

PATRICIA DA SILVA MONTES DROBNJAK
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

CANABINOIDES EM *CANNABIS SATIVA L.* E SEUS PRODUTOS- VALIDAÇÃO DE
MÉTODO E ANÁLISE POR LC-MS/MS

BRASÍLIA- DF
2023

PATRICIA DA SILVA MONTES DROBNJAK

CANABINOIDES EM *CANNABIS SATIVA L.* E SEUS PRODUTOS- VALIDAÇÃO DE
MÉTODO E ANÁLISE POR LC-MS/MS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Brasília
como parte dos requisitos para a obtenção do título de
Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Profa. Dra. Eloisa Dutra Caldas
Coorientador: Dr. Jorge Jardim Zacca

BRASÍLIA- DF
2023

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

DD783c Drobnyak , Patricia da Silva Montes
Canabinoides em Cannabis sativa L. e seus produtos:
validação de método e análise por LC-MS/MS / Patricia da
Silva Montes Drobnyak ; orientador Eloisa Dutra Caldas;
co-orientador Jorge Jardim Zacca. -- Brasília, 2023.
85 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) --
Universidade de Brasília, 2023.

1. Cannabis sativa L.. 2. Canabinoides. 3. Validação de
método. 4. LC-MS/MS. 5. Tetrahydrocannabinol. I. Caldas,
Eloisa Dutra , orient. II. Zacca, Jorge Jardim , co-orient.
III. Título.

PATRICIA DA SILVA MONTES DROBNJAK

CANABINOIDES EM *CANNABIS SATIVA L.* E SEUS PRODUTOS- VALIDAÇÃO DE
MÉTODO E ANÁLISE POR LC-MS/MS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da
Universidade de Brasília como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em
Ciências Farmacêuticas.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Eloisa Dutra Caldas
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Fernando Fabriz Sodré
Universidade de Brasília

Profa.. Virginia Martins Carvalho
Universidade Federal do Rio de Janeiro

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem Ele eu não teria chegado até aqui;

À orientadora **Profa. Dra. Eloisa Dutra Caldas**, pela excelente orientação que me foi prestada, disposição, compreensão e confiança;

Ao coorientador **Perito Criminal Federal. Dr. Jorge Jardim Zacca**, pela confiança no meu trabalho e excelente orientação que me foi prestada. Além de todo conhecimento e conselhos que levarei para a vida;

Aos membros da banca avaliadora, **Prof. Dr. Fernando Sodré, Profa. Dra. Virginia Carvalho**, PCF Dr. Adriano Maldaner, pela disponibilidade em avaliar e contribuir;

Ao **Diogo Freire** que me ensinou muito sobre o equipamento;

Aos **Peritos Criminais Federais Élvio, Lúcio, Adriano, Maurício, Leandro e Amaury** por todo conhecimento compartilhado e colaboração;

Aos **Peritos Criminais Federais do SEPLAB** pela colaboração;

Às funcionárias **Karine, Marilda e Lu** pela ajuda prestada;

Ao meu esposo **Filip Drobnjak**, por toda a paciência, compreensão, ajuda nas horas de desespero e principalmente por todo o amor;

À minha família, em especial, os meus pais **Magna e Antonio**, e a minha irmã **Cristiane** por todo o incentivo, preocupação e suporte. À minha avó **Anna** que reza diariamente um terço pela minha vida;

Aos grandes amigos **Carla Bilac, Gabi Luna, Luana Neres, Priscila Varela, Tayane Eloi e Thiago Rodrigues** por todo o companheirismo e ajuda extraordinárias;

Aos meus sobrinhos **Sofia, Victor, Miguel, Ana Clara, Artur, Juan Pedro e Joaquim**. Aqueles que me tiram o sorriso fácil. À minha família da Sérvia, a família que escolhi fazer parte.

Aos amigos de laboratório do SEPLAB **Amanda e Gabriela** por toda ajuda, esforço e dedicação;

Aos amigos do LabTox **Ágatha, Beatrix, Denise, Camila, Esmeralda, Ettore, Fausto, Guilherme, Larissa, Luciano, Marcela, Nayara e Peter** por toda torcida, ajuda e suporte;

Ao Programa de **Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas** da Universidade de Brasília, pela oportunidade; À **CAPES, FAPDF e UnB**, pelo auxílio financeiro; E a todos que não estão presentes nestas linhas, mas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Taxonomia vernacular da cannabis, mostrando a imagem de um tricoma pedunculares capitados.....	4
Figura 2- Ilustração das características estruturais dos canabinoides encontrados em diferentes espécies vegetais.....	6
Figura 3- Biossíntese de canabinoides, modificado.....	8
Figura 4- Total de THC (%) nas apreensões de cannabis em diferentes formas de apresentação durante o período de 2005 – 2022 na Suíça.....	14
Figura 5- As diversas aplicações da cannabis	15
Figura 6- Acesso global à cannabis.....	18
Figura 7- Estruturas químicas com a nuvem eletrônica da anandamida (endocanabinoide) à esquerda e do THC (fitocanabinoide) à direita, modificado.....	20
Figura 8- Os principais pontos da legislação sobre o cultivo de <i>C. sativa L.</i> nos Estados Unidos, Canadá e União Europeia, com foco na República Italiana entre os países da União Europeia.....	21
Figura 9- Esquemática básica de uma fonte de ionização por Eletrospray (ESI)..	26
Figura 10- Amostras de cannabis apreendidas em território nacional.....	32
Figura 11- Amostras de óleos de cannabis e haxixe.....	32
Figura 12- Preparação de amostra vegetal.....	35
Figura 13- Preparo de amostra vegetal.....	36
Figura 14- Preparação de amostra de óleo de cannabis.....	37
Figura 15- LC-MS/MS do Instituto de Criminalística da Polícia Federal.....	38
Figura 16- Cromatograma dos canabinoides neutros, ácidos e deuterados no LC-MS/MS	42
Figura 17- Resultado do teste de efeito de matriz de material vegetal realizado com diluição 1:10 ² sem adição de padrão interno.....	43
Figura 18- Resultado do teste de efeito de matriz em material vegetal realizado com diluição 1:10 ² e adição de padrão interno.....	43
Figura 19- Resultado do teste de efeito de matriz material vegetal com diluição 1:10 ⁴ sem adição de padrão interno.....	44
Figura 20- Resultado do teste de efeito de matriz material vegetal com diluição 1:10 ⁴ sem adição de padrão interno.....	45

Figura 21- Resultado do teste de efeito de matriz óleo com diluição 1:10 sem adição de padrão interno.....	46
Figura 22- Resultado do teste de efeito de matriz em óleos realizado com diluição 1:10 e adição de padrão interno.....	46
Figura 23- Teor (%) dos canabinoides em folhas, folhas/inflorescência e inflorescência de cannabis.....	53
Figura 24- Teor (%) dos canabinoides em diferentes amostras cannabis em material vegetal prensado.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Quimiotipos da <i>Cannabis sativa</i>	10
Tabela 2- Teor de THC em diferentes partes da planta da cannabis.....	11
Tabela 3- Principais formas de cannabis e as potências típicas do THC.....	13
Tabela 4- Produtos à base de cannabis aprovados pela Anvisa.....	23
Tabela 5- Métodos quantitativos para análise de canabinoides.....	28
Tabela 6- Parâmetros otimizados para cada analito e seus respectivos íons-produto mais intensos.....	40
Tabela 7- Valores dos parâmetros da fonte de ionização para o CBNA e seus íons produto.....	41
Tabela 8- Valores dos parâmetros do método cromatográfico otimizados.....	41
Tabela 9- Recuperação média (%) e repetibilidade (DPR, %) dos 6 analitos em material vegetal sem adição de IS	48
Tabela 10- Recuperação média (%) e repetibilidade (DPR, %) dos 6 analitos em material óleo com adição de IS. Concentrações em ng/mL	48
Tabela 11- Precisão intermediária (DPR,%) dos 6 analitos em Material vegetal. Concentrações em ng/mL	49
Tabela 12- Recuperação média (%) e repetibilidade (DPR, %) dos 6 analitos em matriz óleo sem adição de IS. Concentrações em ng/mL	49
Tabela 13- Recuperação média (%) e repetibilidade (DPR, %) dos 6 analitos em matriz óleo com adição de IS Concentrações em ng/mL.....	49
Tabela 14- Precisão intermediária (DPR, %) dos 6 analitos em matriz óleo	50
Tabela 15- Limite de detecção (LOD), Limite de quantificação (LOQ) para os 6 analitos em material vegetal e óleos.....	50
Tabela 16- Resultados da quantificação de canabinoides por LC-MS/MS em óleos/resinas (média de duas amostras, em %)......	51
Tabela 17- Resultados da quantificação de canabinoides por LC-MS/MS em material vegetal (média de duas amostras, em %)......	55

RESUMO

Nos últimos anos a *Cannabis sativa* L. passou de uma planta proibida para uma que está ganhando aceitação cultural e legal em muitos países para uso medicinal e recreativo. À medida que jurisdições legalizam os produtos à base de cannabis, a variedade e complexidade desses produtos ultrapassam o material vegetal seco. Embora existam numerosos compostos ativos na planta, os principais canabinoides de preocupação regulatória e de segurança são Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), canabidiol (CBD), Δ^9 -ácido tetrahydrocannabinólico-A (THCA-A), ácido canabidiólico (CBDA) e o canabinol (CBN) que pode ser produto da oxidação do THC. Recentemente, a Anvisa retirou o CBD da lista de substâncias proibidas e o reclassificou para substâncias controladas, além de liberar a fabricação e comercialização de seus produtos medicinais. Por isso, métodos apropriados para quantificar os constituintes biologicamente ativos são fundamentais para garantir a segurança e a conformidade regulatória e monitoramento dos produtos destinados ao uso medicinal, como também na apreensão e combate ao tráfico de drogas. Nesse estudo, foi otimizado e validado um método por LC-MS/MS para análise simultânea de CBD, CBDA, THC, THCA-A, CBN e ácido canabinólico (CBNA) em material vegetal e produtos oleosos à base de cannabis. A separação cromatográfica foi feita numa coluna Zorbax Eclipse Plus C18, eluição isocrática contendo 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila e água (85:15). O sistema de espectrometria de massas foi com ionização por eletrospray (ESI+) e um analisador de massa triplo-quadrupolo adquirindo os dados no modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM). Amostras de plantas secas e moídas (50 mg) foram extraídas com uma solução de acetonitrila e metanol (80:20), homogeneizadas, centrifugadas, filtradas e diluídas. As amostras de óleo homogeneizadas (12 mg) foram diluídas, agitadas e filtradas. As diluições foram ajustadas para a faixa de quantificação da curva de calibração (1,56 a 100 ng/mL) e injetadas no LC-MS/MS (API 3200, Sciex). O método foi validado utilizando amostra controle de *Humulus lupulus* para as amostras de planta e uma mistura de óleos de girassol, coco e azeite extravirgem como amostra controle para extratos oleosos. Ambas as matrizes foram fortificadas com os analitos e padrões internos (THC-*d3*, CBD-*d3*, CBN-*d3* e THCA-*d3*). A linearidade das curvas de calibração em fase móvel foi demonstrada com coeficiente de regressão $r^2 \geq 0,99$. Os limites de quantificação (LOQ) de THC variaram entre 0,015% para óleos e 0,09% para plantas, cumprindo os requisitos regulamentares para produtos à base de cannabis ($\leq 0,2$ % THC). O método validado foi aplicado com sucesso na análise de 23 óleos de cannabis, 4 amostras de haxixe e 114 amostras de material vegetal. Todos os óleos e haxixes continham canabinoides acima do LOQ e muitos tinham altos níveis de THC (máximo de 60,9%) e CBD (29,8%), enquanto apenas 15% das amostras tinham teor de THC $\leq 0,2\%$. Não há limite legal de THC para material vegetal, e os teores variaram entre partes das plantas, com as raízes apresentando menor e as inflorescências maior teor. O estudo revelou que os produtos dentro da mesma categoria podem apresentar variações nos perfis e níveis de canabinoides, indicando a necessidade de quantificação de canabinoides em produtos à base de cannabis, dado o atual cenário regulatório diversificado e em rápida mudança em todo o mundo.

Palavras-chave: *Cannabis sativa* L., canabinoides, LC-MS/MS, validação de método, tetrahydrocannabinol, canabidiol, canabinol.

ABSTRACT

In recent years, *Cannabis sativa L.* has transitioned from being a prohibited plant to one that is gaining cultural and legal acceptance in many countries for both medicinal and recreational use. As jurisdictions legalize cannabis-based products, the variety and complexity of these products extend beyond dried plant material. While numerous active compounds exist within the plant, the primary cannabinoids of regulatory and safety concern are Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), cannabidiol (CBD), Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid-A (THCA-A), cannabidiolic acid (CBDA), as well as cannabinol (CBN), which can result from THC oxidation. Recently, Anvisa removed CBD from the list of prohibited substances and reclassified it as controlled substances, while also allowing the manufacture and commercialization of its medicinal products. Therefore, appropriate methods for quantifying biologically active constituents are essential to ensure safety, regulatory compliance, and monitoring of products intended for medicinal use, as well as for drug seizure and combatting drug trafficking. In this study, an LC-MS/MS method was optimized and validated for the simultaneous analysis of CBD, CBDA, THC, THCA-A, CBN, and cannabinolic acid (CBNA) in plant material and oil-based cannabis products. Chromatographic separation was achieved using a Zorbax Eclipse Plus C18 column with isocratic elution containing 0.1% formic acid in acetonitrile and water (85:15). The mass spectrometry system employed electrospray ionization (ESI+), with a triple quadrupole mass analyzer acquiring data in multiple reaction monitoring (MRM) mode. Dried and ground plant samples (50 mg) were extracted with an acetonitrile and methanol solution (80:20), homogenized, centrifuged, filtered, and diluted. Homogenized oil samples (12 mg) were diluted, agitated, and filtered. Dilutions were adjusted within the calibration curve quantification range (1,56 to 100 ng/mL) and injected into the LC-MS/MS system (API 3200, Sciex). The method was validated using a control sample of *Humulus lupulus* for plant samples and a mixture of sunflower, coconut, and extra virgin olive oils as control samples for oil samples. Both matrices were fortified with analytes and internal standards (THC-*d*3, CBD-*d*3, CBN-*d*3, and THCA-*d*3). Calibration curve linearity was demonstrated in the mobile phase with regression coefficients $r^2 \geq 0.99$. The quantification limits (LOQ) for THC ranged from 0,015% for oils to 0,09% for plants, meeting regulatory requirements for cannabis-based products ($\leq 0.2\%$ THC). The validated method was successfully applied to the analysis of 23 cannabis oils, 4 hashish samples, and 114 plant material samples. All oils and hashish contained cannabinoids above the LOQ, with many exhibiting high levels of THC (up to 60.9%) and CBD (29.8%), while only 15% of samples had THC levels $\leq 0.2\%$. There is no legal THC limit for plant material, and levels varied across plant parts, with roots displaying lower content and inflorescences higher content. The study revealed that products within the same category can exhibit variations in cannabinoid profiles and levels, highlighting the need for cannabinoid quantification in cannabis-based products, given the current diverse and rapidly changing regulatory landscape worldwide."

Keywords: Cannabis sativa L., cannabinoids, LC-MS/MS, method validation, tetrahydrocannabinol, cannabidiol, cannabinol.

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO.....	1
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
1. História da cannabis.....	3
2. A Planta.....	4
3. Compostos químicos da cannabis	5
4. Canabinoides.....	6
5. Quimiotipos.....	9
6. Diferenças entre cânhamo e maconha.....	11
7. Uso econômico da cannabis	14
8. Uso recreativo da cannabis.....	16
9. Aplicações médicas da cannabis e o sistema endocanabinoide.....	18
10. Regulação da cannabis.....	20
11. Regulação da cannabis no Brasil.....	22
12. Técnicas de análises de canabinoides.....	24
13. LC-MS/MS.....	25
14. Canabinoides em cannabis e seus produtos.....	27
III. OBJETIVOS.....	30
IV. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
1. Solventes.....	31
2. Padrões analíticos.....	31
3. Amostras	31
4. Preparação da curva de calibração.....	33
5. Preparação de amostras.....	34
6. Condições analíticas.....	37
7. Validação do método.....	38
V. RESULTADOS.....	40
1. Validação do método UPLC-MS/MS.....	40
2. Validação do método	42
3. Análise das amostras e óleo e material vegetal.....	51
VI. DISCUSSÃO.....	58
VII. CONCLUSÃO.....	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

I. INTRODUÇÃO

A história da *Cannabis sativa L.* (cannabis) no Brasil teve início no momento da descoberta do país. As velas e cordomes das primeiras caravelas eram produzidas com fibras de cannabise posteriormente passou a ser cultivada entre índios e negros escravos. Séculos mais tarde, a planta foi considerada um excelente medicamento contra vários males após sua popularização entre médicos ingleses do exército imperial na Índia e intelectuais franceses. A criminalização da cannabis no mundo iniciou-se em 1924 com a II Conferência Internacional do Ópio (CARLINI, 2006) e atualmente é a droga mais consumida no mundo, com prevalência cerca de cinco vezes superior à do consumo de outras drogas (EMCDDA, 2021).

No Brasil, a repressão à produção e ao tráfico ilícito de substâncias entorpecentes está normatizada pela Lei nº 11.343/2006. Esta Lei institui o Sistema Nacional de Políticas Públicas sobre Drogas (Sisnad) que, de acordo com as alterações provocadas pela lei nº 13.840/2019, atua em articulação com Sistema Único de Saúde (SUS) e com o Sistema Único de Assistência Social (SUAS) (BRASIL, 2006; BRASIL, 2019).

Vários estudos foram conduzidos no intuito de informar sobre o risco do uso recreativo de cannabis e também evidências do seu uso no tratamento de diversas condições patológicas (CARVALHO; BRITO; GANDRA, 2017). Diante do cenário da alta demanda por tratamento de pacientes portadores de enfermidades neurológicas graves, principalmente epilepsia refratária, e com o intuito de fornecer à população produtos seguros e de qualidade à base de substâncias derivadas de cannabis, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) publicou a RDC nº 327, de 9 de dezembro de 2019. Essa resolução dispõe sobre os procedimentos para a concessão da Autorização Sanitária para a fabricação e a importação, além de estabelecer requisitos para a comercialização e a fiscalização de produtos de cannabis para fins medicinais (BRASIL, 2019).

Nos últimos anos, ocorreram avanços no cultivo de plantas de cannabis e na produção de produtos relacionados, e mudanças na legislação em alguns países tiveram impacto na dinâmica do cultivo, produção e mercado de cannabis e produtos relacionados. Como resultado desses fatores, há agora uma grande variedade de cannabis disponível nos mercados, com teores variados de tetrahydrocannabinol (THC), o principal componente psicoativo da planta, e de uma ampla variedade de produtos contendo canabidiol (CBD) para fins terapêuticos. No entanto, a presença no mercado de produtos de cannabis adulterados com canabinoides sintéticos altamente potentes tem gerado grande preocupação (EMCDDA, 2021).

No âmbito pericial, os métodos para identificação de canabinoides em materiais apreendidos são os testes químicos rápidos - presuntivos (Fast Corinth V salt, Fast Blue B salt e Rapid Duquenois), e os métodos cromatográficos qualitativos, que confirmam a presença (VALENTE *et al.*, 2006; UNODC, 2009). Mais recentemente, tem havido a necessidade de quantificar os níveis de THC para avaliar a conformidade com a regulamentação nacional dos produtos ($\leq 0,2$ % THC) e identificar outros canabinoides presentes, o que exige técnicas analíticas reprodutíveis e sensíveis (UNODC, 2022).

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS) incorpora a confirmação da identidade das substância em análise, o que nem sempre possui a seletividade adequada em métodos cromatográficos com detectores tradicionais, como UV-Vis . Apesar de ainda não ser amplamente utilizada para análises de rotina de canabinoides em laboratórios forenses, seu uso é importante para gerar consistência e confiabilidade nos resultados, e ao aumento da confiança dos consumidores e reguladores do mercado de cannabis (MCRAE; MELANSON, 2020). Nesse sentido, este estudo tem como objetivo otimizar e validar um método analítico utilizando LC-MS/MS e quantificar os níveis de canabinoides em material vegetal e produtos à base de cannabis.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. História da Cannabis

A história da *Cannabis sativa L.* é complexa e multifacetada. Embora a planta tenha sido usada por milhares de anos para diversos fins, sua proibição no século XX levou a controvérsias e debates acalorados. A cannabis foi uma das primeiras plantas domesticadas na história da humanidade, e sua utilização remonta há mais de 10 mil anos, usada para uma variedade de fins, incluindo produção de têxteis e alimentos (REN *et al.*, 2021). Após a Última Era do Gelo, as sementes de cannabis seguiram a migração de povos nômades e foram trocadas comercialmente entre diferentes grupos, contribuindo com sua propagação pelo planeta, estabelecendo uma simbiose mutuamente benéfica (CROCQ, 2020).

Na época do Império Romano, a cannabis era usada medicinalmente para tratar a dor e inflamação. O filósofo Plínio, O Velho, mencionou as propriedades analgésicas e antiinflamatórias do chá feito a partir da raiz da planta, mas não mencionou seus efeitos psicoativos. Outro escritor da época, Dioscórides, também mencionou os efeitos antiinflamatórios da cannabis, mas observou que o uso excessivo poderia reduzir o desejo sexual. Galeno, por sua vez, escreveu sobre as sobremesas feitas com a planta que eram servidas em reuniões sociais na Itália, e observou que as sementes causavam uma sensação de calor, podendo afetar a cabeça se consumidas em grandes quantidades (CROCQ, 2020).

O termo cannabis tem a mesma origem etiológica na maioria dos idiomas. *Hemp* em inglês e *Hanf* em alemão são etimologicamente cognatos do grego *κάνναβις*, do latim *cannābis*, do italiano *canapa* e do russo *konoplja*. Os idiomas não indo-europeias também utilizam palavras etimologicamente cognatas, como *qunnab* em árabe, uma língua semítica, *kendir* em turco e *kanap'is* em georgiano, uma língua caucasiana (CROCQ, 2020).

A disseminação global da cannabis terminou quando a planta alcançou a África e, finalmente, a América. A Espanha introduziu o cultivo de cannabis no Chile central, na primeira década após a colonização e Louis Hébert foi o primeiro colonizador a cultivar a planta em 1606 no Canadá (CROCQ, 2020). A introdução da cannabis no Brasil se deu a partir de 1549, quando os escravos a trouxeram, sendo conhecida como Fumo-de-Angola. Com o passar dos anos, o uso da planta se disseminou rapidamente, mas ficou restrito aos menos favorecidos, como os índios e escravos, que começaram a cultivá-la para uso próprio. Séculos mais tarde, a cannabis tornou-se popularizada devido aos seus efeitos medicinais, que foram constatados e divulgados por intelectuais franceses e ingleses. Na década de 1930, a planta já era citada em

compêndios médicos e catálogos de produtos farmacêuticos. No entanto, foi nessa mesma década que começou a repressão do uso da cannabis no Brasil e no mundo (CARLINI, 2006).

2. A Planta

A *Cannabis sativa* L. (Linnaeus), membro da família *Cannabaceae* junto com o gênero *Humulus* (lúpulo), é uma planta herbácea anual. Ela é dioica, raramente monoica, anemófila e possui caules eretos que podem atingir até 5 metros, dependendo das condições ambientais e variabilidade genética (GLOSS, 2015; ELSOHLY *et al.*, 2017; MICALIZZI *et al.*, 2021). É uma planta monoespecífica (*Cannabis sativa* L.), dividida em várias subespécies (*C. sativa* subsp. *sativa*, *C. sativa* subsp. *indica*, *C. sativa* subsp. *ruderalis*, *C. sativa* subsp. *spontanea*, *C. sativa* subsp. *kafiristanca*) (UNODC, 2009). A cannabis é naturalmente propagada a partir de sementes e cresce melhor em solos bem protegidos e com boa retenção de água (UNODC, 2022). A extensão da ramificação, e a altura da planta, depende de fatores ambientais e hereditários, bem como do método de cultivo (UNODC, 2022).

Estudos filogenéticos e de homologia de sequências de DNA extraído de amostras arqueobotânicas e modernas indicam que a espécie vegetal é originária da Ásia central e foi introduzida na Europa como planta cultivada e domesticada durante a idade do Bronze (MUKHERJEE *et al.*, 2008; MCPARTLAND; GUY; HEGMAN, 2018). As subespécies *sativa*, *indica* e *ruderalis* (Figura 1) se adaptaram a diferentes regiões do mundo e diferenciam-se em relação aos níveis de canabinoides que possuem (MCPARTLAND, 2018).

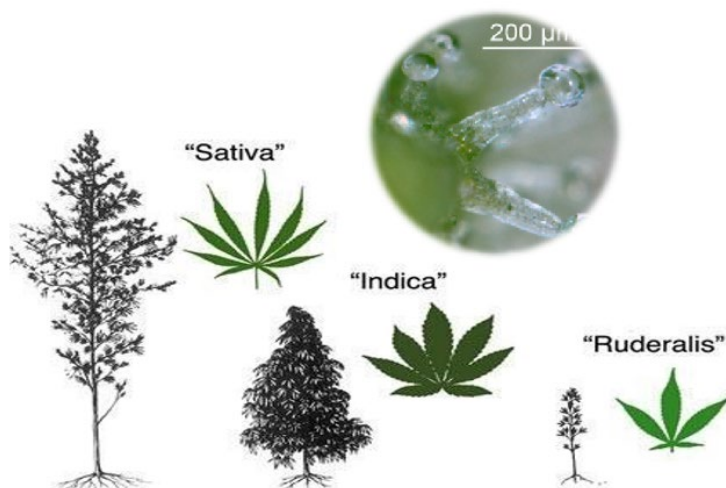


Figura 1: Taxonomia vernacular da cannabis, mostrando a imagem de um tricoma pedunculares capitados. Fonte: McPartland, 2018; UNODC, 2022, modificado

As subespécies *sativa* e *indica* são amplamente difundidas e economicamente mais importantes. Em comparação com a *sativa*, que pode chegar a 3,5 metros de altura, as plantas

da variedade *indica* são geralmente mais baixas (cerca de 1,8 metros) e têm um aspecto mais arbustivo, com folhas verdes largas e escuras que amadurecem mais cedo quando cultivadas ao ar livre. Já a subespécie *ruderalis* é cultivada principalmente nas regiões do norte dos Himalaias e dos estados do sul da antiga União Soviética, sendo conhecida por sua resistência e crescimento esparsos. Essa variedade é raramente cultivada por causa de seu baixo teor de substâncias psicoativas (ELSOHLY *et al.*, 2017).

A *Cannabis sativa* L. apresenta características morfológicas distintas e pode ser identificada pela presença de tricomas, que são estruturas microscópicas presentes na superfície da planta, semelhantes a pelos (UNODC, 2022). Embora a função dos tricomas não seja totalmente clara, acredita-se que uma de suas finalidades seja capturar insetos que tentam se alimentar da planta (GLOSS, 2015).

Existem dois tipos principais de tricomas: não glandulares e glandulares. Os tricomas não glandulares apresentam três formas diferentes: "em forma de garra", na superfície superior da folha; finos e longos na superfície inferior da folha e outras partes vegetais; e finos e curtos em outras partes da planta (UNODC, 2022). Os tricomas glandulares povoam a maior parte das superfícies aéreas das plantas, mas são mais densamente observados nas inflorescências femininas que produzem a resina. Eles apresentam três tipos diferentes: bulbosos, sésseis capitados e peduncular capitados. Os pedunculares capitados (Figura 1) produzem a maior quantidade de resina e são encontrados em maior número nas brácteas das flores femininas (UNODC, 2022).

3. Compostos químicos da cannabis

A cannabis contém mais de 400 compostos, e tem sido descrita como a 'planta das mil e uma moléculas' (ANDRE, HAUSMAN, GUERRIERO, 2016). Os compostos que apresentam a estrutura terpenofenólica típica C_{21} ou C_{22} são conhecidos como canabinoides e possuem derivados e produtos transformados que também são considerados canabinoides. Mais de 120 canabinoides já foram isolados, os quais podem ser agrupados em 11 tipos gerais: (-)- Δ^9 -trans-tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC, ou THC), (-)- Δ^8 -trans-tetrahydrocannabinol (Δ^8 -THC), canabigerol (CBG), canabicromeno (CBC), canabidiol (CBD), canabinodiol (CBND), canabielsol (CBE), canabiciclol (CBL), canabinol (CBN), canabitriol (CBT) e um grupo de canabinoides diversos (Figura 2). Os compostos de uma mesma classe geralmente diferem quanto ao número de carbonos da cadeia lateral, que pode variar de 1 a 5 carbonos, e também

podem diferir na posição dos radicais presentes na estrutura básica da classe (ASHTON, 2001; ELSOHL Y *et al.*, 2017).

Todas as subespécies da cannabis são ricas em compostos fitoquímicos bioativos, mas com composição fitoquímica variada. A subespécie *sativa* e *indica* são mais economicamente importantes e amplamente distribuídas, enquanto a variedade *ruderalis* é caracterizada por um crescimento mais ralo e "daninho" e raramente é cultivada por ter um nível baixo de CBD e THC quando comparado com as outras duas (GLOSS, 2015; ELSOHL Y *et al.*, 2017; UBEED *et al.*, 2022). A variedade *sativa* tende a ter teores mais elevados de THC e menores de CBD em comparação com a *indica*. Ela é encontrada em todo o mundo e compreende a maioria das variedades de drogas equatoriais, como as colombianas, mexicanas, nigerianas e sul-africanas (THOMAS; ELSOHL Y, 2016).

4. Canabinoides

Os canabinoides são uma classe de compostos quimicamente semelhantes que podem ser derivados de plantas, sintetizados artificialmente ou produzidos pelo corpo humano (conhecidos como endocanabinoides). Os primeiros compostos canabinoides foram identificados em plantas da espécie *Cannabis sativa*, e por isso, foram nomeados como fitocanabinoides. No entanto, atualmente sabe-se que outras espécies de plantas e fungos também possuem a capacidade de produzir certos tipos de fitocanabinoides, embora em quantidades menores (Figura 2) (GÜLCK; MØLLER, 2020).

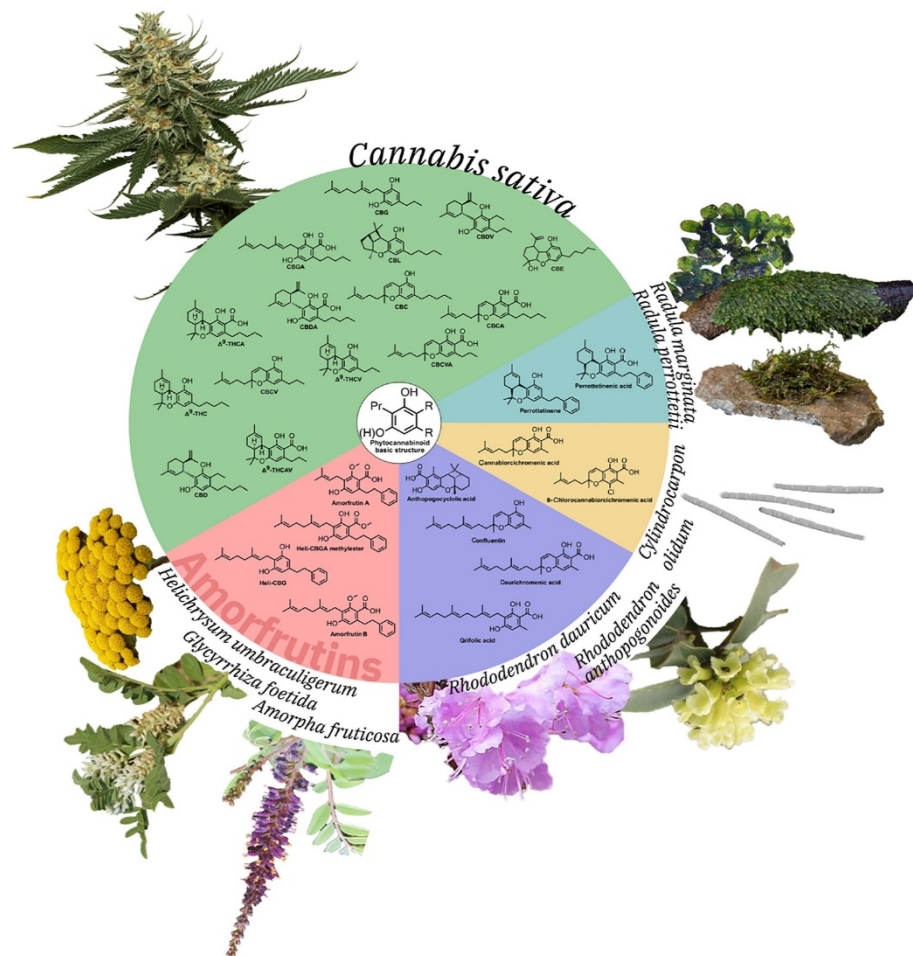


Figura 2: Ilustração das características estruturais dos canabinoides encontrados em diferentes espécies vegetais. Fonte: Gülck e Möller (2020)

As pesquisas sobre a cannabis começaram no início do século XIX, mas o primeiro progresso foi alcançado apenas no início da década de 1940 por Alexander Todd na Inglaterra e Roger Adams nos Estados Unidos, que isolaram independentemente o CBN e o CBD (MECHOULAM, FRIDE, DI MARZO, 1998). Em 1964, Gaoni e Mechoulam abriram o caminho para os estudos dos canabinóides após isolar e caracterizar pela primeira vez, o Δ^9 -THC (MECHOULAM, GAONI, 1965).

Os principais canabinóides que constituem a cannabis são o THC, o CBD e o CBC, sendo o THC e o CBD os mais amplamente pesquisados. Na biomassa fresca, cerca de 95% do THC, CBD e CBC se encontram em suas respectivas formas ácidas: ácido tetrahydrocannabinólico (THCA), ácido canabidiólico (CBDA) e ácido canabicromênico (CBCA). Essas substâncias são formadas pela catálise enzimática do ácido canabigerólico (CBGA) usando as respectivas enzimas: ácido Δ^9 -tetrahydrocannabinólica sintase (Δ^9 -THCAS), ácido canabidiólica sintase (CBDAS) e ácido canabicromênica sintase (CBCAS) (Figura 3).

Essas enzimas são as primeiras sintases de canabinóides a serem estudadas e alvos potencialmente atrativos para diversas aplicações biotecnológicas, pois produzem os precursores diretos de canabinóides farmacologicamente ativos que são formados pela descarboxilação induzida pela luz/calor (TAURA *et al.*, 2007; THOMAS; ELSOHLY, 2016; ROTTI *et al.*, 2019, TAHIR *et al.*,2021).

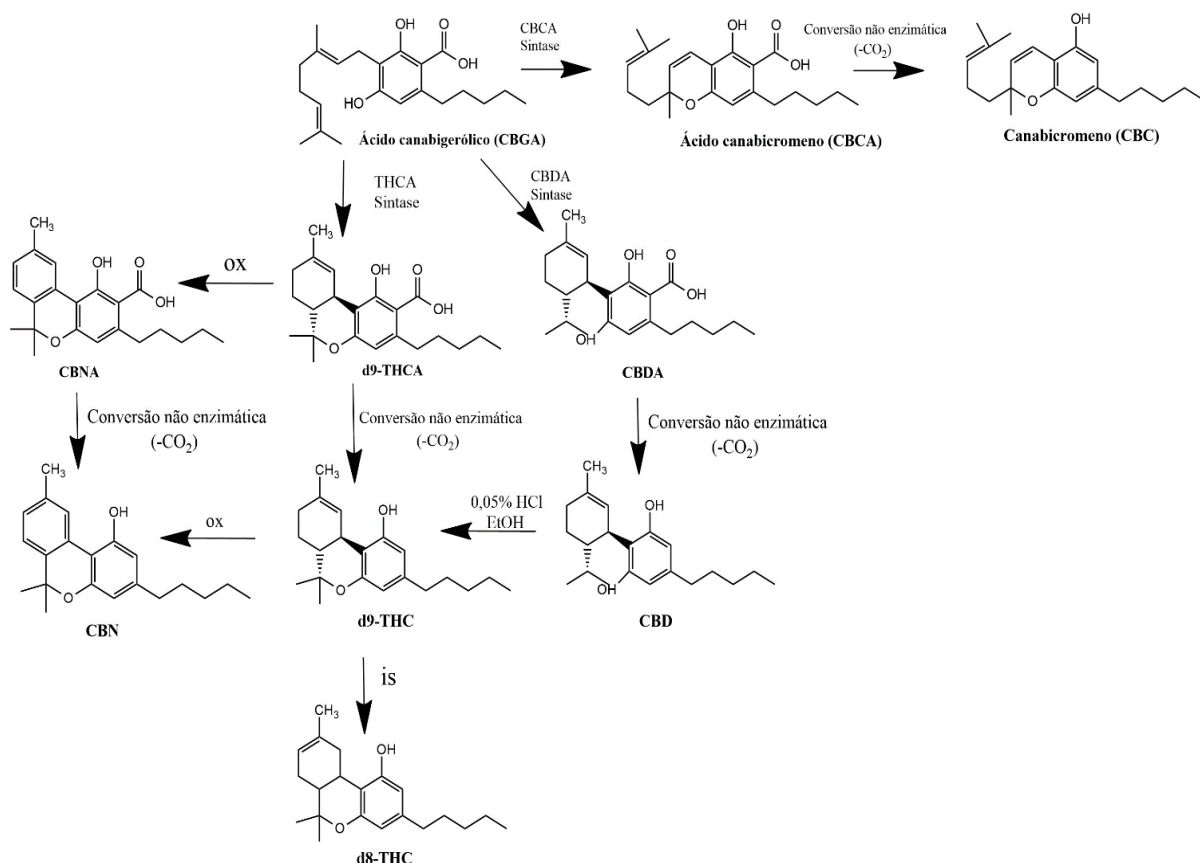


Figura 3: Biossíntese de canabinóides. Fonte: Tahir *et al.* (2021), modificado

O CBDA e THCA são precursores sem ação psicoativa que sofrem descarboxilação parcial ou completa da forma ácida para a neutra (THCA → THC, CBDA → CBD) durante a secagem, armazenamento e processamento térmico (LANZ *et al.*, 2016; ŽUK-GOŁASZEWSKA, GOŁASZEWSKI, 2018). O Δ^9 -THCA e Δ^9 -THC oxidam facilmente para CBNA e CBN, respectivamente, na presença de oxigênio e luz durante a descarboxilação térmica ou até mesmo com o envelhecimento (CITTI *et al.*, 2017; CARVALHO *et al.*, 2020; UNODC, 2022). Da mesma forma, durante o armazenamento ou descarboxilação, Δ^9 -THC também pode se converter para um isômero conhecido como Δ^8 -THC, que é um artefato do processo de envelhecimento (PELLATI *et al.*, 2018, TAHIR *et al.*,2021). O Δ^8 -THC pode estar

presente em alguns produtos à base de cannabis, apesar de ser um isômero do THC que ocorre naturalmente em menor quantidade (UNODC, 2022). O conteúdo de Δ^8 -THC e CBNA é tipicamente baixo a não detectado em amostras de inflorescência de cannabis (SARMA et al., 2020).

Deve-se levar em consideração a possibilidade de conversão do CBD para Δ^9 -THC em condições ácidas durante a análise (UNODC, 2022). Anteriormente, acreditava-se que o THCA era gerado a partir do CBDA por meio de um processo de ciclização. Essa teoria foi respaldada por Gaoni e Mechoulam, que conduziram um experimento em que o CBD foi fervido em etanol contendo 0,05% de ácido clorídrico (HCl) por duas horas, resultando em uma mistura de THC e material inicial (GAONI ;MECHOULAM, 1965). No entanto, é importante salientar que as condições reacionais desse processo diferem das encontradas durante a biossíntese natural nas plantas. Ainda não foi detectada a presença da isomerase, responsável pela conversão do CBDA em THCA em ensaios enzimáticos utilizando extratos de enzimas brutas da cannabis (TAHIR et al., 2021).

A maconha é composta por folhas secas, flores, caules e sementes das subespécies sativa ou indica, que contêm 5-20% de THC (HSU et al., 2021). Por outro lado, o haxixe é outra forma comum, consistindo em partes resinosas da planta que são moldadas em diferentes formatos. O óleo de haxixe é um extrato concentrado de cannabis, geralmente encontrado na forma líquida ou semissólida. Durante o armazenamento desses produtos, tanto o haxixe quanto o óleo de haxixe, ocorre um aumento na concentração de CBN, enquanto a concentração de Δ^9 -THC diminui, embora em taxas diferentes (ELSOHLY; SLADE, 2005).

5. Quimiotipos

De acordo com Salamone et al. (2022), o crescente interesse público na cannabis, juntamente com a impressionante variabilidade de características quimiotípicas, inspirou a divisão da cannabis em grupos (ou quimiotipos) reconhecidos dentro do gênero, baseados em diferentes concentrações de canabinoides principais, incluindo Δ^9 -THC, CBD e CBG. Com base no perfil de canabinoides, é possível distinguir a cannabis sativa (fibra) e (droga) (SALENTIJN et al., 2015). Não existe ainda um consenso sobre a classificação dos quimiotipos da *Cannabis sativa* (SALENTIJN et al., 2015), e alguns autores propõem três quimiotipos (Tabela 1). O Quimiotipo (I) que abrange as plantas com alto teor de THC; (II) cannabis medicinal com um conteúdo de THC:CBD de 1:1; (III) tipo fibra que engloba a cannabis que

possui o CBD como constituinte predominante e um teor de THC que varia de 0,2 a 0,6% (VAN BAKEL *et al.*, 2011; SALENTIJN *et al.*, 2015; SAWLER *et al.*, 2015; WEIBLEN *et al.*, 2015).

Nas plantas do quimiotipo (IV), o CBG, precursor dos canabinoides, é o principal canabinoide encontrado. As plantas do tipo (V) são em grande parte desprovidas de canabinoides devido a um bloqueio na via metabólica (PACIFICO *et al.*, 2007; SALENTIJN *et al.*, 2015; AIZPURUA-OLAIZOLA *et al.*, 2016). O quimiotipo (VI) é encontrado em plantas com um fenótipo morfológico específico, com característica juvenil prolongada, ou seja, produzem canabicromeno (CBC) em plantas jovens que declina com a maturação da planta. Os fatores genéticos que controlam essa característica são independentes do lócus que codifica as enzimas Δ^9 -THCS e CBDS (MEIJER, HAMMOND, SUTTON, 2009; SALENTIJN *et al.*, 2015).

Tabela 1: Quimiotipos da *Cannabis sativa*. Fonte: Meijer, Hammond, Sutton (2009); Salentijn *et al.* (2015); Salamone *et al.* (2022)

Quimiotipo	Principais canabinoides	Classificação
I	Plantas do tipo droga (narcótico) com alto conteúdo do psicotrópico Δ^9 -THC	Planta tipo droga
II	Cannabis medicinal com Δ^9 -THC/CBD 1:1	Tipo de fibra
III	Cannabis com CBD como predominante e um conteúdo mínimo de Δ^9 -THC (de 0,2% p/p a 0,6% p/p)	Tipo de fibra
IV	Cannabis com CBG como canabinoide predominante	Tipo de fibra
V	Cannabis com baixa concentração de canabinoides	Tipo de fibra
VI	Cannabis CBC com característica juvenil prolongada	Tipo de fibra

Trofin *et al.* (2012) propõe uma outra classificação *Cannabis sativa*: o tipo droga, com concentração de Δ^9 -THC variando de 2%-8%; o tipo intermediário com mais de 0,5% de Δ^9 -THC e; o tipo fibra, com concentrações altas de CBD e até 0,3 % de Δ^9 -THC.

No estudo de Aizpurua-Olaizola *et al.* (2016) as plantas de diferentes quimiotipos foram claramente diferenciadas pelo conteúdo de terpenos e terpenos característicos de cada quimiotipo foram identificados. Embora não exista um acordo geral sobre a definição dos quimiotipos, a relação entre THC e CBD tem sido vista como uma informação crucial para a identificação dos efeitos farmacológicos e toxicológicos da cannabis (SARMA *et al.*, 2020).

Segundo Pacifico *et al.* (2007), a classificação do quimiotipo de uma planta de cannabis requer uma análise no final do ciclo de crescimento, durante a fase de floração. Isso implica que classificar as plantas como "droga" ou "fibra" precocemente com base em características morfológicas pode levar a erros. Além disso, a concentração de canabinoides e terpenos varia durante todo o ciclo de vida da planta de cannabis, com diferentes quimiotipos apresentando padrões distintos de evolução. Assim, a seleção de genótipos específicos pode ser uma estratégia eficaz para otimizar a produção de canabinoides e terpenos para uso medicinal e recreativo (AIZPURUA-OLAIZOLA *et al.*, 2016).

6. Diferenças entre cânhamo e maconha

A variedade da planta da *Cannabis sativa* cultivada para uso industrial é denominada *hemp* (cânhamo ou fibra). Essa variedade pode ser transformada em diversos produtos comerciais, como tecidos, alimentos, papel, ração, biocombustível, cordas e roupas. Esses produtos geralmente possuem um teor psicoativo de THC até 0,3%, mas esse teor de legalidade do cânhamo varia consideravelmente entre os países (UNODC, 2022). A maconha pode ser encontrada de várias formas no mercado ilícito, incluindo flor seca, processada como blocos compactados, ou como material triturado, que podem conter outras partes da planta, e varia amplamente de região para região (UNODC, 2022).

Para superar as questões taxonômicas e fornecer uma linguagem comum, governos e autoridades regulatórias estabeleceram um limite legal de THC para permitir a distinção entre cannabis cultivadas para produção de fibras ou para outros fins (maconha), ou seja, do tipo não droga e droga (FIORINI *et al.*, 2019; MICALIZZI *et al.*, 2021). É considerado fibra a planta de cannabis contendo até 0,3% de THC e planta contendo acima deste teor em peso seco é considerado maconha (BARCACCIA *et al.*, 2020). Sawler *et al.* (2015) caracterizaram a estrutura genética do gênero *Cannabis*, revelando diferenças genéticas entre cânhamo e maconha, que não se limita apenas aos genes envolvidos na biosíntese de THC, embora este seja um importante marcador genético para distingui-los.

O teor de THC dos diferentes produtos de cannabis (erva, resina e óleo) é o resultado da proporção das diferentes partes da planta (Tabela 2) usadas em sua produção. Em 1995, a potência média da cannabis era de aproximadamente 4% de THC, que aumentou ao longo dos anos (ELSOHLY *et al.*, 2016, UNODC, 2022).

Tabela 2: Teor de THC em diferentes partes da planta da cannabis estimado pela UNODC (2022)

Partes da planta	Teor total de THC (%)
Flores	10-12
Folhas	1-2
Talos	0,1-0,3
Raízes	< 0,03

O aumento da potência da cannabis pode estar relacionado a mudanças na genética das plantas e nas práticas de cultivo, bem como ao aumento da demanda por produtos de cannabis mais potentes, como "skunk" (um híbrido dito ser 75% *sativa* e 25% *indica*). Estes são produzidos por meio de condições de cultivo otimizadas que pode gerar cannabis com teor total de THC variando de 10% a 25%, resina de cannabis com 25% de THC e óleo de cannabis com 60% de THC (ELSOHLY *et al.*, 2016; UNODC, 2022). A técnica moderna de cultivo seletivo utiliza clonagem ou reprodução assexuada para controlar a genética das plantas e seus perfis canabinoides, incluindo o THC e o CBD (UNODC, 2022). A porcentagem de THC na planta subiu em média cerca de 4% para 16% nos Estados Unidos no período de 1995-2019, e de cerca de 6% para 11% em Europa no período 2002-2019 (UNODC, 2021).

Segundo a agência de saúde canadense (Health Canada, 2023) a maioria dos produtos à base de cannabis são feitos usando as flores e folhas da planta, levando a uma variedade de teores de THC (Tabela 3).

Tabela 3: Principais formas de cannabis e as potências típicas do THC. Fonte: Health Canada (2023)

Forma	Descrição	Teor de THC
Material de ervas frescas ou secas	Flores e folhas da planta de cannabis	até 30%
Óleo de maconha	Extrato de cannabis dissolvido em óleo. Pode ser usado para fazer outras formas (por exemplo, comestíveis).	até 3%
Extratos quimicamente concentrados (por	Extrato de cannabis altamente concentrado dissolvido em solvente à base de petróleo (por	até 90%

Forma	Descrição	Teor de THC
exemplo, óleo de haxixe/budder/cera)	exemplo, butano). Shatter, Budder e cera altamente concentrados.	
Extratos fisicamente concentrados (por exemplo, haxixe/kief)	Tricomas soltos ou resina prensada da planta de cannabis.	até 60%
Comestíveis	Alimentos e bebidas contendo extratos de cannabis	Depende da quantidade de extrato adicionado
Tinturas/sprays	Extrato de cannabis dissolvido em um solvente, geralmente álcool. Pode ser usado para fazer outros produtos (por exemplo, comestíveis).	Varia
Crems/pomadas/ bálsamo	Preparação de extrato de cannabis preparada com álcool, óleo ou cera e aplicada na pele.	Varia

Um estudo realizado na Suíça (SGRM, 2022) revelou que aproximadamente dois terços das apreensões de cannabis herbácea continham níveis de THC entre 3% e 13% e entre as apreensões de resina, dois terços tinham teores que variavam de 8% a 18%, dependendo do cultivo e do método de produção. O uso de resina e/ou flores pode resultar em óleo de cannabis com teor de THC de até 90%. A Figura 4 apresenta a média do teor de THC (%) nas apreensões de cannabis em diferentes formas de apresentação durante o período de 2005 a 2022 na Suíça. Ao longo dos anos, o teor de THC na planta, com e sem flores, permaneceu praticamente constante, enquanto a maconha e o haxixe apresentaram um aumento, atingindo teores médios máximos de 13,2% e 23,9%, respectivamente, em 2022. O óleo de haxixe não seguiu um padrão de aumento ao longo dos anos e apresentou um teor médio máximo de 45,7% em 2016 (SGRM,2022).

Para fins de classificação, "total de THC" e "total de CBD" pode ser definido como a quantidade de THC ou CBD que leva em conta o potencial de THCA e CBDA para se converter quantitativamente em THC e CBD sem degradação adicional, usando as seguintes fórmulas.

Essas fórmulas representam a perda de massa devido à descarboxilação de THCA ou CBDA. O THC e o THCA referem-se especificamente ao isômero Δ^9 -THC (SARMA *et al.*, 2020).

$$\text{Total THC} = \text{THC} + 0.877 \times \text{THCA}$$

$$\text{Total CBD} = \text{CBD} + 0.877 \times \text{CBDA}$$

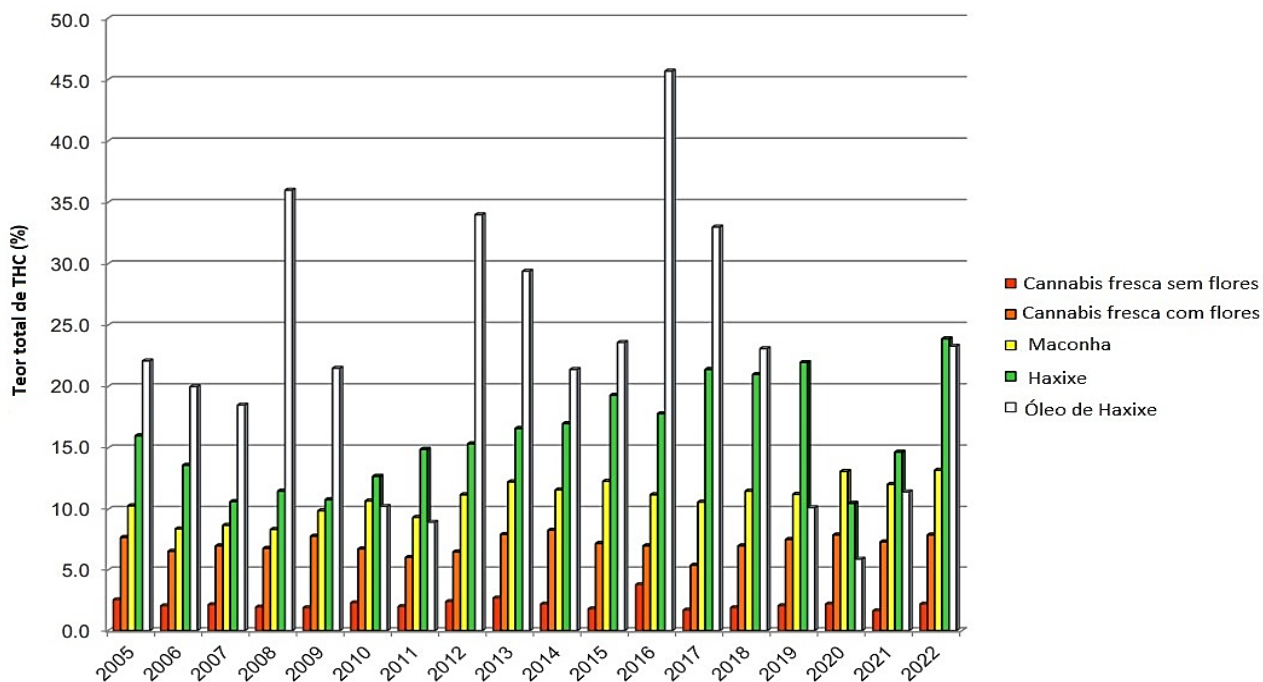


Figura 4: Total de THC (%) nas apreensões de cannabis em diferentes formas de apresentação durante o período de 2005 – 2022 na Suíça. Fonte: SGRM (2022)

7. Uso econômico da cannabis

A cannabis é uma planta versátil que em pouco tempo pode fornecer alta quantidade de biomassa, e sua forma domesticada é amplamente difundida e cultivada não só nos países asiáticos, mas também no Estados Unidos (EUA), Canadá, Europa e África. É multifuncional, sustentável e de baixo impacto ambiental que pode ser útil para vários campos de aplicação (ANDRE; HAUSMAN; GUERRIERO, 2016; IRAKLI *et al.*, 2019).

Tradicionalmente, as plantas de cannabis eram cultivadas para a produção de fibras têxteis e cordas, e as sementes eram usadas principalmente como ração animal. O cultivo diminuiu devido ao uso de fibras sintéticas e do uso da planta para produção de drogas. Somente nas últimas duas décadas, houve uma reintrodução do cultivo exclusivamente para fins industriais (FARINON *et al.*, 2020).

O cânhamo é cultivado para uso na produção de uma ampla variedade de produtos (Figura 5), incluindo alimentos e bebidas, produtos de cuidados pessoais, suplementos

nutricionais, tecidos e têxteis, papel e outros bens manufaturados O caule é usado como fonte de madeira e fibra que são empregados em indústrias de construção e automotiva, enquanto as sementes são ricas em componentes nutricionais e são considerados nutracêuticos. As folhas e flores são fontes de componentes bioativos que, além dos efeitos psicóticos, apresentam propriedades farmacológicas (ANDRE; HAUSMAN; GUERRIERO, 2016; CRF, 2018; IRAKLI *et al.*, 2019; FARINON *et al.*, 2020).

Devido à necessidade de reduzir o uso de produtos intensivos em carbono e combustíveis fósseis, os europeus estão explorando oportunidades para expandir o emprego do cânhamo. Nesse sentido, a Comissão da União Europeia (UE) reconhece que o cultivo dessa variedade da cannabis contribui para os objetivos do Pacto Ecológico Europeu (USDA, 2022).

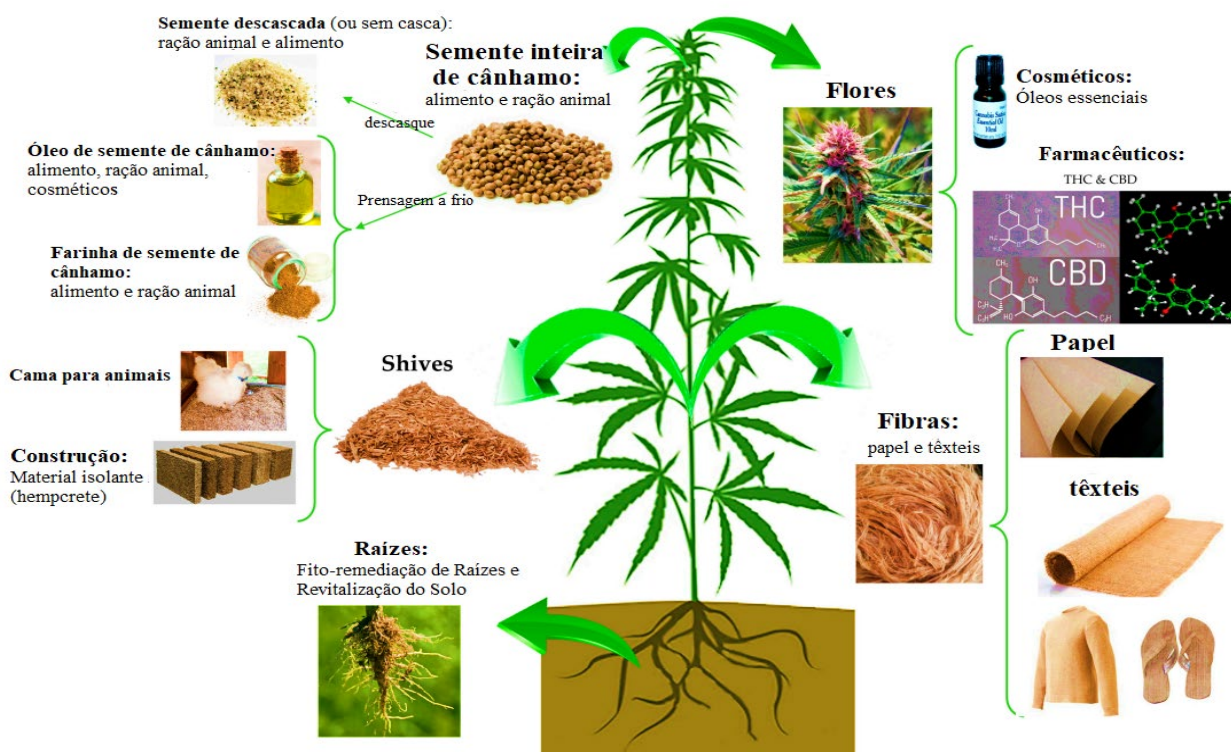


Figura 5: As diversas aplicações da cannabis (modificado). Fonte: Farinon *et al.* (2020)

O cultivo de cânhamo oferece diversos benefícios ambientais, como o armazenamento de carbono, a prevenção da erosão do solo e o aumento da biodiversidade. De acordo com a Comissão Europeia, o cânhamo tem uma alta capacidade de sequestro de carbono, sendo capaz de armazenar de 9 a 15 toneladas de CO₂ por hectare em um curto período. Além disso, as folhas densas do cânhamo protegem o solo, reduzindo a perda de água e evitando a erosão. Sua floração abundante também contribui para a polinização de outras culturas (USDA, 2022).

Outra vantagem do cultivo de cânhamo é a pouca necessidade de pesticidas, devido à sua baixa suscetibilidade a pragas. Além disso, o rápido crescimento e o sombreamento proporcionado pelo cânhamo ajudam a inibir o crescimento de ervas daninhas, quebrando os ciclos de doenças em rotações de culturas. Esses benefícios ambientais e a versatilidade do cânhamo em aplicações industriais e alimentícias têm impulsionado o aumento de sua produção na União Europeia (USDA, 2022).

Entre os países da UE, a França é a maior produtora de cânhamo, responsável por mais de 70% da produção no continente, seguido da Holanda (10%) e Áustria (4%). A França também lidera em termos de área agrícola dedicada ao cultivo de cânhamo, com quase 18.000 hectares, seguida pela Itália, Holanda e Estônia (EIHA, 2018; USDA, 2022). Inicialmente usadas como suplemento alimentar para animais, sementes de cânhamo têm sido exploradas no campo da tecnologia alimentar para melhorar a qualidade nutricional dos alimentos. para consumo humano, como produtos de panificação (FARINON *et al.*, 2020).

8. Uso recreativo da cannabis

No mercado ilegal, há uma variedade de preparações de cannabis disponíveis, como maconha, *sinsemilla* e *ditchweed*. *Sinsemilla* é uma variedade feminizada da cannabis sem sementes, o que resulta em flores mais potentes, e o *ditchweed* uma variedade selvagem com baixa concentração de substâncias psicoativas. Além do haxixe e óleo de haxixe, flores e resinas são frequentemente associadas ao tabaco quando utilizado em um cigarro chamado *blunt*. (ELSOHLY *et al.*, 2016; UNODC, 2021). Na Índia, Bangladesh e outros países da região, existe uma bebida tradicional chamada *bhang*, feita com folhas e flores frescas da planta de cannabis moídas em pasta e combinadas com leite, especiarias, açúcar e às vezes frutas secas. Essa bebida é especialmente popular durante o festival religioso de *Holi* (ELSOHLY *et al.*, 2016).

Não se sabe com precisão quando a cannabis passou a ser empregada especificamente como substância psicoativa (uso religioso, medicinal, recreativo), mas há registros da alteração emocional e comportamental causada pela queima tradicional dessa planta pelos citas (povo nômade iraniano das estepes pântico-cáspias). Em 440 aC, Heródoto descreve como esses povos preparavam pequenas câmaras hermeticamente fechadas com cobertores de feltro, e rastejando sob os cobertores, lançavam as sementes de cânhamo sobre pedras incandescentes e ficavam encantados com a fumaça perfumada (HERODOTUS, 2009).

Ao contrário de outras drogas à base de plantas, para as quais o cultivo e produção estão concentradas em apenas alguns países, a cannabis é produzida em quase todos os países do

mundo. No período de 2010 a 2019, o cultivo da cannabis foi relatado ao UNODC por meio de indicadores diretos (como o cultivo ou erradicação de plantas) ou indicadores indiretos (como a apreensão) por 151 países, cobrindo 97 % da população mundial (UNODC, 2021).

A cannabis foi a droga ilícita mais consumida no mundo em 2019, com cerca de 200 milhões de usuários entre 15 e 64 anos que consumiram ao menos uma vez no ano. Desde 2010, a prevalência do uso de cannabis aumentou em quase 5%, e permanece mais alto na América do Norte (14,5 %), Oceania (12,1%) e África Ocidental e Central (9,4 %) (UNODC, 2021). Entre 2009 e 2019, a quantidade apreendida caiu 35%, principalmente devido ao declínio nos Estados Unidos, que teve o uso recreativo legalizado em vários estados. As maiores apreensões em 2019 (que totalizaram 3.779 toneladas) ocorreram nos Estados Unidos, seguidos por Paraguai, Colômbia, Índia, Nigéria, Marrocos e Brasil. As maiores quantidades de resina de cannabis apreendida (que totalizou 1.395 toneladas) foram relatadas pela Espanha, seguida por Marrocos, Afeganistão, Paquistão e a República Islâmica do Irã (UNODC, 2021).

No Brasil, os últimos levantamentos nacionais de larga escala permitem observar que a prevalência do consumo de maconha entre a população geral permaneceu estável na linha do tempo, mas essa substância destaca-se como a droga ilícita mais consumida no país, com exceção do álcool e do tabaco (LARANJEIRA, MADRUGA, 2012; BASTOS *et al.*, 2017). De modo geral, os dados epidemiológicos referentes ao consumo de drogas no Brasil ainda são insuficientes para que se conheça em profundidade as diferenças regionais e a heterogeneidade do país, sobretudo ao considerar a extensão geográfica do território e o desafio de realizar estudos que representem a totalidade da população (BASTOS *et al.*, 2017).

De acordo com *The Global Cannabis Report* (2021), 70 países legalizaram a cannabis para uso médico, sendo que 26 deles permitem o acesso legal à cannabis com alto teor de THC para uso terapêutico. As regulamentações da cannabis variam entre os países, com alguns adotando mercados totalmente regulamentados, enquanto outros optam pela descriminalização ou permitem apenas o acesso médico (Figura 6). Alguns países, como Espanha e Holanda, permitem o consumo social no local.

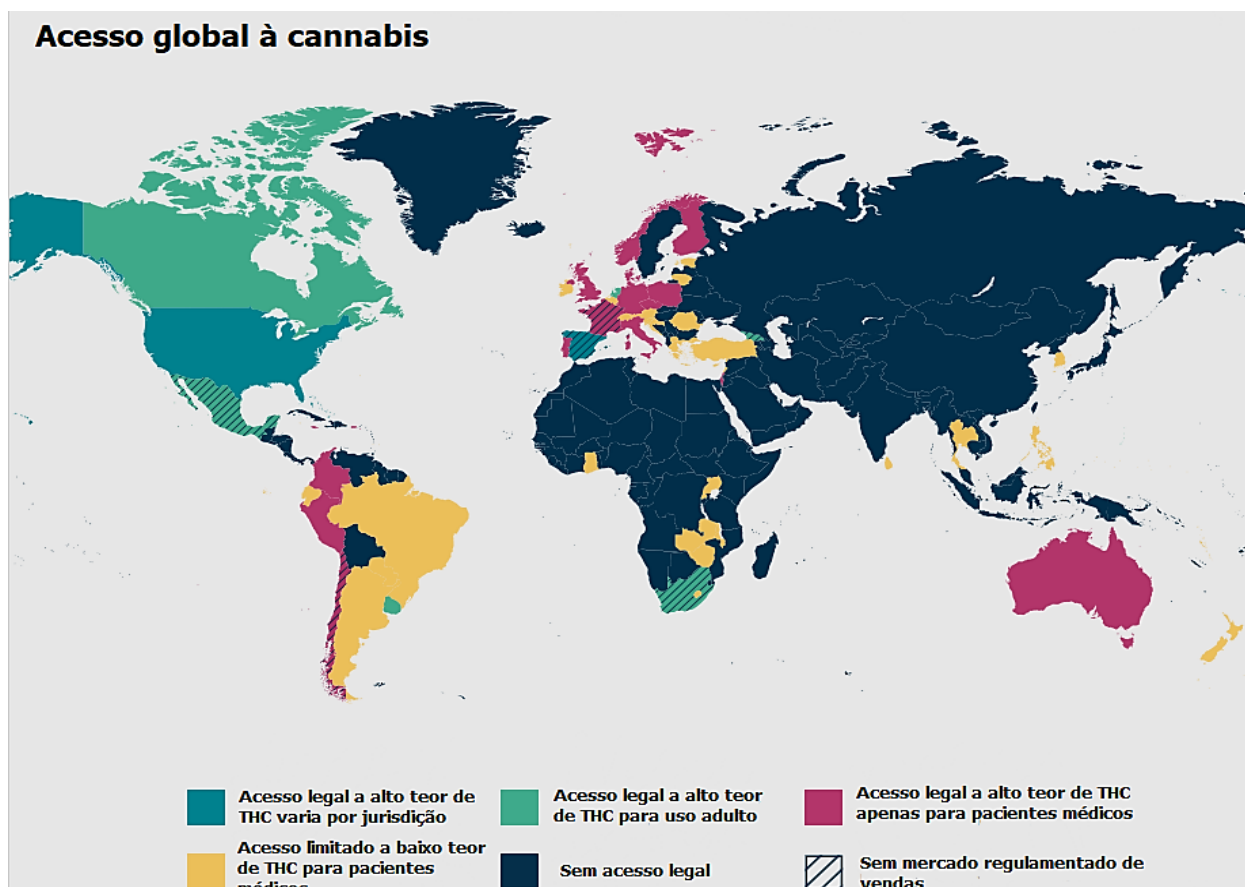


Figura 6: Acesso global à cannabis. Fonte: The Global Cannabis Report (2021), modificado

9. Aplicações médicas da cannabis e o sistema endocanabinoide

Shén Nóng, conhecido como O Divino Agricultor, por volta de 2000 a.C. na China, é considerado o responsável pela descoberta das propriedades curativas da cannabis, que foram descritas há 2000 anos no Pen-Ts'ao Ching, apontada como a primeira farmacopeia conhecida do mundo. Na China, a palavra comum para o cânhamo e a cannabis é "Má", que pode estar presente em composições de palavras relacionadas à dormência ou anestesia. Durante a dinastia Han, Huà Tuó, um renomado cirurgião chinês, supostamente realizava cirurgias com anestesia geral usando uma mistura de vinho e extratos de ervas, possivelmente contendo cannabis (CROCQ, 2020).

No entanto, o consumo para fins médicos foi limitado quando a maconha foi incluída na Convenção Única das Nações Unidas sobre Entorpecentes (1961). O interesse reapareceu após a pesquisa de medicamentos a base de cannabis para o tratamento de uma variedade de condições médicas, incluindo dor crônica, depressão, distúrbios de ansiedade, distúrbios do sono e problemas neurológicos, e uma expansão de ensaios pré-clínicos para investigar o potencial farmacológico de vários fitocanabinoides como drogas anticonvulsivantes

(IBRAHIM *et al.*, 2017; GONÇALVES *et al.*, 2019). Radwan *et al.* (2015) identificaram e avaliaram farmacologicamente os canabinoides menores presentes na amostra de *Cannabis sativa*, incluindo tetrahidrocannabivarina (THCV), canabivarina (CBV) e THCA. Os pesquisadores avaliaram seus efeitos nos receptores canabinoides, atividade antioxidante e citotoxicidade em células cancerígenas. Os resultados indicaram que esses canabinoides possuem propriedades farmacológicas únicas e potencialmente terapêuticas.

Os extratos de óleo de cannabis para uso medicinal são preparados a partir das inflorescências secas da planta e incorporados em óleos alimentares, como de oliva e de girassol, ou mesmo obtidos usando esses óleos como meio de extração (FERNÁNDEZ *et al.*, 2020). De acordo com a formulação, os óleos são divididos em: *full spectrum* (contém todos os compostos naturais da planta), CBD isolado (é a forma mais pura de CBD) e *broad spectrum*, que contém CBD e outros canabinoides, normalmente sem a presença de THC (ARZIMANOGLU *et al.*, 2020; VIGIL *et al.*, 2020). Acredita-se que a presença de compostos inativos, especialmente os terpenos, possa potencializar os efeitos do THC, o que é conhecido como efeito entourage (RUSSO, 2011).

O THC é o fitocanabinóide mais abundante e com maior ação psicotrópica (ASHTON, 2001; BALBINO, 2014). O THC é um ligante que atua principalmente nos receptores canabinoides 1 e 2 (CB1 e CB2), os quais regulam uma variedade de processos fisiológicos básicos, como apetite, humor, memória e inflamação. No entanto, a grande maioria dos efeitos psicoativos do THC é mediada por receptores CB1, enquanto os canabinoides não psicoativos, como o CBD, tem maior afinidade por receptores CB2, que são mais prevalentes no sistema imunológico (ASHTON, 2001; BALBINO, 2014).

O CBD interage com outros receptores, como o GPR55, um receptor acoplado à proteína G associado a várias funções celulares; o receptor do potencial transitório vaniloide 1 (TRPV1), que desempenha um papel importante na regulação da dor e da temperatura; e o receptor ativado pelo proliferador de peroxissoma gama (PPAR γ), envolvido na regulação genética e metabólica. Ao modular a atividade desses diversos receptores, o CBD exibe uma variedade de alvos terapêuticos, e suas propriedades protetoras contribuem para a preservação da saúde celular e a redução do estresse oxidativo. A natureza antiepilética do CBD o torna um agente promissor no tratamento de convulsões e epilepsia e suas propriedades ansiolíticas ajudam a diminuir a ansiedade e o estresse. Ademais, pesquisas sugerem que o CBD pode ter efeitos anticancerígenos, inibindo o crescimento de certos tipos de células cancerosas (MATSUDA *et*

al., 1990; APPENDINO; CHIANESE; TAGLIALATELA-SCAFATI, 2011; PENG et al. 2022)."

Sabe-se que tanto o CBDA quanto o THCA, assim como os demais canabinoides ácidos, não possuem atividade psicotrópica, principalmente porque a dissociação da fração do ácido carboxílico em pH fisiológico de 7,4 impede a passagem através da barreira hematoencefálica (MORENO-SANZ, 2016).

O THC possui uma estrutura muito similar à da anandamida, um endocanabinoide da família dos CBN endógenos. A Figura 7 mostra a similaridade das nuvens eletrônicas entre o THC e a anandamida, o que confere ao THC a capacidade de se ligar aos receptores, ativando o sistema endocanabinoide (NIDA, 2021).

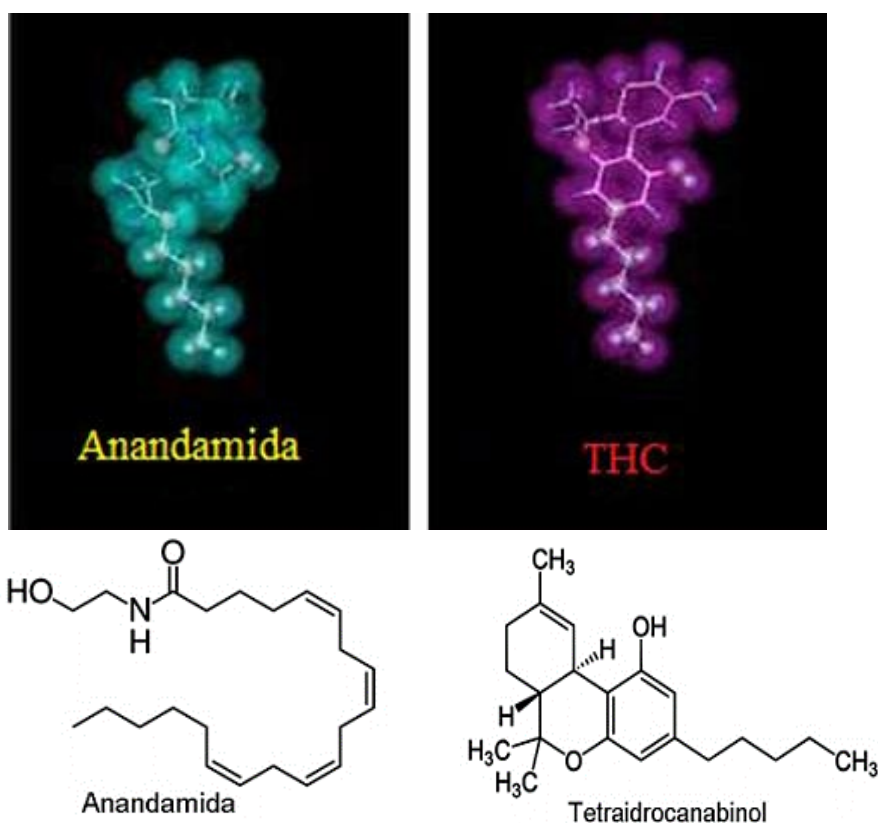


Figura 7: Estruturas químicas e nuvem eletrônica da anandamida (endocanabinoide) e do THC (fitocanabinoide). Fonte: NIDA, 2021, modificado

Os canabinoides são metabolizados no fígado, sendo o 11-hidroxi-THC o principal metabólito, possivelmente mais potente do que o THC. Há mais de 20 outros metabólitos conhecidos, alguns dos quais possuem propriedades psicoativas e todos possuem meias-vidas prolongadas. A excreção desses metabólitos ocorre parcialmente na urina (25%), mas

principalmente no intestino (65%), onde são reabsorvidos e prolongam ainda mais seus efeitos. Devido às características farmacocinéticas dos canabinoides, há uma correlação fraca entre as concentrações plasmáticas ou urinárias e o grau da ação induzida por eles (ASHTON, 2001).

10. Regulação da cannabis

A Figura 8 mostra as principais ações regulatórias para controle da cannabis no mundo. Nos Estados Unidos, entre 1914 e 1933, trinta e três estados promulgaram leis restringindo a produção legal apenas para fins medicinais e industriais. Em 1937, o *Marijuana Tax Act* (Ato de Imposto sobre a Maconha) definiu o cânhamo como uma droga narcótica, sem distinguir entre plantas de baixo e alto teor de THC. Essas restrições limitaram a expansão da produção de cânhamo, que começou a declinar até desaparecer completamente na década de 1950 (JOHNSON, 2018).

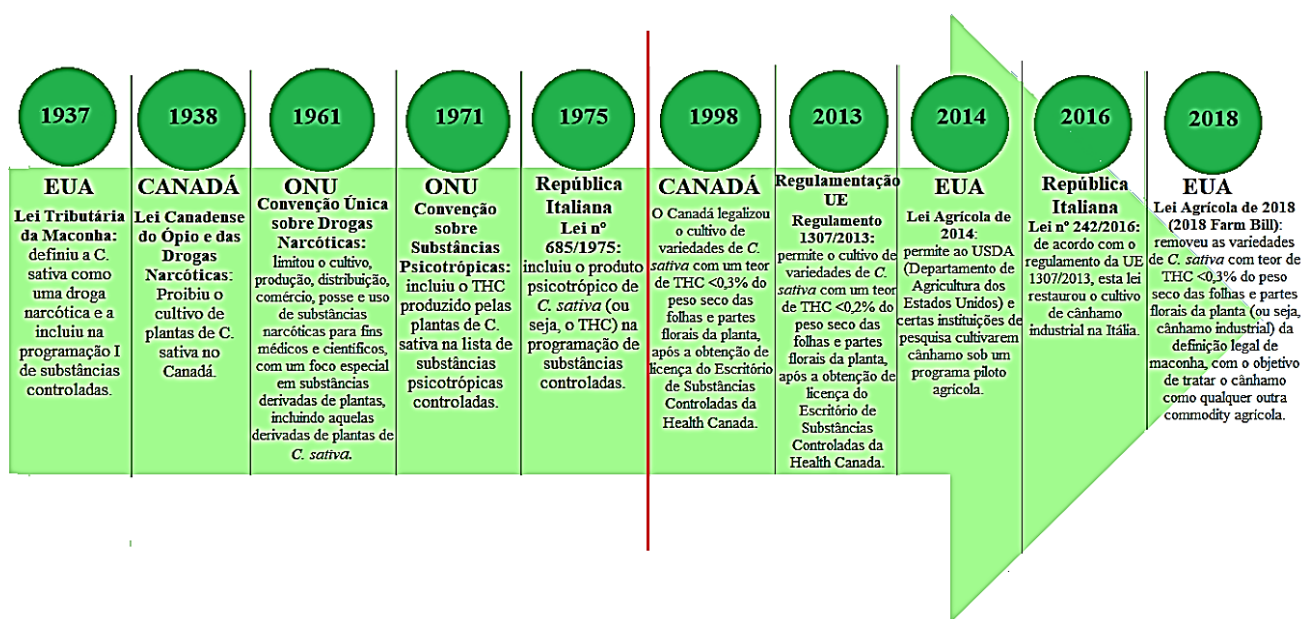


Figura 8. Os principais pontos da legislação sobre o cultivo de *C. sativa* L. nos Estados Unidos, Canadá e União Europeia, com foco na República Italiana entre os países da União Europeia. A linha vermelha separa a legislação relacionada à proibição do cultivo de *C. sativa* L. (parte esquerda da linha vermelha) daquela que permitiu a reintrodução do cultivo desta cultura (parte direita da linha vermelha). Fonte: Farinon *et al* (2020), modificado

No Canadá, o cultivo de cânhamo foi proibido em 1938, no entanto, a partir de 1998, o país começou a permitir a produção de variedades de cânhamo com baixo teor de THC, desde que obtivessem uma licença do *Health Canada*. Atualmente, o Canadá é o principal produtor e exportador de cânhamo, especialmente de alimentos e produtos relacionados. A legislação que regula o cânhamo no Canadá é a *Cannabis Act*, promulgada em 2018, que legalizou o uso

recreativo e medicinal da maconha e estabeleceu um sistema regulatório abrangente para a produção, distribuição, venda e posse da planta. A *Cannabis Act* também definiu as regras para a produção de cânhamo, com até 0,3% de THC em suas flores e folhas, e estabeleceu diretrizes para a importação e exportação dos produtos (CANNABIS ACT, 2023; HEALTH CANADA, 2023).

Na União Europeia, o cultivo de cânhamo para fins industriais foi reintroduzido em 2013. Segundo o regulamento nº 2022/1393, o cânhamo é definido como a variedade da planta *Cannabis sativa* L. que contém até 0,3% de THC em peso seco. A regulamentação (*Common Agricultural Policy*, CAP) estabelece regras para a produção, processamento e comercialização de cânhamo, e os produtores devem obter autorização de cultivo, e as autoridades locais são responsáveis por monitorar o cultivo e garantir a conformidade com as normas de qualidade e segurança (CAP, 2022). Além da regulamentação da UE, cada país membro pode ter sua própria legislação, desde que esteja em conformidade com as normas estabelecidas da UE, que é o segundo maior mercado produtor de cânhamo.

Nos Estados Unidos, a Lei Agrícola de 2014 permitiu a pesquisa e o cultivo de cânhamo por meio de um programa piloto, e em 2018 estabeleceu um novo sistema regulatório federal para o cânhamo, tratando-o como uma *commodity* agrícola e removendo-o da definição legal de droga, abrindo caminho para o desenvolvimento da indústria do cânhamo e seus derivados, como o CBD, cremes, alimentos e bebidas (USDA, 2021).

11. Regulação da cannabis no Brasil

Segundo a Portaria SVS/MS nº 344/1998, a *Cannabis sativa* e seus derivados estão incluídos na lista de plantas proscritas (BRASIL, 1998). O cultivo de cânhamo no Brasil é regulamentado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2022). Apesar da recente permissão para produtos à base de CBD no país, seguido após a mudança desse composto para a lista de substâncias sujeitas a controle especial, o THC ainda permanece na lista de substâncias entorpecentes e, portanto, proibidas.

Nesse contexto, a Anvisa aprovou no dia 3 de dezembro de 2019 a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) 327/19, que cria uma nova categoria de produtos derivados de *Cannabis sativa*. Seguindo as normas da Agência, os produtos à base de cannabis serão comercializados respeitando o limite de no máximo 0,2% de THC, com exceção dos produtos indicados para os cuidados paliativos de pacientes sem outras alternativas terapêuticas e em

situações clínicas irreversíveis ou terminais, que poderão conter teor de THC acima de 0,2% (BRASIL, 2019).

A regra para o registro de medicamentos novos ou inovadores no Brasil prevê a realização de pesquisas clínicas que sejam capazes de comprovar a eficácia desses produtos, além de outros requisitos para seu enquadramento como medicamento, o que não é o caso produtos de cannabis. O canabidiol só pode ser utilizado a partir de um determinado tipo de receita médica (tipo B) e, conforme determina a legislação para o tema, somente no caso de esgotamento de outros tratamentos (BRASIL, 2019).

Até junho de 2023, 25 produtos à base de cannabis foram aprovados pela ANVISA, sendo onze deles à base de extratos de *Cannabis sativa* e quatorze produtos fitofármacos contendo CBD. A Tabela 4 apresenta os produtos aprovados, juntamente com suas respectivas especificações de concentração de CBD e teor de THC. Apenas dois produtos contêm THC acima de 0,2 %.

Tabela 4: Produtos à base de cannabis aprovados pela Anvisa. Fonte (ANVISA, 2023)

Nome do Produto	Empresa detentora da autorização sanitária	CBD (mg/mL)	THC (%)	Local de Fabricação
Fitofármaco Canabidiol (100 mg/mL)	Ease Labs	100	≤0,2	Brasil
Fitofármaco Canabidiol (20,50,200 mg/mL)	Prati-Donaduzzi	20; 50; 200	≤0,2	Brasil
Fitofármaco Canabidiol (17,18 mg/mL)	NuNature	17,18	≤0,2	Estados Unidos
Fitofármaco Canabidiol (34,36 mg/mL)	NuNature	34,36	≤0,2	Estados Unidos
Fitofármaco Canabidiol (200 mg/mL)	Farmanguinhos	200	≤0,2	Brasil
Fitofármaco Canabidiol (50 mg/mL)	Verdemed	50	≤0,2	Canadá
Extrato de <i>Cannabis sativa</i> (200 mg/mL)	Promediol	50	≤0,2	Suíça
Extrato de <i>Cannabis sativa</i> (200 mg/mL)	Zion Medpharma	50	≤0,2	Suíça
Fitofármaco Canabidiol (23,75 mg/mL)	Verdemed	23,75	≤0,2	Colômbia
Extrato de <i>Cannabis sativa</i> (79,14 mg/mL)	Greencare Pharma	47,5	≤0,2	Colômbia
Extrato de <i>Cannabis sativa</i> (79,14 mg/mL)	Ease Labs	47,5	≤0,2	Colômbia/ Brasil
Fitofármaco Canabidiol (150 mg/mL)	Belcher	150	≤0,2	Suíça
Fitofármaco Canabidiol	Aura Pharma	50	≤0,2	Suíça

Nome do Produto	Empresa detentora da autorização sanitária	CBD (mg/mL)	THC (%)	Local de Fabricação
(50 mg/mL)				
Fitofármaco Canabidiol (23,75 mg/mL)	Greencare Pharma	23,75	≤0,2	Colômbia
Fitofármaco Canabidiol (20 mg/mL)	Active Pharmaceutica	20	≤0,2	Canadá
Extrato de <i>Cannabis sativa</i> (160,32 mg/mL)	Greencare	96	0,24	Colômbia
Extrato de <i>Cannabis sativa</i> (160,32 mg/mL)	Mantecorp Farmasa	96	0,24	Colômbia
Extrato de <i>Cannabis sativa</i> (79,14 mg/mL)	Mantecorp Farmasa	47,5	≤0,2	Colômbia
Fitofármaco Canabidiol (200 mg/mL)	Promediol	200	≤0,2	Suíça
Fitofármaco Canabidiol (20 mg/mL)	Collect Pharm	20	≤0,2	-
Fitofármaco Canabidiol (23,75 mg/mL)	Mantecorp Farmasa	23,75	≤0,2	Colômbia
Extrato de <i>Cannabis sativa</i> (10 mg/mL)	Cannabr	10	≤0,2	Canadá
Extrato de <i>Cannabis sativa</i> (200 mg/mL)	Cannten	50	≤0,2	Suíça
Extrato de <i>Cannabis sativa</i> (43 mg/mL)	Herbarium	30	≤0,2	Uruguai
Extrato de <i>Cannabis sativa</i> (200 mg/mL)	Aura Pharma	50	≤0,2	Suíça
Fitofármaco Canabidiol 100	Ease Labs	100	≤0,2	Brasil

Atualmente existem medicamentos que são análogos sintéticos do THC, como o Dronabinol (Marinol®) e a Nabilona (Cesamet®), prescritos como estimulante de apetite para pacientes com AIDS e como antiemético para náuseas e vômitos relacionados à quimioterapia (VERMA *et al.*, 2021). No entanto, esses medicamentos ainda não estão disponíveis no Brasil, onde o único medicamento disponível é o Mevatyl®, que é uma solução em spray que contém 27 mg/ml de THC e 25 mg/ml de CBD, prescrito para tratar espasticidade muscular relacionada à esclerose múltipla (ANVISA, 2022).

Atualmente em tramitação na Comissão de Assuntos Econômicos, o Projeto de Lei (PL) nº 89/2023 tem como intuito estabelecer uma Política Nacional que assegure o fornecimento gratuito de medicamentos formulados a partir de derivados vegetais contendo CBD, em conjunto com outras substâncias canabinoides, incluindo o THC, nas unidades de saúde públicas e privadas vinculadas ao SUS. A iniciativa busca ampliar o acesso aos cuidados de

saúde e garantir um tratamento adequado para pacientes que necessitam de terapias com cannabis medicinal (BRASIL, 2023).

12. Técnicas de análise de canabinoides

Existem diversas técnicas e métodos analíticas disponíveis para a análise química de cannabis e produtos derivados, mas a escolha do método e da abordagem adequados depende do objetivo específico da análise e dos requisitos analíticos correspondentes, sejam eles qualitativos e/ou quantitativos. É fundamental que qualquer método seja validado e/ou verificado para garantir resultados precisos e exatos, sendo adequados para o propósito pretendido. Além disso, é importante estabelecer controles de qualidade e determinar a frequência desses controles de acordo com a política de gestão da qualidade do laboratório (UNODC, 2022).

Na análise quantitativa, a escolha apropriada dos solventes de extração desempenha um papel crucial na extração de canabinoides neutros, como o THC, CBD e CBN, bem como de canabinoides ácidos polares, como o THCA, CBDA e CBNA. Além disso, é fundamental levar em consideração a matriz das diferentes amostras durante o processo de extração e preparação, a fim de evitar possíveis interferências da matriz na análise (UNODC, 2022).

Técnicas como a cromatografia gasosa (CG), principalmente acoplada à espectrometria de massas (CG-MS ou CG-MS/MS), e a cromatografia líquida (LC), acoplada a detectores espectrofotométricos (HPLC-DAD) ou de massas (LC-MS ou LC-MS/MS) tem sido as mais utilizadas para análise quantitativa de canabinoides em cannabis e seus produtos (MENG *et al.*, 2018).

13. LC-MS/MS

A técnica de LC-MS/MS é altamente eficaz, pois combina os benefícios da separação da cromatografia líquida convencional ou da cromatografia líquida de ultra-alta performance (UHPLC) com as capacidades de detecção do espectrômetro de massas em tandem (como o triplo quadrupolo, ou MS/MS). Essa combinação resulta em uma seletividade consideravelmente aprimorada, reduzindo as interferências entre os ingredientes ativos e a matriz (CHRISTINAT, SAVOY, MOTTIER, 2020; MCRAE, MELANSON 2020) .

Na espectrometria de massas em tandem, íons selecionados com base em sua massa são submetidos a uma segunda análise, permitindo uma maior especificidade e sensibilidade na identificação dos compostos presentes na amostra. Isso pode ser realizado através da análise

dos espectros de produtos iônicos ou precursores de íons selecionados por massa, ou por meio da análise de íons precursores de uma perda de massa neutra específica (GROSS, 2017).

Na espectrometria de massa, independentemente do instrumento utilizado, o primeiro passo é a geração de íons. Após o fluxo de moléculas entrar no espectrômetro de massas, essas moléculas são transformadas em íons pela fonte de ionização antes de serem analisadas e detectadas (PAIVA *et al.*, 2010). Existem diversas estratégias de ionização no espectrômetro de massas acoplado ao cromatógrafo líquido, como a ionização por eletrospray (ESI), ionização química à pressão atmosférica (APCI) e fotoionização à pressão atmosférica (APPI) (KANDIAH; URBAN, 2013).

No processo de ionização por eletrospray (ESI), a solução da amostra é direcionada através de um capilar estreito submetido a alta tensão, em condições de pressão atmosférica. Esse campo eletrostático provoca o afastamento dos contra íons negativos da superfície do líquido em direção à parede do capilar, onde são neutralizados, enquanto os íons positivos se deslocam em direção à frente do líquido. Isso resulta na formação de um jato cônico conhecido como cone de Taylor, onde os íons positivos são direcionados para a superfície do jato de líquido. Quando a repulsão eletrostática na superfície supera a tensão superficial do líquido no cone, o jato se rompe, formando pequenas gotas eletricamente carregadas (Figura 9) (GROSS, 2017; HOFFMANN e STROOBANT, 2007; KOSTIAINEN; KAUPPILA, 2009).

À medida que essas gotas viajam em direção à placa de interface da fonte, ocorre evaporação do solvente, reduzindo o tamanho e aumentando a densidade de carga da superfície das gotas. Em um ponto chamado limite de Rayleigh, a densidade de carga na superfície se torna tão alta que as forças de repulsão superam a tensão superficial da gota, resultando na formação de gotículas menores carregadas. Esse processo se repete até que o tamanho da gota seja pequeno o suficiente para que ela emita íons na fase gasosa (GROSS, 2017; HOFFMANN e STROOBANT, 2007; KOSTIAINEN; KAUPPILA, 2009).

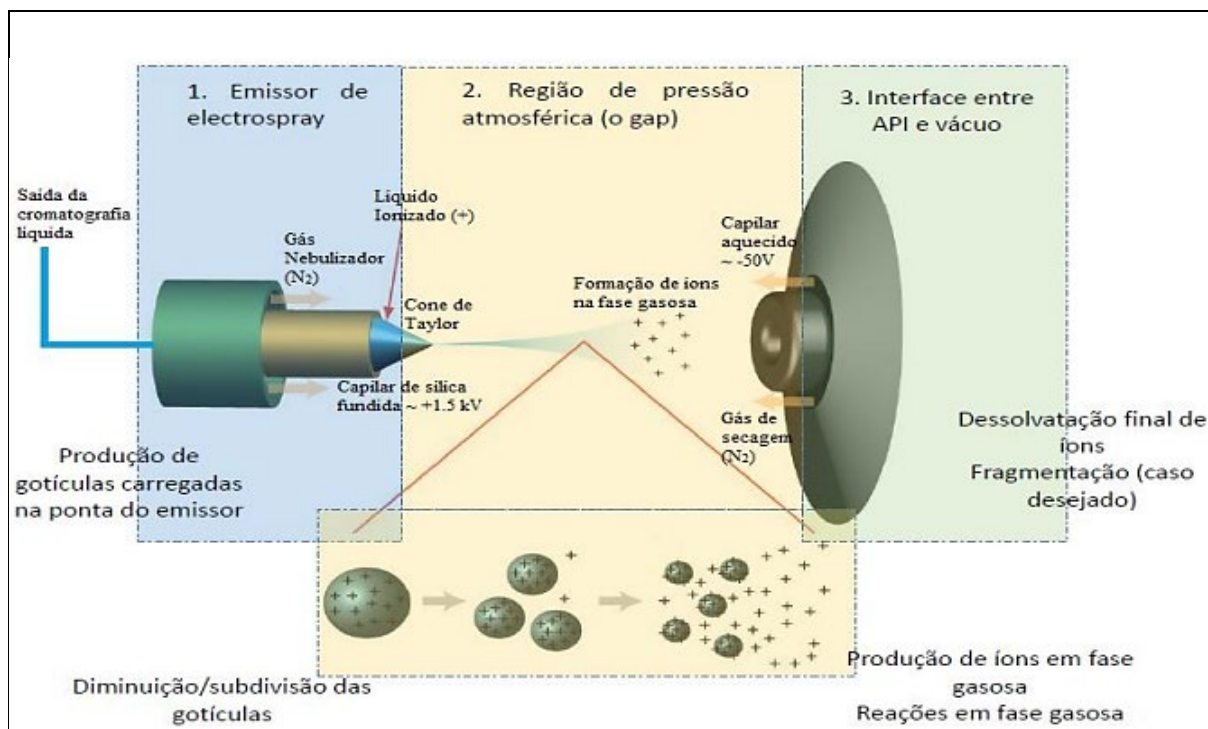


Figura 9: Esquemática básica de uma fonte de ionização por Eletrospray (ESI).

Depois que a amostra é ionizada, o feixe de elétrons é acelerado por um campo elétrico e então entra no analisador de massas, que separa os íons de acordo com sua razão massa/carga (m/z). Existem diversos tipos de analisadores de massa, cada um com sua capacidade de resolução na medida de massas. Esses analisadores utilizam campos elétricos e magnéticos estáticos ou dinâmicos, que podem ser combinados ou utilizados separadamente. As diferenças fundamentais entre os tipos de analisadores de massa comumente usados estão relacionadas à maneira como esses campos são empregados para realizar a separação dos íons (PAIVA *et al.*, 2010; HOFFMANN e STROOBANT, 2007).

Os analisadores de massa mais utilizados em estudos em matrizes complexas incluem o triplo quadrupolo (QqQ, ou MS/MS), o híbrido duplo quadrupolo com tempo de voo (QToF) e o Orbitrap (CAUSANILLES *et al.*, 2017). Cada analisador de massa possui vantagens e considerações específicas. O MS/MS é amplamente utilizado devido à sua alta sensibilidade e reprodutibilidade. Ele é um analisador de massa contínuo, o que significa que não há muita perda de analitos durante a análise. No entanto, tem resolução baixa, o que pode limitar a capacidade de distinguir compostos com massas muito próximas. O híbrido duplo quadrupolo com tempo de voo (QToF) e o Orbitrap oferecem alta resolução e acurácia de massa, o que permite uma identificação mais precisa e confiável dos analitos, no entanto, uma desvantagem

desses instrumentos é que a análise ocorre de forma pulsada, o que pode levar a perdas dos íons de interesse (GROSS, 2017; HOFFMANN e STROOBANT, 2007).

Um espectrômetro de massa triplo quadrupolo é composto por três quadrupolos em série. A primeira etapa, chamada de quadrupolo de filtragem (Q1), seleciona e filtra o íon de interesse da amostra. Em seguida, o íon filtrado passa por um espaço livre e entra no segundo quadrupolo (Q2), onde é submetido a uma colisão com um gás de colisão para fragmentação controlada. Por fim, os fragmentos resultantes são analisados no terceiro quadrupolo (Q3), os íons produto são filtrados e finalmente detectados por uma placa multiplicadora de elétrons que gera amplificação do sinal elétrico, com base em sua razão m/z , permitindo a quantificação e identificação precisa dos analitos (HOFFMANN e STROOBANT, 2007). Em análises por LC-MS/MS, o modo de monitoramento de múltiplas reações (MRM) é altamente recomendado devido à capacidade de quantificar de forma seletiva analitos específicos com alta sensibilidade (GROSS, 2017).

14. Canabinoides em cannabis e seus produtos

A Tabela 5 apresenta um resumo de alguns estudos que quantificaram canabinoides em diferentes matrizes, incluindo óleos e material vegetal. Diferentes técnicas analíticas foram empregadas para essa finalidade, tais como GC com detecção por chama (GC-FID), GC-MS, HPLC-UV/DAD, LC-MS/MS, entre outras. Cada método analítico possui uma abordagem específica de preparo de amostra, que pode envolver extração com diferentes solventes, sendo os mais comumente usados a acetonitrila e o metanol, e adição de padrões internos (IS). A faixa de trabalho para a quantificação dos canabinoides varia de acordo com o método e a matriz analisada.

Tabela 5: Métodos quantitativos para análise de canabinoides

Instrumentação	Matriz	Canabinoides analisados	Preparo da amostra	Faixa de trabalho	LOD/LOQ	Referência
GC-FID	Óleos	THC e THCA	Diluição com MeOH + IS	0,10–4,0%	0,03/0,10%	Casiraghi <i>et al.</i> (2017)
GC-MS	Óleos	THC e THCA	Diluição com MeOH + IS	0,1–4,0%	0,03/0,10%	Casiraghi <i>et al.</i> (2017)
GC-MS	Material vegetal	THC e THCA	Extração com MeOH (16h), diluição + IS	0,1- 0,8%	0,013/0,015%	Stanaszek e Zuba (2007)
GC-MS	Óleos	CBD	Destilação das inflorescências	0,18–14 mg/mL	-	Fiorini <i>et al.</i> (2019)
HPLC-DAD	Material vegetal	THC e THCA	Extração com MeOH (16h), diluição + IS	0,05 – 2,0%	0,0003/0,0027%	Stanaszek e Zuba (2007)
HPLC-DAD	Material vegetal	CBDA, CBGA, CBD, CBG	Extração com EtOH, e diluição	2,5-200 µg/mL CBG: 1,3-100 µg/mL	0,8/2,5 µg/mL	Pellati <i>et al.</i> (2018)
HPLC-DAD	Óleos	THC, CBD, THCA, CBDA e CBN	Diluição com metanol:n-hexano (9:1) + IS e diluição	0,001 a 0,030 mg/mL	0,22/0,66 mg/mL	Carvalho <i>et al.</i> (2020)
UHPLC-UV-MS	Material vegetal	CBDA; CBGA; CBG; CBD; THCv; CBN; THC; CBL; CBC e THCAA	Extração com ACN: MeOH (80:20)	1-100 µg/mL	0,4 /1,0 µg/mL	Wang <i>et al.</i> (2018)
LC-MS/MS	Material vegetal	THCA, THC, CBG, THCv, CBN, CBD	Extração por fluido supercrítico SFE e diluição com EtOH + IS	0,5 a 1000 ng/mL	LOQ: 0,05 ng/mL	Aizpurua-Olaizola <i>et al.</i> (2014)
LC-MS/MS	Material	CBC, CBD, CBDA, CBG, CBGA ,	Extração com ACN: MeOH	0,05-50 µg/mL	LOQ: 0,05	Gul <i>et al.</i> (2018)

Instrumentação	Matriz	Canabinoides analisados	Preparo da amostra	Faixa de trabalho	LOD/LOQ	Referência
	vegetal	CBN, THC, THCA, THCV	(80:20) + IS		mg/Kg	
LC-MS/MS	Material vegetal, óleos e cosméticos	CBD, CBDA, THC, THCA-A	Extração com MeOH: H ₂ O (95:5) + IS	0,195–50 ng/mL	0,048/0,19 ng/mL	Meng <i>et al.</i> (2018)
LC-MS/MS	Material vegetal	CBN, CBD, CBG, CBC, CBDA, CBGA, THC, THCA	Extração com ACN e diluição com ACN:H ₂ O (50:50) + IS	0,1-9000 ng/mL	7200/24000 µg/kg	Brown <i>et al.</i> (2019)
LC-MS/MS	Material vegetal	CBC, CBL, CBD, CBDV, CBG, CBN, Δ ⁸ -THC, Δ ⁹ -THC, CBDA, CBGA, THCA	Extração e diluição com MeOH: H ₂ O (95:5, v/v) +IS	10–2500 ng/mL	0,005/0,05%	Berthold <i>et al.</i> (2020)
LC-MS/MS	Óleo de semente	THC, THCA-A, CBD, CBDA, CBN, CBG, (CBGA),	Diluição com ACN: H ₂ O (1:1) +IS	0–20 ng/mL	0,6 mg/kg	Christinat, Savoy e Mottier (2020)
LC-MS/MS	Material vegetal	THC, THCA, CBD, CBDA, CBN	Extração com MeOH:H ₂ O (80:20), diluição com MeOH+IS	0,002 -200 mg/g	0,0002%	McRae e Melanson (2020)
LC-MS/MS	Óleos	THC, CBD, CBN	Diluição com MeOH + IS	1- 50 ng/mL	0,05 µg/g	Hsu <i>et al.</i> (2021)
LC-MS/MS	Óleos	THC, THCA-A, CBD, CBDA, CBG, CBGA, CBC, CBV, CBDVA, CBGVA, CBN, THCVA, THCV	Diluição com ACN + IS	0,05–50 ng/mL	LOQ:0,01%	Galant <i>et al.</i> (2022)

CBDA (Ácido canabidiólico), CBD (Canabidiol), CBDV (Canabidivarina), CBG (Canabigerol), CBGA (Canabigerol Ácido), CBGVA (Canabigerovarina Ácida), CBL (Canabiciclol), CBC (Canabicromeno), CBV (Canabivarina), CBN (Canabinol), Δ⁸-THC (Δ⁸-Tetrahydrocanabinol), Δ⁹-THC (Δ⁹-Tetrahydrocanabinol), THCA (Ácido tetrahydrocanabinólico), THCVA (Tetrahydrocannabivarina Ácida), THCV (Tetrahydrocannabivarina)

III. OBJETIVOS

Geral

Otimizar e validar um método analítico utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS) para a quantificação de canabinoides em material vegetal e óleo à base de cannabis.

Específicos

- I. Otimizar as condições de preparação da amostra e análise de canabinoides no LC-MS/MS.
- II. Validar o método analítico quanto à seletividade, sensibilidade, linearidade, precisão e exatidão.
- III. Determinar os teores de canabinoides em amostras vegetais e óleos à base de cannabis
- IV. Analisar os resultados obtidos e discutir a qualidade dos produtos analisados em relação às normas estabelecidas pela legislação brasileira.

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Solventes

Ácido fórmico 85% Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda (São Paulo, Brasil). Metanol (MeOH) de grau HPLC adquirido da Tedia (OH, EUA). Acetonitrila (ACN) grau LC-MS J.T. Baker (PA, EUA). Água ultrapura foi obtida purificando-se água destilada em um sistema Milli-Q (MA, USA).

2. Padrões analíticos

Soluções padrões utilizadas foram adquiridas da Cerilliant (TX, EUA) através da Sigma-Aldrich, compreendendo os padrões Mix de Δ^9 -THC (concentração de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), CBD (concentração de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e CBN (concentração de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$); Δ^8 -THC (concentração de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$); Mix de CBCA (concentração de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), CBDA (concentração de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), CBDVA (concentração de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), CBGA (concentração de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), THCA-A (concentração de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e THCVA (concentração de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$); CBNA (concentração de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$); Δ^9 -THC com três deutérios (THC- d_3) (concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$); CBD com três deutérios (CBD- d_3) (concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$); CBN com três deutérios (CBN- d_3) (concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$); e THCA-A com três deutérios (THCA-A- d_3) (concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). As substâncias deuteradas foram utilizadas como padrão interno na curva analítica e como padrão surrogate nas amostras.

3. Amostras

Um total de 114 amostras de material vegetal foram adquiridas por apreensão em território nacional pela Polícia Federal. Destas, 10 eram inflorescências (IN), 4 combinações de folhas e inflorescências (FI), 3 apenas folhas (F), e 97 materiais prensados (MP). Também foram adquiridos 4 amostras de haxixe (HX) Estas amostras foram apreensões feitas pela Polícia Federal em diferentes localidades no período de 2021 a 2022. Outras 23 amostras de óleo foram fornecidas ao Laboratório de Toxicologia da UnB provenientes de associações ou usuários individuais, além de seis amostras de raízes (R) (Figuras 10 e 11).



Figura 10: Amostras de cannabis apreendidas em território nacional. A) Inflorescências e flores; B) Inflorescências; C) Folhas; D) Raízes; E) Material vegetal prensado.



Figura 11: Amostras de óleos de cannabis e haxixe

4. Preparação da curva de calibração

A partir dos padrões analíticos, foram preparadas soluções-mãe, estoque e trabalho mistura (STM) em acetonitrila contendo 5000, 500 e 50 ng/mL de cada um dos analitos Δ^9 -THC, CBD, CBN, CBDA, THCA-A e CBNA. Essas soluções foram preparadas diluindo o padrão em ACN:

- Solução estoque de Δ^9 -THC, CBD, CBN (10 μ g/mL): Foi adicionado 100 μ L (micropipeta eletrônica 50-1000 μ L, Eppendorff) do padrão mix 1000 μ g/mL em um balão de 10 mL calibrado.
- Solução estoque de CBNA (10 μ g/mL): Foi adicionado 100 μ L (micropipeta eletrônica 50-1000 μ L, Eppendorff) do padrão (1000 μ g/mL) em um balão de 10 mL calibrado.
- Solução estoque de CBDA e THCA-A (5 μ g/mL): Foi adicionado 100 μ L (micropipeta eletrônica 50-1000 μ L, Eppendorff) do padrão (500 μ g/mL) em um balão de 10 mL calibrado;
- STM de todos os analitos (500 ng/mL): em balão calibrado de 10 mL, acrescentou-se 500 μ L da solução estoque de Δ^9 -THC, CBD, CBN e CBNA (micropipeta eletrônica 50-1000 μ L, Eppendorff) e 1000 μ L (micropipeta eletrônica 50-1000 μ L, Eppendorff) da solução estoque de CBDA e THCA-A. Completou o balão com ACN;
- STM de todos os analitos(50 ng/mL): 1000 μ L (micropipeta eletrônica 50-1000 μ L, Eppendorff) da STM de todos os analitos em balão volumétrico calibrado de 10 mL.

As soluções de IS foram diluídas com ACN também em balão volumétrico calibrado e para cada um dos analitos preparou-se uma solução estoque:

- Foram diluídos 100 μ L (micropipeta eletrônica 50-1000 μ L, Eppendorff) de cada analito THC- d_3 (100 μ g.mL⁻¹); CBD- d_3 (100 μ g.mL⁻¹); CBN- d_3 (100 μ g.mL⁻¹); e THCA-A- d_3 (100 μ g.mL⁻¹) em um balão de 10 mL de forma independente a fim de obter uma solução estoque de 1000 ng/mL para cada analito. Em seguida 600 μ L (micropipeta eletrônica 50-1000 μ L, Eppendorff) de cada analito foi diluído com ACN em bação volumétrico de 10 mL a fim de se obter uma solução mista de deuterados com concentração de 60 ng/mL.

As curvas de calibração foram preparadas diluindo a STM dos analitos e dos IS da seguinte forma:

- 100 ng/mL: 120 µL (micropipeta eletrônica calibrada 15-300 µL, Eppendorff) da STM (500 ng/mL), completar vial até 500 µL com fase móvel e acrescentar 100 µL da STM de IS (60 ng/mL);
- 50 ng/mL: 60 µL (micropipeta eletrônica calibrada 15-300 µL, Eppendorff) da STM (500 ng/mL), completar vial até 500 µL com fase móvel e acrescentar 100 µL da STM de IS(60 ng/mL);
- 25 ng/mL: 30 µL (micropipeta eletrônica calibrada 15-300 µL, Eppendorff) da STM (500 ng/mL), completar vial até 500 µL com fase móvel e acrescentar 100 µL da STM de IS(60 ng/mL);
- 12,5 ng/mL: 15 µL (micropipeta eletrônica calibrada 15-300 µL, Eppendorff) da STM (500 ng/mL), completar vial até 500 µL com fase móvel e acrescentar 100 µL da STM de IS(60 ng/mL);
- 6,25 ng/mL: 75 µL (micropipeta eletrônica calibrada 15-300 µL, Eppendorff) da STM (50 ng/mL), completar vial até 500 µL com fase móvel e acrescentar 100 µL da STM de IS(60 ng/mL);
- 3,12 ng/mL: 37,5 µL (micropipeta eletrônica calibrada 15-300 µL, Eppendorff) da STM (50 ng/mL), completar vial até 500 µL com fase móvel e acrescentar 100 µL da STM de IS(60 ng/mL);
- 1,56 ng/mL: 18,7 µL (micropipeta eletrônica calibrada 15-300 µL, Eppendorff) da STM (50 ng/mL), completar vial até 500 µL com fase móvel e acrescentar 100 µL da STM de IS(60 ng/mL).

Ao final as soluções foram homogeneizadas.

Essas soluções mistas foram então diluídas para soluções de trabalho e calibração de 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25, 50 e 100 ng/mL de cada canabinoide. Um estoque misto dos padrões internos (IS) Δ^9 -THC-*d3*, CBD-*d3*, CBN-*d3* e THCA-A-*d3* foi feito a 60 ng/mL e adicionado aos padrões de calibração para obter uma concentração final de 10 ng/mL para a curva de calibração. Nas análises foram consideradas a relação entre a área de pico das substâncias em relação ao IS correspondente.

5. Preparação de amostras

Para a preparação das amostras para análise dos canabinoides presentes no material vegetal seco, o seguinte passo a passo foi seguido (Figura 12 e 13):

- Todas as amostras de material vegetal, com exceção das raízes, foram moídas utilizando gral e pistilo. As amostras de raízes foram lavadas com água corrente, posteriormente secadas em estufa e, por fim, raladas utilizando um ralador doméstico.
- 50 mg da amostra (em duplicada) em balança analítica de precisão calibrada (Mettler Toledo®).
- Adicionou-se 2,5 mL de uma solução de acetonitrila e metanol (80:20) a cada sub-amostra, seguido de homogeneização/extração por 2 minutos com agitador vortex (Satra®).
- As amostras foram centrifugadas por 10 minutos na centrífuga Q222B (Quimis®), o sobrenadante foi filtrado com filtro PTFE 0,45 µm para remover impurezas.
- Diluiu-se o sobrenadante filtrado (solução 1) em fase móvel de acordo com a concentração da amostra, para garantir que a concentração se encaixasse dentro da faixa de quantificação estabelecida pela curva de calibração
 - Proporção 1:10³: Foi adicionado 10 µL (micropipeta mecânica 1-10 µL, Eppendorff) da solução 1 em um balão de 10 mL calibrado (solução 2).
 - Proporção 1:10⁵: Foram adicionados 100 µL (micropipeta eletrônica 50-1000 µL, Eppendorff) da solução 2 em um balão calibrado de 10 mL.
- 500 µL da solução diluída foram transferidos para um vial e adicionado 100 µL da STM (solução trabalho mistura) contendo 60 ng/mL de IS (padrão interno) - THC-*d3*, CBD-*d3*, CBN-*d3*, THCA-*d3*.
- As soluções finais foram injetadas no LC-MS/MS para quantificação dos canabinoides presentes THC, CBD, CBN, THCA, CBDA e CBNA.

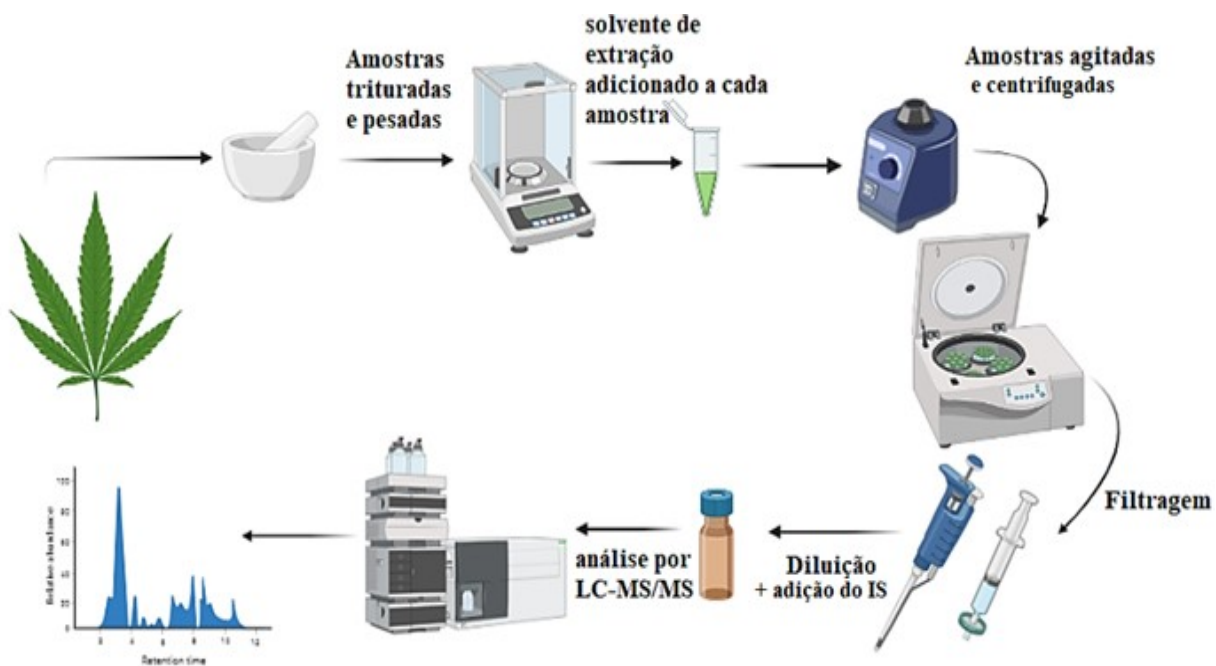


Figura 12. Preparação da amostra vegetal



Figura 13: Preparo de amostra. A) inflorescência no grau e pistilo; B) Amostras maceradas, pesadas e separadas; C) Filtragem do extrato vegetal

As amostras de óleo e haxixe foram preparadas como delineado a seguir (Figura 14)

- Pesou-se 12 mg de cada amostra de óleo e de haxixe (em duplicada) utilizando uma balança analítica de precisão calibrada (Mettler Toledo®)

- As amostras foi diluídas em balão volumétrico de 10 mL com acetonitrila, a mistura homogeneizada utilizando um agitador vortex (Satra®) por 2 minutos, seguido de banho ultrassônico (Branson®) por 10 minutos e filtração com filtro PTFE 0,45 μm
- O filtrado foi diluído na fase móvel para atingir a concentração final que estivesse dentro da faixa de quantificação estabelecida pela curva de calibração:
- Proporção 1:10³: Foi adicionado 100 μL (micropipeta eletrônica 50-1000 μL , Eppendorf) da solução 1 em um balão de 10 mL (solução 2).
- Proporção 1:10: Foi adicionado 1000 μL (micropipeta eletrônica 50-1000 μL , Eppendorf) da solução 2 em um balão de 10 mL.
- Proporção 1:10⁵: Foram adicionados 100 μL (micropipeta eletrônica 50-1000 μL , Eppendorf) da solução 2 em um balão de 10 mL.
- Ao final da diluição, adicionou-se 500 μL da solução final diluída e 100 μL da STM (solução de trabalho padrão) contendo 60 ng/mL do padrão interno (IS) - THC-*d*3, CBD-*d*3, CBN-*d*3, THCA-*d*3.

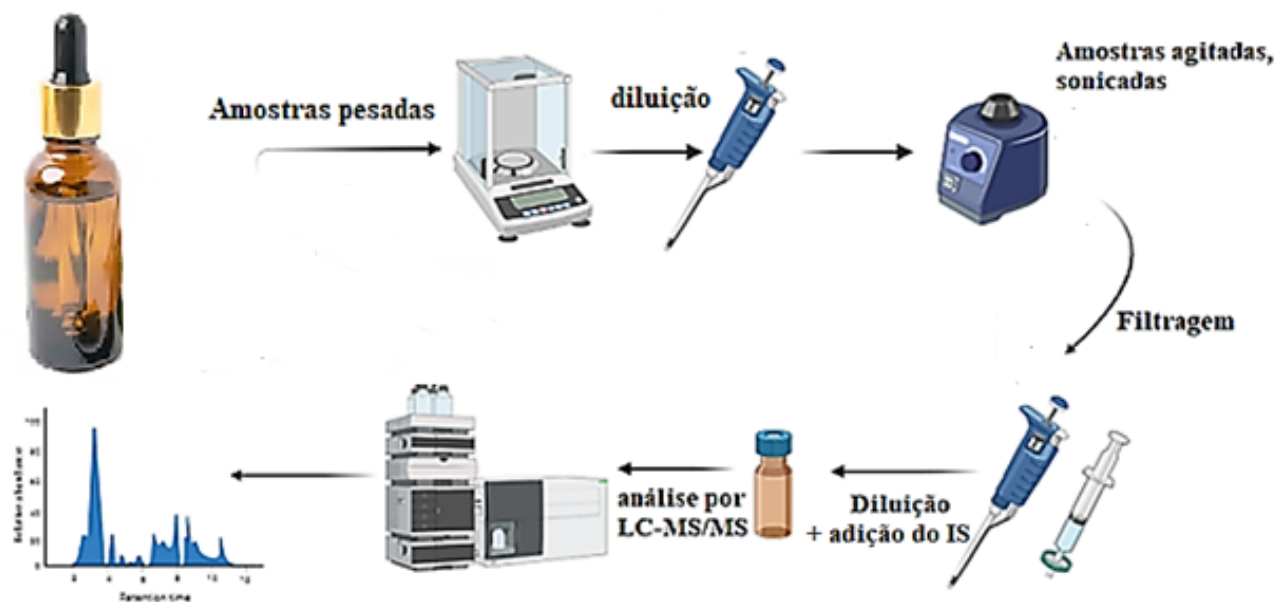


Figura 14: Preparação de amostra de óleo de cannabis

6. Condições analíticas

A análise foi feita num sistema UPLC 1290 Infinity (Agilent, MA, EUA), que combinou uma bomba binária, um amostrador automático refrigerado AUTO REFR AS950 HACH 115VAC (CO, EUA) e um forno de coluna, acoplado a espectrômetro de massa em tandem (API 3200 Sciex, Foster City, CA, EUA; Figura 15), equipado com uma fonte de ionização Turbo V™. A separação cromatográfica foi realizada em fase reversa, utilizando uma coluna para UPLC ZORBAX Eclipse Plus C18 (Agilent), com dimensões de (50 mm × 2,1 mm, 1,8 µm), a uma taxa de fluxo de 0,2 mL/min. A fase móvel foi acetonitrila e água ultrapura (85:15), acidificadas com ácido fórmico a 0,1%. A temperatura do forno da coluna foi ajustada para 30 °C, e o volume de injeção do amostrador automático foi definido como 10 µL.

Os parâmetros de ionização por electrospray no MS/MS (ESI+) foram determinados para cada analito e otimizados por infusão de fluxo a 200 ng/mL de cada solução de estoque individual: potencial de desaglomeração (DP, *declustering potencial* em inglês), potencial de entrada (EP, *entrance potencial* em inglês), potencial de entrada da cela de colisão (CEP, *Collision Cell Entrance Potential* em inglês), energia de colisão (CE, *Collision Energy* em inglês) e potencial de saída da cela de colisão (CXP, *Collision Cell Exit Potential* em inglês). Posteriormente, a otimização dos parâmetros da fonte de ESI foi realizada de forma automática e univariada pelo equipamento, através de injeções sucessivas, com o objetivo de determinar o melhor valor para cada um dos parâmetros. Os parâmetros da fonte de ESI foram otimizados para o analito de menor intensidade que, de acordo com as análises realizadas, foi identificado como o CBNA e seus íons produto.

No monitoramento de reação múltipla (MRM), o íon precursor para cada analito foi a sua molécula protonada ($[M+H]^+$) e duas reações de transição foram monitoradas para cada composto, com uma janela de detecção de 50 segundos e um tempo de varredura alvo de 0.2 segundos. A temperatura (TEM) da fonte do bloco foi mantida em 600 °C. A aquisição de dados foi realizada usando o software Analyst 1.7 e o processamento de dados subsequente foi feito usando o software Multiquant 3.0.

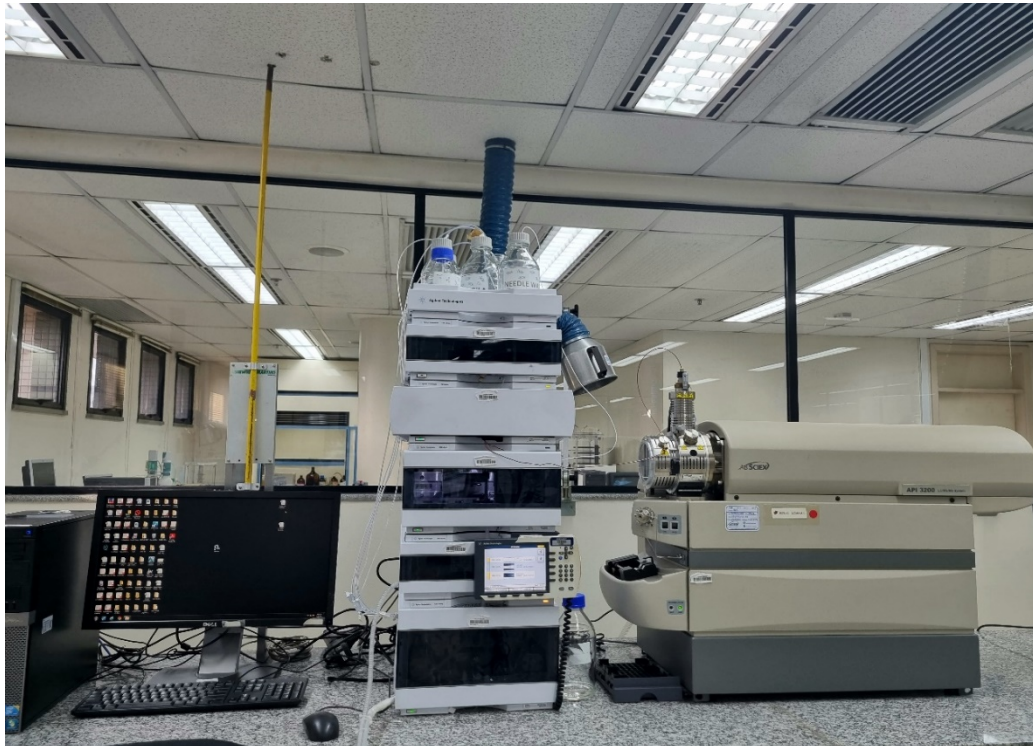


Figura 15: LC-MS/MS (API 3200, Sciex) do Instituto de Criminalística da Polícia Federal

7. Validação do método

O método foi validado para os seguintes parâmetros : seletividade, linearidade/faixa de trabalho, recuperação, precisão, limite de detecção, limite de quantificação. Cada parâmetro foi validado para material vegetal usando *Humulus lupulus* (da mesma família taxonômica da cannabis, mas não contém canabinoides de interesse deste estudo; BERTHOLD *et al.*, 2020), e uma mistura de óleos de girassol, coco e azeite extravirgem para óleo, normalmente utilizados para preparação dos óleos. A avaliação dos resultados foi feita seguindo as diretrizes publicadas pelo INMETRO (INMETRO-DOQ-CGCRE-008).

Seletividade

A seletividade foi avaliada analisando amostras controle de cada matriz quanto a presença de alguma interferência no mesmo tempo de retenção e com os mesmos íons de transição dos analitos de interesse.

Efeito de matriz

Os efeitos de matriz (interferência de outras substâncias que levam à supressão ou amplificação do sinal analítico) foram avaliados analisando amostras fortificadas das matrizes

controle para planta e óleo e comparando a média da área das amostras fortificadas pós-extração (correspondentes à matriz) com a média da área das amostras fortificadas em solvente, expressa em porcentagem. Os efeitos de matriz foram considerados significativos quando excediam 20%.

Linearidade

A linearidade da curva de calibração correspondente à matriz foi avaliada em sete diferentes níveis de concentração, com 5 réplicas (n) autênticas em cada nível: 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25, 50 e 100 ng/mL para THC, CBD e CBN; 3,12; 6,25; 12,5; 25, 50 e 100 ng/mL para THCA, CBDA e CBNA. A média das áreas normalizadas em cada ponto foi utilizada para construir a curva de calibração, e o teste de Grubbs foi realizado para detectar *outliers*. A homoscedasticidade da curva de calibração utilizando a regressão linear de mínimos quadrados foi avaliada para cada analito pelo teste de Levene, e a curva foi considerada homoscedástica quando as variâncias não diferiam significativamente entre os níveis testados. Para curvas de calibração heteroscedásticas, foram testados fatores de ponderação $1/x$, $1/x^2$, $1/x^{0.5}$, $1/y$, $1/y^2$ e $1/y^{0.5}$ para determinar a melhor regressão linear ajustada. A linearidade da curva de calibração foi considerada quando o coeficiente de determinação (r^2) era pelo menos 0,99.

Recuperação, repetibilidade e precisão intermediária

A recuperação, repetibilidade e precisão intermediária foram avaliados nos níveis 1,56; 25 e 100 ng/mL para THC, CBD e CBN; e de 3,12; 25 e 100 ng/mL para THCA, CBDA e CBNA. A recuperação foi calculada comparando concentração média da matriz branca fortificada pré-extração com a curva em matriz, expressa em % (n= 4-5), e a repetibilidade definida como a dispersão desses resultados, expresso como desvio padrão relativo (DPR, %). O experimento foi repetido em outro dia para determinação da precisão intermediária (n=9-10), também expressa como DPR. Os critérios de aceitação foram recuperação dentro da faixa de 80-110%, e repetibilidade e precisão intermediária inferiores a 15% (INMETRO-DOQ-CGCRE-008).

Limite de detecção e limite de quantificação

Para a estimar o limite de detecção (LOD) do equipamento foram realizadas sucessivas diluições até se encontrar a menor concentração/menor valor cuja relação sinal/ruído fosse 3:1. O limite de quantificação (LOQ) do método foi definido para cada analito em cada matriz como

o nível mais baixo em que o método foi validado dentro dos critérios de aceitação para recuperação e precisão intermediária.

V. RESULTADOS

1. Validação do método UPLC-MS/MS

A Tabela 6 mostra os parâmetros otimizados no MS/MS ESI+ e as transições monitoradas (**quantificação** e qualificação) para cada analito investigado no estudo. O CBNA coelui parcialmente com o THC, mas isto não impacta a análise já que possuem transições distintas.

Tabela 6: Parâmetros otimizados para cada analito e seus respectivos íons-produto mais intensos

Analito	Fórmula molecular	TR (min)	DP (V)	EP (V)	Transições (m/z) ^b	CE (eV)
CBDA	C ₂₂ H ₃₀ O ₄	1.30	10	7	359,3 > 341,3	24
					359,3 > 219,3	45
CBD	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	1.49	35	7	315,3 > 193,2	30
					315,3 > 123,2	42
CBD- <i>d</i> ₃ ^a	C ₂₁ H ₂₇ D ₃ O ₂	1.49	38	11	318,4 > 196,3	40
					318,4 > 123,2	30
CBN	C ₂₁ H ₂₆ O ₂	2.10	40	11	311,3 > 223,2	35
					311,3 > 293,3	25
CBN- <i>d</i> ₃ ^a	C ₂₁ H ₂₃ D ₃ O ₂	2.10	48	8	314,5 > 223,4	30
					314,5 > 195,1	35
CBNA	C ₂₂ H ₂₃ O ₄	2.56	30	5	355,3 > 234,9	45
					355,3 > 253,3	45
Δ ⁹ -THC	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	2.58	35	7	315,3 > 193,2	30
					315,3 > 123,2	42
Δ ⁹ -THC- <i>d</i> ₃ ^a	C ₂₁ H ₂₇ D ₃ O ₂	2.58	38	11	318,4 > 196,3	40
					318,4 > 123,2	30
THCA	C ₂₂ H ₃₀ O ₄	3.28	10	7	359,3 > 341,3	24
					359,3 > 219,3	45
THCA-A- <i>d</i> ₃ ^a	C ₂₂ H ₂₇ D ₃ O ₄	3.28	30	4	362,5 > 222,3	40
					362,5 > 264,4	40

^a Padrão interno; ^b Em negrito estão as transições usadas para quantificação; TR- Tempo de retenção; DP- Potencial de desaglomeração ; EP- Potencial de entrada; CE- Energia de colisão

A Tabela 7 apresenta os resultados obtidos dessa otimização específica para o CBNA e seus íons produto.

Tabela 7: Valores dos parâmetros da fonte de ionização para o CBNA e seus íons produto

Parâmetros	Valores
Suprimento da Curtain Gas (psi)	50
Gás de colisão (psi)	2
Tensão do Ionspray (V)	5000
Temperatura (°C)	600
Gás 1 (psi)	80
Gás 2 (psi)	85

A otimização dos parâmetros cromatográficos foi realizada através da injeção sucessiva de uma mistura de todos os padrões analíticos (solução trabalho mistura – STM) até se adquirir um cromatograma ideal. Os valores otimizados no método cromatográfico estão mostrados na Tabela 8.

Tabela 8: Valores dos parâmetros do método cromatográfico otimizados.

Parâmetros	Valores
Vazão da fase móvel	200 µL/min
Temperatura da coluna	30°C
Volume de injeção	10µL
Isocrático da fase móvel (acetonitrila:água), 0,1 % ácido fórmico	85:15
Tempo total de corrida	11 min

Na Figura 16 é possível notar que ocorreu coeluição dos analitos e seus deuterados, o que é esperado já que possuem as mesmas características físico-químicas.

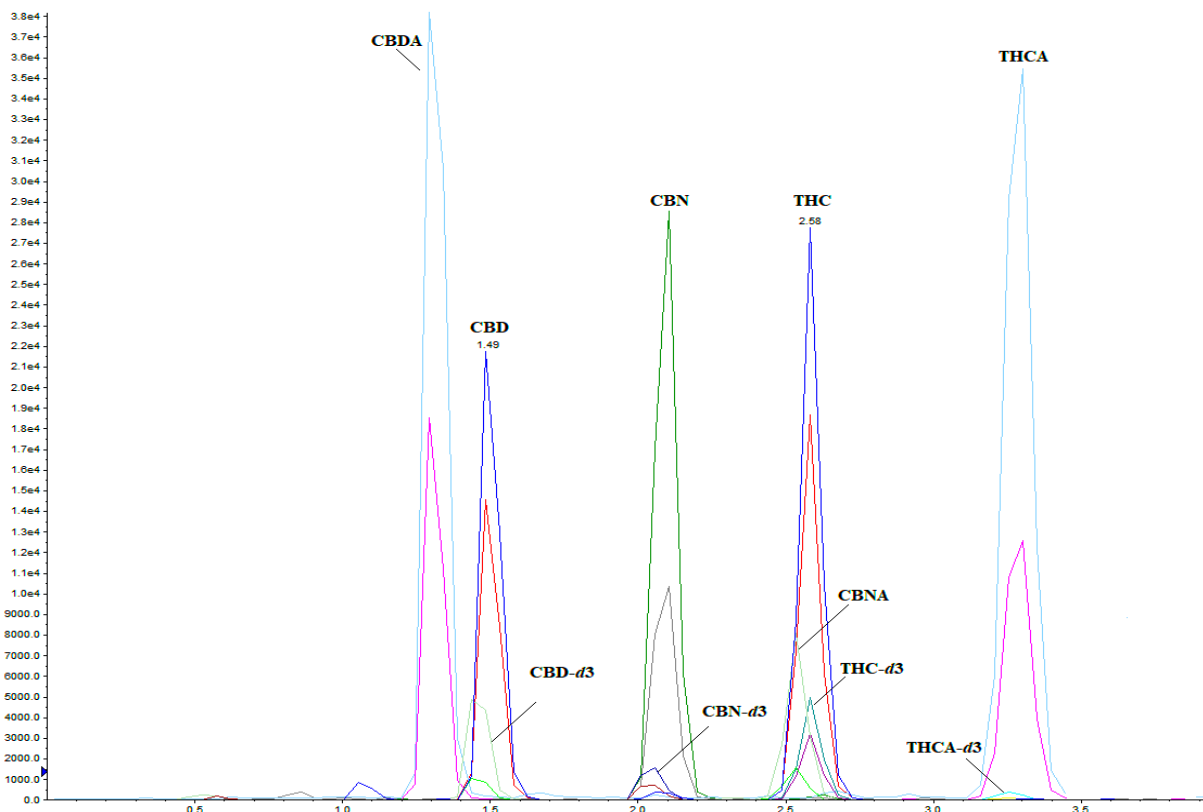


Figura 16: Cromatograma dos canabinoides neutros, ácidos e deuterados no LC-MS/MS API 3200 (Sciex). 200 ng/mL para os analitos e 10 ng/mL deuterados.

2. Validação do método

Nenhuma interferência foi observada no tempo de retenção dos analitos das amostras controle de material vegetal (lúpulos) e do mix de óleos (azeite, coco e extravirgem), indicando a **seletividade** do método.

O **efeito matriz** foi avaliado para cada analito e matriz em todos os níveis de concentração da curva de calibração, com e sem a adição do IS. Os resultados estão mostrados nas Figuras 18 e 19. Para a matriz de planta fortificada e diluída 100 vezes sem adição de IS houve supressão de sinal para o CBN em todos os níveis de fortificação. Para o CBDA, observou-se uma redução de -32,4% apenas na concentração de 6,25 ng/mL (Figura 17).

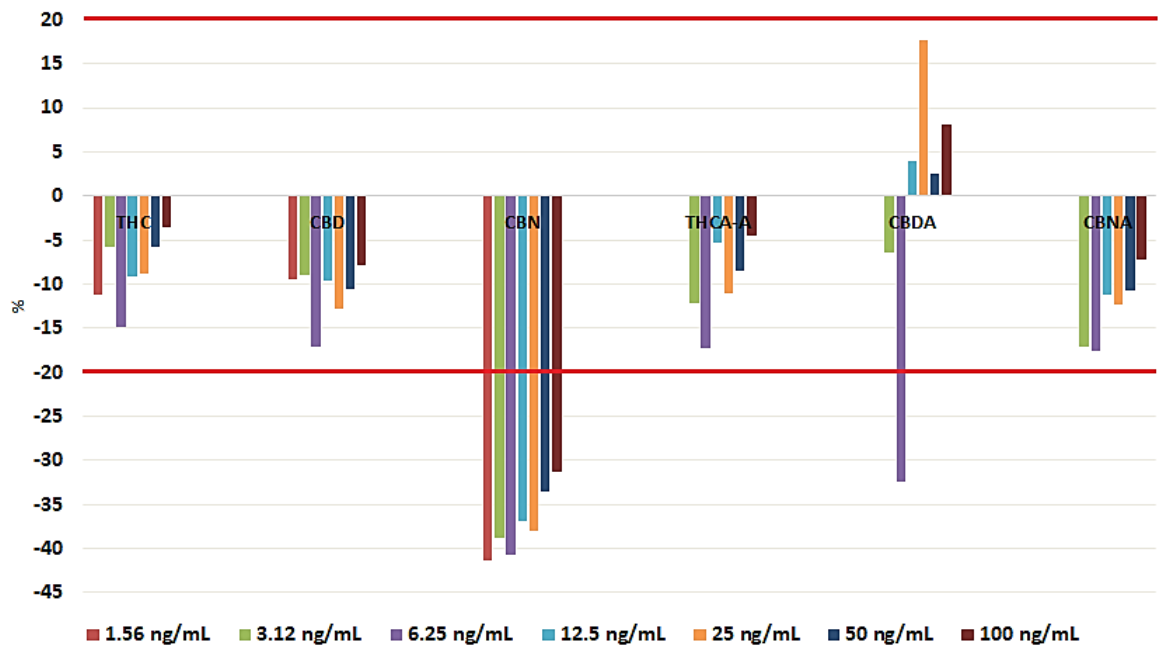


Figura 17: Resultado do teste de efeito de matriz de material vegetal realizado com diluição 1:10² sem adição de IS. Foram utilizadas as concentrações de 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25, 50 e 100 ng/mL para THC, CBD e CBN; e as concentrações de 3,12; 6,25; 12,5; 25, 50 e 100 ng/mL para THCA, CBDA e CBNA. A linha em vermelho demarca o limite de variação aceitável.

Com adição de IS, foi observado supressão do sinal para todos os analitos, mas somente na concentração de 6,25 ng/mL. A exceção foi o CBN (23,1%), que apresentou amplificação de sinal apenas no nível de fortificação de 50 ng/mL (Figura 18).

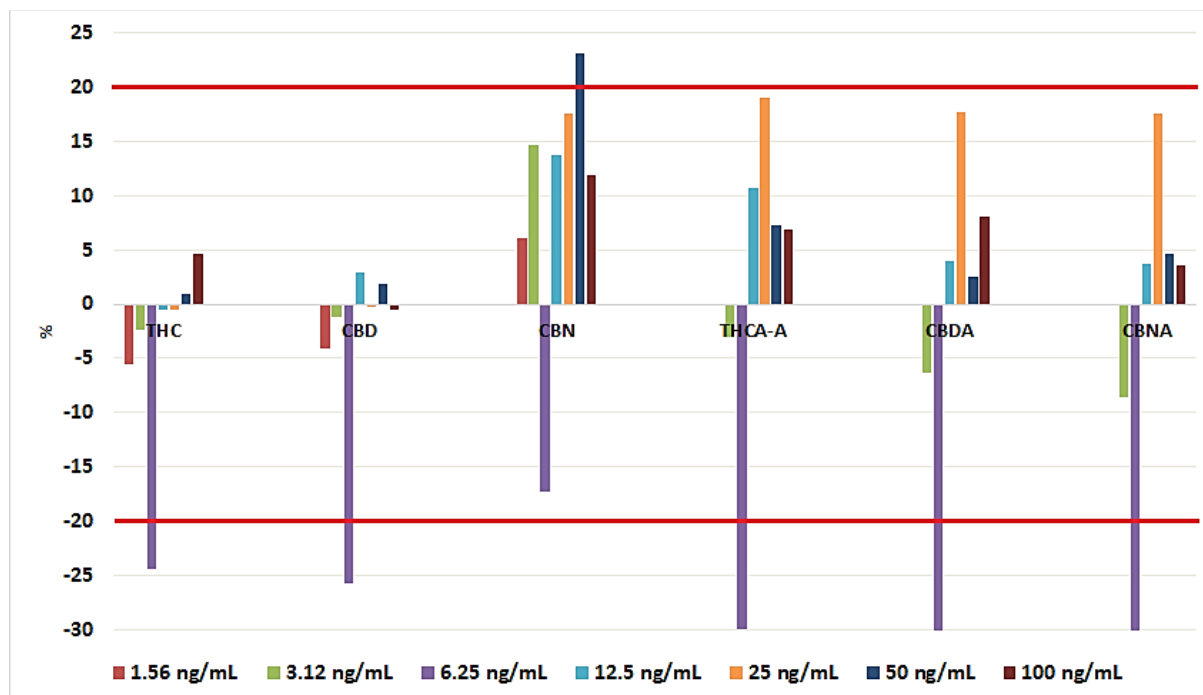


Figura 18: Resultado do teste de efeito de matriz em material vegetal realizado com diluição 1:10² e adição de IS. Foram utilizadas as concentrações de 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25, 50 e 100 ng/mL para THC, CBD e CBN; e as

concentrações de 3,12; 6,25; 12,5; 25, 50 e 100 ng/mL para THCA, CBDA e CBNA. A linha em vermelho demarca o limite de variação aceitável.

Diante dos resultados obtidos, a matriz branca foi diluída em mais 100 vezes e tanto com adição quanto sem adição de IS, não foi observado um efeito significativo de matriz para nenhum analito em nenhum dos níveis de fortificação ($< \pm 20\%$; Figuras 19 e 20).

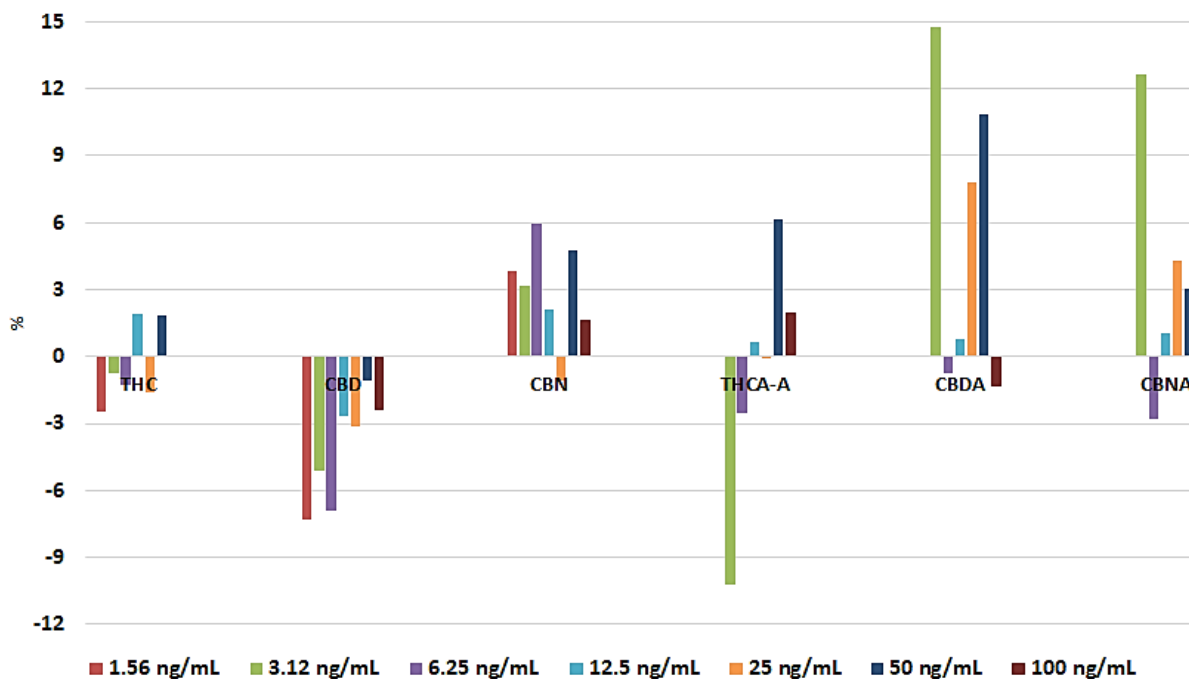


Figura 19: Resultado do teste de efeito de matriz material vegetal com diluição 1:10⁴ sem adição de IS. Foram utilizadas as concentrações de 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25, 50 e 100 ng/mL para THC, CBD e CBN; e as concentrações de 3,12; 6,25; 12,5; 25, 50 e 100 ng/mL para THCA, CBDA e CBNA.

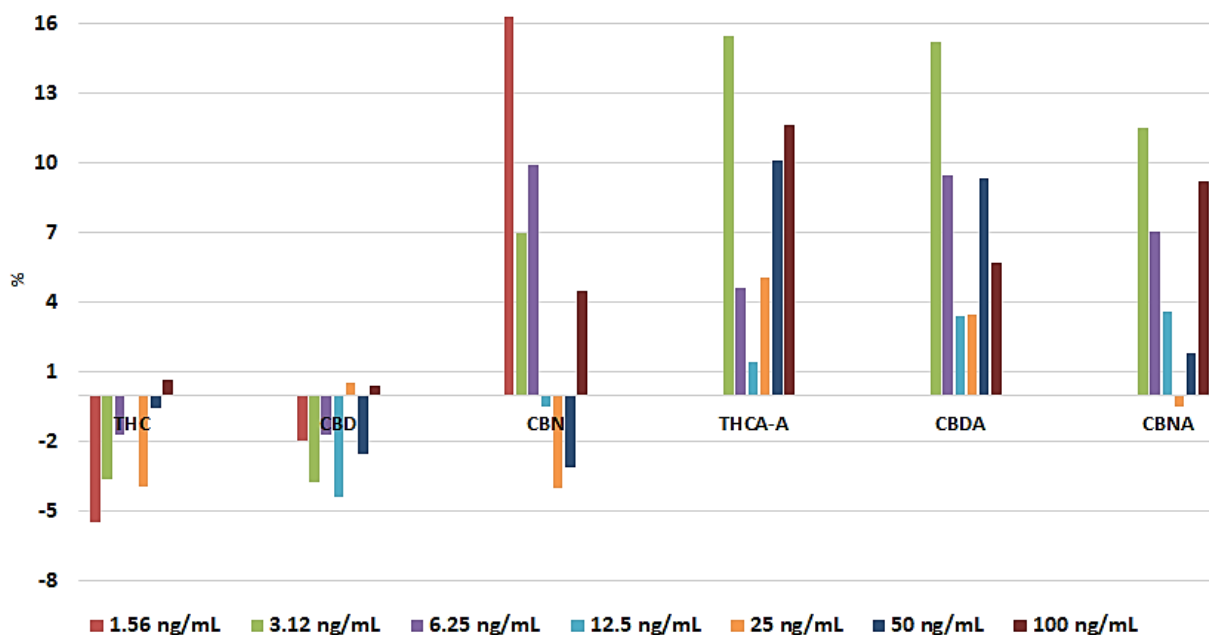


Figura 20: Resultado do teste de efeito de matriz material vegetal realizado com diluição 1:10⁴ com adição de IS. Foram utilizadas as concentrações de 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25, 50 e 100 ng/mL para THC, CBD e CBN; e as concentrações de 3,12; 6,25; 12,5; 25, 50 e 100 ng/mL para THCA, CBDA e CBNA.

Realizou-se o teste de efeito de matriz nos óleos utilizando uma abordagem semelhante à empregada nos testes realizados para as plantas. Esses óleos foram diluídos na proporção de 1:10 e, posteriormente, fortificados e analisados com e sem a adição de IS. Não foram observados efeitos significativos de matriz para nenhum dos analitos nas diluições testadas, independentemente da presença ou ausência de IS (Figuras 21 e 22)

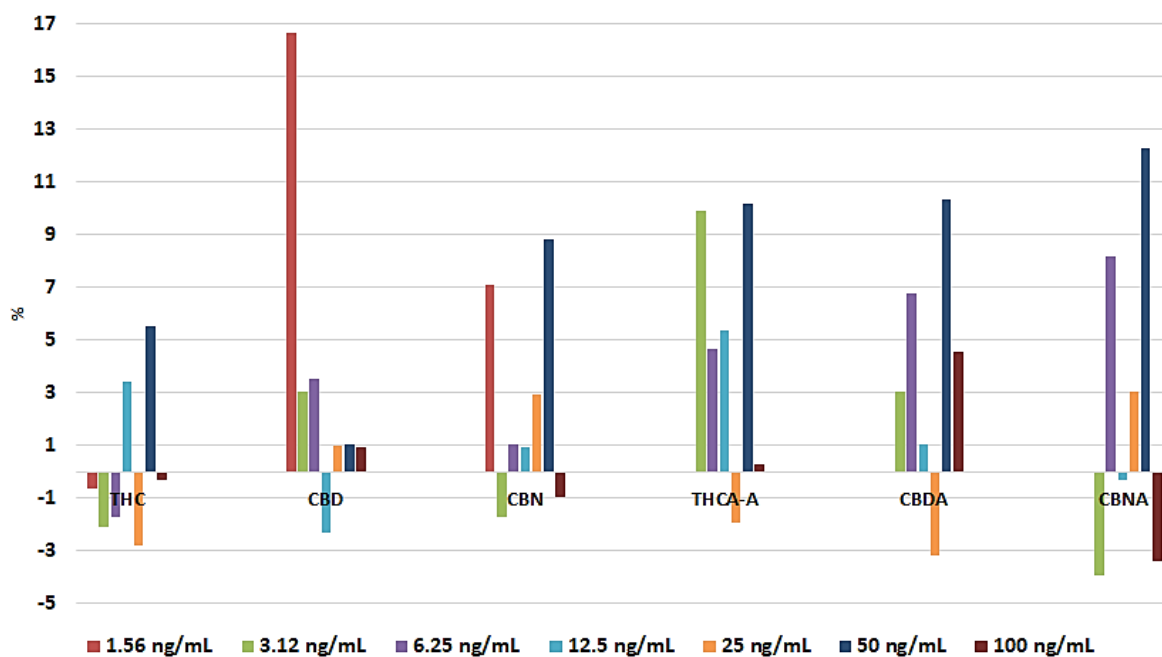


Figura 21: Resultado do teste de efeito de matriz óleo com diluição 1:10 sem adição de IS. Foram utilizadas as concentrações de 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50 e 100 ng/mL para THC, CBD e CBN; e as concentrações de 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50 e 100 ng/mL para THCA, CBDA e CBNA.

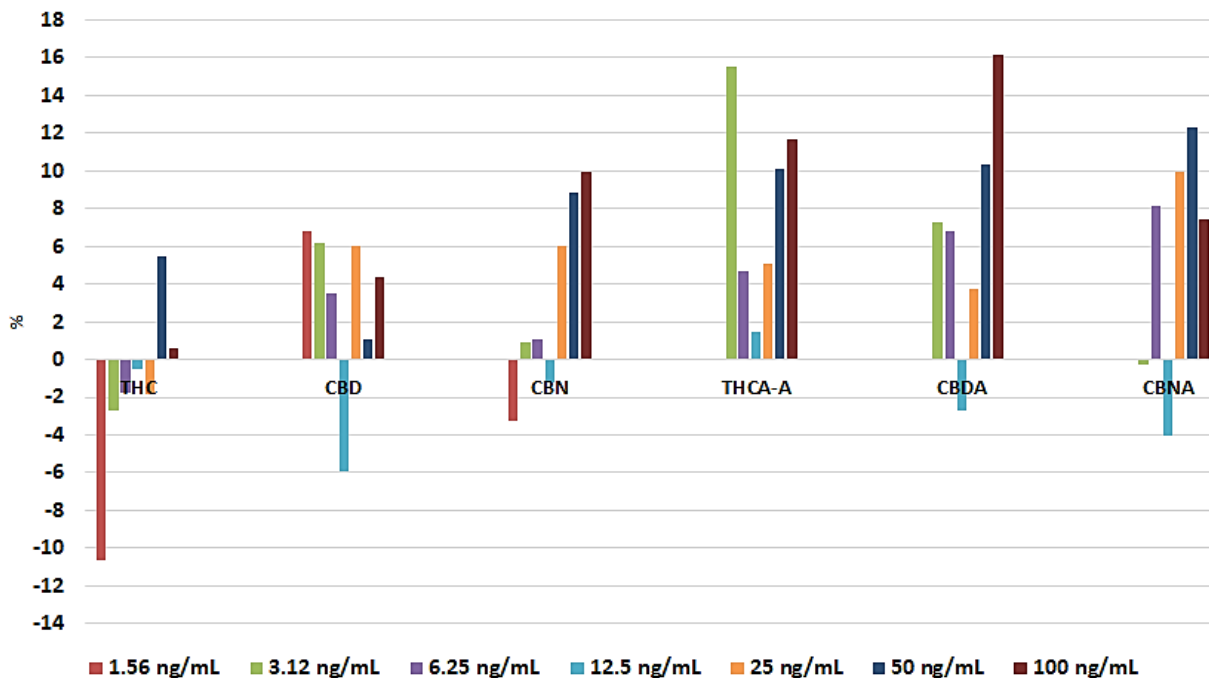


Figura 22: Resultado do teste de efeito de matriz em óleos realizado com diluição 1:10 e adição de IS. Foram utilizadas as concentrações de 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25, 50 e 100 ng/mL para THC, CBD e CBN; e as concentrações de 3,12; 6,25; 12,5; 25, 50 e 100ng/mL para THCA, CBDA e CBNA.

Considerando que não foi observado efeito matriz material vegetal na diluição 1:10⁴ que corresponde a diluição mínima dessas amostras, nem na matriz óleo na diluição 1:10 (diluição mínima de 1:10² nas amostras reais), a quantificação dos analitos foi realizada contra uma curva de calibração em solvente (fase móvel), na faixa de concentração de 1,56 a 100 ng/mL. Todos analitos apresentaram comportamento heterocedástico e foi utilizado ponderação de 1/x, com $r^2 \geq 0,99$.

Os resultados de **recuperação e repetibilidade** para a matriz material vegetal estão mostrados nas Tabelas 9 e 10. A recuperação sem adição de IS, esteve dentro dos critérios estabelecidos de 80-110% nos três níveis de fortificação e a repetibilidade foi < 15%, exceto para o nível mais baixo do CBNA sem adição de IS, que apresentou um valor de 31,1% (Tabela 9). Com o uso de IS, a recuperação para os ácidos na concentração mais alta estava acima dos critérios aceitos (> 110%), mas como a repetibilidade foi < 15 % em todas as concentrações e analitos, os resultados foram considerados satisfatórios (Tabela 10).

Tabela 9: Recuperação média (%) e repetibilidade (DPR, %) dos 6 analitos em material vegetal sem adição de IS (n=4-5)

Analito	Recuperação			Repetibilidade		
	Baixo	Médio	Alto	Baixo	Médio	Alto
Δ^9 -THC	101	98,4	100	9,7	2,4	1,3
CBD	99,6	98,4	100	6,9	2,9	0,9
CBN	106	90,8	102	9,3	2,0	0,6
THCA-A	102	99,7	98,6	5,3	2,3	1,1
CBDA	96,7	97,9	105	8,0	3,0	1,3
CBNA	89,3	92,2	102	31,1	2,9	3,0

Níveis de concentração baixa, média e alta, respectivamente: 1,56, 25 e 100 ng/mL para Δ^9 -THC, CBD e CBN; 3,12, 25 e 100 ng/mL para THCA, CBDA e CBNA

Tabela 10: Recuperação média (%) e repetibilidade (DPR, %) dos 6 analitos em material vegetal com adição de IS. Concentrações em ng/mL (n=4-5)

Analito	Recuperação			Repetibilidade		
	Baixo	Médio	Alto	Baixo	Médio	Alto
Δ^9 -THC	99,9	105,0	99,9	9,7	4,7	5,8
CBD	98,3	101,1	102	7,5	2,1	2,2
CBN	106	103,9	114	11,8	5,9	5,0
THCA-A	109	106,5	118	14,5	4,6	14,2
CBDA	101	104,6	116	14,2	5,3	12,3
CBNA	86,2	98,4	119	12,2	5,3	9,0

Níveis de concentração baixa, média e alta, respectivamente: 1,56, 25 e 100 ng/mL para Δ^9 -THC, CBD e CBN; 3,12, 25 e 100 ng/mL para THCA, CBDA e CBNA

Os resultados da precisão intermediária na matriz material vegetal confirmaram que a variabilidade dos resultados analíticos se manteve dentro dos limites aceitáveis para a maioria dos analitos quando o IS foi adicionado, exceto para CBN, THCA_A e CBNA. Na ausência de adição de IS o THC, CBN, CBDA e CBNA apresentaram resultados acima dos critérios de aceitação (Tabela 11).

Tabela 11: Precisão intermediária (DPR,%) dos 6 analitos em Material vegetal. Concentrações em ng/mL (n=9-10)

Analito	Com adição IS			Sem adição IS		
	Baixo	Médio	Alto	Baixo	Médio	Alto
Δ^9 -THC	11,4	10,3	7,7	26,9	11,1	9,2
CBD	11,6	5,8	4,0	10,5	17,9	10,9
CBN	15,3	6,6	3,9	13,3	29,4	20,3
THCA-A	16,8	10,8	18,2	13,0	17,6	14,5
CBDA	14,9	4,5	9,4	16,8	25,7	25,9
CBNA	19,4	13,1	8,2	42,9	28,9	27,3

Para precisão intermediária (n = 9-10) dos 6 analitos em material vegetal nos níveis de concentração baixa, média e alta, respectivamente: 1,56, 25 e 100 ng/mL para Δ^9 -THC, CBD e CBN; 3,12, 25 e 100 ng/mL para THCA, CBDA e CBNA

Para a matriz óleo, tanto sem adição de IS, os resultados de recuperação estiveram dentro da faixa aceitável de 80% a 110% com padrão interno, o CBD no nível mais baixo e o CBDA no nível mais alto apresentaram resultados acima dos critérios aceitos (Tabelas 12 e 13).

Tabela 12: Recuperação média (%) e repetibilidade (DPR, %) dos 6 analitos em matriz óleo sem adição de IS. Concentrações em ng/mL (n=5)

Analito	Recuperação			Repetibilidade		
	Baixo	Médio	Alto	Baixo	Médio	Alto
Δ^9 -THC	90,2	96,5	92,2	4,7	3,8	2,3
CBD	104	103	91,7	9,9	2,9	2,3
CBN	91,5	97,6	89,4	4,7	2,6	1,9
THCA-A	97,7	95,9	104,6	3,7	3,5	4,9
CBDA	103	93,2	106,8	3,4	7,6	2,8
CBNA	103	93,2	85,3	9,1	6,7	2,2

Para recuperação (n = 5) dos 6 analitos em material vegetal e óleo nos níveis de concentração baixa, média e alta, respectivamente: 1,56, 25 e 100 ng/mL para Δ^9 -THC, CBD e CBN; 3,12, 25 e 100 ng/mL para THCA, CBDA e CBNA

Tabela 13: Recuperação média (%) e repetibilidade (DPR, %) dos 6 analitos em matriz óleo com adição de IS Concentrações em ng/mL (n=5)

Analito	Recuperação			Repetibilidade		
	Baixo	Médio	Alto	Baixo	Médio	Alto
Δ^9 -THC	93,9	102,1	103	6,2	2,5	2,5
CBD	112	106	98,6	9,9	4,2	6,3
CBN	103	104	104	8,7	5,8	7,9
THCA-A	96,6	97,0	109	6,0	11,8	7,7
CBDA	102	93,9	111	6,7	11,9	10,3
CBNA	102	93,7	88,7	14,5	11,8	8,3

Níveis de concentração baixa, média e alta, respectivamente: 1,56, 25 e 100 ng/mL para Δ^9 -THC, CBD e CBN; 3,12, 25 e 100 ng/mL para THCA, CBDA e CBNA

Os resultados da **precisão intermediária** na matriz óleo demonstraram uma consistente e satisfatória precisão para a maioria dos analitos com a adição de IS. No entanto, foi observado que sem a adição de IS, os analitos ácidos (THCA-A, CBDA e CBNA) apresentaram valores de DPR% acima de 15% (Tabela 14).

Tabela 14: Precisão intermediária (DPR, %) dos 6 analitos em matriz óleo (n=9-10)

Analito	Com adição IS			Sem adição IS		
	Baixo	Médio	Alto	Baixo	Médio	Alto
Δ^9 -THC	14,5	2,3	3,6	16,6	15,6	18,4
CBD	12,0	8,6	4,8	12,0	12,6	18,5
CBN	12,0	9,7	9,9	17,6	15,0	3,7
THCA-A	16,7	8,6	8,1	22,4	24,9	19,0
CBDA	13,5	17,3	9,9	21,1	32,7	31,2
CBNA	15,3	13,8	15,6	13,1	36,1	37,4

Para precisão intermediária (n = 9-10) dos 6 analitos em óleo nos níveis de concentração baixa, média e alta, respectivamente: 1,56, 25 e 100 ng/mL para Δ^9 -THC, CBD e CBN; 3,12, 25 e 100 ng/mL para THCA, CBDA e CBNA

Os resultados confirmaram que o uso de padrão interno melhora a performance do método e foi utilizado para análise das amostras reais, e o método foi validado na menor concentração testada, 1,56 ng/mL para os canabinoides neutros e 3,12 ng/mL para os ácidos. Considerando uma diluição 1:10⁴, o LOQ para o material vegetal é de 0,09% para neutros e 0,18% e para os ácidos. Para as amostras de óleos (diluição de 1:10³), o LOQ é de 0,015% para os canabinoides neutros e 0,03% para os ácidos (Tabela 15)

Tabela 15: Limite de detecção (LOD), Limite de quantificação (LOQ) para os 6 analitos em material vegetal e óleos

Analito	Material vegetal		Óleos	
	LOD (%)	LOQ (%)	LOD (%)	LOQ (%)
Δ^9 -THC	0,011	0,09	0,0019	0,015
CBD	0,011	0,09	0,0019	0,015
CBN	0,011	0,09	0,0019	0,015
THCA-A	0,022	0,18	0,0038	0,03
CBDA	0,022	0,18	0,0038	0,03
CBNA	0,022	0,18	0,0038	0,03

3. Análise das amostras de óleo e material vegetal

Uma vez validado o método de quantificação, foram analisadas 27 amostras de óleo/resina de cannabis, sendo 4 amostras de haxixe provenientes de apreensões da PF e as demais doações ao Laboratório de Toxicologia da UnB. Os resultados são apresentados na Tabela 16. THC e o CBD foram os canabinoides com maior número de amostras quantificadas (85%), com níveis que variaram de 0,3 a 60,9% (média de 15,1%) e 0,1 a 29,8% (média 3,4%),

respectivamente. O CBN teve 74% de amostras quantificadas, com níveis entre 0,2 e 25,8% (média 2,6%). Quinze amostras continham THCA (0,3 a 9,3%), CBDA em apenas 8 amostras (1,4-12,2%) e o CBNA em 2 amostras (2,9 e 3,0%).

Tabela 16: Resultados da quantificação de canabinoides por LC-MS/MS em óleos/haxixe (média das duplicatas, em %)

Amostra	THC	THCA	CBD	CBDA	CBN	CBNA
OL1-22	60,9 (62,6;59,1)	1,4(1,4;1,4)	6,7 (8,7;4,7)	ND	2,4 (2,6;2,2)	2,9(3,0;2,8)
OL2-22	51,5 (50,4; 52,7)	1,9 (2,2;1,5)	2,4 (2,8;1,8)	ND	3,5 (3,7;3,4)	3,0 (3,4;2,6)
OL3-22	37,2 (40,8;33,6)	0,5 (0,5;0,5)	2,5 (2,72;2,24)	ND	3,1 (3,2;3,0)	ND
OL4-22	25,4 (28,0; 22,8)	4,9 (4,9;4,9)	0,4 (0,4;0,4)	6,5 (6,3;6,7)	0,3 (0,3;0,3)	ND
OL5-22	23,6 (25,0; 22,2)	1,8 (1,3; 2,3)	0,2 (0,2;0,2)	2,4 (2,3;2,5)	0,2 (0,2;0,2)	ND
OL6-22	20,3 (20,0;20,6)	1,0 (1,0;1,0)	0,3 (0,3;0,3)	1,4 (1,5;1,3)	0,2 (0,2;0,2)	ND
OL7-22	18,9 (20,0; 17,8)	2,6 (2,0; 3,2)	0,3 (0,3;0,3)	3,5 (3,5;3,5)	0,6 (0,6;0,6)	ND
OL8-22	3,5 (3,5;3,5)	9,3(8,5; 10,3)	18,7 (17,9;19,3)	12,2 (10,1; 14,2)	0,2 (0,2;0,2)	ND
OL9-22	2,5 (2,5;2,5)	1,7 (1,5; 1,9)	0,1(0,1;0,1)	2,2 (2,6;1,8)	0,4 (0,4;0,4)	ND
OL10-22	1,5 (1,5;1,5)	5,3 (5,5;5,1)	0,6 (0,6;0,6)	7,1 (7,3; 6,9)	ND	ND
OL11-22	1,5 (1,6;1,4)	3,0 (3,8;2,2)	1,1(1,0;1,2)	3,9 (3,9;3,9)	25,8 (25,0;26,6)	ND
OL12-23	6,0 (6,1;5,9)	<LOQ	29,8 (26,9;32,6)	ND	0,3 (0,3;0,3)	ND
OL13-23	0,3 (0,3;0,3)	<LOQ	0,2 (0,2;0,2)	ND	0,2 (0,2;0,2)	ND
OL14-23	1,4 (1,6;1,3)	0,26 (0,26;0,26)	0,3 (0,3;0,3)	ND	0,2 (0,2;0,2)	ND
OL15-23	< LOQ	<LOQ	2,1 (2,1;2,1)	ND	<LOQ	ND
OL16-23	1,5 (1,6;1,5)	<LOQ	0,2 (0,3;0,1)	ND	<LOQ	<LOQ
OL17-23	3,0 (2,6;3,5)	<LOQ	< LOQ	ND	0,2 (0,2;0,2)	ND
OL18-23	2,1 (2,4;1,7)	ND	2,7 (2,8;2,6)	ND	0,5 (0,54;0,50)	ND
OL19-23	< LOQ	ND	1,7 (1,6;1,8)	ND	0,3 (0,3;0,3)	ND
OL20-23	0,6 (0,6;0,6)	ND	1,3 (1,26;1,36)	ND	<LOQ	ND
OL21-23	0,5 (0,5;0,5)	ND	1,2 (1,29;1,16)	ND	<LOQ	ND
OL22-23	< LOQ	ND	1,9 (1,9;1,9)	ND	<LOQ	ND
OL23-23	< LOQ	ND	1,7 (1,7;1,7)	ND	<LOQ	ND
HX1-18	17,5 (16,7;18,2)	0,2 (0,2;0,2)	1,4 (1,4;1,3)	ND	9,1 (9,3;8,9)	ND
HX2-21	58,5 (58,5; 58,5)	0,3 (0,3;0,3)	<LOQ	ND	3,9 (3,9;3,9)	ND
HX3-21	7,5 (7,1;7,8)	0,2 (0,2;0,2)	<LOQ	ND	0,8 (0,8;0,8)	ND
HX4-21	2,3 (2,3;2,3)	ND	<LOQ	ND	0,4 (0,3;0,4)	ND
MÉDIAS	15,1	2,3	3,4	4,9	2,6	2,9

^aMédia das amostras quantificadas (\geq LOQ);. O LOQ para canabinoides neutros (THC, CBD, CBN) é de 0,015%, enquanto para canabinoides ácidos (THCA, CBDA, CBNA) é de 0,03%. Não detectado(ND), Óleo (OL), Haxixe (HX)

As amostras de material vegetal foram classificadas de acordo com suas características: raízes (5 amostras), folhas (3 amostras), folhas e inflorescências (4 amostras), inflorescências

(10 amostras), e material prensado (92 amostras). Os resultados estão mostrados nas Figuras 23 e 24 e Tabela 17

Nas folhas, THC, THCA e CBN estiveram presentes em todas as amostras, variando de 0,2-1% (média 0,7%), 0,7- 2,8% (1,76%) e 0,3-0,4% (0,36%), respectivamente. CBDA esteve presente em duas amostras, ambas com 0,2%, e CBD e CBNA não foi quantificado em nenhuma amostra.

Em amostras de folhas e inflorescências, THC, THCA e CBN estavam presentes em todas as amostras, variando de 1-4% (média 2,0%), 1-2,8% (1,77%) e 0,4-1,1% (0,6%), respectivamente. CBDA estava presente em apenas uma amostra (0,2%), enquanto CBD e CBNA estavam abaixo do LOQ em todas as amostras.

As inflorescências apresentaram valores de THC, THCA e CBN que variaram de 4-18,7% (média 6,4%), 1,2-28,8% (6,9%) e 0,4-6,4% (2,73%), respectivamente. CBNA estava presente em oito amostras, com teores de 0,2-1,5% (média 0,51%), enquanto CBD e seu precursor ácido estavam presentes em apenas uma amostra, com 0,1 e 0,2%, respectivamente. A amostra que apresentou os maiores níveis de THC e THCA também continha todos os outros canabinoides acima do LOQ (Figura 23).

Nas raízes, os canabinoides apresentaram valores < LOQ para todos os compostos, exceto uma amostra que apresentou CBN na concentração de 0,2%. Dentre as seis amostras de raiz, apenas uma apresentou níveis quantificáveis de canabinoide, CBN com 0,9%.

Todas as 92 amostras de material prensado apresentaram valores de THC, THCA e CBN que variaram de 0,3-13,2% (média 5,1%), 0,2-8,7% (média de 2,5%) e 0,2-2,8% (média 1,0%), respectivamente. O CBNA foi encontrado em um terço das amostras e variou de 0,2-0,5% (média 0,25%), enquanto CBD e CBNA estavam abaixo do LOQ em todas as amostras (Figura 24).

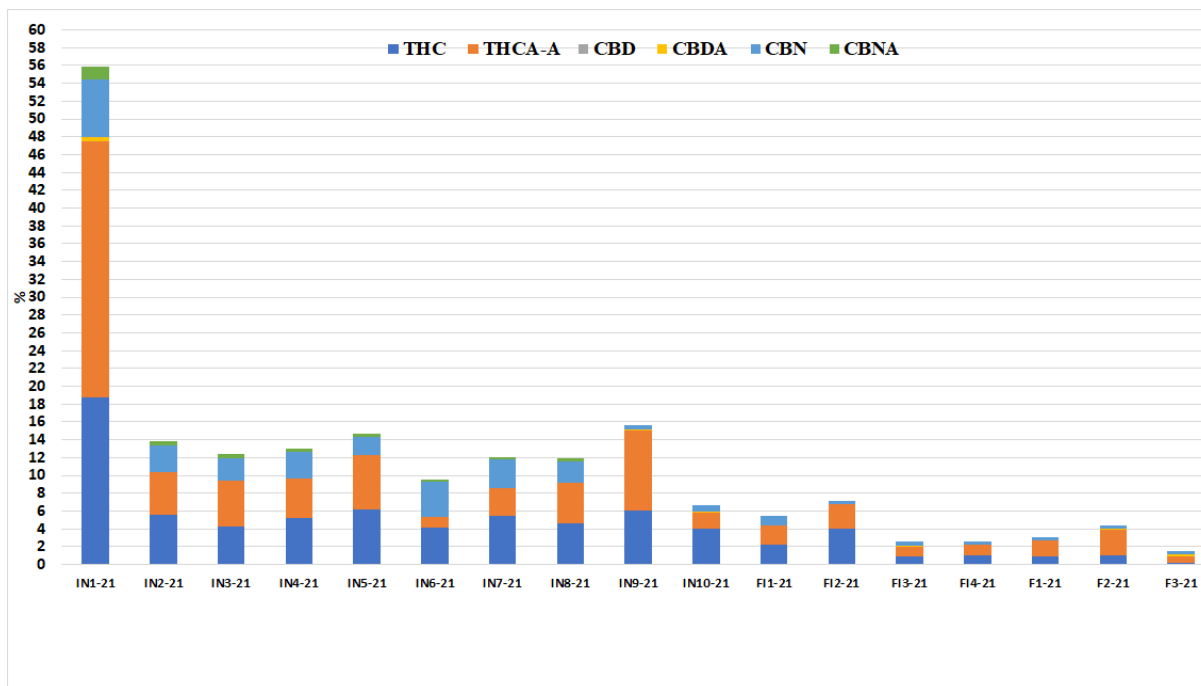


Figura 23: Teor (%) dos canabinoides em folhas, folhas/inflorescência e inflorescência de cannabis IN-Inflorescências, FI- Folhas e inflorescências, F- Folhas.

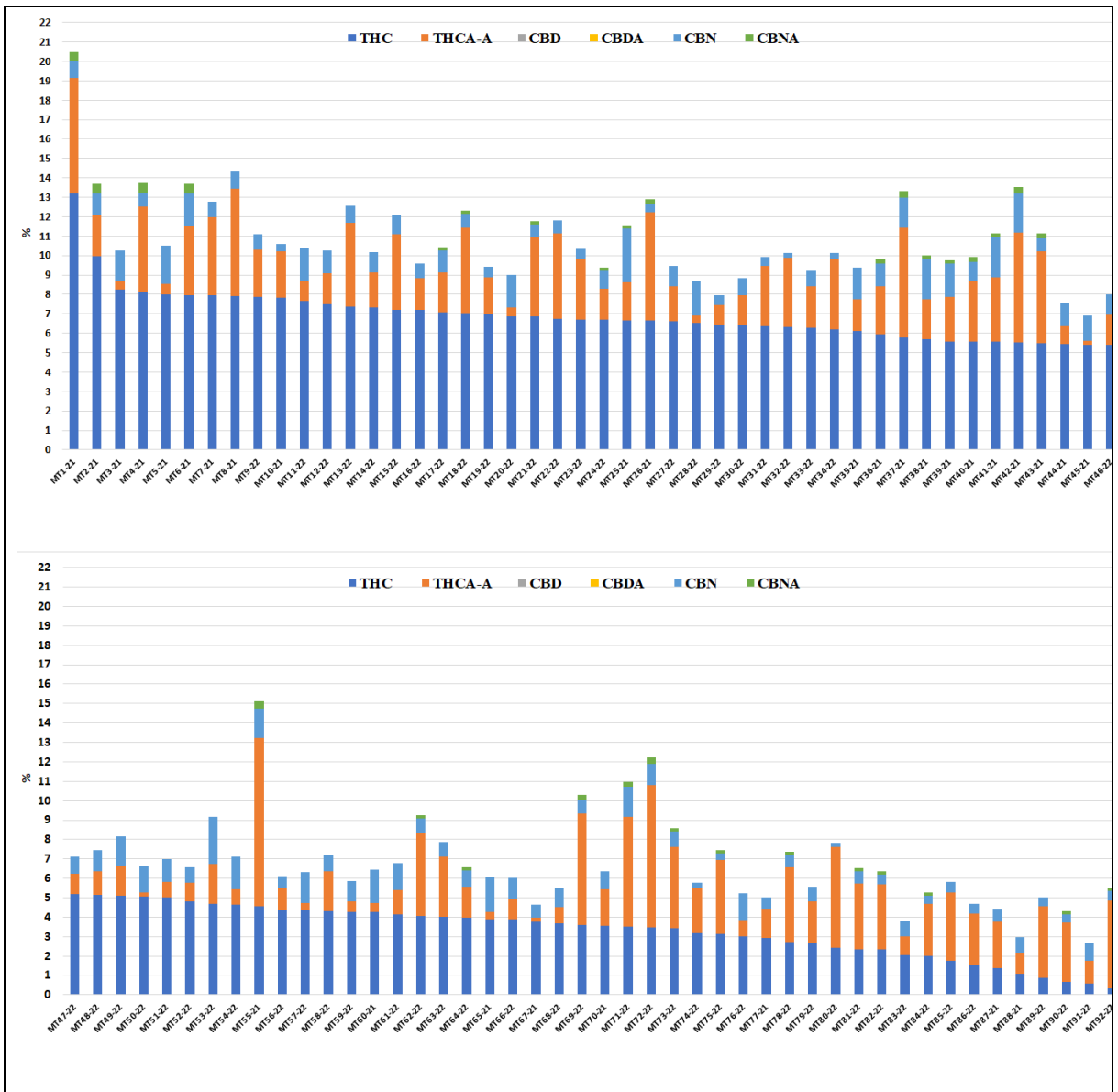


Figura 24: Teor (%) dos canabinoides em diferentes amostras de material vegetal prensado

Tabela 17: Resultados da quantificação de canabinoides por LC-MS/MS em material vegetal (média de duas sub-amostras, em %)

Amostra	THC	THCA	CBD	CBDA	CBN	CBNA
F1-21	0,9 (1,0;0,8)	1,8 (1,7;1,9)	<LOQ	<LOQ	0,4 (0,4;0,4)	<LOQ
F2-21	1,0 (1,0;1,1)	2,8 (2,8;2,8)	<LOQ	0,2 (0,2;0,2)	0,4 (0,4;0,4)	<LOQ
F3-21	0,2 (0,2;0,2)	0,7 (0,7;0,7)	<LOQ	0,2 (0,2;0,2)	0,3 (0,3;0,3)	<LOQ
MÉDIA	0,7	1,76	<LOQ	0,2	0,36	<LOQ
FI1-21	2,3 (2,2;2,3)	2,1 (2,1;2,1)	<LOQ	<LOQ	1,1 (1,0;1,1)	<LOQ
FI2-21	4,0 (3,8;4,2)	2,8 (3,0;2,5)	<LOQ	<LOQ	0,4 (0,4;0,4)	<LOQ
FI3-21	1,0 (0,9;1,0)	1,0 (1,0;0,9)	<LOQ	0,2 (0,2;0,2)	0,5 (0,5;0,5)	<LOQ
FI4-21	1,0 (1,0;0,9)	1,2 (1,2;1,2)	<LOQ	<LOQ	0,4 (0,4;0,4)	<LOQ
MÉDIA	2,0	1,77	<LOQ	0,2	0,60	<LOQ
IN1-21	18,7(4,38;33,0)	28,8(8,5;49)	0,1(0,1;0,1)	0,5(0,5;0,5)	6,4 (1,7;11,0)	1,5
IN2-21	5,5 (7,3;3,9)	4,8 (5,3;4,4)	<LOQ	<LOQ	3,0(3,7;2,3)	0,5(0,5;0,5)
IN3-21	4,3(4,3;4,3)	5,1 (5,2;5,0)	<LOQ	<LOQ	2,5(2,6;2,3)	0,5(0,5;0,5)
IN4-21	5,2(5,2;5,2)	4,5(4,5;4,5)	<LOQ	<LOQ	3,0(3,0;3,0)	0,4(0,4;0,4)
IN5-21	6,2 (6,2;6,2)	6,1(6,1;6,1)	<LOQ	<LOQ	2,0(2,0;2,0)	0,3(0,3;0,3)
IN6-21	4,2(4,2;4,2)	1,2(1,2;1,2)	<LOQ	<LOQ	3,9(3,6;4,2)	0,2(0,2;0,2)
IN7-21	5,4(5,2;5,4)	3,1(2,9;3,2)	<LOQ	<LOQ	3,2(3,2;3,2)	0,3(0,3;0,3)
IN8-21	4,6(4,4;4,8)	4,6(4,3;4,9)	<LOQ	<LOQ	2,3(2,4;2,2)	0,4(0,4;0,4)
IN9-21	6,0(5,7;6,3)	9,0(8,0;10,0)	<LOQ	0,2(0,2;0,2)	0,4 (0,4;0,4)	<LOQ
IN10-21	4,0(3,7;4,3)	1,8(1,3;2,3)	<LOQ	0,2(0,2;0,2)	0,6(0,6;0,6)	<LOQ
MÉDIA	6,4	6,9	0,1	0,2	2,73	0,51
R1-22	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
R2-22	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
R3-22	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
R4-22	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
R5-22	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,2 (0,2;0,2)	<LOQ
R6-22	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
MÉDIA	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,2(0,2;0,2)	<LOQ
MT1-21	13,2 (12,5;13,8)	6,0 (5,4;6,5)	<LOQ	ND	0,9(0,9;0,9)	0,5 (0,5;0,5)
MT2-21	10,0 (9,9;10,1)	2,1(2,1;2,1)	<LOQ	ND	1,1(1,1;1,1)	0,5 (0,5;0,5)
MT3-21	8,2 (7,9;8,5)	0,5 (0,5;0,5)	<LOQ	ND	1,6(1,6;1,6)	ND
MT4-21	8,1(8,1;8,1)	4,4 (4,6;4,2)	<LOQ	ND	0,7(0,7;0,7)	0,5
MT5-21	8,0(7,7;8,3)	0,6(0,6;0,6)	<LOQ	ND	2,0(2,0;2,0)	ND
MT6-21	7,9(7,6;8,0)	3,6(4,3;2,9)	<LOQ	ND	1,7(1,8;1,6)	0,5
MT7-21	7,9(7,7;8,0)	4,0(4,0;4,0)	<LOQ	ND	0,8(0,8;0,8)	ND
MT8-21	7,9(7,7;8,0)	5,6(5,3;6,0)	ND	ND	0,9(0,9;0,9)	ND
MT9-22	7,9(7,9;7,9)	2,4(2,3;2,6)	ND	ND	0,8(0,8;0,8)	ND
MT10-21	7,8 (7,7;7,9)	2,4(2,4;2,4)	ND	ND	0,4(0,4;0,4)	ND
MT11-22	7,7 (7,7;7,7)	1,1(1,1;1,1)	ND	ND	1,7(1,7;1,7)	ND
MT12-22	7,5 (7,4;7,6)	1,6(1,4;1,8)	ND	ND	1,2(1,2;1,2)	ND
MT13-22	7,4 (7,4;7,4)	4,3(4,3;4,3)	ND	ND	0,9(0,9;0,9)	ND
MT14-22	7,3 (7,3;7,3)	1,8(1,8;1,8)	ND	ND	1,0(1,2;0,8)	ND
MT15-22	7,2 (7,2;7,2)	3,9(4,0;3,8)	ND	ND	1,0(1,0;1,0)	ND
MT16-22	7,2(7,2;7,2)	1,6(1,4;1,8)	<LOQ	ND	0,8(0,8;0,8)	<LOQ
MT17-22	7,1 (7,6;6,4)	2,1(2,1;2,1)	<LOQ	ND	1,1(1,1;1,1)	0,2 (0,2;0,2)

Amostra	THC	THCA	CBD	CBDA	CBN	CBNA
MT18-22	7,0 (7,3;6,7)	4,4(4,6;4,2)	<LOQ	ND	0,7(0,7;0,7)	0,2
MT19-22	7,0(6,4;7,6)	1,9(1,9;1,9)	<LOQ	ND	0,6(0,6;0,6)	<LOQ
MT20-22	6,9 (6,9;6,9)	0,5(0,5;0,5)	<LOQ	ND	1,7(1,7;1,7)	<LOQ
MT21-22	6,8(7,5;6,5)	4,1(4,1;4,1)	<LOQ	ND	0,7(0,7;0,7)	0,2(0,2;0,2)
MT22-22	6,8 (6,6;6,9)	4,4(4,4;4,4)	<LOQ	ND	0,7(0,7;0,7)	<LOQ
MT23-22	6,7 (6,8;6,6)	3,1(3,1;3,1)	<LOQ	ND	0,6(0,6;0,6)	<LOQ
MT24-22	6,7 (6,9;6,5)	1,6(1,6;1,6)	<LOQ	ND	0,9(0,9;0,9)	0,2(0,2;0,2)
MT25-21	6,7(6,9;6,4)	2,0(2,0;2,0)	<LOQ	ND	2,8(2,9;2,7)	0,2(0,2;0,2)
MT26-21	6,6(6,6;6,6)	5,6(5,4;5,7)	<LOQ	ND	0,4(0,4;0,4)	0,2(0,2;0,2)
MT27-22	6,6 (6,8;6,4)	1,8(1,8;1,8)	<LOQ	ND	1,0(1,0;1,0)	<LOQ
MT28-22	6,5 (6,9;6,2)	0,4(0,4;0,4)	<LOQ	ND	1,8(1,6;2,0)	<LOQ
MT29-22	6,5(6,5;6,5)	1,0(1,2;0,8)	<LOQ	ND	0,5(0,5;0,5)	<LOQ
MT30-22	6,4 (6,3;6,5)	1,6(1,4;1,8)	<LOQ	ND	0,9(0,9;0,9)	<LOQ
MT31-22	6,4 (6,4;6,4)	3,1(3,0;3,2)	<LOQ	ND	0,4(0,4;0,4)	<LOQ
MT32-22	6,3(6,4;6,2)	3,6(3,6;3,6)	<LOQ	ND	0,3(0,3;0,3)	<LOQ
MT33-22	6,3(6,1;6,5)	2,1(2,1;2,1)	<LOQ	ND	0,8(0,8;0,8)	<LOQ
MT34-22	6,2(6,2;6,2)	3,7(3,7;3,7)	<LOQ	ND	0,3(0,3;0,3)	<LOQ
MT35-21	6,1(5,9;6,3)	1,6(1,6;1,6)	<LOQ	ND	1,7(1,7;1,7)	<LOQ
MT36-21	6,0(5,9;6,1)	2,5(2,5;2,5)	<LOQ	ND	1,2(1,4;1,0)	0,2(0,2;0,2)
MT37-21	5,8(5,6;6,0)	5,7(4,9;6,4)	<LOQ	ND	1,6(1,6;1,6)	0,3(0,3;0,3)
MT38-21	5,7(5,5;5,9)	2,0(2,1;1,9)	<LOQ	ND	2,1(2,1;2,1)	0,2(0,2;0,2)
MT39-21	5,6(5,6;5,6)	2,3(2,3;2,3)	<LOQ	ND	1,7(1,7;1,7)	0,2(0,2;0,2)
MT40-21	5,6(5,4;5,7)	3,1(3,0;3,2)	<LOQ	ND	1,0(1,0;1,0)	0,2(0,2;0,2)
MT41-21	5,6(5,4;5,7)	3,3(3,2;3,4)	<LOQ	ND	2,1(2,1;2,0)	0,2(0,2;0,2)
MT42-21	5,5(5,2;5,9)	5,7(4,9;6,4)	<LOQ	ND	2,0(2,0;2,0)	0,3(0,3;0,3)
MT43-21	5,5(5,5;5,5)	4,8(4,8;4,8)	<LOQ	ND	0,7(0,7;0,7)	0,2(0,2;0,2)
MT44-21	5,5 (7,2;3,9)	0,9(0,9;0,9)	<LOQ	<LOQ	1,2(1,0;1,4)	<LOQ
MT45-21	5,4(5,2;5,7)	0,2(0,2;0,2)	<LOQ	ND	1,3(1,3;1,3)	<LOQ
MT46-22	5,4(5,3;5,5)	1,6(1,6;1,6)	<LOQ	<LOQ	1,0(1,0;1,0)	<LOQ
MT47-22	5,2(5,0;5,4)	1,0(1,0;1,0)	<LOQ	<LOQ	0,9(0,9;0,9)	<LOQ
MT48-22	5,2(5,2;5,2)	1,2(1,2;1,2)	<LOQ	<LOQ	1,1(1,1;1,1)	<LOQ
MT49-22	5,1(5,1;5,1)	1,5(1,5;1,5)	<LOQ	<LOQ	1,6(1,4;1,7)	<LOQ
MT50-22	5,1(5,1;5,1)	0,2(0,2;0,2)	<LOQ	<LOQ	1,4(1,2;1,6)	<LOQ
MT51-22	5,0(4,9;5,1)	0,8(0,6;1,0)	<LOQ	<LOQ	1,2(1,2;1,2)	<LOQ
MT52-22	4,8(4,7;4,9)	1,0(1,0;1,0)	<LOQ	<LOQ	0,8(0,8;0,8)	<LOQ
MT53-22	4,7(5,2;4,2)	2,1(2,1;2,1)	<LOQ	<LOQ	2,4(2,0;2,8)	<LOQ
MT54-22	4,6(4,4;4,8)	0,8(0,8;0,8)	<LOQ	ND	1,7(1,8;1,6)	<LOQ
MT55-21	4,6(4,4;4,8)	8,7(9,1;8,3)	<LOQ	<LOQ	1,5(1,5;1,5)	0,4(0,4;0,4)
MT56-22	4,4 (4,3;4,2)	1,1(1,1;1,1)	<LOQ	ND	0,6(0,6;0,6)	<LOQ
MT57-22	4,3 (4,3;4,3)	0,4(0,4;0,4)	<LOQ	<LOQ	1,6(1,4;1,7)	<LOQ
MT58-22	4,3 (4,3;4,3)	2,1(2,1;2,1)	<LOQ	<LOQ	0,8(0,8;0,8)	<LOQ
MT59-22	4,3 (4,4;4,2)	0,5(0,5;0,5)	<LOQ	ND	1,0(1,0;1,0)	<LOQ
MT60-21	4,3(4,4;4,2)	0,4(0,4;0,4)	<LOQ	ND	1,7(1,8;1,5)	<LOQ
MT61-22	4,1(4,1;4,1)	1,3(1,3;1,3)	<LOQ	ND	1,4(1,4;1,4)	<LOQ
MT62-22	4,1(3,9;4,2)	4,3(4,2;4,4)	<LOQ	ND	0,8(0,8;0,8)	0,2(0,2;0,2)
MT63-22	4,0(3,2;4,8)	3,1(3,0;3,2)	<LOQ	ND	0,8(0,8;0,8)	<LOQ
MT64-22	4,0(3,8;4,2)	1,6(1,6;1,6)	<LOQ	ND	0,8(0,8;0,8)	0,2(0,2;0,2)

Amostra	THC	THCA	CBD	CBDA	CBN	CBNA
MT65-21	3,9(3,9;3,9)	0,4(0,4;0,4)	<LOQ	ND	1,8(1,8;1,8)	<LOQ
MT66-22	3,9 (3,9;3,9)	1,0(1,0;1,0)	<LOQ	ND	1,1(1,1;1,1)	<LOQ
MT67-21	3,8(3,7;3,9)	0,2(0,2;0,2)	<LOQ	ND	0,7(0,7;0,7)	<LOQ
MT68-22	3,7(3,8;3,6)	0,8(0,6;1,2)	<LOQ	ND	1,0(1,0;1,0)	<LOQ
MT69-22	3,6 (3,6;3,6)	5,7(5,8;5,5)	<LOQ	<LOQ	0,7(0,7;0,7)	0,2(0,2;0,2)
MT70-21	3,6 (3,7;3,4)	1,9(1,9;1,9)	<LOQ	ND	0,9(0,9;0,9)	<LOQ
MT71-22	3,5(3,5;3,5)	5,6(5,5;5,7)	<LOQ	<LOQ	1,5(1,5;1,5)	0,3(0,3;0,3)
MT72-22	3,5(3,6;3,4)	7,3(7,1;7,5)	<LOQ	<LOQ	1,1(1,1;1,1)	0,4(0,4;0,4)
MT73-22	3,4(3,4;3,4)	4,2(4,2;4,2)	<LOQ	<LOQ	0,8(0,8;0,8)	0,2(0,2;0,2)
MT74-22	3,2 (3,2;3,2)	2,3(2,3;2,3)	<LOQ	ND	0,3(0,3;0,3)	<LOQ
MT75-22	3,1(3,0;3,2)	3,8(4,2;3,4)	<LOQ	<LOQ	0,3(0,3;0,3)	0,2(0,2;0,2)
MT76-22	3,0(3,2;2,8)	0,8(0,8;0,8)	<LOQ	<LOQ	1,4(1,4;1,4)	<LOQ
MT77-21	2,9(2,9;2,9)	1,5(1,5;1,5)	<LOQ	<LOQ	0,6(0,6;0,6)	<LOQ
MT78-22	2,7(2,7;2,7)	3,9 (4,0;3,8)	<LOQ	<LOQ	0,6(0,6;0,6)	0,2(0,2;0,2)
MT79-22	2,7(2,8;2,6)	2,1(2,1;2,1)	<LOQ	ND	0,7(0,7;0,7)	<LOQ
MT80-22	2,4(2,4;2,4)	5,2(5,0;5,4)	<LOQ	<LOQ	0,2(0,2;0,2)	<LOQ
MT81-22	2,3(2,3;2,3)	3,4(3,2;3,6)	<LOQ	ND	0,6(0,6;0,6)	0,2(0,2;0,2)
MT82-22	2,3(2,3;2,3)	3,4(3,2;3,4)	<LOQ	ND	0,5(0,5;0,5)	0,2(0,2;0,2)
MT83-22	2,0(2,0;2,0)	1,0(1,0;1,0)	<LOQ	<LOQ	0,8(0,8;0,8)	<LOQ
MT84-22	2,0(2,0;2,0)	2,7(2,6;2,8)	<LOQ	ND	0,4(0,4;0,4)	0,2(0,2;0,2)
MT85-22	1,8(1,7;1,9)	3,5(3,5;3,5)	<LOQ	<LOQ	0,6(0,6;0,6)	<LOQ
MT86-22	1,5(1,4;1,6)	2,6(2,6;2,6)	<LOQ	<LOQ	0,5(0,5;0,5)	<LOQ
MT87-21	1,4(1,4;1,4)	2,4(2,6;2,6)	<LOQ	ND	0,7(0,7;0,7)	<LOQ
MT88-21	1,1(1,0;1,1)	1,1(1,1;1,1)	<LOQ	<LOQ	0,8(0,8;0,8)	<LOQ
MT89-22	0,9 (0,9;0,9)	3,7(3,6;3,8)	<LOQ	<LOQ	0,5(0,5;0,5)	<LOQ
MT90-22	0,7 (0,7;0,7)	3,1(2,8;3,3)	<LOQ	<LOQ	0,4(0,4;0,4)	0,2(0,2;0,2)
MT91-22	0,6 (0,7;0,5)	1,1(1,1;1,1)	<LOQ	<LOQ	0,9(0,9;0,9)	<LOQ
MT92-22	0,3 (0,3;0,3)	4,5(3,9;5,1)	<LOQ	ND	0,5(0,5;0,5)	0,2(0,2;0,2)
MÉDIA^a	5,1	2,58	<LOQ	<LOQ	1,0	0,2(0,2;0,2)

^aMédia das amostras quantificadas (\geq LOQ);. O LOQ para canabinoides neutros (THC, CBD, CBN) é de 0,09%, enquanto para canabinoides ácidos (THCA, CBDA, CBNA) é de 0,18%. Não detectado(ND), Folhas (F), Folhas e inflorescências (FI), Inflorescências (IN), Raízes (R), Material prensado (MT)

VI. DISCUSSÃO

O método foi validado para análise de material vegetal e produtos oleosos à base de cannabis. É um método rápido por LC-MS/MS com tempo de corrida de 11 minutos e forneceu a separação cromatográfica de todos os analitos de interesse no estudo. Os métodos de análise de canabinoides disponíveis na literatura, que quantificam simultaneamente mais de três canabinoides, requeriam 11 minutos ou mais (MENG *et al.*, 2018, HSU *et al.*, 2021, GALANT *et al.*, 2022). Portanto, o curto tempo de execução do método validado irá melhorar a eficiência da rotina dos laboratórios que analisam cannabis para fins regulatórios.

Ao considerar os métodos de quantificação, a espectrometria de massas é sensível e seletiva, o que é ideal para monitorar muitos compostos que são semelhantes em estrutura e massa, como é o caso dos fitocanabinoides. No entanto, isso requer que as amostras sejam extensivamente diluídas antes da análise. Esse método pode quantificar canabinoides em níveis de 0,0002-20% (MCRAE e MELANSON, 2020), 0.05-35% (BERTHOLD *et al.*, 2020), 50-2500 ng/g (HSU *et al.*, 2018) e 0,01-5% (GALANT *et al.*, 2022). Outros sistemas de detecção, como UV ou DAD, não são tão sensíveis e seletivos, mas permitem que maiores concentrações de analitos sejam injetadas para análise, o que pode reduzir o tempo de preparação da amostra (WANG *et al.* 2016; CARVALHO *et al.* 2020;).

A fonte de ionização escolhida foi a por electrospray (ESI), operando no modo positivo para detecção dos compostos ácidos (THCA-A, CBDA e CBNA) e neutros (THC, CBD e CBN), como também descrito por outros autores (HSU *et al.*, 2021; MCRAE e MELANSON, 2020). Embora o modo de íon negativo seja o ideal para os canabinoides ácidos (CITTI *et al.*, 2017). Considerou-se também o fato de que seria necessário criar dois métodos diferentes, já que o equipamento utilizado no estudo não permite a troca de polaridade ao longo da corrida. Portanto, o modo positivo foi adotado

A curva de calibração para as duas matrizes foi realizada em solvente, uma vez que não foi verificado efeito de matriz nas diluições de $1/10^4$ para o material vegetal e $1/10$ para os óleos. Portanto a quantificação tanto do material vegetal quanto dos óleos pode ser feita em uma única corrida utilizando a mesma curva. O estudo realizado por Meng *et al* (2018) também não constatou nenhum efeito significativo de matriz para óleo e material vegetal, similar ao encontrado por Galant *et al* (2022) com diluição de $1/10^5$ vezes com óleo, ambos por LC-MS/MS.

A preparação de amostras foi feita em conformidade com o estudo de Wang *et al* (2018) que para alcançar um melhor sistema de solvente para extração com recuperação satisfatória testaram solventes, incluindo metanol, etanol e acetonitrila nos canabinoides CBDA, THCAA

e Δ^9 -THC em material vegetal. Além disso, analisaram as misturas de acetonitrila e metanol em diferentes proporções e concluíram que o melhor sistema de solvente de extração foi uma mistura de 80% de acetonitrila e 20% de metanol. Gul *et al.* (2018) também utilizaram os ACN e MeOH nas mesmas proporções para extrair canabinoides em amostras de raízes. Já em óleos, Galant *et al.* (2022) testaram diferentes solventes, volumes e tempos de extração para testar a eficiência da extração de 130 canabinoides em óleo e concluíram que aumentar o volume do extrator e estender o tempo de extração não teve efeito na recuperação da extração.

Amostras de material vegetal e óleos/haxixe à base de cannabis foram avaliadas com as condições validadas por LC-MS/MS. Com base na faixa de concentrações de canabinoides das várias amostras, os extratos de cannabis foram diluídos em $1/10^4$, $1/10^5$, enquanto as amostras de óleos/resinas foram diluídas em $1/10^3$, $1/10^4$ e $1/10^5$, com LOQs para canabinoides neutros entre 0,09 no material vegetal a 0,015% para óleos/resinas. Devido à alta concentração de canabinoides na matriz, não é viável adicionar padrões internos diretamente na matriz antes da extração devido ao alto custo desses padrões. Por isso, um método comum de quantificação é preparar curvas de calibração em solvente e diluir extratos de matriz dentro da faixa da curva de calibração (MCRAE e MELANSON, 2020).

No presente estudo 6 amostras de raízes foram analisadas, mas apenas uma amostra continha canabidiol em níveis quantificáveis (0,2% de CBN). Gul *et al.* (2018) quantificaram CBG, CBGA, CBD, CBDA, Δ^9 -THC, THCA-A, Δ^8 -THC, THCV, CBC e CBN (LOQ de 0,05 mg/kg, ou 0,000005%; LC-MS/MS) em todas as 12 amostras de raízes de cannabis, com teor de Δ^9 -THC que variou 0,25-2,37 mg/kg e 8,3-16,94 mg/kg de THCA-A. Conforme a UNODC (2022) o teor de THC total em raízes é $<0,03\%$, que se encontra abaixo do LOQ do presente trabalho (0,09%).

As amostras de material vegetal contêm mais precursores ácidos do que os óleos, já que na biomassa fresca, cerca de 95% dos canabinóides se encontram em suas respectivas formas ácidas. Já nos óleos são comumente encontradas as formas neutras, já que esses produtos passam por etapas que favorecem descarboxilação dos ácidos induzida pela luz/calor (TAURA *et al.*, 2007; THOMAS; ELSOHLY, 2016; PROTTI *et al.*, 2019, TAHIR *et al.*, 2021). Todas as amostras de folhas analisadas apresentaram teor de THCA > THC e CBDA > CBD, já nas inflorescências um terço apresentou a mesma proporção de ácidos em relação a neutros. Apenas uma amostra de inflorescência apresentou todos os canabinoides acima do LOQ e quase todas as amostras apresentaram CBNA acima do LOQ.

Os níveis de THC e seu ácido atingiram respectivamente seus valores máximos nas amostras de folhas de 1 e 2,8%, nas inflorescências de 18,7 e 28,8% e nas folhas/inflorescências de 4 e 2,8%.. Esses teores estão acima do que é encontrado na literatura, que segundo a UNODC (2022) o teor total máximo THC para folhas de até 2% e para inflorescência varia de 10-14%. Estudo realizado na Suíça (SGRM, 2022) revelou que apreensões de cannabis herbácea sem e com inflorescências estão abaixo de 10%. No entanto, conforme a Health Canada (2023), folhas e flores de material de ervas frescas ou plantas pode conter até 30% de THC total.

Meng *et al.* (2018) quantificaram 40 produtos à base de cannabis disponíveis no Canadá, incluindo óleos, materiais vegetais e cremes, dos quais 38 continham níveis de THC muito abaixo do limite legal canadense para produtos à base de cannabis (0,01%). Os produtos apresentaram uma ampla variedade de concentrações de CBD que variou de < 0.19 a 8,4 µg/g.

No presente estudo, dos 27 óleos analisados, apenas 4 estavam dentro do limite imposto pela legislação e 4 amostras apresentaram nível de CBD abaixo do LOQ. Os resultados das análises dos óleos revelaram que todas as amostras apresentaram teor de THC alcançando o máximo de 60,9% e CBD variou de 0,1-29,8%. Ainda conforme o conforme a Health Canada (2023), óleos de cannabis, haxixe e óleos de haxixe podem conter teor máximo total de THC de 3%, 60% e 90% respectivamente.

Em geral, os produtos à base de óleo tinham níveis mais altos de CBD e CBDA do que as amostras de material vegetal Galant *et al* (2022) verificaram que o conteúdo total de CBD em produtos de cannabis na forma de óleo foi consistente com os declarados no rótulo dos produtos (5-30%). O teor total de THC encontrado variou de 0,02% a 0,09%. Hsu *et al* (2021) analisaram 90 amostras de cosméticos contendo óleo de semente de cânhamo ou extrato de semente de cânhamo como ingrediente; 22 amostras continham THC em concentrações que variaram entre 0,063 e 1777µg/g e 11 amostras continham concentrações de THC acima do limite legal na maioria das regulamentações, como a do Canadá que é de 10 µg/g (0,001%). Trinta e quatro amostras continham CBD, variando entre 0,47 e 37,21 µg/g, e 5 amostras continham CBN, variando entre 2,22 e 25,17 µg/g. Não há um nível ou limite definido aceitável para o CBD em produtos de cannabis não medicinais. Embora mais estudos de segurança sejam necessários, o consenso é que o CBD não tem efeitos prejudiciais em seres humanos, apesar de ser listado como uma substância controlada em muitos países (MENG *et al.*, 2018).

Todos os materiais vegetais apresentaram CBN acima do LOQ, exceto as amostras de raízes, e apenas um terço apresentaram CBNA. Mais da metade das amostras de óleo apresentaram CBN, porém apenas duas amostras apresentaram a presença de CBNA. A

presença de CBN nessas amostras pode ser resultado da descarboxilação sofrida pelo seu precursor ácido ou pela oxidação do THC. O teor máximo de CBNA encontrado foi nas inflorescências com o teor de 1,5%, o que pode ter sido resultado da isomerização do THCA (CITTI *et al.*, 2017; CARVALHO *et al.*, 2020; UNODC, 2022). Conforme o estudo de Sarma *et al.* (2020), em amostras de inflorescência de cannabis, os níveis de CBNA são tipicamente baixos ou até mesmo não detectáveis.

VII. CONCLUSÃO

O rápido aumento na demanda pela análise de canabinoides em produtos à base de cannabis resultou na necessidade por métodos analíticos capazes de atender aos requisitos regulatórios atuais e serem adaptáveis a futuros requisitos. A análise de material vegetal também se faz necessária para o estudo dos quimiotipos da planta, já que será usada como matéria prima para diversos fins. A aplicação de equipamentos analíticos avançados, como o sistema LC-MS/MS, tornou possível a validação de um método para detectar e quantificar 6 canabinoides em duas diferentes matrizes em uma única análise cromatográfica de 11 minutos. Os baixos limites de quantificação e a ampla faixa de quantificação na matriz relatados neste trabalho (entre 0,015%-100% para óleos e entre 0,09%-60% para material vegetal) são possíveis graças às vantagens oferecidas pelo LC-MS/MS. O método demonstrou sensibilidade, especificidade e precisão durante a análise de amostras de cannabis e pode ser adaptado para faixas de concentração e outras matrizes conforme necessário. Esperamos que este método seja facilmente adaptado para matrizes mais desafiadoras, como cosméticos e produtos comestíveis.

O método validado foi aplicado com sucesso na análise de 27 produtos à base de cannabis e 114 amostras de material vegetal. O resultado do estudo concluiu que, dos 27 produtos (óleos e haxixes), 100% continham canabinoides acima do LOQ (4 apenas CBD/CBDA, 4 apenas THC/THCA, 19 ambos). Uma proporção elevada de produtos analisados continha THC que alcançou limite máximo de 60,9% e CBD de 29,8%. Nas amostras não havia rótulos, por isso não houve comparação de quantidades declaradas de canabinoides versus as quantidades reais descobertas. Em relação a legislação, 15% (4/27) das amostras apresentaram teor total de THC $\leq 0,2\%$, ou seja, estavam em conformidade com as exigências da Anvisa considerando aplicações médicas. Apesar de não haver, até presente estudo, um teor máximo legal de THC permitido para material vegetal, foi possível identificar que essas proporções variaram entre diferentes partes das plantas e no material vegetal prensado, o que pode ser explicado pelas diversas subespécies do gênero. O material vegetal apresentou maior proporção

de canabinoides ácidos do que os óleos, o que já era esperado. Os resultados do estudo enfatizaram a necessidade de quantificação de canabinoides em produtos à base de cannabis devido às variações nos perfis desses compostos entre produtos similares, dado o atual cenário regulatório diversificado e em rápida mudança em todo o mundo.

Por fim, é benéfico para fins científicos e de fabricação avaliar o THC, CBD e seus respectivos ácidos individualmente, uma vez que o THCA-A em si não possui efeitos neurológicos e a conversão para THC *in vivo* ainda não é bem compreendida (MENG *et al.*, 2018).

Trabalhos futuros deverão incluir não apenas pesquisas para abranger mais tipos de matrizes de produtos, mas também investigações mais aprofundadas sobre outros canabinoides potenciais em drogas, cosméticos e outras matrizes complexas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIZPURUA-OLAIZOLA, O.; OMAR, J.; NAVARRO, P.; OLIVARES, M.; ETXEBARRIA, N.; USOBIAGA, A. Identification and quantification of cannabinoids in *Cannabis sativa* L. plants by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, n. 29, p. 7549–7560, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8177-x>

AIZPURUA-OLAIZOLA, O.; SOYDANER, U.; ÖZTÜRK, E.; SCHIBANO, D.; SIMSIR, Y.; NAVARRO, P.; ETXEBARRIA, N.; USOBIAGA, A. Evolution of the Cannabinoid and Terpene Content during the Growth of *Cannabis sativa* Plants from Different Chemotypes. **Journal of Natural Products**, v. 79, p. 324–331, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00949>

AL UBEED, H. M. S.; BHUYAN, D. J.; ALSHERBINY, M. A.; BASU, A.; VUONG, Q. V. A Comprehensive Review on the Techniques for Extraction of Bioactive Compounds from Medicinal *Cannabis*. **Molecules**, v. 27, p. 1–18, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules27030604>

ANDRE, C. M.; HAUSMAN, J. F.; GUERRIERO, G. Cannabis sativa: The plant of the thousand and one molecules. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1–17, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00019>

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC N° 327, de 9 de dezembro de 2019**. Dispõe sobre os procedimentos para a concessão da Autorização Sanitária para a fabricação e a importação, bem como estabelece requisitos para a comercialização, prescrição, a dispensação, o monitoramento e a fiscalização de produtos de Cannabis para fins medicinais, e dá outras providências. Brasil: Diário Oficial da União, 2019.p. 1–26.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Registrado primeiro medicamento à base de Cannabis sativa**. 2022a. Disponível em: [https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2018/registrado-primeiro-medicamento-a-base-de-cannabis-sativa#:~:text=A%20Ag%C3%Aancia%20Nacional%20de%20Vigil%C3%A2ncia,farmac%C3%AAutica%20solu%C3%A7%C3%A3o%20oral%20\(spray\)](https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2018/registrado-primeiro-medicamento-a-base-de-cannabis-sativa#:~:text=A%20Ag%C3%Aancia%20Nacional%20de%20Vigil%C3%A2ncia,farmac%C3%AAutica%20solu%C3%A7%C3%A3o%20oral%20(spray).). Acesso em: 14 jun. 2023.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Anvisa aprova novo produto de Cannabis a ser fabricado no Brasil**. 2022b. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2022/anvisa-aprova-novo-produto-de-cannabis-a-ser-fabricado-no-brasil>. Acesso em: 22 abr. 2023.

APPENDINO, G.; CHIANESE, G.; TAGLIALATELA-SCAFATI, O. **Cannabinoids: Occurrence and Medicinal Chemistry Current Medicinal Chemistry**.

ARZIMANOGLU, A.; BRANDL, U.; CROSS, J. H.; GIL-NAGEL, A.; LAGAE, L.; LANDMARK, C. J.; SPECCHIO, N.; NABBOU, R.; THIELE, E. A.; GUBBAY, O. Epilepsy and cannabidiol: a guide to treatment. **Epileptic Disorders**, v. 22, n. 1, p. 1–14, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1684/epd.2020.1141>

ASHTON, C. H. Pharmacology and effects of cannabis: A brief review. **British Journal of Psychiatry**, v. 178, p. 101–106, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1192/bjp.178.2.101>

BALBINO, M. A. “**Estudo do comportamento eletroquímico do Δ 9-tetraidrocanabinol derivatizado com Fast Blue B**”. 2014. Tese - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/59/59138/tde-01122014-231252/publico/versaofinalteseMarcoBalbino.pdf>. Acesso em: 14 abr. 2023.

BARCACCIA, G.; PALUMBO, F.; SCARIOLO, F.; VANNOZZI, A.; BORIN, M.; BONA, S. Potentials and Challenges of Genomics for Breeding Cannabis Cultivars. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 1–19, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.573299>

BASTOS, F. I. P. M.; VASCONCELLOS, M. T. L.; BONI, R. B.; REIS, N. B.; COUTINHO, C. F. S. **III Levantamento nacional sobre o uso de drogas pela população brasileira**. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/34614>. Acesso em: 11 jun. 2023.

BERTHOLD, E. C.; YANG, R.; SHARMA, A.; KAMBLE, S. H.; KANUMURI, S. R.; KING, T. I.; POPA, R.; FREEMAN, J. H.; BRYM, Z. T.; AVERY, B. A.; MCCURDY, C. R. Regulatory sampling of industrial hemp plant samples (*Cannabis sativa* L.) using UPLC-MS/MS method for detection and quantification of twelve cannabinoids. **Journal of Cannabis Research**, v. 2, p. 1–11, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1186/s42238-020-00050-0>

BRASIL. **Portaria Nº 344, de 12 de maio de 1998**. Aprova o Regulamento Técnico sobre substâncias e medicamentos sujeitos a controle especial. Brasil: Diário Oficial da União, 1998. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs/1998/prt0344_12_05_1998_rep.html. Acesso em: 13 abr. 2023.

BRASIL. **Lei Nº 11.343, de 23 de agosto de 2006**. Institui o Sistema Nacional de Políticas Públicas sobre Drogas - Sisnad; prescreve medidas para prevenção do uso indevido, atenção e reinserção social de usuários e dependentes de drogas; estabelece normas para repressão à produção não autorizada e ao tráfico ilícito de drogas; define crimes e dá outras providências. Brasil: Diário Oficial da União, 2006. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2006/Lei/L11343.htm. Acesso em: 26 jun. 2020.

BRASIL. **Lei Nº 13.840, de 5 de junho de 2019**. Altera as Leis nos 11.343, de 23 de agosto de 2006, 7.560, de 19 de dezembro de 1986, 9.250, de 26 de dezembro de 1995, 9.532, de 10 de dezembro de 1997, 8.981, de 20 de janeiro de 1995, 8.315, de 23 de dezembro de 1991, 8.706, de 14 de setembro de 1993, 8.069, de 13 de julho de 1990, 9.394, de 20 de dezembro de 1996, e 9.503, de 23 de setembro de 1997, os Decretos-Lei nos 4.048, de 22 de janeiro de 1942, 8.621, de 10 de janeiro de 1946, e 5.452, de 1º de maio de 1943, para dispor sobre o Sistema Nacional de Políticas Públicas sobre Drogas e as condições de atenção aos usuários ou dependentes de drogas e para tratar do financiamento das políticas sobre drogas. Brasil: Diário Oficial da União, 2019. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2019/lei/113840.htm. Acesso em: 26 jun. 2020.

BROWN, A. K.; XIA, Z.; BULLOCH, P.; IDOWU, I.; FRANCISCO, O.; STETEFELD, J.; STOUT, J.; ZIMMER, J.; MARVIN, C.; LETCHER, R. J.; TOMY, G. Validated quantitative cannabis profiling for Canadian regulatory compliance - Cannabinoids, aflatoxins, and terpenes. **Analytica Chimica Acta**, v. 1088, p. 79–88, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.08.042>

CANADA. *Cannabis Act*. 2023a. Disponível em: <https://laws-lois.justice.gc.ca/PDF/C-24.5.pdf>. Acesso em: 11 jul. 2023.

CANADA. **About cannabis**. 2023b. Disponível em: <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/drugs-medication/cannabis/about.html>. Acesso em: 14 mar. 2023.

CARLINI, E. A. A história da maconha no Brasil. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 55, n. 4, p. 314–317, 2006. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/S0047-20852006000400008>

CARVALHO, V. M.; AGUIAR, A. F. L.; BARATTO, L. C.; SOUZA, F. L. C.; ROCHA, E. D. Quantificação de canabinoides em extratos medicinais de *Cannabis* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. **Química Nova**, v. 43, n. 1, p. 90–97, 2020. DOI: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170457>

CARVALHO, V. M.; BRITO, M. S.; GANDRA, M. Mães pela *Cannabis* medicinal em um Brasil aterrorizado entre luzes e fantasmas. **Fórum Sociológico**, n. 30, p. 57–66, 2017. DOI: <https://doi.org/10.4000/sociologico.1747>

CASIRAGHI, A.; RODA, G.; CASAGNI, E.; CRISTINA, C.; MUSAZZI, U. M.; FRANZÈ, S.; ROCCO, P.; GIULIANI, C.; FICO, G.; MINGHETTI, P.; GAMBARO, V. Extraction Method and Analysis of Cannabinoids in *Cannabis* Olive Oil Preparations. **Planta Medica**, v. 84, n. 4, p. 242–249, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1055/s-0043-123074>

CAUSANILLES, A.; BAZ-LOMBA, J. A.; BURGARD, D. A.; EMKE, E.; GONZÁLEZ-MARIÑO, I.; KRIZMAN-MATASIC, I.; LI, A.; LÖVE, A. S. C.; MCCALL, A. K.; MONTES, R.; van NUIJS, A. L. N.; ORT, C.; QUINTANA, J. B.; SENTA, I.; TERZIC, S.; HERNANDEZ, F.; de VOOGT, P.; BIJLSMA, L.. Improving wastewater-based epidemiology to estimate cannabis use: focus on the initial aspects of the analytical procedure. **Analytica Chimica Acta**, v. 988, p. 27–33, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.08.011>

CHRISTINAT, N.; SAVOY, M. C.; MOTTIER, P. Development, validation and application of a LC-MS/MS method for quantification of 15 cannabinoids in food. **Food Chemistry**, v. 318, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126469>

CITTI, C.; BATTISTI, U. M.; BRAGHIROLI, D.; CICCARELLA, G.; SCHMID, M.; VANDELLI, M. A.; CANNAZZA, G. A Metabolomic Approach Applied to a Liquid Chromatography Coupled to High-Resolution Tandem Mass Spectrometry Method (HPLC-ESI-HRMS/MS): Towards the Comprehensive Evaluation of the Chemical Composition of Cannabis Medicinal Extracts. **Phytochemical Analysis**, v. 29, n. 2, p. 144–155, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1002/pca.2722>

CROCQ, M.-A. History of *Cannabis* and the endocannabinoid system. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 22, n. 3, p. 223–228, 2020. DOI: <https://doi.org/10.31887/DCNS.2020.22.3/MCROCQ>

DE MEIJER, E. P. M.; HAMMOND, K. M.; SUTTON, A. The inheritance of chemical phenotype in *Cannabis sativa* L. (IV): Cannabinoid-free plants. **Euphytica**, v. 168, p. 95–112, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10681-009-9894-7>

EIHA. European Industrial Hemp Association. **Hemp cultivation & production in Europe**. 2018. Disponível em: <https://eiha.org/wp-content/uploads/2020/10/2018-Hemp-agri-report.pdf>. Acesso em: 14 maio. 2023.

ELSOHLY, M. A.; SLADE, D. Chemical constituents of marijuana: The complex mixture of natural cannabinoids. **Life Sciences**, v. 78, p. 539–548, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.09.011>

ELSOHLY, M. A.; MEHMEDIC, Z.; FOSTER, S.; GON, C.; CHANDRA, S.; CHURCH, J. C. Changes in *Cannabis* potency over the last two decades (1995-2014): Analysis of current data in the United States. **Biological Psychiatry**, v. 79, n. 7, p. 613–619, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2016.01.004>

ELSOHLY, M. A.; RADWAN, M. M.; GUL, W.; CHANDRA, S.; GALAL, A. Phytochemistry of *Cannabis sativa* L. In: KINGHORN, A. D.; FALK, H.; GIBBONS, S.; KOBAYASHI, J. (org.). **Phytocannabinoids: Unraveling the Complex Chemistry and Pharmacology of Cannabis sativa**. 2017, v. 103, p. 1–36. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-45541-9_1

EMCDDA. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. **Relatório Europeu sobre Drogas: Tendências e Evoluções**. Luxemburgo, 1-59, 2021. Disponível em: https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/13838/2021.2256_PT_03.pdf. Acesso em: 11 jul. 2023.

EUROPEAN UNION. **Commission Regulation (EU) 2022/1393 of 11 August 2022 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of delta-9-tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) in hemp seeds and products derived therefrom**. Official Journal of the European Union, 2022. Seção 1, p. 83–84. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/HTML/?uri=CELEX:32022R1393>. Acesso em: 11 jul. 2023.

FARINON, B.; MOLINARI, R.; COSTANTINI, L.; MERENDINO, N. The seed of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.): Nutritional quality and potential functionality for human health and nutrition. **Nutrients**, v. 12, p. 1–60, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu12071935>

FERNÁNDEZ, N.; CARRERAS, L. J.; LARCHER, R. A.; RIDOLFI, A. S.; QUIROGA, P. N. Quantification of Cannabinoids in *Cannabis* Oil Using GC/MS: Method Development, Validation, and Application to Commercially Available Preparations in Argentina. **Planta Medica International Open**, v. 7, p. 81–87, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1055/a-1155-6613>

FIORINI, D.; MOLLE, A.; NABISSI, M.; SANTINI, G.; BENELLI, G.; MAGGI, F. Valorizing industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) by-products: Cannabidiol enrichment in the inflorescence essential oil optimizing sample pre-treatment prior to distillation. **Industrial Crops and Products**, v. 128, p. 581–589, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.10.045>

GALANT, N.; CZARNY, J.; POWIERSKA-CZARNY, J.; PIOTROWSKA-CYPLIK, A. Development and Validation of the LC–MS/MS Method for Determination of 130 Natural and Synthetic Cannabinoids in *Cannabis* Oil. **Molecules**, v. 27, n. 23, p. 1–11, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules27238601>

GAONI, Y.; MECHOULAM, R. 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. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/ja01062a046>

GLOSS, D. An Overview of Products and Bias in Research. **Neurotherapeutics**, v. 12, p. 731–734, 2015. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s13311-015-0370-x>

GONÇALVES, J.; ROSADO, T.; SOARES, S.; SIMÃO, A. Y.; CAMELO, D.; LUÍS, Â.; FERNÁNDEZ, N.; BARROSO, M.; GALLARDO, E.; DUARTE, A. P. *Cannabis* and Its Secondary Metabolites: Their Use as Therapeutic Drugs, Toxicological Aspects, and Analytical Determination. **Medicines**, v. 6, p. 1–47, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/medicines6010031>

GROSS, J. H. **Mass Spectrometry: a textbook**. 3. ed. Springer Cham, 2017. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-319-54398-7>

GUL, W.; GUL, S. W.; CHANDRA, S.; LATA, H.; IBRAHIM, E. A.; ELSOHLY, M. A. Detection and Quantification of Cannabinoids in Extracts of *Cannabis sativa* Roots Using LC-MS/MS. **Planta Medica**, v. 84, n. 4, p. 267–271, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1055/s-0044-100798>

GÜLCK, T.; MØLLER, B. L. Phytocannabinoids: Origins and Biosynthesis. **Trends in Plant Science**, v. 25, n. 10, p. 985–1004, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.05.005>

HERODOTUS. **The History of Herodotus: book IV**. 2009. E-book. Disponível em: <http://classics.mit.edu/Herodotus/history.4.iv.html>. Acesso em: 26 jan. 2022.

HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. **Mass Spectrometry: Principles and Applications**. 3. ed. British Library, 2007.

HSU, Y.-H.; FANG, M.-C.; HUANG, S.-C.; KAO, Y.-M.; TSENG, S.-H.; WANG, D.-Y. Determination of cannabinoids in hemp oil based cosmetic products by LC-tandem MS. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 29, n. 3, p. 502–509, 2021. DOI: <https://doi.org/10.38212/2224-6614.3370>

IBRAHIM, E. A.; GUL, W.; GUL, S. W.; STAMPER, B. J.; HADAD, G. M.; SALAM, R. A. A.; IBRAHIM, A. K.; AHMED, S. A.; CHANDRA, S.; LATA, H.; RADWAN, M. M.; ELSOHLY, M. A. Determination of Acid and Neutral Cannabinoids in Extracts of Different Strains of *Cannabis sativa* Using GC-FID. **Planta Medica**, v. 84, n. 4, p. 250–259, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1055/s-0043-124088>

IRAKLI, M.; TSALIKI, E.; KALIVAS, A.; KLEISIARIS, F.; SARROU, E.; COOK, C. M. Effect of genotype and growing year on the nutritional, phytochemical, and antioxidant properties of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) seeds. **Antioxidants**, v. 8, p. 1–15, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox8100491>

JOHNSON, R. **Hemp as an Agricultural Commodity**. 2018. Disponível em: <https://sgp.fas.org/crs/misc/RL32725.pdf>. Acesso em: 11 jun. 2023.

KANDIAH, M.; URBAN, P. L. Advances in ultrasensitive mass spectrometry of organic molecules. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 12, p. 5299–5322, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1039/c3cs35389c>

KOSTIAINEN, R.; KAUPPILA, T. J. Effect of eluent on the ionization process in liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 685–699, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.08.095>

LANZ, C.; MATTSSON, J.; SOYDANER, U.; BRENNEISEN, R. Medicinal Cannabis: In Vitro Validation of Vaporizers for the Smoke-Free Inhalation of *Cannabis*. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147286>

LARANJEIRA, R. (org.); MADRUGA, C. S.; PINSKY, I.; CAETANO, R.; MITSUHIRO, S. S.; CASTELLO, G. **Segundo Levantamento Nacional de Álcool e Drogas**. São Paulo, 2012. Disponível em: <https://inpad.org.br/wp-content/uploads/2014/03/Lenad-II-Relat%C3%B3rio.pdf>. Acesso em: 10 jul. 2023.

MATSUDA, L. A.; LOLAIT, S. J.; BROWNSTEIN, M. J.; YOUNG, A. C.; BONNER, T. I. Structure of cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. **Nature**, v. 346, p. 561–564, 1990. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/346561a0>

MCPARTLAND, J. M. *Cannabis* Systematics at the Levels of Family, Genus, and Species. **Cannabis and Cannabinoid Research**, v. 3, n. 1, p. 203–212, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1089/can.2018.0039>

MCPARTLAND, J. M.; GUY, G. W.; HEGMAN, W. *Cannabis* is indigenous to Europe and cultivation began during the Copper or Bronze age: a probabilistic synthesis of fossil pollen studies. **Vegetation History and Archaeobotany**, v. 27, p. 635–648, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00334-018-0678-7>

MCRAE, G.; MELANSON, J. E. Quantitative determination and validation of 17 cannabinoids in *Cannabis* and hemp using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical**

and **Bioanalytical Chemistry**, v. 412, p. 7381–7393, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02862-8>

MECHOULAM, R.; FRIDE, E.; MARZO, V. Di. Endocannabinoids. **European Journal of Pharmacology**, v. 359, p. 1–18, 1998. DOI: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(98\)00649-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0014-2999(98)00649-9)

MENG, Q.; BUCHANAN, B.; ZUCCOLO, J.; POULIN, M. M.; GABRIELE, J.; BARANOWSKI, D. C. A reliable and validated LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of 4 cannabinoids in 40 consumer products. **PLoS ONE**, v. 13, n. 5, p. 1–16, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196396>

MICALIZZI, G.; VENTO, F.; ALIBRANDO, F.; DONNARUMMA, D.; DUGO, P.; MONDELLO, L. *Cannabis Sativa* L.: a comprehensive review on the analytical methodologies for cannabinoids and terpenes characterization. **Journal of Chromatography A**, v. 1637, p. 1–16, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461864>

MORENO-SANZ, G. Can You Pass the Acid Test? Critical Review and Novel Therapeutic Perspectives of Δ^9 -Tetrahydrocannabinolic Acid A. **Cannabis and Cannabinoid Research**, v. 1, n. 1, p. 124–130, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1089/can.2016.0008>

MORRISSEY, K. **The Global Cannabis Report: Growth & Trends Through 2025**. 2021. Disponível em: <https://newfrontierdata.com/global-cannabis/>. Acesso em: 14 mar. 2023.

MUKHERJEE, A.; ROY, S. C.; DE BERA, S.; JIANG, H. E.; LI, X.; LI, C. Sen; BERA, S. Results of molecular analysis of an archaeological hemp (*Cannabis sativa* L.) DNA sample from North West China. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 55, n. 4, p. 481–485, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10722-008-9343-9>

PACIFICO, D.; MISELLI, F.; CARBONI, A.; MOSCHELLA, A.; MANDOLINO, G. Time course of cannabinoid accumulation and chemotype development during the growth of *Cannabis sativa* L. **Euphytica**, v. 160, p. 231–240, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10681-007-9543-y>

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**. São Paulo: Cengage Learning, 2010. 716 p.

PELLATI, F.; BORGONETTI, V.; BRIGHENTI, V.; BIAGI, M.; BENVENUTI, S.; CORSI, L. *Cannabis sativa* L. and Nonpsychoactive Cannabinoids: Their Chemistry and Role against Oxidative Stress, Inflammation, and Cancer. **BioMed Research International**, p. 1–15, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1155/2018/1691428>

PENG, J.; FAN, M.; AN, C.; NI, F.; HUANG, W.; LUO, J. A narrative review of molecular mechanism and therapeutic effect of cannabidiol (CBD). **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 130, n. 4, p. 439–456, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1111/bcpt.13710>

PROTTI, M.; BRIGHENTI, V.; BATTAGLIA, M. R.; ANCESCHI, L.; PELLATI, F.; MERCOLINI, L. Cannabinoids from *Cannabis sativa* L.: A New Tool Based on HPLC-DAD-MS/MS for a Rational Use in Medicinal Chemistry. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 10, p. 539–544, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.8b00571>

PUTNAM, A.; STAFF, F. B. **Market trends and regulations for industrial hemp in the European Union.** Disponível em: https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/Report/DownloadReportByFileName?fileName=Market%20Trends%20and%20Regulations%20for%20Industrial%20Hemp%20in%20the%20European%20Union_Brussels%20USEU_European%20Union_E42022-0052.pdf. Acesso em: 11 jun. 2023.

RADWAN, M. M.; ELSOHLY, M. A.; EL-ALFY, A. T.; AHMED, S. A.; SLADE, D.; HUSNI, A. S.; MANLY, S. P.; WILSON, L.; SEALE, S.; CUTLER, S. J.; ROSS, S. A. Isolation and Pharmacological Evaluation of Minor Cannabinoids from High-Potency *Cannabis sativa*. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 6, p. 1271–1276, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00065>

REN, G.; ZHANG, X.; LI, Y.; RIDOUT, K.; SERRANO-SERRANO, M. L.; YANG, Y.; LIU, A.; RAVIKANTH, G.; NAWAZ, M. A.; MUMTAZ, A. S.; SALAMIN, N.; FUMAGALLI, L. Large-scale whole-genome resequencing unravels the domestication history of *Cannabis sativa*. **Science Advances**, v. 7, p. 1–12, 2021. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1126/sciadv.abg2286>

RUSSO, E. B. Taming THC: potential *Cannabis* synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. **British Journal of Pharmacology**, v. 163, p. 1344–1364, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01238.x>

SALAMONE, S.; WALTL, L.; POMPIGNAN, A.; GRASSI, G.; CHIANESE, G.; KOEBERLE, A.; POLLASTRO, F. Phytochemical Characterization of *Cannabis sativa* L. Chemotype V Reveals Three New Dihydrophenanthrenoids That Favorably Reprogram Lipid Mediator Biosynthesis in Macrophages. **Plants**, v. 11, p. 1–14, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants11162130>

SALENTIJN, E. M. J.; ZHANG, Q.; AMADUCCI, S.; YANG, M.; TRINDADE, L. M. New developments in fiber hemp (*Cannabis sativa* L.) breeding. **Industrial Crops and Products**, v. 68, p. 32–41, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.08.011>

SARMA, N. D.; WAYE, A.; ELSOHLY, M. A.; BROWN, P. N.; ELZINGA, S.; JOHNSON, H. E.; MARLES, R. J.; MELANSON, J. E.; RUSSO, E.; DEYTON, L.; HUDALLA, C.; VRDOLJAK, G. A.; WURZER, J. H.; KHAN, I. A.; KIM, N. C.; GIANCASPRO, G. I. *Cannabis* Inflorescence for Medical Purposes: USP Considerations for Quality Attributes. **Journal of Natural Products**, v. 83, p. 1334–1351, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01200>

SAWLER, J.; STOUT, J. M.; GARDNER, K. M.; HUDSON, D.; VIDMAR, J.; BUTLER, L.; PAGE, J. E.; MYLES, S. The genetic structure of marijuana and hemp. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. 1–9, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133292>

SENADO FEDERAL. **Projeto de Lei N° 89, de 2023**. Institui a Política Nacional de Fornecimento Gratuito de Medicamentos Formulados de Derivado Vegetal à Base de Canabidiol, em associação com outras substâncias canabinoides, incluindo o tetrahydrocannabinol, nas unidades de saúde públicas e privadas conveniadas ao Sistema Único de Saúde – SUS. 2023, p. 1–6. Disponível em: <https://legis.senado.leg.br/sdleg-getter/documento?dm=9251801&ts=1681737802431&disposition=inline>. Acesso em: 23 abr. 2023.

SGRM. Schweizerische Gesellschaft für Rechtsmedizin. **Statistik 2022 THC**. 2022. Disponível em: https://sgrm.ch/inhalte/Forensische-Chemie-und-Toxikologie/Fachgruppe_Chemie/Statistiken/THC/THC_Gehaltsstatistik_SGRM_2022.pdf. Acesso em: 11 jul. 2023.

SOUZA, D. Z.; MICHELIN, K.; HOLLER, M. G.; SOARES, G. L. G.; RITTER, M. R.; BIANCHI, N. R. Roteiro ilustrado para identificação morfológica da *Cannabis sativa* L. **Perícia Federal**, n. 24, p. 1–35, 2006. Disponível em: <https://apcf.org.br/wp-content/uploads/2020/06/24.pdf>

STANASZEK, R.; ZUBA, D. A comparison of developed and validated chromatographic methods (HPLC, GC-MS) for determinations of delta-9-tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) and delta-9-tetrahydrocannabinolic acid (Δ^9 -THCA-A) in hemp. **Problems of Forensic Sciences**, v. 71, p. 331–322, 2007. Disponível em: <https://ojp.gov/ncjrs/virtual-library/abstracts/comparison-developed-and-validated-chromatographic-methods-hplc-gc>. Acesso em: 10 maio. 2023.

TAHIR, M. N.; SHAHBAZI, F.; RONDEAU-GAGNÉ, S.; TRANT, J. F. The biosynthesis of the cannabinoids. **Journal of Cannabis Research**, v. 3, p. 1–12, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s42238-021-00062-4>

TAURA, F.; SIRIKANTARAMAS, S.; SHOYAMA, Y.; YOSHIKAI, K.; SHOYAMA, Y.; MORIMOTO, S. Cannabidiolic-acid synthase, the chemotype-determining enzyme in the fiber-type *Cannabis sativa*. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 581, p. 2929–2934, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.05.043>

THOMAS, B. F.; ELSOHLY, M. A. The Botany of *Cannabis sativa* L. In: **The Analytical Chemistry of Cannabis**. Elsevier, 2016. p. 1–26. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804646-3.00001-1>. Acesso em: 11 jul. 2023.

TROFIN, I. G.; VLAD, C. C.; NOJA, V. V.; DABIJA, G. Identification and characterization of special types of herbal cannabis. **UPB Scientific Bulletin, Series B: Chemistry and Materials Science**, v. 74, n. 1, p. 119–130, 2012. Disponível em: https://www.scientificbulletin.upb.ro/rev_docs_arhiva/full354_493232.pdf. Acesso em: 10 jun. 2023.

UNODC. United Nations Office on Drugs and Crime. **Recommended methods for the identification and analysis of cannabis and cannabis products: manual for use by national drug analysis laboratories**. New York: United Nations, 2009. Disponível em: https://www.unodc.org/documents/scientific/ST-NAR-40-Ebook_1.pdf. Acesso em: 11 maio. 2021.

UNODC. United Nations Office on Drugs and Crime. **World Drug Report 2021. Booklet 3 - Drug market trends: Opioids, Cannabis**. United Nations, 2021. Disponível em: https://www.unodc.org/unodc/en/data-and-analysis/wdr-2021_booklet-3.html. Acesso em: 11 jul. 2023.

UNODC, United Nations Office on Drugs and Crime **Recommended Methods for the Identification and Analysis of Cannabis and Cannabis products**. Vienna: 2022. Disponível em: <https://www.unodc.org/unodc/en/scientists/recommended-methods-for-the-identification-and-analysis-of-cannabis-and-cannabis-products.html>. Acesso em: 11 jul. 2023.

VAN BAKEL, H.; STOUT, J. M.; COTE, A. G.; TALLON, C. M.; SHARPE, A. G.; HUGHES, T. R.; PAGE, J. E. The draft genome and transcriptome of *Cannabis sativa*. **Genome Biology**, v. 12, p. 1–17, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-10-r102>

VERMA, R.; HODA, F.; ARSHAD, M.; IQUBAL, A.; SIDDIQUI, A. N.; KHAN, M. A.; HAQUE, S. E.; AKHTAR, M.; NAJMI, A. K. *Cannabis*, a Miracle Drug with Polyvalent Therapeutic Utility: Preclinical and Clinical-Based Evidence. **Medical Cannabis and Cannabinoids**, v. 4, p. 43–60, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1159/000515042>

VIGIL, J. M.; MONTERA, M. A.; PENTKOWSKI, N. S.; DIVIANT, J. P.; OROZCO, J.; ORTIZ, A. L.; RAEI, L. J.; WESTLUND, K. N. The therapeutic effectiveness of full spectrum hemp oil using a chronic neuropathic pain model. **Life**, v. 10, n. 5, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/life10050069>

VOLKOW, N. D. **Marijuana Research Report**. National Institute on Drug Abuse, 2020. Disponível em: <https://nida.nih.gov/download/1380/cannabis-marijuana-research-report.pdf?v=7fc7d24c3dc120a03cf26348876bc1e4>. Acesso em: 11 jun. 2023.

WANG, Y. H.; AVULA, B.; ELSOHLY, M. A.; RADWAN, M. M.; WANG, M.; WANAS, A. S.; MEHMEDIC, Z.; KHAN, I. A. Quantitative Determination of Δ^9 -THC, CBG, CBD, Their Acid Precursors and Five Other Neutral Cannabinoids by UHPLC-UV-MS. **Planta Medica**, v. 84, p. 260–266, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1055/s-0043-124873>

WEIBLEN, G. D.; WENGER, J. P.; CRAFT, K. J.; ELSOHLY, M. A.; MEHMEDIC, Z.; TREIBER, E. L.; MARKS, M. D. Gene duplication and divergence affecting drug content in *Cannabis sativa*. **New Phytologist**, v. 208, p. 1241–1250, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/nph.13562>

ŻUK-GOŁASZEWSKA, K.; GOŁASZEWSKI, J. *Cannabis sativa* L. – cultivation and quality of raw material. **Journal of Elementology**, v. 23, n. 3, p. 971–984, 2018. DOI: <https://doi.org/10.5601/jelem.2017.22.3.1500>