas à planta	5 variedades da planta da canábis ricas em THCA ( <i>buds</i> secos) 60 produtos comerciais (suplementos orais, alimentos, doces, bebidas, vapores/elíquidos e tópicos) 2 óleos de cânhamo, 2 óleos de haxixe Cápsulas genéricas de dronabinol (dosagem 2.5 mg e 5.0 mg)	CBD, CBDA, $\Delta^9$ -THC, THCA, CBN, $\Delta^8$ -THC, CBG, CBGA, CBDV, THCV e CBC	HPLC-DAD



**Tabela 3 (CONT):** Métodos analíticos descritos para a análise de canabinóides em produtos medicinais à base da planta da cânabís (*Cannabis sativa* L.).

REFS	Objetivo(s)	Amostra(s)	Analito(s)	Método(s)	
(Citti et al., 2018)	Destacar as principais diferenças na composição química dos extratos de Bediol <sup>®</sup>	24 extratos de cânabís medicinal (CME) (inflorescências)	CBDA, THCA, CBD, THC e CBN	HPLC-DAD HPLC-MS HPLC-MS/MS	
(Callado et al., 2018)	Quantificação dos principais canabinóides	189 amostras secas de variedades medicinais e de cânhamo industrial de <i>Cannabis sativa</i> L. (folhas e inflorescências fêmeas)	CBDV, THCV, CBD, CBC, $\Delta^8$ -THC, $\Delta^9$ -THC, CBG e CBN	GC-FID NIR FT-NIR	
(Baratta et al., 2019)	Preparação e otimização de formulações galénicas à base de cânabís	Formulações galénicas à base de cânabís (146 decocções e 93 óleos) (flores do tipo <i>Cannabis</i> FM2)	THC, THCA, CBD, CBDA e CBN	UPLC-MS	
(Bettiol et al., 2019)	Estudar a variabilidade em termos da concentração dos canabinóides	219 preparações magistrais de óleo	CBD, CBN, THC e THCA	HPLC-DAD	
(Coogan, 2019)	Estudo da gama de perfis de canabinóides disponíveis no programa de Marijuana Medicinal de Nova Jérсия	Variedades de cânabís (flores)	CBGA, CBG, CBDA, CBD, THCA, $\Delta^9$ -THC, $\Delta^8$ -THC e CBN	HPLC	
(Deidda et al., 2019)	Monitorizar as concentrações de $\Delta^9$ -THC e CBD	459 extratos de azeite de cânabís	CBD e THC	HPLC-DAD	
(Elkins et al., 2019)	Qualificação e quantificação dos canabinóides	Biomassa (inflorescências secas) e resina de cânabís medicinal	CBDA, CBD, CBN, THC, CBC, THCA, CBE e CBL	UHPLC-MS-DAD UHPLC-DAD Extração SFE	
(Protti et al., 2019)	Identificar e quantificar canabinóides em produtos de cânabís	2 tipos de produtos recreativos: 2 produtos à base de plantas (inflorescências fêmeas secas e 2 amostras de haxixe)	THC, THCA, CBD, CBDA e CBN	HPLC-DAD-MS/MS	
		Monitorizar o conteúdo de compostos não psicoativos			1 variedade de cânabís medicinal
		7 amostras de cânhamo (inflorescências fêmeas secas)			Extração UAE
		2 extratos líquidos obtidos de cânabís do tipo-fibra			
(Borges et al., 2020)	Análise de CBD, CBN e THC	4 óleos de <i>Cannabis sativa</i>	CBD, CBN e THC	GC-FID	
(Cas et al., 2020)	Determinar o conteúdo de canabinóides	8201 óleos de cânabís	CBDA, CBD, THCA, THC e CBN	GC-MS	

**Tabela 3 (CONT):** Métodos analíticos descritos para a análise de canabinóides em produtos medicinais à base da planta da canábis (*Cannabis sativa* L.).

REFS	Objetivo(s)	Amostra(s)	Analito(s)	Método(s)
(Povedano et al., 2020)	Análise metabolómica não direcionada de extratos de canábis polares e não polares	Extratos de 17 cultivares de <i>Cannabis sativa</i> L. (folhas e inflorescências)	CBG, CBC, CBD, $\Delta^9$ -THC, $\Delta^8$ -THC, CBL, CBE, CBN, CBDN, CBT, CBDV, THCV, CBGV, CBDVA, CBDA, CBGA e THCA	GC-MS HPLC-MS/MS
(Montone et al., 2020)	Identificação abrangente de fitocannabinóides	Extratos de canábis medicinal italiana FM-2 (inflorescências)	CBG, $\Delta^9$ -THC, CBD, CBC, CBN, $\Delta^8$ -THC, CBL, CBDN, CBE, CBT, CBR, CBCT, CBTT, CBF, DCBF, CBM, CBCN, CBGA, THCA, CBDA, CBCA, CBNA, CBEA, CBTA, CBRA, CBFA, DCBFA, THCOA, THCV, THCVA e CBDV	HPLC-MS
(Mudge & Brown, 2020)	Quantificação de 10 canabinóides	<i>Cannabis sativa</i> (marijuana) (flores secas e amostras de óleo)	CBDA, CBD, CBN, THCA, THC, THCV, CBG, CBC, CBDVA e CBGA	HPLC-UV
(Rochfort et al., 2020)	Desenvolver um método de extração para a canábis medicinal	Material seco de canábis medicinal ( <i>buds</i> )	THC e CBD	UHPLC Extração CO <sub>2</sub> -SFE
(Ternelli et al., 2020)	Caracterização química de diferentes óleos de canábis medicinal	Óleos de canábis medicinal (inflorescências)	CBDA, CBGA, THCA, CBN, CBG, CBD e THC	HPLC-MS/MS GC-MS GC-FID Extração HS-SPME
(Yang et al., 2020)	Estudar a composição química e a atividade dos recetores CB <sub>1</sub> /CB <sub>2</sub>	59 amostras de canábis medicinal (45 amostras de flores secas, 2 resinas e 12 amostras de óleo)	CBD, THC, CBDA e THCA	UPLC-MS Extração SFE MAE
(Ahmed et al., 2021)	Caracterização química da canábis de valor medicinal Identificação e quantificação de canabinóides	6 variedades de canábis (flores secas) Extratos de canábis (secos)	CBL, CBD, CBC, THC, CBG e CBN	GC-MS

**Tabela 3 (CONT):** Métodos analíticos descritos para a análise de canabinóides em produtos medicinais à base da planta da cânabís (*Cannabis sativa* L.).

REFS	Objetivo(s)	Amostra(s)	Analito(s)	Método(s)
(Baratta et al., 2021)	Estudo da qualidade e da estabilidade	Cápsulas orais e óleos (inflorescências e flores secas)	CBD, THC, CBDA, THCA e CBN	UPLC-MS
(Brighenti et al., 2021)	Comparar a eficiência das técnicas analíticas	Variedades dos tipos fibra, recreativa e medicinal de cânabís (inflorescências fêmeas)	CBDA, CBD, CBGA, CBG, THCA, THC e CBN	HPLC-DAD <sup>13</sup> C-NMR
(Palermi et al., 2021)	Descrever um protocolo de manuseamento e harmonização de processos para a atividade de titulação	Preparações galénicas (óleos)	THC, CBD, THCA e CBDA	UPLC-MS/MS HPLC-MS/MS
(Qamar et al., 2021)	Quantificação dos 11 principais canabinóides e dos seus ácidos	Material da planta da cânabís (flores secas de cânabís medicinal)	CBDV, THCV, CBD, CBG, CBDA, CBGA, CBN, Δ <sup>9</sup> -THC, Δ <sup>8</sup> -THC, CBC e THCA	UHPLC-DAD Extração CO <sub>2</sub> -SFE
(Viviers et al., 2021)	Analisar uma porção dos produtos à base de cânabís disponíveis no mercado sul-africano e fornecer uma visão geral detalhada dos seus perfis de THC e CBD	840 amostras: alimentos, extratos, infusões, líquidos, material da planta e sólidos	THC e CBD	GC-MS HPLC-DAD

**CBC** – Canabicromeno; **CBD** – Canabidiol; **CBDA** – Ácido canabidiólico; **CBDN** – Canabidinol; **CBDV** – Canabidivarina; **CBDVA** – Ácido canabidivarínico; **CBCA** – Ácido canabicromênico; **CBCN** – Canabicromanona; **CBNA** – Ácido canabinólico; **CBCT** – Canabicitrano; **CBE** – Canabielsoína; **CBEA** – Ácido canabielsoínico; **CBF** – Canabifurano; **CBFA** – Ácido canabifurânico; **CBG** – Canabigerol; **CBGA** – Ácido canabigerólico; **CBGM** – Éter monometílico de canabigerol; **CBGV** – Canabigerovarina; **CBL** – Canabiciolol; **CBM** – Canabimovona; **CBN** – Canabinol; **CO<sub>2</sub> – SFE** – Extração com CO<sub>2</sub> supercrítico; **CBR** – Canabiripsol; **CBRA** – Ácido canabiripsol; **CBT** – Canabitriol; **CBTA** – Ácido canabitriólico; **CBTT** – Canabitetrol; **CME** – Extratos de cânabís medicinal; **<sup>13</sup>C-NMR** – Ressonância magnética nuclear do átomo de carbono; **DCBF** – Dihidrocanabifurano; **DCBFA** – Ácido dihidrocanabifurânico; **FT-NIR** – Espectroscopia de infravermelho próximo com transformada de *Fourier*; **FT-NMR** – Ressonância magnética nuclear com transformada de *Fourier*; **GC-FID** – Cromatografia gasosa acoplada ao detetor de ionização de chama; **GC-MS** – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa; **<sup>1</sup>H-NMR** – Ressonância Magnética Nuclear do átomo de hidrogénio; **HPLC** – Cromatografia líquida de alta eficiência; **HPLC-DAD** – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detetor de rede de díodos; **HPLC-DAD-MS/MS** – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detetor de rede de díodos e à espectrometria de massa em tandem; **HPLC-MS** – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa; **HPLC-MS/MS** – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa em tandem; **HPLC-UV** – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detetor de ultravioleta; **HPTLC** – Cromatografia em camada fina de alta eficiência; **HS-SPME** – Microextração por fase sólida no modo *headspace*; **LMD** – Microdissecação a laser; **LPE** – Extração em fase líquida; **MAE** – Extração assistida por micro-ondas; **NIR** – Espectroscopia de infravermelho próximo; **SEM** – Microscopia eletrónica de varrimento; **SFE** – Extração com fluido supercrítico; **Δ<sup>8</sup>-THC** - Δ<sup>8</sup>-Tetrahydrocannabinol; **Δ<sup>9</sup>-THC ou THC** - Δ<sup>9</sup>-Tetrahydrocannabinol; **THCA** - Ácido Tetrahydrocannabinólico; **THCOA** – Éster de acetato de THC; **THCV** – Δ<sup>9</sup>-Tetrahydrocannabivarina; **THCVA** – Ácido tetrahydrocannabivarínico; **UAE** – Extração assistida por ultrassom; **UHPLC** – Cromatografia líquida de ultra-alta eficiência; **UHPLC-DAD** – Cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada ao detetor de rede de díodos; **UHPLC-MS-DAD** – Cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada ao detetor de rede de díodos e à espectrometria de massa; **UPLC-MS** – Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massa; **UPLC-MS/MS** – Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massa em tandem.

A escolha da(s) abordagem(ens) analítica (s) empregue(s) representa hoje uma tarefa fundamental para monitorizar a composição do material da planta da canábida e garantir a qualidade, a eficácia e a segurança dos seus produtos derivados, assim os parâmetros de extração bem como os de pré-tratamento da planta e a análise de canabinóides desempenham um papel crucial para garantir um produto final rico em compostos bioativos (Calvi et al., 2018; Nahar et al., 2020; Brighenti et al., 2021; Micalizzi et al., 2021). Como mencionado anteriormente, as técnicas de extração desempenham um papel importante na análise de uma molécula alvo, assim um protocolo de extração deve fornecer não apenas altos valores de recuperação, mas ao mesmo tempo deve ser simples, seletivo e reproduzível e com base na complexidade da matriz, a preparação da amostra deve reduzir o maior número possível de interferências para garantir resultados analíticos exatos (Micalizzi et al., 2021).

Na planta da canábida, os canabinóides estão presentes nas flores e nas folhas, e o método de extração mais empregue é a extração sólido-líquido (SLE), que envolve o uso de um solvente apropriado com grande afinidade por canabinóides, embora também possam ser encontrados outros métodos na literatura como a microextração em fase sólida (SPME) e a extração com fluído supercrítico (SFE) (Citti et al., 2018; Micalizzi et al., 2021). Os canabinóides são compostos não polares com baixa solubilidade em água e podem ser extraídos usando uma variedade de solventes, desde solventes polares, como metanol (MeOH), etanol (EtOH) ou acetato de etilo (EtOAc), até solventes apolares, como n-hexano (Citti et al., 2018; Rochfort et al., 2020; Micalizzi et al., 2021). Contudo, devido à sua alta afinidade pela estrutura molecular dos canabinóides, o etanol permite uma extração seletiva de ácidos ou canabinóides neutros, no entanto, graças ao caráter lipofílico, também o n-hexano é empregue para o controlo de qualidade dos canabinóides (Micalizzi et al., 2021). Ao lidar com a canábida medicinal, os solventes orgânicos tóxicos devem ser evitados (Citti et al., 2018).

A seleção da técnica analítica mais adequada geralmente é um compromisso entre a velocidade, a seletividade e a sensibilidade (Politi et al., 2008). Vários métodos foram publicados para a análise de canabinóides na canábida, incluindo a cromatografia em camada fina (TLC), a cromatografia em camada fina de alta eficiência (HPTLC), a cromatografia gasosa (GC) e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Gul et al., 2015). A maioria dos laboratórios e dos artigos publicados para a quantificação dos canabinóides no material da planta da canábida descreve o uso da cromatografia líquida de

alta eficiência acoplada a um detetor de rede de díodos (HPLC-DAD) e/ou à espectrometria de massa (HPLC-MS), embora outras técnicas também possam ser aplicadas, como a cromatografia gasosa acoplada a um detetor de ionização de chama (GC-FID) ou à espectrometria de massa (GC/MS) e a ressonância magnética nuclear (NMR) (Ciolino et al., 2018b; Borges et al., 2020; Ahmed et al., 2021; Brighenti et al., 2021).

As técnicas baseadas em GC têm uma longa história e dominaram inicialmente a arena de análise da canábis, no entanto, este equipamento analítico é uma técnica lenta e dispendiosa e não permite a análise direta da amostra extraída, pois envolve o aquecimento da amostra a alta temperatura (cerca de 280°C) antes da separação cromatográfica para transformar a amostra líquida na sua fase gasosa (Ciolino et al., 2018a; Callado et al., 2018; Steimling & Kahler, 2018; Nahar et al., 2020). Este aquecimento leva inevitavelmente à descarboxilação dos ácidos canabinóides para obter os correspondentes canabinóides neutros, pelo que é necessário uma derivatização antes da injeção para preservar a sua estrutura antes da análise e proteger os seus grupos funcionais (ácido carboxilo) (Citti et al., 2018; Leghissa et al., 2018; Steimling & Kahler, 2018). Portanto, esta metodologia não pode ser empregue para avaliar a composição real dos canabinóides presentes nas preparações à base de canábis sem uma etapa preliminar de derivatização, pois o resultado final a emitir é a soma da concentração das formas ácidas com as formas neutras respetivas (Citti et al., 2016; Citti et al., 2018). A derivatização requer preparação extra da amostra, mas melhora a separação cromatográfica devido ao aumento da volatilidade dos produtos (Leghissa et al., 2018). Embora as técnicas de cromatografia gasosa, ainda se encontrem em uso e pertencem à lista dos métodos recomendados pela *United Nations Office on Drugs and Crime* (UNODC) para a análise de canábis e dos seus produtos, os laboratórios geralmente preferem o uso da cromatografia líquida (LC) devido às etapas adicionais de preparação de amostras associadas à derivatização, especialmente desde a introdução da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e da cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) ou cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (UHPLC) (Leghissa et al., 2018; Elkins et al., 2019; Nahar et al., 2020).

As técnicas baseadas em cromatografia líquida (LC), nomeadamente a cromatografia líquida hifenada, incorporando o HPLC, o UPLC ou o UHPLC, geralmente acoplados a um detetor ultravioleta (UV), a uma rede de díodos UV (DAD) ou à espectrometria de massa (MS), tornaram-se ferramentas analíticas populares nas últimas décadas e são os métodos de eleição para a determinação de canabinóides naturais na maioria dos laboratórios (Nahar et al., 2020). O UPLC é uma técnica cromatográfica líquida avançada que oferece um tempo de análise significativamente curto, muito melhor eficiência de separação e resolução de misturas de analitos, permite a deteção de analitos numa concentração muito baixa devido à sua melhor relação sinal-ruído e requer um volume de injeção muito menor sem perda de sensibilidade, bem como utiliza uma pequena quantidade de solvente(s) como fase móvel, no entanto, o HPLC ainda continua a ser o método de escolha devido à maior acessibilidade dos laboratórios a este sistema em comparação ao UPLC e também devido à maior pressão em comparação ao HPLC convencional, o que leva à diminuição do tempo de vida das colunas (Nahar et al., 2020).

O HPLC é considerado um método simples e indiscutivelmente é a técnica de separação cromatográfica mais popular, moderna, poderosa e versátil que tem sido usada rotineiramente para separar, identificar e quantificar componentes de misturas complexas, por exemplo, extratos de produtos naturais, frações ou produtos acabados (Nahar et al., 2020; Qamar et al., 2021). O HPLC é frequentemente usado para a análise de canabinóides em canábis ou produtos derivados na sua forma nativa, sendo um método mais adequado do que o GC porque não requer pré-tratamentos de amostra demorados, não envolve stress térmico, permite a quantificação simultânea dos compostos ácidos e neutros de cada canabinóide na mesma corrida cromatográfica, sem o uso de protocolos de derivatização particulares ou procedimentos de aquecimento (Gul et al., 2015; Patel et al., 2017; Micalizzi et al., 2021; Qamar et al., 2021). Com o HPLC podem ser empregues diferentes tipos de detetores, como o de ultravioleta (UV), a rede de díodos (DAD), o de fluorescência (FLD) e a espectrometria de massa (MS), embora o UV e o DAD são os mais frequentemente usados com análise por LC com base no baixo custo inicial, facilidade de uso e robustez (Citti et al., 2018; Nahar et al., 2020; Micalizzi et al., 2021). A deteção UV é uma abordagem muito direta, o instrumento é mais simples e menos caro, em relação aos sistemas MS, e é a mais utilizada para a análise de canabinóides em materiais de plantas, onde a quantidade dos principais canabinóides é relativamente alta, no entanto, tem menos sensibilidade, seletividade e especificidade em comparação com

o MS (Citti et al., 2018; Leghissa et al., 2018; Deidda et al., 2019). Embora o detetor de UV seja o mais empregue, apresenta algumas desvantagens relacionadas à pouca sensibilidade e especificidade, porém, a baixa especificidade pode ser superada pelo uso de um detetor DAD, uma vez que os ácidos canabinóides apresentam um espectro de absorção diferente dos canabinóides neutros (Citti et al., 2018). Enquanto, o comprimento de onda ( $\lambda$ ) usado para detetar os canabinóides na forma neutra é de cerca de 220 nm, as formas ácidas apresentam uma absorção máxima entre 270 e 310 nm (Citti et al., 2018; Micalizzi et al., 2021). O custo comparativamente baixo do detetor e a manutenção combinados com a maior reprodutibilidade, tornam o DAD o instrumento de escolha para análises de rotina (Elkins et al., 2019).

Outros detetores, como por exemplo, o detetor evaporativo de dispersão de luz (ELSD), o detetor de infravermelho (IR), o detetor eletroquímico (ELD) e o detetor de fluorescência (FLD) também se encontram em uso, embora poucos estudos descrevam o uso de HPLC-FLD, uma vez que os espectros de fluorescência dos canabinóides são fortemente afetados pelo pH da fase móvel e os ácidos canabinóides perdem completamente as suas propriedades de fluorescência em condições ácidas (Citti et al., 2018; Nahar et al., 2020).

Por fim, a crescente necessidade de metodologias mais rápidas e ecológicas encorajou a testar outros métodos analíticos alternativos à análise convencional de HPLC e GC para a determinação de canabinóides, o que inclui a ressonância magnética nuclear (NMR) (Peschel & Politi, 2015; Citti et al., 2018; Brighenti et al., 2021). Esta técnica é rápida e seletiva e as suas principais vantagens estão relacionadas à quantidade reduzida de solvente necessário para a análise e aquisição simultânea dos dados quali-quantitativos dos analitos-alvo e a falta de sensibilidade às impurezas presentes no material de plantas, como a clorofila e os lípidos, no entanto, não é comumente empregue devido aos altos custos instrumentais e à necessidade de pessoal altamente especializado (Politi et al., 2008; Citti et al., 2018; Brighenti et al., 2021).

## 5. Propósitos e objetivos da dissertação

O objetivo do presente trabalho é desenvolver formulações à base de canábis na forma farmacêutica líquida (óleos) para administração oral, para posteriormente se registrar os produtos através de uma Autorização de Colocação no Mercado (ACM), concebida com base na avaliação da qualidade. Todos os produtos medicinais à base de canábis disponíveis no mercado português contêm THC e/ou CBD, à exceção do Epidiolex®, assim o que distingue, as formulações que foram desenvolvidas são a sua composição e as suas formas farmacêuticas líquidas, sendo o primeiro produto a ser introduzido no mercado nacional com os dois ativos e na forma de solução oral. Os produtos finais não foram testados em nenhum modelo animal, pois os pedidos de ACM são procedimentos simplificados não exigindo a realização de ensaios clínicos, não obstante existem pressupostos na legislação que salvaguardam a segurança e eficácia dos produtos, como é o caso da definição das possíveis vias de administração e a listagem das indicações terapêuticas aplicáveis.

Para além do desenvolvimento galénico de formulações, os outros dois objetivos deste projeto de dissertação são:

- Realizar o estudo da estabilidade das formulações desenvolvidas;
- Desenvolver e validar um método por HPLC-DAD que possa ser aplicado nas análises de rotina do Laboratório de Estudos Farmacêuticos (LEF) para o doseamento dos canabinóides  $\Delta^9$ -THC e CBD em amostras de óleo à base de canábis.



## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **1. Revisão da Literatura**

A revisão da literatura foi realizada através de uma pesquisa detalhada e da análise de artigos científicos presentes em bases de dados, nomeadamente a biblioteca do conhecimento online (B-on), base de dados de referência portuguesa, o *PubMed*, o *Science Direct*, o *Mendeley*, o *Google Académico*, o *Scielo*, o *Springer* e o *Elsevier*. Para esta pesquisa utilizou-se as seguintes palavras-chave: “*analysis cannabinoids medicinal*”, “*analysis cannabinoids medical*” e “*medical cannabis*”. Após a análise do título/resumo só foram incluídos artigos originais e de revisão em inglês sobre a planta *Cannabis sativa* L. no âmbito medicinal. Para além destas bases de dados, também foi possível recolher informação relevante para a elaboração deste projeto de dissertação na página do INFARMED, no diário da República Eletrónico (DRE), no EUR-LEX, na UNODC, na FDA, na *European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction* (EMCDDA), na EMA e no *International Conference on Harmonization* (ICH).

### **2. Reagentes, materiais e amostras**

A autoridade reguladora nacional, o INFARMED, licencia o uso de um medicamento, preparação ou substância com base nos requisitos europeus, assim as formulações foram desenvolvidas de acordo com:

- As Boas práticas agrícolas e de colheita - *Guideline on Good Agricultural and Collection Practice* (GACP) publicada pela EMA;
- As Boas práticas de fabrico de substâncias ativas destinadas a medicamentos para uso humano, aprovadas pelo Regulamento Delegado (UE) nº1252/2014 da Comissão, de 28 de Maio de 2014, que complementa a Diretiva 2001/83/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, no que se refere aos princípios e diretrizes de boas práticas de fabrico de substâncias ativas destinadas a medicamentos para uso humano;
- As Boas Práticas de Fabrico de Medicamentos (GMP), previstas no Decreto-Lei nº176/2006, de 30 de Agosto, que na sua redação atual, estabelece o regime jurídico dos medicamentos de uso humano, com as devidas adaptações;
- As Boas práticas de distribuição de substâncias ativas e de medicamentos, fixadas no âmbito da União Europeia;

- A *guideline* ICH Q8 referente ao desenvolvimento farmacêutico;
- A *guideline* ICH Q1A (R2) que determina quais os testes de estabilidade a realizar em novas substâncias e nos produtos farmacêuticos;
- E segundo a *guideline* ICH Q6A que estabelece as especificações quanto aos procedimentos de teste e aos critérios de aceitação para novos medicamentos.

Como os produtos desenvolvidos vão ser introduzidos no mercado através de uma ACM estão sujeitos a um termo de confidencialidade. Assim, os fornecedores do laboratório, os reagentes, as soluções-padrão, as soluções usadas no método e as condições instrumentais do equipamento analítico são confidenciais, bem como a metodologia aplicada no desenvolvimento galénico de formulações, para o estudo da estabilidade dos lotes laboratoriais e para o desenvolvimento e validação do método por HPLC-DAD para o doseamento dos compostos THC e CBD. Assim, os métodos apresentados são uma metodologia geral do que foi desenvolvido ao longo deste projeto. Todos os reagentes usados para o desenvolvimento do método por HPLC são de grau analítico (*HPLC grade*). O *software* usado na análise e no processamento dos dados também está incluído neste acordo de confidencialidade.

## **2.1. Acondicionamento dos extratos**

A empresa que subcontratou o LEF para a elaboração das formulações à base de canábis, enviou dois extratos, THC e CBD. Os extratos provenientes da Colômbia chegaram ao laboratório na forma de resina com elevada concentração de matéria ativa e com tendência para formação de cristais, pelo que foi necessário um processo de aquecimento e agitação até se obterem amostras mais homogêneas. Posteriormente, ambos foram colocados e armazenados no laboratório à temperatura ambiente (25°C) e com acesso restrito.

## **2.2. Métodos**

### **2.2.1. Preparação das formulações galénicas à base de canábis**

Antes de se proceder ao desenvolvimento das formulações, os dois extratos THC e CBD foram analisados no departamento de controlo de qualidade na área de introdução de novos produtos. Neste departamento realizaram-se diversos ensaios, tais como a análise de aflatoxinas, ocratoxinas, solventes residuais, bem como a identificação e o doseamento

dos canabinóides THC e CBD, tendo como objetivos assegurar a qualidade dos dois extratos e garantir que estes estão em conformidade com as especificações do fornecedor. Contudo, a metodologia e os resultados destes ensaios não são apresentados porque não pertencem aos propósitos e objetivos desta tese de dissertação.

Após verificar que os contaminantes microbiológicos, os solventes residuais e que a concentração dos canabinóides se encontravam dentro dos parâmetros dos certificados de análise enviados pelo fabricante, realizou-se uma pesquisa sobre quais os excipientes líquidos mais utilizados na formação dos medicamentos à base de canabinóides, nomeadamente em formulações líquidas (óleos). Com base nas suas características físico-químicas selecionaram-se três excipientes diferentes. Posteriormente, as formulações foram desenvolvidas de acordo com o grau de pureza dos dois extratos, e tendo em consideração que existe a presença de THC e CBD no extrato de CBD e THC, respetivamente, as concentrações finais e as respetivas massas foram calculadas conforme a percentagem de THC e CBD pretendida.

Tendo em conta que foi assinado um termo de confidencialidade aquando do início da parte laboratorial do presente projeto, as quatro concentrações a que foram preparadas as formulações e os três excipientes usados não podem ser mencionados, sendo as concentrações e os excipientes a partir de agora denominados 1, 2, 3, 4 e A, B, C, respetivamente. Para as formulações com os dois compostos ativos, pesou-se cada extrato para o mesmo balão de 10 mL e fez-se o volume com o excipiente A (2A, 3A, 4A). Este processo foi realizado para o excipiente B (2B, 3B, 4B) e C (2C, 3C, 4C). Para as formulações à base de CBD, pesou-se o extrato em triplicado para balões de 10 mL diferentes e fez-se o volume dos balões com o excipiente A, B e C (1A, 1B, 1C). Esta etapa teve como finalidade avaliar a solubilidade dos extratos nos excipientes usados, sendo um excipiente ou um veículo, um solubilizador que aumenta a biodisponibilidade dos ingredientes farmacêuticamente ativos (API), neste caso, os canabinóides, fornecendo forma e volume à preparação, para possibilitar a toma única dos ativos. Posteriormente, as formulações desenvolvidas foram submetidas a uma cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de rede de díodos (HPLC-DAD).

### **2.2.2. Acondicionamento das formulações**

As doze formulações anteriormente desenvolvidas e os três excipientes foram colocados e armazenados no laboratório à temperatura ambiente (25°C) e com acesso restrito. Os excipientes, com base nas indicações do fornecedor, não necessitam de condições específicas de armazenamento.

### **2.2.3. Estudos preliminares**

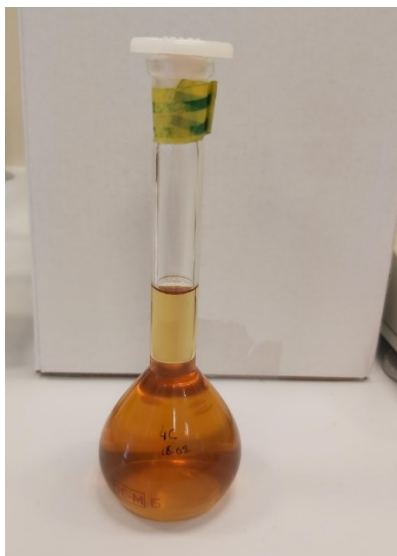
Antes de se desenvolver formulações galénicas em larga escala e otimizar a metodologia de extração e análise, é necessário realizar estudos preliminares. Estes estudos envolvem a análise de diferentes parâmetros, um dos quais, a seletividade. Para avaliar este parâmetro foram selecionadas quatro formulações que foram desenvolvidas em dois veículos diferentes (B e C): duas apenas com CBD (1B e 1C) e as restantes com a mesma proporção dos API, THC e CBD (2B e 2C). O veículo A foi excluído na etapa 2.2.1. devido à formação de um precipitado, o que é indicativo de que os vários componentes da formulação são incompatíveis com este veículo. Relativamente a estas quatro formulações, pesou-se cada uma para balões volumétricos de 25 mL diferentes, tendo as suas massas sido ajustadas, para uma determinada concentração final de THC/CBD, concentração teste, com base na concentração dos canabinóides nas formulações líquidas.

Após a pesagem, perfiz-se cada balão com um determinado solvente de extração e filtrou-se as soluções com filtros de seringa estéreis. Este procedimento foi realizado para os quatro placebos, que são os dois veículos que foram usados no fabrico das formulações (B e C) e os dois restantes são os mesmos excipientes aos quais se juntou duas gotas de uma essência. Posteriormente, as oito soluções foram agitadas manualmente. A injeção dos placebos e da essência têm como finalidade avaliar o seu comportamento nas formulações desenvolvidas e se estes interferem no doseamento dos analitos alvo. Além disto, a solução aromática permite disfarçar as características organoléticas da planta da canábis presente nos óleos. Para determinar os tempos de retenção (TR) dos canabinóides em estudo e conseqüentemente proceder à sua identificação, preparou-se uma solução-padrão (P1), a partir das soluções-stock de THC, CBD e CBN a uma concentração de 1000 µg/mL, para uma concentração de 200 µg/mL, 200 µg/mL e 2 µg/mL, para um volume final de 1 mL e perfiz-se com o solvente do padrão. Posteriormente, as quatro amostras, os quatro placebos, a solução-padrão, o solvente da amostra e o solvente do padrão foram analisados por HPLC-DAD a um determinado comprimento de onda. Cada

solvente e cada solução padrão foi injetada duas vezes no sistema e relativamente aos solventes têm como objetivo discriminar eventuais picos que possam aparecer nos cromatogramas das amostras e da solução padrão.

#### **2.2.4. Estudo da estabilidade dos lotes laboratoriais**

Antes de se desenvolverem formulações em grande escala para se prosseguir com o estudo da estabilidade dos lotes laboratoriais, realizou-se outro estudo preliminar para verificar se a concentração dos fitocanabinóides, THC e CBD, corresponde às concentrações a que foram desenvolvidas as formulações. Nesta etapa, preparou-se uma nova formulação, denominada formulação-teste, apenas num único veículo (4C) para um balão de 50 mL, conforme se encontra ilustrado na figura 4. Como se preparou uma maior quantidade de óleo, desta vez, pesaram-se os dois extratos para o mesmo gobelet de 100 mL e adicionou-se o excipiente C. Após a diluição dos extratos, transferiu-se a solução para um balão e perfez-se o volume com o mesmo excipiente.



**Figura 4:** Formulação-teste desenvolvida no excipiente C (4C).

Relativamente ao doseamento dos canabinóides, pesou-se a formulação 4C para um balão volumétrico de 25 mL, tendo a sua massa sido ajustada, para uma determinada concentração final de THC/CBD, concentração teste, com base na concentração dos canabinóides presentes no óleo. Após a pesagem, perfez-se o balão com um determinado solvente de extração e filtraram-se as soluções com filtros de seringa estéreis. Este procedimento foi realizado em duplicado, toma 1 (T1) e toma 2 (T2). Como se pretende determinar a concentração dos compostos THC e CBD, traçou-se uma curva de calibração

para cada composto através de uma solução-padrão, FS-CI, preparada a partir das soluções-stock de THC, CBD e CBN, a uma concentração de 1000 µg/mL, para uma concentração de 200 µg/mL, 200 µg/mL e 2 µg/mL, para um volume final de 1 mL e perfez-se o volume com o solvente dos padrões.

Segundo os métodos internos, para avaliar a adequabilidade do sistema (*system suitability*), recomenda-se no mínimo 6 níveis de concentração para as retas de calibração, assim o FS-CI foi injetado no sistema 6 vezes. Posteriormente, o solvente da amostra, o solvente do padrão, a solução padrão FS-CI e a FS-CI D-Check, bem como as duas tomas da amostra foram analisados por HPLC-DAD a um determinado comprimento de onda. A solução D-Check é de contra-verificação da reta de calibração e consiste em soluções-stock individuais dos canabinóides a 1000 µg/mL de THC, CBD e CBN e têm como finalidade determinar a recuperação, ou seja, a quantidade de analito (em percentagem) que é extraído e passível de ser analisado pelo sistema de medição. As condições instrumentais do equipamento analítico utilizadas no doseamento dos canabinóides são iguais às que foram usadas na etapa 2.2.3. que se refere aos estudos preliminares.

Relativamente ao estudo da estabilidade dos lotes laboratoriais, antes de se preparar as formulações, foi necessário aquecer novamente os extratos a uma determinada temperatura segundo as indicações do fabricante para homogeneização dos API. Posteriormente, para as formulações com os dois compostos ativos, THC e CBD, pesou-se cada extrato para gobelets de 100 mL diferentes e adicionou-se o excipiente B (1B, 2B, 3B, 4B). Após a solubilização de cada extrato no veículo, transferiram-se as soluções para balões de 100 mL e perfez-se o volume com o mesmo excipiente. Este processo foi realizado para o excipiente C (1C, 2C, 3C, 4C). Para as formulações de CBD, pesou-se o extrato para dois gobelets de 100 mL, adicionou-se o excipiente B e C e após a sua diluição, transferiram-se as soluções para balões de 100 mL diferentes e perfez-se o volume com o respetivo veículo. Estas formulações foram preparadas à temperatura ambiente (25°C). Para avaliar qual a influência da temperatura no processo de fabrico dos produtos, mais propriamente, a solubilização dos extratos nos dois veículos e consequentemente o doseamento dos canabinóides no produto final, cada extrato foi pesado em duplicado e a sua solubilização nos veículos B (1B, 2B, 3B, 4B) e C (1C, 2C, 3C, 4C) foi realizada a 37°C. Esta temperatura foi controlada através de uma sonda e após a completa solubilização da mistura, transferiu-se para um balão de 100 mL e perfez-se o volume com o mesmo veículo.

No final, cada formulação foi amostrada e dividida de modo a ser representativa de todo o lote para quatro tubos de 15 mL. As formulações com as temperaturas de fabrico de 25°C e 37°C que representam o tempo zero (T0), data em que o produto é colocado nas condições de estabilidade e que não deverá ultrapassar os 90 dias após fabrico, foram analisadas por HPLC-DAD quanto ao seu conteúdo de THC e CBD.

Os estudos de estabilidade em produtos farmacêuticos têm como finalidade fornecer evidências sobre a qualidade de uma substância ativa ou produto ao longo do tempo, sendo este sujeito a diferentes fatores ambientais tais como a temperatura, a humidade e a exposição à luz. A realização destes estudos visa o estabelecimento de prazos de validade e a determinação das condições de armazenamento adequadas. Nesta primeira fase, para avaliar as condições de conservação, nomeadamente a influência da temperatura na concentração dos ativos, armazenou-se cada formulação (25°C e 37°C) em três câmaras climáticas diferentes durante 28 dias (T28), a 5°C ± 3°C, a 25°C ± 2°C e a 40°C ± 2°C, com base na *guideline* ICH Q1(A), que determina quais os testes de estabilidade a realizar em novas substâncias e nos produtos farmacêuticos. Estas temperaturas representam as condições de ensaio nas zonas climáticas I (Zona “Moderada”) e II (Zona “Subtropical”), na qual se inclui Portugal. Como a região climática na qual o produto será comercializado condiciona as suas condições de armazenamento, ainda existe mais 2 zonas identificadas, para abranger os países com temperaturas mais quentes, a zona III (“Quente e seco”) e a zona IV (“Tropical”).

Após os 28 dias de estabilidade, e tendo em conta a *guideline* ICH Q6A e as normas internas do próprio laboratório, deve-se incluir no protocolo de estabilidade, os testes que permitem detetar possíveis alterações das características do produto, que influenciam a qualidade/eficácia do mesmo ao longo do tempo de armazenagem, sendo três destes testes, o aspeto, o doseamento dos princípios ativos e o doseamento das substâncias de degradação (CBN). A metodologia e os resultados destes ensaios não vão ser apresentados, pois as formulações foram colocadas nas câmaras climáticas dia 6 de Setembro, assim, só poderiam ser analisadas, dia 4 de Outubro, o que significa que os dados não puderam ser processados em tempo útil até à data de submissão da tese de dissertação. No final, o doseamento dos canabinóides irá permitir escolher qual o melhor excipiente e a temperatura de fabrico para o desenvolvimento das formulações através da comparação entre a concentração dos ativos na T0 e na T28. Como as formulações

também foram armazenadas durante 28 dias, a 5°C, 25°C e a 40°C, as eventuais diferenças nas concentrações de THC e CBD entre a T0 e a T28 também irá possibilitar escolher qual das três temperaturas é a indicada para a sua conservação.

### **2.2.5. Desenvolvimento do método**

As formulações T0 anteriormente preparadas à temperatura ambiente (25°C) e a 37°C em dois excipientes diferentes (B e C) foram analisadas por HPLC-DAD quanto ao seu conteúdo de THC e CBD. Como tal, pesou-se cada formulação diretamente para um balão volumétrico de 25 mL, tendo a sua massa sido ajustada, para uma determinada concentração final de THC/CBD, concentração teste, com base na concentração dos canabinóides presentes nos óleos. Após a pesagem, perpez-se o volume do balão com um determinado solvente de extração, agitou-se manualmente as soluções e filtrou-se com filtros de seringa estéreis. Este procedimento foi realizado em duplicado, toma 1 (T1) e toma 2 (T2). Para determinar a concentração dos analitos alvo, traçou-se uma curva de calibração para cada composto, concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ) versus área do pico (mV.s), através uma solução-padrão, FS-CI, preparada a partir das soluções-stock de THC, CBD e CBN, a uma concentração de 1000  $\mu\text{g/mL}$ , para uma concentração de 200  $\mu\text{g/mL}$ , 200  $\mu\text{g/mL}$  e 2  $\mu\text{g/mL}$ , para um volume final de 1 mL e perpez-se o volume com o solvente dos padrões.

Segundo os métodos internos, para avaliar a adequabilidade do sistema (*system suitability*), recomenda-se no mínimo 6 níveis de concentração para as retas de calibração, assim o FS-CI foi injetado no sistema 6 vezes. Posteriormente, o solvente da amostra, o solvente do padrão, as soluções padrão FS-CI e a FS-CI D-Check, bem como as duas tomas da amostra foram analisados por HPLC-DAD a um determinado comprimento de onda. De acordo com as normas internas do laboratório, a cada 6 injeções de amostra, é necessário colocar novamente no sistema o solvente dos padrões, a solução-padrão FS-CI (D-End) e o solvente da amostra. Como foram analisadas 16 formulações, ou seja, no total 32 formulações contabilizando as duas tomas, foi necessário colocar mais cinco vezes cada solvente e solução-padrão no equipamento. As condições instrumentais do equipamento analítico utilizadas no doseamento dos canabinóides são iguais às que foram usadas na etapa 2.2.3. e 2.2.4.



### **2.2.6. Sistema de limpeza do equipamento HPLC-DAD**

A preparação do sistema de HPLC, nomeadamente a lavagem da bomba e dos seus canais e do injetor, foi realizada da seguinte forma: primeiramente retirou-se a coluna da análise anterior e colocou-se a união. Posteriormente, lavou-se e purgou-se todos os canais e a agulha do equipamento com água durante 5 min a um fluxo de 5.0 mL/min. Ao realizar este processo, se o sistema apresentar uma pressão constante, coloca-se a fase móvel num dos canais e repete-se o mesmo procedimento para esta solução. O próximo passo é colocar a coluna e para a acondicionar aumenta-se gradualmente o fluxo da fase móvel até chegar ao fluxo pretendido, monitorizando sempre a pressão do equipamento.

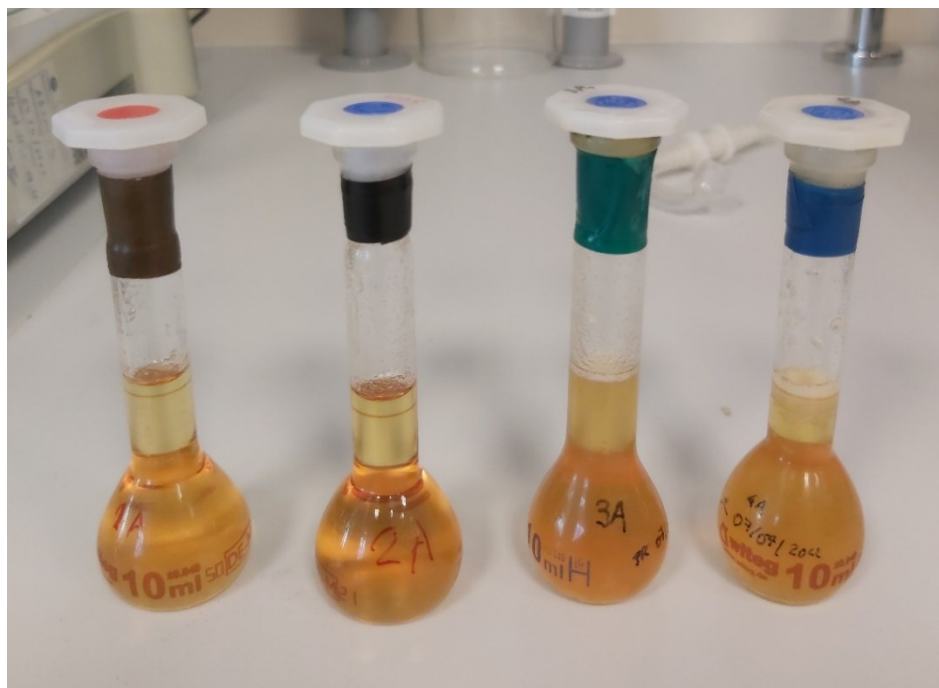
### **2.2.7. Validação do método**

Os dois extratos que foram usados como substâncias ativas nas formulações, foram importados da Colômbia e devido a um atraso bastante alargado não foi possível realizar a última parte deste projeto de dissertação, a validação do método analítico, no prazo inicialmente previsto. Antes da metodologia ser aplicada nas análises de rotina do LEF, é necessário validar alguns parâmetros, segundo as diretrizes europeias como a *guideline* ICH Q2 e a EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2\*\* da EMA, tendo também em consideração as normas internas do próprio laboratório. Os parâmetros de validação anteriormente mencionados incluem: a seletividade, a gama de trabalho, a linearidade, o limite de deteção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ), a exatidão, a precisão (repetibilidade do sistema, repetibilidade da análise e precisão intermédia), o estudo da filtração e a estabilidade das soluções e do sistema. Posteriormente, o próximo passo é a otimização do processo de fabrico.

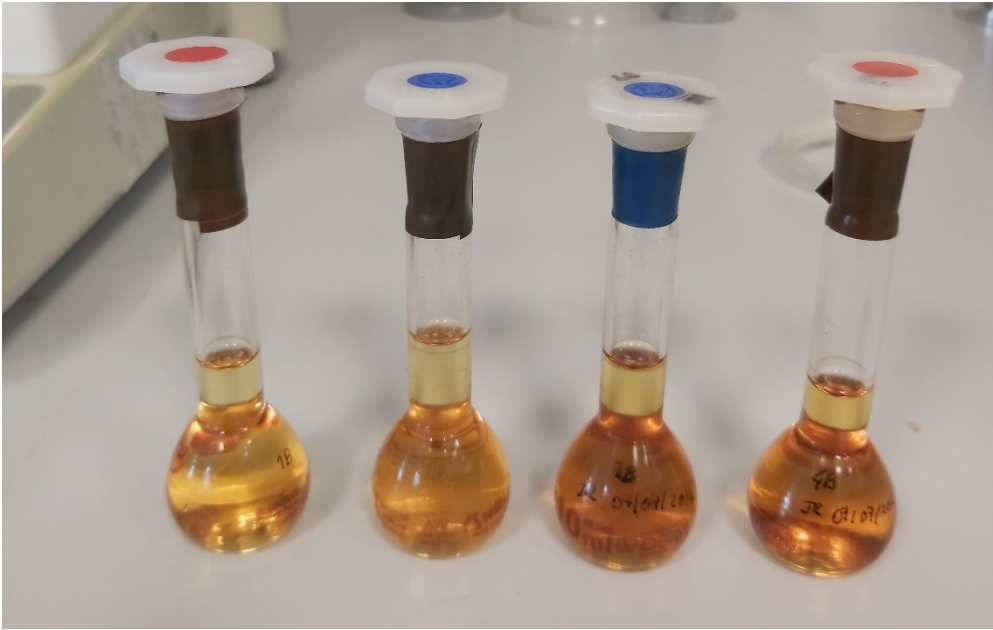
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1. Formulações galénicas à base de canábis

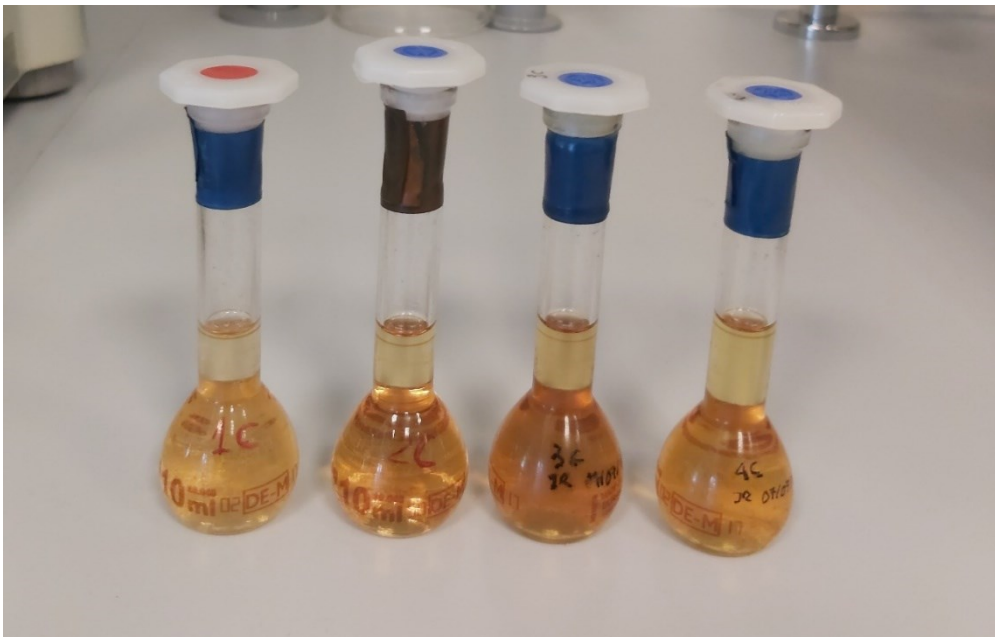
A avaliação da solubilidade é um dos parâmetros de grande relevância para o desenvolvimento farmacêutico. No caso dos API destas formulações, como apresentam uma solubilidade muito reduzida em água e são lipofílicos, a primeira etapa antes de se proceder ao desenvolvimento galénico em larga escala é testar a solubilidade do produto em vários excipientes, sendo que estes têm de permitir a sua solubilização e posterior administração. Como tal, as formulações foram testadas em 3 veículos diferentes. Os resultados obtidos encontram-se na figura 5, 6 e 7 e pode-se observar a formação de um precipitado no excipiente A (figura 5) em todas as preparações, contudo, este fenómeno não ocorreu no excipiente B (figura 6) nem no excipiente C (figura 7). O veículo A, um surfactante líquido não iónico dispersível em água, quando interage com duas moléculas muito lipofílicas, nomeadamente os dois principais fitocanabinóides, o THC e o CBD, leva à formação de um precipitado em meio aquoso, o que releva a incompatibilidade entre o excipiente e os vários componentes da formulação, o que consequentemente inviabiliza a sua utilização nos produtos.



**Figura 5:** Formulações à base de canábis desenvolvidas no excipiente A. Da esquerda para a direita, o primeiro balão representa a formulação de CBD (1A) a uma determinada concentração e os três restantes são as formulações desenvolvidas a três concentrações diferentes de THC e CBD (2A, 3A, 4A).



**Figura 6:** Formulações à base de canábis desenvolvidas no excipiente B. Da esquerda para a direita, o primeiro balão representa a formulação de CBD (1B) a uma determinada concentração e os três restantes são as formulações desenvolvidas a três concentrações diferentes de THC e CBD (2B, 3B, 4B).



**Figura 7:** Formulações à base de canábis desenvolvidas no excipiente C. Da esquerda para a direita, o primeiro balão representa a formulação de CBD (1C) a uma determinada concentração e os três restantes são as formulações desenvolvidas a três concentrações diferentes de THC e CBD (2C, 3C, 4C).

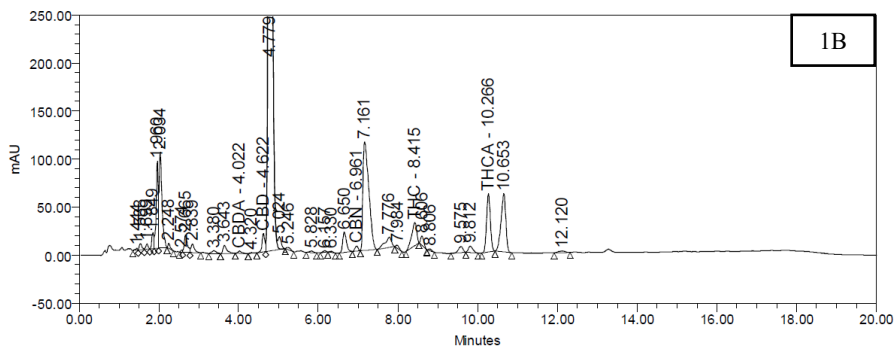
## 2. Estudos preliminares

Os dados foram analisados e processados a um comprimento de onda. Para facilitar a compreensão e discussão dos resultados, o comprimento de onda que se analisou os canabinóides THC e CBD é a partir de agora mencionado como  $\lambda_1$ . Este estudo preliminar tem como finalidade avaliar a seletividade ou especificidade do método analítico, ou seja, se este tem a capacidade de avaliar e diferenciar inequivocamente o(s) analito(s) de interesse de outros componentes endógenos que podem estar presentes na amostra, bem como dos solventes usados no procedimento analítico. A partir da solução-padrão P1, foi possível identificar os canabinóides THC e CBD através dos seus tempos de retenção (TR) (min) (anexo I e tabela 4), estando os cromatogramas da solução-padrão P1 e das amostras presentes nos anexos II e na figura 8, respetivamente.

**Tabela 4:** Tempo de retenção (TR) (min) dos compostos THC e CBD nas amostras 1B, 1C, 2B e 2C.

	Substância	TR (min)
1B	THC	8.415
	CBD	4.622
1C	THC	8.419
	CBD	4.778
2B	THC	8.310
	CBD	4.732
2C	THC	8.329
	CBD	4.730

**CBD** – Canabidiol; **THC** -  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol; **TR** – Tempo de retenção.



**Figura 8:** Cromatogramas das amostras 1B, 1C, 2B e 2C ao comprimento de onda  $\lambda_1$ .

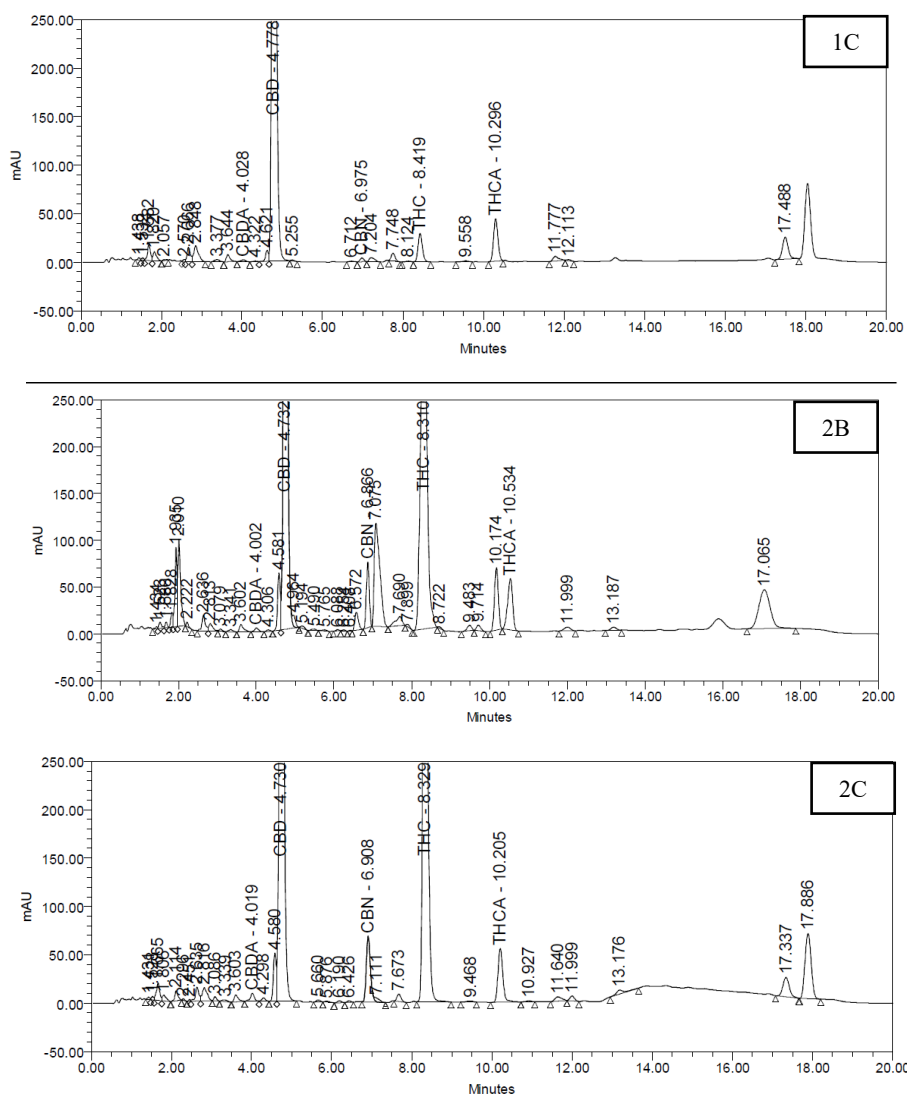
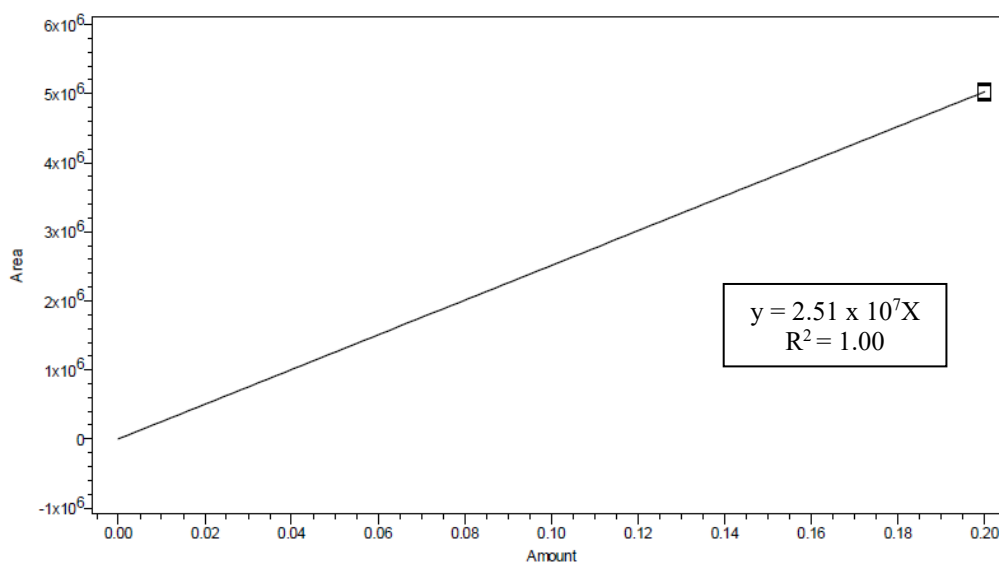


Figura 8 (CONT): Cromatogramas das amostras 1B, 1C, 2B e 2C ao comprimento de onda  $\lambda_1$ .

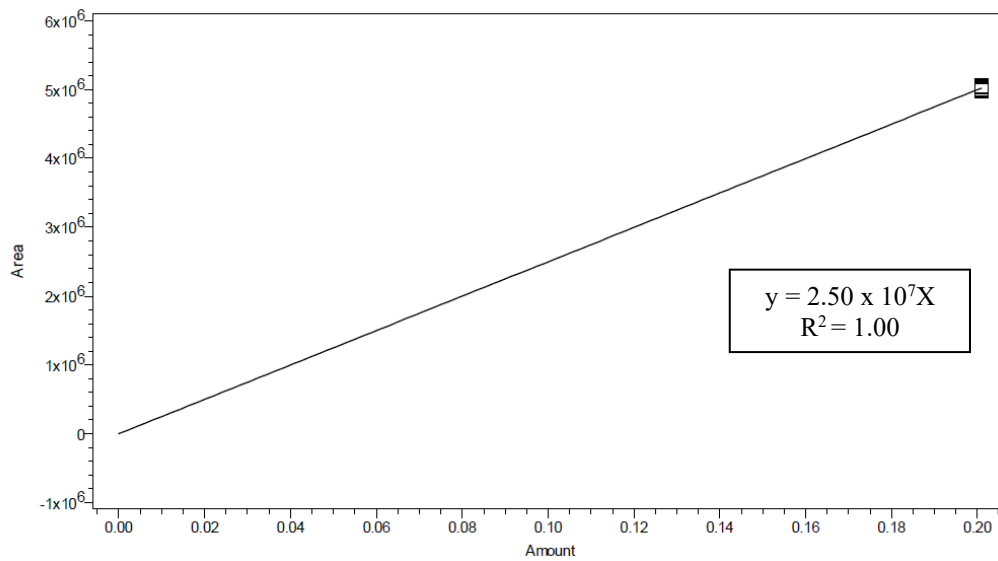
A comparação entre os cromatogramas das amostras (figura 8), dos solventes (anexo III) e dos placebos com e sem a essência (anexo IV), permite concluir que o método analítico identifica os canabinóides THC e CBD de outros componentes presentes na matriz. Por fim, no cromatograma dos placebos (anexo IV), é possível observar a presença dos ativos, muito possivelmente, devido a um efeito de *carry over*. Este efeito é um problema comum em HPLC, e é detetado através da presença inesperada de pequenos picos correspondentes aos compostos de interesse. Estes picos surgem quando uma amostra em branco é injetada após a injeção de amostras com os analitos. Assim, na etapa 2.2.7., referente ao desenvolvimento do método analítico, para evitar contaminações, deve-se injetar primeiro os placebos no sistema.

### 3. Desenvolvimento do método

Para determinar as concentrações dos fitocannabinóides THC e CBD, traçou-se duas curvas de calibração, concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ) vs área do pico (mV.s), para cada composto (figura 9 e 10). Segundo as normas internas do LEF, a determinação da linearidade através da acuidade visual, do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e do gráfico de resíduos só se aplica na validação do método, contudo as duas retas apresentam um  $R^2$  de 1.00 (tabela 5). Apesar das *guidelines* da EMA não referirem qual o valor mínimo aceite para o  $R^2$ , a *guideline* de referência na área forense, *Guidance for the validation of analytical methodology and calibration of equipment used for testing of illicit drugs in seized materials and biological specimens*, da UNODC menciona que um alto coeficiente de determinação de 0.99 é frequentemente usado como um critério para avaliar a linearidade. As áreas (mV.s) e as concentrações ( $\mu\text{g/mL}$ ) usadas para as retas de calibração para o THC e CBD encontram-se nos anexos V e VI, respetivamente.



**Figura 9:** Curva de calibração, concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ) versus área do pico (mV.s), para o THC.



**Figura 10:** Curva de calibração, concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ) versus área do pico (mV.s), para o CBD.

**Tabela 5:** Equação das retas de calibração e respectivos coeficientes de determinação ( $R^2$ ).

Curva de calibração	Equação	$R^2$
THC	$y = 2.51 \times 10^7 X$	$R^2 = 1.00$
CBD	$y = 2.50 \times 10^7 X$	$R^2 = 1.00$

**CBD** – Canabidiol;  **$R^2$**  – Coeficiente de determinação; **THC** -  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol.

Apesar de não se determinar a linearidade no desenvolvimento do método, o que vigora no LEF é a avaliação da adequabilidade do sistema (*system suitability*). O teste à adequabilidade do sistema é uma parte que integra muitos procedimentos analíticos, sendo considerado uma qualificação do desempenho, onde se testa características relacionadas ao equipamento, ao *software* (integração de cromatogramas) e ao método analítico. O objetivo deste teste é garantir a qualidade do método e se este é adequado para um determinado propósito. Os parâmetros do teste de adequação do sistema a serem estabelecidos para um determinado método depende do tipo de procedimento que está a ser validado. Neste caso, e tendo em conta, os métodos de validação internos pretende-se avaliar:

- A Eficiência da coluna ( $N$ ), a capacidade de eluição com o mínimo de dispersão do analito (**equação 1**);

$$N = 16 \times \left(\frac{TR}{W}\right)^2 \quad \text{(Equação 1)}$$

$N$  = Número de pratos teóricos

$TR$  = Tempo de retenção (min)

$W$  = Largura do pico na linha de base

- O Fator de simetria (T), simetria do pico em relação ao seu eixo (**equação 2**);

$$T = \frac{W_{0.05}}{2f} \quad \text{(Equação 2)}$$

T = Fator de simetria

$W_{0.05}$  = Largura do pico a uma altura de 5%

f = Distância do pico da linha central ao início do pico

- O Desvio do padrão relativo (RSD, %) (**equação 3**), usado para comparar a dispersão ou variação em grupos de medidas;

$$\text{RSD (\%)} = \frac{S}{x_{\text{média}}} \quad \text{(Equação 3)}$$

RSD = Desvio do padrão relativo (%)

S = Desvio do padrão

$x_{\text{média}}$  = média dos valores

- E a recuperação (R), a quantidade (em percentagem) de analito que é extraído e passível de ser analisado pelo sistema de medição (**equação 4**).

$$R (\%) = \frac{C_{\text{determinada}}}{C_{\text{nominal}}} \times 100$$

**(Equação 4)**

R = Recuperação (%)

$C_{\text{determinada}}$  = Concentração do componente determinada a partir das 6 injeções de solução-padrão ( $\mu\text{g/mL}$ )

$C_{\text{nominal}}$  = Concentração da solução de referência do componente ( $\mu\text{g/mL}$ )

Para além destes quatro parâmetros, na validação do método também se pretende calcular o grau de separação entre picos adjacentes (resolução,  $R_s$ ), nomeadamente entre o THC e o seu isómero  $\Delta^8$ -THC, bem como a menor quantidade de analito numa amostra que pode ser quantificada, ou seja, o limite de quantificação (LOQ) para as impurezas presentes nas formulações, o THCA, o CBDA e o CBN. Os critérios de aceitação da adequabilidade do sistema usadas no desenvolvimento do método e os valores obtidos para o doseamento dos canabinóides THC e CBD encontram-se sumarizados na tabela 6, 7 e 8.



**Tabela 6:** Critérios de aceitação da adequabilidade do sistema (eficiência, fator de simetria, RSD e recuperação) para o doseamento dos canabinóides THC e CBD.

Solução	Parâmetros	Critérios de aceitação
Reta de calibração	Eficiência	$\geq 2000$
FS-CI (n $\geq 6$ )	Fator de simetria	0.8-1.5
	Área do pico, RSD (%), n $\geq 6$	$\leq 2.0\%$
Soluções de contra-verificação	Recuperação	85.0 – 115.0%
FS-CI D-Check		
FS-CI D-End		

**RSD** – Desvio do padrão relativo.

**Tabela 7:** Resultados da adequabilidade do sistema para o doseamento de THC.

Solução	TR (min)	Área (mV.s)	THC			
			Eficiência	Fator de simetria	RSD (%)	Recuperação (%)
FS-CI	8.045	5047064	28704	1.38		NA
	8.066	5048095	28888	1.39		NA
	8.100	5031681	29154	1.38		NA
	8.126	5020580	29626	1.38	0.32	NA
	8.134	5018376	28786	1.39		NA
	8.172	5009379	28968	1.39		NA
FS-CI D-Check	8.184	5121334	NA	NA	NA	101.832
FS-CI D-End	8.137	4918494	NA	NA	NA	97.799
	8.138	4851434	NA	NA	NA	96.465
	8.173	4755733	NA	NA	NA	94.563
	8.234	4670730	NA	NA	NA	92.872
	8.170	4586694	NA	NA	NA	91.201

NA – Não aplicável; **RSD** – Desvio do padrão relativo; **THC** -  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol; **TR** – Tempo de retenção.

Antes de se introduzir as formulações no equipamento, é necessário avaliar se os critérios de aceitação da adequabilidade do sistema são cumpridos. De acordo com as tabelas 6, 7 e 8, é possível observar que todos os parâmetros estão conforme os métodos de validação internos do laboratório, à exceção do fator de simetria para o CBD. Este fator é influenciado pelo tipo de análise e pelas condições analíticas do equipamento (fase móvel ou coluna), sendo crucial na validação do método perceber a causa do alargamento da base dos picos.

**Tabela 8:** Resultados da adequabilidade do sistema para o doseamento de CBD.

Solução	TR (min)	Área (mV.s)	CBD			RSD (%)	Recuperação (%)
			Eficiência	Fator de simetria			
FS-CI	4.543	5047121	14348	1.64	0.55	NA	
	4.558	5051699	14509	1.65		NA	
	4.578	4998011	14603	1.64		NA	
	4.598	5023856	14691	1.62		NA	
	4.591	4981721	14410	1.65		NA	
	4.632	5011582	14569	1.64		NA	
FS-CI D-Check	4.641	5084688	NA	NA	NA	101.309	
FS-CI D-End	4.610	4878644	NA	NA	NA	97.204	
	4.618	4810467	NA	NA	NA	95.845	
	4.639	4746188	NA	NA	NA	94.564	
	4.678	4628904	NA	NA	NA	92.228	
	4.630	4542748	NA	NA	NA	90.511	

CBD – Canabidiol; NA – Não aplicável; RSD – Desvio do padrão relativo; TR – Tempo de retenção.

Em relação ao doseamento dos canabinóides THC e CBD nas amostras, cada concentração foi calculada de acordo com as seguintes equações:

$$C_{amostra} = \frac{W_{amostra}}{Dil_{amostra}} \times 100$$

**(Equação 5)**

$C_{amostra}$  = Concentração da amostra ( $\mu\text{g/mL}$ )

$W_{amostra}$  = Massa da amostra (mg)

$Dil_{amostra}$  = Fator de diluição da amostra (mL)

$$C (\%) = \frac{C_{componente}}{C_{amostra}} \times 100$$

**(Equação 6)**

C = Concentração da amostra (%)

$C_{componente}$  = Concentração do componente determinada a partir das 6 injeções de solução-padrão ( $\mu\text{g/mL}$ )

$C_{amostra}$  = Concentração da amostra ( $\mu\text{g/mL}$ )

De acordo com a farmacopeia europeia, o intervalo aceite para o doseamento dos canabinóides THC e CBD é de 90.0 a 110.0% do conteúdo nominal indicado no rótulo (tabela 9). Os resultados obtidos para o THC (tabela 10) estão dentro do intervalo aceite, à exceção dos valores 112.011, 116.39, 112.739 e 112.72 que correspondem às formulações 2B (25°C e 37°C), 3B (37°C) e 4B (25°C). No entanto, as concentrações obtidas para o CBD (tabela 10) variam de 116.323 a 134.377, o que indica que todos os valores estão fora de especificação. Assim, as formulações para este canabinóide não obedecem aos critérios de aceitação definidos. As especificações são padrões críticos de qualidade propostos e justificados pelo fabricante e aprovados pelas autoridades reguladoras.

**Tabela 9:** Intervalo de aceitação (%) para o doseamento dos canabinóides THC e CBD no produto final.

THC e CBD	
Farmacopeia europeia	90.0 a 110.0%

CBD – Canabidiol; THC -  $\Delta^9$ -Tetrahidrocanabinol.

**Tabela 10:** Tempo de retenção (TR) (min), área do pico (mV.s) e concentração (%) do THC e CBD nas amostras.

Formulação	Toma	API	Temperatura de Fabrico (°C)	Tempo de retenção (TR) (min)	Área do pico (mV.s)	Concentração (%)	Concentração Média (%)
1B	1	CBD	25°C	4.577	2959096	118.482	118.47
	2	CBD		4.582	3008775	118.457	
1B	1	CBD	37°C	4.622	3025725	118.195	118.185
	2	CBD		4.620	2960274	118.174	
1C	1	CBD	25°C	4.643	2966320	117.131	117.025
	2	CBD		4.618	2972603	116.918	
1C	1	CBD	37 °C	4.599	2894156	115.882	116.323
	2	CBD		4.592	2974526	116.764	
2B	1	THC	25°C	8.199	3144734	111.880	THC = 112.011
		CBD		4.664	3440249	133.089	
	2	THC		8.201	3124659	112.141	CBD = 133.417
	CBD	4.663	3427110	133.744			
2B	1	THC	37°C	8.203	3258811	116.614	THC = 116.39
		CBD		4.659	3459031	134.596	
	2	THC		8.205	3157944	116.166	CBD = 134.377
		CBD		4.659	3353935	134.157	
2C	1	THC	25°C	8.175	2874403	104.586	THC = 104.502
		CBD		4.627	3019367	119.461	
	2	THC		8.157	2847093	104.418	CBD = 119.635
		CBD		4.620	3004198	119.808	

**Tabela 10 (CONT):** Tempo de retenção (TR) (min), área do pico (mV.s) e concentração (%) do THC e CBD nas amostras.

<b>Formulação</b>	<b>Toma</b>	<b>API</b>	<b>Temperatura de Fabrico (°C)</b>	<b>Tempo de retenção (TR) (min)</b>	<b>Área do pico (mV.s)</b>	<b>Concentração (%)</b>	<b>Concentração Média (%)</b>
2C	1	THC	37°C	8.136	2988088	106.719	<b>THC = 106.883</b>
		CBD		4.607	3161014	122.761	
	2	THC		8.127	2950765	107.047	<b>CBD = 123.137</b>
		CBD		4.605	3130989	123.512	
3B	1	THC	25°C	8.226	2764383	109.386	<b>THC = 109.046</b>
		CBD		4.673	2936244	116.982	
	2	THC		8.221	2760830	108.705	<b>CBD = 116.679</b>
		CBD		4.665	2935581	116.376	
3B	1	THC	37°C	8.215	2962798	112.966	<b>THC = 112.739</b>
		CBD		4.662	3241865	124.452	
	2	THC		8.204	2908449	112.512	<b>CBD = 123.75</b>
		CBD		4.652	3159168	123.047	
3C	1	THC	25 °C	8.206	2683650	106.723	<b>THC = 106.651</b>
		CBD		4.649	5869315	117.503	
	2	THC		8.180	2722880	106.578	<b>CBD = 117.49</b>
		CBD		4.632	5961837	117.476	
3C	1	THC	37°C	8.155	2714014	107.074	<b>THC = 106.295</b>
		CBD		4.619	5988077	116.843	
	2	THC		8.150	2674534	105.516	<b>CBD = 117.067</b>
		CBD		4.619	5905601	117.291	

**Tabela 10 (CONT):** Tempo de retenção (TR) (min), área do pico (mV.s) e concentração (%) do THC e CBD nas amostras.

Formulação	Toma	API	Temperatura de Fabrico (°C)	Tempo de retenção (TR) (min)	Área do pico (mV.s)	Concentração (%)	Concentração Média (%)
4B	1	THC	25°C	8.190	5885090	113.500	<b>THC = 112.72</b>
		CBD		4.645	6406510	124.401	
	2	THC		8.167	5714109	111.940	<b>CBD = 123.661</b>
		CBD		4.616	6231996	122.920	
4B	1	THC	37°C	8.175	5569889	109.114	<b>THC = 108.634</b>
		CBD		4.638	3012995	118.857	
	2	THC		8.158	5499133	108.154	<b>CBD = 117.654</b>
		CBD		4.627	2940337	116.450	
4C	1	THC	25°C	8.134	5299101	103.301	<b>THC = 103.467</b>
		CBD		4.616	3119803	122.467	
	2	THC		8.137	5337004	103.633	<b>CBD = 122.614</b>
		CBD		4.619	3139562	122.761	
4C	1	THC	37°C	8.245	5462084	104.935	<b>THC = 106.535</b>
		CBD		4.683	6381142	123.430	
	2	THC		8.223	5525346	108.135	<b>CBD = 124.176</b>
		CBD		4.670	6339706	124.922	

API – Ingrediente farmacologicamente ativo; CBD – Canabidiol; TR -Tempo de retenção; THC -  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol.

A concentração dos API no veículo B é superior à concentração no veículo C (tabela 11), à exceção da formulação 3C e 4C para o canabinóide CBD. O conteúdo de CBD apesar de se encontrar fora de especificação no excipiente C, é o que mais se aproxima do intervalo de aceitação descrito na farmacopeia europeia, 90.0 a 110.0%. A diferença na concentração dos API entre os dois veículos varia entre 2.099 a 9.507 e 0.811 a 13.782 para o THC e CBD, respetivamente. Comparando os dois veículos e de acordo com os resultados obtidos na tabela 11, não é possível estimar qual dos dois deverá ser usado no desenvolvimento das formulações. A escolha do excipiente só poderá ser realizada após o produto final sair do período de estabilidade e se proceder ao seu doseamento. Contudo, a nível cromatográfico, os cromatogramas de todas as formulações desenvolvidas no veículo C apresentam menos diversidade de compostos (figura 11).

Relativamente à temperatura de fabrico (25°C e 37°C), o resultado expectável é que as formulações desenvolvidas a 37°C apresentem um decréscimo na concentração dos ativos, já que o calor leva à degradação dos compostos THC e CBD. Este comportamento não se observou para as formulações 2B, 2C, 3B e 4C, pois a concentração dos API é superior nas formulações que foram desenvolvidas a 37°C (tabela 12). A diferença na concentração dos API entre as temperaturas de fabrico varia entre 0.356 a 4.086 e 0.285 a 9.019 para o THC e CBD, respetivamente. Comparando as temperaturas e de acordo com os resultados obtidos na tabela 12, não é possível estimar qual das duas é que deve ser aplicada na formação dos óleos. A temperatura indicada só poderá ser confirmada após o produto final sair do período de estabilidade e se proceder ao seu doseamento. A partir dos cromatogramas não se observa qualquer diferença entre as temperaturas de fabrico, porque a temperatura só influencia a concentração dos ativos (figura 11).

Nos anexos estão apresentados todos os cromatogramas relativos ao desenvolvimento do método, incluindo os cromatogramas das soluções-padrão FS-CI utilizadas para traçar as duas retas de calibração, bem como os cromatogramas das soluções de contra-verificação FS-CI D-Check e FS-CI D-End (Anexo VII).

**Tabela 11:** Diferença na concentração (%) dos API entre veículos (B e C).

Formulação	API	Temperatura de Fabrico (°C)	Concentração Média (%)	Diferença na concentração dos API (%)
1B	CBD	25°C	118.47	1.445
1C	CBD		117.025	
1B	CBD	37°C	118.185	1.862
1C	CBD		116.323	
2B	THC	25°C	112.011	THC = 7.509
	CBD		133.417	CBD = 13.782
2C	THC		104.502	
	CBD		119.635	
2B	THC	37°C	116.39	
	CBD		134.377	CBD = 11.24
2C	THC		106.883	
	CBD		123.137	
3B	THC	25°C	109.046	
	CBD		116.679	CBD = 0.811
3C	THC		106.651	
	CBD		117.49	
3B	THC	37°C	112.739	
	CBD		123.75	CBD = 6.683
3C	THC		106.295	
	CBD		117.067	
4B	THC	25°C	112.72	
	CBD		123.661	CBD = 1.047
4C	THC		103.467	
	CBD		122.614	
4B	THC	37°C	108.634	
	CBD		117.654	CBD = 6.522
4C	THC		106.535	
	CBD		124.176	

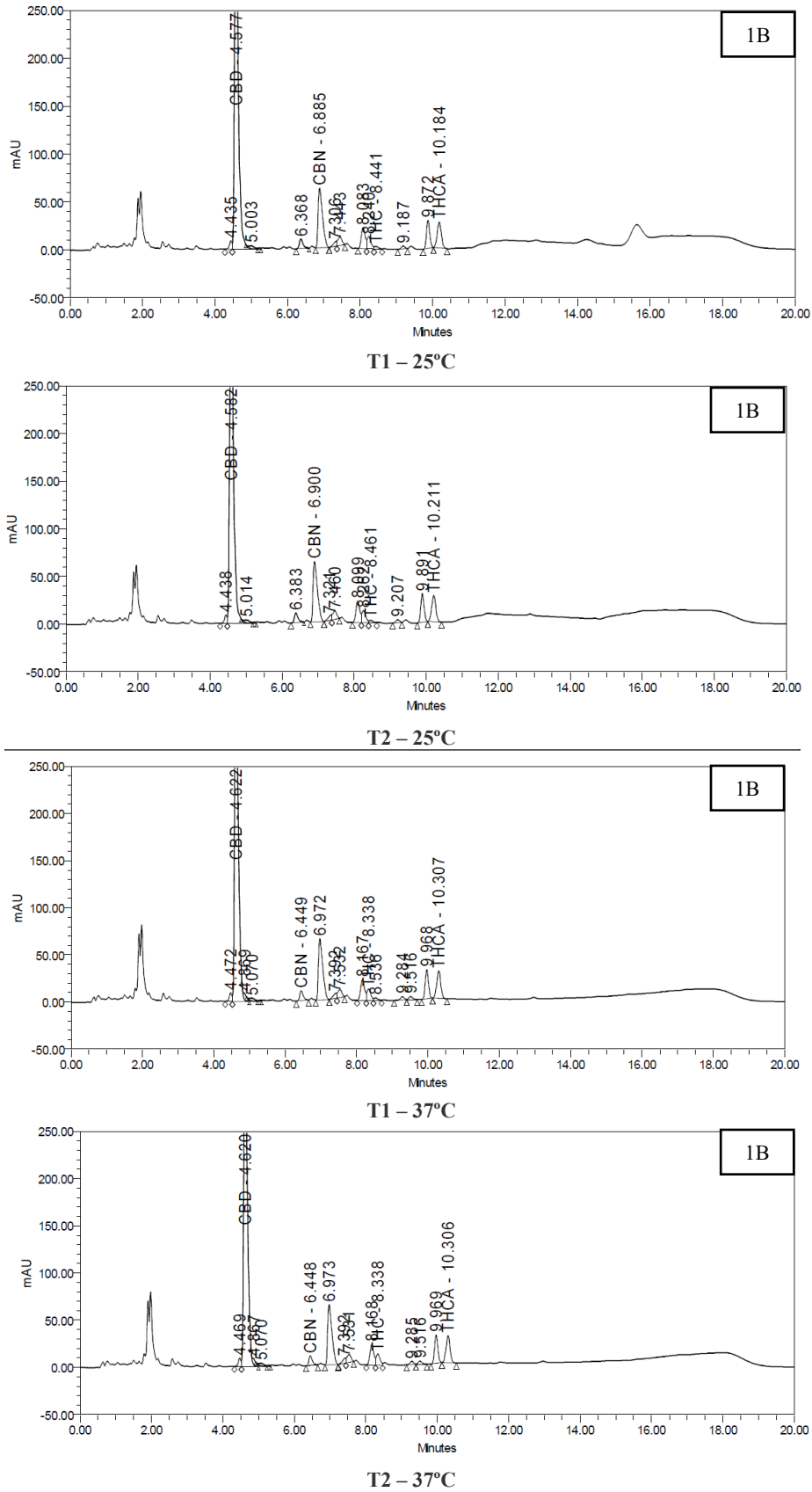
API – Ingrediente farmacologicamente ativo; CBD – Canabidiol; THC -  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol.



**Tabela 12:** Diferença na concentração (%) dos API entre temperaturas de fabrico (25°C e 37°C).

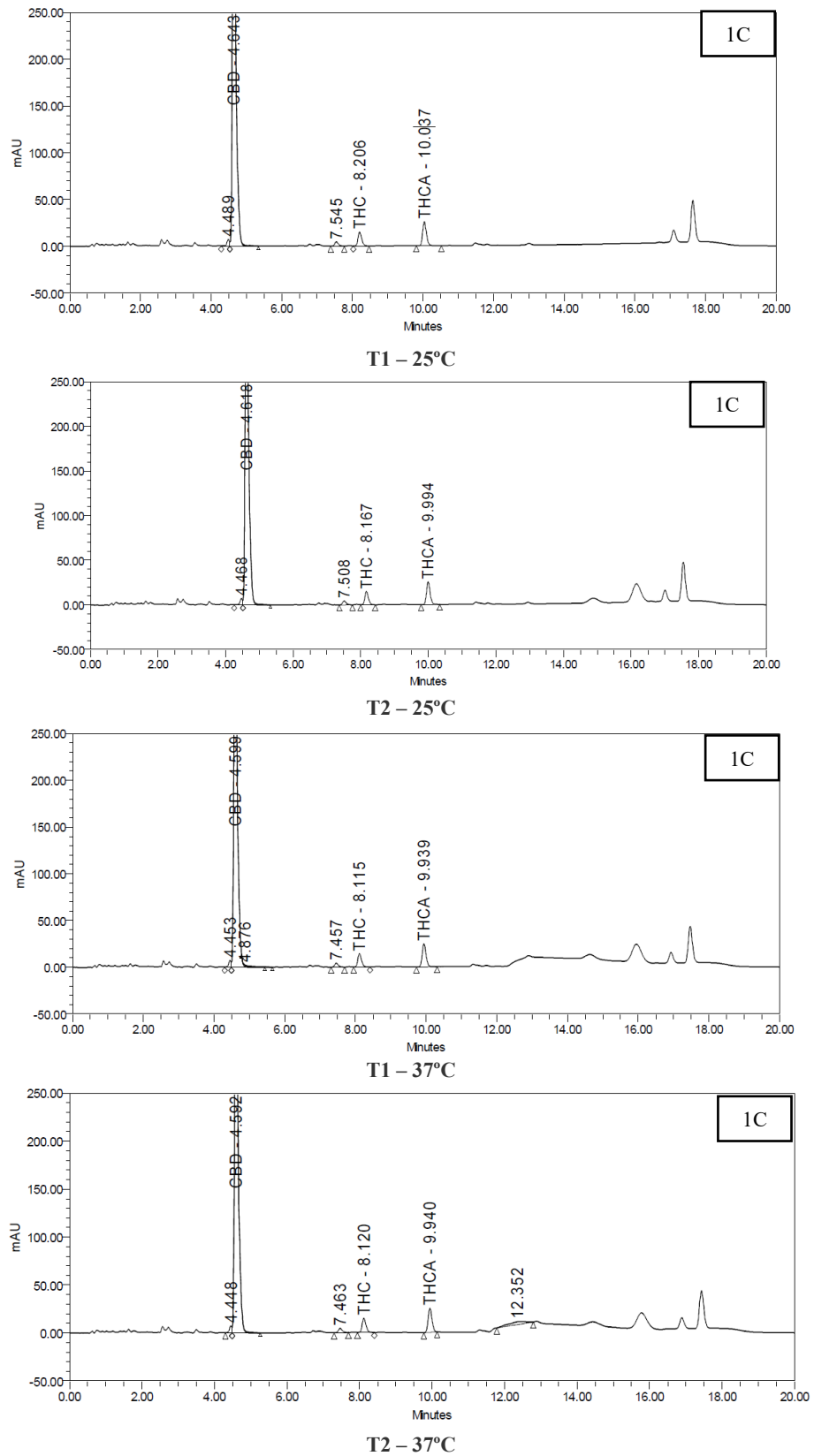
<b>Formulação</b>	<b>API</b>	<b>Temperatura de Fabrico (°C)</b>	<b>Concentração Média (%)</b>	<b>Diferença na concentração dos API (%)</b>
1B	CBD	25°C	118.47	0.285
1B	CBD	37°C	118.185	
1C	CBD	25°C	117.025	0.702
1C	CBD	37°C	116.323	
2B	THC	25°C	112.011	<b>THC = 4.379</b>
	CBD		133.417	
2B	THC	37°C	116.39	<b>CBD = 0.96</b>
	CBD		134.377	
2C	THC	25°C	104.502	<b>THC = 2.381</b>
	CBD		119.635	
2C	THC	37°C	106.883	<b>CBD = 3.502</b>
	CBD		123.137	
3B	THC	25°C	109.046	<b>THC = 3.693</b>
	CBD		116.679	
3B	THC	37°C	112.739	<b>CBD = 7.071</b>
	CBD		123.75	
3C	THC	25°C	106.651	<b>THC = 0.356</b>
	CBD		117.49	
3C	THC	37°C	106.295	<b>CBD = 0.423</b>
	CBD		117.067	
4B	THC	25°C	112.72	<b>THC = 4.086</b>
	CBD		123.661	
4B	THC	37°C	108.634	<b>CBD = 9.019</b>
	CBD		117.654	
4C	THC	25°C	103.467	<b>THC = 3.068</b>
	CBD		122.614	
4C	THC	37°C	106.535	<b>CBD = 1.562</b>
	CBD		124.176	

**API** – Ingrediente farmacologicamente ativo; **CBD** – Canabidiol; **THC** -  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol.

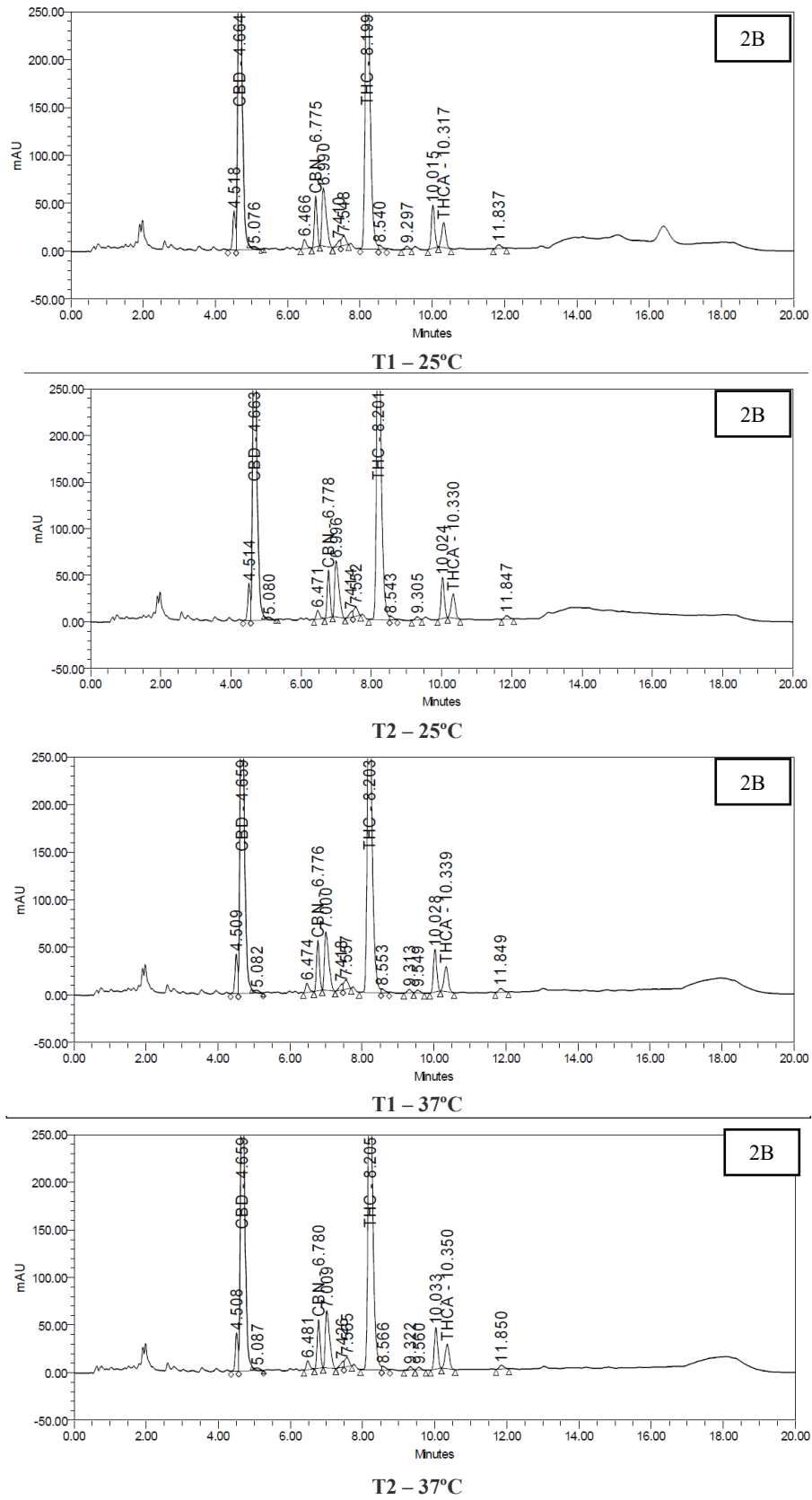


**Figura 11:** Cromatogramas das amostras 1B, 1C, 2B, 2C, 3B, 3C, 4B e 4C ao comprimento de onda  $\lambda_1$ . A informação abaixo dos cromatogramas representa as tomas (T1, T2) e a temperatura de fabrico (25°C, 37°C).

*Development of a cannabis-based formulation.*  
*Desenvolvimento de uma formulação à base de cânabís.*

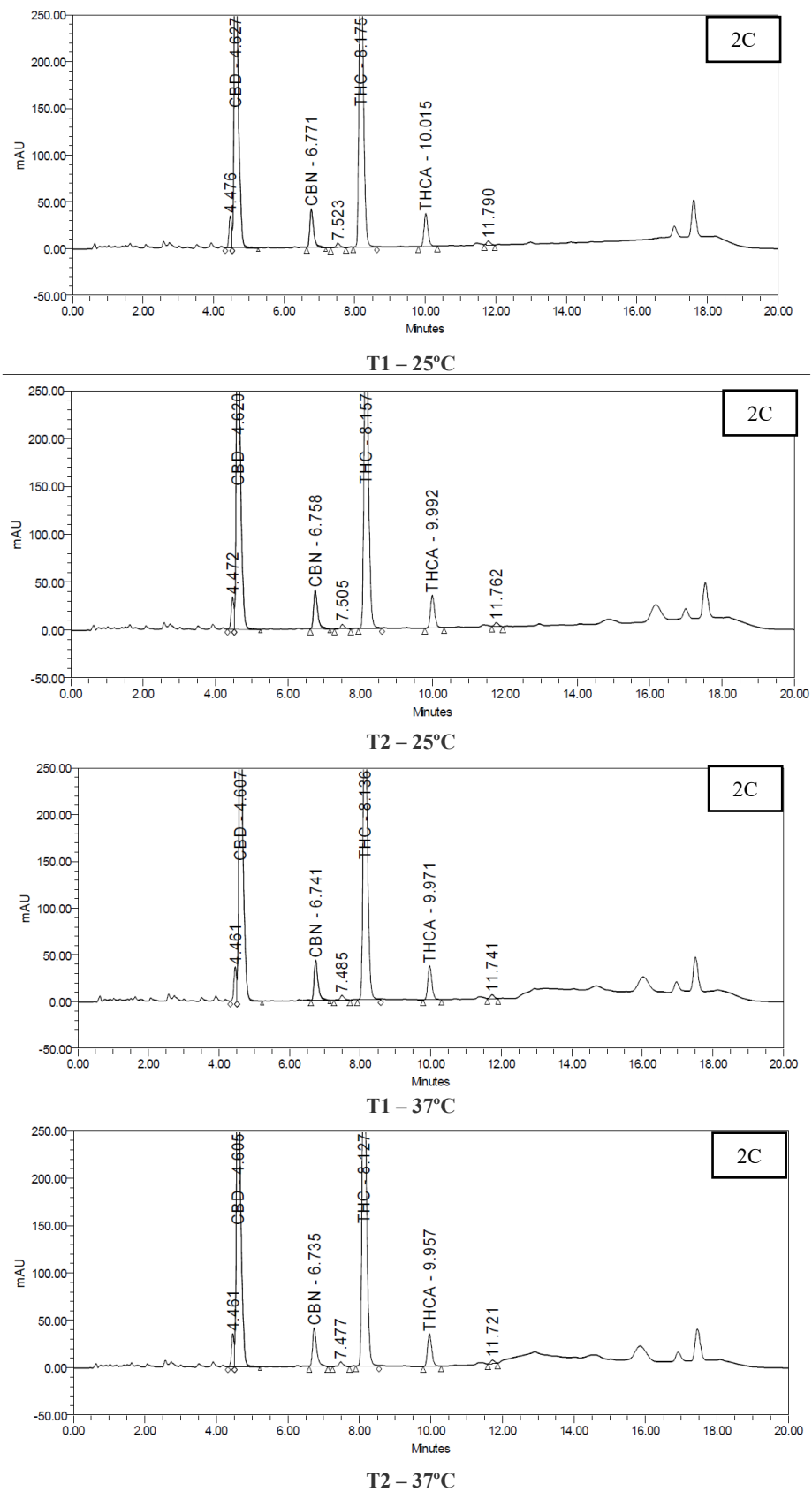


**Figura 11 (CONT):** Cromatogramas das amostras 1B, 1C, 2B, 2C, 3B, 3C, 4B e 4C ao comprimento de onda  $\lambda_1$ . A informação abaixo dos cromatogramas representa as tomas (T1, T2) e a temperatura de fabrico (25°C, 37°C)

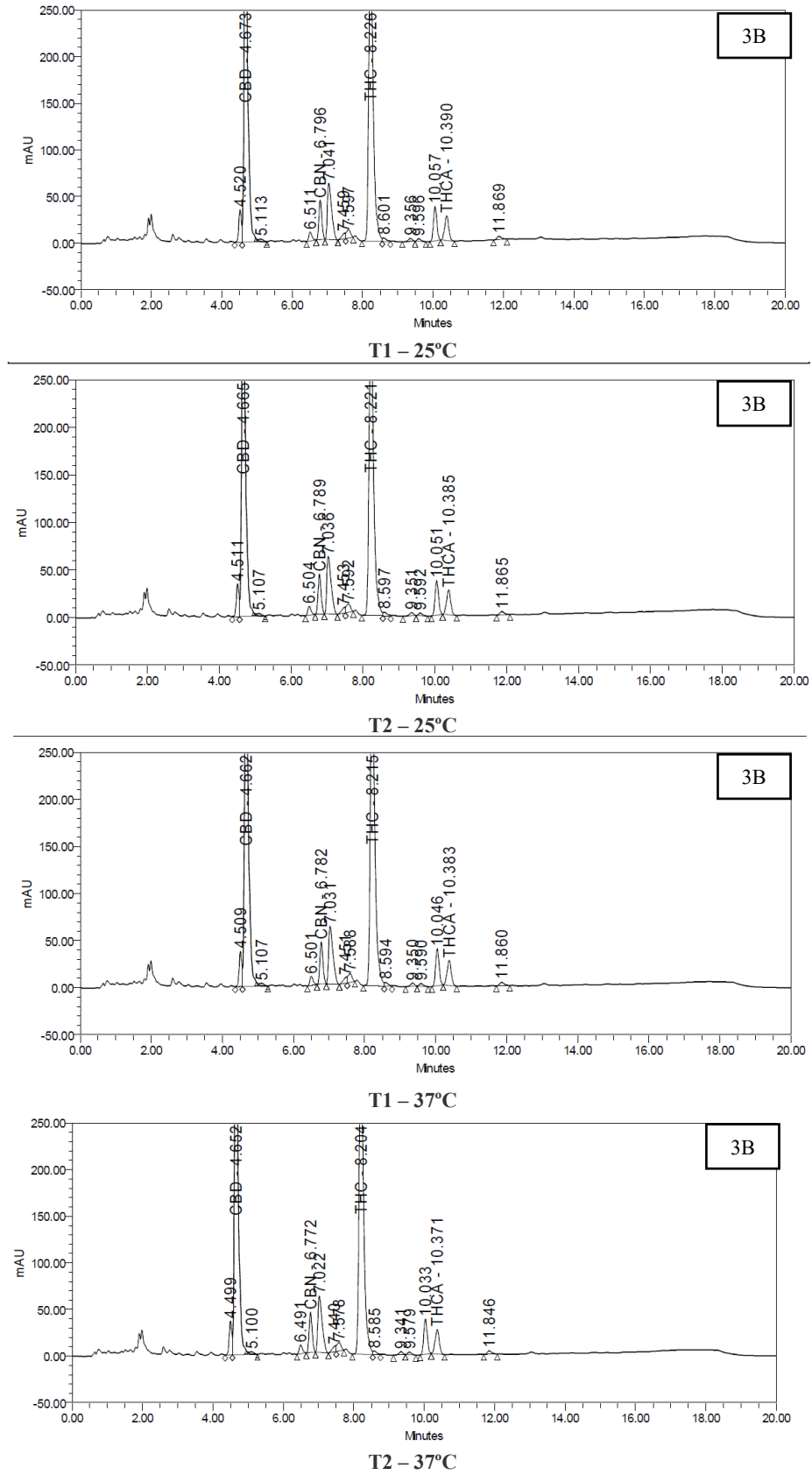


**Figura 11 (CONT):** Cromatogramas das amostras 1B, 1C, 2B, 2C, 3B, 3C, 4B e 4C ao comprimento de onda  $\lambda_1$ . A informação abaixo dos cromatogramas representa as tomas (T1, T2) e a temperatura de fabrico (25°C, 37°C).

Development of a cannabis-based formulation.  
Desenvolvimento de uma formulação à base de cânabís.



**Figura 11 (CONT):** Cromatogramas das amostras 1B, 1C, 2B, 2C, 3B, 3C, 4B e 4C ao comprimento de onda  $\lambda_1$ . A informação abaixo dos cromatogramas representa as tomas (T1, T2) e a temperatura de fabrico (25°C, 37°C).



**Figura 11 (CONT):** Cromatogramas das amostras 1B, 1C, 2B, 2C, 3B, 3C, 4B e 4C ao comprimento de onda  $\lambda_1$ . A informação abaixo dos cromatogramas representa as tomas (T1, T2) e a temperatura de fabrico (25°C, 37°C).

Development of a cannabis-based formulation.  
Desenvolvimento de uma formulação à base de cânabís.

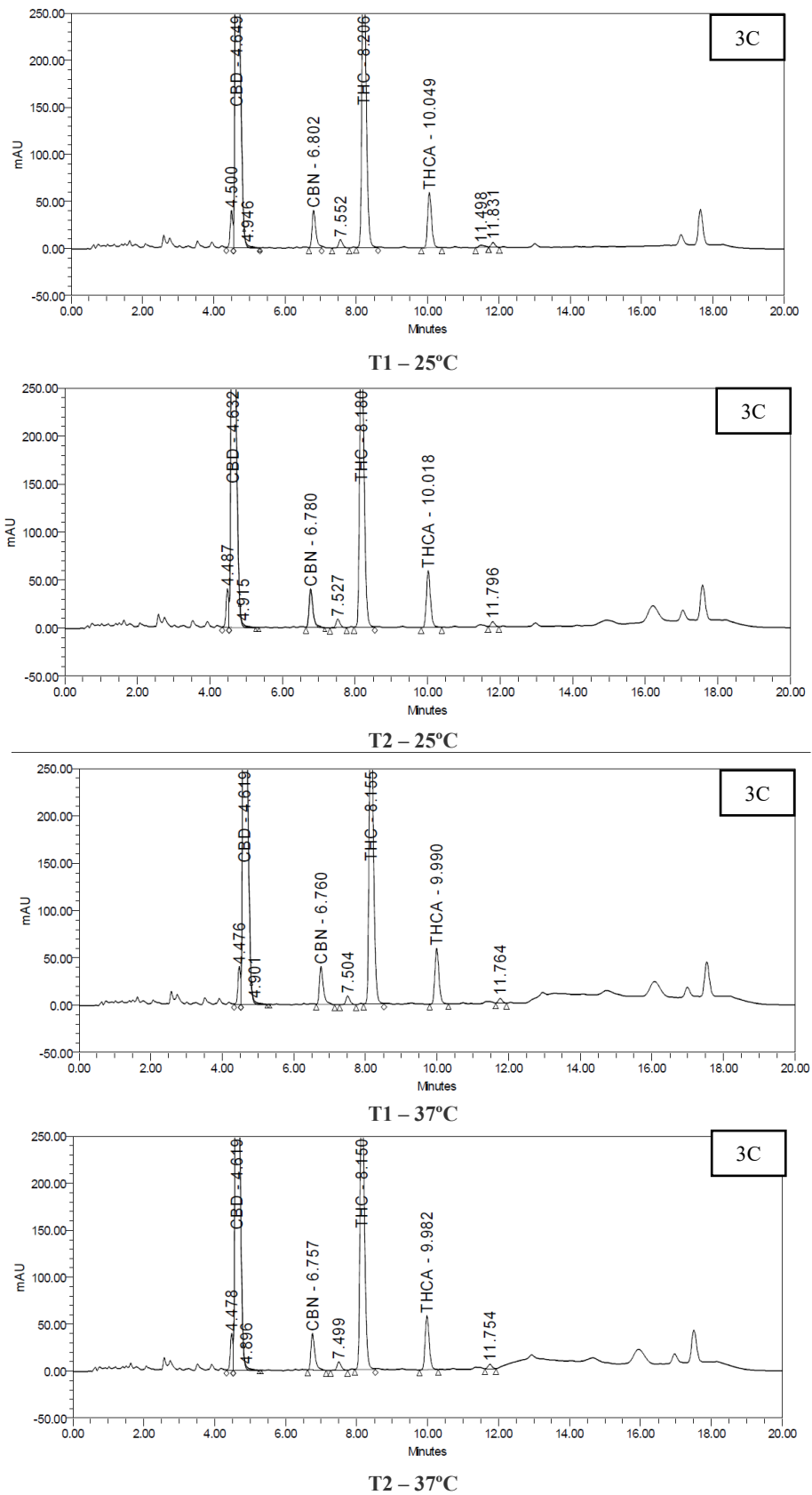
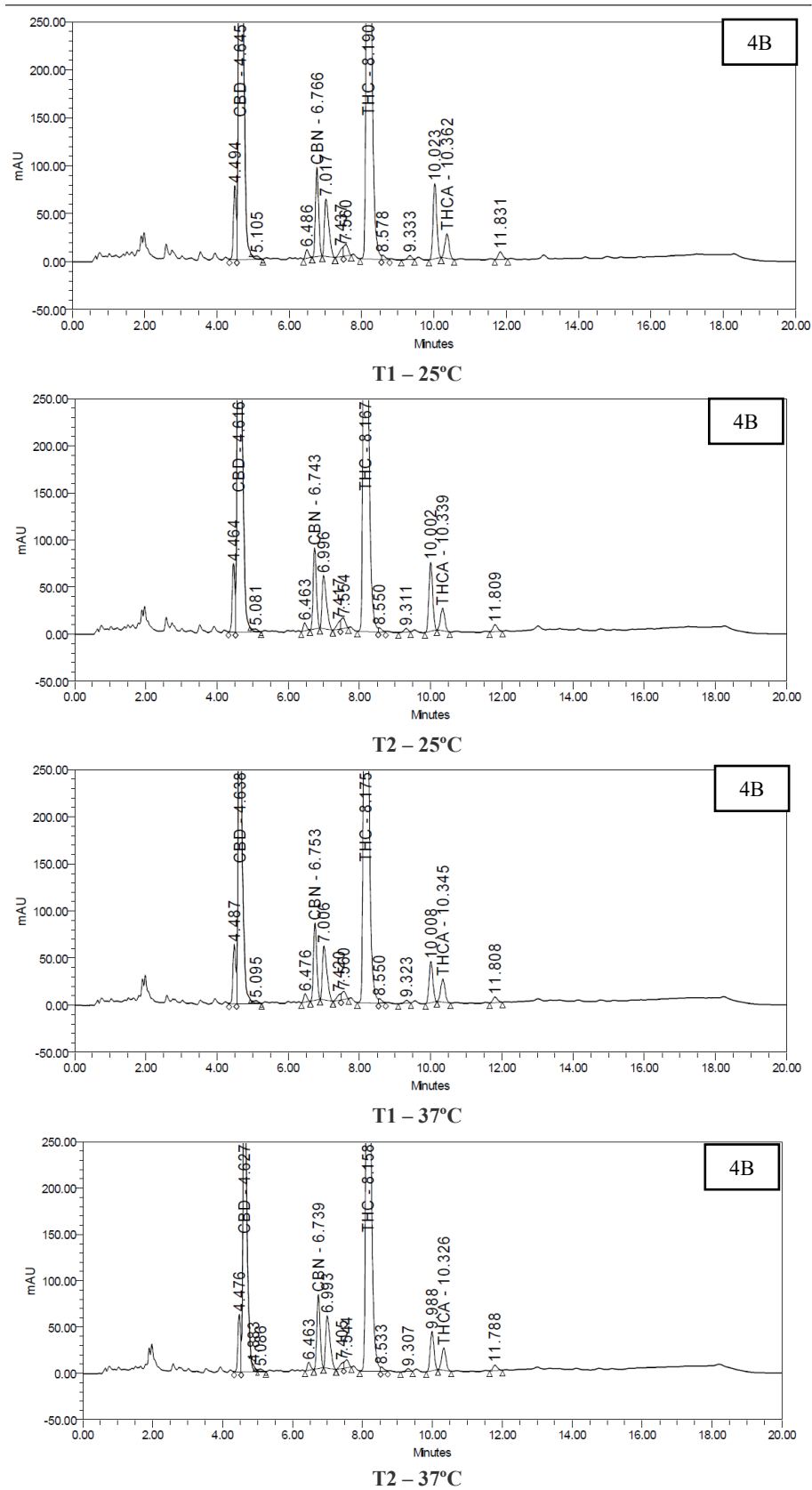


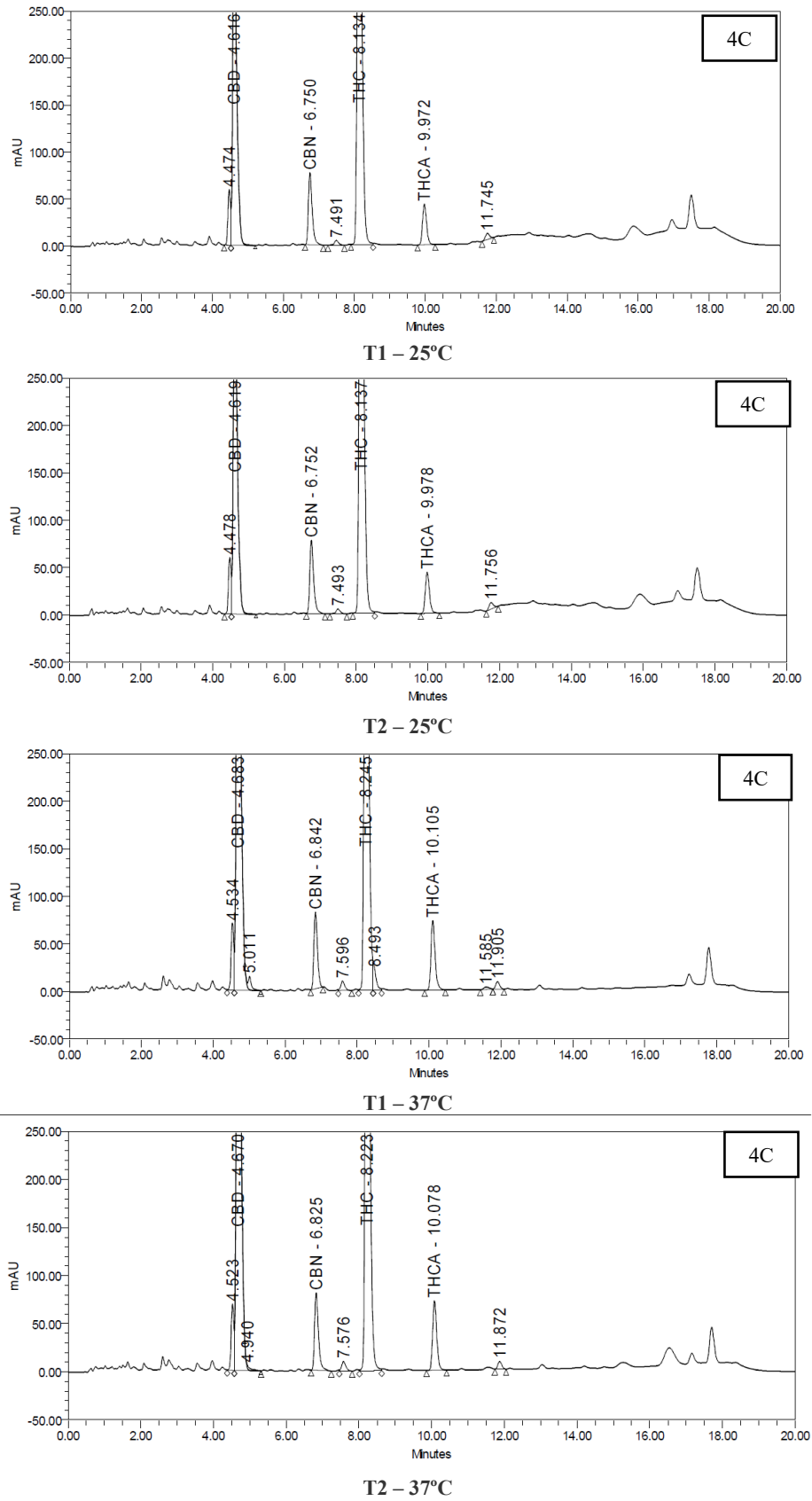
Figura 11 (CONT): Cromatogramas das amostras 1B, 1C, 2B, 2C, 3B, 3C, 4B e 4C ao comprimento de onda  $\lambda_1$ . A informação abaixo dos cromatogramas representa as tomas (T1, T2) e a temperatura de fabrico (25°C, 37°C).



**Figura 11 (CONT):** Cromatogramas das amostras 1B, 1C, 2B, 2C, 3B, 3C, 4B e 4C ao comprimento de onda  $\lambda_1$ . A informação abaixo dos cromatogramas representa as tomas (T1, T2) e a temperatura de fabrico (25°C, 37°C).



*Development of a cannabis-based formulation.*  
*Desenvolvimento de uma formulação à base de cânabís.*



**Figura 11 (CONT):** Cromatogramas das amostras 1B, 1C, 2B, 2C, 3B, 3C, 4B e 4C ao comprimento de onda  $\lambda_1$ . A informação abaixo dos cromatogramas representa as tomas (T1, T2) e a temperatura de fabrico (25°C, 37°C).

## CONCLUSÃO

A planta *Cannabis sativa* L. é quimicamente complexa e para monitorizar a sua composição e garantir a qualidade, a eficácia e a segurança dos seus produtos derivados, a extração e análise dos canabinóides desempenha um papel crucial. Com o objetivo de desenvolver formulações à base de canábis na forma farmacêutica líquida, avaliou-se a qualidade do produto, para posterior registo através de ACM. Realizou-se também o estudo da estabilidade das formulações desenvolvidas e procedeu-se ao desenvolvimento e validação do método por HPLC-DAD para que possa ser aplicado nas análises de rotina do LEF para o doseamento dos canabinóides  $\Delta^9$ -THC e CBD em amostras de óleo à base de canábis. No desenvolvimento das formulações, avaliou-se a solubilidade da matéria-prima e observou-se a formação de um precipitado no veículo A, revelando assim a incompatibilidade entre o excipiente e os vários componentes da formulação. Em relação ao método analítico, este demonstrou ser seletivo. Na avaliação da adequabilidade do sistema, todos os parâmetros estão conforme os métodos de validação internos, à exceção do fator de simetria para o CBD. Os resultados obtidos para o THC estão dentro do intervalo aceite, à exceção dos valores 112.011, 116.39, 112.739 e 112.72 que correspondem às formulações 2B (25°C e 37°C), 3B (37°C) e 4B (25°C). No entanto, as concentrações obtidas para o CBD variam de 116.323 a 134.377, o que indica que todos os valores estão fora de especificação. O conteúdo de CBD apesar de se encontrar fora de especificação no excipiente C, é o que mais se aproxima do intervalo de aceitação descrito na farmacopeia europeia. No doseamento das formulações T0, os resultados obtidos indicam que não é possível estimar qual é o melhor excipiente (B, C) nem a melhor temperatura de fabrico (25°C, 37°C) que devem ser aplicados no processo de fabrico dos óleos.

Por fim, devido a um atraso bastante alargado na entrega dos extratos não foi possível processar os dados em tempo útil do doseamento das formulações T28 e realizar a última parte deste projeto, a validação do método analítico. Face a estes resultados é que se irá concluir qual o melhor processo de fabrico e demonstrar a confiabilidade do método para a determinação da concentração dos analitos. Assim, a validação é uma etapa essencial, já que estes compostos estão associados a propriedades medicinais e psicoativas, e a mínima variação na sua concentração pode resultar em efeitos terapêuticos distintos, o que consequentemente afeta a qualidade do produto.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adamek, K., Jones, A. M. P., & Torkamaneh, D. (2022). Accumulation of somatic mutations leads to genetic mosaicism in cannabis. *Plant Genome*, *15*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1002/tpg2.20169>
- Aguillón, A. R., Leão, R. A. C., Miranda, L. S. M., & de Souza, R. O. M. A. (2021). Cannabidiol Discovery and Synthesis—a Target-Oriented Analysis in Drug Production Processes. *Chemistry - A European Journal*, *27*(18), 5577–5600. <https://doi.org/10.1002/chem.202002887>
- Ahmed, A. Q., Noshad, D., & Li, P. C. H. (2021). Quantification of Cannabinoids in Cultivars of Cannabis sp. by Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Chromatographia*, *84*(8), 711–717. <https://doi.org/10.1007/s10337-021-04060-9>
- Amending, P., Single, T. H. E., On, C., & Drugs, N. (1961). bis , 23, *1961*(March).
- Assembleia da República. (2018). Lei n.º 33 de 18 de Julho de 2018 - Regula a utilização de medicamentos, preparações e substâncias à base da planta da canábis, para fins medicinais. *Diário Da República, I Série*(137), 3241–3242. Retrieved from <https://dre.pt/application/file/a/115712610>
- Assembleia da República. (2019). Saúde. Portaria nº 44-A/2019 de 31 de janeiro. *Diário Da República, Iª Série*(22), 778-(2). Retrieved from <https://dre.pt/application/conteudo/118950610>
- Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde (INFARMED). (2022). Disponível a partir de <https://www.infarmed.pt/web/infarmed/canabis-medicinal>. Acesso 24 de Julho de 2022.
- Banerjee, R., Erridge, S., Salazar, O., Mangal, N., Couch, D., Pacchetti, B., & Sodergren, M. H. (2022). Real World Evidence in Medical Cannabis Research. *Therapeutic Innovation and Regulatory Science*, *56*(1), 8–14. <https://doi.org/10.1007/s43441-021-00346-0>
- Baratta, F., Simiele, M., Pignata, I., Enri, L. R., D’avolio, A., Torta, R., ... Brusa, P. (2021). Cannabis-based oral formulations for medical purposes: Preparation, quality and stability. *Pharmaceuticals*, *14*(2), 1–16. <https://doi.org/10.3390/ph14020171>
- Baratta, F., Simiele, M., Pignata, I., Enri, L. R., Torta, R., De Luca, A., ... Brusa, P. (2019). Development of standard operating protocols for the optimization of cannabis-based formulations for medical purposes. *Frontiers in Pharmacology*,

- 10(JUN), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00701>
- Bettioli, A., Lombardi, N., Crescioli, G., Maggini, V., Gallo, E., Mugelli, A., ... Vannacci, A. (2019). Galenic preparations of therapeutic *Cannabis sativa* differ in cannabinoids concentration: A quantitative analysis of variability and possible clinical implications. *Frontiers in Pharmacology*, 9(JAN). <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01543>
- Bonini, S. A., Premoli, M., Tambaro, S., Kumar, A., Maccarinelli, G., Memo, M., & Mastinu, A. (2018). *Cannabis sativa*: A comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history. *Journal of Ethnopharmacology*, 227(September), 300–315. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.09.004>
- Borges, G. R., Birk, L., Scheid, C., Morés, L., Carasek, E., Kitamura, R. O. S., ... de Oliveira, T. F. (2020). Simple and straightforward analysis of cannabinoids in medicinal products by fast-GC–FID. *Forensic Toxicology*, 38(2), 531–535. <https://doi.org/10.1007/s11419-020-00522-1>
- Braich, S., Baillie, R. C., Jewell, L. S., Spangenberg, G. C., & Cogan, N. O. I. (2019). Generation of a Comprehensive Transcriptome Atlas and Transcriptome Dynamics in Medicinal Cannabis. *Scientific Reports*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53023-6>
- Brighenti, V., Marchetti, L., Anceschi, L., Protti, M., Verri, P., Pollastro, F., ... Pellati, F. (2021). Separation and non-separation methods for the analysis of cannabinoids in *Cannabis sativa* L. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 206, 114346. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114346>
- Calvi, L., Pentimalli, D., Panseri, S., Giupponi, L., Gelmini, F., Beretta, G., ... Giorgi, A. (2018). 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*, 150, 208–219. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.11.073>
- Capra, S., Narayan, S. W., Parratt, K., & Patanwala, A. E. (2020). Cannabinoids for drug-resistant seizures in a critically ill patient—Case report and literature review. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 45(3), 570–572. <https://doi.org/10.1111/jcpt.13082>
- Carcieri, C., Tomasello, C., Simiele, M., De Nicolò, A., Avataneo, V., Canzoneri, L., ... D’Avolio, A. (2018). Cannabinoids concentration variability in cannabis olive oil galenic preparations. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 70(1), 143–149.

<https://doi.org/10.1111/jphp.12845>

- Cas, M. D., Casagni, E., Casiraghi, A., Minghetti, P., Fornasari, D. M. M., Ferri, F., ... Roda, G. (2020). Phytocannabinoids profile in medicinal cannabis oils: The impact of plant varieties and preparation methods. *Frontiers in Pharmacology*, 11(November), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.570616>
- Chandiok, K., Marathe, S., Rooney, M., Stocker, J., Tellis, B., & Pit, S. (2021). Cannabis and its therapeutic value in the ageing population: Attitudes of health-care providers. *Australasian Journal on Ageing*, 40(3), 261–274. <https://doi.org/10.1111/ajag.12846>
- Choi, Y. H., Hazekamp, A., Peltenburg-Looman, A. M. G., Frédérick, M., Erkelens, C., Lefeber, A. W. M., & Verpoorte, R. (2004). NMR assignments of the major cannabinoids and cannabiflavonoids isolated from flowers of *Cannabis sativa*. *Phytochemical Analysis*, 15(6), 345–354. <https://doi.org/10.1002/pca.787>
- Choi, Y. H., Kim, H. K., Hazekamp, A., Erkelens, C., Lefeber, A. W. M., & Verpoorte, R. (2004). Metabolomic differentiation of *Cannabis sativa* cultivars using 1H NMR spectroscopy and principal component analysis. *Journal of Natural Products*, 67(6), 953–957. <https://doi.org/10.1021/np049919c>
- Ciolino, L. A., Ranieri, T. L., & Taylor, A. M. (2018a). Commercial cannabis consumer products part 1: GC–MS qualitative analysis of cannabis cannabinoids. *Forensic Science International*, 289, 429–437. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.05.032>
- Ciolino, L. A., Ranieri, T. L., & Taylor, A. M. (2018b). Commercial cannabis consumer products part 2: HPLC-DAD quantitative analysis of cannabis cannabinoids. *Forensic Science International*, 289, 438–447. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.05.033>
- Citti, C., Battisti, U. M., Braghiroli, D., Ciccarella, G., Schmid, M., Vandelli, M. A., & Cannazza, G. (2018). A Metabolomic Approach Applied to a Liquid Chromatography Coupled to High-Resolution Tandem Mass Spectrometry Method (HPLC-ESI-HRMS/MS): Towards the Comprehensive Evaluation of the Chemical Composition of Cannabis Medicinal Extracts. *Phytochemical Analysis*, 29(2), 144–155. <https://doi.org/10.1002/pca.2722>
- Citti, C., Braghiroli, D., Vandelli, M. A., & Cannazza, G. (2018). Pharmaceutical and biomedical analysis of cannabinoids: A critical review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 147, 565–579. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.06.003>
- Citti, C., Ciccarella, G., Braghiroli, D., Parenti, C., Vandelli, M. A., & Cannazza, G.

- (2016). Medicinal cannabis: Principal cannabinoids concentration and their stability evaluated by a high performance liquid chromatography coupled to diode array and quadrupole time of flight mass spectrometry method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 128, 201–209. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.05.033>
- Coogan, T. A. (2019). Analysis of the cannabinoid content of strains available in the New Jersey Medicinal Marijuana Program. *Journal of Cannabis Research*, 1(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s42238-019-0011-z>
- Corr. (1922). Guideline on bioanalytical method validation, 44(July 2011), 1–23.
- Decreto-Lei n.º 15/93, de 22 de janeiro. (1993). Lei de Combate à Droga, 1–39.
- Deidda, R., Avohou, H. T., Baronti, R., Davolio, P. L., Pasquini, B., Del Bubba, M., ... Furlanetto, S. (2019). Analytical quality by design: Development and control strategy for a LC method to evaluate the cannabinoids content in cannabis olive oil extracts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 166, 326–335. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.01.032>
- Delegado, R., Ue, N., & Comissão, D. A. (2014). Regulamento delegado (ue) n., 2013(4), 2013–2015.
- Delgado-Povedano, M. M., Sánchez-Carnerero Callado, C., Priego-Capote, F., & Ferreiro-Vera, C. (2020). Untargeted characterization of extracts from Cannabis sativa L. cultivars by gas and liquid chromatography coupled to mass spectrometry in high resolution mode. *Talanta*, 208(September 2019), 120384. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120384>
- Diário da República Eletrónico (DRE). (2022). Disponível a partir de <https://dre.pt/dre/home>. Acesso 08 de Agosto de 2022.
- Elkins, A. C., Deseo, M. A., Rochfort, S., Ezernieks, V., & Spangenberg, G. (2019). Development of a validated method for the qualitative and quantitative analysis of cannabinoids in plant biomass and medicinal cannabis resin extracts obtained by super-critical fluid extraction. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1109(December 2018), 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.01.027>
- EMA. (2013). AGÊNCIA EUROPEIA DO MEDICAMENTO - Anexo I -Resumo das Características do Medicamento Sativex.
- EMA. (2010). Anexo I - Resumo das Características do Medicamento - dabigatrano, 1–29. Retrieved from [http://www.ema.europa.eu/docs/pt\\_PT/document\\_library/EPAR\\_-](http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR_-)

[\\_Product\\_Information/human/000829/WC500041059.pdf](#)

- Erku, D., Shrestha, S., & Scuffham, P. (2021). Cost-Effectiveness of Medicinal Cannabis for Management of Refractory Symptoms Associated With Chronic Conditions: A Systematic Review of Economic Evaluations. *Value in Health*, 24(10), 1520–1530. <https://doi.org/10.1016/j.jval.2021.04.1276>
- Erridge, S., Salazar, O., Kawka, M., Holvey, C., Coomber, R., Usmani, A., ... Sodergren, M. H. (2021). An initial analysis of the UK Medical Cannabis Registry: Outcomes analysis of first 129 patients. *Neuropsychopharmacology Reports*, 41(3), 362–370. <https://doi.org/10.1002/npr2.12183>
- EUR-Lex. (2022). Disponível a partir de <https://eur-lex.europa.eu/homepage.html?locale=pt>. Acesso 08 de Agosto de 2022.
- European Commission. (2012). Good Manufacturing Practice (GMP) guidelines Chapter 1: Pharmaceutical Quality System. *Eudralex*, 4(January 2013), 1–8.
- European Commission. (2013). European Commission Guideline 2013/C343/01 – on Good Distribution Practice of medicinal products for human use. *Official Journal of the European Union*, 1–14.
- European Medicines Agency (EMA). (2022). Disponível a partir de <https://www.ema.europa.eu/en/medicines>. Acesso 25 de Julho de 2022.
- European Medicines Agency/ Herbal Medicinal Products Committee. (2006). Guideline on Good Agricultural and Collection Practice (GACP) for Starting Materials of Herbal Origin. *Emea*, (February), 1–11. Retrieved from [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2009/09/WC500003362.pdf-1](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003362.pdf-1)
- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). (2018). *Cannabis legislation in Europe. Publications Office of the European Union, Luxembourg*. <https://doi.org/10.2810/930744>
- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). (2022). Disponível a partir de [https://www.emcdda.europa.eu/publications/topic-overviews/classification-of-controlled-drugs/html\\_en](https://www.emcdda.europa.eu/publications/topic-overviews/classification-of-controlled-drugs/html_en). Acesso 24 de Julho de 2022.
- Europeu, P. (2006). REGULAMENTO (CE) N° 1902/2006 DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO de 20 de Dezembro de 2006. *Jornal Oficial Da União Europeia*, 378, 20–21.
- Fischedick, Justin T., Glas, R., Hazekamp, A., & Verpoorte, R. (2009). A qualitative and quantitative HPTLC densitometry method for the analysis of cannabinoids in

- Cannabis sativa L. *Phytochemical Analysis*, 20(5), 421–426.  
<https://doi.org/10.1002/pca.1143>
- Fischedick, Justin Thomas, Hazekamp, A., Erkelens, T., Choi, Y. H., & Verpoorte, R. (2010). Metabolic fingerprinting of Cannabis sativa L., cannabinoids and terpenoids for chemotaxonomic and drug standardization purposes. *Phytochemistry*, 71(17–18), 2058–2073. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.10.001>
- Fletcher, S., Pawliuk, C., Ip, A., Huh, L., Rassekh, S. R., Oberlander, T. F., & Siden, H. (2022). Medicinal cannabis in children and adolescents with autism spectrum disorder: A scoping review. *Child: Care, Health and Development*, 48(1), 33–44. <https://doi.org/10.1111/cch.12909>
- Food and Drug Administration (FDA). (2022). Disponível a partir de <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm>. Acesso 25 de Julho de 2022
- Gul, W., Gul, S. W., Radwan, M. M., Wanas, A. S., Mehmedic, Z., Khan, I. I., ... ElSohly, M. A. (2015). Determination of 11 cannabinoids in biomass and extracts of different varieties of cannabis using high-performance liquid chromatography. *Journal of AOAC International*, 98(6), 1523–1528. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.15-095>
- Guy, R. C. (2014). International Conference on Harmonisation. *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition*, 2(November 1994), 1070–1072. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00861-7>
- Happyana, N., Agnolet, S., Muntendam, R., Van Dam, A., Schneider, B., & Kayser, O. (2013). Analysis of cannabinoids in laser-microdissected trichomes of medicinal Cannabis sativa using LCMS and cryogenic NMR. *Phytochemistry*, 87, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.11.001>
- Hazekamp, A., Bastola, K., Rashidi, H., Bender, J., & Verpoorte, R. (2007). Cannabis tea revisited: A systematic evaluation of the cannabinoid composition of cannabis tea. *Journal of Ethnopharmacology*, 113(1), 85–90. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.05.019>
- Hazekamp, A., Choi, Y. H., & Verpoorte, R. (2004). Quantitative analysis of cannabinoids from Cannabis sativa using 1H-NMR. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 52(6), 718–721. <https://doi.org/10.1248/cpb.52.718>
- Hung, C.-H., Zukowski, J., Jensen, D. S., Miles, A. J., Sulak, C., Dadson, A. E., & Linford, M. R. (2015). Separation of cannabinoids on three different mixed-mode columns containing carbon/nanodiamond/amine-polymer superficially porous particles. *Journal of Separation Science*, 38(17), 2968–2974.



<https://doi.org/10.1002/jssc.201500156>

ICH Q1A(R2). (2003). International Conference on Harmonization (ICH). Guidance for industry: Q1A(R2) STABILITY TESTING OF NEW DRUG SUBSTANCES AND PRODUCTS. *Ich Harmonised Tripartite Guideline*, 4(February), 24.

ICH Q8. (2009). EMEA/CHMP, 2009, ICH Topic Q 8 (R2) Pharmaceutical Development, Step 5: Note for Guidance on Pharmaceutical Development. *Regulatory ICH*, 8(June). Retrieved from [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2009/09/WC500002872.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002872.pdf)

Ilias, Y., Rudaz, S., Mathieu, P., Christen, P., & Veuthey, J. L. (2005). Extraction and analysis of different Cannabis samples by headspace solid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 28(17), 2293–2300. <https://doi.org/10.1002/jssc.200500130>

INFARMED. (2006). Decreto-Lei n.º176 de 30 de Agosto de 2006. *Diário Da República*, 1–250. Retrieved from [https://www.infarmed.pt/documents/15786/1068535/035-E\\_DL\\_176\\_2006\\_12ALT/d2ae048e-547e-4c5c-873e-b41004b9027f](https://www.infarmed.pt/documents/15786/1068535/035-E_DL_176_2006_12ALT/d2ae048e-547e-4c5c-873e-b41004b9027f)

INFARMED. (2018). Folheto informativo: Sativex solução para pulverização bucal, 1–9. Retrieved from <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>

INFARMED. (2019). Relatório Público de Avaliação do pedido de participação de medicamento para uso humano, 8–15. Retrieved from <http://www.infarmed.pt/documents/15786/1437513/Relatório+público+de+avaliação+do+medicamento+Sativex+2019/c055642c-92fe-4e84-9da6-f72f3a9c0e06>

INFARMED. (2021a). Informação aos Profissionais de Saúde sobre Produtos à Base de Canábis Medicinal. Retrieved from <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/>

INFARMED. (2021b). Instruções de Utilização: Tilray Flor Seca THC 18, 1–10. Retrieved from <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>

International Conference on Harmonization (ICH). (2022). Disponível a partir de <https://www.ich.org/>. Acesso 08 de Agosto de 2022.

I.P., I. (2019). Deliberação nº11/CD/2019.

Kayser, O., Muntendam, R., Happyana, N., & Erkelens, T. (2009). Genetic and Metabolic Studies of Cannabinoids in Standardized Medicinal Cannabis sativa Time

- Dependent Metabolomics and Transcriptional Analysis of Cannabinoid Biosynthesis in *Cannabis sativa* var. Bedrobinol and Bediol Grown under Standardized Condition, (January 2015). <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2263.5360>
- Khan, I. (1979). Convention on psychotropic substances, 1971. *Progress in Neuro-Psychopharmacology*, 3(1–3), 11–14. [https://doi.org/10.1016/0364-7722\(79\)90064-x](https://doi.org/10.1016/0364-7722(79)90064-x)
- Kumar, P., Mahato, D. K., Kamle, M., Borah, R., Sharma, B., Pandhi, S., ... Mishra, A. K. (2021). Pharmacological properties, therapeutic potential, and legal status of *Cannabis sativa* L.: An overview. *Phytotherapy Research*, 35(11), 6010–6029. <https://doi.org/10.1002/ptr.7213>
- Leghissa, A., Hildenbrand, Z. L., & Schug, K. A. (2018). A review of methods for the chemical characterization of cannabis natural products. *Journal of Separation Science*, 41(1), 398–415. <https://doi.org/10.1002/jssc.201701003>
- Levene, R. J., Pollak-Christian, E., & Wolfram, S. (2019). A 21st Century Problem: Cannabis Toxicity in a 13-Month-Old Child. *Journal of Emergency Medicine*, 56(1), 94–96. <https://doi.org/10.1016/j.jemermed.2018.09.040>
- McGregor, I. S., Cairns, E. A., Abelev, S., Cohen, R., Henderson, M., Couch, D., ... Gauld, N. (2020). Access to cannabidiol without a prescription: A cross-country comparison and analysis. *International Journal of Drug Policy*, 85(September). <https://doi.org/10.1016/j.drugpo.2020.102935>
- Micalizzi, G., Vento, F., Alibrando, F., Donnarumma, D., Dugo, P., & Mondello, L. (2021). Cannabis Sativa L.: a comprehensive review on the analytical methodologies for cannabinoids and terpenes characterization. *Journal of Chromatography A*, 1637, 461864. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461864>
- Ministério da Saúde. (2019). Decreto-Lei n.º 8/2019, de 15 de janeiro. *Diário Da República*, 1.ª Série - N.º 10, 184–191.
- Montone, C. M., Cerrato, A., Botta, B., Cannazza, G., Capriotti, A. L., Cavaliere, C., ... Laganà, A. (2020). Improved identification of phytocannabinoids using a dedicated structure-based workflow. *Talanta*, 219(April). <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121310>
- Mudge, E. M., & Brown, P. N. (2020). Determination of Cannabinoids in Cannabis sativa Dried Flowers and Oils by LC-UV: Single-Laboratory Validation, First Action 2018.10. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 103(2), 489–493. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.19-0197>

- Mudge, E. M., Murch, S. J., & Brown, P. N. (2017). Leaner and greener analysis of cannabinoids. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409(12), 3153–3163. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0256-3>
- Nahar, L., Onder, A., & Sarker, S. D. (2020). A review on the recent advances in HPLC, UHPLC and UPLC analyses of naturally occurring cannabinoids (2010–2019). *Phytochemical Analysis*, 31(4), 413–457. <https://doi.org/10.1002/pca.2906>
- Nations, U. (2008). Single Convention on Narcotic Drugs, 1961, (May), 13–15.
- OEDT. (2019). *Relatório Europeu sobre drogas 2021: tendências e evoluções. Observatório Europeu de Droga e da Toxicodependência*. Retrieved from [http://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/11364/20191724\\_TDAT19001PTN\\_PDF.pdf](http://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/11364/20191724_TDAT19001PTN_PDF.pdf)
- Ozber, N., Watkins, J. L., & Facchini, P. J. (2020). Back to the plant: overcoming roadblocks to the microbial production of pharmaceutically important plant natural products. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 47(9–10), 815–828. <https://doi.org/10.1007/s10295-020-02300-9>
- Pacifici, R., Marchei, E., Salvatore, F., Guandalini, L., Busardò, F. P., & Pichini, S. (2017). Evaluation of cannabinoids concentration and stability in standardized preparations of cannabis tea and cannabis oil by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 55(10), 1555–1563. <https://doi.org/10.1515/cclm-2016-1060>
- Palermi, A., Cafaro, A., Barco, S., Bucchioni, P., Franceschini, P., Cusato, J., ... Cangemi, G. (2021). Analysis of cannabinoids concentration in cannabis oil galenic preparations: Harmonization between three laboratories in northern Italy. *Pharmaceuticals*, 14(5). <https://doi.org/10.3390/ph14050462>
- Pan, G., Li, Z., Huang, S., Tao, J., Shi, Y., Chen, A., ... Zhao, L. (2021). Correction to: Genome-wide development of insertion-deletion (InDel) markers for Cannabis and its uses in genetic structure analysis of Chinese germplasm and sex-linked marker identification (BMC Genomics, (2021), 22, 1, (595), 10.1186/s12864-021-07883-w). *BMC Genomics*, 22(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07960-0>
- Patel, B., Wene, D., & Fan, Z. (Tina). (2017). Qualitative and quantitative measurement of cannabinoids in cannabis using modified HPLC/DAD method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 146, 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.07.021>
- Peschel, W., & Politi, M. (2015). <sup>1</sup>H NMR and HPLC/DAD for Cannabis sativa L.

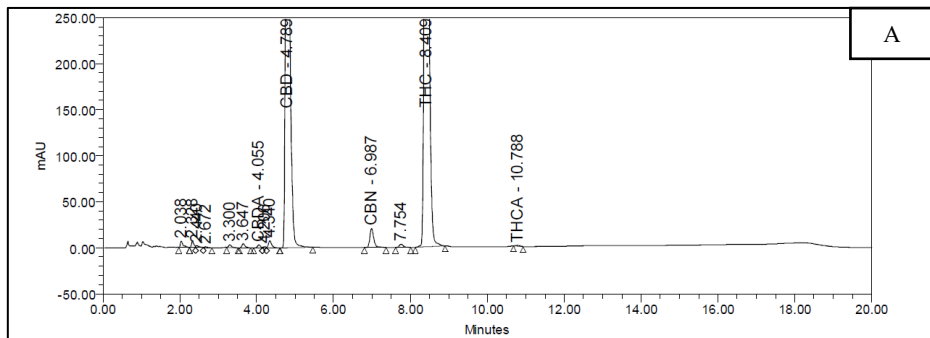
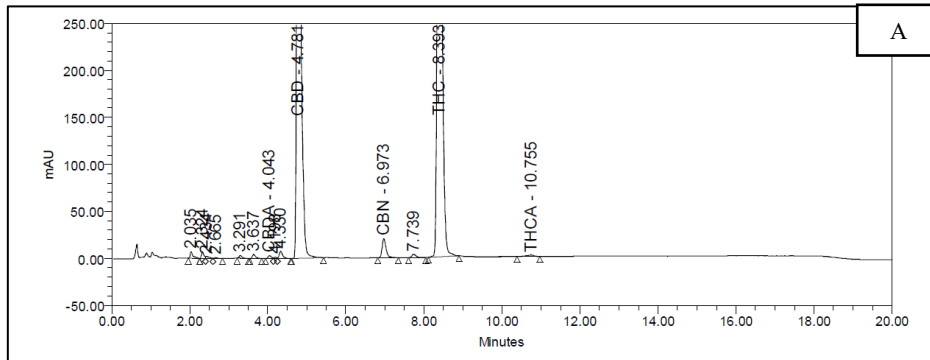
- chemotype distinction, extract profiling and specification. *Talanta*, *140*, 150–165. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.02.040>
- Politi, M., Peschel, W., Wilson, N., Zloh, M., Prieto, J. M., & Heinrich, M. (2008). Direct NMR analysis of cannabis water extracts and tinctures and semi-quantitative data on  $\Delta^9$ -THC and  $\Delta^9$ -THC-acid. *Phytochemistry*, *69*(2), 562–570. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.07.018>
- Protti, M., Brighenti, V., Battaglia, M. R., Anceschi, L., Pellati, F., & Mercolini, L. (2019). Cannabinoids from Cannabis sativa L.: A New Tool Based on HPLC-DAD-MS/MS for a Rational Use in Medicinal Chemistry. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, *10*(4), 539–544. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.8b00571>
- Qamar, S., Manrique, Y. J., Parekh, H. S., & Falconer, J. R. (2021). Development and optimization of supercritical fluid extraction setup leading to quantification of 11 cannabinoids derived from medicinal cannabis. *Biology*, *10*(6), 1–19. <https://doi.org/10.3390/biology10060481>
- Regulamentar, D., Na, O., & Regulamentar, D. (2021). Revê a legislação de combate à droga Decreto Regulamentar n . ° 61 / 94 - Diário da República n . ° 236 / 1994 , Série I-B de 1994-10-12, 1–33.
- Regulamentar, D., Regulamentar, D., Regulamentar, D., & Adjunto, E. (2021). Define requisitos e procedimentos relativos à concessão de autorizações para o exercício de atividades relacionadas com o cultivo , fabrico , comércio por grosso , transporte , circulação , importação e exportação de medicamentos , preparações e substânci, 1–8.
- Rochfort, S., Isbel, A., Ezernieks, V., Elkins, A., Vincent, D., Deseo, M. A., & Spangenberg, G. C. (2020). Utilisation of Design of Experiments Approach to Optimise Supercritical Fluid Extraction of Medicinal Cannabis. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66119-1>
- Romano, L. L., & Hazekamp, A. (2013). Cannabis Oil: chemical evaluation of an upcoming cannabis-based medicine. *Cannabinoids*, *1*(1), 1–11.
- Sánchez-Carnerero Callado, C., Núñez-Sánchez, N., Casano, S., & Ferreiro-Vera, C. (2018). The potential of near infrared spectroscopy to estimate the content of cannabinoids in Cannabis sativa L.: A comparative study. *Talanta*, *190*(April), 147–157. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.07.085>
- Steimling, J., & Kahler, T. (2018). Liquid Chromatography’s Complementary Role to Gas Chromatography in Cannabis Testing. *LC GC North America*, *36*(s6), 36-40,42.

- Retrieved from  
[http://ezproxy.umuc.edu/login?url=https://search.proquest.com/docview/2069422668?accountid=14580%0Ahttp://sfx.umd.edu/uc?url\\_ver=Z39.88-2004&rft\\_val\\_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:journal&genre=article&sid=ProQ:ProQ%3Aabitrade&atitle=Liquid+Chromatography%27s+C](http://ezproxy.umuc.edu/login?url=https://search.proquest.com/docview/2069422668?accountid=14580%0Ahttp://sfx.umd.edu/uc?url_ver=Z39.88-2004&rft_val_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:journal&genre=article&sid=ProQ:ProQ%3Aabitrade&atitle=Liquid+Chromatography%27s+C)
- Stolker, A. A. M., Van Schoonhoven, J., De Vries, A. J., Bobeldijk-Pastorova, I., Vaes, W. H. J., & Van Den Berg, R. (2004). Determination of cannabinoids in cannabis products using liquid chromatography-ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1058*(1–2), 143–151. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.089>
- Ternelli, M., Brighenti, V., Anceschi, L., Poto, M., Bertelli, D., Licata, M., & Pellati, F. (2020). Innovative methods for the preparation of medical Cannabis oils with a high content of both cannabinoids and terpenes. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *186*, 113296. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113296>
- The Lancet. (2010). European Medicines Agency-more transparency needed. *The Lancet*, *375*(9728), 1753. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60785-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60785-4)
- United Nations Office on Drugs and Crime. (2009). *A commitment to quality and continuous improvement. Unodc*.
- United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). (2022). Disponível a partir de <https://www.unodc.org/>. Acesso 08 de Agosto de 2022.
- Viviers, H. J., Petzer, A., & Gordon, R. (2021). An assessment of the potency related to Cannabis-based products in the South African market. *Forensic Science International*, *322*, 110754. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2021.110754>
- Weisman, J. M., & Rodríguez, M. (2021). A systematic review of medical students' and professionals' attitudes and knowledge regarding medical cannabis. *Journal of Cannabis Research*, *3*(1). <https://doi.org/10.1186/s42238-021-00100-1>
- Wurglics, M., & Ude, C. (2020). *Medical use of cannabis and cannabinoids. Arzneimitteltherapie* (Vol. 38).
- Yang, Y., Vyawahare, R., Lewis-Bakker, M., Clarke, H. A., Wong, A. H. C., & Kotra, L. P. (2020). Bioactive chemical composition of cannabis extracts and cannabinoid receptors. *Molecules*, *25*(15), 1–18. <https://doi.org/10.3390/molecules25153466>

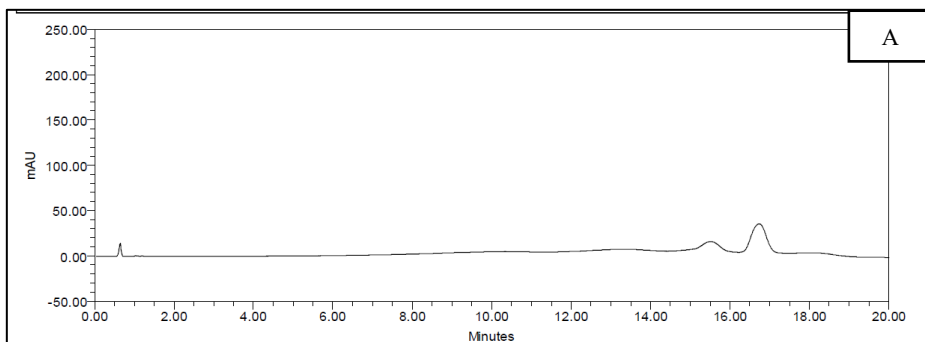
## ANEXOS

**Anexo I (Estudos preliminares):** Tempo de retenção (TR) (min) e tempo de retenção médio (TR médio) (min) dos compostos THC e CBD na solução-padrão P1.

	Substância	TR (min)	TR médio (min)
P1	THC	8.393	8.409
	CBD	4.781	4.789



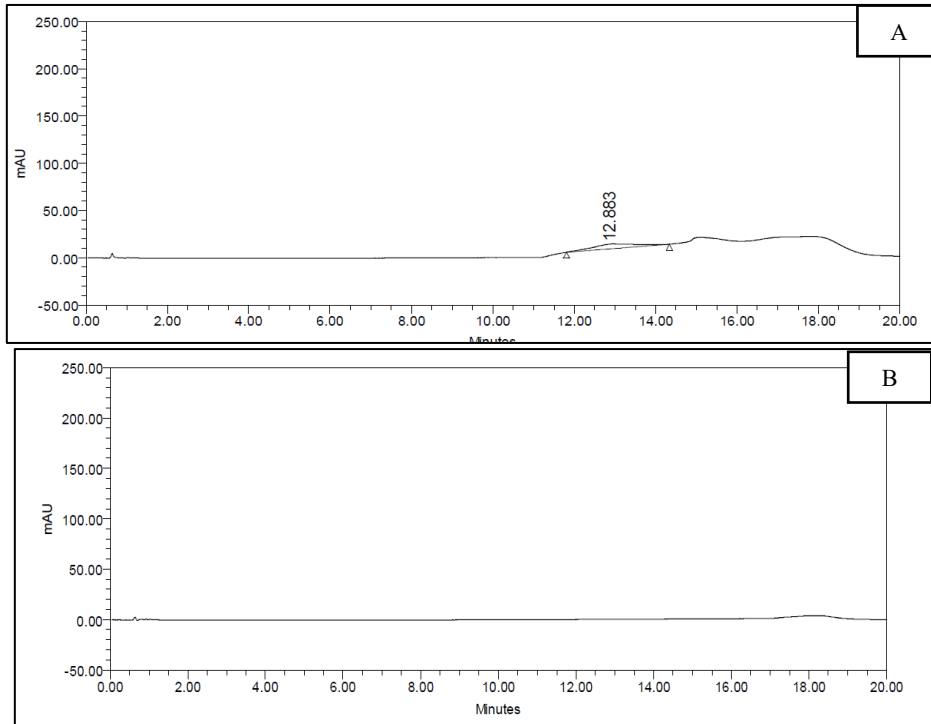
**Anexo II (Estudos preliminares):** Cromatogramas da solução-padrão P1 ao comprimento de onda  $\lambda_1$ .



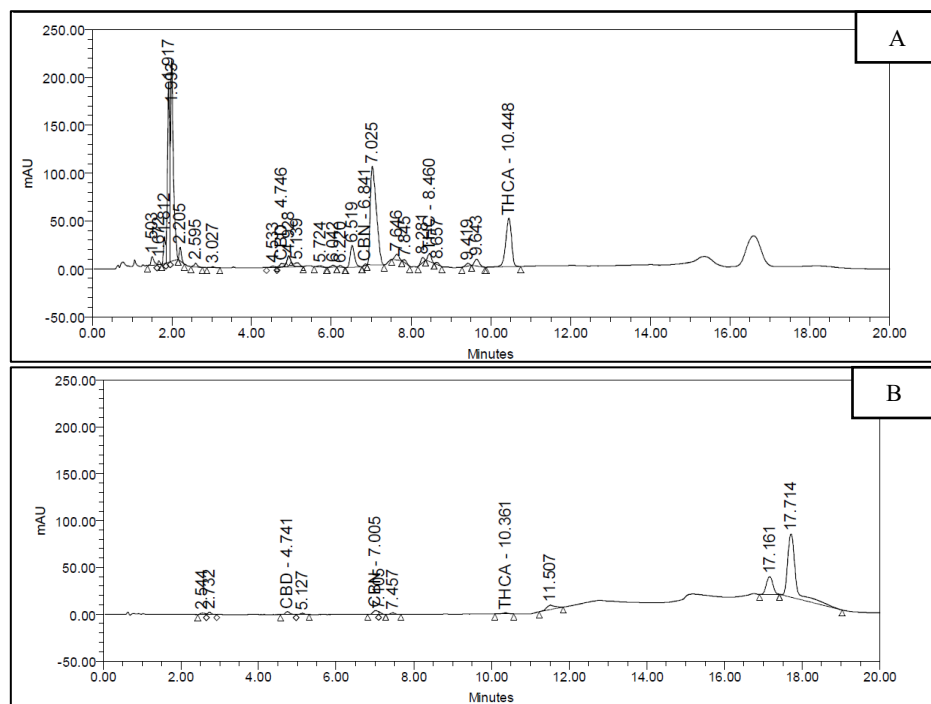
**Anexo III (Estudos preliminares):** Cromatogramas dos solventes ao comprimento de onda  $\lambda_1$ .

A - Solvente do padrão P1; B - Solvente da amostra.

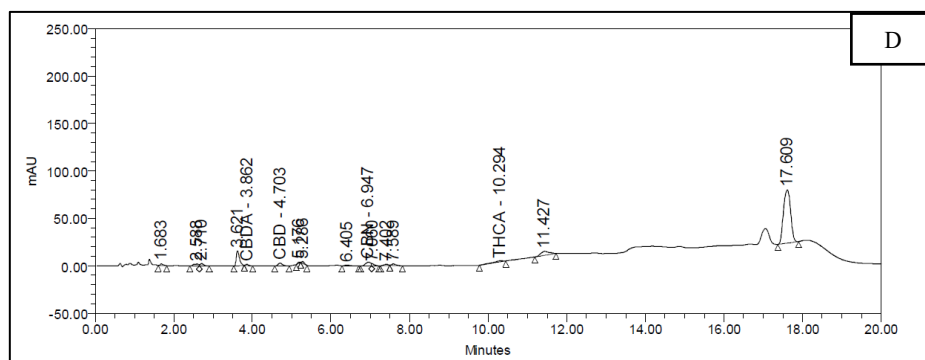
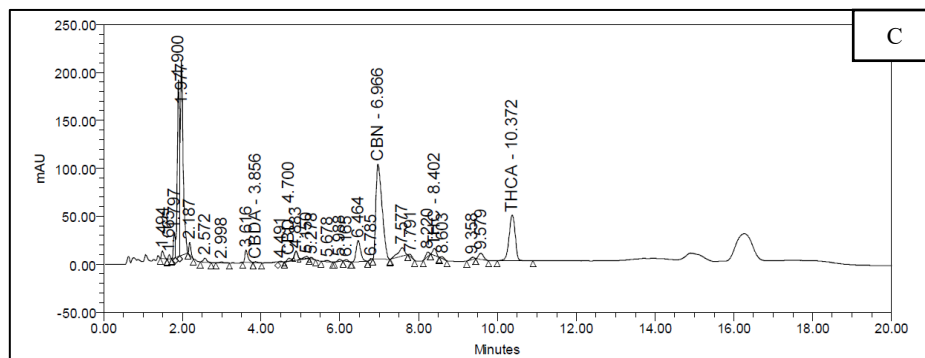
Development of a cannabis-based formulation.  
Desenvolvimento de uma formulação à base de cânabís.



Anexo III (Estudos preliminares, CONT): Cromatogramas dos solventes ao comprimento de onda  $\lambda_1$ .  
A – Solvente do padrão P1; B – Solvente da amostra.



Anexo IV (Estudos preliminares): Cromatogramas dos placebos ao comprimento de onda  $\lambda_1$ .  
A – Veículo B; B – Veículo C; C – Veículo B com a essência; D – Veículo C com a essência.



**Anexo IV (Estudos preliminares, CONT):** Cromatogramas dos placebos ao comprimento de onda  $\lambda_1$ . **A** – Veículo B; **B** – Veículo C; **C** – Veículo B com a essência; **D** – Veículo C com a essência.

**Anexo V (Desenvolvimento do método):** Tempo de retenção (TR) (min) e área do pico (mV.s) usadas para a reta de calibração do THC.

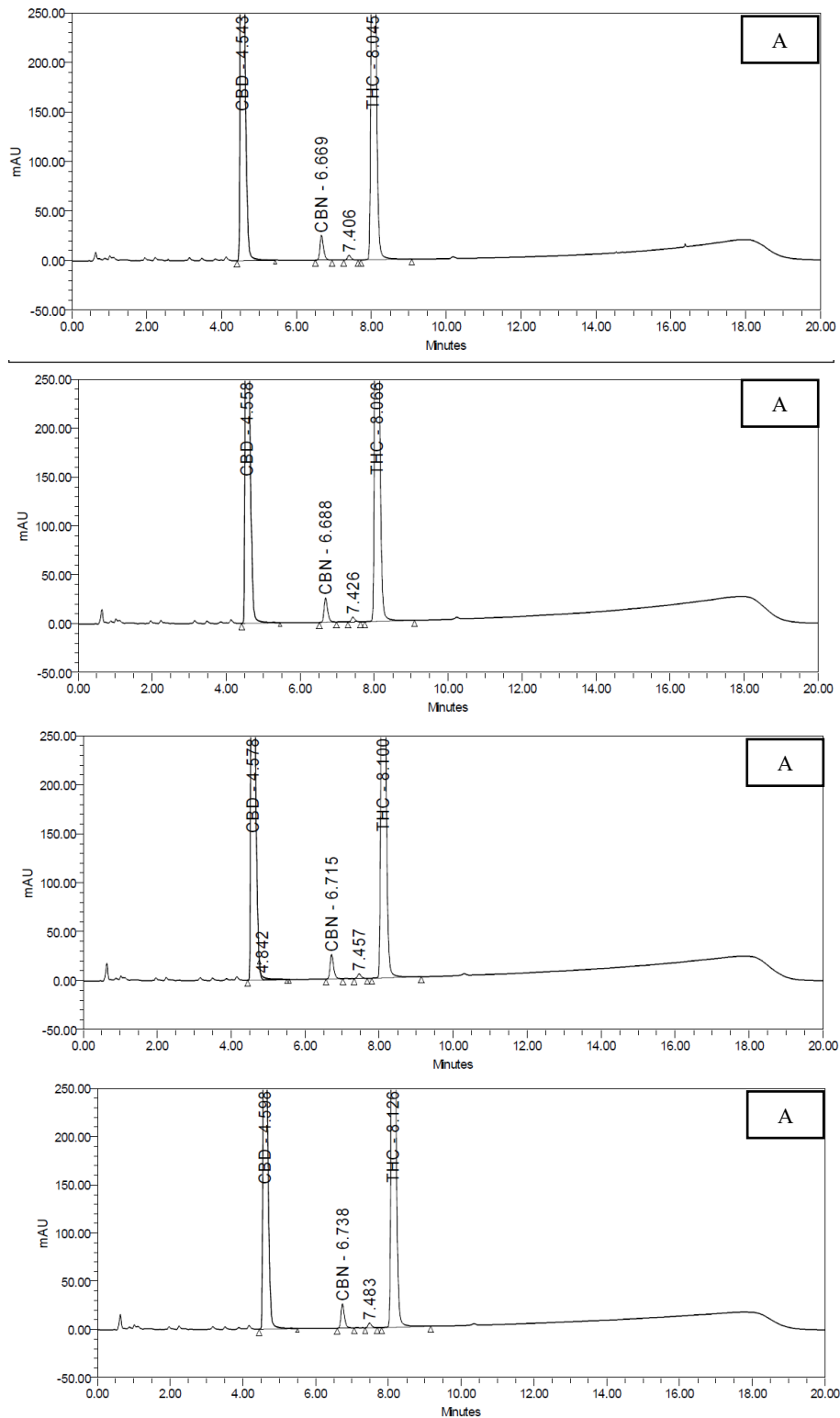
Solução-padrão	THC		Área (mV.s)
	Tempo de retenção (TR) (min)	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	
FS-CI	8.045	0.201	5047064
FS-CI	8.066	0.201	5048095
FS-CI	8.100	0.200	5031681
FS-CI	8.126	0.200	5020580
FS-CI	8.134	0.200	5018376
FS-CI	8.172	0.199	5 009379

**Anexo VI (Desenvolvimento do método):** Tempo de retenção (TR) (min) e área do pico (mV.s) usadas para a reta de calibração do CBD.

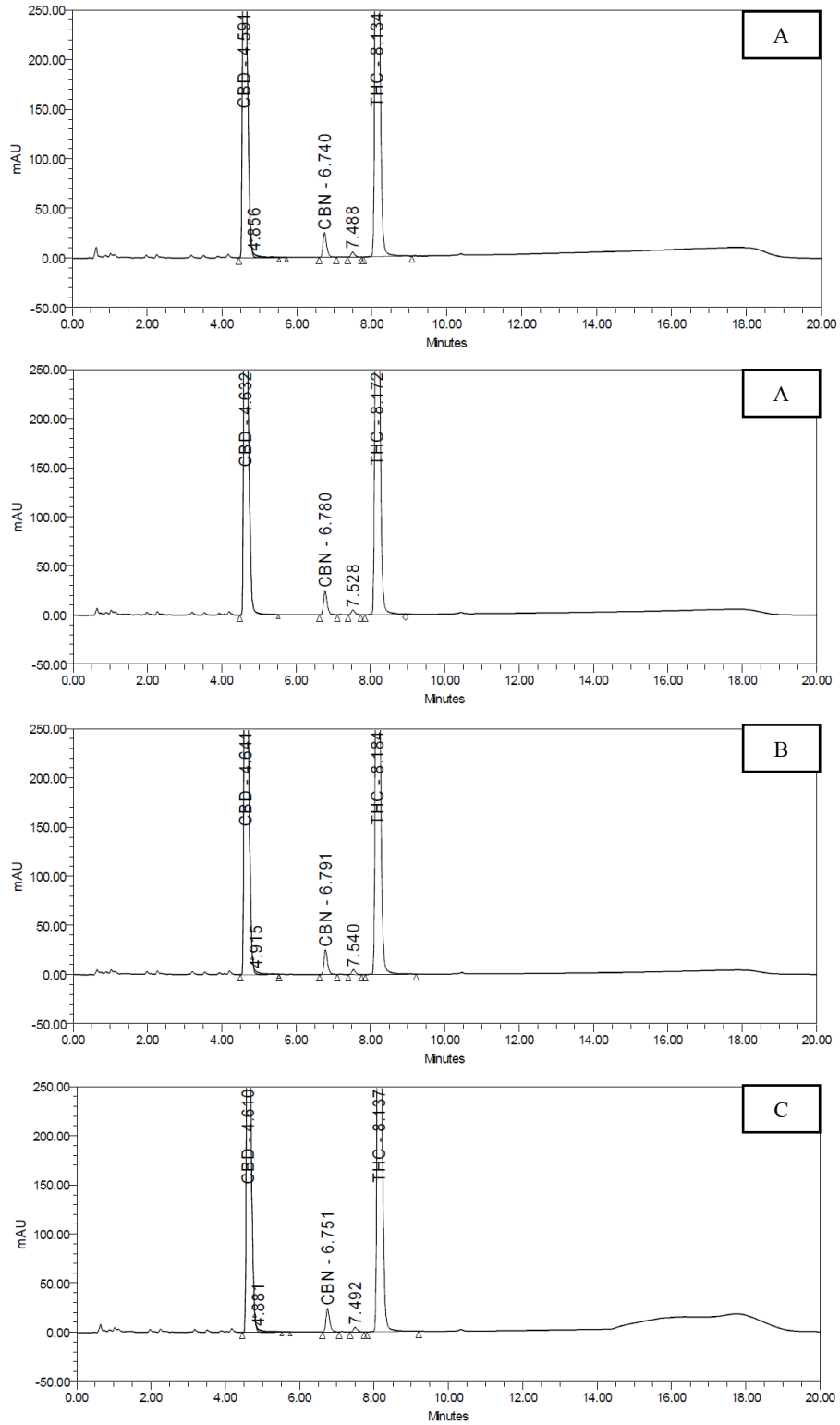
Solução-padrão	CBD		Área (mV.s)
	Tempo de retenção (TR) (min)	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	
FS-CI	4.543	0.201	5047121
FS-CI	4.558	0.201	5051699
FS-CI	4.578	0.200	4998011
FS-CI	4.598	0.200	5023856
FS-CI	4.591	0.200	4981721
FS-CI	4.632	0.199	5011582



*Development of a cannabis-based formulation.  
Desenvolvimento de uma formulação à base de cânabís.*

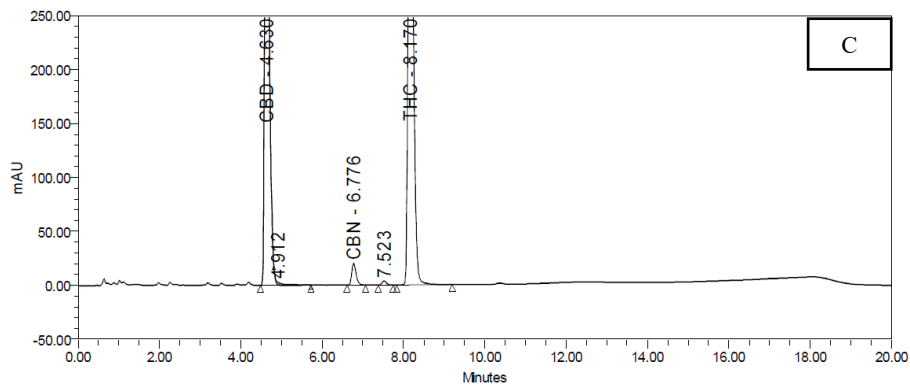
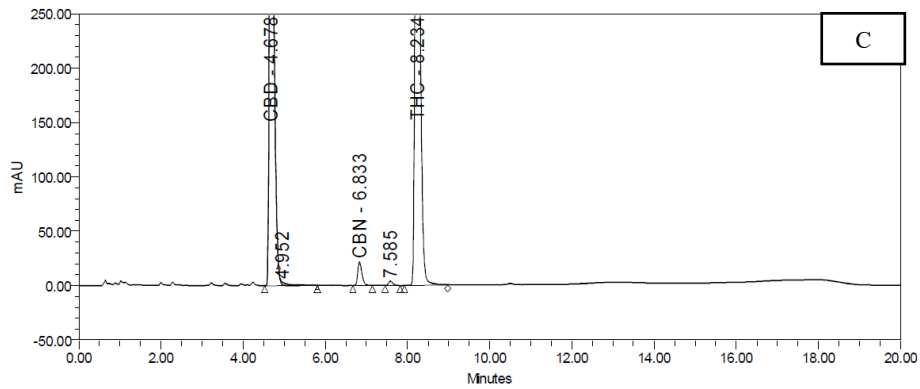
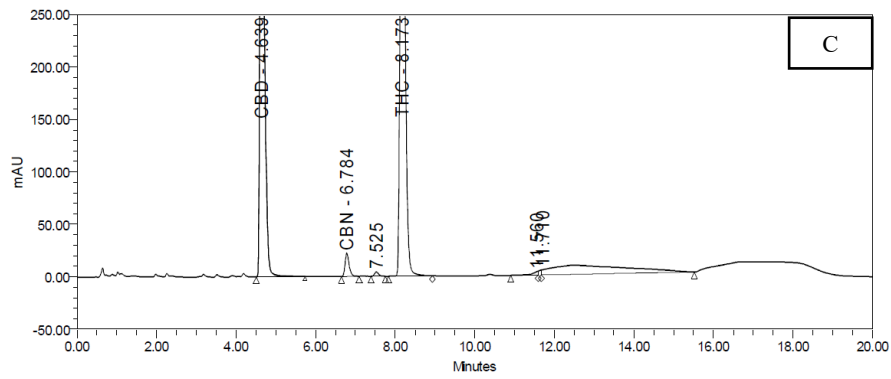
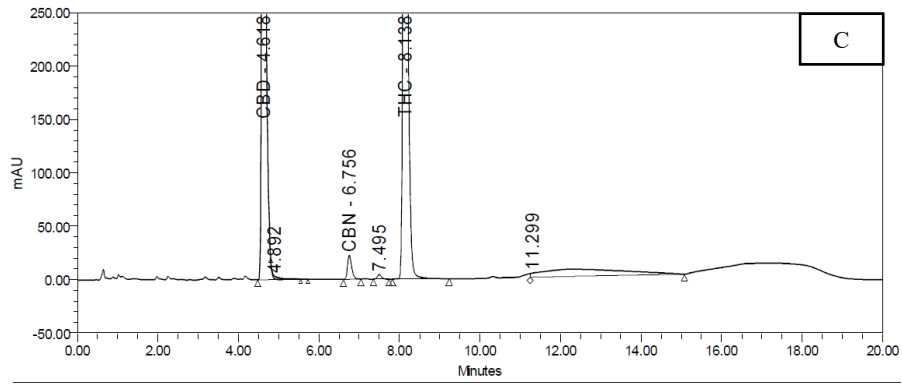


**Anexo VII (Desenvolvimento do método):** Cromatogramas das soluções-padrão ao comprimento de onda  $\lambda_1$ . **A** - FS-CI; **B** - FS-CI D-Check; **C** - FS-CI D-End.



Anexo VII (Desenvolvimento do método, CONT): Cromatogramas das soluções-padrão ao comprimento de onda  $\lambda_1$ . A - FS-CI; B - FS-CI D-Check; C - FS-CI D-End.

*Development of a cannabis-based formulation.  
Desenvolvimento de uma formulação à base de cânabís.*



**Anexo VII (Desenvolvimento do método, CONT):** Cromatogramas das soluções-padrão ao comprimento de onda  $\lambda_1$ . **A** - FS-CI; **B** - FS-CI D-Check; **C** - FS-CI D-End.