

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FABIANO SOARES DE ARAÚJO

ANÁLISE DE CANABINOIDES EM EXTRATOS DE *CANNABIS SATIVA* POR
CROMATOGRÁFIA EM FASE GASOSA ACOPLADA A ESPECTRÔMETRO
DE MASSAS

CURITIBA

2017

FABIANO SOARES DE ARAÚJO

ANÁLISE DE CANABINOIDES EM EXTRATOS DE *CANNABIS SATIVA* POR
CROMATOGRÁFIA EM FASE GASOSA ACOPLADA A ESPECTRÔMETRO
DE MASSAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química Orgânica.

Orientadora: Prof. Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales Maia

CIDADE

2017

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

A663a Araújo, Fabiano Soares de
Análise de canabinoides em extratos de *cannabis sativa* por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas [Recurso eletrônico] / Fabiano Soares de Araújo. – Curitiba, 2017.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2017.

Orientadora: Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales Maia.

1. Canabinoides. 2. Maconha. 3. Análise cromatográfica. 4. Espectrômetro. I. Universidade Federal do Paraná. II. Maia, Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales. III. Título.

CDD: 543.8

Bibliotecária: Vanusa Maciel CRB- 9/1928

Universidade Federal do Paraná
Setor de Ciências Exatas
Departamento de Química
Coordenação de Pós-Graduação

Declaração

Declaramos, para os devidos fins, que **Fabiano Soares de Araujo** fez Defesa Pública de sua Dissertação de Mestrado intitulada “**Análise de canabinoides em extratos de *Cannabis sativa* por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas**”, em 25 de outubro de 2017. O trabalho foi avaliado por uma banca examinadora composta pelos seguintes professores:

Prof.^a Dr.^a Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales Maia
(DQ/UFPR)

Prof.^a Dr.^a Cristina Aparecida Jark Stern (DFAR/UFPR)

Prof.^a Dr.^a Ana Luísa Lacava Lordello (DQ/UFPR)

Após a avaliação, o aluno foi considerado **aprovado**.

Informamos ainda que o referido aluno obteve aprovação em todas as disciplinas cursadas no Mestrado e está, no momento, aguardando os trâmites legais para a obtenção de seu diploma de Mestre em Química.

Por ser verdade, firmamos a presente declaração,

Curitiba, 25 de outubro de 2017.


Jaísa Fernandes Soares
Coordenadora

Dedico esse trabalho a minha mãe.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha mãe, Aparecida Soares, por sempre me incentivar a seguir nos estudos, por sempre me incentivar a seguir meus sonhos, por trabalhar duro por dias e noites para me dar condições de concluir essa etapa, por sempre buscar me motivar e me fazer levantar a cabeça mesmo nos momentos mais difíceis.

Agradeço à Professora Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales Maia por aceitar-me em seu laboratório e permitir a execução do projeto, mesmo frente a diversos desafios.

Agradeço à Professora Andreia Oliveira pelos conselhos e orientações ao longo do projeto.

Agradeço ao Professor Carlos García Carnelli por abrir as portas de seu laboratório o Uruguai, por compartilhar seus conhecimentos e disponibilizar as principais ferramentas para a conclusão desse projeto.

Agradeço a Santiago Fernandez que me auxiliou diariamente nos trabalhos desenvolvidos no Uruguai, sendo sempre muito atencioso e compreensivo.

Agradeço a todos os pacientes que cederam amostras para execução desse trabalho.

Agradeço a todos colegas de laboratório que ajudaram nos desafios diários, compartilharam ideias e suportaram os minha desorganização.

Agradeço a James Kava, meu grande amigo que me motivou e incentivou, principalmente para ter a confiança em abordar o tema da Cannabis nesse projeto, agregando muito conhecimento ao longo de incontáveis horas de conversa ao longo dos anos.

Agradeço a Késia Aline de Jesus, minha esposa que segurou em minha mão nos momentos mais difíceis, que apoiou em seguir em frente mesmo nos projetos mais mirabolantes, me contagiando com seu sorriso e me dando forças para chegar até aqui.

Agradeço a minha família

A meus amigos que tornam o caminho sempre mais divertido.

Agradeço ao coletivo Marcha da Maconha por me mostrar que não estou sozinho na luta por um país mais justo, onde nenhuma pessoa seja molestada por escolher fazer uso de Cannabis.

“Desistir... eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério;
é que tem mais chão nos meus olhos do que cansaço nas minhas pernas,
mais esperança nos meus passos do que tristeza nos meus ombros,
mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça”

Cora Coralina

RESUMO

O presente trabalho foi realizado parcialmente em parceria com a Universidad de La República, Montevideu, onde foi executado o estudo de influência de alguns parâmetros de extração de canabinoides em amostras de flores. No Laboratório de Produtos Naturais e Ecologia Química da UFPR foram analisadas trinta e nove amostras de produtos à base de *Cannabis sativa*, importados e nacionais, em forma de extratos concentrados (EC) ou diluídos em diferentes veículos, como glicerina (G), ou azeites vegetais (AV) necessitando diferentes formas de extração para cada classe. Foi utilizada a técnica de cromatografia em fase gasosa com espectrômetro de massas (CG-EM), onde foi possível realizar a quantificação de três canabinoides, Δ^9 -tetraidrocanabinol (Δ^9 -THC), canabidiol (CBD) e canabinol (CBN), e a identificação de outros quatro compostos minoritários, canabicromeno (CBC), canabigerol (CBG), tetraidrocanabivarin (THCV) e Δ^8 -tetraidronabinol (Δ^8 -THC). Dentre as amostras importadas o CBD foi constatado como canabinoide majoritário, em concentrações entre 3,3 e 26,8%, sendo consideradas amostras de EC, G e AV. As amostras produzidas artesanalmente apresentaram principalmente Δ^9 -THC, com exceção de quatro amostras onde CBD foi constatado como canabinoide majoritário, independentemente de sua concentração. As concentrações variaram entre 22,6 em EC a teores menores que 1% em amostras em glicerina. A técnica de cromatografia em fase gasosa se mostrou eficiente para a identificação de canabinoides neutros, visto que a ocorrência do processo de descarboxilação no injetor do equipamento. Os resultados demonstram a grande variedade de composição de canabinoides nas amostras de extratos de *Cannabis*, ratificando a necessidade do desenvolvimento de pesquisas para melhor controle de qualidade e da composição dos extratos de *Cannabis* utilizados no Brasil. Estudos para esclarecer uma possível variação da biodisponibilidade em função do veículo no qual os canabinoides estão dissolvidos, são de fundamental necessidade para melhor compreensão do uso da Cannabis para uso medicinal.

Palavras-chave: canabinoides. Canabidiol. Tetraidrocanabinol. CG-EM

ABSTRACT

This work was partially carried out in partnership with the Universidad of La República, Montevideo, where the study of the influence of some parameters of cannabinoid extraction on flower samples was carried out. In the Laboratory of Natural Products and Chemical Ecology of UFPR, thirty-nine samples of Cannabis based products, imported and domestic, were analyzed as concentrated extracts (EC) or diluted in different vehicles, such as glycerin (G), or vegetable oils (AV) requiring different forms of extraction for each class. Using a gas chromatography with mass spectrometry (GC-MS) was possible to quantify three cannabinoids, Δ 9-tetrahydrocannabinol (Δ 9-THC), cannabidiol (CBD) and cannabinol (CBN), and it was possible to identify the presence of cannabichromene (CBC), cannabigerol (CBG), tetrahydrocannabivarin (THCV) and Δ 8-tetrahydrocannabinol (Δ 8-THC). Among the imported samples, CBD was found to be the major cannabinoid, in concentrations between 3.3 and 26.8%, being considered EC, G and AV samples. The domestic samples presented mainly Δ 9-THC, with the exception of four samples where CBD was verified as the majority cannabinoid, independently of its concentration which remained in the range of 22.6% in EC to less than 1% in glycerol samples. The gas phase chromatography technique proved to be efficient for the identification of just neutral cannabinoids, since the occurrence of the decarboxylation process in the equipment injector. The results demonstrate the great variety of cannabinoids composition in the samples of Cannabis extracts, confirming the need to develop researches for better quality control and the composition of Cannabis extracts used in Brazil. Studies to clarify a possible variation of the bioavailability as a function of the vehicle in which the cannabinoids are dissolved are fundamentally necessary for a better understanding of the use of Cannabis for medicinal use.

Keywords: cannabinoids. Cannabidiol. Tetrahydrocannabinol. GC-MS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Anagrama com a palavra cânhamo.....	17
Figura 2: A esquerda, imagem com propaganda divulgada de Cigarros Índios de Cannabis vendidos no Brasil no fim do século XIX, início século XX. A direita imagem de um frasco comercial de extrato de Cannabis indica	18
Figura 3: Imagem do Formulário Chernoviz (a esquerda) e ilustração da página 436 onde consta a descrição dos usos de Cannabis.....	18
Figura 4: Gráfico demonstrando o número de artigos relacionados com as palavras-chave Cannabis, canabinoides e endocanabinoides, durante o período de 100 anos. A busca foi realizada no portal eletrônico sciencedirect.com, acessado em 18 de julho de 2016.	20
Figura 5: Perfil de crescimento de três variedades de Cannabis; S= C. sativa; I= C. indica; R= C. ruderalis. As representações foram feitas com crescimento de 2,4m, 1,2m e 0,6m respectivamente. Ao lado de cada amostra é apresentado o perfil foliar de cada variedade. ²⁰	23
Figura 6: Apresenta uma flor feminina de espécie de Cannabis denominada White Widow (A), vendida pelo banco de sementes Royal Queen Seeds. Em B a região abundante em tricomas ampliada. A direita, imagem de microscopia de fluorescência apresentando apenas um tricoma (C) e a direita imagem do tricoma com contraste (D) indicando região da enzima THCA sintase.	23
Figura 7: Rota de síntese do ácido olivetólico e ácido divarínico	24
Figura 8: Rota de biossíntese do ácido canabigerólico (CBGA), ácido canabigerovarínico (CBGVA) e ácido sesquicanabigerólico, de acordo com Yukihiro. ²⁵	24
Figura 9: Ilustração de três reações enzimáticas que o ácido canabigerólico (CBGA) pode ser submetido, originando o ácido canabidiólico, ácido tetraidrocanabinólico (THCA) e ácido canabícromenólico (CBCA), quando em interação com as enzimas CBDA sintase, THCA sintase e CBCA sintase, respectivamente.	25
Figura 10: Ilustração dos canabinoides ácidos e seus respectivos canabinoides neutros obtidos após descarboxilação.....	26
Figura 11 Ilustração apresentando os produtos de oxidação do canabidiol (CBD), tetraidrocanabinol (THC), ácido canabidiólico (CBDA) e canabidivarin (CBDV), os quais quando submetidos a condições oxidantes originam canabinodiol (CBND), canabinol (CBN), ácido canabinólico (CBNA) e canabinodivarin (CBNDV).....	26
Figura 12: Produtos de degradação fotocatalisada do CBDA e CBCA, os quais quando em contato com luz, podem gerar o ácido canabielsônico (CBEA) e o ácido canabiciclólico (CBLA), respectivamente, assim como os produtos de descarboxilação canabinélsônico e CBE e CBL.	27
Figura 13: Variedades de canabinoides minoritários	28
Figura 14: Imagem ilustrativa do moedor utilizado no processo de moagem.	34
Figura 15: Procedência das amostras analisadas organizadas conforme estado de origem	35
Figura 16: Ilustração das amostras que foram analisadas. A) amostra de extrato concentrado; B) amostra de extrato de cannabis dissolvido em Glicerina; C) amostra de flor PR 12; D) amostra PR11; E) amostras de extratos de Cannabis dissolvidos em azeite, da esquerda para a direita SP07, PR13, PR03 e PR05.....	38
Figura 17: Proposta de fragmentação para formação do pico base apresentado no espectro de massas do CBN (a); Espectro de massas do CBN (b)	44
Figura 18: Proposta de fragmentação para formação da estrutura do pico base apresentado no espectro de massas do CBD.....	45
Figura 19: Espectro de massas do CBD	45
Figura 20: Proposta de fragmentação para formação do pico base apresentado no espectro de massas do CBC.....	46
Figura 21: Espectro de massas do Δ^9 -THC ⁵²	46
Figura 22: Proposta de fragmentação de massas para o THC, considerando a formação do pico base (231) e o pico com razão massa carga 271.	47

<i>Figura 23: Referência de espectro de massas dos canabigerol (CBG), Δ^8-Tetraidronacabinol (Δ^8-THC) e tetraidrocanabivarin (THV/THCV).⁵²</i>	48
<i>Figura 24: Cromatograma com os picos referente ao CBN nas concentrações de 5, 10, 25, 35, 50, 75, 100 e 125 μg</i>	48
<i>Figura 25: Cromatograma referente a amostras PR03, após extração dos canabinoides.</i>	50
<i>Figura 26: Cromatograma do veículo (azeite) da amostra PR03 após extração dos canabinoides.</i>	50
<i>Figura 27: Cromatograma referente a análise cromatográfica da amostra PR05, demonstrando a presença de impurezas</i>	50
<i>Figura 28: Cromatograma referente à amostra diluída em glicerina (PB01), destacando a baixa concentração de canabinoides.</i>	51
<i>Figura 29: Cromatograma referente à análise da amostra de extrato de Cannabis concentrado (SC01), onde é possível destacar a presença de THC como canabinoide majoritário</i>	52
<i>Figura 30: Cromatograma referente à análise da amostra de extrato de Cannabis concentrado (SC01), onde é possível identificar a presença de canabinoides minoritários.</i>	52
<i>Figura 31: Cromatograma referente à análise de amostra PR09, sendo possível verificar a predominância de THC (9,45 min).</i>	53
<i>Figura 32: Distribuição das amostras de extratos e flores de Cannabis analisadas em função da composição de canabinoides (THC e CBD) e da concentração.</i>	60

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Concentração de THC extraída em função do tamanho de partícula utilizada no ensaio. Os dados estão em porcentagem em relação à massa seca. A) ensaio 1 e B) ensaio 2.	42
Gráfico 2: Percentual de THC em relação à massa seca de material vegetal em função do solvente utilizado	43
Gráfico 3: Valores de concentração de THC em relação à massa seca, em função do tempo de extração de flores de Cannabis	43
Gráfico 4: Regressão linear de CBD entre as concentrações de 5 a 75 ppb	49
Gráfico 5: Regressão linear da curva analítica de CBD entre as concentrações de 75 e 200 ppb	49
Gráfico 6: Dados de concentração (m/m) das amostras de extratos de Cannabis importadas. Nesse gráfico não há distinção da forma de apresentação de cada amostra	54
Gráfico 7: Dados de concentração (m/m) de canabinoides em amostras artesanais dissolvidas em azeite.	55
Gráfico 8: Canabinoides minoritários identificados em amostras de produção artesanal de extratos de Cannabis dissolvidos em azeite.	55
Gráfico 9: Dados de concentração de canabinoides em extratos de cannabis dissolvidas em glicerina	56
Gráfico 10: Gráfico de canabinoides minoritários identificados nas amostras de extratos de Cannabis concentrados. Os valores expressos representam a razão da área do sinal analítico do canabinoide pela área do canabinoide majoritário. Com exceção da amostra PR06, todas as amostras possuem THC como canabinoide majoritário. Os canabinoides majoritários e compostos com razão superior a 10% não foram não são expressos nesse gráfico.	57
Gráfico 11: Perfil de concentração de CBD, THC e CBN em extratos de Cannabis de amostras concentradas.	58
Gráfico 12: Concentração de CBD, THC e CBN em extratos concentrados das amostras SC01 a SC08	58
Gráfico 13: Concentração de CBD, THC e CBN em extratos de Cannabis das amostras MG03, PR06, RS02, SP02, SP03, SP05 e SP06	58
Gráfico 14: Dados de concentração (m/m) de CBD, THC e CBN nas amostras de flores	59
Gráfico 15: Dados da razão entre a área do sinal analítico dos canabinoides minoritários em relação à área de THC, em amostras de flores	60

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1 Canabinoides constituintes da cannabis classificados por classes</i>	<i>29</i>
<i>Tabela 2: Distribuição das amostras analisadas conforme origem (comercial ou artesanal) e pela forma de apresentação, considerando o veículo utilizado para diluição, extratos concentrados e flores.....</i>	<i>37</i>

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

2 AG - aradonoil glicerol

ABRACE - Associação Brasileira de Apoio a Cannabis Esperança

CB1 – Receptor Canabinoide 1

CB2 – Receptor Canabinoide 2

CBC – canabicromeno

CBCA - ácido canabicromenólico

CBCV – canabimevarin

CBCVA - ácido canabimevarínico

CBD - Canabidiol

CBDV – canabidivarin

CBDVA - ácido canabidivarínico

CBE – canabielsoin

CBEA - ácido canabielsóinico

CBG – canabigerol

CBGA - ácido canabigerólico

CBGVA - ácido canabigerovarínico

CBL – canabiciclol

CBLA - ácido canabiciclólico

CBNA - ácido canabinólico

CBND – canabinodiol

CBT – canabitriol

CCD - cromatografia em camada delgada

CG – Cromatografia em fase gasosa

CLAE – Cromatografia em fase líquida de alta eficiência

DBF – Dibutil ftalato

DP – Desvio Padrão

EM – Espectrômetro de Massas

FID - detector por ionização por chama

FM – Fase móvel

GPP - pirofosfato de geranila

IRCCA - Instituto de Regulação e Controle da Cannabis

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

MS - detector de espectrometria de massas

SEC – Sistema Endocanabinoide

THCA - ácido tetraidrocanabinólico

THCV – tetraidrocanabivarin

THCVA - ácido tetraidrocanabivarínico

UDELAR – Universidad de la República

UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo

Δ 8-THC – delta 8 tetraidrocanabinol

Δ 9 -THC – delta 9 tetraidrocanabinol

SUMÁRIO

1	<u>INTRODUÇÃO</u>	17
1.1	HISTÓRICO DA CANNABIS	18
1.2	ASPECTOS BOTÂNICOS	21
1.3	CANABINOIDES	23
1.3.1	FITOCANABINOIDES	23
1.3.2	ENDOCANABINOIDES	29
1.4	USO MEDICINAL	29
1.5	MÉTODOS DE ANÁLISE	30
2	<u>OBJETIVOS</u>	32
3	<u>MATERIAIS E MÉTODOS</u>	33
3.1.1	CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA – CANABINOIDES	33
3.1.2	ÁREA SUPERFICIAL	34
3.1.3	SOLVENTE EXTRATOR	34
3.1.4	TEMPO	34
3.2	MATERIAIS	35
3.3	AMOSTRAS	35
3.4	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	38
3.4.1	PREPARO DE AMOSTRA	38
3.5	CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	39
3.6	CURVA ANALÍTICA	40
3.6.1	LIMITE DE DETECÇÃO	40
3.6.2	LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO	40
4	<u>RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	40
4.1	LABORATÓRIO DE FARMACOGNOSIA - UDELAR	40
4.1.1	INVESTIGAÇÃO DOS PARÂMETROS DE EXTRAÇÃO	41
4.2	LABORATÓRIO DE PRODUTOS NATURAIS E ECOLOGIA QUÍMICA - UFPR	44
4.2.1	IDENTIFICAÇÃO ESPECTROMÉTRICA	44
4.2.2	CURVA DE CALIBRAÇÃO	48
4.2.3	LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO	49
4.2.4	AVALIAÇÃO QUALITATIVA	49
4.2.5	AVALIAÇÃO QUANTITATIVA	53
5	<u>CONCLUSÃO</u>	61
6	<u>RECOMENDAÇÕES</u>	62
7	<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	63

1 Introdução

Na Europa o uso das fibras de cânhamo exerceu uma contribuição muito importante para equipar as caravelas no período das grandes navegações, possibilitando a confecção de velas e cordas resistentes para suportarem as condições drásticas encontradas ao cruzar oceanos.³

No Brasil o primeiro registro da presença do cânhamo foi descrito por Garcia Orta, onde em sua obra relatou o uso em rituais religiosos pelos povos escravizados do *bangüê*, denominação que foi utilizada por esses povos. Com o passar dos anos o cânhamo começou a ser chamado de maconha, inicialmente na forma de gíria, mas que atualmente é uma das denominações mais conhecidas da planta de *Cannabis*. A palavra tem origem a partir de um anagrama da palavra cânhamo, como pode ser visto na Figura 1.⁵



Figura 1: Anagrama com a palavra cânhamo⁵

Apesar de já se ter conhecimento há milênios sobre as propriedades medicinais da *Cannabis*, o uso medicinal ganhou destaque apenas em meados do século XIX, após a publicação do livro *Sobre as preparações do Cânhamo Indiano*, escrita por William O'Shaughnessy, médico irlandês que se baseou nos escritos indianos para escrever uma obra que apresentava casos de sucesso no tratamento de dores, insônia, reumatismo, convulsões, incontinência, picada de cobra, espasmos musculares, tétano e outros. A obra promoveu a distribuição da espécie *Cannabis indica* pela Europa, rapidamente o conhecimento chegou ao Brasil, tendo inclusive diversos medicamentos a venda na farmácia, o mais conhecido era o *Cigarros Índio* da companhia Grimault, a planta seca era enrolada na forma de cigarro, com indicação de tratamento de asma e insônia sendo encontrados como frascos com extratos e tinturas (Figura 2). As vendas desses produtos foram intensificadas e permaneceram nas farmácias e boticários até as primeiras décadas do século XX.



Figura 2: A esquerda, imagem com propaganda divulgada de *Cigarros Índios* de Cannabis vendidos no Brasil no fim do século XIX, início século XX. A direita imagem de um frasco comercial de extrato de Cannabis indica

No início do século XX iniciou a cannabis fazia parte da Farmacopéia brasileira (um movimento a favor da proibição da *Cannabis* e seus derivados. Um brasileiro exerceu papel relevante na intensificação desse movimento a nível mundial, Dr Pernambuco, como era conhecido, participou da II Conferência Mundial sobre Ópio, em Genebra em 1924 e mesmo com pouco embasamento dos mais de 40 integrantes para tratar do assunto, a *Cannabis* foi incluída na lista de substâncias controladas junto com ópio e cocaína, com o argumento de que estava havendo um uso endêmico da *Cannabis*, comparado às drogas narcóticas.

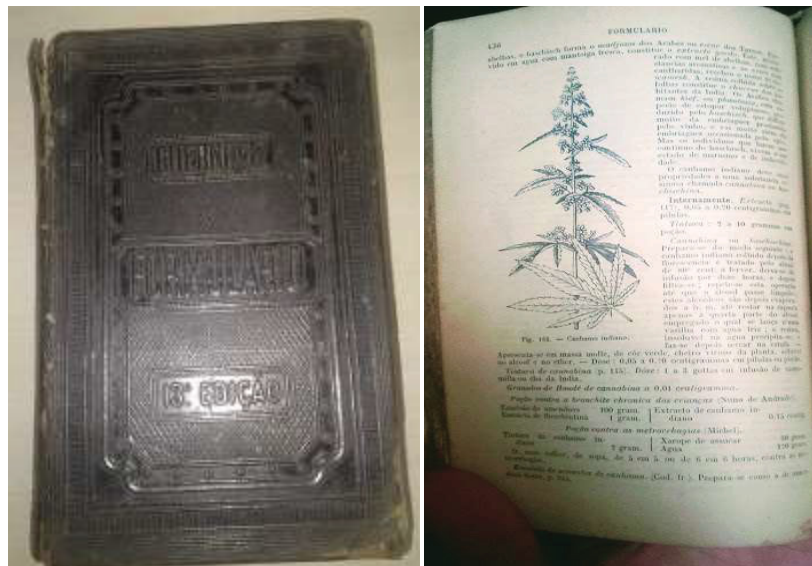


Figura 3: Imagem do Formulário Chernoviz (a esquerda) e ilustração da página 436 onde consta a descrição dos usos de *Cannabis*⁶

No dia 2 de agosto de 1937 foi aprovada nos Estados Unidos a *Lei de taxação da Marihuana* (denominação informal da *Cannabis* naquele país), taxando as produções e venda dos produtos de *Cannabis*, dessa forma os tratamentos e produções foram inviabilizados. Não demorou muito para que os efeitos desse movimento chegassem ao Brasil. Em 25 de novembro de 1938 entrou em vigor o decreto de lei Nº891 do Governo Federal, que definiu a proibição total do plantio, colheita e manipulação por particulares da maconha, coca, ópio e seus derivados. Para realizar as atividades era necessária autorização prévia do órgão regulador, que exigia um depósito no valor 40.000\$000 (quarenta mil-mil réis). Nesse ano ainda não havia salário-mínimo definido, mas o valor correspondia a 166 salários-mínimos de 1940.⁷

Em meio a uma intensa repressão ao cultivo e manipulação da *Cannabis* e seus derivados, o químico búlgaro Raphael Mechoulam apresenta o artigo científico que revolucionou a ciência e a compreensão sobre a planta. Intitulado *Identificação, isolamento e síntese parcial de constituintes ativos do hashish*, Mechoulam não apenas elucidou a estrutura de uma dezena de compostos presentes nos extratos, mas também identifica que o Δ^9 -tetraidrocanabinol (Δ^9 -THC) é o principal componente psicoativo da *Cannabis*.⁸ Esse trabalho abriu uma grande linha de trabalho para diversos cientistas, que se empenharam em compreender melhor o mecanismo de ação e as propriedades oferecidas por aquela planta que até os dias de hoje gera tanta polêmica.

Na década de 80, já era conhecida a maioria das principais substâncias produzidas exclusivamente por plantas do gênero *Cannabis*, os canabinoides, o que levou a diversos grupos buscarem por compreender como esses compostos atuam no cérebro, levando a descoberta dos receptores responsáveis por interagir com essas substâncias. Esses receptores foram denominados receptores canabinoide CB1 e CB2.^{9,10} Muitas dúvidas continuavam, qual a função desses receptores em nosso organismo? A busca por essa resposta levou ao descobrimento de substâncias endógenas que atuam diretamente nos receptores CB1 e CB2, a essa classe de compostos foi dada a denominação de endocanabinoides, sendo o conjunto que engloba os receptores, substâncias que neles atuam e as enzimas de síntese e degradação recebem a denominação de sistema endocanabinoide (SEC).

Atualmente é comprovado que o SEC está ligado a funções básicas do nosso organismo, desde funções regulatórias do sono e apetite, coordenação motora, modulação neuronal, regulando inclusive mutações realizadas em porções do DNA. O SEC foi encontrado em diversos grupos do reino animal, desde mamíferos^{10,11}, aves, peixes¹², e inclusive insetos¹³. Muito maior do que esperado, os estudos sobre o SEC

abriram um leque de possibilidades para o entendimento do funcionamento dos organismos e a possibilidade de criação de novas drogas. As pesquisas relacionadas à *Cannabis* multiplicaram após o descobrimento do sistema endocanabinoide, conforme pode ser verificado na Figura 4.

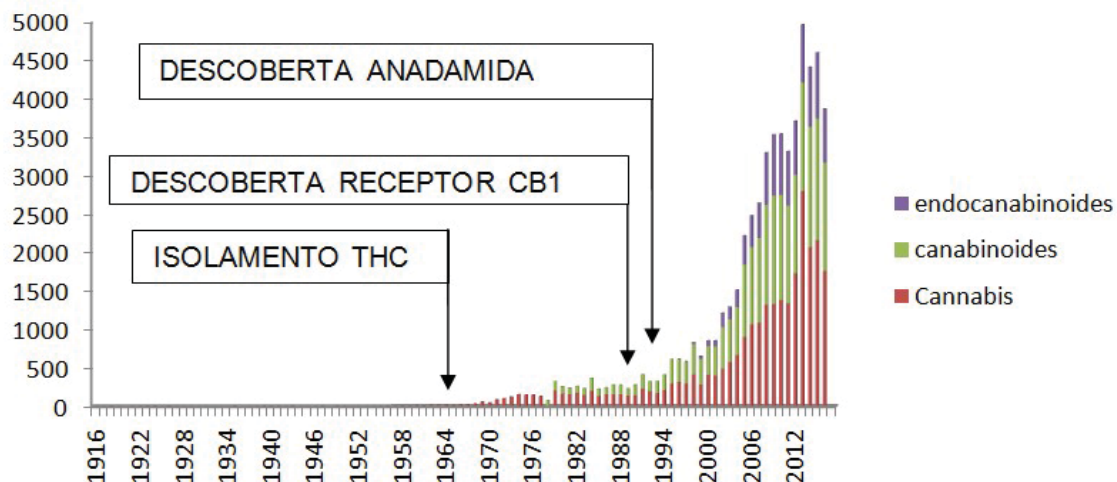


Figura 4: Gráfico demonstrando o número de artigos relacionados com as palavras-chave Cannabis, canabinoides e endocanabinoides, durante o período de 100 anos. A busca foi realizada no portal eletrônico sciencedirect.com, acessado em 18 de julho de 2016.

No Brasil do século XXI a proibição continuou ganhando força. Após a nova Lei de Drogas de 2006 (Lei 11.343/06) e a despenalização do usuário, os inquéritos por tráfico aumentaram de forma nunca vista. Em 2006, apenas 9% da população carcerária no país respondia por tráfico, subindo para 28% em 2014, sendo que entre as mulheres o índice chega a 58%, que sofreu um aumento de 117% em menos de 10 anos.¹⁴

O cenário nacional sofreu uma mudança, a partir do ano de 2013, no quesito das propriedades medicinais da planta. Com a divulgação de reportagens em grandes veículos de comunicação, impressa e digital,¹⁵ relatando casos de famílias que realizam tratamento de crianças e jovens com síndromes de difícil controle, como CDKL5, Dravet e West, utilizando extratos importados, ricos em canabidiol CBD, importados inicialmente de forma ilegal. Nos casos mais evidentes, o extrato rico em CBD é o único medicamento efetivo no tratamento dos sintomas desses pacientes. Houve alguns casos de indiciamento por tráfico internacional de drogas, quando o medicamento entrava no Brasil. Diversas famílias identificaram essa como uma possível alternativa no tratamento de seus familiares, gerando pressão sobre os órgãos reguladores que, até 2017, já emitiu cerca de 2000 autorizações para importação de medicamentos à base de *Cannabis*. Até o momento, quatro famílias possuem liminar protetiva para realizar o cultivo de *Cannabis* para fins medicinais. No dia 28 de abril de 2017, a

Associação Brasileira de Apoio a Cannabis Esperança (ABRACE) se tornou a primeira associação autorizada a plantar, manipular e distribuir um produto nacional a base de *Cannabis*, para fins medicinais. A liminar judicial foi expedida pela 2ª Vara Federal -PB, possibilitando o atendimento de, por enquanto, até 151 famílias. Há diversos casos de tratamentos realizados com extratos feitos de forma artesanal, com plantas cultivadas de forma ilegal, que oferecem benefícios a seus usuários. Os tratamentos vão além de epilepsia de difícil controle, ao menos uma paciente obteve liminar protetiva para cultivo de plantas com alto teor de THC, para tratamento dos sintomas de fibromialgia.¹⁶ Há diversos estudos que ratificam o uso do THC como a gente anticâncer em modelos pré-clínicos.¹⁷

Em outubro de 2016 foi lançado o projeto Farmacannabis, da Universidade Federal do Rio de Janeiro em parceria com a Fundação Oswaldo Cruz, com objetivo de realizar atividades de controle de qualidade dos óleos nacionais e importados e o desenvolvimento de pesquisas relacionadas à *Cannabis*. Em novembro de 2016 a empresa brasileira Entourage Phytolab importou dez quilos de flores secas de *Cannabis*, previamente moídas, para desenvolver pesquisas com objetivo de produzir comercialmente um produto à base de *Cannabis* para fins medicinais.¹⁸ No caso dos produtos importados ou produzidos no Brasil, estes não possuem, até o momento, nenhum controle de qualidade órgãos reguladores. Essa falta de controle afeta diretamente aqueles pacientes sensíveis a certo canabinoide, como no caso em que doses elevadas de THC podem levar a uma piora no quadro clínico. Para que seja realizado o acompanhamento adequado por um médico, é necessário saber a dosagem e a biodisponibilidade dos princípios ativos que está sendo administrada ao paciente, essa informação não está presente em todos os rótulos dos medicamentos importados e ausente nos óleos artesanais.

1.2 Aspectos botânicos

As plantas do gênero da *Cannabis* são angiospermas, dioicas, de ciclo anual, que fazem parte da família Cannabaceae, família na qual faz parte o *Humulus lupulus*, o conhecido lúpulo utilizado na produção de cerveja.¹⁹ As folhas desse gênero são características, possuindo perfil espalmado, podendo conter de 3 a 11 folíolos serrilhados.²⁰

A primeira identificação botânica foi realizada em 1753, pelo botânico sueco Carl Linnaeus, quando analisando as variedades da planta presente na Europa realizou a identificação da *Cannabis sativa* L. Apenas quinze anos após a primeira identificação, Lammarck, enquanto estudava algumas variedades de *Cannabis* presente na Índia,

identificou uma variedade distinta daquela descrita pelo naturalista Linnaeus, essa segunda variedade foi denominada *Cannabis indica* Lam., em 1919 uma terceira variedade foi identificada na região da Sibéria, com características distintas das duas anteriores, a qual foi denominada *Cannabis ruderalis* Janisch. Atualmente ainda há muitos debates acerca da classificação botânica, sendo que alguns autores consideram três espécies distintas, enquanto outros consideram como sendo uma única espécie, *Cannabis sativa*, onde dentro dessa encontra-se três principais variedades, *Cannabis sativa* L. ssp *sativa*, *Cannabis sativa* L. ssp *indica* e *Cannabis sativa* L. ssp *ruderalis*.²¹ Entretanto, com a ação antrópica, promovendo diversos cruzamentos para obtenção de plantas com características únicas, há no mercado centenas de sub variedades híbridas que são apresentadas com nomes comerciais variados aplicados por seus criadores.

Dentre as três variedades supracitadas é possível facilmente identificar diferenças que as caracterizam. A variedade *sativa* possui maior crescimento vertical, podendo atingir de 1,5 m a 5 m de altura e menor número de ramificações, possuindo folhas mais longas que podem conter entre 5 e 7 folíolos. As plantas da variedade *indica* possuem menor crescimento vertical, quando comparados à *sativa*, podendo chegar a 1,2m de altura em média. Suas folhas podem possuir maior número de folíolos (7 a 11) e maior número de ramificações. A terceira variedade, *ruderalis*, é a com menor crescimento vertical, normalmente não ramificada, com folhas que possuem entre 3 e 5 folíolos (Figura 5).²⁰Atualmente há centenas de plantas híbridas disponíveis comercialmente, que podem mesclar diferentes características de duas ou mais variedades.

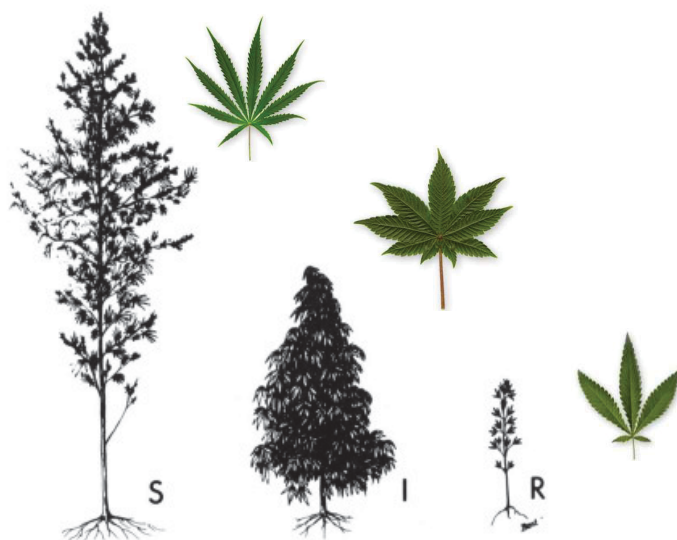


Figura 5: Perfil de crescimento de três variedades de *Cannabis*; S= *C. sativa*; I= *C. indica*; R= *C. ruderalis*. As representações foram feitas com crescimento de 2,4m, 1,2m e 0,6m respectivamente. Ao lado de cada amostra é apresentado o perfil foliar de cada variedade.²⁰

As inflorescências femininas de plantas de *Cannabis* são conhecidas pela presença de alta densidade de tricomas, glândulas de secreção e armazenamento, dentro da qual armazena enzimas que produzem compostos como ácido tetraidrocanabinólico (THCA). Pela sua classificação, essa é a única enzima localizada dentro de uma cavidade de secreção. A maior concentração de tricomas ocorre em inflorescência de plantas femininas, podendo ocorrer em menor concentração em tecido foliar jovem (Figura 6).²²



Figura 6: Apresenta uma flor feminina de espécie de *Cannabis* denominada White Widow (A), vendida pelo banco de sementes Royal Queen Seeds. Em B a região abundante em tricomas ampliada. A direita, imagem de microscopia de fluorescência apresentando apenas um tricoma (C) e a direita imagem do tricoma com contraste (D) indicando região da enzima THCA *shintase*.

1.3 Canabinoides

1.3.1 Fitocanabinoides

Canabinoides são compostos químicos denominados monoterpenos fenólicos, com estrutura básica de 21 átomos de carbono, e incluem os compostos que são produzidos exclusivamente por plantas do gênero *Cannabis*, seus derivados e produtos de transformação, dessa forma denominados fitocanabinoides.²³ A biossíntese desses compostos ocorre a partir da condensação enzimática do pirofosfato de geranila (GPP), produzido pela rota do mevalonato, e o ácido olivetólico, oriundo da rota Biosintética dos policetídeos (Figura 7), na presença da enzima *geranylpyrophosphate:olivetolate genanyltransferase*.²⁴ Nessa rota, o primeiro canabinoide sintetizado é o ácido canabigerólico (CBGA) (Figura 8).

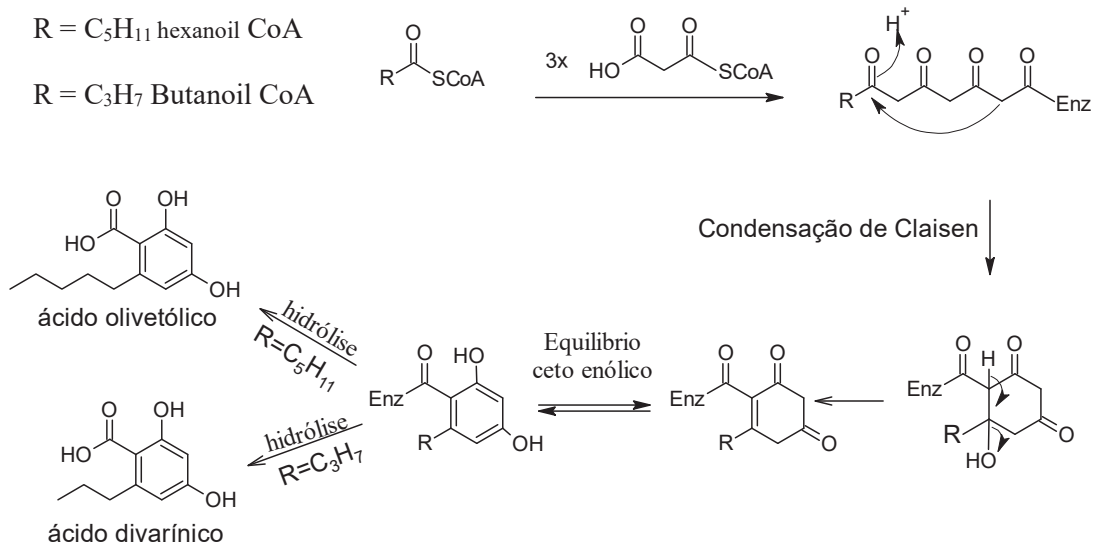


Figura 7: Rota de síntese do ácido olivetólico e ácido divarínico

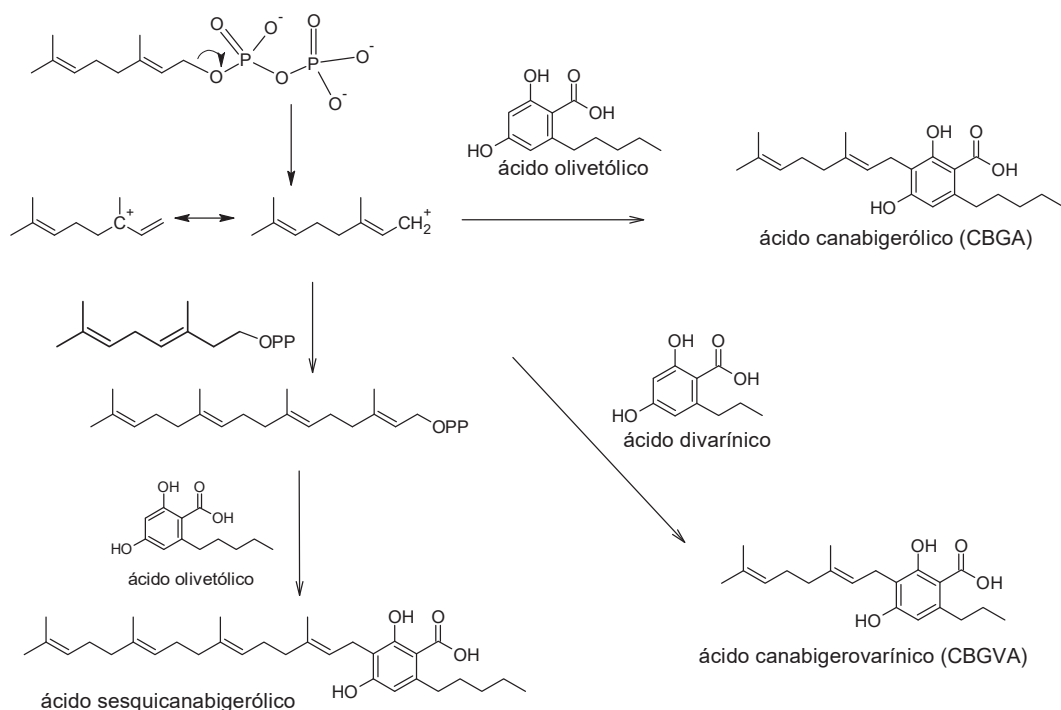


Figura 8: Rota de biossíntese do ácido canabigerólico (CBGA), ácido canabigerovarínico (CBGVA) e ácido sesquicanabigerólico, de acordo com Yukihiro.²⁵

O próprio CBGA poderá ser submetido a reação com três principais enzimas, *CBDA sintase*, *THCA sintase* e *CBCA sintase*, que originarão o ácido canabidiólico (CBDA), ácido Δ^9 -tetraidrocanabinólico (Δ^9 -THCA) e o ácido canabicromenólico (CBCA), sendo esses os principais canabinoides produzidos por rotas enzimáticas. Outra classe de canabinoides é formada pela reação de condensação enzimática entre GPP e o ácido divarínico, que originará o ácido canabigerovarínico (CBGVA), que por sua vez pode ser submetido a reações enzimáticas pelas enzimas *CBDA*, *THCA* e *CBCA sintase*,

formando o ácido canabidivarínico (CBDVA), ácido tetraidrocanabivarínico (THCVA) e o ácido canabicromevarínico (CBCVA) (Figura 9).²⁵

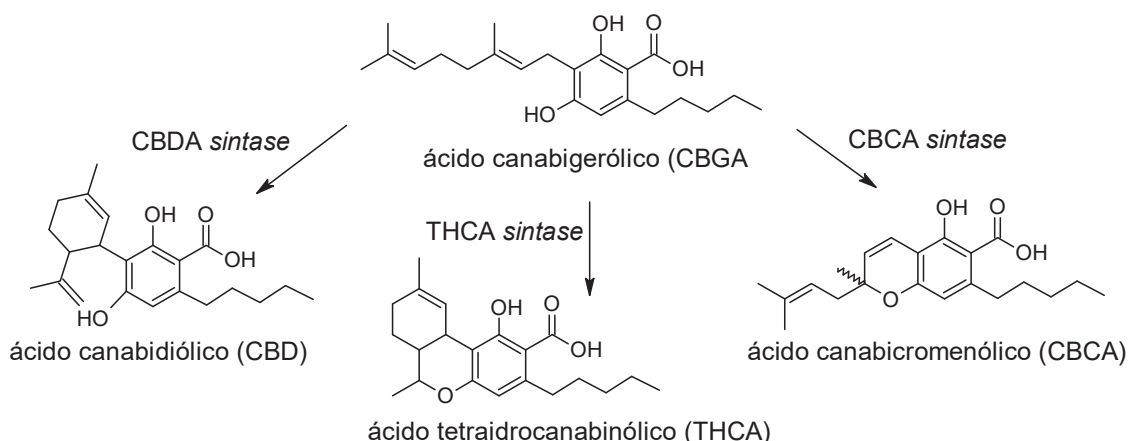


Figura 9: Ilustração de três reações enzimáticas que o ácido canabigerólico (CBGA) pode ser submetido, originando o ácido canabidiólico, ácido tetraidrocanabinólico (THCA) e ácido canabicromenólico (CBCA), quando em interação com as enzimas *CBDA sintase*, *THCA sintase* e *CBCA sintase*, respectivamente.

Os canabinoides produzidos enzimaticamente podem sofrer diversas reações secundárias, sendo a principal a reação não enzimática de descarboxilação, que irá produzir os chamados canabinoides neutros. A reação de descarboxilação do CBGA, CBDA, Δ^9 -THCA e CBCA irão produzir o canabigerol (CBG), canabidiol (CBD), tetraidrocanabinol (Δ^9 -THC) e canabicromeno (CBC), respectivamente. Um estudo indicou que a razão entre o Δ^9 -THCA e Δ^9 -THC é de aproximadamente 5,5 em plantas frescas,²⁶ valor que diminui com a exposição a temperatura e armazenamento por tempo prolongado. A reação de descarboxilação foi demonstrada como uma reação de primeira ordem, sendo incentivada pelo aumento de temperatura, entretanto o aumento da temperatura próximo de 145°C promove a degradação do Δ^9 -THC em Δ^8 -THC, assim como a evaporação desses compostos.²⁷ De forma análoga, os compostos CBDVA, THCVA e CBCVA podem sofrer a reação de descarboxilação originando canabidivarin (CBDV), tetraidrocanabivarin (THCV), e canabicromevarin (CBCV) (Figura 10).

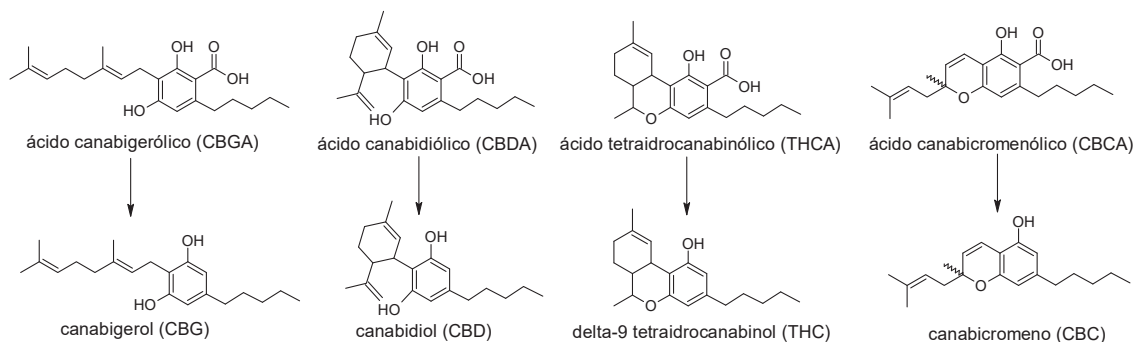


Figura 10: Ilustração dos canabinoides ácidos e seus respectivos canabinoides neutros obtidos após descarboxilação

Os canabinoides, ácidos ou neutros, podem sofrer reações de oxidação, principalmente em casos de armazenamento inadequado, em que as flores permanecem expostas a atmosfera. No caso do THC o produto de oxidação é o canabinol (CBN), o primeiro canabinoide identificado, por Wood et al, em 1896²⁸, tendo sua estrutura definida quarenta anos depois.²⁹ O Produto de Oxidação do THCA origina o ácido canabinólico (CBNA). O produto de oxidação do CBD é o canabinodiol (CBND), isolado pela primeira vez em 1977 por Lousberg.³⁰ De forma similar é encontrado os canabinoides do tipo *-varin*, como o canabinodivrain (CBNDV), produto de oxidação do CBDV (Figura 11).

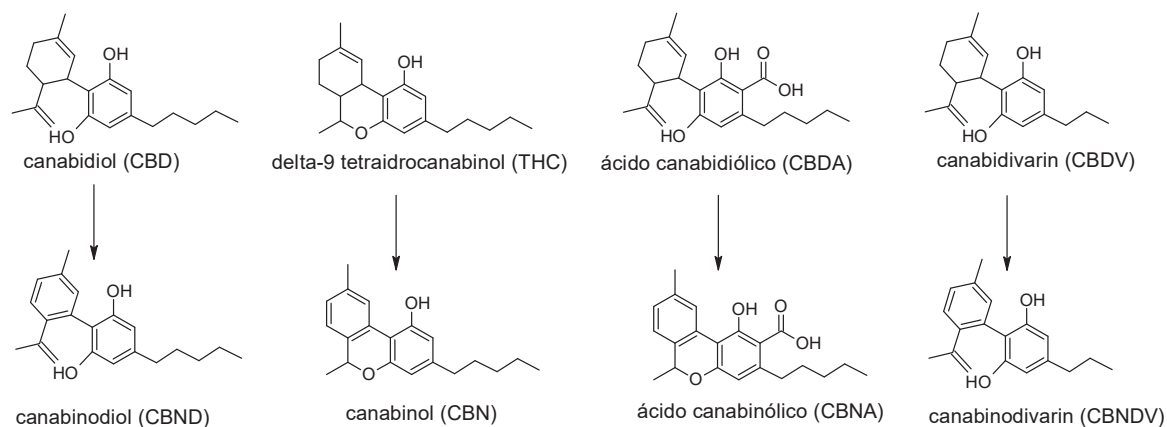


Figura 11 Ilustração apresentando os produtos de oxidação do canabidiol (CBD), tetraidrocanabinol (THC), ácido canabidiólico (CBDA) e canabidivarin (CBDV), os quais quando submetidos a condições oxidantes originam canabinodiol (CBND), canabinol (CBN), ácido canabinólico (CBNA) e canabinodivrain (CBNDV)

Os canabinoides estão sujeitos a reações fotocatalisadas como, por exemplo, o canabielsoin (CBE) e o ácido canabielsóinico (CBEA), produtos de degradação do CBD e CBDA, respectivamente. Os produtos gerados por reações fotocatalisadas a partir do CBC e CBCA são canabiciclól (CBL) e ácido canabiciclólico (CBLA) (Figura 12).

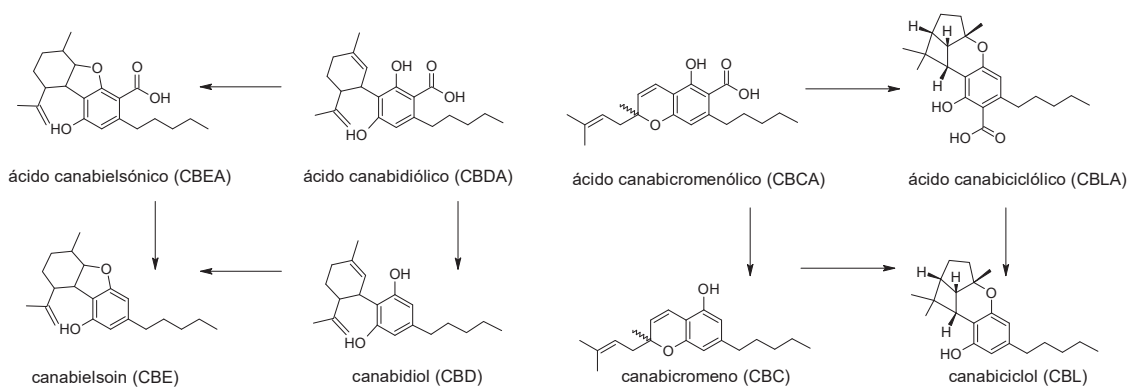


Figura 12: Produtos de degradação fotocatalisada do CBDA e CBCA, os quais quando em contato com luz, podem gerar o ácido canabielsonico (CBEA) e o ácido canabiciclólico (CBLA), respectivamente, assim como os produtos de descarboxilação canabielsonico e CBE e CBL.

Outros canabinoides podem ser formados a partir de reações com outros compostos presentes no meio como a condensação com outra unidade de GPP, gerando o ácido sesquicanabigerólico, água em reações de hidratação de alcenos, que podem originar a classe de canabinoide canabitriol (CBT), e álcoois em reações de esterificação de canabinoides ácidos. Há diversos relatos de produtos isolados e identificados semelhantes aos relacionados acima, entretanto com a cadeia alquílica como C₁, C₂ e C₄ (Figura 13). O conjunto de todos os canabinoides já identificados totaliza 104 compostos que podem ser agrupados em 11 classes conforme descrito na

TABELA 1.²³

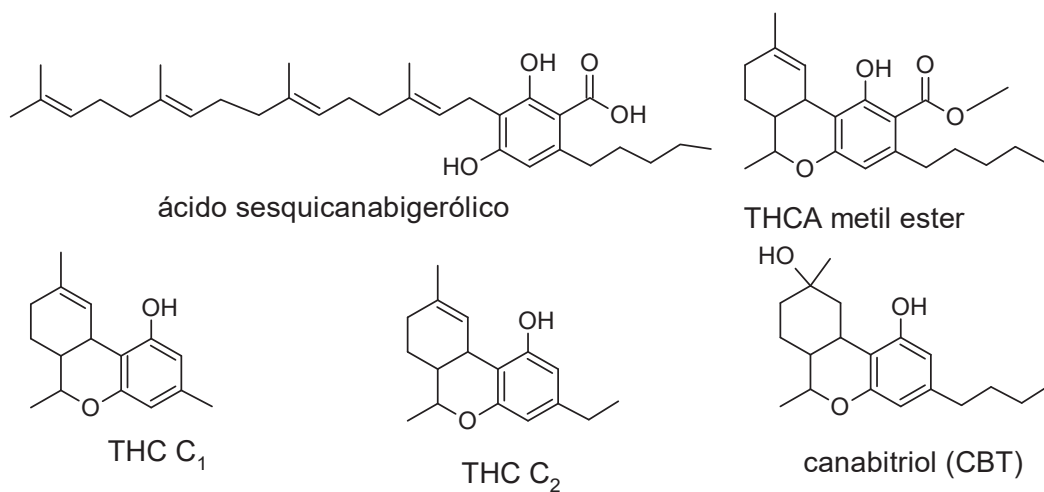


Figura 13: Variedades de canabinoides minoritários

TABELA 1 CANABINOIDES CONSTITUINTES DA CANNABIS CLASSIFICADOS POR CLASSES

CLASSE QUÍMICA	NÚMERO DE COMPONENTES
Δ^9 -THC	18
Δ^8 -THC	2
CBG	17
CBC	8
CBD	8
CBE	5
CBL	3
CBN	10
CBT	9
CANABINOIDES MISTOS	22

1.3.2 Endocanabinoides

Endocanabinoides são substâncias endógenas que atuam diretamente nos receptores canabinoides (CB1 e CB2), derivados de ácidos graxos, sendo o primeiro identificado em 1992, e o mais conhecido a etanol amida do ácido araquidônico, denominado anandamida.¹⁰ O segundo endocanabinoide mais conhecido é o aracdonoil glicerol (2-AG), descoberto pelo grupo de pesquisa do Prof. Mechoulam.¹¹

A concentração de 2-AG pode ser até 200 vezes maior que a concentração de anandamida em tecidos cerebrais.³¹ Os endocanabinoides são produzidos sobre demanda, associadas ao aumento intracelular de Ca^{2+} , em sítios pós-sinápticos em resposta a atividade sináptica.³²

Mais recentemente houve um aumento em desenvolvimento de outros compostos que atuam nos receptores CB1 e CB2, principalmente, com isso houve o surgimento dos chamados canabinoides sintéticos, que tanto são utilizados para pesquisas por novos tratamentos e como droga recreacional no mercado ilegal, conhecidas como *Spice*, alguns compostos possuem afinidade muito diferentes com o receptores e seus efeitos em longo prazo não são totalmente conhecidos.³³

1.4 Uso Medicinal

Com a evolução das pesquisas relacionadas à *Cannabis* e aos canabinoides diversos tratamentos possíveis foram investigados pela comunidade científica, incluindo muitos que já eram conhecidos há décadas ou até milhares de anos, mas agora com embasamento científico que permite compreender o canabinoide responsável por cada tratamento. O controle de crises epilépticas ganhou muito destaque, com destaque nos últimos quatro anos no Brasil, atribuído principalmente pelo CBD, foi descrito pela

primeira vez pelo professor Elisaldo Carlini, da UNIFESP em 1981³⁴, e continua sendo objeto de estudos por diversos grupos de pesquisas.^{35,36} Entretanto até o momento o mecanismo de ação não foi totalmente elucidado.³⁷ O uso de Cannabis está associado ao alívio de sensação de náuseas decorrentes de tratamentos de quimioterapia³⁸, colaborando de forma associada ao aumento de apetite nesses pacientes.³⁹ Outros tratamentos reconhecidos como eficazes são para dor crônica⁴⁰ e esclerose múltipla, além de outros tratamentos que continuam sendo investigados, relacionados a transtornos de sono⁴¹, ansiedade e depressão⁴², doenças autoimunes, glaucoma, recuperação óssea e câncer⁴³.

1.5 MÉTODOS DE ANÁLISE

Os canabinoides podem facilmente ser identificados por técnicas colorimétricas e cromatográficas. Análises colorimétricas com o uso de Fast Blue B permitem identificar a presença de canabinoides sem que haja alguma seletividade entre eles,⁴⁴ enquanto o reagente de Beam permite identificar CBD, CBG e seus derivados ácidos, sem que haja interferência de THC e outros canabinoides.⁴⁵ Qualquer outra informação quantitativa fica muito restrita para esse tipo de análise, a aplicação conjunta de outra técnica mais sofisticada que permita elevar a seletividade da técnica, como, por exemplo, cromatográficas, espectrofotométricas.⁴⁴

A cromatografia em camada delgada (CCD) já possibilita a identificação qualitativa de determinados canabinoides, ácidos ou não, desde que acompanhada do uso de padrões. Pode ser uma ótima alternativa, de baixo investimento inicial, que possibilite resultados mais conclusivos. Procedimentos de CCD validados utilizam diferentes combinações de fase móvel (FM). Para identificação de CBD e THC é descrito o uso de cromatoplaças de fase normal (sílica) e a mistura de hexano 4:1 éter etílico.⁴⁶

Para controle de qualidade de produtos de Cannabis, é preciso adotar técnicas cromatográficas mais precisas e que ofereçam resultados mais confiáveis. A técnica de cromatografia em fase gasosa (CG) é uma alternativa prática para a determinação de teores totais de canabinoides. Entretanto, devido ao emprego de alta temperatura para seu funcionamento, é inevitável a ocorrência de descarboxilação dos canabinoides imediatamente ao injetar a

amostra no equipamento, requerendo etapas para derivatização caso seja do interesse analisar canabinoides ácidos. Ao avaliar produtos já descarboxilados, ou não seja do interesse avaliar os canabinoides ácidos, essa é uma técnica muito adequada. Para detecção na técnica de CG, em análise de rotina, são frequentemente utilizados o detector por ionização por chama (*FID-flame ionization detector*), técnica sensível e de menor custo de operação e manutenção, mas com baixa seletividade quando comparada com detectores de espectrometria de massas (MS).⁴⁷

Detectores MS possibilitam a identificação qualitativa de compostos minoritários, mesmo em baixa concentração, na casa de parte por bilhão (ppb – $\mu\text{g/Kg}$). Além disso, o uso de detectores MS permite comparar os fragmentos de carga-massa singulares de cada composto, comparando-os com bibliotecas de referência, o que permite identificar a presença de determinado composto, mesmo sem possuir padrão de referência.⁴⁸ Para análises quantitativas detectores MS aumentam a seletividade da técnica por permitir que o sinal analítico seja obtido a partir de fragmentos carga-massa específico, evitando interferências da matriz.

Para uma avaliação e determinação dos canabinoides ácidos e não ácidos, visto que esses possuem propriedades terapêuticas distintas. Para isso a técnica de cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE) atende perfeitamente, por não requerer aquecimento para sua operação, as análises são realizadas a temperaturas próximas à ambiente.⁴⁹

2 Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo desenvolver metodologia de análise para traçar o perfil da composição de canabinoides em extratos de *Cannabis*, utilizados para fins medicinais no Brasil, assim como realizar a quantificação dos principais canabinoides, utilizando a técnica de cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas.

Objetivos específicos:

- 1- Investigação dos parâmetros de tamanho de partícula, solvente extrator e tempo de extração.
- 2- Análise qualitativa da presença de canabinoides a partir do espectro de massas e tempo de retenção de cada composto
- 3- Desenvolvimento de curva de calibração para análise quantitativa de CBD e CBN.
- 4- Quantificação de canabinoides em amostras de extratos e flores de Cannabis, importados e artesanais.

3 Materiais e métodos

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Produtos Naturais e Ecologia Química da UFPR e algumas etapas foram executadas em parceria com a Universidad de La República, em Montevideu, no laboratório de Farmacognosia, sob orientação do professor Calos García. Dessa forma, as atividades serão agrupadas pelo local onde foram realizadas.

As atividades a seguir foram realizadas no Laboratório De Farmacognosia – UDELAR

Nessa etapa foram estudados alguns parâmetros para extração dos canabinoides em flores de *Cannabis*, analisando por cromatografia em fase gasosa com detector por ionização de chama (FID). As amostras de flores foram recebidas por doação do Instituto de Regulação e Controle da *Cannabis* (IRCCA), órgão governamental uruguaio responsável pelo controle dos cultivadores e clubes registrados naquele país. Essa amostra foi denominada IR074. Abaixo são descritos os métodos para cada etapa realizada.

3.1.1 CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA – CANABINOIDES

Os canabinoides em extratos de flores de *Cannabis* foram analisados utilizando a técnica de cromatografia em fase gasosa por padronização externa, acompanhando a razão de áreas dos canabinoides e do padrão interno (dibutil ftalato). O equipamento utilizado é um cromatógrafo Shimadzu 17-A, coluna capilar de sílica fundida Rtx-5MS (5% difenil + 94% dimetil polisiloxano), com 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm. Como gás de arraste foi empregado hélio. A programação de temperatura inicia a 200°C, 10°/min até 250°C, permanecendo por 6 minutos nessa temperatura, atingindo 280°C a 10°/min onde permanecerá por 3 minutos, totalizando 18 minutos de análise. Foi utilizado o equipamento no modo split em razão de 10, com injeção manual de 1 µL.

As soluções para análise foram preparadas com 0,250 mL de cada extrato a ser analisado, 0,500 mL de solução 0,2 mg/mL de padrão interno e 0,250 mL de metanol. Nesse momento a quantificação foi realizada seguindo a seguinte equação:

$$[THC] = \frac{[THC\ std] * pureza\ THC\ std}{[si\ std] * pureza\ SI} * \frac{área\ SI\ std}{área\ THC\ std} * \frac{[si\ amostra] * pureza\ SI * diluição * 100}{massa\ material\ vegetal}$$

Equação 1: Equação utilizada para realizar os cálculos de concentração dos canabinoides, exemplificado para o THC. [THC] corresponde a concentração final de canabinoide, [THC std] a concentração de canabinoide de referência, [SI std] a concentração do padrão interno na referência, valores de área SI e THC corresponde às áreas nos picos referentes ao padrão interno e canabinoide, respectivamente.

INVESTIGAÇÃO DAS VARIÁVEIS NO PROCESSO DE EXTRAÇÃO

3.1.2 ÁREA SUPERFICIAL

Para verificar a influência do tamanho de partícula do material vegetal no processo de extração, foram realizados ensaios divididos em três categorias de tamanho. Para categoria de tamanho grande foi utilizada flores inteiras, com massa próxima a um grama, sem nenhum seccionamento. Na categoria média, cerca de 1,0g de flores foram cortadas em aproximadamente dez pedaços pequenos. O último grupo, de pedaços pequenos, foi utilizado um equipamento moedor, feito especificamente para o processo de moagem de flores de *Cannabis*, conhecido popularmente no Brasil como *dichavador* (Figura 14), o equipamento divide o material em pequenas partículas e deverá ser limpo com o auxílio de um pincel para recuperar o material vegetal e resina retida nas paredes do equipamento. Para realizar a extração foi utilizada a razão mg de material vegetal/mL de solvente próximo a dez. Cada ensaio foi realizado em triplicata e analisado por cromatografia em fase gasosa. O material foi mantido sob agitação magnética por cerca de vinte e quatro horas, protegido da luz e sem aquecimento. Após o tempo de extração o material foi filtrado, lavado e transferido a um balão volumétrico de cem mililitros.



Figura 14: Imagem ilustrativa do moedor utilizado no processo de moagem.

3.1.3 SOLVENTE EXTRATOR

Com objetivo de verificar a influência do solvente no processo de extração por maceração dinâmica, foi utilizada uma variação de cinco solventes e misturas de polaridades distintas, sendo etanol, metanol: clorofórmio 9:1, metanol: clorofórmio 1:1, acetato de etila: hexano 1:1 e hexano. Aproximadamente um grama de material vegetal triturado foi mantido sob agitação magnética por trinta minutos, em seguida filtrado e a solução transferida a um balão volumétrico de cem mililitros. Cada solução foi analisada por cromatografia em fase gasosa.

3.1.4 TEMPO

Ensaios objetivando verificar a influência do tempo no processo de extração de canabinoides em flores de *Cannabis* foram realizados utilizando como solvente a solução clorofórmio: metanol 1:9, com material vegetal finamente dividido, sob agitação

magnética nos tempos de 5, 15, 30, 60 e 90 minutos. Os ensaios foram realizados em triplicata e analisados por cromatografia em fase gasosa.

A descrição a seguir foi realizada no Laboratório de Produtos Naturais e Ecologia Química-UFPR

3.2 Materiais

O material utilizado para a realização desse trabalho consiste em metanol grau HPLC (Panreac), heptano grau PA (Quimex), sulfato de sódio grau PA (Biotec). Para a aferição de volume foram utilizadas micropipetas automáticas (Labmatec – HTC) com volumes de 2 a 20 μ L, 10 a 100 μ L e 100 a 1000 μ L. As análises foram executadas utilizando um equipamento de cromatografia em fase gasosa da marca Shimadzu modelo 2010, com injetor automático modelo AOC-5000 plus, acoplado ao espectrômetro de massas do tipo triploquadrupolo, modelo TQ8040. Como gás de arraste foi utilizado gás hélio (White Martins) para cromatografia, pureza 5.0. Os padrões analíticos de CBD e CBN possuem pureza maior que 99%. Como padrão interno foi utilizado dibutilftalato PA, marca NEON, do qual foi preparada uma solução estoque de concentração 0,2mg/mL.

3.3 Amostras

As amostras analisadas nesse trabalho foram adquiridas por doação voluntária de pessoas que realizam tratamento com extratos de *Cannabis* no Brasil, distribuídas entre amostras comerciais importadas, amostras produzidas no Brasil com autorização judicial e amostras produzidas de forma artesanal em território brasileiro. As amostras foram nomeadas com a sigla do estado de origem e numeradas conforme ordem de recebimento (Figura 15).

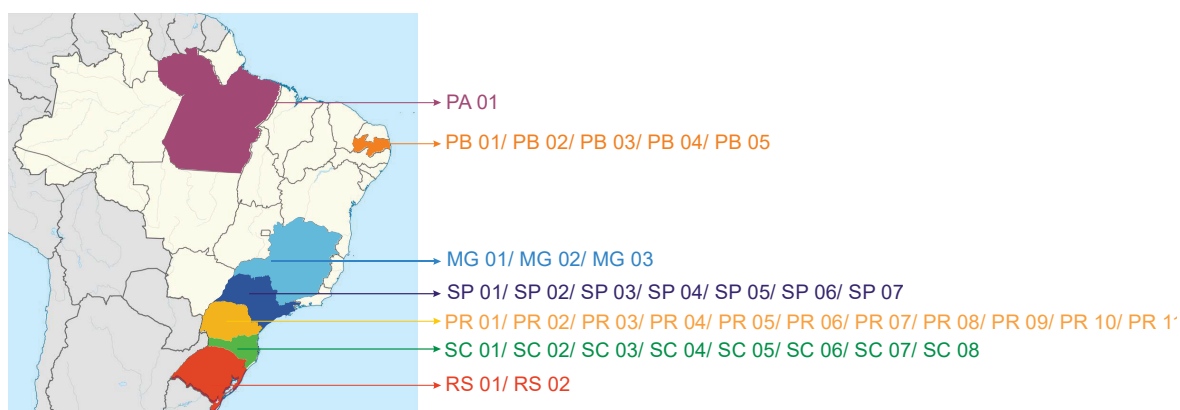


Figura 15: Procedência das amostras analisadas organizadas conforme estado de origem

Ao todo foram analisadas trinta e nove (39) amostras e, para facilitar a compreensão, as amostras foram divididas entre comerciais e artesanais e em grupos a partir da sua forma de apresentação, considerando, quando houve, o veículo no qual o extrato foi diluído, extratos concentrados e flores. A classificação foi realizada com base na descrição contida no rótulo dos produtos comerciais, em informações descritas pelo fornecedor da amostra e dos dados obtidos em ensaios preliminares à extração.

Os extratos concentrados são produzidos pela extração etanólica de flores e/ou folhas e talos de plantas de *Cannabis*, com posterior evaporação do solvente. A amostra se apresenta na forma de uma pasta escura de alta viscosidade, podendo conter partículas insolúveis, assumindo colorações que variam ente o amarelo claro a um verde intenso. Devido à imprecisão quanto a forma de preparo e material vegetal de origem de cada amostra não é possível definir a causa, mas associando os relatos fornecidos pelos doadores de amostras, fatores como presença de folhas e tempo de exposição ao solvente podem colaborar para que o extrato final assuma coloração esverdeada (Figura 16A).

Outra classe é composta por extratos de *Cannabis* diluídos em azeite/óleos vegetais composto principalmente por ácidos graxos de cadeia média e longa, como azeite de oliva e óleo de coco, por exemplo. Essas amostras são apresentadas na forma de um líquido a temperatura ambiente podendo solidificar conforme as propriedades de cada óleo. Entre amostras artesanais foi possível verificar maior quantidade de partículas insolúveis, ocorrendo inclusive precipitação visível dessas partículas (Figura 16E).

As amostras diluídas em glicerina podem ser produzidas pela dissolução de extratos nesse veículo ou extração das partes aéreas da planta diretamente com esse solvente, essa classe de amostras apresenta sabor adocicado característico da glicerina e baixa viscosidade (Figura 16B).

Seis amostras de flores femininas de *Cannabis* foram analisadas, cinco dessas têm como origem sementes com genéticas híbridas, das quais foram colhidas e tiveram as folhas removidas, permanecendo apenas as inflorescências. A amostra PR12 foi recebida com informações que provém do mercado ilegal (Figura 16 C e D). As amostras estão separadas por classe distribuídas em relação a sua origem, se é comercial ou produzido artesanalmente, e conforme a apresentação de cada uma, diferenciando entre as amostras dissolvidas em azeite ou glicerina, amostras de extratos concentrados e flores. Os dados estão descritos na

Tabela 2.

Tabela 2: Distribuição das amostras analisadas conforme origem (comercial ou artesanal) e pela forma de apresentação, considerando o veículo utilizado para diluição, extratos concentrados e flores.

CATEGORIA	AMOSTRAS
Importado Diluído Em Óleo	PR01; PR03; PR04; PR05; RS01; PR13
Importado Diluído Em Glicerina	PR02
Importado Concentrado	SP05
Artesanal Concentrado	PR06; SC03; SP02; SC04; SP03; SC05; SP04; SC06; SP06; SC07; SC01; SC08; SC02; RS02; MG03
Artesanal Diluído Em Azeite	SP01; SP07; MG02; PA01
Artesanal Diluído Em Glicerina	MG01; PB01; PB02; PB03; PB04; PB05
Flores	PR07; PR08; PR09; PR10; PR11; PR12

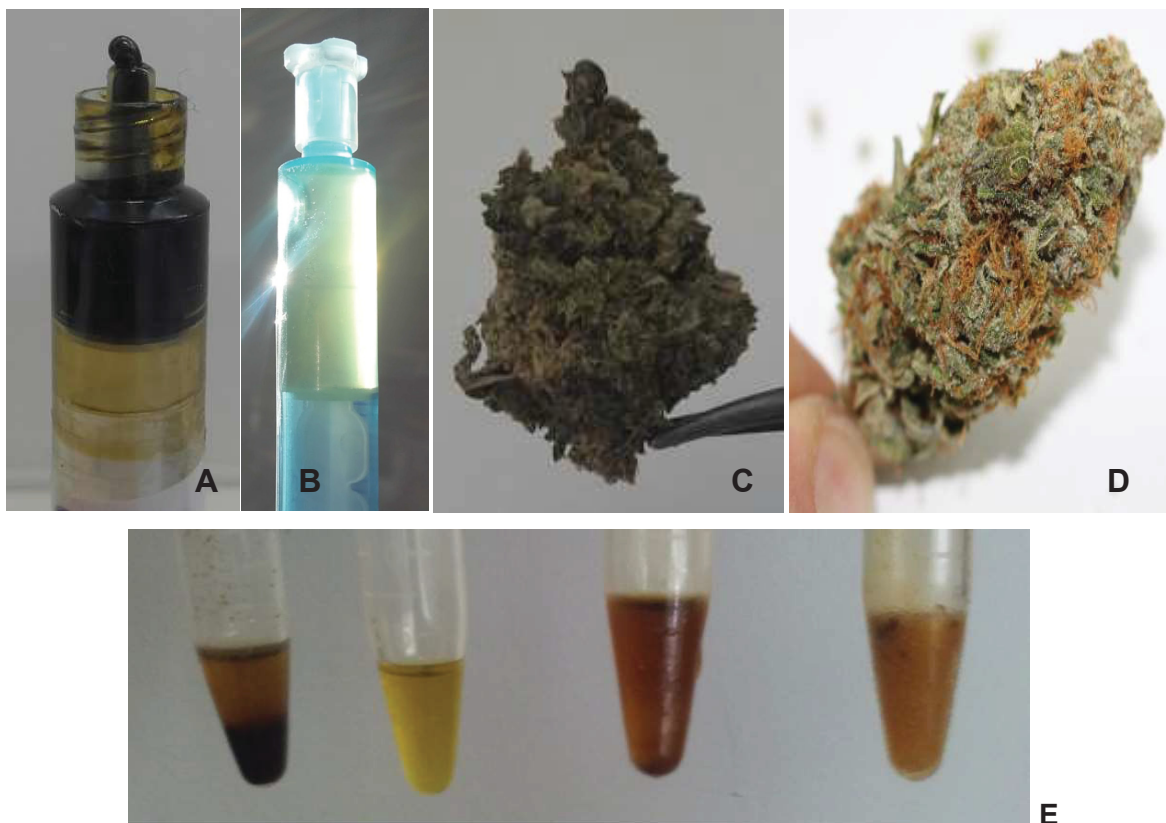


Figura 16: Ilustração das amostras que foram analisadas. A) amostra de extrato concentrado; B) amostra de extrato de cannabis dissolvido em Glicerina; C) amostra de flor PR 12; D) amostra PR11; E) amostras de extratos de Cannabis dissolvidos em azeite, da esquerda para a direita SP07, PR13, PR03 e PR05

3.4 Procedimento experimental

3.4.1 Preparo de amostra

3.4.1.1 Extratos de Cannabis concentrados

As amostras de extrato concentrado foram preparadas com aproximadamente 20 mg da amostra, com posterior dissolução em 8 mL de metanol, sob agitação magnética por aproximadamente 10 minutos. Em seguida o material foi filtrado e transferido diretamente para um balão volumétrico de 10 mL. O balão teve seu volume ajustado até o menisco seguido de agitação branda para homogeneização. Para o preparo da solução de análise foram coletados 0,100 mL da solução da amostra, diluídos em 0,50 mL de solução de padrão interno e 0,40 mL de metanol.

3.4.1.2 Extratos de Cannabis diluídos em azeite

As amostras diluídas em azeite necessitam de um preparo de amostra para remoção do veículo no qual os canabinoides estão dissolvidos, possibilitando a análise por cromatografia em fase gasosa. A matriz é composta principalmente por triacilgliceróis de cadeia média a longa. Para isso, aproximadamente 250mg de amostra foram coletados, transferidos para um frasco com tampa de rosca e então 8,0mL de metanol foram adicionados. A amostra permaneceu sob agitação magnética por aproximadamente 20 minutos. Depois de decorrido o tempo estabelecido a amostra permaneceu em repouso para separação de fases, visto que os triacilgliceróis não são solúveis em metanol. O solvente foi removido com auxílio de uma pipeta de Pasteur e o processo repetido mais duas vezes, totalizando três extrações. No último procedimento foi adicionado ao frasco 1,0mL de heptano, possibilitando a dissolução dos triacilgliceróis, facilitando a separação de fases e a remoção total do metanol. Ao fim do processo foi obtido um volume total de metanol de aproximadamente 24mL, que foram transferidos para um balão volumétrico de 25mL, o volume foi ajustado até o menisco e em seguida foi realizada a homogeneização por agitação manual. Para o preparo da solução de análise, foram coletados volumes entre 0,05 e 0,250mL, dependendo da concentração da amostra, aos quais foram adicionados 0,50mL de padrão interno e o volume foi completado até um total de 1,00mL.

3.4.1.3 Extratos de Cannabis diluídos em glicerina

De forma semelhante às amostras diluídas em azeite, as amostras diluídas em glicerina devem passar por uma etapa de remoção da matriz na qual os canabinoides

estão dissolvidos. Para isso, uma porção de aproximadamente 1g da amostra foi coletada e transferida para um frasco com tampa de rosca, em seguida foi adicionado 3,0mL de heptano e 1,0mL de água destilada, visto que os canabinoides possuem grande afinidade com solventes de baixa polaridade como heptano e baixa afinidade com água. A mistura foi mantida sob agitação magnética por 20 minutos. Em alguns casos houve a formação de emulsão entre as fases, o que dificulta a separação das fases. Para contornar esse ocorrido foi adicionada ao frasco uma pequena quantidade de NaCl, que promove o aumento da tensão superficial da água, diminuindo significativamente a presença de emulsão. A fase orgânica foi separada com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e transferida para um frasco Erlenmeyer. O procedimento de extração foi repetido mais duas vezes. Ao frasco contendo as três frações orgânicas (aproximadamente 9,0mL), foi adicionada uma pequena quantidade de sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) como agente secante, removendo a água residual contida no solvente. A fase orgânica foi filtrada, transferida a um balão volumétrico de 10,0mL e o volume ajustado até o menisco com heptano. Para o preparo da solução de análise foram coletados 0,90mL da solução contendo a amostra aos quais foram adicionados 0,10mL de solução de padrão interno.

3.4.1.4 Flores

Para análise das flores de *Cannabis*, cada amostra foi mantida em estufa a 35°C pelo período de 24h, até que não fosse verificada variação na massa da amostra. Após secagem o material foi finamente dividido com o auxílio de uma tesoura de aço inox, previamente limpa e seca. Todo o material moído foi transferido para um frasco Erlenmeyer. Cada extração utiliza aproximadamente 250mg de material vegetal seco. Ao frasco foi adicionado 25mL da solução metanol: clorofórmio (9:1 v/v) e então todo o material foi mantido sob agitação por 30 minutos. Após o tempo estabelecido o material foi filtrado e transferido diretamente para um balão volumétrico de 25mL e seu volume foi ajustado até o menisco. Cada análise foi realizada ao menos em duplicata. Em seguida as soluções de análise foram preparadas com 0,25mL de extrato adicionado de 0,25mL de metanol e 0,50mL de padrão interno.

3.5 Condições Cromatográficas

Foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida do tipo Rtx-5MS, que possui fase estacionária composta de 5% difenil + 95% dimetilpolisiloxano, com 30m de comprimento, 0,25mm de diâmetro e espessura da camada interna de 0,25 μm , utilizando hélio como gás de arraste. O equipamento foi programado em modo split de razão 1:90, com injetor a 250°C e sistema de ionização de impacto de elétrons a 70eV. A programação de temperatura inicia em 200°C, aquecendo em uma taxa de 10°C/min

até 250°C, permanecendo por 6 minutos, atingindo 280°C a 10°C/min, temperatura que permanece por 3 minutos, totalizando um tempo total de 18 minutos cada análise. A análise inicia em 3,5min após a injeção da amostra, em modo SCAN, com intervalo espectrométrico entre 60 e 400 m/z.

3.6 Curva Analítica

As curvas analíticas foram obtidas a partir da diluição da solução analítica padrão de 1,00mg/mL, sendo para o CBD as concentrações de 5, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175 e 200µg/mL (ppb), enquanto para CBN as concentrações foram de 5, 10, 15, 20, 25, 35, 50, 75, 100 e 125µg/mL. Em todas as soluções dos padrões CBD e CBN foi adicionado 0,5 mL da solução de padrão interno dibutilftalato (DBF) em concentração de 200µg/mL. Cada ponto foi analisado em quadruplicata e o monitoramento do sinal analítico de cada composto foi realizado a partir do pico base e tempo de retenção relativo. O tratamento dos dados foi realizado com auxílio do software MS Excel®

3.6.1 Limite de detecção

O limite de detecção foi estabelecido considerando os picos cromatográficos com razão sinal ruído superior ou igual a 3,0.

3.6.2 Limite de Quantificação

O limite de quantificação (LQ) foi determinado conforme descrito na resolução RE 899 da ANVISA, onde o LQ corresponde à razão de dez vezes o desvio padrão (DP) pelo valor da inclinação da curva (IC).⁵⁰

$$LQ = \frac{10 \times DP}{IC}$$

4 Resultados e Discussão

4.1 Laboratório de Farmacognosia - UDELAR

Nesse trabalho foi possível realizar a análise da composição de canabinoides em extratos de *Cannabis*, identificando ao todo sete canabinoides (Δ^9 -THC, CBD, CBN, CBG, CBC, THCV e Δ^8 -THC), e realizando a quantificação de três principais compostos (Δ^9 -THC, CBD e CBN). As análises da composição de canabinoides realizadas pela técnica de cromatografia em fase gasosa não permite a identificação das espécies ácidas, devido ao processo de descarboxilação que ocorre no momento de injeção da amostra no equipamento, a menos que seja realizado o processo de derivatização. Dessa forma, a identificação dos compostos presentes nas amostras analisadas será informada apenas na forma dos canabinoides neutros.

Os resultados a seguir foram obtidos no Laboratório de Farmacognosia – UDELAR (Uruguai), através de um estágio de 45 dias sob a supervisão do Prof. Dr. Carlos Garcia Carnelli.

4.1.1 Investigação dos Parâmetros de Extração

4.1.1.1 Área Superficial

O primeiro ensaio visa estudar a influência da área superficial do material vegetal no processo de extração. No primeiro momento foi possível verificar a predominância de THC na composição do extrato através de análises por CG/EM. Os outros canabinoides permaneceram abaixo de um por cento em relação ao THC. Analisando os dados obtidos nesse ensaio, diferente do esperado, as amostras que tiveram o material vegetal finamente dividido apresentaram menores teores de THC (Gráfico 1A). Esse fato levou a proposição de dois possíveis erros experimentais, uma possível perda de material no processo de moagem, ou um erro na escolha das flores, não sendo considerada a variação entre as amostras. Para solucionar isso foram coletadas flores de aspectos e massa semelhantes e então realizado novamente o procedimento com amostras de tamanho pequeno e tamanho grande (Gráfico 1B). Nesse segundo caso as amostras de flores finamente divididas apresentaram os maiores teores de THC, indicando que houve um erro relacionado à amostragem no primeiro ensaio. Dessa forma é possível inferir que há diferença significativa de concentração canabinoides em diferentes partes da planta.

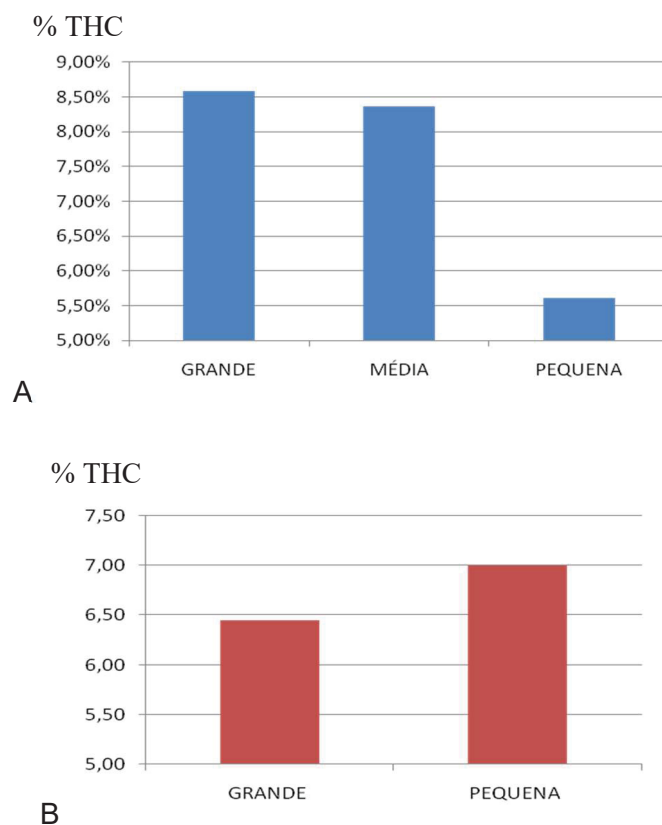


Gráfico 1: Concentração de THC extraída em função do tamanho de partícula utilizada no ensaio. Os dados estão em porcentagem em relação à massa seca. A) ensaio 1 e B) ensaio 2.

4.1.1.2 Solvente

O estudo relacionado ao solvente utilizado para a extração não apresentou variação significativa entre o etanol, que apresentou maior teor de THC em seu extrato, permanecendo a concentração final muito próxima às misturas de metanol: clorofórmio 9:1 e 1:1, assim como para mistura hexano: acetato de etila 1:1. Apenas a extração com hexano apresentou menor eficiência, além de extrair grande quantidade de ceras, o que dificulta a análise por cromatografia em fase gasosa (Gráfico 2). Para os próximos ensaios optou-se em utilizar a mistura metanol: clorofórmio 9:1 para a extração, visto que o etanol, apesar de melhor solvente extrator, possui um percentual de água próximo a 4%, o que deve ser evitado para análise de rotina, pois a água pode causar danos à coluna cromatográfica.

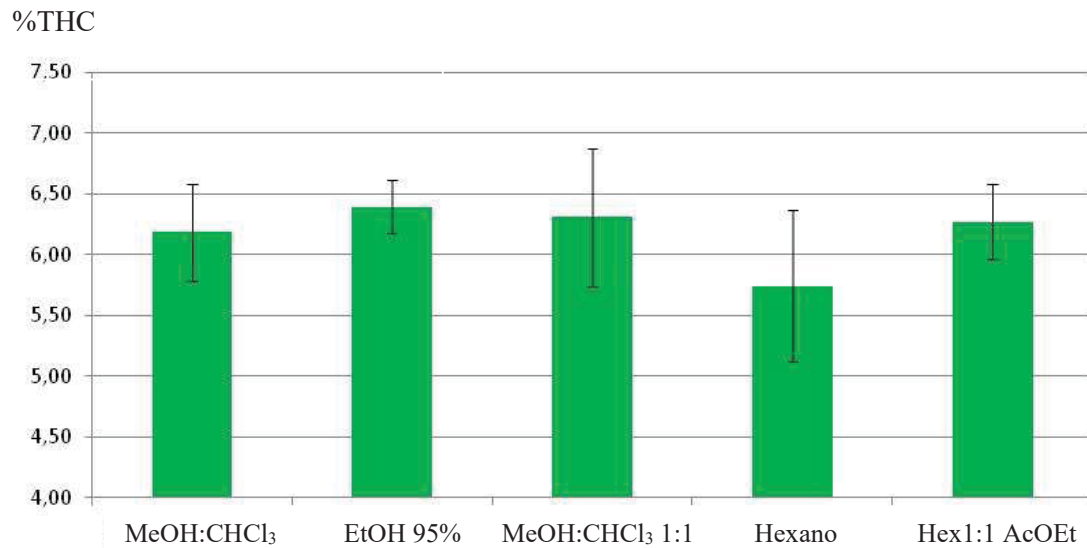


Gráfico 2: Percentual de THC em relação à massa seca de material vegetal em função do solvente utilizado

4.1.1.3 Tempo

No último parâmetro a ser avaliado no processo de extração, foi possível plotar um gráfico de concentração de THC em relação à massa seca de flores, em função do tempo de extração. Foi possível verificar que após trinta minutos de extração foi alcançado o equilíbrio, não havendo variação significativa da concentração nos tempos de extração de 60 e 90 minutos (Gráfico 3).

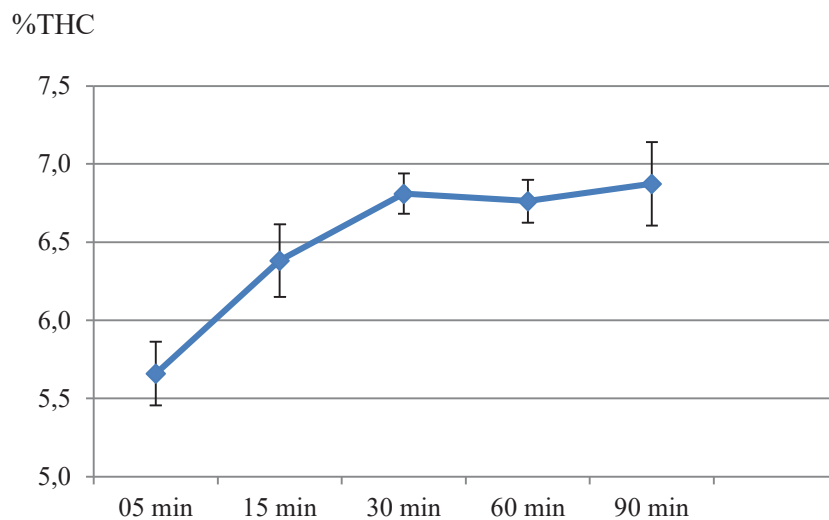


Gráfico 3: Valores de concentração de THC em relação à massa seca, em função do tempo de extração de flores de Cannabis

Esta etapa descrita a seguir foi realizada no LAPNEQ – UFPR.

4.2 Laboratório de Produtos Naturais e Ecologia Química - UFPR

Devido à instabilidade de soluções de THC, gerando a presença de produtos de degradação como o CBN, a concentração desse canabinoide é usualmente determinada utilizando a curva de calibração do CBN, considerando a razão entre os fatores de resposta igual a 1,⁵¹ as atividades descritas a seguir foram analisadas dessa forma.

4.2.1 Identificação Espectrométrica

Cada canabinoide foi identificado a partir de seu espectro de massas, comparando com dados da literatura. CBN pode ser identificado pelo pico base de $m/z=295$, correspondente à perda de um radical metila, após a movimentação de uma ligação dupla para o núcleo arila. Essa movimentação não sofre influência dos substituintes do anel aromático (Figura 17).

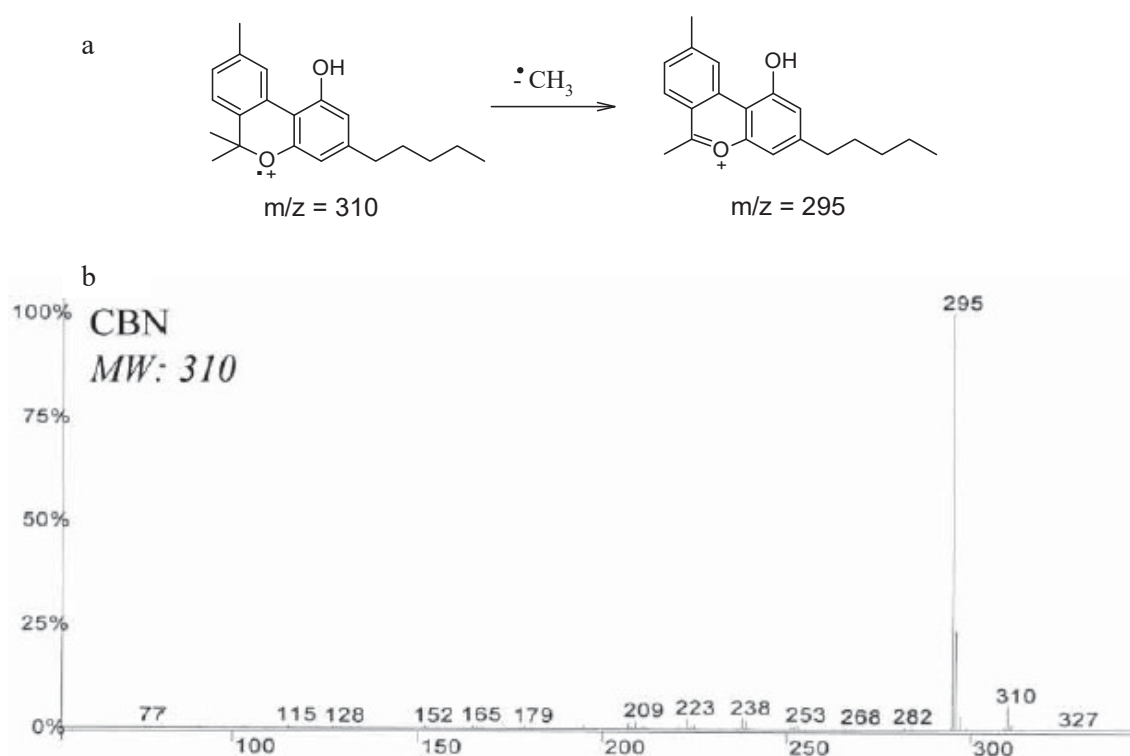


Figura 17: Proposta de fragmentação para formação do pico base apresentado no espectro de massas do CBN (a); Espectro de massas do CBN (b)

O espectro de massas apresentado para o CBD é muito semelhante ao do CBC, ambos com pico base de $m/z=231$. Entretanto é possível diferenciá-los, além dos tempos de retenção relativos ao padrão interno diferentes (1,55 para o CBC e 1,86 para o CBD), pela presença do fragmento $m/z=246$, presente apenas no espectro de massas

do CBD. Esse fragmento se origina de uma reação retro Diels-Alder, e na sequência uma perda de radical metila, originando o fragmento $m/z=231$ (Figura 18 e Figura 19). No espectro correspondente ao CBC o pico base de $m/z=231$ é originado a partir da eliminação de um radical C_6H_{11} , de massa 83, que conforme apresentado a proposta de fragmentação na Figura 20, dará origem ao pico base correspondente.

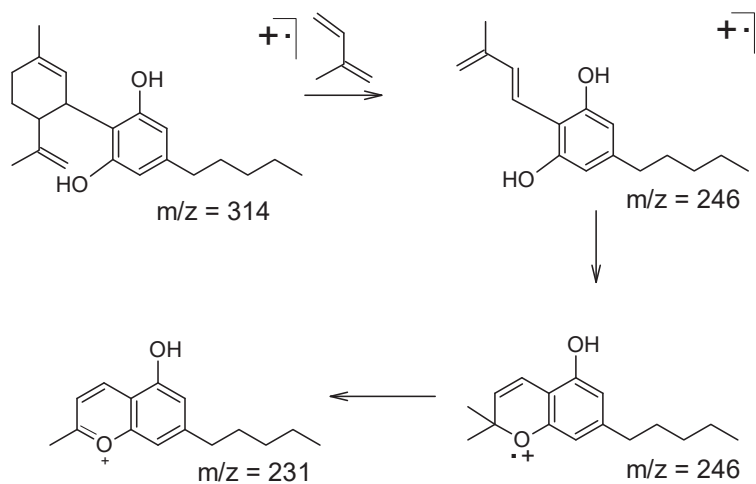


Figura 18: Proposta de fragmentação para formação da estrutura do pico base apresentado no espectro de massas do CBD.

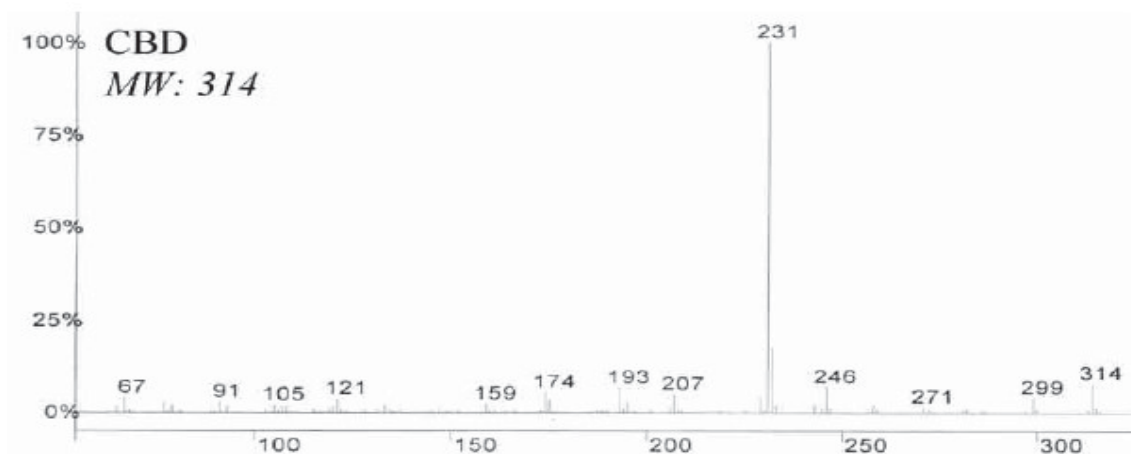


Figura 19: Espectro de massas do CBD

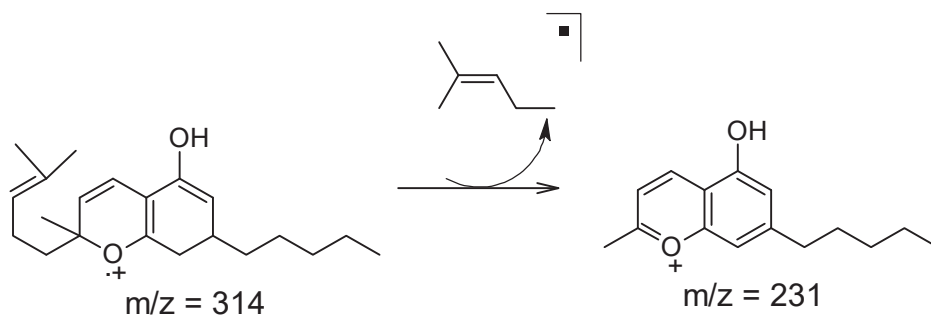


Figura 20: Proposta de fragmentação para formação do pico base apresentado no espectro de massas do CBC

No espectro de massas do THC é observado o íon molecular $m/z=314$, sendo o pico base gerado a partir da eliminação de um radical $\cdot\text{CH}_3$, originando o fragmento de $m/z=299$. Outro íon que colabora para a identificação do THC é formado pela perda, a partir do íon molecular, de um radical $\cdot\text{C}_3\text{H}_7$ e posterior formação do anel diidrofurano com razão massa carga de 271 (Figura 21, Figura 22).

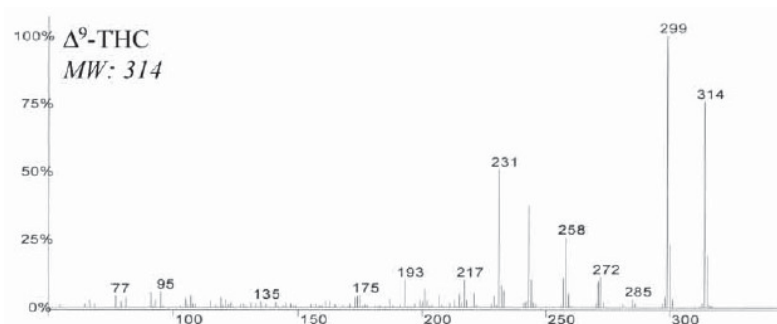


Figura 21: Espectro de massas do Δ^9 -THC⁵²

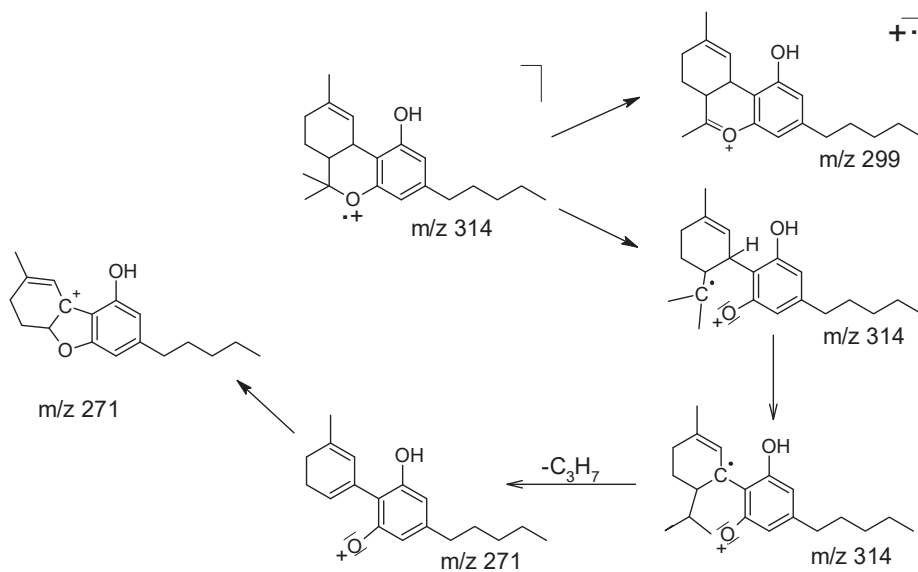
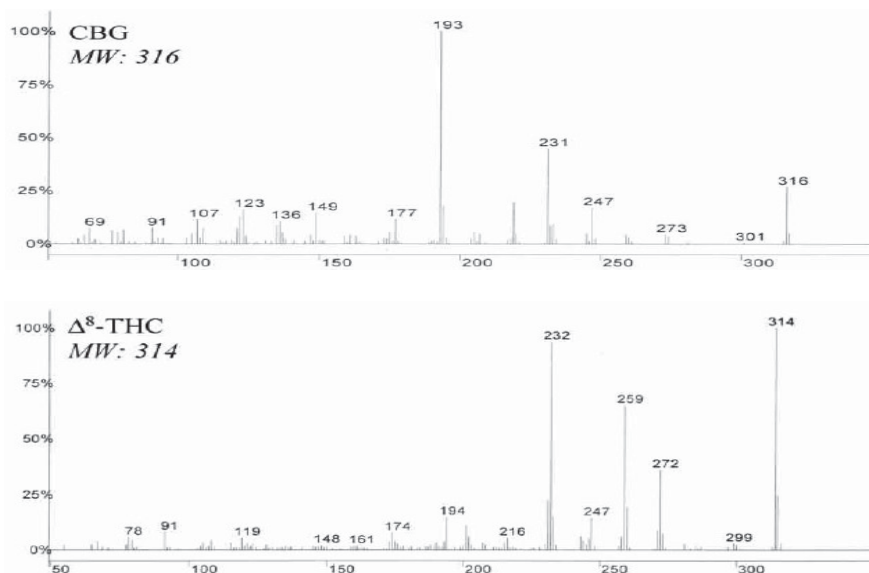


Figura 22: Proposta de fragmentação de massas para o THC, considerando a formação do pico base (271) e o pico com razão massa carga 271.

Os espectros dos compostos THCV (pico base m/z= 271), CBG (pico base m/z= 193) e Δ^8 -THC (pico base m/z= 314) foram comparados diretamente com dados da literatura (Figura 23).⁵²



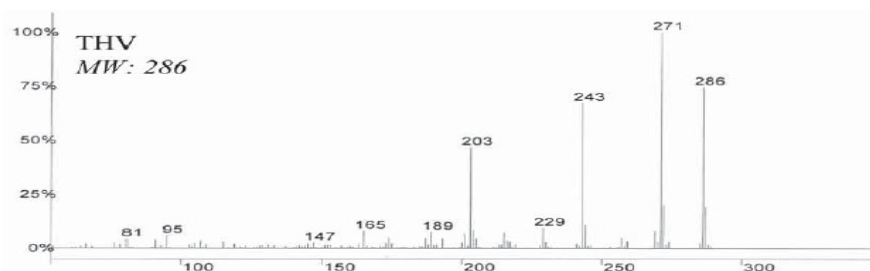


Figura 23: Referência de espectro de massas dos canabigerol (CBG), Δ^8 -Tetraidronacabinol (Δ^8 -THC) e tetraidrocanabivarin (THV/THCV).⁵²

4.2.2 Curva de calibração

A curva de calibração para o CBN foi ajustada aos pontos analíticos com perfil linear ($R^2 = 0,991$), abrangendo as concentrações entre 5 e 125 μ g/mL, sendo a calibração regida pela equação (1) a seguir, onde a_{CBN} corresponde à área do sinal analítico referente ao CBN e a_{DBF} ao sinal analítico do padrão interno (dibutilftalato). Cada ponto foi injetado em quadruplicata (Figura 24).

$$\frac{a_{CBN}}{a_{DBF}} = 0,006 \times [CBN] - 0,056 \quad (1)$$

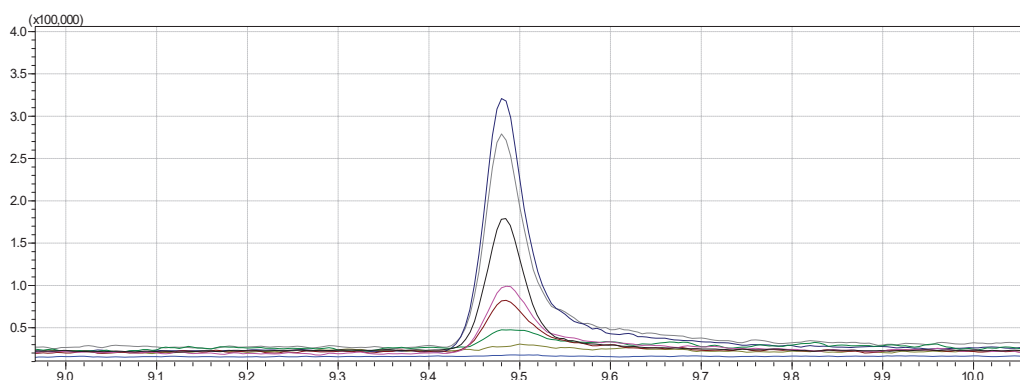


Figura 24: Cromatograma com os picos referente ao CBN nas concentrações de 5, 10, 25, 35, 50, 75, 100 e 125 μ g

Para desenvolver a curva para quantificação de CBD foram analisados padrões em dois intervalos de concentração, uma para concentrações mais diluídas (2), em concentrações de 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 75 μ g/mL (Gráfico 4), e outra para soluções mais concentradas de 75, 100, 125, 150, 175 e 200 μ g/mL (gráfico 5). Nos dois intervalos analisados as curvas assumiram perfil linear ($R^2 > 0,99$). Cada ponto foi injetado em quadruplicata.

$$\text{Concentrações} \leq 75\mu\text{g/mL} \quad \frac{a_{CBD}}{a_{DBF}} = 0,0014 \times [CBD] - 0,0017 \quad (R^2=0,9918) \quad (2)$$

$$\text{Concentrações} > 75\mu\text{g/mL} \quad \frac{a_{CBD}}{a_{DBF}} = 0,0047 \times [CBD] - 0,2466 \quad (R^2=0,9946) \quad (3)$$

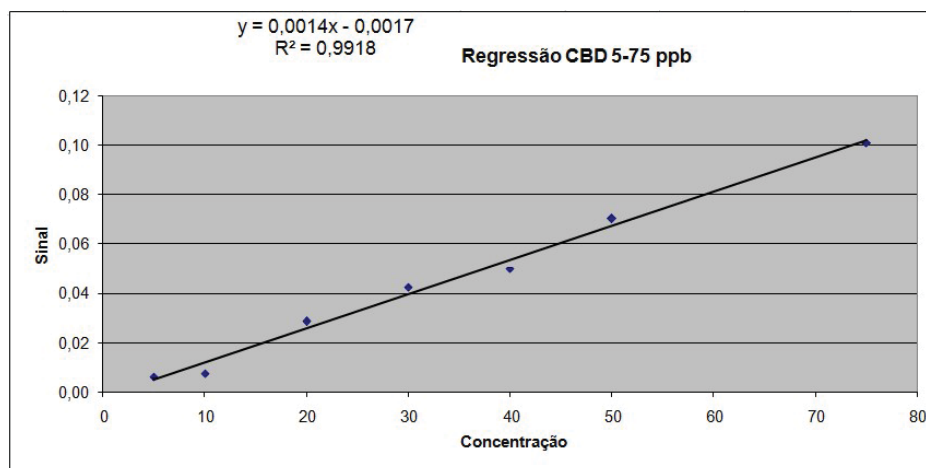


Gráfico 4: Regressão linear de CBD entre as concentrações de 5 a 75 ppb

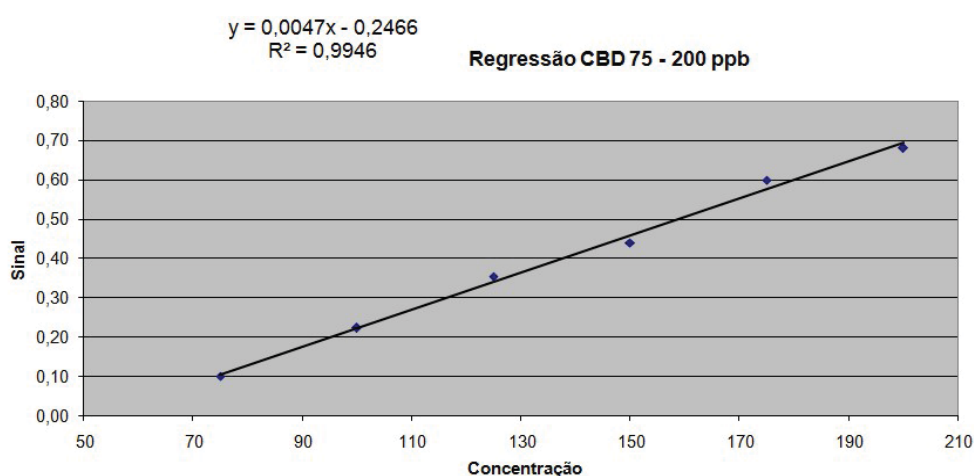


Gráfico 5: Regressão linear da curva analítica de CBD entre as concentrações de 75 e 200 ppb

4.2.3 Limite de quantificação

O limite de quantificação do método foi calculado e apresentou que a menor quantidade de analito que pode ser quantificada com precisão aceitável corresponde a 8,9 $\mu\text{g/mL}$ para CBN e 8,3 $\mu\text{g/mL}$ para CBD.

4.2.4 Avaliação Qualitativa

No momento de extração foi possível verificar semelhanças e diferenças no aspecto físico de cada amostra, como por exemplo cor, viscosidade. Em relação às amostras diluídas em azeite, SP01, SP07, PA01, MG01, PR01, PR03, PR04, PR13 apresentaram aspecto homogêneo e cor amarela a castanha, entretanto as amostras comerciais (PR03, PR04 e PR13) apresentaram menor teor de partículas insolúveis, demonstrando melhor eficiência no processo de filtração durante o preparo. O veículo utilizado (azeite) possui baixa afinidade por metanol, promovendo clara e fácil separação de fases após repouso, o que proporcionou um cromatograma livre de impurezas e fácil

identificação dos canabinoides (Figura 25). As extrações eram monitoradas utilizando revelador colorimétrico Fast Blue Salt B em placa de sílica, que por uma variação colorimétrica indica a presença de canabinoides, e confirmadas por análise em cromatografia em fase gasosa. O cromatograma da Figura 26 indica que não havia presença significativa de canabinoides no veículo após a extração, o sinal analítico referente aos canabinoides apresentou razão sinal ruído menor a 1,0.

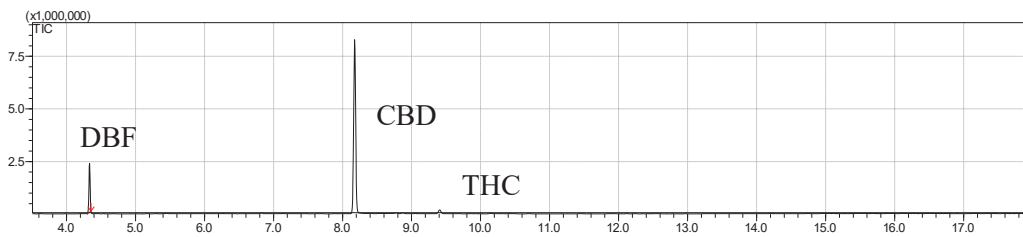


Figura 25: Cromatograma referente a amostras PR03, após extração dos canabinoides.

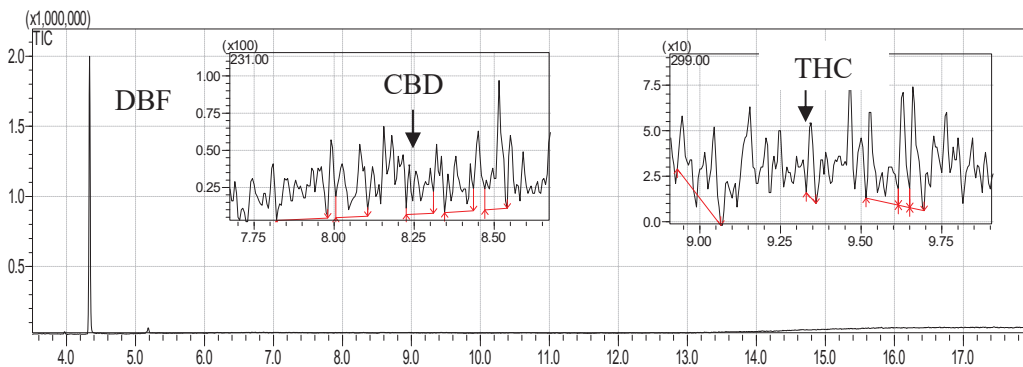


Figura 26: Cromatograma do veículo (azeite) da amostra PR03 após extração dos canabinoides.

As amostras PR01, PR05 e RS01 foram semelhantes nas análises por CG/EM por utilizarem outro tipo de azeite vegetal, com características de ácidos graxos de cadeia média, promovendo substancial solubilidade em metanol, deixando resíduos do veículo na solução de análise (Figura 27).

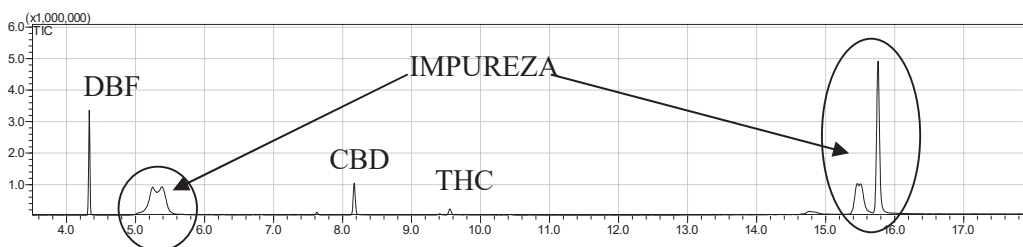


Figura 27: Cromatograma referente a análise cromatográfica da amostra PR05, demonstrando a presença de impurezas

As amostras de extratos dissolvidos em glicerina exigiram um procedimento de extração distinto daquele realizado para as amostras dissolvidas em azeite vegetal, devido à alta solubilidade da glicerina em metanol. Para isso a extração foi testada utilizando heptano para solubilizar os canabinoides e água para reter a glicerina. O método foi testado com uma amostra preparada dissolvendo uma pequena porção de um extrato rico em THC, sendo observada a remoção quantitativa dos canabinoides do meio de glicerina. Em todas as amostras ocorreu a formação de emulsão entre as fases de solvente, com diferentes intensidades. Para evitar a emulsão e facilitar a separação de fases foi adicionada uma pequena quantidade de NaCl no frasco, efeito que aumenta a tensão superficial da água e diminui a intensidade da emulsão.

Já nos primeiros ensaios foi possível verificar que as amostras em glicerina apresentavam baixa concentração de canabinoides, o que exige a utilização de maior quantidade de amostras para que seja possível a detecção dos canabinoides dentro do limite de quantificação do método analítico. Mesmo dessa forma foi possível realizar a quantificação, apenas para o canabinoide majoritário. A identificação de canabinoides minoritários ficou prejudicada pela baixa razão sinal/ruído referente a esses compostos. O cromatograma a seguir apresenta o perfil cromatográfico da amostra PB01, onde é possível verificar a presença de canabinoides, mas em concentração muito inferior quando comparadas à maioria das amostras em azeite vegetal, mesmo utilizando massas até 20 vezes maior para a realização do procedimento de extração (Figura 28). O fato de apresentar menor concentração de canabinoides não desqualifica a qualidade dessas amostras, é necessário compreender efeitos de biodisponibilidade dos canabinoides no organismo em função do veículo no qual esses compostos estão dissolvidos.

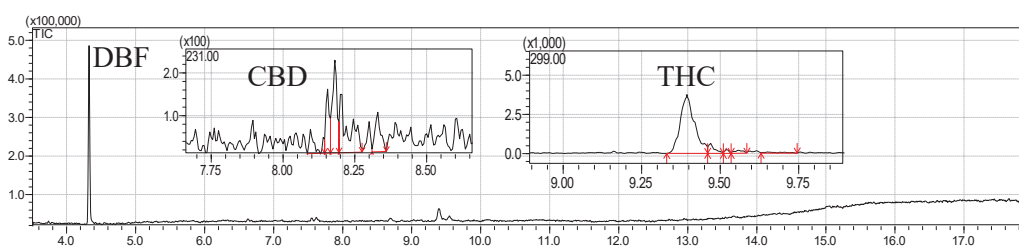


Figura 28: Cromatograma referente à amostra diluída em glicerina (PB01), destacando a baixa concentração de canabinoides

Amostras de extratos concentrados são as que exigiram menos etapas no preparo da amostra, visto que o extrato é facilmente dissolvido em metanol, podendo conter maior ou menor quantidade de partículas insolúveis. Apesar de não ter sido

avaliado por técnicas instrumentais, foi possível observar menor quantidade de resíduos de solvente na amostra comercial importada (SP05), já que o extrato apresenta aspecto mais sólido e seco em relação às amostras artesanais, que, à mesma temperatura, assumiam consistência de um líquido de alta viscosidade. De qualquer maneira esses extratos possuem alta concentração de canabinoides, principalmente THC nas amostras artesanais e CBD na amostra importada. Durante o preparo das amostras foi necessário aumentar a diluição para o preparo da solução de análise, visto que a alta concentração de canabinoides pode provocar danos ao detector do equipamento de cromatografia utilizado. Nos cromatogramas apresentados a seguir é possível verificar a alta concentração de THC na amostra SC01, sendo possível identificar facilmente a presença de outros canabinoides minoritários (Figura 29, Figura 30).

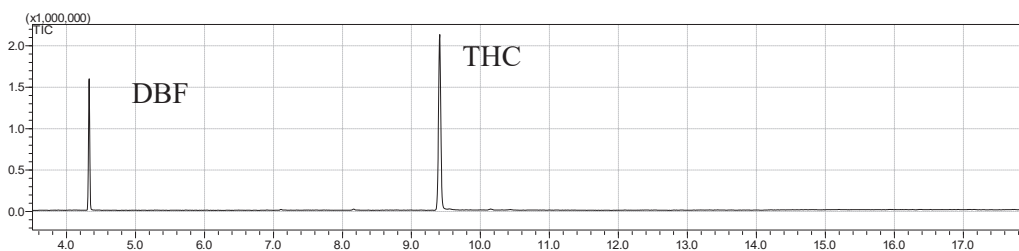


Figura 29: Cromatograma referente à análise da amostra de extrato de *Cannabis* concentrado (SC01), onde é possível destacar a presença de THC como canabinoide majoritário

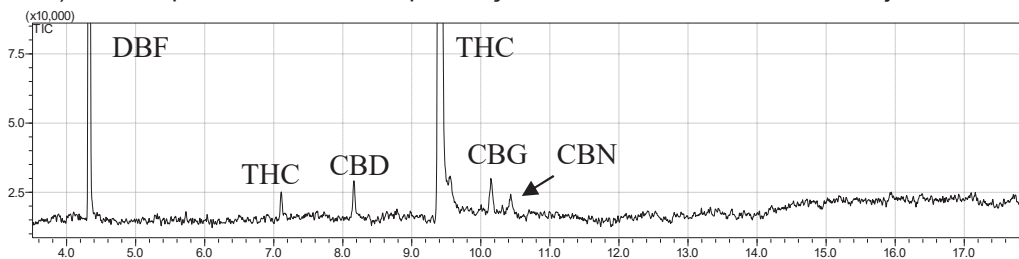


Figura 30: Cromatograma referente à análise da amostra de extrato de *Cannabis* concentrado (SC01), onde é possível identificar a presença de canabinoides minoritários.

As amostras de flores seguiram o procedimento de extração desenvolvido durante os ensaios de investigação dos parâmetros de extração, realizados na Universidad de La República (UDELAR). As amostras eram compostas por pequenas inflorescências, sem folhas, mas que não necessariamente representam a planta como um todo, visto que não houve descrição adequada do método para colheita dessas amostras, a modo de garantir que haja essa homogeneidade. De qualquer forma é possível compreender melhor a composição de canabinoides de algumas variedades comerciais. Foi possível verificar que THC representa o componente majoritário do extrato obtido a partir das flores analisadas, representado na Figura 31 pela amostra

PR09, o que ratifica a necessidade de compreender de forma mais ampla a composição e a genética de cada planta, para que seja possível direcionar cada planta ao tratamento clínico que necessite da composição apresentada por cada variedade.

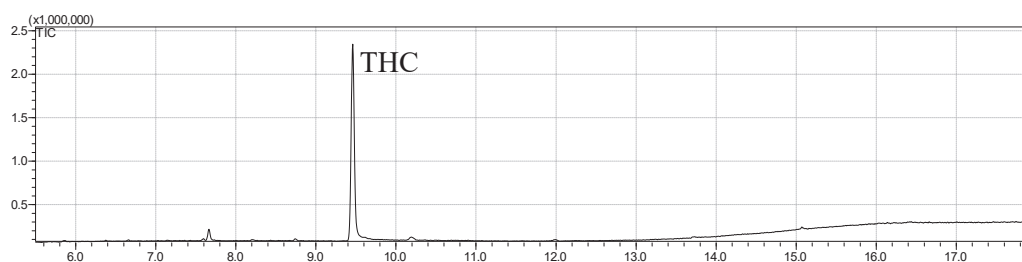


Figura 31: Cromatograma referente à análise de amostra PR09, sendo possível verificar a predominância de THC (9,45 min).

4.2.5 Avaliação Quantitativa

4.2.5.1 Amostras Importadas

Entre as amostras importadas, independente da forma de apresentação do produto, foi possível verificar a presença de CBD como canabinoide majoritário, ainda que haja diferença entre as concentrações das amostras. A amostra com maior concentração de CBD foi PR04 (26,8% ± 1,92) e PR05 (25,3% ± 0,67), sendo os únicos a superarem 25%. Outras duas amostras, RS01 e PR03, apresentaram elevado teor de CBD, 23,9 ± 0,66 e 22,5% ± 2,81, respectivamente. Duas amostras possuem CBD, entretanto em menor concentração, PR02(4,7% ± 0,46) e PR01(3,4% ± 0,07). As amostras importadas apresentam baixo teor de THC. Em apenas uma amostra foi possível quantificar THC e a concentração permaneceu abaixo de 0,2%, conforme descrito na tabela abaixo (Gráfico 6). Outros canabinoides (CBC e Δ^8 -THC) foram identificados nas amostras, mesmo que em baixíssima concentração, quando comparados ao CBD. A amostra PR13, mesmo trabalhando com massas superiores a 1g não apresentou concentração de canabinoides em concentração dentro do LQ (limite de quantificação).

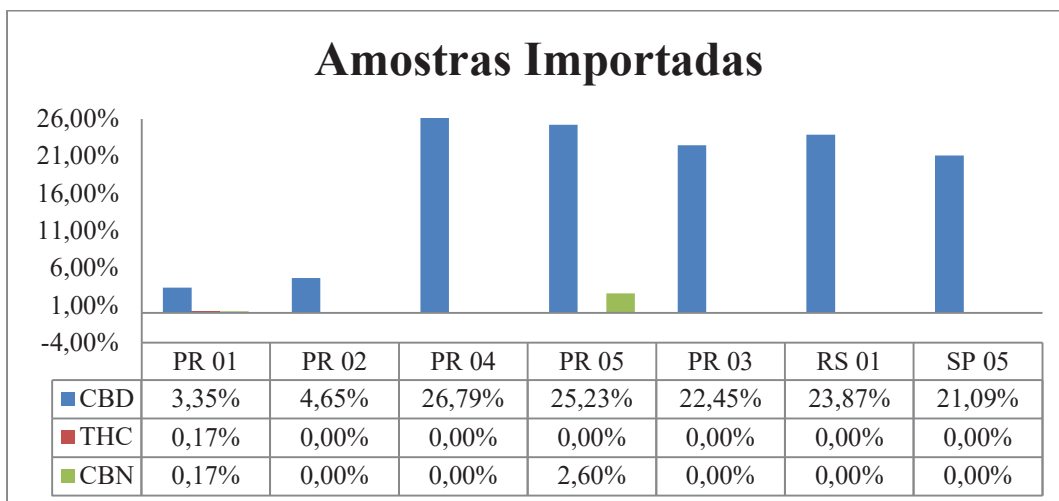


Gráfico 6: Dados de concentração (m/m) das amostras de extratos de *Cannabis* importadas. Nesse gráfico não há distinção da forma de apresentação de cada amostra

4.2.5.2 Amostras Artesanais

As amostras artesanais, independente da forma de apresentação, tiveram principalmente THC como canabinoide majoritário, com exceção de apenas duas amostras, PR06 e SP01, nas quais houve a prevalência de CBD. Essas duas amostras foram descritas como preparadas a partir da variedade comercial de *Cannabis* denominada *Harle-Tsu*, apresentada já como uma variedade comercial rica em CBD.⁵³ A concentração dos canabinoides varia em relação a forma de apresentação, extratos concentrados podem ultrapassar 20% de THC ou CBD, enquanto as amostras dissolvidas em glicerina não ultrapassaram 1%, mais diluído inclusive que extratos dissolvidos em azeite vegetal. Abaixo é apresentada a descrição por classe.

4.2.5.2.1 Extrato de Cannabis dissolvido em azeite

É possível verificar que as amostras artesanais dissolvidas em azeite apresentam menor concentração de canabinoides totais, em comparação com as amostras importadas, entretanto um número pequeno de amostras (4) dessa classe foram analisadas e essas contam com informações pouco detalhadas em relação ao preparo das amostras. A amostra mais concentrada foi MG02, que atingiu 3,42% ($\pm 1,28$), contendo também a maior concentração de CBN, correspondendo a quase 30% do canabinoide majoritário, indicando que o material vegetal que deu origem ao extrato foi colhido de forma tardia, ou armazenado de forma inadequada entre o período de colheita e a produção do extrato. Duas apresentaram concentração próximo a 1% do canabinoide majoritário, SP01 destaca-se pela presença de CBD (1,10% $\pm 0,10$) enquanto SP07 THC (1,20% $\pm 0,12$). A amostra PA01 foi a mais diluída (0,22% $\pm 0,07$) (Gráfico 7).

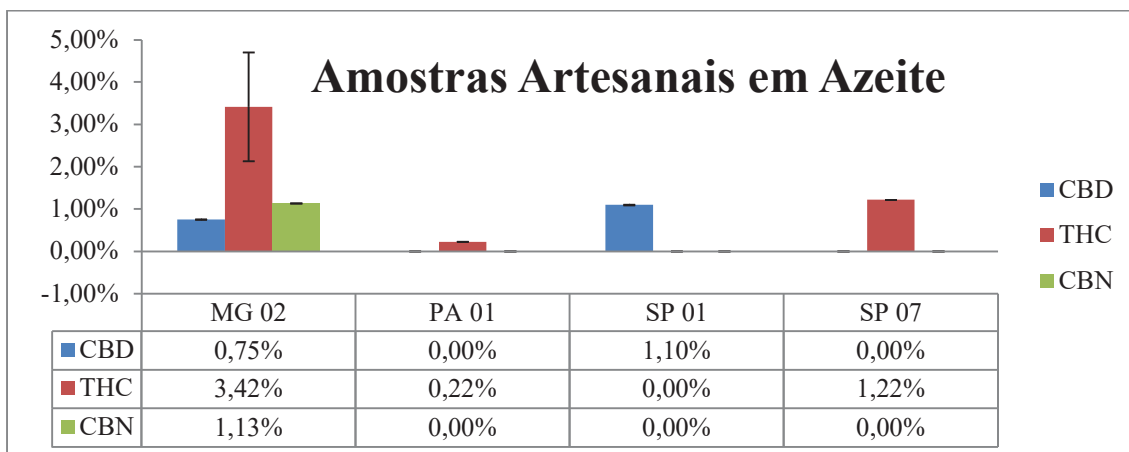


Gráfico 7: Dados de concentração (m/m) de canabinoides em amostras artesanais dissolvidas em azeite.

Devido à baixa concentração de canabinoides, a identificação de canabinoides minoritários foi prejudicada, foi possível identificar poucos componentes minoritários por amostra. Destaca-se a presença de CBD e CBN em três amostras, sendo que com maior intensidade em SP07, mas ainda abaixo do LQ. THCV foi encontrado em apenas uma amostra dessa classe (MG02), com intensidade muito próxima ao LD A amostra SP01, rica em CBD, apresentou apenas uma pequena quantidade de THC (Gráfico 8).

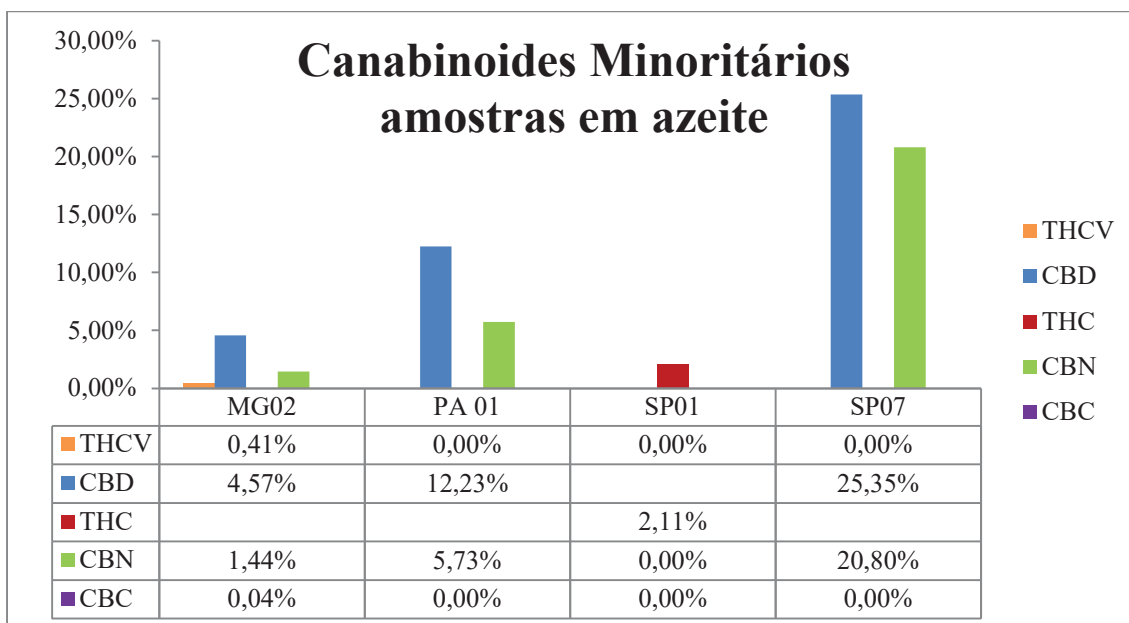


Gráfico 8: Canabinoides minoritários identificados em amostras de produção artesanal de extratos de Cannabis dissolvidos em azeite.

4.2.5.2.2 Glicerina

As amostras artesanais dissolvidas em glicerina apresentaram como semelhança a baixa concentração de canabinoides, sendo que nas amostras PB01 –

PB05, permaneceu abaixo de 0,1%, independente do canabinoide majoritário presente na amostra. A amostra mais concentrada, MG02, teve predominância de CBD, mas em baixa concentração, próxima a 0,9% (m/m) ($\pm 0,1$), enquanto THC corresponde a aproximadamente 50% em relação ao CBD, ou seja, a razão CBD:THC encontra-se próximo a 2:1. Para essas amostras, mesmo que tenha sido encontrada a presença de CBN, não foi possível quantificar, devido à baixa concentração, permanecendo abaixo do LQ do método (Gráfico 9). A dissolução de canabinoides em glicerina torna o produto mais palatável a algumas pessoas, devido ao sabor adocicado do glicerol, mas, talvez pelo modo de preparo das amostras analisadas, essa é classe de amostras analisadas com menor concentração de canabinoides, o que, como dito anteriormente é necessária maior compreensão quanto à biodisponibilidade dos canabinoides nesse veículo.

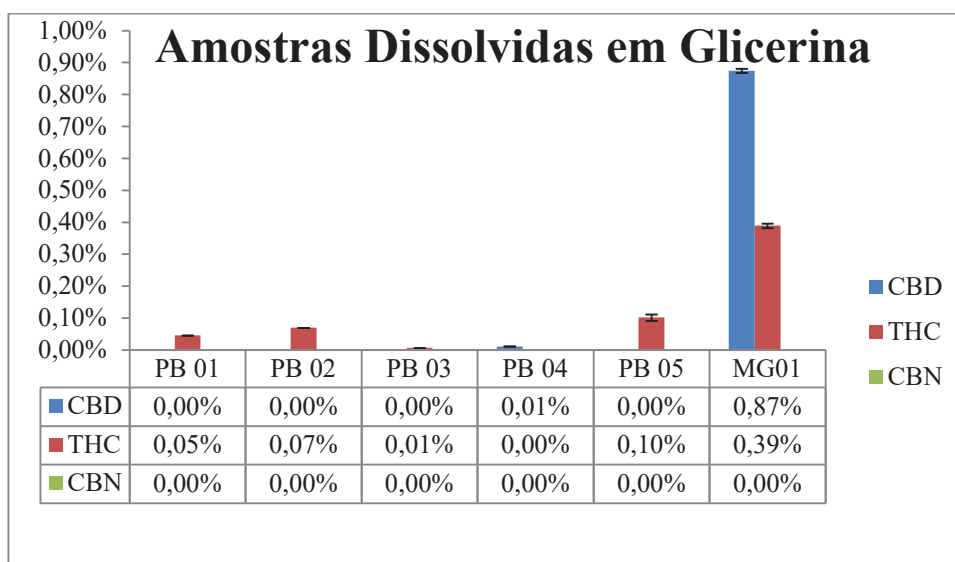


Gráfico 9: Dados de concentração de canabinoides em extratos de cannabis dissolvidas em glicerina

4.2.5.2.3 Extratos Concentrados

As amostras de extratos concentrados apresentaram a maior variedade de canabinoides por amostra analisada, sendo possível identificar a presença de sete canabinoides, sendo que CBD, CBN, THCV e CBG foram comuns quase a totalidade de amostras. Além do CBN, outro produto de degradação do componente majoritário (Δ^9 -THC) foi identificado em apenas duas das amostras analisadas, o Δ^8 -THC. A amostra SC02 foi a amostra que apresentou o maior número de canabinoides detectável, além dos compostos supracitados, houve a presença de CBC. A amostra PR06 é a única que contém THC em baixa concentração (Gráfico 10).

Em apenas uma amostra de extratos concentrados (PR06) foi identificado o CBD como o canabinoide majoritário, atingindo 22,6% ($\pm 0,1$), enquanto a concentração de THC ficou próximo a 4,1%, exibindo uma razão CBD:THC próximo a 5. Como descrito acima, esse extrato foi feito com flores de uma planta da variedade *Harle-Tsu*, mas como pode haver diferença genética entre as plantas da mesma variedade, não é possível garantir que todas as plantas apresentem esse perfil de composição.

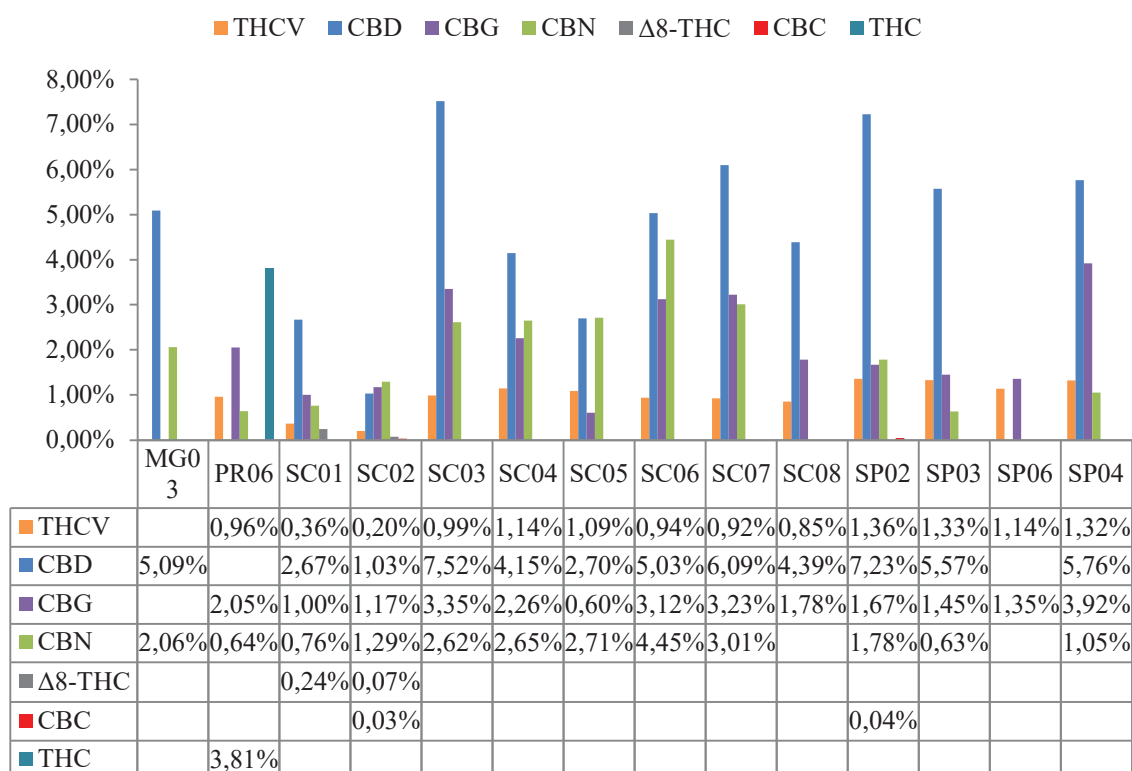


Gráfico 10: Gráfico de canabinoides minoritários identificados nas amostras de extratos de Cannabis concentrados. Os valores expressos representam a razão da área do sinal analítico do canabinoide pela área do canabinoide majoritário. Com exceção da amostra PR06, todas as amostras possuem THC como canabinoide majoritário. Os canabinoides majoritários e compostos com razão superior a 10% não foram não são expressos nesse gráfico.

Em todas as outras amostras houve a prevalência de THC, em concentrações que variam de $4,86 \pm 0,3$ (SP06) e $22,6 \pm 2,8$ (SC01), apresentando variadas concentrações de CBD e CBN. Nas amostras SC02, SC04, SP04 e MG03 apenas THC se enquadrou dentro do LQ (Gráfico 11). A amostra SP06 além de apresentar baixo teor de THC, a razão THC/CBN não ultrapassa 1,7, ou seja, há uma quantia significativa de CBN em relação ao THC, demonstrando que o material vegetal de origem não foi bem armazenado entre a colheita e o processo (Gráfico 12 e Gráfico 13).

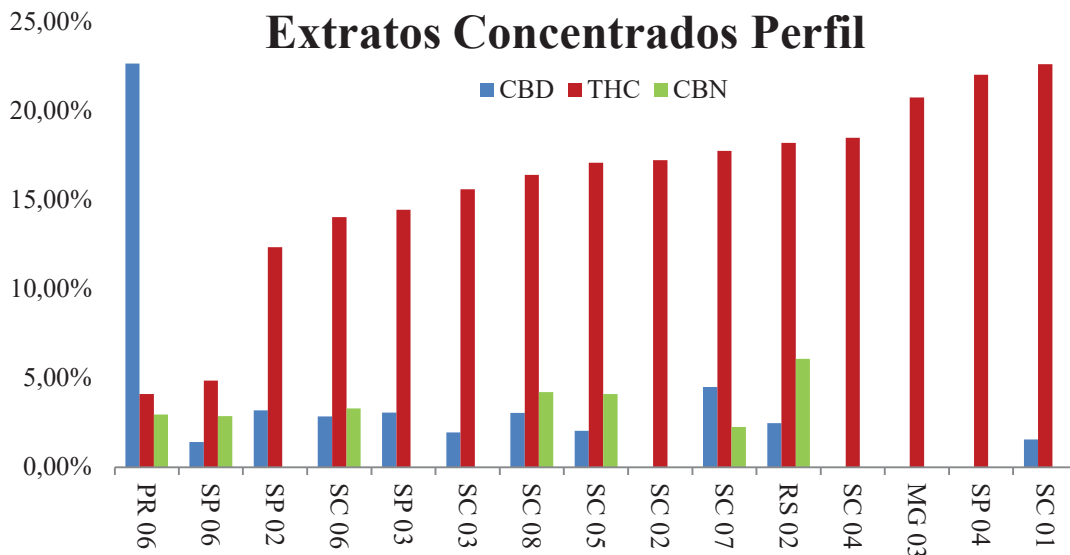


Gráfico 11: Perfil de concentração de CBD, THC e CBN em extratos de Cannabis de amostras concentradas.

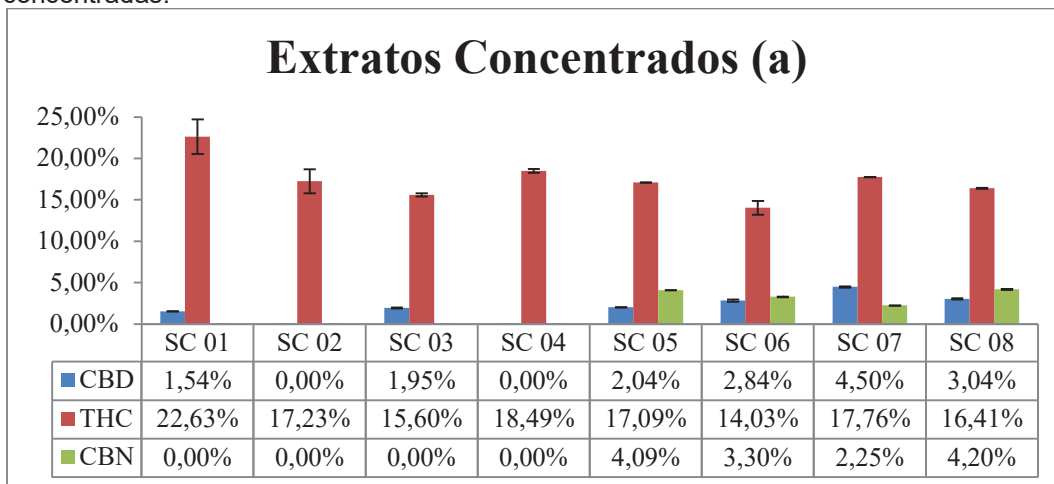


Gráfico 12: Concentração de CBD, THC e CBN em extratos concentrados das amostras SC01 a SC08

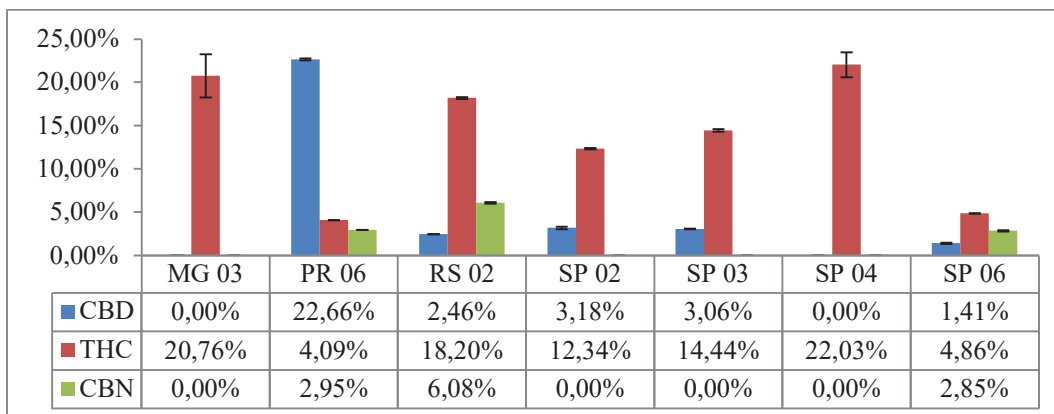


Gráfico 13: Concentração de CBD, THC e CBN em extratos de Cannabis das amostras MG03, PR06, RS02, SP02, SP03, SP05 e SP06

Essa análise possibilita entender a composição em relação à canabinoides, mas não se avaliou neste estudo a presença de contaminantes biológicos, pesticidas e fungicidas, sendo necessário compreender que com a utilização de extratos concentrados, pode ocorrer também o acúmulo de diversas substâncias, nocivas ou não, que possam ter sido aplicadas ou entrado em contato com a planta durante o período de cultivo e manipulação para produção de extratos.

4.2.5.2.4 Flores

As flores analisadas apresentaram principalmente THC em sua composição, com teores que variam de $6,5 \pm 1,60$ da amostra PR08 a $9,63\% \pm 1,12$ da amostra PR11. Duas amostras apresentaram teores de CBN próximo a 1,0%, sendo a maior concentração encontrada na amostra PR12, oriunda do mercado ilegal, que por sinal apresentou a maior concentração de CBD ($1,29\% \pm 0,07$). Na amostra PR 07 apenas o sinal analítico do THC se enquadrou dentro do LQ do método (Gráfico 14).

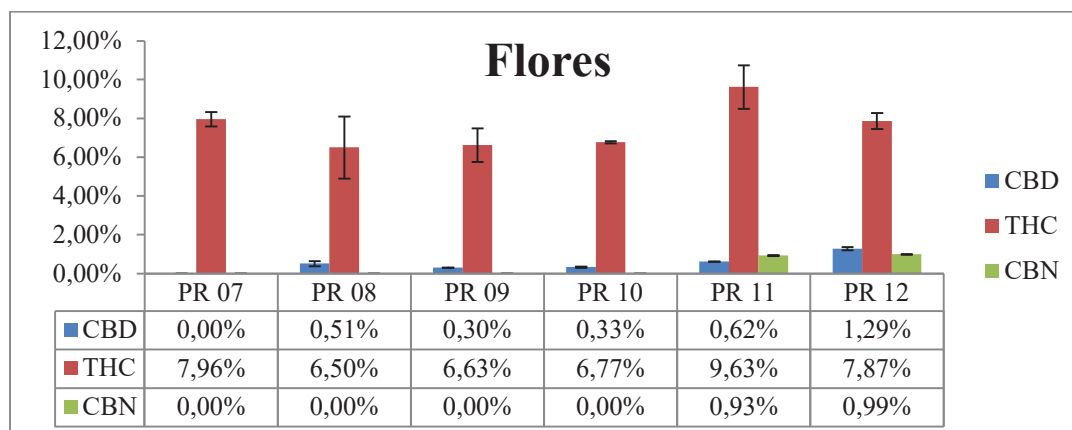


Gráfico 14: Dados de concentração (m/m) de CBD, THC e CBN nas amostras de flores

A baixa concentração de CBN nas amostras PR07, PR08, PR09 e PR10 indica que as flores estavam frescas, assim como CBG que foi encontrado em considerável concentração em PR12, indicando que a planta analisada pode ter sofrido uma colheita precoce, ou seja, se a planta fosse cultivada por mais tempo, o canabigerol poderia ser transformado a THCA e CBDA, elevando os teores desses canabinoides. Apesar de baixíssima concentração, foi possível identificar a presença de THCV em três amostras de flores (Gráfico 15).

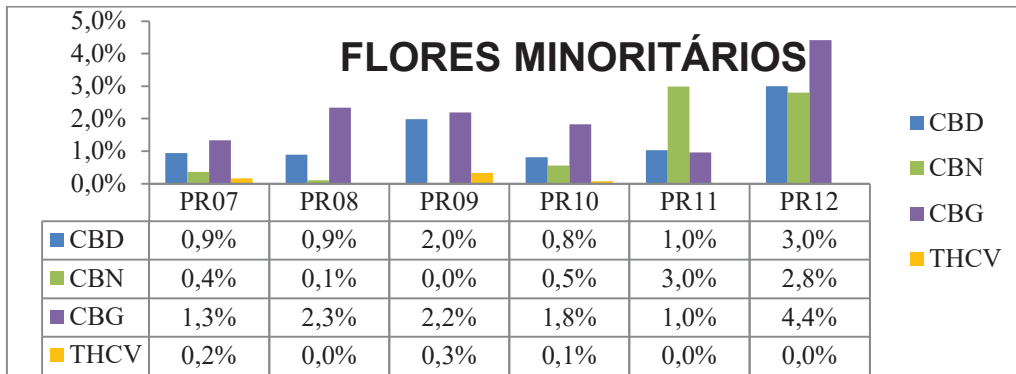


Gráfico 15: Dados da razão entre a área do sinal analítico dos canabinoides minoritários em relação à área de THC, em amostras de flores

Na figura 32 é apresentada a distribuição dos resultados das amostras analisadas, considerando a predominância do canabinoide majoritário e a concentração desse, onde é possível verificar que há poucas amostras artesanais com altos teores de CBD. Nessa imagem é possível verificar a grande variedade de composição e concentração das amostras analisadas. As amostras importadas se concentram nos quadrantes referentes a alta concentração de CBD, quadrantes esses que contém apenas três amostras artesanais.

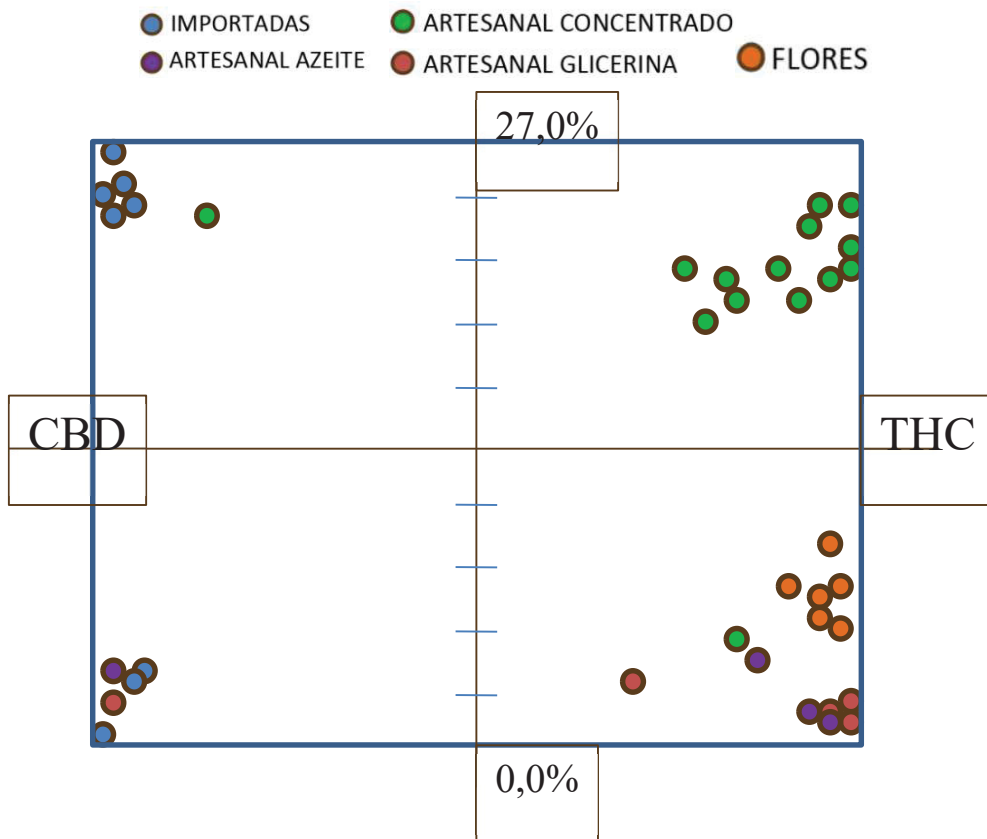


Figura 32: Distribuição das amostras de extratos e flores de Cannabis analisadas em função da composição de canabinoides (THC e CBD) e da concentração

5 Conclusão

A técnica de cromatografia gasosa com espectrômetro de massas demonstrou adequada para realizar a identificação dos principais canabinoides presentes em extratos de *Cannabis*. Foi possível desenvolver curvas analíticas para a quantificação dos principais canabinoides na forma neutra (não ácida), possibilitando a análise quantitativa de amostras nacionais e importadas. Dessa forma foi possível verificar que as amostras cultivadas e processadas em território nacional possuem principalmente THC, com exceção de três amostras analisadas (PR06, PB04 e SP01) mesmo que com grande diferença de concentração entre essas amostras. Dentre as amostras importadas houve a predominância de CBD, também com grande variação de concentração entre as amostras. Esse fato acende um alerta quanto à necessidade de controle e monitoramento de cultivos direcionados a fins terapêuticos, principalmente quando relacionados a crianças, visto que devido a psicoatividade atribuída ao THC, a administração desse composto a um organismo que ainda está em desenvolvimento pode acarretar consequências que ainda não são totalmente compreendidas pela ciência. A presença de canabinoides minoritários (CBG, CBC, THCV e Δ^8 -THC) contribui para o efeito sinérgico, aí se deve a importância de monitorá-los, para que dessa forma seja possível ter uma ideia mais ampla sobre a ação desses compostos nos organismos estudados.

Há grande diferença entre as concentrações de canabinoides entre as amostras analisadas, visto a alta concentração em amostras importadas, por exemplo, e a concentração baixa em amostras diluídas em glicerina ou na amostra PR13, mas isso não deve desqualificar nenhuma dessas amostras, mas despertam a necessidade de estudos que esclareçam a questão de biodisponibilidade dos compostos quando administrados no organismo em diferentes veículos, possibilitando que haja uma melhor compreensão clínica quanto aos efeitos relacionados ao uso de cada uma dessas apresentações.

6 Recomendações

Os estudos dos canabinoides presentes em produtos à base de extratos de *Cannabis* é essencial para o desenvolvimento da ciência que estuda os efeitos dos fito e endocanabinoides, a endocanabinologia. Entretanto para que seja possível ter uma compreensão mais ampla dos efeitos desses compostos, principalmente quando utilizados extratos brutos, é desejável que sejam realizadas análises mais completas, quantificando os canabinoides ácidos, que possuem outra rota farmacológica em relação aos canabinoides neutros, além da composição de terpenos. Há evidências de que os terpenos influenciam nos efeitos provocados pelo uso de *Cannabis*, mas sua composição em relação a cada variedade de planta ainda é pouco descrita.

No Brasil ainda há uma carência em relação a pesquisas científicas relacionadas à *Cannabis* e canabinoides, é desejável que sejam realizadas pesquisas para o desenvolvimento de um produto nacional, possibilitando que um maior número de famílias tenha acesso ao tratamento, seja para crianças, jovens, adultos e idosos. Para que isso seja possível, há a necessidade de desenvolver processos de extração de preferência sem o uso de solventes e que mantenham as propriedades e a composição integral da planta, a formulação de um produto que seja acessível às famílias, com controle de qualidade e garantia de manutenção do tratamento. Para que tudo isso seja possível, é necessário que os agentes públicos responsáveis pela regulamentação e controle facilitem o acesso a plantas de *Cannabis*, para pesquisa científica e produção doméstica e industrial.

A mudança mais efetiva no cenário mundial da *Cannabis*, seja para uso medicinal social, inicia com a compreensão do fracasso da guerra as drogas, com o respeito aos direitos civis daqueles que mais sofrem com essa guerra, a população periférica, pobre, em sua maioria negra, que atualmente serve como bode expiatório de uma política arcaica e ineficiente.

7 Referências Bibliográficas

- ¹ HUI-LIN LI, *the origin and use of cannabis en Eastern Asia*, Economy Botany 28, 1974, 293-301
- ² LISE MANNICHE, *An Ancient Egyptian Herbal*, Austin, Texas, University of Texas press, 1989
- ³ ROBINSON, ROWAN, *O grande Livro da Cannabis: Guia Completo de seu uso industrial, medicinal e ambiental*; tradução Maria Luiza X. de A. Borges – Rio de Janeiro; Jorge Zahar Ed., 1999
- ⁴ EARLEYWINE, M; *Understanding Marijuana: A new look at the scientific evidence – United States*; Oxford University Press, 2002
- ⁵ CARLINI, E., *A História da Maconha no Brasil*, Review; *Jornal Brasileiro de Psiquiatria*, 55(4); 314-317, 2006
- ⁶ Chernoviz L. N. P; *Formulário e guia médico*; Livrariade A. Roger e F. Chernoviz, Paris; 1904
- ⁷ BRASIL, Decreto de Lei Nº 891, de 25 de novembro de 1938. Resolve decretar a seguinte Lei de Fiscalização de Entorpecentes. *Diário Oficial*, Rio de Janeiro, RJ, 25 de novembro de 1938.
- ⁸GAONI, Yechiel; MECHOULAM, Raphael. Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. *Journal of the American chemical society*, v. 86, n. 8, p. 1646-1647, 1964.
- ⁹ DEVANE, W.A., DYSARZ, F.A., JOHNSON, M.R., MELVIN, L.S., AND HOWLETT, A.C. *Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain*. *Molecular Pharmacology*, 1988,34, 605–613.
- ¹⁰DEVANE, W. A., HANUS, L., Breuer, A., *Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor*. *Science*,1992 258, 1946–1949.
- ¹¹ Mechoulam R., Ben-Shabat S., Hanus L., Ligumsky M., Kaminski N. E., Schatz A. R., Gopher A., Almog S., Martin B. R., Compton D. R., et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 1995; 50: 83–90.
- ¹² Salzet M., Breton C., Bisogno T., Di Marzo V. Comparative biology of the endocannabinoid system. *Eur J Biochem* 2000; 267: 4917–4927.
- ¹³ McPartland J., Di Marzo V., De Petrocellis L., Mercer A., Glass M. Cannabinoid receptors are absent in insects. *J Comp Neurol* 2001; 436: 423–429.
- ¹⁴ Rosanne D'Agostino; *Com Lei de Drogas, presos por tráfico passam de 31 mil para 138 mil no país* [online]; Disponível em: <http://g1.globo.com/politica/noticia/2015/06/com-lei-de-drogas-presos-por-trafico-passam-de-31-mil-para-138-mil-no-pais.html>; acessado em 18 de setembro de 2017
- ¹⁵ ILEGAL, Direção: Tarso Araújo. Brasil, 2014, Documentário, colorido; duração1:30h
- ¹⁶Farré M. *Cannabis Use in Patients with Fibromyalgia: Effect on Symptoms Relief and Health-Related Quality of Life*. García AV, ed. *PLoS ONE*. 2011;6(4):e18440. doi:10.1371/journal.pone.0018440.
- ¹⁷ Velasco G. et al., *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 64 (2016) 259–266
- ¹⁸ Lima, F. Laboratório brasileiro importa 10 Kg de maconha para fazer remédio. *Folha de São Paulo*, 2016; Disponível em: <http://www1.folha.uol.com.br/equilibrioesaude/2016/11/1835350->

laboratorio-brasileiro-importa-10-kg-de-maconha-para-fazer-remedio.shtml. Acessado em 19 de maio de 2017

¹⁹ DIAS, V.H.G.; Genetic identification of *Cannabis sativa* using chloroplast trnL-F gene; *Forensic Science International: Genetics* 14 (2015) 201–202

²⁰ ANDERSON C. L.; LEAF VARIATION AMONG CANNABIS SPECIES FROM A CONTROLLED GARDEN; *Botanical Museum Leaflets, Harvard University*, Vol. 28, No. 1 (March 1980), pp. 61-69

²¹ FARAG, S., and O. KAYSER. "The Cannabis Plant: Botanical Aspects." *Handbook of Cannabis and Related Pathologies: Biology, Pharmacology, Diagnosis, and Treatment* (2016):3.

²² YUKIHIRO SHOYAMA, *Recent Advances in Cannabis sativa Research: Biosynthetic Studies and Its Potential in Biotechnology, Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2007, 8, 237-243

²³ HAND BOOK DA CANNABIS – IDENTIFICAR REFERÊNCIA CORRETA – CAPÍTULO 1

²⁴ FELLERMEIER M.; *Biosynthesis of cannabinoids Incorporation experiments with 13C-labeled glucose*; *Eur. J. Biochem.* 268, 1596±1604 (2001)

²⁵ YUKIHIRO S.; *Recent Advances in Cannabis sativa Research: Biosynthetic Studies and Its Potential in Biotechnology, Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2007, 8, 237-243

²⁶ TASCHWER, M.; SCHMID, M. G. Determination of the relative percentage distribution of THCA and Δ⁹-THC in herbal Cannabis seized in Austria – Impact of different storage temperatures on stability. *Forensic Science International* 254 167–171, 2015.

²⁷ L. Leisztner; Determination of cannabinoid acids by high-performance liquid chromatography of their neutral derivatives formed by thermal decarboxylation: I. Study of the decarboxylation process in open reactor; *Journal of Chromatography A* Volume 520, 9 November 1990, Pages 339-347

²⁸ Wood, T.B., Spivey, W.T.N., Easterfield, T.H., 1896. Charas, the resin of Indian hemp. *J. Chem. Soc.* 69, 539– 546.

²⁹ Adams, R., Baker, B.R., Wearn, R.B., 1940. Structure of cannabinol. III. Synthesis of cannabinol, 1-hydroxy-3-namyl-6,6,9-trimethyl-6-dibenzopyran. *J. Am. Chem. Soc.* 62, 2204–2207

³⁰ Ch, Lousberg Robert JJ, et al. "Cannabinodiol: conclusive identification and synthesis of a new cannabinoid from *Cannabis sativa*." *Phytochemistry* 16.5 (1977): 595-597.

³¹ Bisogno T., Berrendero F., Ambrosino G., Cebeira M., Ramos J.-A., Fernandez-Ruiz J.-J., Di Marzo V. Brain regional distribution of endocannabinoids: implications for their biosynthesis and biological function. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 256: 377–380.

³² Heifets B. D., Castillo P. E. (2009). Endocannabinoid signaling and long-term synaptic plasticity. *Annu. Rev. Physiol.* 71, 283–306.

³³ HUDSON, Simon; RAMSEY, John. The emergence and analysis of synthetic cannabinoids. *Drug testing and analysis*, v. 3, n. 7-8, p. 466-478, 2011.

³⁴ CARLINI, Elisaldo A.; CUNHA, Jomar M. Hypnotic and antiepileptic effects of cannabidiol. *The Journal of Clinical Pharmacology*, v. 21, n. S1, 1981.

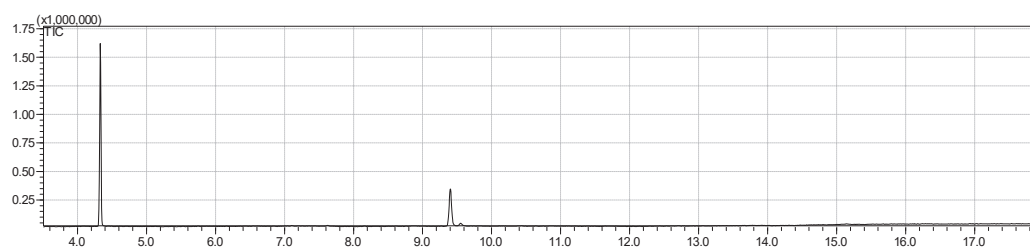
³⁵ Devinsky O, Cilio MR, Cross H *et al.* Cannabidiol: pharmacology and potential therapeutic role in epilepsy and other neuropsychiatric disorders. *Epilepsia*, 55, 791-802 (2014).

-
- ³⁶ Wallace MJ, Blair RE, Falenski KW *et al.* The endogenous cannabinoid system regulates seizure frequency and duration in a model of temporal lobe epilepsy. *J Pharmacol Exp Ther*, 307, 129-37 (2003).
- ³⁷DE CARO, Carmen *et al.* The potential role of cannabinoids in epilepsy treatment. **Expert Review of Neurotherapeutics**, n. just accepted, 2017.
- ³⁸ Iversen, L.L. *The Science of Marijuana*. 2nd ed. New York: Oxford University Press (2008)
- ³⁹PERTWEE, Roger G. (Ed.). **Handbook of cannabis**. Oxford University Press, USA, 2014. Capítulo 24
- ⁴⁰ Burns, T.L. and Ineck, J.R. (2006). Cannabinoid analgesia as a potential new therapeutic option in the treatment of chronic pain. *The Annals of Pharmacotherapy*, **40**, 251–260.
- ⁴¹ Arias-Carrión, O., Huitrón-Reséndiz, S., Arankowsky-Sandoval, G., and Murillo-Rodríguez, E. (2011). Biochemical modulation of the sleep-wake cycle: endogenous sleep-inducing factors. *Journal of Neuroscience Research*, **89**, 1143–1149.
- ⁴² Robson, P. (2001). Therapeutic aspects of cannabis and cannabinoids. *British Journal of Psychiatry*, **178**, 107–115.
- ⁴³ Guillermo Velasco; The use of cannabinoids as anticancer agents; [Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry 64 \(2016\) 259–266](#)
- ⁴⁴ Romão, Wanderson (2016). Evaluating the selectivity of colorimetric test (Fast Blue BB salt) for the cannabinoids identification in marijuana street samples by UV–Vis, TLC, ESI (+) FT-ICR MS and ESI (+) MS/MS. *Forensic Chemistry*, 1(), 13–21.
- ⁴⁵ Mechoulam R. On the nature of the Beam test. *Tetrahedron*. 1968 Aug;24(16):5615-24.
- ⁴⁶ Recommended Methods for the Identification and Analysis of Cannabis and Cannabis Products; United Nations, Laboratory and Scientific Section United Nations Office on Drugs and Crime
New York, 2009
- ⁴⁷ Simona Pichini, A rapid and simple procedure for the determination of cannabinoids in hemp food products by gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Volume 36, Issue 5, 2005; Pages 939-946,
- ⁴⁸ NIST. National Institute of Standards and Technology. Material Measurement Laboratory. Web book, 2016.
- ⁴⁹ Backer, B; Innovative development and validation of an HPLC/DAD method for the qualitative and quantitative determination of major cannabinoids in cannabis plant material, *Journal of Chromatography B*, Volume 877, Issue 32, 2009.
- ⁵⁰ BRASIL; Resolução RE 899 de 29 de maio de 2003; Determinar a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos; Órgão Emissor ANVISA – Agência de Vigilância Sanitária.
- ⁵¹ A. J. Poortman-van der Meer, H. Huizer / *Forensic Science International* 101 (1999) 1 –8
- ⁵² Hazekamp, A; *Chromatographic and Spectroscopic Data of Cannabinoids from Cannabis sativa L.* *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 28: 2361–2382, 2005
- ⁵³ Clone collector; Harle-tsu; Disponível em: <http://clonecollector.com/product/harle-tsu/>; Acesso em 01 de outubro de 2017.

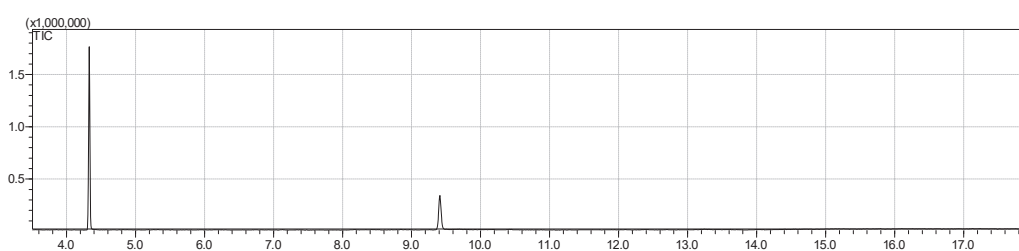
ANEXOS

Cromatogramas por amostra

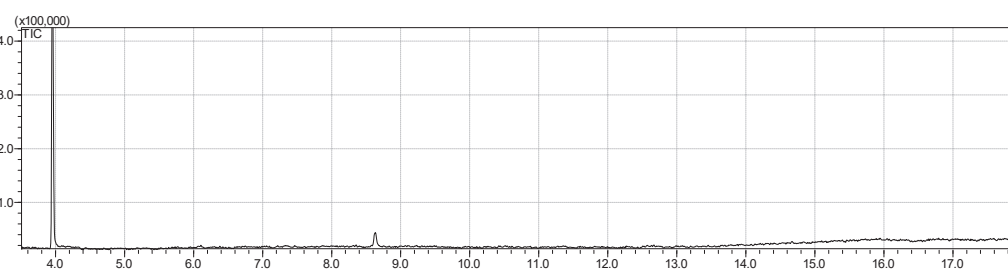
SC01



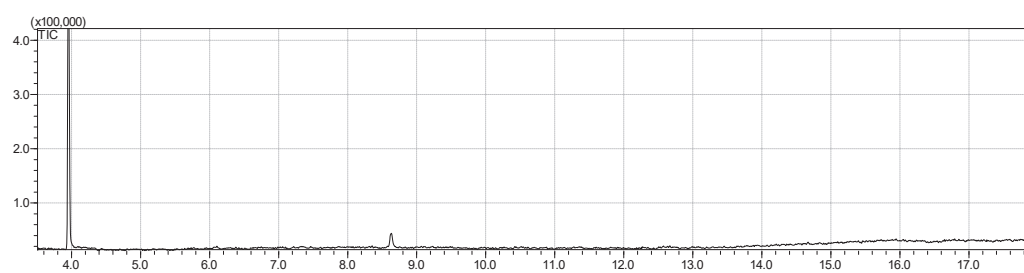
SC02



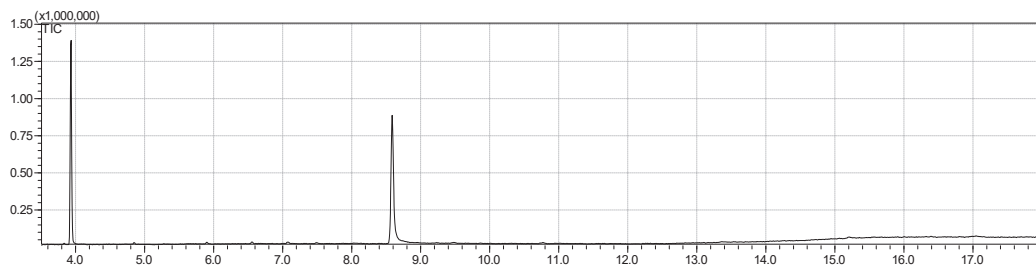
SC03



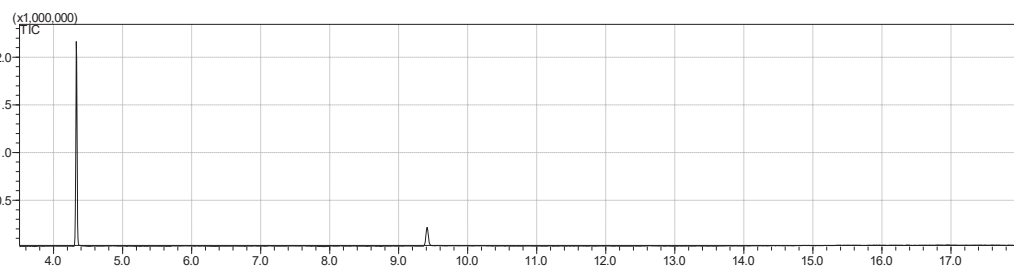
SC04



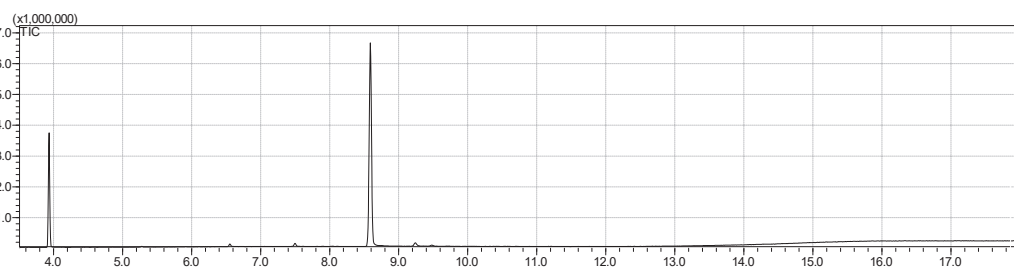
SC05



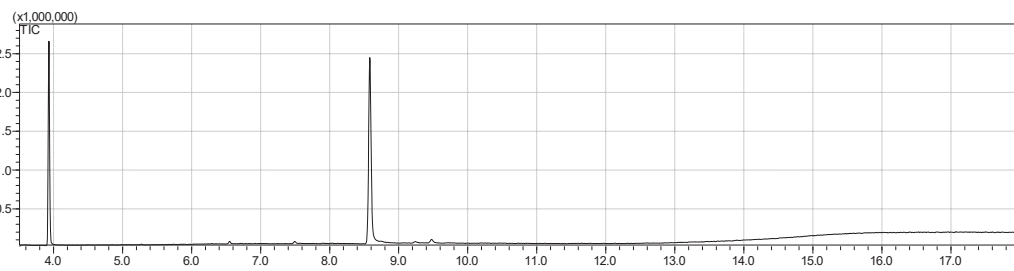
SC06



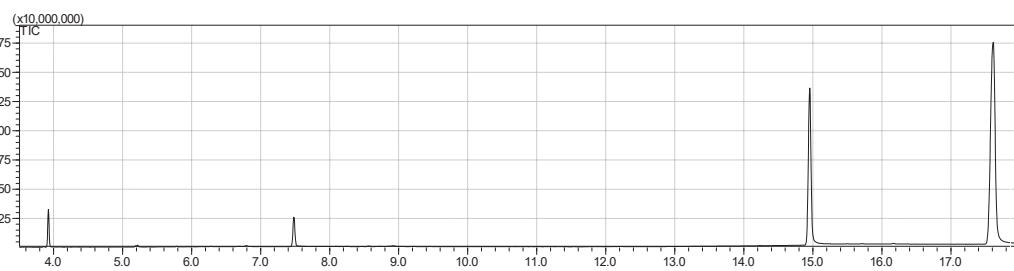
SC07



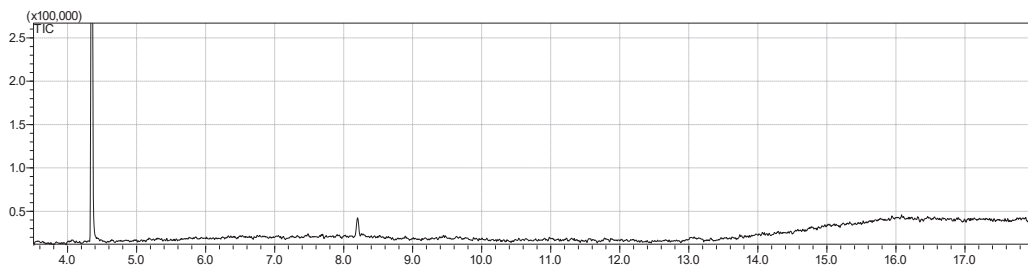
SC08



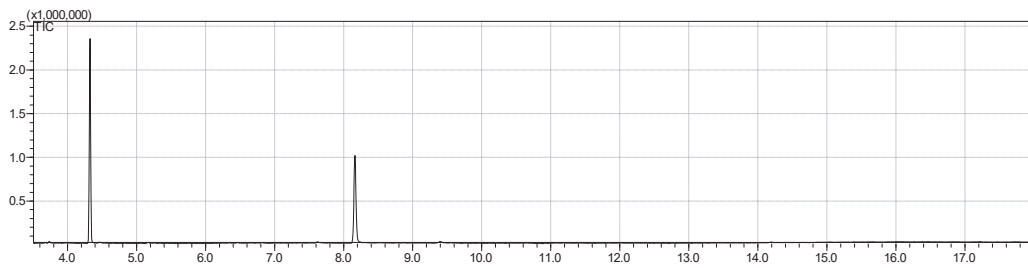
PR01



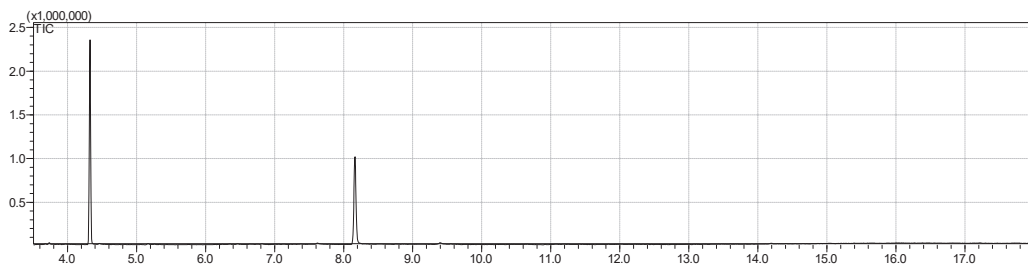
PR02



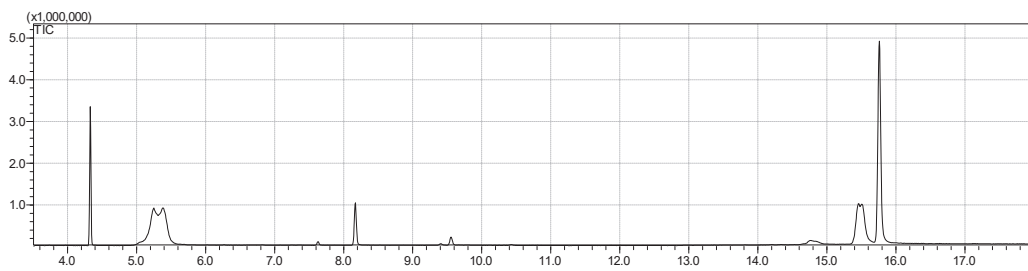
PR03



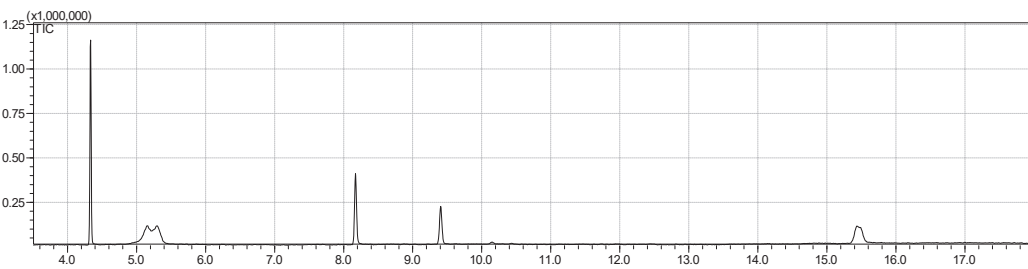
PR04



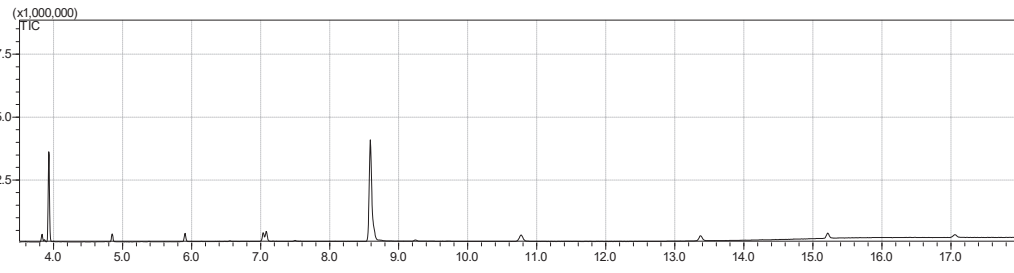
PR05



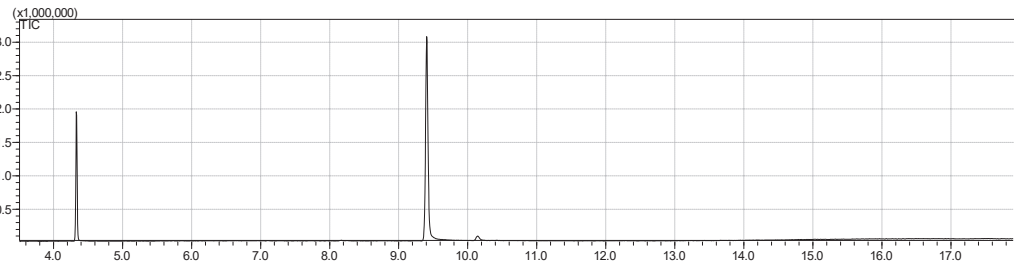
PR06



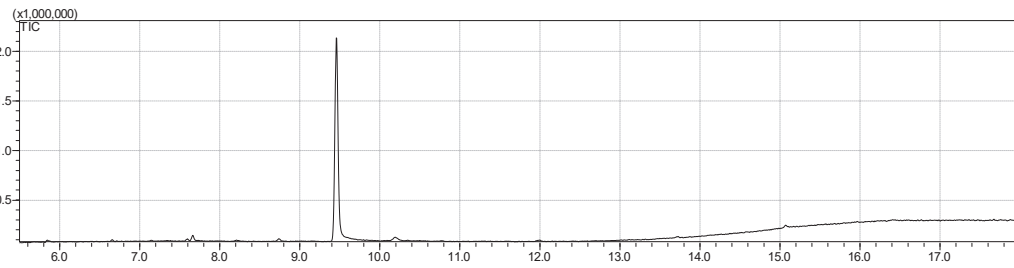
PR07



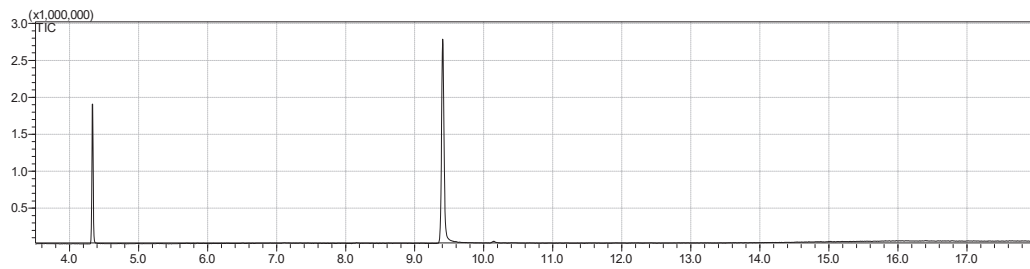
PR08



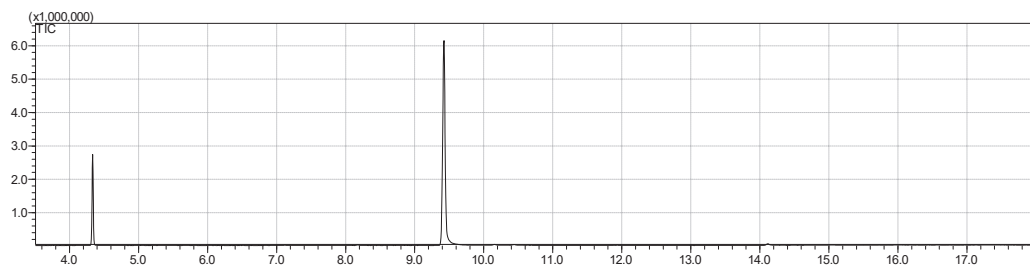
PR09



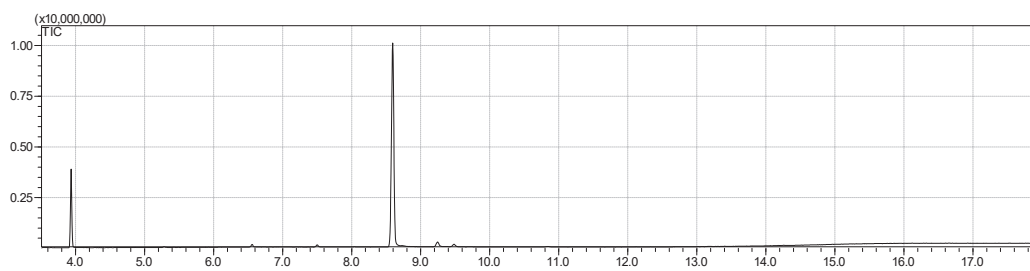
PR10



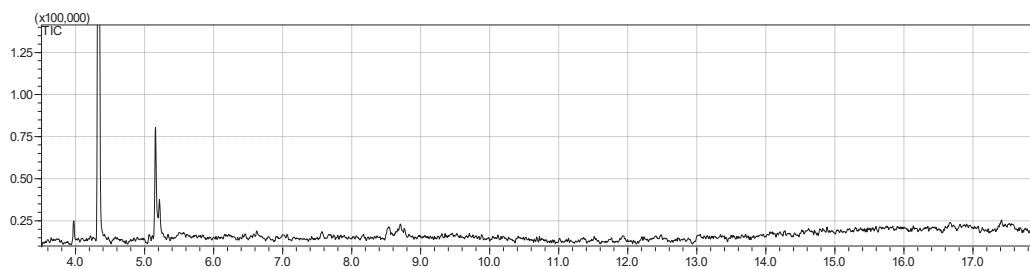
PR11



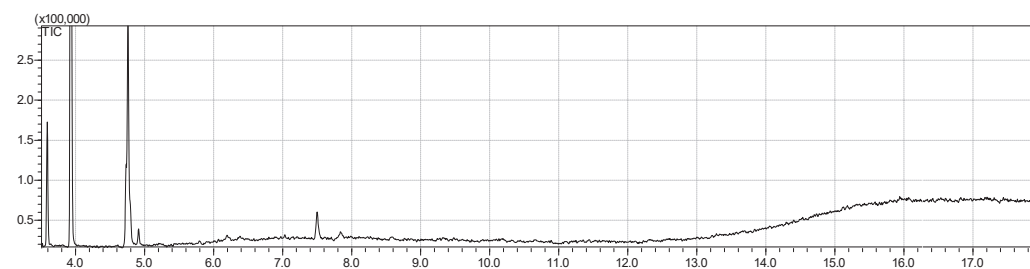
PR12



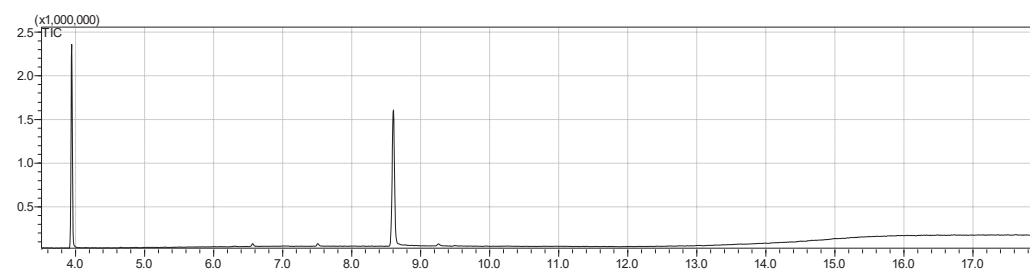
PR13



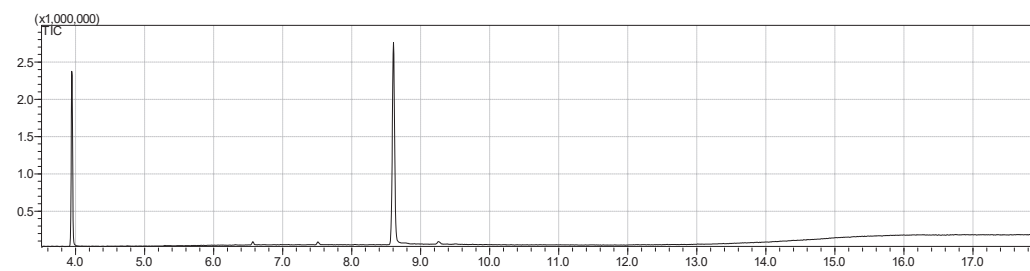
SP01



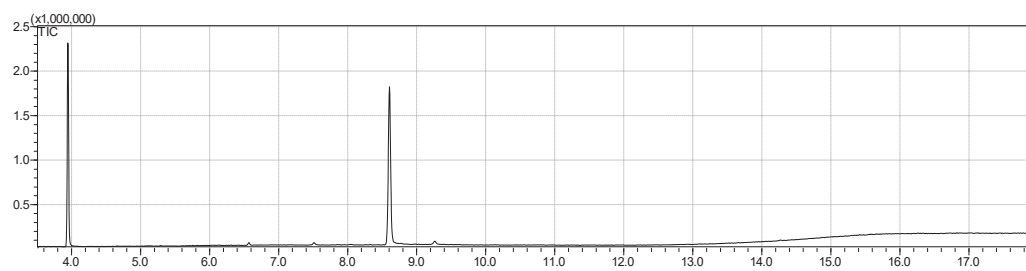
SP02



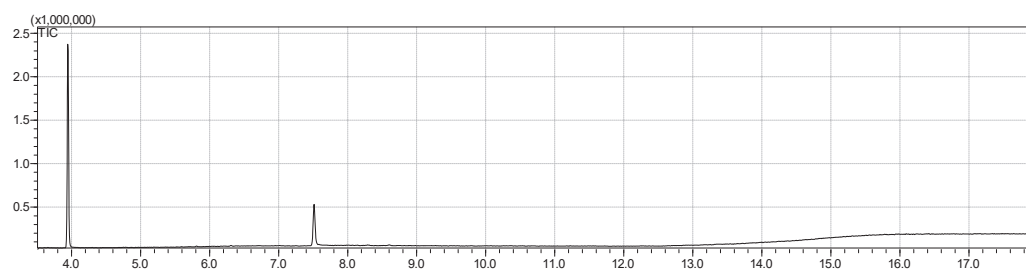
SP03



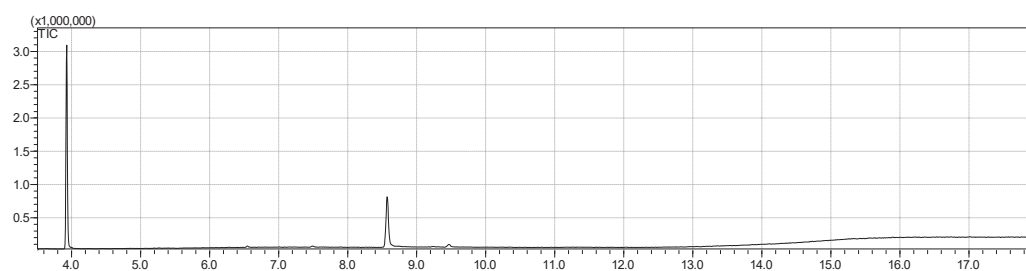
SP04



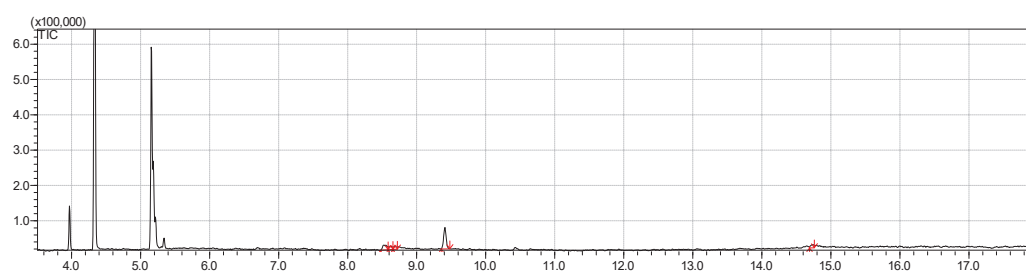
SP05



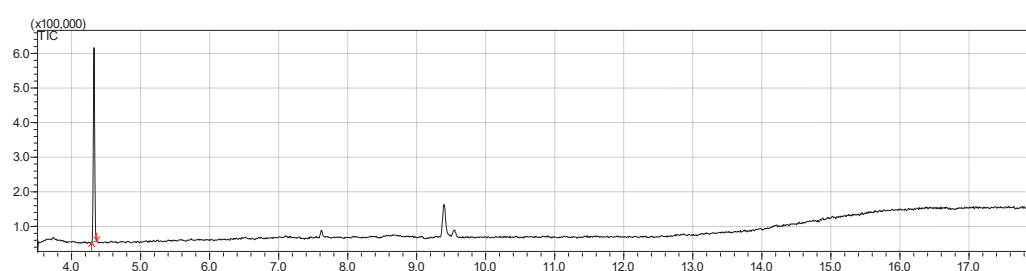
SP06



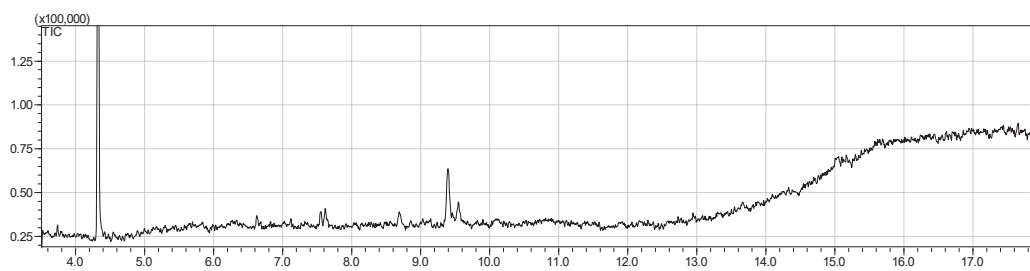
SP07



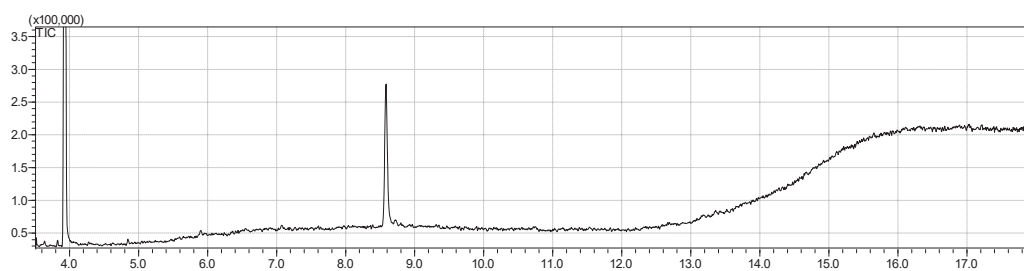
PB01



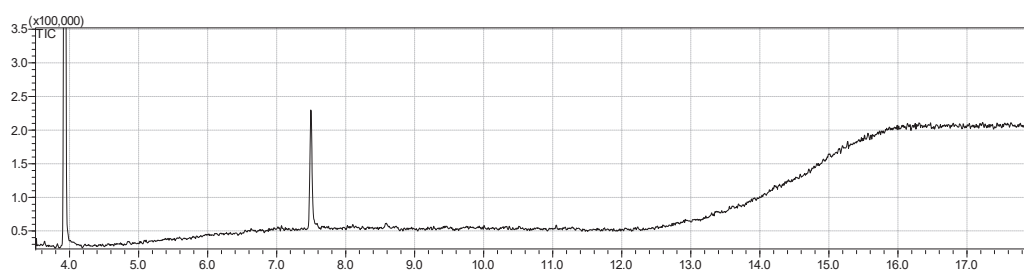
PB02



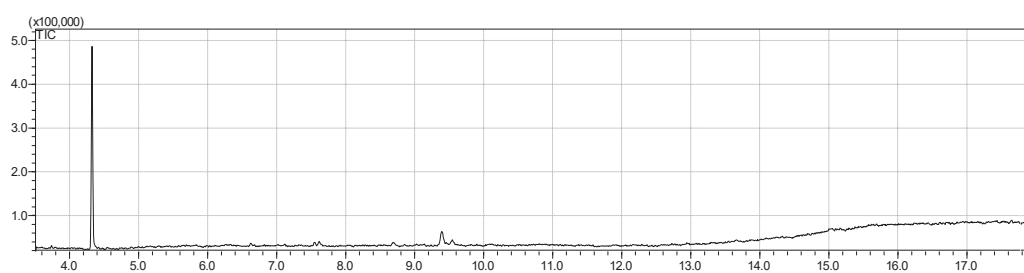
PB03



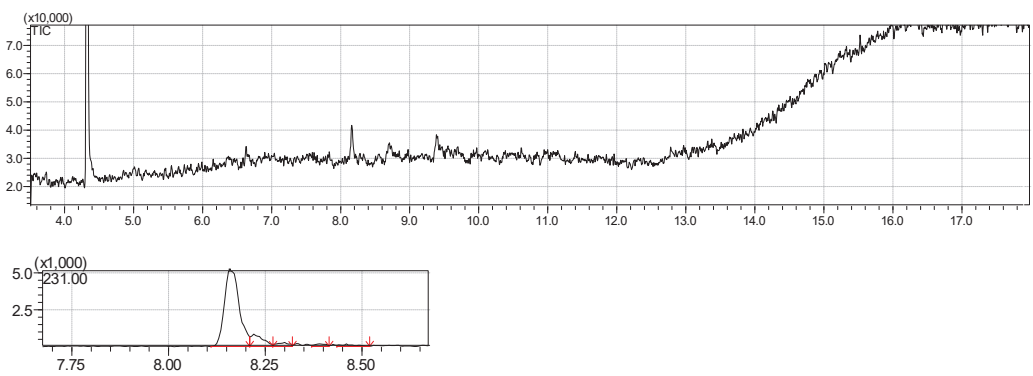
PB04



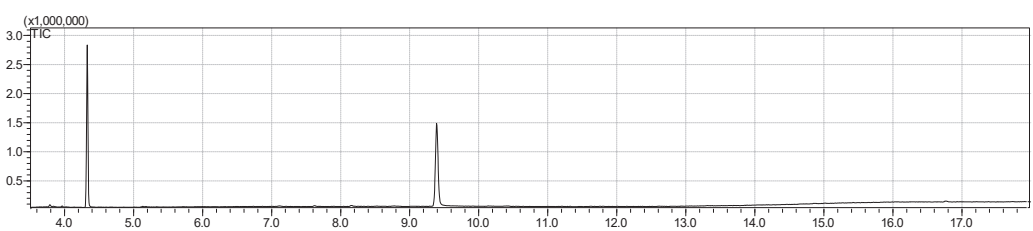
PB05



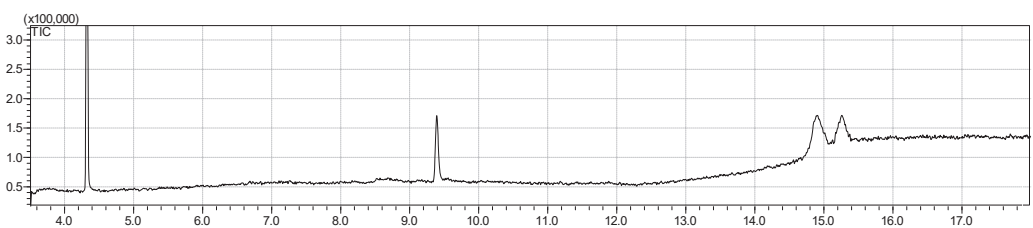
MG01



MG02



MG03



PA01

