

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE

„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI

ȘCOALA DOCTORALĂ

DOMENIUL FARMACIE

***EVALUAREA FIZICO-CHIMICĂ ȘI FARMACOLOGICĂ
A UNOR PRODUSE FARMACEUTICE CU CONȚINUT
DE CANABINOZI***

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. NEGREȘ SIMONA

Student-doctorand:

MOLDOVEANU (BLEBEA) NICOLETA MIRELA

2022

Cuprins

Abrevieri și simboluri.....	8
Introducere.....	10
I. Partea generală.....	16
1. Sistemul endocannabinoid.....	16
1.1. Liganzii endogeni.....	17
1.2. Receptorii canabinoizi.....	19
1.3. Distribuția receptorilor canabinoizi.....	20
1.4. Semnalizarea receptorilor canabinoizi.....	23
1.5. Rolurile fiziologice și patologice ale receptorilor CB ₁	26
2. Utilizarea canabinoizilor în terapia farmacologică.....	30
2.1. <i>Cannabis sativa</i> L. – caracterizare generală.....	30
2.2. Efecte antipsihotice, anxiolitice, antiemetice.....	31
2.3. Efecte în Boala Alzheimer.....	35
2.4. Efecte anticonvulsivante, antiepileptice.....	35
2.5. Efecte antiparkinsoniene.....	37
2.6. Efecte în Boala Huntington.....	37
2.7. Efecte antioxidante.....	37
2.8. Efect antibacterian.....	38
2.9. Efecte analgezice.....	39
2.10. Efecte în afecțiuni oncologice.....	41
2.11. Efecte în boli cardiovasculare.....	41
2.12. Efecte în complicațiile diabetului.....	42
2.13. Efecte în scleroza multiplă tuberoasă.....	42
2.14. Efecte în obezitate, anorexie.....	43
2.15. Efecte în tratarea acneei.....	43
2.16. Farmacocinetică și farmacodinamică.....	45
2.17. Interacțiuni.....	49
3. Statutul juridic al canabidiolului.....	51
3.1. Descrierea situației actuale - trecut și prezent.....	51
3.2. Reglementări existente la nivelul Uniunii Europene.....	51
3.3. Reglementări existente la nivel mondial.....	54
II. Contribuții personale.....	58
4. Ipoteză de lucru și obiective generale.....	58
5. Metode de cuantificare a principalilor canabinoizi din uleiurile cu conținut de canabidiol.....	59
5.1. Analiza canabinoizilor prin cromatografia pe strat subțire.....	59
5.1.1. Introducere.....	59
5.1.2. Materiale și metodă.....	59
5.1.4. Rezultate și discuții.....	62
5.1.5. Concluzii.....	63
5.2. Analiza calitativă și cantitativă a uleiurilor de cânepă folosind UHPLC -PDA.....	63
5.2.1. Introducere.....	63
5.2.2. Material și metodă.....	64

5.2.3. Rezultate și discuții.....	67
5.2.4. Concluzii	74
5.3. Separarea cromatografică a canabinoizilor folosind UHPLC LC/MS	74
5.3.1. Introducere.....	74
5.3.2. Materiale și metodă	75
5.3.3. Rezultate și discuții.....	78
5.3.4. Concluzii	84
6. Utilizarea LC-MS/MS pentru testarea pesticidelor în produse care conțin canabinoizi	85
6.1. Introducere.....	85
6.2. Materiale și metodă	86
6.2.1. Principiul metodei	86
6.2.2. Materiale și reactivi	87
6.2.3. Materiale de referință	87
6.2.4. Echipamente folosite	90
6.2.5. Parametrii instrumentali ai metodei.....	90
6.2.6. Metoda analitică	92
6.3. Rezultate și discuții	96
6.4. Concluzii	104
7. Dezvoltarea unei metode foarte rapide pentru identificare și cuantificarea a canabinoizilor din uleiul de cânepă	105
7.1. Introducere.....	105
7.2. Materiale și metodă	106
7.2.1. Principiul metodei	107
7.2.2. Echipamente și materiale.....	107
7.3. Rezultate și discuții	113
7.3.1. Specificitate	113
7.3.2. Precizia	114
7.3.3. Acuratețea.....	114
7.3.4. Liniaritatea.....	115
7.3.5. Limița de detecție (LOD) și limița de cuantificare (LOQ).....	117
7.3.6. CB în ulei de cânepă.....	118
7.4. Concluzii	126
8. Evaluarea efectului anticonvulsivant a trei uleiuri de cânepă cu concentrații diferite de canabidiol.....	128
8.1. Ipoteza de cercetare	128
8.2. Materiale și metode	129
8.2.1. Animale de experiență.....	130
8.2.2. Substanțe și aparatură.....	130
8.2.3. Validarea metodei pentru inducerea convulsiilor la șoarece.....	131

8.2.4. Evaluarea efectului anticonvulsivant al uleiurilor de cânepă în tratament acut la șoarece.....	132
8.2.5. Analiza statistică.....	132
8.3. Rezultate și discuții.....	133
8.3.1. Validarea metodei pentru inducerea convulsiilor la șoarece.....	133
8.3.2. Evaluarea efectului anticonvulsivant al uleiurilor de cânepă în tratament acut la șoarece.....	136
8.4. Concluzii.....	139
9. Evaluarea efectului antihiperalgic a trei uleiuri de cânepă cu concentrații diferite de canabidiol într-un model de durere neuropată la șobolan.....	140
9.1. Ipoteza de cercetare.....	140
9.2. Materiale și metode.....	140
9.2.1. Animale de experiență.....	141
9.2.2. Substanțe și aparatură.....	141
9.2.3. Protocol experimental.....	141
9.2.4. Analiza statistică.....	144
9.3. Rezultate și discuții.....	144
9.3.1. Mase corporale.....	144
9.3.2. Hipersensibilitatea tactilă.....	147
9.3.3. Hipersensibilitatea la stimul rece.....	151
9.4. Concluzii.....	156
10. Obținerea de membrane prin combinații ale uleiului cu canabidiol și biopolimerul chitosan.....	158
10.1. Introducere.....	158
10.2. Materiale și metodă.....	159
10.2.1. Obținerea membranelor.....	159
10.2.2. Studiul macroscopic.....	162
10.2.3. Studiul de microscopie cu epifluorescență pentru evaluarea membranelor de CS.....	162
10.2.4. Transmitanța optică.....	162
10.2.5. Determinarea gradului de hidratare (%) al membranelor.....	162
10.3. Rezultate și discuții.....	163
10.3.1. Obținerea membranelor.....	163
10.3.2. Studiul macroscopic.....	164
10.3.3. Studiul de microscopie cu epifluorescență pentru evaluarea membranelor de CS.....	166
10.3.4. Transmitanța optică.....	171
10.3.5. Determinarea gradului de hidratare (%) al membranelor.....	172
10.4. Concluzii.....	174
11. Evaluarea efectului unei emulsii cu conținut de canabidiol într-un model animal de inflamație cronică.....	176

11.1. Ipoteza de cercetare	176
11.2. Materiale și metode.....	176
11.2.1. Animale de experiență	176
11.2.2. Substanțe și aparatură	177
11.2.3. Protocol experimental.....	177
11.2.4. Evaluarea efectului analgezic – Hot Plate	178
11.2.5. Evaluarea efectului antiinflamator prin metoda pletismometrică.....	178
11.2.6. Analiza statistică.....	179
11.3. Rezultate și discuții.....	179
11.3.1. Mase corporale.....	179
11.3.2. Evaluarea efectului analgezic	180
11.3.3. Evaluarea efectului antiinflamator.....	184
11.4. Concluzii.....	189
Bibliografie	194
Anexe.....	214
Anexa 1. Lucrări științifice publicate în reviste de specialitate.....	215
Anexa 2. Lucrări științifice comunicate (postere științifice).....	264

Introducere

Datorită prezenței unor suplimente alimentare pe piața farmaceutică românească și internațională pe bază de canabinoizi (CB), a crescut interesul față de utilizarea acestora. Utilizarea medicală a canabinoizilor și în special a fitocanabinoizilor, a fost una dintre temele cele mai atractive ale cercetării medico-farmaceutice din ultimii ani, pe zi ce trece acești compuși câștigând din ce în ce mai mult teren.

Principalul compus activ din plantă este Δ -9-tetrahydrocannabinolul (Δ -9-THC), responsabil în mare parte de efectele psihoactive care au făcut celebră cânepa indiană. Canabidiolul (CBD), este un alt compus important obținut din *Cannabis sativa* L., cu un potențial terapeutic ridicat, care ar putea aduce o nouă speranță pacienților cronici ce suferă de dureri, inflamații, epilepsie, tulburări de somn, scleroză multiplă, anorexie, schizofrenie sau cancer. CBD a fost izolat pentru prima dată în 1940, iar structura și stereochimia acestuia au fost elucidate în 1963. CBD este disponibil într-un număr tot mai mare de forme farmaceutice, dar cel mai cunoscut este uleiul de CBD, care în doar câțiva ani, a devenit extrem de popular la nivel mondial [1].

CBD poate fi găsit în multe produse farmaceutice și formulări cosmetice comercializate pe Internet sau în diferite magazine. Pentru unele produse, nu există o certitudine privind puritatea uleiului de CBD, astfel încât uleiurile comerciale sunt de fapt un amestec de CB și nu conțin CBD pur. Ele sunt amestecate în uleiuri comestibile obișnuite, cum ar fi ulei de floarea soarelui, ulei de măsline sau ulei de semințe de cânepă pentru a obține așa-numitul ulei cu CBD.

Tema tezei de doctorat abordează subiectul analizei conținutului în CB a unor suplimente alimentare comercializate online, dar și determinarea eficacității acestora pe modele de farmacologie experimentală. Această idee a plecat de la faptul că un sondaj din 2017 a raportat că analiza a 84 de produse cu conținut de CB, achiziționate online a arătat că din toate produsele examinate, numai 26 au fost etichetate corespunzător referitor la concentrația în CBD în conformitate cu normele Food and Drug Administration. Mai mult decât atât, s-au raportat cazuri de intoxicație pediatrică cu THC, la pacienții care au ingerat produse pe bază de CBD, semnalând astfel necesitatea adoptării unei legislații și a unui statut juridic clar cu privire la comercializarea acestor produse.

Întrucât aceste produse nu sunt controlate suficient, iar consumatorii nu posedă mijloace pentru analiza compoziției chimice, aceștia pot cumpăra accidental diverse forme farmaceutice cu conținut de CB cu proprietăți nedorite, care vor duce la apariția unor efecte adverse (ținând cont de paleta largă de acțiuni farmacologice ale acestor substanțe active).

Plecând de la aceste considerente, obiectivele cercetării au fost următoarele:

1. Evaluarea calității produselor care conțin CB, prin dezvoltarea mai multor metode: TLC, cromatografia de lichide de ultra înaltă performanță (UHPLC) cu detectare ultraviolet (UV) și metoda cromatografiei lichide de înaltă performanță-spectrometrie de masă (LC-MS/MS).

Deoarece planta de *Cannabis* este predispusă la boli, dăunători, ciuperci și infecții bacteriene, s-a dezvoltat o procedură analitică care poate detecta pesticidele din probe (aceasta datorită faptului că în special în țările și statele în care este legalizat consumul, cultivatorii sunt mai tentați să utilizeze stimulatori de creștere și pesticide pentru a crește randamentul de cultivare).

2. Evaluarea eficacității produselor studiate în experimente non-clinice prin corelarea dozelor eficace citate în literatură pentru un anumit efect farmacologic și conținutul declarat în CBD pentru fiecare produs investigat. S-au utilizat două modele farmacologice: inducerea convulsiilor tonico-clonice prin aplicarea electrozilor auriculari la șoarece și inducerea durerii neuropate prin administrarea de paclitaxel la șobolan.

3. Obținerea unor forme farmaceutice cu conținut de CB, destinate utilizării topice, în patologii cronice cu componentă inflamatorie. Acest obiectiv s-a concretizat prin realizarea unei metode de combinare a uleiului de CBD cu biopolimerul chitosan (CS).

4. Testarea eficacității emulsiei CBD-CS pentru reducerea inflamației prin administrarea topică la șobolani cu inflamație indusă cu ajutorul adjuvantului Freund.

Teza se încheie cu concluzii generale și prezentarea contribuțiilor originale, a perspectivelor de dezvoltare ulterioară, lista de lucrări și a referințelor bibliografice.

I. Partea generală

1. Sistemul endocannabinoid

ECS este un sistem neuromodulator care joacă roluri cheie în menținerea și modularea proceselor fiziologice în care sunt implicate sistemul nervos central (SNC), activitatea endocrină, sistemul reproductiv, sistemul cardiovascular și menținerea homeostaziei organismului, aceștia acționând ca o punte chimică între corp și minte [2].

ECS este un constituent biologic important pentru supraviețuirea organismului și include *receptorii CB*, *endocanabinoizii* (eCBs) (liganzii lor lipidici), *enzimele metabolice* și alte proteine care reglează nivelurile țesuturilor de eCBs conform *fig. 1.1*.

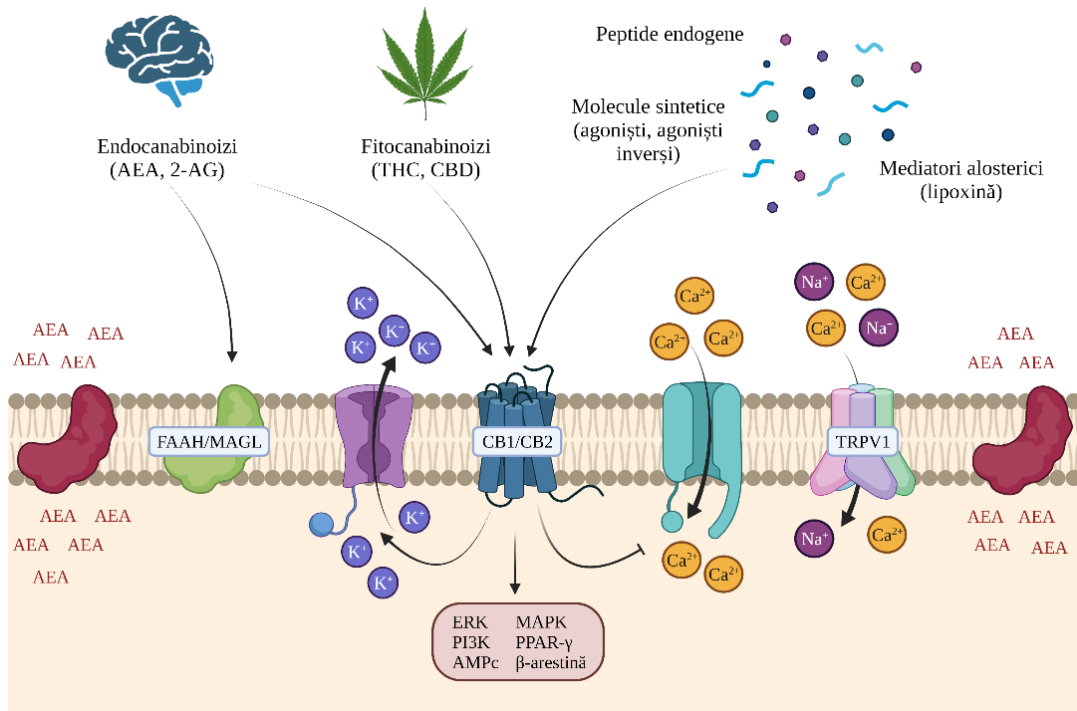


Fig. 1.1. Sistemul endocannabinoid, adaptat după de Melo Reis și colab., 2021, creat cu BioRender.com [3]

Inițial s-a afirmat despre CB, faptul că produc efecte fiziologice prin interacțiuni nespecifice cu membrana celulară. La sfârșitul anilor 80' ai secolului trecut, cercetările realizate pe modele animale au condus la descoperirea receptorilor CB, receptorul CB₁ descoperit în anul 1988 de către William Devane și Allyn Howlet [4] și receptorul CB₂ descoperit în anul 1993 de către Sean Munro și colab. [5].

Receptorii CB cuplați la proteina G, aparțin familiei A de receptori, cu 7 domenii transmembranare, specific către grupul Gi/o (Gi_{1, 2, 3}; Go_{1, 2}) [6]. Aceștia sunt responsabili pentru majoritatea efectelor fiziologice ale ECS, fiind localizați atât la nivelul SNC cât și în periferie. Asemănarea receptorilor CB₁ și CB₂ este de 68% între domeniile transmembranare și, 44% per total, fiind similari în raport de 97-99% la om și șoareci [7]. Receptorii CB sunt activați de trei grupuri de liganzi: *eCBs*, *fitocanabinoizii* (THC, CBD) și *canabinoizii sintetici* (WIN55,212-2, 2-metil -2'-F-anandamidă (Met-F-AEA), JWH-015, HU-210, HU-331). CBi se leagă reversibil și stereoselectiv de receptorii CB.

Ambii receptori CB₁ și CB₂, sunt membri ai familiei GPCR și sunt cuplați la *toxina pertussis*. Cea mai menționată cale este cuplarea cu proteina Gi/o, o (PTX) -sensibilă care poate inhiba adenilat ciclaza (AC) și formarea adenozin monofosfatului ciclic (AMPc), însă poate

intensifica formarea de AMPc la cuplarea cu proteina Gs, atunci când este simultan activat în neuronii, fenomen cunoscut drept heterodimerizare [8].

Dezechilibrele în ECS au ca rezultat afectarea diferitelor procese fiziologice endogene, apariția fenomenelor neuroinflamatorii, sau efecte imunomodulare, motiv pentru care ECS este implicat în diferite patologii neurodegenerative precum boala Alzheimer (AD), boala Parkinson (PD), boala Huntington (HD) și scleroza multiplă (SM) [9], [10], [11], dureri cronice și inflamatorii [12], afecțiuni oncologice [13], [14], greață, vărsături [15], obezitate [16], epilepsie [17], glaucom, astm [18], tulburări de dispoziție [19], [20].

Corpul uman are *eCBs*, în special AEA și 2-AG, care pot activa fie CB₁, fie CB₂. Pe lângă CB₁ și CB₂, 2-AG și AEA pot lega și alte proteine transmembranare, inclusiv receptorul cuplat cu proteina G55 (GPR55), receptori nucleari (PPAR γ) și receptorul tranzitoriu potențial de tip vaniloid de tip 1 (TRPV1). TRPV1 este un receptor neselectiv de canal cationic, fiind ținta naturală a capsaicinei, distribuit în terminațiile periferice și centrale ale neuronilor senzori neuronii. TRPV1 a fost sugerat ca o țintă potențială pentru dezvoltarea de agenți antinociceptivi, antiinflamatori și agenți antiepileptici [21], [22].

2. Utilizarea canabinoizilor în terapia farmacologică

Planta *Cannabis sativa* L., este o specie dioică aparținând familiei *Cannabaceae*, originară din Asia Centrală, cu o istorie îndelungată. Primele date cu privire la utilizarea acestei plante, datează din 2500 î.Hr. [23].

Cele două componente neuroactive majore din plantele de *Cannabis* sunt: principalul compus psihoactiv, THC-ul și compusul non-psihoactiv, CBD [24].

În prezent, CBD este utilizat ca ingredient activ în două preparate aprobate de autoritățile de reglementare: Epidiolex® - soluție orală (conține doar CBD) și Sativex® - spray oromucosal (conține atât CBD, cât și THC) [25], [26], [27]. Statutul legal al canabisului este diferit de la o țară la alta, deoarece există țări în care se află THC și CBD sunt clasificate în aceeași clasă de substanțe interzise în timp ce în alte țări produsele cu CBD sunt legale [28].

Dovezile cu privire la diferitele aplicații terapeutice ale CBD au fost trecute în revistă de Pisanti și colab. (2017) și se regăsesc în *tabelul 2.1*.

Devin interesante interacțiunile fitocanabinoizi-terpenoide care ar putea produce sinergism în ceea ce privește tratamentul durerii, inflamației, depresiei, anxietății, dependenței, epilepsiei, cancerului, infecțiilor fungice și bacteriene. Sinergismul fitocanabinoid-terpenoidă, crește probabilitatea unor dezvoltări de noi produse terapeutice [29].

Tabel 2.1. Prezentare generală a afecțiunilor pentru care CBD poate avea beneficii terapeutice preluate de la Pisanti și colab (2017), [30]

Afecțiunea	Efecte
Boala Alzheimer	Antinfiamatorii, antioxidante, antiapoptotice ale răspunsurilor neuroinflamatorii și neurodegenerative în modele <i>in vitro</i> și <i>in vivo</i>
Boala Parkinson	Atenuarea insuficienței dopaminergice <i>in vivo</i> ; neuroprotecție; îmbunătățirea ratingului psihiatric și reducerea agitației și a comportamentului agresiv la pacienți.
Scleroză multiplă	Antinfiamatorii și imunomodulatoare, Semne îmbunătățite la șoareci
Boala Huntington	Neuroprotectoare și antioxidante la șoareci; nu există diferențe clinice semnificative la subiecți umani
Leziuni ischemice	Efecte neuroprotectoare pe termen scurt; inhibarea citotoxicității, stresului oxidativ și inflamației <i>in vitro</i> și la modelele de rozătoare.
Durere	Efect analgezic la pacienții cu durere neuropată rezistentă la alte tratamente.
Psihoză	Atenuarea modificărilor comportamentale și gliale în modelele de schizofrenie pe animale; proprietăți anti-psihotice asupra simptomelor induse de ketamină
Anxietate	Reducerea tensiunii musculare, neliniște, oboseală, probleme de concentrare, îmbunătățirea interacțiunilor de anxietate și stres sociale la modelele de pe rozătoare; anxietate socială redusă la pacienți.
Depresie	Efect antidepresiv în depresie la rozătoare.
Cancer	Acțiuni antiproliferative și anti-invazive într-o gamă largă de tipuri de cancer; inducerea morții celulelor canceroase mediată de autofagie; efecte chemopreventive
Greață	Suprimarea greții
Boli inflamatorii	Proprietăți antiinflamatorii în mai multe modele <i>in vitro</i> și <i>in vivo</i> ; inhibarea citokinelor și căilor inflamatorii
Artrita reumatoidă	Inhibarea TNF- α într-un model animal
Infecții	Antibacterian împotriva <i>Staphylococcus aureus</i> rezistent la meticilină
Boala inflamatorie intestinală și boala Crohn	Inhibarea recrutării macrofagelor și a secreției de TNF- α <i>in vivo</i> ; reducerea indicelui de activitate a bolii la pacienții cu boala Crohn.
Boli cardiovasculare	Reducerea dimensiunii infarctului prin proprietăți anti-oxidante și antiinflamatorii <i>in vitro</i> și <i>in vivo</i>
Complicațiile diabetului	Atenuarea fibrozei și disfuncție miocardice

Până acum, au fost dezvoltate doar câteva formulări medicamentoase diferite. Sativex® –amestecul THC și CBD (1:1), primul medicament eliberat pe rețetă pe bază de cannabis ca tratament al sclerozei multiple (SM) și combaterea spasticității [31].

În prezent sunt comercializați doi agoniști CB₁ sintetici, Marinol® (Dronabinol, sintetic Δ^9 -THC) și Cesamet® (Nabilone, analog sintetic al Δ^9 -THC). Dronabinolul este utilizat ca

stimulent al apetitului la pacienți cu sindrom SIDA și pentru greața și vărsăturile asociate tratamentelor oncologice.

Rimonabant® a fost primul antagonist selectiv al receptorilor CB₁ dezvoltat ca un agent anti-obezitate care suprimă pofta de mâncare. Nu a fost aprobat niciodată în SUA, a fost retras oficial de către Agenția Europeană pentru Medicamente (EMA) în 2009 din cauza efectelor secundare, care au inclus simptome neurologice și psihiatrice, inclusiv anxietate, depresie, anxietate, convulsii, greață și comportament suicidar [32].

Pe piață există un singur medicament pe bază de CBD purificat, și anume Epidiolex®. Cu toate acestea, datorită farmacocineticii nesatisfăcătoare a administrării CBD-ului pe cale gastroenterică, este necesară dezvoltarea alternativelor.

3. Statutul juridic al canabidiolului

La nivel mondial, utilizarea preparatelor derivate din planta de *Cannabis* în domeniul medical au o istorie îndelungată. În secolul XX, consumul a devenit limitat până în 30 martie 1961, când planta de *Cannabis* și CB₁ au fost clasificați în Convenția unică a ONU, drept *substanțe fără uz medical*. În ultimii ani, însă interesul pacienților cu privire la utilizarea CB-
lor a crescut [33].

La mijlocul anilor 1990 în mai multe state americane au fost adoptate referendumuri prin care s-a legalizat consumul de cannabis pentru pacienți cu SM și afecțiuni oncologice în stadiu terminal.

La începutul secolului XXI, Israelul (2001), Țările de Jos (2003), Elveția (2011), Cehia (2013), Australia (2016) și Germania (2017) au autorizat utilizarea în scopuri medicale a cannabisului în condiții speciale. În decembrie 2017, *Organizația Mondială a Sănătății* (OMS) a recomandat ca cel puțin CBD să nu mai fie considerată o substanță controlată la nivel internațional.

În Europa, ultima versiune a legislației privind cannabisul a demonstrat că utilizarea medicamentelor pe bază de cannabis este foarte reglementată. În niciuna dintre țările UE nu a fost autorizat fumatul de cannabis în scopuri medicale. Până în prezent, Sativex® și Epidiolex® sunt medicamentele pe bază de cannabis care conțin CBD și care pot fi prescrise pacienților [34].

La nivel global, în peste 40 de țări au fost aprobate programe medicale pe bază de cannabis. Legalitatea CBD-ului nu este o noțiune clară la nivel mondial. Măsura Canadei de a legaliza cannabisul în octombrie 2018 evidențiază în continuare necesitatea unei soluții rapide cu privire la statutul juridic al CB-
lor [35], care este diferit de la o țară la alta, deoarece există țări în care

THC-ul și CBD-ul sunt clasificate în aceeași clasă de substanțe interzise, în timp ce în alte țări produsele care conțin CBD sunt legale [36].

II. Contribuții personale

4. Ipoteză de lucru și obiective generale

Scopul acestei lucrări a fost acela de a dezvolta metode noi de analize fizico-chimice pornind de la cele deja existente în literatura de specialitate pentru a obține în final metode de cuantificare rapide și eficiente a CB-lor.

Conform informațiilor obținute din datele furnizate de literatura de specialitate, prezentate în capitolele 1-3 ale acestei teze, CB prezintă numeroase potențiale efecte farmacologice și utilizări terapeutice. Cercetările din această lucrare au constatat în caracterizarea fizico-chimică și farmacologică a unor compuși farmaceutici cu conținut în CB și crearea unor combinații între CS și ulei CBD. Prin combinația dintre CS, un biopolimer, regenerabil cu aplicații biomedicale și CBD, se pot obține emulsii cu stabilitate bună și farmacocinetică adecvată, ce pot constitui o bază pentru crearea de noi forme farmacologic active. Membranele obținute pot reprezenta o aplicație farmaceutică, iar acestea pot intra în terapeutică, după efectuarea unor noi serii de teste și studii preclinice și apoi clinice.

Obiectivele generale propuse pentru realizarea tezei sunt:

1. Dezvoltarea unor metode de cuantificare a principalilor CB din uleiurile cu conținut declarat de CBD.
2. Utilizarea tehnicii LC-MS/MS pentru testarea pesticidelor în produse care conțin CB.
3. Dezvoltarea unei metode aplicând o tehnică cromatografică de lichide de ultra înaltă performanță (UHPLC) - cu detector cu șir de fotodiode (PDA), metodă rapidă pentru identificare și cuantificarea CB-lor din uleiurile de cânepă.
4. Evaluarea efectului anticonvulsivant a trei uleiuri de cânepă cu concentrații diferite de CBD.
5. Evaluarea efectului antihiperalgic în durerea neuropată pentru trei uleiuri vegetale cu concentrații diferite de CBD.
6. Obținerea de membrane prin combinații ale uleiului CBD cu biopolimerul CS, pe principiul „green-technology”.
7. Evaluarea eficacității emulsiei CBD-CS într-un model animal pe șobolani cu inflamație cronică indusă cu ajutorul adjuvantului Freund complet.

5. Metode de cuantificare a principalilor canabinoizi din uleiurile cu conținut de canabidiol

5.1. Analiza canabinoizilor prin cromatografia pe strat subțire

Studiul de față a avut ca obiectiv o metodă pentru detectarea CB-lor folosind TLC, scopul final fiind analiza preliminară a uleiurilor cu conținut de CBD comercializate pe Internet.

Materiale și Metode

S-a utilizat ca instrument de analiză a CB-lor, kit-ul Alpha Cat. Aplicând acest protocol, principalele ingrediente active ale uleiurilor CBD au putut fi vizualizate pe baza unei reacții de culoare specifică. S-au utilizat pentru analiză, trei uleiuri, comercializate pe Internet, înregistrate ca: *Proba 174*, *Proba 175*, *Proba 181*.

Rezultate și discuții

S-a folosit rigla grafică a CB-lor pentru a măsura diametrul punctelor colorate în galben, roșu, portocaliu, corespunzătoare pentru CBD și THC pentru a se cuantifica nivelul acestora din cele 3 probe de ulei. S-a multiplicat fiecare citire a rezultatelor cu 2, conform instrucțiunilor.

Tehnica TLC prezintă avantajul analizelor paralele, deși are limitări în rezoluție și sensibilitate, însă costurile sunt reduse iar probele se pregătesc ușor. TLC este foarte utilă în laborator pentru screeningul rapid al purității conținutului și este folosită pentru amprentarea rapidă a probelor, dar nu este indicată pentru aplicațiile care necesită o sensibilitate ridicată.

5.2. Analiza calitativă și cantitativă a uleiurilor de cânepă folosind UHPLC -PDA

În acest subcapitol s-a verificat performanța analitică a CBD-ului din 3 uleiuri comerciale de cânepă aplicând o tehnică UHPLC cu detectare PDA.

Materiale și metode

S-a utilizat un sistem UHPLC Flexar, Perkin Elmer MA, SUA, o coloană C18 Brownlee Analytical (50 mm x 2,1 mm i.d 1,9 μm) folosind eluție în gradient cu acid formic 0,1% în apă ca fază mobilă A și acid formic 0,1% în acetonitril ca fază mobilă B. Debitul a fost de 0,4 mL/min, iar volumul de injectare a fost de 5 μL. Lungimea de undă de detecție a fost stabilită la 210 nm. Controlul instrumentelor, achiziția și procesarea datelor a fost realizată folosind programul SCIEX Analyst 2.0. [37], [38].

S-a folosit standard de CBD, 1,0 mg/mL, denumit și înregistrat ca *Proba 176*. Am folosit 3 variante de uleiuri comercializate pe Internet, înregistrate conform subcapitolului 5.1.2.2.

Rezultate și discuții S-au obținut astfel următoarele cromatogramele din *fig. 5.2.1.*, iar în *tabelul 5.2.1.* se regăsește cuantificarea exactă a probelor.

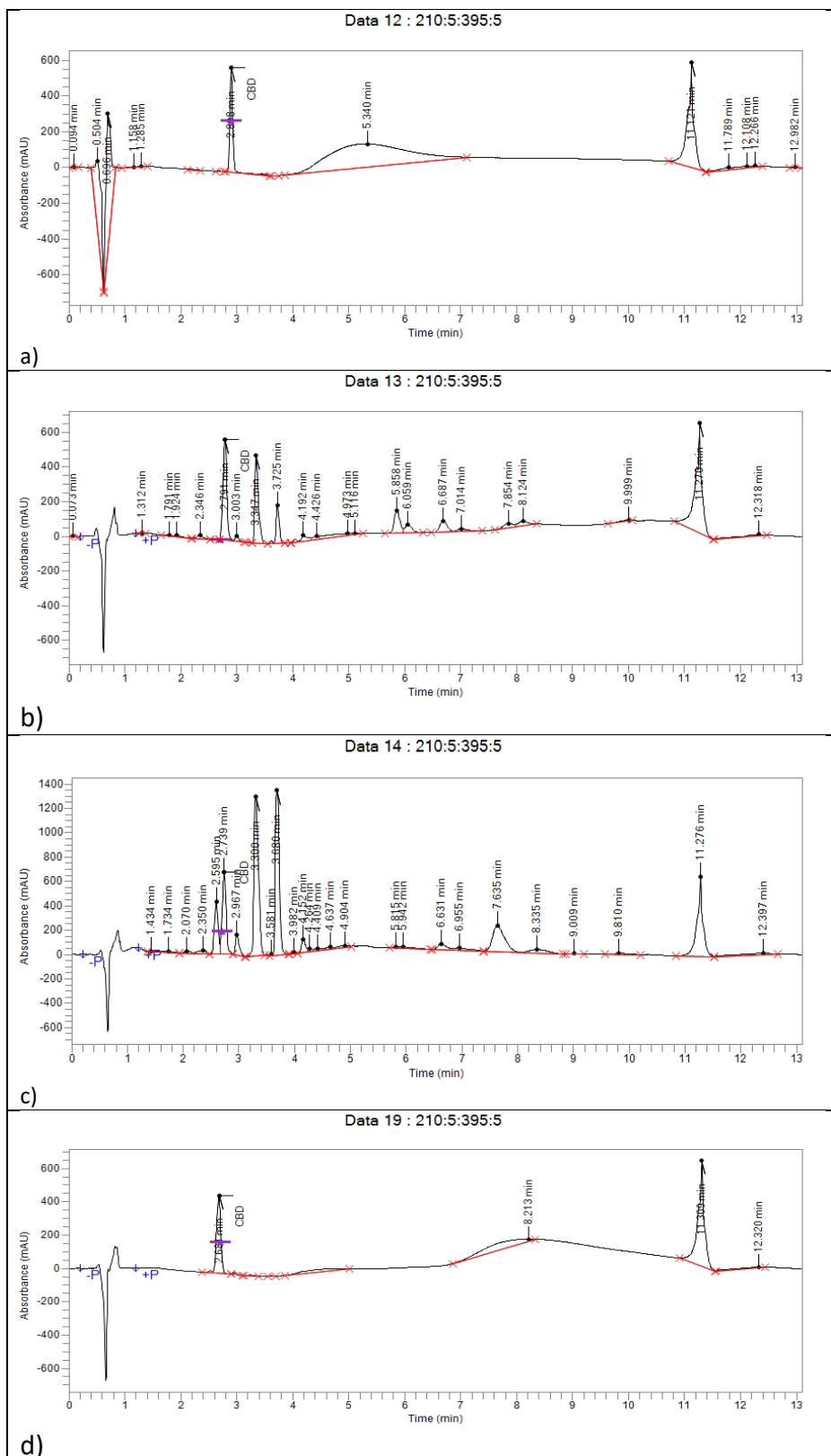


Fig. 5.2.1. Cromatograma pentru CBD a) standardul 20 ppm; b) 174D100; c) 175D100; d) 181 D4500

Analiza probelor, care au inclus opt eşantioane individuale, patru eşantioane compozite, un standard de calibrare CBD cu diluții diferite de 10 ppm și 20 ppm, s-au efectuat rapid.

Tabel 5.2.1. Cuantificarea CBD pentru probele de ulei de CBD

Nume probă	Cantitatea medie	Unitate măsură	Media (Foley-Dorsey)	Media factor	Rezoluție medie	Suprafața medie
Standard CBD 20 ppm	0,0000	µg/mL	11,217	1,407	2,27	2203748,7
CBD 174 D100	35,2245	µg/mL	7,385	1,083	1,25	2803382,6
CBD 175 D100	48,3351	µg mL	N/A	0,000	1,09	3319760,2
CBD 181 D4500	27,3011	µg/mL	6,110	0,995	0,00	2491310,3

Pentru validarea metodei vor fi necesare determinări ulterioare.

5.3. Separarea cromatografică a canabinoizilor folosind UHPLC LC/MS

Studiul a avut ca obiectiv dezvoltarea unei tehnici de analiză calitativă și cantitativă a CBD și a CBG din cele trei uleiuri comerciale de cânepă cu ajutorul unui aparat UHPLC cu detector MS.

Materiale și metode

A fost utilizat un sistem PerkinElmer® Flexar UHPLC cuplat cu un detector MS PerkinElmer® model 5500 QTRAP, utilizând o coloană PerkinElmer Brownlee Analytic DB AQ C18 (100x2,1 mm, I.D 1,9 µm) sau echivalent, eluție în gradient, debit: 400 µL/min, temperatura coloanei: 40 °C, volum de injectare: 5µL.

Rezultate și discuții

Rezultatele obținute pentru probele analizate sunt prezentate în *tabelul 5.3.1.*

Tabel 5.3.1. Rezultatele probelor 174, 175 și 181

ID Probă	174	175	181
	D100 * 1mil	D300 * 1 mil	D4500 * 1 mil
CBG	-	-	-
CBD	31,94	7,5	27,45
CBG (mg/mL)	N/A	N/A	N/A
CBD (mg/mL)	3,2	2,3	123,5

N/A: nu se aplică

S-a validat limita de detecție la nivelul 3,12 ng/mL. În privința CBG-ului, acesta nu a fost detectat, cel mai probabil din cauza diluției mari a probelor și a raportului mare CBD/CBG. De aceea aceste probe vor trebui reinjectate la diluții mai mici pentru măsurarea CBG-ului. Analiza

celor trei eșantioane de ulei cu CBD a arătat diferențe între concentrațiile declarate și rezultatele studiului preliminar.

6. Utilizarea LC-MS/MS pentru testarea pesticidelor în produse care conțin canabinoizi

În majoritatea țărilor nu este reglementată utilizarea pesticidelor în culturile de plante din familia *Cannabaceae*. În țările în care consumul de *Cannabis* este legalizat, indiferent dacă este vorba de uz medicinal sau recreativ, nu există linii directe cu privire la utilizarea pesticidelor [39]. În acest capitol am dezvoltat o tehnică pentru analiza pesticidelor folosind cromatografia lichidă de înaltă performanță în tandem cu spectrometria de masă (LC-MS/MS).

Materiale și metode

Pentru identificarea timpilor cromatografici de retenție și tranzițiilor specifice s-au utilizat trei materiale de referință certificate (MRC). Pentru analiză au fost utilizate 4 tipuri de uleiuri cu conținut de CBD, achiziționate de pe Internet, 3 variante de uleiuri comercializate conform subcapitolului 5.1.2.2. și *Specimen 137* [40].

Separarea cromatografică a fost obținută cu un sistem UHPLC Flexar, PerkinElmer MA, SUA. A fost utilizată o coloană Kinetex Biphenyl 2,6 μm , 4,6 x150 mm. Detecția prin spectrometrie de masă a fost realizată cu un instrument de tip QTRAP model 5500, SCIEX MA, SUA. Controlul instrumentelor, achiziția și procesarea datelor a fost realizată folosind programul SCIEX Analyst 2.0. [40].

Rezultate și discuții

Cromatogramele LC-MS ale uleiurilor de CBD cu spectrele pesticidelor selectate sunt prezentate în *fig. 6.1*.

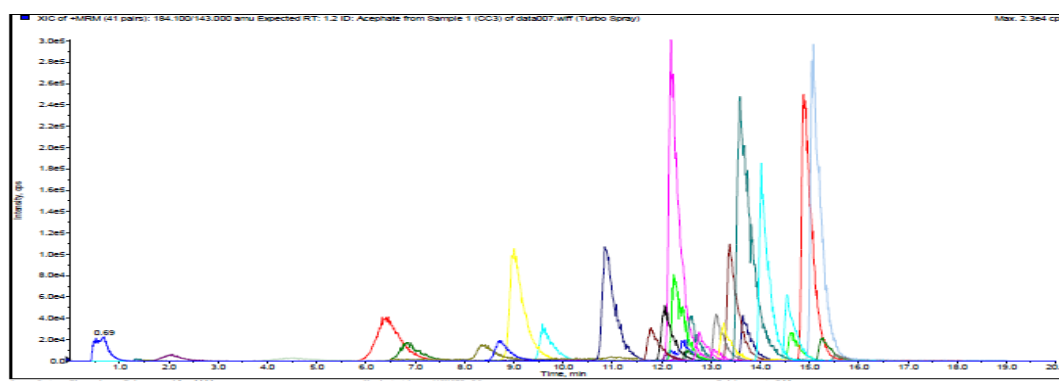


Fig. 6.1. Cromatogramele LC-MS ale uleiurilor CBD cu spectrele pesticidelor selectate soluția CC3

Ca rezultat al metodei dezvoltate, s-au obținut măsurători precise pentru 34 din MRC, care au permis o identificare a pesticidelor țintă, conform tabel 6.1.

Tabel 6.1. Parametrii MRM utilizați pentru achiziția ecuației de tranziție și regresie pentru fiecare dintre cele 34 de pesticide

ID Tranziție	Q1	Q3	Timp (min)	Ecuația de regresie	Coefficientul de corelație
Acefat	184,1	143,0	2,89	$y = 7,932720 x - 1,81$	$r = 0,9968$
Acetamiprid	223,2	126,1	4,42	$y = 2,083852 x - 3,68$	$r = 0,9968$
Aldicarb	116,0	89,1	4,23	$y = 2,52313 x - 0,749$	$r = 0,9962$
Azoxistrobin	404,1	372,1	7,13	$y = 2,785535 x - 0,67$	$r = 0,9948$
Bifenazat	301,1	170,1	6,03	$y = 3,725641 x - 0,07$	$r = 0,9956$
Boscalid	343,3	307,0	5,71	$y = 699 x + 45,8$	$r = 0,9938$
Carbaril	202,1	145,0	4,65	$y = 3,996637 x - 1,05$	$r = 0,9958$
Carbofuran	222,2	123,1	4,66	$y = 7,44522 x + 293$	$r = 0,9925$
Clorpirifos	350,0	198,0	9,00	$y = 1,329148 x - 0,017$	$r = 0,9971$
Clofentezină	303,0	138,0	8,15	$y = 3,4839778 x - 0,0807$	$r = 0,9954$
Diazinonă	305,0	169,0	6,44	$y = 1,812474 x - 0,0237$	$r = 0,9956$
Diclorvos	221,0	109,0	4,26	$y = 2,119429x - 0,485$	$r = 0,9907$
Dimetomorf	388,2	301,1	6,93	$y = 1,0673458x + 750$	$r = 0,9931$
Etoxazol	360,1	141,0	8,93	$y = 2,008411 x - 0,615$	$r = 0,9949$
Fenhexamid	302,0	97,0	5,40	$y = 1,00693 x - 0,0231$	$r = 0,9927$
Fenoxicarb	302,2	88,1	6,39	$y = 3,9773735 x - 0,141$	$r = 0,9944$
Fenpiroximat	422,0	366,1	10,88	$y = 3,1892363x - 0,98$	$r = 0,9953$
Fipronil	437,0	367,9	4,84	$y = 1,1881774 x - 0,0254$	$r = 0,9909$
Flonicamid	230,1	203,1	3,32	$y = 4,8634719x - 0,0661$	$r = 0,9934$
Fludioxonil	266,0	229,0	4,85	$y = 402 x - 0,00613$	$r = 0,9933$
Hexitiazox	353,0	228,0	10,0	$y = 7,2196881 x - 0,202$	$r = 0,9952$
Imazalil	297,1	159,2	5,52	$y = 3,0107207 x - 0,0253$	$r = 0,9954$
Imidacloprid	256,2	209,0	4,20	$y = 6,852821x + 4,09825$	$r = 0,9965$
Malation	331,0	127,0	6,12	$y = 1,520464 x - 0,024$	$r = 0,9963$
Metalaxil	280,2	220,2	5,62	$y = 8,4179348 x - 0,162$	$r = 0,9943$
Metiocarb	226,1	169,2	5,43	$y = 4,5714622 x - 0,0815$	$r = 0,9948$
Metomil	163,1	88,1	3,65	$y = 2,664425 x - 0,31$	$r = 0,9942$
Paclobutrazol	294,0	70,0	4,98	$y = 5,2763132 x - 0,157$	$r = 0,9950$
Propoxur	210,1	111,0	4,43	$y = 4,4810788 x - 1,14$	$r = 0,9947$
Spinosin A	732,6	142,1	8,0	$y = 4,1183437 x - 0,091$	$r = 0,9914$
Spinosin D	746,6	142,1	8,65	$y = 1,429841 x - 0,0136$	$r = 0,9977$
Spirotetramat	374,2	330,2	6,43	$y = 2,1850381 x - 0,0331$	$r = 0,9963$
Spiroxamină	298,4	144,2	4,98	$y = 4,632466 x - 1,88$	$r = 0,9925$
Tiametoxam	292,0	211,0	3,88	$y = 9,920947 x + 716$	$r = 0,9929$

Metoda LC-MS/MS dezvoltată poate fi utilizată pentru analiza a 34 de compuși din lista pesticidelor, pornind de la o concentrație de 0,075 ng/mL. Exprimat în unitatea de măsurare a

specimenului, domeniul acoperit este de 52,5 - 10500 ng/g. În niciuna dintre cele 4 probe de uleiuri cu conținut de CBD testate, nu au fost detectate pesticide. Pentru verificarea acurateții calibrării au fost preparate 2 soluții utilizate ca etaloane de control. Un etalon de control a avut concentrația limitei maxime admise pentru pesticide de 100 ng/g, iar al doilea a fost preparat la 25% din limita superioară a curbei de calibrare.

7. Dezvoltarea unei metode foarte rapide pentru identificare și cuantificarea a canabinoizilor din uleiul de cânepă

Acest capitol descrie dezvoltarea metodei și validarea, separarea și detectarea principalilor CB în uleiul de cânepă prin cromatografie lichidă ultra-performantă în fază inversă folosind detectorul de matrice fotodiodă (RP-UHPLC-PDA) [41].

Materiale și metodă

CB prezenți în probele analizate au fost extrași în metanol, apoi au fost injectate în sistemul UHPLC, unde CB au fost separați în urma traversării unei coloane cromatografice umplută cu fază staționară inversă de tip C18. După eluția din coloană, compușii au fost analizați utilizând detectorul PDA prin achiziția semnalului corespunzător compusului țintă la lungimea de undă de 228 nm [41].

CBi analizați cu metoda dezvoltată sunt: Canabidivarina (CBDV), CBDA, Acidul Canabigerolic (CBGA), CBG, CBD, CBN, Δ 9-THC, Δ 8-THC, CBC, Acid-A Tetrahydrocannabinolic (THCA-A) [41].

Ca material de referință s-a folosit amestec standard de 10 fitocanabinoizi în acetonitril furnizat la o concentrație de 250 μ g/mL obținut de la Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA).

S-a utilizat un sistem PerkinElmer Flexar FX-15 UHPLC, echipat cu un detector PDA, pompă cuaternară, cuptor pe coloană și autosampler. Separarea cromatografică a fost efectuată cu ajutorul unei coloane PerkinElmer Brownlee® C18, 2,7 μ m, coloană 3,0 x 150 mm (PerkinElmer, Shelton, CT, SUA).

Rezultate și discuții

Metoda dezvoltată a fost validată prin evaluarea specificității, liniarității, LOD, LOQ, acurateții și preciziei și a fost aplicată în analiza uleiurilor de cânepă. Aceasta se concentrează pe cuantificarea CB-lor majori prezenți în uleiuri, dar poate fi aplicată și pentru a verifica THC și alți CB la niveluri $>0,075\%$ pentru a evalua conformitatea cu statutul juridic propriu al fiecărei țări.

S-a obținut o bună separare între compușii matricei și analiții țintă cu o rezoluție adecvată care permite integrarea și cuantificarea corespunzătoare a fiecărui vârf de interes, așa cum se arată în *fig. 7.1*. Timpii de retenție utilizați pentru identificarea compușilor din eșantioane sunt afișați în *tabelul 7.1*.

Tabel 7.1. Timpii de retenție (Rt) ai CB-lor identificați în amestecul standard

Analit	CBDV	CBDA	CBGA	CBG	CBD	CBN	Δ 9-THC	Δ 8-THC	CBC	THCA
Rt (min)	1,87	2,36	2,46	2,59	2,71	3,53	4,05	4,15	4,54	4,65

Metoda dezvoltată în acest studiu a fost aplicată analizei calitative-cantitative a principalilor CB din probele analizate S1-S9.

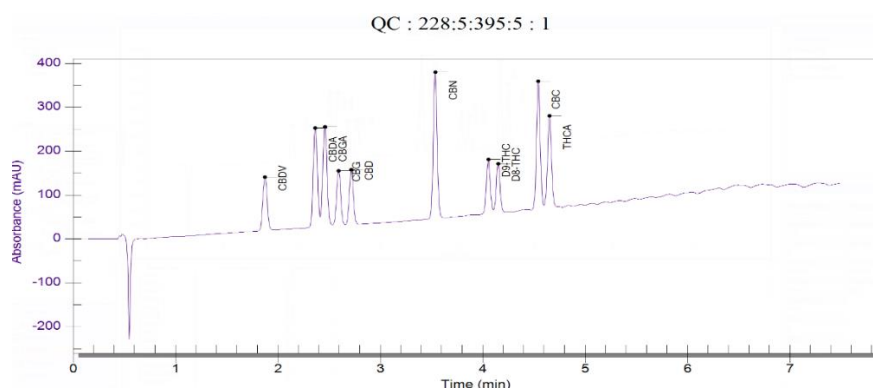


Fig. 7.1. Cromatograma a 10 CB amestec standard (16,7 μ g/mL)

După cum se vede în *tabelul 7.2.*, indicele de puritate prevăzut pentru fiecare eșantion arată că metoda dezvoltată este capabilă să separe analiții țintă din matricea eșantionului.

Valorile ridicate pentru CBC din eșantionul 2 și CBN din eșantionul 4 indică o mare probabilitate ca interferențele specifice matricei să fie prezente la acele perioade de retenție specifice.

Tabel 7.2. Indicii de puritate ai fiecărui vârf din soluțiile de probă (de 300 de ori)

Analit	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9
CBDV	1,29	1,02	N/A	1,62	1,26	N/A	4,2	1,82	1,96
CBDA	1,09	1,45	N/A	1,36	1,48	1,68	1,33	1,57	N/A
CBGA	2,07	N/A	N/A	N/A	1,46	1,52	1,67	N/A	N/A
CBG	1,23	1,05	N/A	N/A	1,09	N/A	1,41	N/A	N/A
CBD	1,29	1,06	1,12	2,21	1,13	1,09	1,29	1,33	1,07
CBN	N/A	1,68	1,42	3,37	N/A	N/A	1,19	N/A	N/A
Δ 9-THC	1,29	2,06	1,19	N/A	1,54	1,15	1,40	N/A	N/A
Δ 8-THC	N/A	N/A	N/A	1,27	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
CBC	1,14	7,23	2,15	1,39	1,05	1,05	N/A	N/A	N/A
THCA	1,42	1,19	N/A	N/A	1,15	1,21	N/A	N/A	N/A

N/A: nu se aplică

Pentru a evalua cât de apropiate sunt valorile măsurate de concentrațiile reale, precizia la 16,7 µg/mL a fost calculată ca procent de recuperare. Rezultatele indicate în *tabelul 7.3* demonstrează o bună precizie a metodei propuse la concentrația evaluată.

Tabel 7.3. Rezultate pentru precizie

Analit	Concentrația teoretică (µg/mL)	Concentrația obținută (µg/mL)	Acuratețe (medie±%DSR)
THCA	16,69	16,69	100,12 ± 0,20
		16,75	
		16,69	
CBDV	16,71	16,88	101,38 ± 0,26
		16,97	
		16,94	
CBDA	16,70	16,92	101,38 ± 0,02
		16,92	
		16,93	
CBGA	16,71	16,92	101,29 ± 0,05
		16,92	
		16,91	
CBG	16,67	16,82	101,01 ± 0,12
		16,82	
		16,85	
CBD	16,71	16,83	100,89 ± 0,15
		16,86	
		16,88	
CBN	16,79	17,13	102,12 ± 0,15
		17,17	
		17,13	
Δ9-THC	16,65	17,01	102,00 ± 0,17
		16,96	
		16,97	
Δ8-THC	16,69	16,87	101,78 ± 0,80
		16,94	
		17,13	
CBC	16,67	16,88	101,05 ± 0,18
		16,82	
		16,83	

Precizia în punctul cel mai de jos al curbei de calibrare (2,5 µg/mL) a fost evaluată pe baza concentrației raportate de RSD%. Metoda s-a dovedit a fi reproductibilă, cu o valoare RSD de 1,54% pentru CBDV; 0,45% pentru CBDA; 0,72% pentru CBGA; 1,88% pentru CBG; 1,63% pentru CBD%; 1,14% pentru CBN; 3,77% pentru Δ9-THC; 4,25% pentru Δ8-THC;

3,38% pentru CBC și 2,79% pentru THCA. Aceste rezultate indică faptul că metoda este precisă la concentrația evaluată.

Curbele de etalonare au fost liniare în intervalul de concentrație de 2,5-50 $\mu\text{g/mL}$ (0,75-15 mg/g de la diluția de 3000 de ori sau de 7,5-150 mg/g pentru diluția de 300 de ori, în unități de probă) pentru fiecare compus analizat. Curba de calibrare a prezentat o regresie liniară bună și s-a obținut o valoare mai mare de 0,999 pentru R^2 (coeficient de determinare) pentru toți CB. Au fost efectuate câte 3 injecții pentru fiecare dintre cele 6 puncte de pe curbă, de aici se poate extrage R^2 și ecuația dreptei (tabel 7.4).

Tabel 7.4. Rezultate pentru liniaritate, ecuație de regresie și R^2 pentru fiecare analit

Analit	Ecuația de regresie	R^2
CBDV	$y = 22,747x + 11,129$	0,9999
CBDA	$y = 37,845x + 26,076$	0,9997
CBGA	$y = 39,081x + 26,087$	0,9996
CBG	$y = 21,367x + 11,536$	0,9999
CBD	$y = 21,100x + 10,921$	0,9998
CBN	$y = 47,883x + 51,955$	0,9990
$\Delta 9$ -THC	$y = 18,904x + 14,026$	0,9997
$\Delta 8$ -THC	$y = 17,184x + 10,464$	0,9998
CBC	$y = 44,184x - 6791,7$	0,9998
THCA	$y = 34,511x - 7682,5$	0,9997

LOD și LOQ au fost estimate pe urma datelor obținute pentru liniaritate. S-a constatat că principali CB de interes pot fi detectați la o concentrație de 0,22 mg/g pentru $\Delta 9$ -THC (0,022%) și 0,19 mg/g pentru CBD (0,019%) și pot fi ușor cuantificați la 0,68 mg/g pentru $\Delta 9$ -THC (0,068%) și 0,58 mg/g (0,058%) pentru CBD. Metoda propusă oferă suficientă sensibilitate pentru $\Delta 9$ -THC, de aproximativ 10 ori mai mică decât limita legală impusă în unele țări (0,2%). Limitele pentru alți CB care pot fi analizate cu această metodă sunt afișate în tabelul 7.5.

Tabel 7.5. Limita de detecție (LOD) și limita de cuantificare (LOQ), determinată de curbele de etalonare în unități standard ($\mu\text{g/mL}$) și unități de probă (mg/g)

Analit	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)	LOD (mg/g)	LOQ (mg/g)
CBDV	0,70	2,12	0,21	0,64
CBDA	1,69	5,13	0,51	1,54
CBGA	1,78	5,39	0,53	1,62
CBG	0,67	2,03	0,20	0,61
CBD	0,63	1,92	0,19	0,58
CBN	3,31	10,04	0,99	3,01
$\Delta 9$ -THC	0,75	2,27	0,22	0,68
$\Delta 8$ -THC	0,82	2,50	0,25	0,75
CBC	1,30	3,93	0,39	1,18
THCA	1,84	5,59	0,55	1,68

Principalele componente CBD și CBDA au fost găsite în toate probele, cu excepția a două pentru CBDA într-un interval de concentrație de 1,42 până la 166,32 mg/g pentru CBD și 1,62 până la 18,80 mg/g pentru CBDA. Alți CB prezenți în uleiuri au fost CBDV (2,52 până la 14,70 mg/g), CBGA, a fost detectat în două probe (1,19 până la 2,64 mg/g) și ca urme în celelalte două probe, CBG, a fost cuantificat într-o singură probă (2,13 mg/g) și detectat în alte trei, CBN (4,75 mg/g), a fost găsit într-o probă și identificat în alte trei, Δ^9 -THC (1,06 până la 1,35 mg/g), Δ^8 -THC, a fost detectat numai într-o singură probă în cantitate prea mică pentru a fi cuantificată și CBC, a fost prezent în șase probe la o concentrație mai mică, sugerând necesitatea de a reduce pliul de diluție pentru a fi cuantificat și THCA (1,80-2,75 mg/g).

8. Evaluarea efectului anticonvulsivant a trei uleiuri de cânepă cu concentrații diferite de canabidiol

Cercetarea efectuată în acest capitol a avut următoarele obiective:

- Validarea unei metode pentru inducerea convulsiilor la șoareci albi din sușa NMRI, prin aplicarea unui stimul convulsivant la nivel auricular. Validarea a avut rolul de a stabili caracteristicile optime ale șocului electric administrat.
- Implementarea modelului experimental validat pentru determinarea efectului anticonvulsivant la șoareci albi din sușa NMRI pentru tratamentul acut cu 3 uleiuri vegetale din *Cannabis sativa* având concentrații diferite în CB.

Materiale și metode

Toate procedurile experimentale au fost efectuate respectând normele de bioetică în cercetarea pe animale de experiență în scop științific, conform Legii 43/2014 privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice și Directivei 2010/63/UE a Parlamentului European și a Consiliului din 22 septembrie 2010, referitoare la protecția animalelor folosite în scopuri experimentale sau în alte scopuri științifice. Protocolul experimental a fost aprobat de Comisia de Bioetică a Facultății de Farmacie, Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila” din București, România.

Experimentul s-a desfășurat în 2 etape. În prima etapă a fost evaluat pragul convulsivant la diferite intensități ale stimulului electric aplicat la nivel auricular, în vederea validării modelului experimental. A doua etapă a presupus evaluarea răspunsului animalelor de laborator la tratamentul acut cu diferite uleiuri de cânepă, administrate înaintea aplicării stimulului convulsivant.

Rezultate și discuții

În acest experiment a fost demonstrat efectul anticonvulsivant al produselor testate, la doze calculate prin utilizarea concentrației reale, determinată în cercetările anterioare. Efectul anticonvulsivant a fost semnificativ pentru uleiurile de cânepă de 2,5% CBD, respectiv 8% CBD, efectul fiind aproape similar cu cel produs de fenobarbital. Cele două uleiuri au prevenit apariția letalității, iar frecvența apariției convulsiilor a fost mai redusă față de cea observată la lotul martor.

Validarea metodei pentru inducerea convulsiilor la șoarece

Atât valorile maselor corporale ale animalelor de experiență, cât și numărul de convulsii înregistrat pentru fiecare lot au prezentat o distribuție normală.

Rezultatele experimentale au evidențiat faptul că menținând la valori constante durata șocului (3 s), durata trenului de impulsuri (0,5 s), frecvența (100 pulsuri/s) și variind numai intensitatea curentului electric 15 – 18 mA, nu se modifică numărul de convulsii tonico-clonice semnificativ statistic. Ținând cont de aceste rezultate, în testele ulterioare a fost aleasă intensitatea de 15 mA pentru a determina influența uleiurilor vegetale de cânepă în tratament acut asupra convulsiilor induse prin aplicarea stimulului electric.

Evaluarea efectului anticonvulsivant al uleiurilor de cânepă în tratament acut la șoarece

Valorile greutateilor au prezentat o distribuție normală și nu au existat diferențe semnificative statistic între mediile celor 5 loturi (ANOVA, $p = 0,9842$).

În *tabelul 8.1.* este redată semnificația statistică privind durata convulsiilor apărute după tratamentul acut cu apă distilată, fenobarbital și 3 concentrații diferite de uleiuri de cânepă. Testul ANOVA a arătat o diferență semnificativă între loturi ($p < 0,0001$, *fig. 8.1.*). Administrarea uleiurilor conținând doze de 25,77 mg/kg și 47 mg/kg au produs scăderea duratei convulsiilor cu 85, respectiv 87%, efectele prezentând semnificație statistică ($p = 0,0049$; $p = 0,0014$). Șoarecii din lotul martor, tratați cu apă distilată, au avut o frecvență de apariție a convulsiilor de 100% (*fig. 8.2.*). Șoarecii tratați cu substanța de referință, fenobarbital, au avut o frecvență a convulsiilor de doar 20%. De asemenea, șoarecii tratați cu 15 mg/kg CBD au avut o frecvență de apariție a convulsiilor de 100%, similar lotului martor, iar loturile tratate cu 25,77 mg/kg și 47 mg/kg CBD au prezentat o frecvență a convulsiilor de 40, respectiv 30%. Testul Chi pătrat a demonstrat o diferență semnificativă statistic între fenobarbital și lotul martor privind incidența apariției convulsiilor ($p = 0,0003$). Reducerea frecvenței apariției convulsiilor pentru șoarecii tratați cu 25,77 mg/kg și 47 mg/kg CBD a fost, de asemenea, semnificativă statistic ($p = 0,0034$; $p = 0,001$).

Efectul letal al convulsiilor administrate prin electroșoc a fost întâlnit la 30% dintre animalele din lotul martor (*fig. 8.3.*). Nu a fost observată letalitatea în rândul șoarecilor tratați cu fenobarbital, 25,77 mg/kg CBD și 47 mg/kg CBD, însă testul Chi pătrat nu a arătat o semnificație statistică ($p = 0,0603$). Pe de altă parte, lotul tratat cu 15 mg/kg CBD a prezentat o letalitate de 10%.

Tabel 8.1. Semnificația statistică a rezultatelor privind durata medie a convulsiilor pe lot experimental, frecvența apariției convulsiilor și letalitatea, comparativ cu lotul martor

Comparație vs. martor (p)	Fenobarbital	CBD1 (15 mg/kg)	CBD2 (25,77 mg/kg)	CBD3 (47 mg/kg)
post test Bonferroni	0,0005	> 0,05	0,0049	0,0014
Chi pătrat (convulsii %)	0,0003	-	0,0034	0,001
Chi pătrat (letalitate %)	-	0,2636	0,0603	0,0603

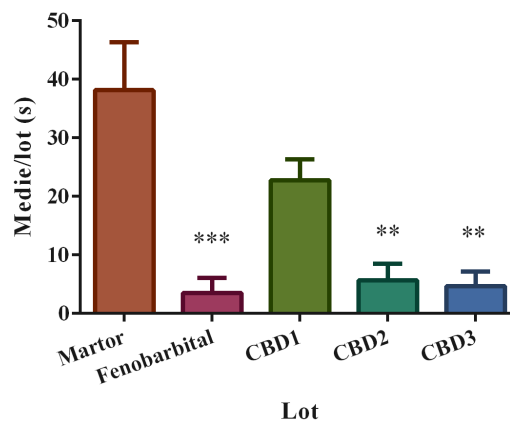


Fig. 8.1. Variația duratei convulsiilor tonico-clonice induse prin electroșoc în funcție de tratament (medie \pm SEM) ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, unde * $p < 0,05$.

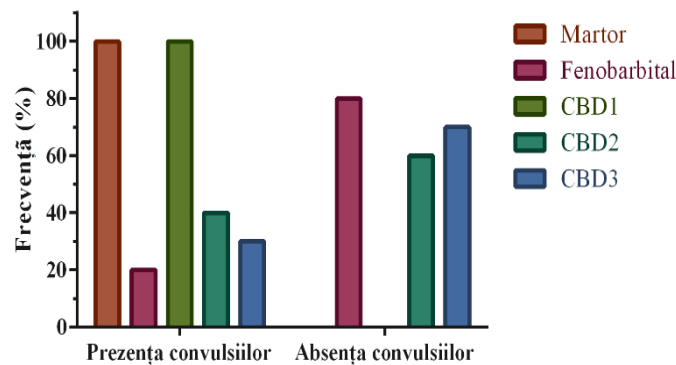


Fig. 8.2. Frecvența apariției convulsiilor tonico-clonice induse prin electroșoc în funcție de tratament

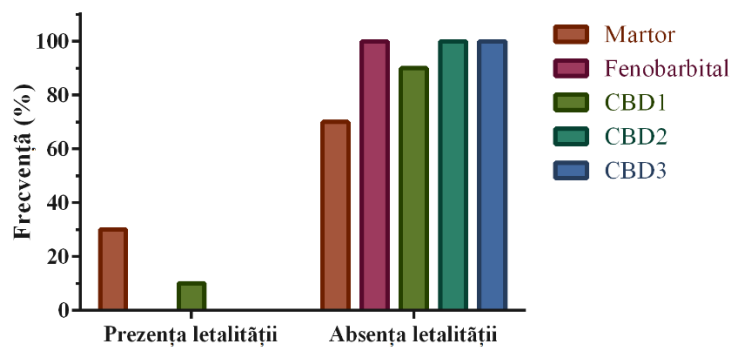


Fig. 8.3. Frecvența letalității convulsiilor tonico-clonice induse prin electroșoc în funcție de tratament

O intensitate a curentului electric de 15 mA a produs un efect convulsivant similar cu intensități mai mari. Astfel, efectul anticonvulsivant al unor uleiuri de cânepă a fost evaluat inducând convulsii tonico-clonice prin administrarea unui stimul electric cu intensitatea de 15 mA. A fost observat un efect anticonvulsivant semnificativ pentru uleiurile de cânepă de 2,5% CBD, respectiv 8% CBD, efectul fiind aproape similar cu cel produs de fenobarbital.

De asemenea, pentru uleiurile de 2,5% și 8% nu a fost observat un efect letal, iar frecvența apariției convulsiilor a fost mai redusă decât cea observată la lotul martor.

9. Evaluarea efectului antihiperalgic a trei uleiuri de cânepă cu concentrații diferite de canabidiol într-un model de durere neuropată la șobolan

Obiectivul experimentului a constat în inducerea durerii neuropate la șobolani, utilizând doze mici de paclitaxel intraperitoneal și evaluarea efectului antihiperalgic în durerea neuropată pentru 3 uleiuri vegetale de cânepă din comerț, administrate în cantitate mică. Evaluarea eficacității acestora s-a făcut prin utilizarea ca substanță de referință a gabapentinului.

Materiale și metode

Au fost alcătuite 6 loturi experimentale (6 animale/lot) și au fost administrate următoarele substanțe timp de 4 zile consecutive [42]:

- lot 1 (martor, M): ser fiziologic 0,1 mL/100 g i.p. și apă distilată 0,1 mL/100 g p.o.;
- lot 2 (PTX): paclitaxel 2 mg/kg i.p. și apă distilată 0,1 mL/100 g p.o.;
- lot 3 (referință, PTX+GPN): paclitaxel 2 mg/kg i.p. și gabapentin 60 mg/kg p.o.;
- lot 4 (PTX+CBD1): paclitaxel 2 mg/kg i.p. și ulei de cânepă 1,35% (0,75 mg/kg CBD) p.o.;

- lot 5 (PTX+CBD2): paclitaxel 2 mg/kg i.p. și ulei de cânepă 2,5% (1,29 mg/kg CBD) p.o.;
- lot 6 (PTX+CBD3): paclitaxel 2 mg/kg i.p. și ulei de cânepă 8% (2,35 mg/kg CBD) p.o.;

Tratamentul cu doze mici de paclitaxel a avut rolul de a induce neuropatia dureroasă la șobolani. După cele 4 zile, tratamentul cu paclitaxel a fost întrerupt, iar apa distilată, gabapentin și uleiurile de cânepă au fost administrate în continuare timp de 14 zile în vederea evaluării efectului antihiperalgic al substanțelor administrate, comparativ cu martorul. Hipersensibilitatea mecanică și la stimul rece au fost evaluate înainte de începerea tratamentului (testare inițială pentru evaluarea omogenității dintre loturile experimentale, ziua 0), în a patra zi de tratament cu paclitaxel (la o oră după administrare, ziua 4), la o săptămână după întreruperea tratamentului cu paclitaxel (ziua 11), respectiv la două săptămâni (ziua 18).

Rezultate și discuții

Animalele de experiență au fost cântărite o dată la 3 zile, nu au fost observate diferențe semnificative statistic între loturile experimentale.

Hipersensibilitatea tactilă

Alodinia mecanică a fost determinată la șobolani în condiții fiziologice și la 4, 11, respectiv 18 zile de tratament. Nu s-au observat diferențe semnificative statistic între grupuri în cadrul testării inițiale, înainte de administrarea substanțelor (*fig. 9.1.*, ANOVA, $p > 0,05$).

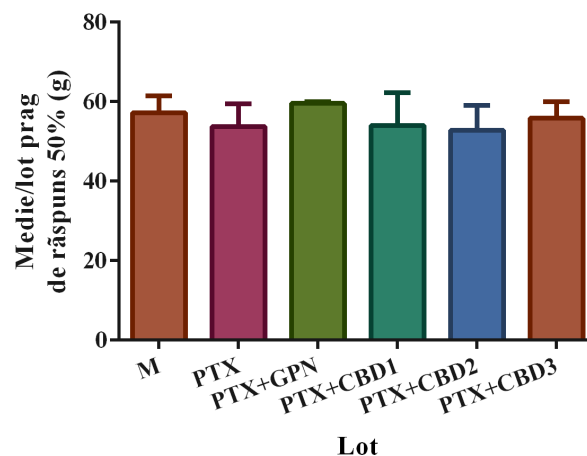


Fig. 9.1. Variația pragului de răspuns 50% în funcție de lot (medie \pm SEM), determinat utilizând filamentele von Frey, la momentul inițial

După administrarea celor 4 doze consecutive de paclitaxel, șobolanii au prezentat un prag de răspuns 50% mediu cu 26% mai redus, comparativ cu lotul martor, însă diferența nu a fost semnificativă statistic (*fig. 9.2.*, ANOVA, $p > 0,05$). De asemenea, tratamentul simultan cu gabapentin a produs o creștere a acestui prag de răspuns cu 40% față de lotul tratat cu paclitaxel

și apă distilată (ANOVA, $p > 0,05$). Doar doza de 2,35 mg/kg CBD a produs o creștere a pragului de răspuns comparativ cu lotul tratat cu paclitaxel și apă, cu 23%, rezultatul fiind însă ne semnificativ statistic (ANOVA, $p > 0,05$).

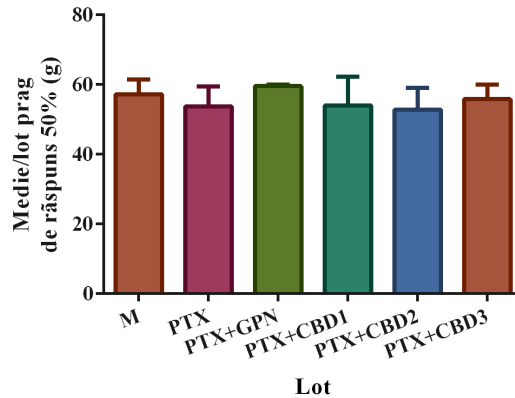


Fig. 9.2. Variația pragului de răspuns 50% în funcție de lot (medie \pm SEM), determinat utilizând filamentele von Frey, în ziua 4 (după 4 doze de paclitaxel)

Hipersensibilitatea la stimul rece

Hipersensibilitatea la stimulul rece a fost evaluată utilizând testul de evaporare a acetonei la șobolani în condiții bazale și la 4, 11, respectiv 18 zile de tratament. Modelul experimental presupune aplicarea unei picături de acetonă la baza lăbuțelor posterioare cu o seringă, evaporarea acesteia producând o stimulare termică rece, dureroasă [43].

Analiza statistică nu a relevat diferențe semnificative între loturi în cadrul testării inițiale, înainte de inducerea neuropatiei (*fig. 9.3.*, ANOVA, $p > 0,05$), grupurile experimentale fiind omogene din punctul de vedere al sensibilității la stimul rece.

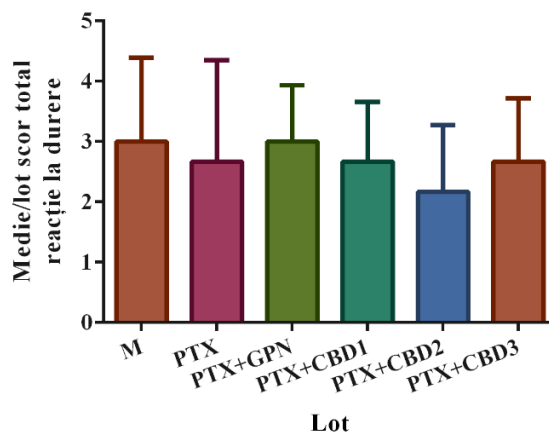


Fig. 9.3. Variația scorului total al reacției la durere în funcție de lot (medie \pm SEM), determinat utilizând testul evaporării acetonei, la momentul inițial

După cele 4 zile de tratament cu paclitaxel, șobolanii au avut un scor total al reacției la durere cu 138% mai mare, comparativ cu lotul martor, însă creșterea sensibilității la stimul rece nu a fost semnificativă statistic (*fig. 9.4.*, ANOVA, $p > 0,05$). Asocierea de gabapentin a redus hipersensibilitatea cu 63% față de lotul tratat cu paclitaxel și apă distilată, dar rezultatul nu a fost semnificativ statistic (ANOVA, $p > 0,05$).

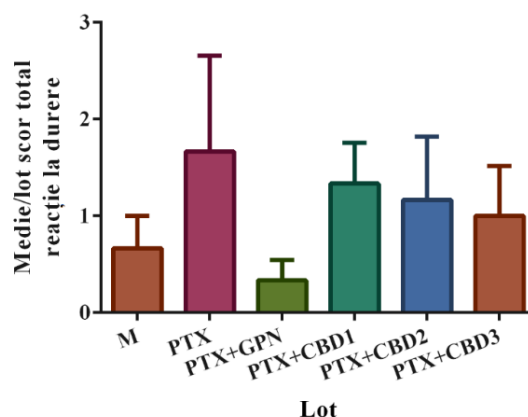


Fig. 9.4. Variația scorului total al reacției la durere în funcție de lot (medie \pm SEM), determinat utilizând testul evaporării acetonei, în ziua 4 (după 4 doze de paclitaxel)

La o săptămână de la sistarea tratamentului cu paclitaxel, hipersensibilitatea termică la stimul rece a fost relativ mai mare, șobolanii prezentând un scor total al reacției la durere cu 150% mai mare față de lotul martor, însă variația nu a fost semnificativă statistic (*fig. 9.5.* ANOVA, $p > 0,05$). Administrarea concomitentă de gabapentin a condus la scăderea sensibilității termice cu 80%, iar tratamentul cu CBD 0,75, 1,29 și 2,35 mg/kg a redus sensibilitatea la stimul rece cu 20, 30, respectiv 40%, comparativ cu lotul tratat cu paclitaxel și apă (ANOVA, $p > 0,05$).

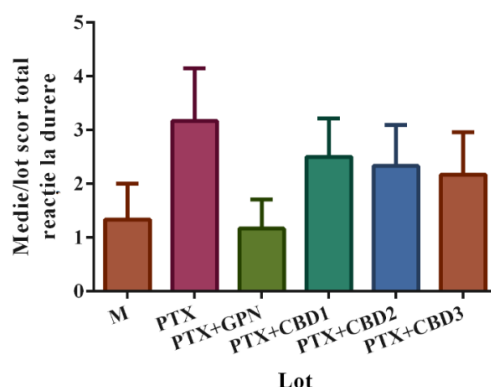


Fig. 9.5. Variația scorului total al reacției la durere în funcție de lot (medie \pm SEM), determinat utilizând testul evaporării acetonei, în ziua 11 (7 zile după ultima doză de paclitaxel)

Rezultatele cercetării au evidențiat următoarele aspecte:

- tratamentul concomitent cu 60 mg/kg gabapentin a prevenit dezvoltarea neuropatiei, efectele antihiperalgice și antialodinic fiind semnificative statistic după 18 zile de tratament;
- dozele de 0,75 și 1,29 mg/kg CBD au avut efecte similare privind hipersensibilitatea tactilă, iar efectul antialodinic nu a fost semnificativ statistic în acest caz;
- doza de 2,35 mg/kg CBD a redus semnificativ statistic alodinia mecanică după 18 zile de tratament;
- în ceea ce privește hipersensibilitatea la stimulul rece, efectul uleiului de cânepă a fost doză-dependent, iar variația în funcție de doză a fost însă relativ mică;
- toate cele 3 doze de CBD au redus semnificativ statistic hipersensibilitatea termică la finalul tratamentului.

10. Obținerea de membrane prin combinații ale uleiului cu canabidiol și biopolimerul chitosan

Scopul acestui studiu preliminar a fost încorporarea uleiului cu CBD ca și componentă activă în filmele pe bază de CS, iar membranele obținute să fie analizate pentru a identifica o aplicație farmaceutică.

Materiale și metodă

S-au obținut în premieră absolută membrane de chitosan standard solubilizat în acid acetic și acid lactic cu ulei de CBD, concentrație 1350 mg/100mL, CS standard, Sigma Aldrich, Germania, (CAS 9012-76-4), N-metil pirolidonă (NMP) și soluție tampon de fosfat salin (PBS).

Analizele acestora au fost efectuate prin prisma caracteristicilor morfologice, evaluări macroscopice și microscopice, precum și a gradului de hidratare. Membranele au fost, de asemenea, analizate din punct de vedere al opacității / transparenței (%).

Rezultate și discuții

Motivul alegerii biopolimerului CS în cadrul acestui studiu doctoral s-a datorat faptului că este necostisitor și ușor de procurat din surse naturale regenerabile (chitina din creveți, languste, crabi sau homari).

Acumularea uleiului între pereții membranelor de CS se datorează interacțiunilor de natură chimică, posibile între matricea biopolimerului și componentele uleiului cu CBD. În imagini suprafața și secțiunea transversală a membranei de CS este compactă și regulată, fără pori mari, caracteristici pentru un compus compact cu lanțuri polimerice ordonate (*fig. 10.1.*)

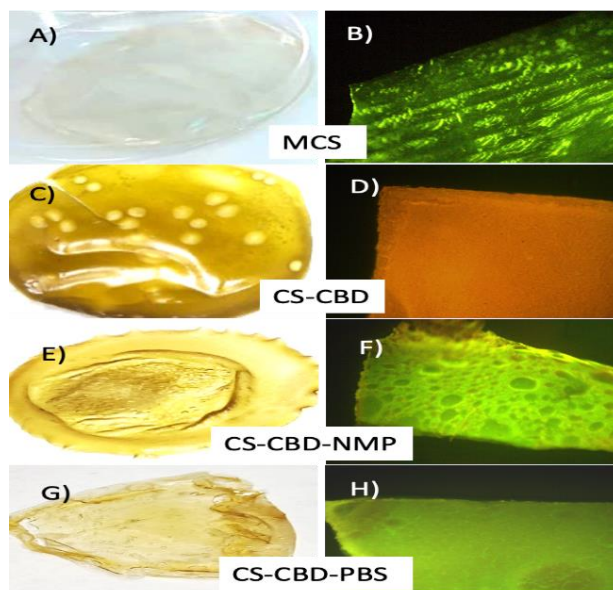


Fig. 10.1-Aspectul macroscopic al membranelor (A, C, E, G) și detaliile structurale microscopice și emisiile de fluorescență, (B, D, F, G) mărire x100.

Dispoziția matricei de CS este uniformă și imaginile demonstrează că a înglobat în interior uleiul CBD.

La expunerea membranelor la soluția tampon PBS s-a observat că membranele își schimbă capacitatea de a îngloba soluții saline. La unele dintre membranele testate, creșterea treptată a volumului a dus la destabilizarea structurii matricei

Studiul realizat a permis obținerea unor combinații prin adăugarea de ulei CBD în soluții de CS, fiind realizate 3 tipuri de filme membranare (CBD:CS), CS1% în acid acetic 1% cu ulei CBD, CS1% în acid lactic 1% cu ulei CBD :NMP (1:1) și CS1% în acid lactic 1% cu ulei CBD, analizate și comparate cu o membrană de referință de CS1%, în acid acetic 1%. Aceste rezultate oferă date preliminare care vor fi utilizate pentru aplicații biomedicale.

11. Evaluarea efectului unei emulsii cu conținut de canabidiol într-un model animal de inflamație cronică

Obiectivul studiului a constat în evaluarea efectelor analgezic și antiinflamator al unei emulsii cu conținut în CBD după administrare locală, într-un model de inflamație cronică la șobolani, indusă de administrarea adjuvantului Freund intraplantar.

Materiale și metode

Experimentul a fost realizat pe 32 șobolani masculi cu vârste cuprinse între 12 și 15 săptămâni, sușa Wistar, proveniți de la biobaza Universității de Medicină și Farmacie „Carol Davila” din București. Animalele au fost cazate în cuști de plexiglas, cu acces liber la hrană și

apă. Temperatura și umiditatea relativă au fost menținute constante pe parcursul experimentului (21-24 °C, 45-50%), fiind înregistrate cu ajutorul unui higrotermometru. Șobolanii au avut o masă corporală medie de $410 \pm 33,14$ g.

Animalele de laborator au fost împărțite în 4 loturi experimentale egale (n=8) și au fost supuse următoarelor proceduri [44]:

1. Efectuarea testelor (sensibilitatea la stimul nociceptiv termic, determinarea volumelor labelor posterioare) în săptămâna 0, înainte de tratament.

2. Inducerea inflamației cronice prin administrarea intraplantară în laba posterioară dreaptă a agentului inflamator (adjuvant Freund complet):

- Lot 1 (martor, M) – 0,1 mL ser fiziologic;
- Lot 2 (adjuvant Freund complet-AFC) – 0,1 mL adjuvant Freund complet;
- Lot 3 (referință, AFC și hidrocortizon-HCZ; AFC+HCZ) – 0,1 mL adjuvant Freund complet;
- Lot 4 (AFC și emulsie CBD, AFC+CBD) – 0,1 mL adjuvant Freund complet.

3. Repetarea testelor la o săptămână de la inducerea inflamației.

4. Inițierea tratamentului local, la nivelul labei posterioare drepte, o dată pe zi:

- Lot 1 (martor, M) – masare fără tratament;
- Lot 2 (adjuvant Freund complet-AFC) – masare fără tratament;
- Lot 3 (AFC și hidrocortizon-HCZ, AFC+HCZ) – 2 mL unguent hidrocortizon 10 mg/g, masare;
- Lot 4 (AFC și emulsie CBD, AFC+CBD) – 2 mL emulsie CS-PBS și CBD în raport volumetric (v/v)= 1: 4, masare.

5. Repetarea testelor la o săptămână după inițierea tratamentului (2 săptămâni de la inducerea inflamației).

Rezultate și discuții

Sensibilitatea dureroasă la stimul termic a fost determinată la șobolani înainte de inducerea inflamației și la 1, respectiv 2 săptămâni de la administrare agentului inflamator.

La o săptămână de la inducerea inflamației se observă variații procentuale semnificative ale volumelor membrelor posterioare drepte pentru toate cele 3 loturi la care s-a administrat agentul inflamator (*fig. 11.1.*). Astfel, volumele labelor posterioare au crescut față de lotul martor cu 1112% pentru lotul AFC (ANOVA, $p < 0,0001$), 1016% pentru lotul AFC+HCZ (ANOVA, $p < 0,001$), respectiv 1417% pentru lotul AFC+CBD (ANOVA, $p < 0,0001$).

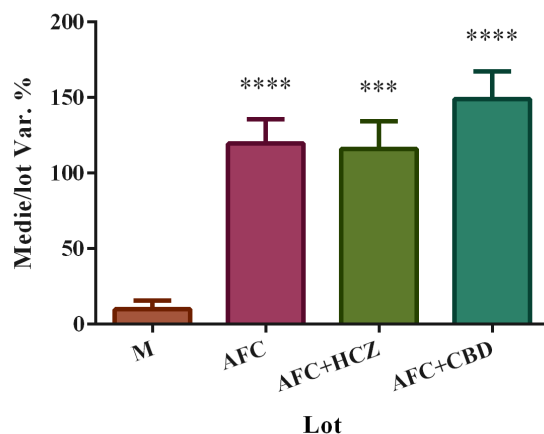


Fig. 11.1. Variația volumului labelor posterioare drepte (medie \pm SEM) în funcție de lot, la 1 săptămână după inducerea inflamației, determinat prin metoda pletismometrică

La 2 săptămâni după inducerea inflamației, variația procentuală a volumelor labelor șobolanilor la care s-a administrat doar AFC a fost cu 360% mai mare, comparativ cu lotul martor, diferența fiind semnificativă statistic (Kruskal-Wallis, $p < 0,001$) (fig. 11.2.).

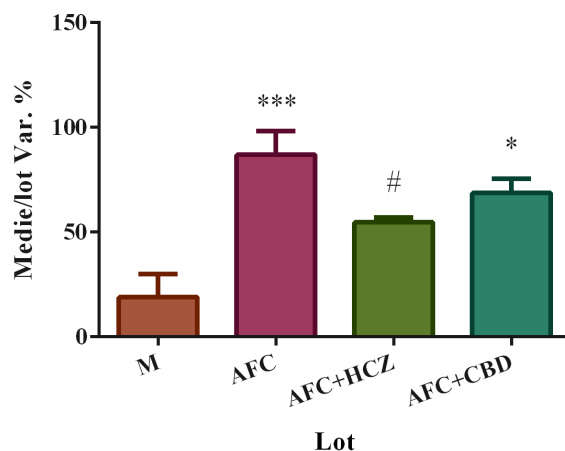


Fig. 11.2. Variația volumului labelor posterioare drepte (medie \pm SEM) în funcție de lot, la 2 săptămâni după inducerea inflamației, determinat prin metoda pletismometrică; ** $p < 0,001$, *** $p < 0,001$ vs. M, # $p < 0,05$ vs. AFC

Tratamentul local cu HCZ a condus la o variație a volumelor cu 37% mai mică comparativ cu lotul AFC, această diferență fiind semnificativă statistic (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$), fiind astfel evidențiat efectul antiinflamator. Deși tratamentul local cu emulsia de CBD a produs o scădere a variației volumelor cu 21% față de lotul AFC, diferența nu a fost semnificativă statistic (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$). De asemenea, lotul tratat cu CBD a avut variații ale

volumelor labelor posterioare drepte semnificativ mai mari comparativ cu lotul martor (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$).

Efectul antiinflamator al emulsiei de CBD a fost investigat utilizând metoda pletismometriei și a demonstrat că tratamentul local cu HCZ a ameliorat semnificativ edemul indus de adjuvant, iar tratamentul local cu emulsia de CBD-CS a produs o ameliorare modestă, ne semnificativă statistic a edemului. De asemenea, efectul analgezic evaluat în testul hot-plate, a hidrocortizonului și a emulsiei cu CBD-CS administrate topic, a fost ne semnificativ statistic. S-a concluzionat că ar fi necesară continuarea experimentului fie cu concentrații mai mari de substanță activă, sau aplicarea topică repetată, de mai multe ori pe zi, fie administrarea sistemică a emulsiei cu CBD-CS pentru apariția unui efect semnificativ.

Concluzii și contribuții personale

Plecând de la datele din literatură am analizat conținutul în CB a uleiurilor achiziționate pe Internet, utilizând diferite metode cromatografice, începând cu TLC și continuând cu verificarea performanțelor analitice ale metodei UHPLC-PDA, după care am folosit tehnica LC-MS/MS.

Cercetările ulterioare au vizat determinarea conținutului în pesticide a uleiurilor analizate. S-a dezvoltat o metodă folosind tehnica LC-MS/MS pentru detectarea reziduurilor de pesticide din uleiurile cu conținut de CBD, achiziționate online. Metoda LC-MS/MS dezvoltată poate fi utilizată pentru analiza a 34 de compuși din lista pesticidelor, pornind de la o concentrație de 0,075 ng/mL. Exprimat în unitatea de măsurare a specimenului, domeniul acoperit este de 52,5 - 10500 ng/g. Avantajul acestui tip de preparare a probei și a metodei dezvoltate este simplitatea, metoda este economică, nu are pierderi de analit.

Metoda rapidă dezvoltată pentru determinarea a 10 CB a fost validată prin evaluarea specificității, liniarității, LOD, LOQ, acurateții și preciziei și a fost aplicată cu succes în analiza uleiurilor de cânepă. Metoda descrisă s-a concentrat pe cuantificarea CB-lor majori prezenți în uleiuri, dar poate fi aplicată și pentru a verifica THC-ul și alți CB la niveluri $>0,075\%$ pentru a evalua conformitatea cu statutul juridic propriu fiecărei țări. Cele două diluții de 300 și 3000 permit ca o gamă largă de probe necunoscute să fie analizate în intervalul de concentrație al metodei. În cazul în care metoda propusă este destinată a fi utilizată pentru controlul calității produselor finite, diluția probei poate fi, de asemenea, optimizată în scopul dorit.

S-a efectuat un screening farmacologic privind activitatea anticonvulsivantă și activitatea în tratamentul durerii neuropate. Efectul anticonvulsivant al uleiurilor de cânepă a fost evaluat

inducând convulsii tonico-clonice prin administrarea unui stimul electric cu intensitatea de 15 mA. A fost observat un efect anticonvulsivant semnificativ pentru uleiurile de cânepă de 2,5% CBD, respectiv 8% CBD, efectul fiind comparabil cu cel produs de fenobarbital. Rezultatele experimentale au evidențiat faptul că nu a apărut efect letal pentru uleiurile de 2,5% și 8%, iar frecvența apariției convulsiilor a fost mai redusă decât cea observată la lotul martor. Deși uleiul cu o concentrație de 8% CBD a produs cel mai bun efect, rezultatele obținute în urma administrării uleiului cu o concentrație de 2,5% au fost similare.

Evaluarea activității CB-lor în durerea neuropată s-a realizat după ce prealabil am instituit un tratament de 4 zile consecutiv cu paclitaxel la șobolan în doză de 2 mg/kg, care a produs o neuropatie evidențiată prin alodinie mecanică și hipersensibilitate termică la stimul rece. Tratamentul concomitent cu 60 mg/kg gabapentin a prevenit dezvoltarea neuropatiei, efectele antihiperalgice și antialodinice fiind semnificative statistic după 18 zile de tratament. Atât în cazul sensibilității tactile, cât și a celei termice, gabapentin a prezentat efecte superioare celei mai mari doze de ulei utilizat în cadrul experimentului.

Scopul obținerii membranelor cu CS, un biopolimer cu aplicații biomedicale, a fost acela de a încorpora uleiul cu CBD ca și componentă activă în filmele pe bază de CS, iar apoi membranele obținute să fie analizate pentru a identifica o aplicație farmaceutică. Analizele acestora au fost efectuate din punct de vedere al caracteristicilor morfologice (evaluări macroscopice și microscopice precum și gradul de hidratare. Au fost analizate și din punct de vedere al opacității/transparenței. Spectrele lor UV-Vis au completat studiul preliminar. Membranele obținute au potențialul de a deveni o tehnologie unică de livrare pentru a servi piața farmaceutică pe scară largă.

Apreciez că elementele care susțin contribuțiile inovatoare ale tezei de doctorat sunt următoarele:

1. Dezvoltarea unei metode folosind tehnica LC-MS/MS pentru detectarea reziduurilor de pesticide din uleiurile cu conținut de CBD.
2. Dezvoltarea, validarea și explicarea pas cu pas a unei metode rapide și simple folosind sistemul UHPLC-UV pentru identificarea și cuantificarea principalilor CB din uleiuri vegetale, metodă ce poate fi folosită și pentru alte produse vegetale.
3. Evidențierea eficacității uleiurilor cu conținut variabil în CBD în neuropatia indusă de citostatice la șobolan.
4. Realizarea unor membrane constituite din biopolimerul chitosan și uleiul de CBD.

5. Apreciez că cercetările ulterioare pot deschide larg perspective cu privire la folosirea acestor membrane în industria farmaceutică și cosmetică, contribuind astfel la optimizarea metodelor de tratament.

Consider că elementele de originalitate ale tezei sunt următoarele:

1. Dezvoltarea unei tehnici analitice pentru depistarea pesticidelor, o provocare datorită multor factori legați de complexitatea matricei și de detectarea simultană a contaminanților.
2. Dezvoltarea unor metode rapide care se concentrează pe cuantificarea CB-lor majori prezenți în uleiuri, dar care poate fi aplicată și pentru a verifica THC-ul și alți CB, pentru a evalua conformitatea produsului etichetat, cu statutul juridic propriu fiecărei țări.
3. Validarea unei metode pentru inducerea convulsiilor la șoareci albi din sușa NMRI, prin aplicarea unui stimul convulsivant la nivel auricular.
4. Implementarea modelului experimental validat pentru determinarea efectului anticonvulsivant la șoareci albi din sușa NMRI pentru tratamentul acut cu 3 uleiuri vegetale de cânepă având concentrații diferite în CB.
5. Evaluarea efectului antihiperalgic în durerea neuropată indusă de citostatice (paclitaxel) pentru 3 uleiuri vegetale de cânepă din comerț, administrate în cantitate mică.
6. Dezvoltarea membranelor din ulei cu CBD și CS, pe principiul „green-technology”, datorită faptului că este lipsit de efecte secundare.
7. Evaluarea eficacității emulsiei CBD-CS pentru reducerea inflamației prin administrarea topică la șobolani cu inflamație indusă cu ajutorul adjuvantului Freund.

Bibliografia selectivă

1. Hazekamp, A. The Trouble with CBD Oil. *Med. Cannabis Cannabinoids* 2018, 1, 65–72, doi:10.1159/000489287.
2. Lu, H.-C.; Mackie, K. An Introduction to the Endogenous Cannabinoid System. *Biol. Psychiatry* 2016, 79, 516–525, doi:10.1016/j.biopsych.2015.07.028.
3. de Melo Reis, R.A.; Isaac, A.R.; Freitas, H.R.; de Almeida, M.M.; Schuck, P.F.; Ferreira, G.C.; Andrade-da-Costa, B.L. da S.; Trevenzoli, I.H. Quality of Life and a Surveillant Endocannabinoid System. *Front. Neurosci.* 2021, 15, doi:10.3389/fnins.2021.747229.
4. Devane, W.A.; Dysarz, F.A.; Johnson, M.R.; Melvin, L.S.; Howlett, A.C. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol. Pharmacol.* 1988, 34, 605–613.
5. Munro, S.; Thomas, K.L.; Abu-Shaar, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 1993, 365, 61–65, doi:10.1038/365061a0.
6. Pertwee, R.G. Cannabinoid receptors and pain. *Prog. Neurobiol.* 2001, 63, 569–611, doi:10.1016/S0301-0082(00)00031-9.
7. Guy, G.W.; Whittle, B.A.; Robson, P.J. The Medicinal Uses of Cannabis and

- Cannabinoids. *Le Pharm. Hosp.* 2008, 43, 56–57, doi:10.1016/S0768-9179(08)70455-3.
8. R. G. Pertwee *Cannabinoids*; 2005; Vol. 168;.
 9. Zajicek, J.P.; Apostu, V.I. Role of Cannabinoids in Multiple Sclerosis. *CNS Drugs* 2011, 25, 187–201, doi:10.2165/11539000-000000000-00000.
 10. Sánchez, A.J.; García-Merino, A. Neuroprotective agents: Cannabinoids. *Clin. Immunol.* 2012, 142, 57–67, doi:10.1016/j.clim.2011.02.010.
 11. Garcia-Arencibia, M.; Garcia, C.; Fernandez-Ruiz, J. Cannabinoids and Parkinsons Disease. *CNS Neurol. Disord. - Drug Targets* 2009, 8, 432–439, doi:10.2174/187152709789824642.
 12. Beltramo, M. Système cannabinoïde et douleur : vers de nouveaux médicaments ? *J. Soc. Biol.* 2009, 203, 99–106, doi:10.1051/jbio:2009002.
 13. Proto, M.C.; Gazzero, P.; Di Croce, L.; Santoro, A.; Malfitano, A.M.; Pisanti, S.; Laezza, C.; Bifulco, M. Interaction of endocannabinoid system and steroid Hormones in the control of colon cancer cell growth. *J. Cell. Physiol.* 2012, 227, 250–258, doi:10.1002/jcp.22727.
 14. Malfitano, A.M.; Ciaglia, E.; Gangemi, G.; Gazzero, P.; Laezza, C.; Bifulco, M. Update on the endocannabinoid system as an anticancer target. *Expert Opin. Ther. Targets* 2011, 15, 297–308, doi:10.1517/14728222.2011.553606.
 15. Parker, L.A.; Rock, E.M.; Limebeer, C.L. Regulation of nausea and vomiting by cannabinoids. *Br. J. Pharmacol.* 2011, 163, 1411–1422, doi:10.1111/j.1476-5381.2010.01176.x.
 16. Valenzuela, C.; Aguirre, C.; Castillo, V.; Ronco, A.M.; Llanos, M. Participación del sistema endocannabinoide en el desarrollo de obesidad. *Rev. Med. Chil.* 2010, 138, 621–629, doi:10.4067/S0034-98872010000500014.
 17. Hofmann, M.E.; Frazier, C.J. Marijuana, endocannabinoids, and epilepsy: Potential and challenges for improved therapeutic intervention. *Exp. Neurol.* 2013, 244, 43–50, doi:10.1016/j.expneurol.2011.11.047.
 18. Braun, A.; Engel, T.; Aguilar-Pimentel, J.A.; Zimmer, A.; Jakob, T.; Behrendt, H.; Mempel, M. Beneficial effects of cannabinoids (CB) in a murine model of allergen-induced airway inflammation: Role of CB1/CB2 receptors. *Immunobiology* 2011, 216, 466–476, doi:10.1016/j.imbio.2010.09.004.
 19. Ashton, C.H.; Moore, P.B. Endocannabinoid system dysfunction in mood and related disorders. *Acta Psychiatr. Scand.* 2011, 124, 250–261, doi:10.1111/j.1600-0447.2011.01687.x.
 20. Esteban, S.; García-Sevilla, J.A. Effects induced by cannabinoids on monoaminergic systems in the brain and their implications for psychiatric disorders. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* 2012, 38, 78–87, doi:10.1016/j.pnpbp.2011.11.007.
 21. Premkumar, L.; Sikand, P. TRPV1: A Target for Next Generation Analgesics. *Curr. Neuropharmacol.* 2008, 6, 151–163, doi:10.2174/157015908784533888.
 22. Park, C.K.; Lü, N.; Xu, Z.Z.; Liu, T.; Serhan, C.N.; Ji, R.R. Resolving TRPV1- and TNF- α -mediated spinal cord synaptic plasticity and inflammatory pain with neuroprotectin D1. *J. Neurosci.* 2011, 31, 15072–15085, doi:10.1523/JNEUROSCI.2443-11.2011.
 23. Abrams, D.; Guzman, M. Cannabis in cancer care. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2015, 97, 575–586, doi:10.1002/cpt.108.
 24. Ibarra-Lecue, I.; Pilar-Cuéllar, F.; Muguruza, C.; Florensa-Zanuy, E.; Díaz, Á.; Urigüen, L.; Castro, E.; Pazos, A.; Callado, L.F. The endocannabinoid system in mental disorders: Evidence from human brain studies. *Biochem. Pharmacol.* 2018, 157, 97–107, doi:10.1016/j.bcp.2018.07.009.
 25. Giacoppo, S.; Bramanti, P.; Mazzon, E. Sativex in the management of multiple sclerosis-

- related spasticity: An overview of the last decade of clinical evaluation. *Mult. Scler. Relat. Disord.* 2017, *17*, 22–31, doi:10.1016/j.msard.2017.06.015.
26. Rekind, T. THC:CBD Spray and MS Spasticity Symptoms: Data from Latest Studies. *Eur. Neurol.* 2014, *71*, 4–9, doi:10.1159/000357742.
 27. Lucas, C.J.; Galettis, P.; Schneider, J. The pharmacokinetics and the pharmacodynamics of cannabinoids. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2018, *84*, 2477–2482, doi:10.1111/bcp.13710.
 28. Corroon, J.; Kight, R. Regulatory Status of Cannabidiol in the United States: A Perspective. *Cannabis Cannabinoid Res.* 2018, *3*, 190–194, doi:10.1089/can.2018.0030.
 29. Russo, E.B. Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *Br. J. Pharmacol.* 2011, *163*, 1344–1364, doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01238.x.
 30. Pisanti, S.; Malfitano, A.M.; Ciaglia, E.; Lamberti, A.; Ranieri, R.; Cuomo, G.; Abate, M.; Faggiana, G.; Proto, M.C.; Fiore, D.; et al. Cannabidiol: State of the art and new challenges for therapeutic applications. *Pharmacol. Ther.* 2017, *175*, 133–150, doi:10.1016/j.pharmthera.2017.02.041.
 31. Vermersch, P. Sativex® (tetrahydrocannabinol + cannabidiol), an endocannabinoid system modulator: basic features and main clinical data. *Expert Rev. Neurother.* 2011, *11*, 15–19, doi:10.1586/ern.11.27.
 32. McLaughlin, P.J. Rimonabant. In *Reference Module in Biomedical Sciences*; Elsevier, 2017.
 33. Home | National Academies Available online: <https://www.nationalacademies.org/> (accessed on Oct 28, 2021).
 34. Biryukov, P.N. The European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. *Drug Control* 2020, *1*, 38–41, doi:10.18572/2072-4160-2020-1-38-41.
 35. Shannon, S. Cannabidiol in Anxiety and Sleep: A Large Case Series. *Perm. J.* 2019, *23*, 18–041, doi:10.7812/TPP/18-041.
 36. Lafaye, G.; Karila, L.; Blecha, L.; Benyamina, A. Cannabis, cannabinoids, and health. *Dialogues Clin. Neurosci.* 2017, *19*, 309–316, doi:10.31887/DCNS.2017.19.3/glafaye.
 37. **Blebea, N.M.**; Costache, T.; Negres, S. The qualitative and quantitative analysis of CBD in hemp oils by UHPLC with PDA and applications. *Sci. Pap. D-Animal Sci.* 2019, *62*, 138–142.
 38. **Blebea, N.M.**; Negreş, S. Methods for quantification of the main cannabinoids in CBD oil. In *Proceedings of the Geolinks Conference Proceedings; 2021; Vol. 3*, pp. 123–129.
 39. McLaren, J.; Swift, W.; Dillon, P.; Allsop, S. Cannabis potency and contamination: a review of the literature. *Addiction* 2008, *103*, 1100–1109, doi:10.1111/j.1360-0443.2008.02230.x.
 40. **Blebea N.M.**; Hancu G.; Costache T.; Ciobanu A.; Nicoară A.; Karampelas O.; Negreş S. LC-MS/MS use for testing pesticides in cannabinoid-containing products. *Farmacia* 2021, *69*, 6, <https://doi.org/10.31925/farmacia.2021.6.13>
 41. **Blebea, N.M.**; Rambu, D.; Costache, T.; Negreş, S. Very Fast RP–UHPLC–PDA Method for Identification and Quantification of the Cannabinoids from Hemp Oil. *Appl. Sci.* 2021, *11*, 9414, doi:10.3390/app11209414.
 42. Zbarcea C.E.; Negreş S.; Chiriță C. Gabapentin, alone and associated with tramadol reduces peripheral paclitaxel-induced neuropathy in rats. *Farmacia* 2011, *59*, 414–423.
 43. Deuis, J.R.; Dvorakova, L.S.; Vetter, I. Methods used to evaluate pain behaviors in rodents. *Front. Mol. Neurosci.* 2017, *10*, 284.
 44. Costa, B.; Trovato, A.E.; Comelli, F.; Giagnoni, G.; Colleoni, M. The non-psychoactive cannabis constituent cannabidiol is an orally effective therapeutic agent in rat chronic inflammatory and neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.* 2007, *556*, 75–83, doi:10.1016/j.ejphar.2006.11.006.

Lucrări științifice publicate în reviste de specialitate

Blebea NM, Rambu D, Costache T, Negreș S, Very Fast RP–UHPLC–PDA Method for Identification and Quantification of the Cannabinoids from Hemp Oil. *Appl.Sci.* 2021, 11, 9414. <https://doi.org/10.3390/app11209414>. **IF – 2.679** for 2020.

Blebea NM, Hancu G, Costache T, Ciobanu A, Nicoară A, Karampelas O, Negreș S, LC-MS/MS use for testing pesticides in cannabinoid-containing products. *Farmacia.* 2021, vol. 69, 6, <https://doi.org/10.31925/farmacia.2021.6.13>. **IF – 1.433** for 2020

Blebea NM, Costache T, Negreș S, The Qualitative and Quantitative Analysis of CBD in hemp oils by UHPLC with PDA and Applications, *Scientific papers*, series D, *Animal Science*”, București, 2019, 62 (1): 138-142.

Blebea NM, Negreș S, Methods for quantification of the main cannabinoids in CBD oil, *Geolinks International Conference, Conference Proceedings 2021*, ISSN 2603-5472/ ISBN 978-619-7495-17-1, vol.3, 1, pp.57-64. <https://www.geolinks.info/library/methods-for-quantification-of-the-main-cannabinoids-in-cbd-oil>. ISI Proceedings.

Blebea NM, Bucur LA, Negreș S. The cannabinoids- important therapeutic approach in the field of oncology Published: Jun 2021 in *Romania Journal of Pharmaceutical Practice*, DOI: [10.37897/RJPHP.2021.2.1](https://doi.org/10.37897/RJPHP.2021.2.1). <https://farma.com.ro/rjphp-vol-xiv-no2-year-2021/>. BDI.

Blebea NM, Bucur LA, Pharmacotherapeutic options in neoplastic diseases – part IV DOI: [10.26416/FARM.201.4.2021.5324](https://doi.org/10.26416/FARM.201.4.2021.5324). <https://www.medichub.ro/reviste-de-specialitate/farmacist-ro-mid-525-cmsid-62>. Published: 2021 in *Farmacist.ro*. BDI.

Blebea NM; Schröder V; Mitea G; Iancu V; Apetroaei MM; Apetroaei MR; Negreș S. "Development Membranes with Chitosan Delivery Systems for Cannabidiol," 2021 *International Conference on e-Health and Bioengineering (EHB)*, 2021, pp. 1-4, DOI: [10.1109/EHB52898.2021.9657739](https://doi.org/10.1109/EHB52898.2021.9657739) ISI Proceedings.