

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

CANABINOIDES: PERFIL QUALITATIVO EM AMOSTRAS APREENDIDAS E
AVALIAÇÃO DA FRAGMENTAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM
IONIZAÇÃO POR ELETROSPRAY

SABRINA LAÍZ BÜTTENBENDER

Porto Alegre

2020

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

CANABINOIDES: PERFIL QUALITATIVO EM AMOSTRAS APREENDIDAS E
AVALIAÇÃO DA FRAGMENTAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM
IONIZAÇÃO POR ELETROSPRAY

Dissertação apresentada por **Sabrina Laíz
Büttenbender** para obtenção do GRAU
DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Andreas Sebastian Loureiro Mendez
Coorientadora: Profa. Dra. Renata Pereira Limberger

Porto Alegre
2020

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 31 de março de 2020, pela Banca Examinadora constituída por:

Dra. Maíra Kerpel dos Santos
Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Forense

Profa. Dra. Miriam Anders Apel
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dra. Pâmela Cristina Lukasewicz Ferreira
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Büttenbender, Sabrina Laíz
Canabinoides: perfil qualitativo em amostras apreendidas e avaliação da fragmentação por espectrometria de massas com ionização por eletrospray / Sabrina Laíz Büttenbender. -- 2020.
107 f.
Orientador: Andreas Sebastian Loureiro Mendez.

Coorientadora: Renata Pereira Limberger.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. Cannabis sativa. 2. Canabinoides. 3. Cromatografia Líquida. 4. Espectrometria de Massas. I. Mendez, Andreas Sebastian Loureiro, orient. II. Limberger, Renata Pereira, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Análises e Pesquisa em Toxicologia e no Laboratório de Controle de Qualidade Farmacêutico da Faculdade de Farmácia, e na Unidade de Química de Proteínas e Espectrometria de Massas do Centro de Biotecnologia UFRGS. A autora recebeu bolsa de estudos do CNPq.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Andreas Sebastian Loureiro Mendez pela orientação ao longo destes dois anos, e pela confiança depositada em mim desde o início.

À Prof. Dra. Renata Pereira Limberger pela oportunidade de realizar meu trabalho na área forense, e pelos ensinamentos sempre valiosos.

Aos colegas de Labtoxico e de Pós-Graduação pelas trocas de conhecimento e experiências acadêmicas, pelos momentos de descontração e companheirismo, e pelos mais diferentes auxílios que facilitaram a realização desse trabalho.

Ao Anderson pela dedicação e auxílio nos estudos de quimiometria.

A todos professores e funcionários da Faculdade de Farmácia. À UFRGS, por ter possibilitado meu desenvolvimento profissional e humano.

A todos meus amigos pelos momentos felizes compartilhados e pela amizade que construímos. Às minhas amigas de longa data, obrigada por acompanharem minha trajetória até aqui. Em especial, agradeço à Lisi, com quem compartilhei ambições, angústias e felicidades durante essa jornada acadêmica; e ao Rodrigo, cujo incentivo foi fundamental para a realização dessa etapa.

E, finalmente, aos meus pais e aos meus irmãos, pelo acolhimento incondicional, e pela compreensão e apoio essenciais às minhas escolhas.

RESUMO

Os canabinoides são substâncias químicas encontradas exclusivamente na *Cannabis sativa* L. (canábis). Possuem grande relevância farmacológica e toxicológica, sendo a canábis e seus produtos derivados as drogas de abuso mais consumidas mundialmente. O procedimento adotado por órgãos periciais brasileiros para caracterização de amostras de canábis consiste na detecção de Δ^9 - tetraidrocanabinol (THC), o canabinoide ao qual são atribuídos os efeitos psicotomiméticos. Entretanto, a identificação de outros canabinoides fortalece a caracterização de amostras, além de possibilitar estudos sobre o perfil de drogas de apreensão, que podem ser aplicados com fins criminalísticos na investigação da origem e distribuição desses produtos. Nesse trabalho, foi realizada uma avaliação do perfil qualitativo de canabinoides presentes em material vegetal de amostras compartilhadas pela Polícia Federal Brasileira. As amostras eram provenientes de material compactado comercializado ilegalmente, operações de erradicação de plantações clandestinas e do cultivo *indoor* de sementes apreendidas. Para identificação simultânea de oito canabinoides majoritariamente presentes em amostras de canábis, foram desenvolvidos métodos de cromatografia líquida acoplada a espectroscopia no ultravioleta (HPLC-UV) e espectrometria de massas sequencial por injeção de fluxo (FIA-MS/MS). A composição das amostras avaliadas nas análises de HPLC-UV vai ao encontro das tendências descritas para drogas de abuso consumidas atualmente, sendo o THC o canabinoide mais presente. O perfil de fragmentação do THC e de outros canabinoides foi avaliado por FIA-MS/MS com ionização por eletrospray nos modos positivo e negativo (ESI(\pm)). Foi possível distinguir espécies isômeras de canabinoides aplicando ESI(-), devido a diferenças nos perfis de fragmentação. Adicionalmente, com auxílio de ferramentas quimiométricas, foram elaborados modelos de classificação de amostras a partir dos dados obtidos por FIA-ESI(-) MS/MS, que se mostraram aplicáveis para distinção dos diferentes tipos de amostras avaliadas.

Palavras-chave: Canábis, Canabinoides, Cromatografia Líquida, Espectrometria de Massas.

ABSTRACT

Cannabinoids are chemical substances found exclusively in *Cannabis sativa* L. They are of great pharmacological and toxicological relevance since cannabis and its derived products are the most widely consumed drugs of abuse in the world today. The detection of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), the cannabinoid to which psychotomimetic effects are attributed, is the procedure adopted by Brazilian forensics for the characterization of cannabis samples. However, the identification of other cannabinoids could lead to a more robust sample characterization and enable studies on seized drugs profile as well, which could be both applied for forensic purposes in the investigation of the origin and distribution of illegal cannabis. This work presents an evaluation of the qualitative profile of cannabinoids present in plant material from samples shared by the Brazilian Federal Police. The samples came from compacted material traded illegally, operations to eradicate clandestine plantations and indoor cultivation of seized seeds. Liquid chromatography coupled with ultraviolet spectroscopy (HPLC-UV) and flow injection analysis tandem mass spectrometry (FIA-MS/MS) methods were developed to simultaneously identification of eight major cannabinoids in cannabis samples. The cannabinoid profile evaluated in the HPLC-UV analyzes meets the trends described for this kind of drug, with THC being the most present cannabinoid. The mass fragmentation profile of THC and other cannabinoids were evaluated by FIA-MS/MS with electrospray ionization operating in positive and negative modes (ESI(\pm)). It was possible to distinguish isomeric cannabinoids by applying ESI(-) due to differences in fragmentation profiles. Additionally, using chemometric tools, sample classification models were elaborated from the data obtained by FIA-ESI(-) MS/MS, which proved to be suitable to distinguish the different types of samples evaluated.

Keywords: Cannabis, Cannabinoids, Liquid Chromatography, Mass Spectrometry.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Prevalência de consumo de substâncias ilícitas entre brasileiros de 12 a 65 anos, por tipo de substância. | 28 |
| Figura 2. Estrutura química de canabinoides. | 29 |
| Figura 3. Quantidades de maconha apreendidas, em toneladas, de 1995 a 2018. | 34 |
| Figura 4. Esquema das principais etapas de um espectrômetro de massas. | 39 |
| Figura 5. Espectros de absorção dos canabinoides, medidos em soluções metanólicas a 20 µg/mL, entre 200 e 400 nm. | 47 |
| Figura 6. Esquema ilustrativo do gradiente definido para o método de separação de canabinoides por cromatografia líquida..... | 48 |
| Figura 7. Cromatograma de solução de padrões de canabinoides a 20 µg/mL obtido durante desenvolvimento de método por HPLC-UV, com correção da linha de base... | 49 |
| Figura 8. Frequência de identificação dos canabinoides nas amostras. | 53 |
| Figura 9. Diagrama ilustrativo da quantidade de amostras do grupo M contendo CBN, THC e THCA. | 54 |
| Figure 10. Representative scheme of the main cannabinoids of each subclass. | 63 |
| Figure 11. CBG standard solution FIA-ESI(±) MS experiments. (A) ESI(-) TIC; (B) ESI(-) combined MS spectra; (C) ESI(+) TIC; (D) ESI(+) combined MS spectra. | 68 |
| Figure 12. Combined spectra of FIA-ESI(+) MS/MS experiments. (A) CBGA; (B) CBDA; (C) THCA; (D) CBN. | 70 |
| Figure 13. Combined spectra of FIA-ESI(+) MS/MS experiments. (A) CBG; (B) CBD; (C) THC; (D) Δ ⁸ -THC..... | 71 |
| Figure 14. Combined spectra of FIA-ESI(-) MS/MS experiments. (A) CBG; (B) CBGA. | 72 |
| Figure 15. Combined spectra of FIA-ESI(-) MS/MS experiments. (A) CBD; (B) THC; (C) Δ ⁸ -THC. | 73 |
| Figure 16. Combined spectra of FIA-ESI(-) MS/MS experiments. (A) CBDA; (B) THCA. | 74 |
| Figure 17. Combined spectra of CBN by FIA-ESI(-) MS/MS. | 75 |
| Figure 18. Exploratory analyses obtained from FIA-ESI(-) MS/MS results of isolated and mixed cannabinoid standards..... | 76 |
| Figure 19. FIA-ESI(-) MS/MS spectra of precursor ions in sample T1. (A) m/z 315; (B) m/z 313; (C) m/z 357; (D) m/z 309; (E) m/z 359..... | 77 |

| | |
|--|----|
| Figure 20. FIA-ESI(-) MS/MS spectra of precursor ions in sample T2. (A) m/z 315; (B) m/z 313; (C) m/z 357; (D) m/z 309; (E) m/z 359..... | 78 |
| Figure 21. FIA-ESI(-) MS/MS spectra of precursor ions in sample T3. (A) m/z 315; (B) m/z 313; (C) m/z 357; (D) m/z 309; (E) m/z 359..... | 79 |
| Figure 22. FIA-ESI(-) MS/MS spectra of precursor ions in sample T4. (A) m/z 315; (B) m/z 313; (C) m/z 357; (D) m/z 309; (E) m/z 359..... | 80 |
| Figure 23. FIA-ESI(-) MS/MS spectra of precursor ions in sample T5. (A) m/z 315; (B) m/z 313; (C) m/z 357; (D) m/z 309; (E) m/z 359..... | 81 |
| Figure 24. Sample prediction (PLS-DA). | 84 |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 17 |
| 2 OBJETIVOS | 21 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL..... | 23 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 23 |
| 3 REVISÃO DE LITERATURA | 25 |
| 3.1 <i>CANNABIS SATIVA</i> LINNAEUS..... | 27 |
| 3.2 REGULAMENTAÇÃO DO USO TERAPÊUTICO E RECREATIVO | 31 |
| 3.2.1 <i>Legislação brasileira</i> | 32 |
| 3.3 ANÁLISES QUÍMICAS DA PLANTA E SEUS DERIVADOS..... | 34 |
| 3.3.1 MS APLICADA A CANABINOIDES | 39 |
| 4 CAPÍTULO I. PERFIL QUALITATIVO DE CANABINOIDES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFECIÊNCIA | 41 |
| 4.1 INTRODUÇÃO..... | 43 |
| 4.2 MATERIAIS E MÉTODOS | 44 |
| 4.2.1 <i>Padrões e amostras</i> | 44 |
| 4.2.2 <i>Metodologia</i> | 44 |
| 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 46 |
| 4.3.1 <i>Otimização do método</i> | 46 |
| 4.3.2 <i>Análise simultânea de canabinoides nas amostras</i> | 50 |
| 4.4 CONCLUSÕES | 54 |
| 5 CAPÍTULO II. FRAGMENTATION OF CANNABINOIDS BY FLOW INJECTION ANALYSIS TANDEM MASS SPECTROMETRY | 57 |
| 5.1 MANUSCRITO | 59 |
| 6 DISCUSSÃO GERAL | 89 |
| 7 CONCLUSÕES | 95 |
| 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 99 |

A canábis (*Cannabis sativa* Linnaeus) é a planta que dá origem a uma série de preparações, como a maconha, feita a partir das suas partes aéreas secas e prensadas, e o haxixe, uma resina concentrada, de consumo predominante no Oriente Médio e Sudeste Asiático. É uma planta muito controversa, cujo uso é historicamente relatado em diversas regiões do mundo para fornecer fibras para fiação, tecelagem, papel, sementes para alimentação humana, em rituais religiosos e como remédio para tratamento de diferentes patologias (HARTSEL et al., 2016).

Os chineses foram os primeiros a consumir canábis com fins medicinais, por volta de 2700 a.C., para alívio de dor, espasmos musculares, convulsões, epilepsia, asma e reumatismo, sendo que existem evidências do uso terapêutico de canábis também entre assírios, citas, indianos, persas e egípcios (HUESTIS, 2002; ZUARDI, 2006). Por volta de 800 d.C. foi introduzida na Europa Ocidental, de onde foi levada ao continente americano pelos colonizadores (PAIN, 2015; PERTWEE, 2014). A partir da segunda metade do século XX, o consumo de canábis com fins recreativos se disseminou entre os jovens. Tornou-se uma droga de abuso com grande importância na cultura ocidental devido a suas propriedades de alteração de humor, e é atualmente a droga psicotrópica mais difundida no mundo (UNODC, 2019).

A canábis é classificada como droga perturbadora do sistema nervoso central (SNC), apesar de possuir ação depressora em altas doses. Esses efeitos perturbadores são atribuídos predominantemente ao Δ^9 -tetraidrocanabinol (THC), principal substância relacionada aos efeitos psicoativos de canábis. Mesmo com a movimentação atual em torno da regulamentação do uso terapêutico de canábis em alguns locais, o uso recreativo é proibido na maioria dos países – o que não impede que ocorram significativos avanços no mercado ilegal.

Em relação ao cultivo da planta, observa-se um aumento na potência (teor de THC) da canábis nas últimas décadas, através da utilização de linhagens geneticamente selecionadas para este fim, ou pela produção exclusiva de plantas femininas, que acumulam mais metabólitos quando não fertilizadas (MEHMEDIC et al., 2010). Isso aumenta o potencial de causar dependência da canábis consumida atualmente, que é capaz de causar euforia, transtornos psicológicos, síndrome de abstinência e tolerância (HUESTIS, 2002; SOLYMOSI; KOFALVI, 2017).

Apesar de os efeitos psicoativos estarem relacionados aos canabinoides, há centenas de outros compostos já identificados na canábis, entre alcanos, açúcares, compostos nitrogenados, ácidos graxos, flavonoides, fenilpropanoides, esteroides e

terpenos. Os canabinoides são terpenofenóis encontrados exclusivamente na *Cannabis*, chamados também de fitocanabinoides para diferenciação entre os ligantes de receptores de canabinoides endógenos (anandamida e 2-araquidonoilglicerol), e dos canabinoides sintéticos, como nabilona e dexabinol (HANUŠ et al., 2016; SOLYMOSI; KOFALVI, 2017).

Os fitocanabinoides são biossintetizados como ácidos, e por descarboxilação não enzimática são produzidas formas neutras. Dessa forma, o precursor do THC é o ácido tetrahydrocannabinólico (THCA), que por ação do calor perde sua carboxila e dá origem ao canabinoide neutro THC. Por sua vez, o THC pode ser degradado a canabinol (CBN) na presença de oxigênio, ou, quando exposto ao calor, convertido a seu isômero Δ^8 -tetrahydrocannabinol (Δ^8 -THC), considerado mais estável termodinamicamente (HARTSEL et al., 2016). Portanto, não é somente o THC que está relacionado à potência da canábis, sendo que os compostos relacionados à sua origem e degradação também devem ser considerados.

Atualmente, o procedimento adotado pela Polícia Federal Brasileira (PFB) para caracterização de canábis (em amostras de apreensão como maconha e haxixe) é por testes de detecção de THC (BORILLE et al., 2017a). No entanto, a presença de outros canabinoides fortalece essa caracterização, e uma identificação química mais abrangente possibilitaria a identificação de perfis químicos que podem ser utilizados em estudos criminalísticos para determinar a origem e padrões de distribuição de drogas.

No que diz respeito às análises químicas para identificação e/ou quantificação de canabinoides em material vegetal, diversas metodologias podem ser aplicadas. Testes colorimétricos e imunoensaaios são usados como métodos presuntivos, e a cromatografia em camada delgada é extensivamente aplicada para análises preliminares. Em um manual editado pela *United Nations Office on Drugs and Crime* (UNODC) em 2009 com métodos recomendados para análises confirmatórias, constam técnicas validadas de cromatografia em fase gasosa (GC) e líquida (LC) para identificação de canábis e seus produtos.

Para a quantificação individual de canabinoides ácidos e neutros por GC, é preciso realizar uma derivatização prévia, com o objetivo de impedir a conversão de THCA a THC, devido às altas temperaturas inerentes a essa técnica. Já por LC, a determinação real de espécies neutras e ácidas de canabinoides pode ser realizada diretamente, pois é realizada à temperatura ambiente. Atualmente, as metodologias por LC buscam caracterizar as amostras de forma ampla, avaliando uma maior diversidade de

canabinoides. Para isso, podem ser acoplados detectores de espectroscopia no ultravioleta (UV), que apresentam alta robustez e bons resultados, e estão comumente presentes em laboratórios de análises químicas. Também podem ser acoplados detectores de espectrometria de massas (MS), que são universais e apresentam grandes sensibilidade e especificidade (CLARKE, 2017).

Tendo em vista o cenário atual da planta e seus produtos, este trabalho integra uma pesquisa continuada acerca do perfil químico de amostras de canábis apreendidas pela PFB. Em nosso grupo de pesquisa temos um conjunto diversificado de trabalhos envolvendo análises químicas de *Cannabis*. Já foram publicados estudos realizados a partir do cultivo de sementes apreendidas, utilizando GC (MARIOTTI et al., 2016), espectroscopia no infravermelho próximo (BORILLE et al., 2017b) e espectrometria de massas por ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier (FR-ICR MS) (BORILLE et al., 2017a); além de uma revisão acerca dos métodos de análise de planta (BORILLE et al., 2017c). Também estão em andamento trabalhos com métodos bioanalíticos para monitoramento do uso de canábis por condutores a partir de amostras de sangue total e fluido oral; métodos farmacopeicos para caracterização e controle de qualidade da planta e de produtos derivados; e um estudo envolvendo os diluentes adicionados às preparações de maconha apreendidas.

Neste trabalho, será apresentada uma avaliação do perfil qualitativo de canabinoides presentes em material vegetal a partir do desenvolvimento de metodologias analíticas de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectroscopia no ultravioleta (HPLC-UV) e espectrometria de massas sequencial por injeção de fluxo (FIA-MS/MS) para identificação simultânea de oito canabinoides.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar padrões de canabinoides e amostras de material vegetal de canábis apreendidas pela Polícia Federal Brasileira (PFB) por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectroscopia no ultravioleta (HPLC-UV) e espectrometria de massas sequencial por injeção de fluxo (FIA-MS/MS).

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver método de HPLC-UV para identificação de canabinoides em material vegetal;
- Aplicar o método desenvolvido para avaliação da composição de amostras de materiais vegetais de canábis apreendidos em diferentes locais pela PFB;
- Avaliar o perfil de fragmentação de padrões de canabinoides por FIA-MS/MS com ionização por eletrospray em modo positivo e negativo (ESI(\pm));
- Desenvolver ferramentas quimiométricas para diferenciação e classificação de amostras de canábis analisadas por FIA-MS/MS.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 *Cannabis sativa* Linnaeus

A *Cannabis sativa* L. é uma planta produzida historicamente para fornecer fibras para fiação, tecelagem, papel, sementes para alimentação humana e resinas aromáticas, contendo compostos de interesse recreativo e medicinal (HARTSEL et al., 2016). Pertencente à família Cannabaceae, é considerada, apesar de controvérsias a respeito da taxonomia (LAURSEN, 2015), a única espécie do gênero *Cannabis* e possui a seguinte classificação botânica (ITIS, 2020; USDA, 2019):

Reino: Plantae (planta)

Subreino: Tracheobionta (planta vascular)

Subdivisão: Spermatophyta (planta com sementes)

Divisão: Magnoliophyta (planta com flores)

Classe: Magnoliopsida (dicotiledônea)

Subclasse: Hamamelididae

Ordem: Urticales

Família: Cannabaceae

Gênero: *Cannabis* L.

Espécie: *Cannabis sativa* L.

Subespécies: *Cannabis sativa* ssp. *indica*

Cannabis sativa ssp. *sativa*

Variedades: *Cannabis sativa* var. *sativa*

Cannabis sativa var. *spontanea*

A canábis tem sido utilizada em diferentes regiões do mundo com fins recreativos ou terapêuticos. Apesar disso, é considerada a planta mais controversa da sociedade, sendo que a canábis é a droga ilícita mais suscetível de ser consumida em todas as faixas etárias (OEDT, 2018). O número total de usuários é de aproximadamente 188 milhões, considerando que aproximadamente 3,8% da população global entre 15 e 64 anos usou canábis pelo menos uma vez em 2017 (UNODC, 2019).

Dados do III Levantamento Nacional sobre o Uso de Drogas pela População Brasileira (III LNUD) estimam que 7,7% de brasileiros de 12 a 65 anos já consumiram alguma forma de canábis na vida (BASTOS et al., 2017) (Figura 1). Comparativamente às estimativas mundiais, a prevalência no uso de canábis na vida o Brasil é similar à de

países como Hungria (7,4%) e Bulgária (8,3%) (OEDT, 2018), que não tiveram mudanças recentes em suas legislações sobre uso terapêutico e/ou recreativo de canábis.

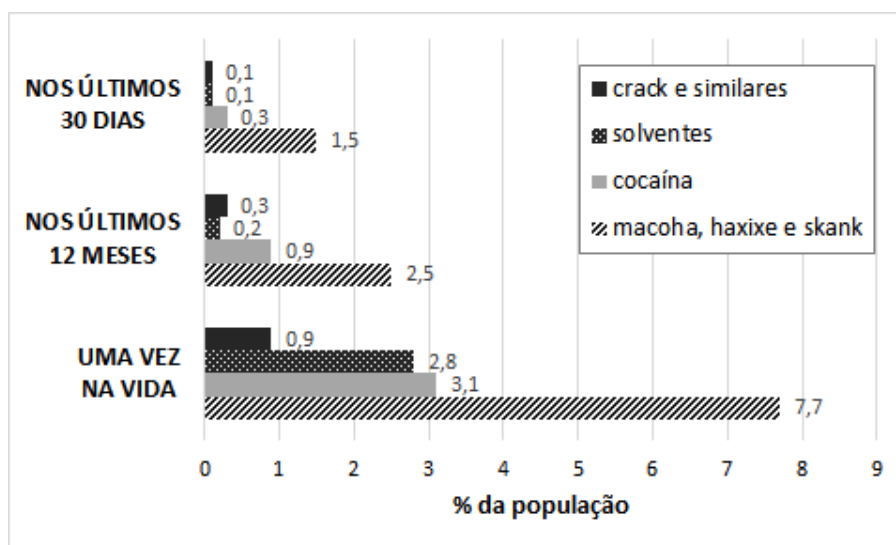


Figura 1. Prevalência de consumo de substâncias ilícitas entre brasileiros de 12 a 65 anos, por tipo de substância (BASTOS et al., 2017).

O III LNUD traz também que a estimativa de consumo de canábis nos últimos 30 dias para a população de 12 a 65 anos do Brasil foi de 1,5% (BASTOS et al., 2017), que corresponde a aproximadamente 2,2 milhões de indivíduos, número pelo menos cinco vezes maior do que para qualquer outra substância ilícita (Figura 1). Esta estimativa é similar, por exemplo, à da Romênia (1,4%) e da Letônia (1,6%) (OEDT, 2018); e inferior aos valores estimados para outros países europeus e para os Estados Unidos (10,1%) (SAMHSA, 2019).

Dentre os diferentes metabólitos já identificados na planta, mais de uma centena destes são classificados como canabinoides, que são substâncias de relevância toxicológica encontrada exclusivamente na *Cannabis* (BORILLE et al., 2017c). Estes compostos também são chamados de fitocanabinoides, para diferenciar dos endocanabinoides (anandamida e 2-araquidonoilglicerol), que ocorrem naturalmente no corpo.

Os fitocanabinoides são metabólitos secundários, constituídos por terpenofenóis de 21 átomos de carbono, e seus respectivos ácidos carboxílicos, análogos e possíveis produtos de transformação (HONÓRIO; ARROIO; DA SILVA, 2006). Eles podem ser divididos em ácidos e neutros, sendo estes últimos o resultado natural da descarboxilação dos canabinoides ácidos. Apesar de comumente serem detectados em análises e possuírem relevância farmacológica e toxicológica, as formas neutras não são

biosintetizadas pela planta, sendo resultado da ação do calor sobre suas formas ácidas (HARTSEL et al., 2016).

A Figura 2 apresenta as estruturas de canabinoides comumente encontrados na planta e seus derivados. O ácido canabigerólico (CBGA) é o bioprecursor de outros canabinoides ácidos na planta (ELSOHLY, 2007), como o THCA e o ácido canabidiólico (CBDA). Esses dão origem às suas respectivas formas neutras, canabigerol (CBG), THC, e canabidiol (CBD). A partir do THC podem ser formados Δ^8 -THC e CBN, produtos da isomerização ou da degradação por oxidação, respectivamente (HANUŠ et al., 2016; HARTSEL et al., 2016). Todos esses canabinoides apresentam uma cadeia lateral *n*-pentil ligada ao anel aromático, mas existem análogos com cadeias *n*-propil, identificados pelo sufixo varina, como Δ^9 -tetrahydrocanabivarina (THCV) e canabidivarina (CBDV).

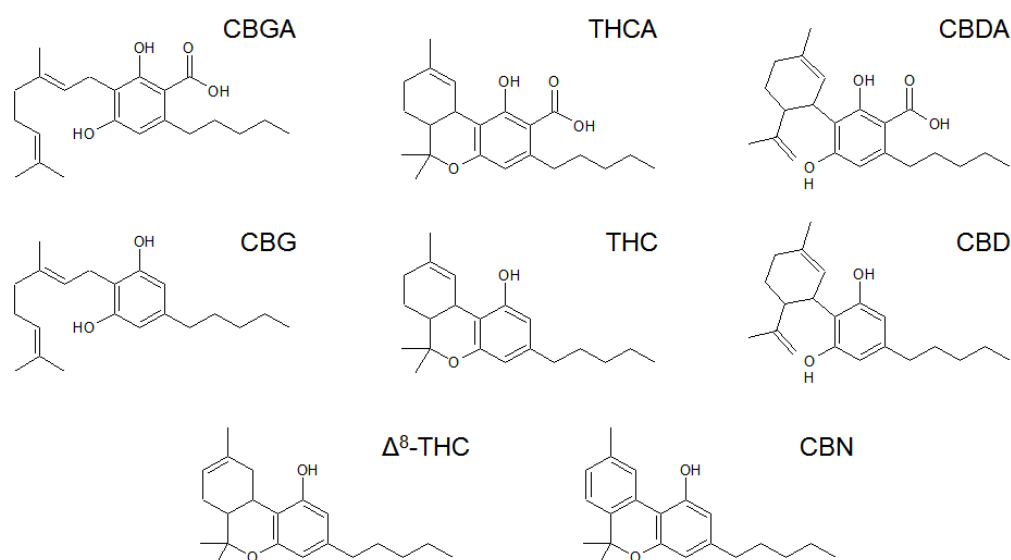


Figura 2. Estrutura química de canabinoides: ácido canabigerólico (CBGA); canabigerol (CBG); ácido canabidiólico (CBDA); canabidiol (CBD); ácido tetrahydrocannabinólico (THCA); Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC); Δ^8 -tetrahydrocannabinol (Δ^8 -THC); canabinol (CBN).

Diferentes produtos podem ser preparados a partir do material vegetal. O principal é a maconha, encontrada em quase todos os países. É constituída por material compactado de diferentes partes da planta secas, sendo geralmente fumada em cigarros artesanais de papel de seda ou em cachimbos, com rápido início de ação (MEHMEDIC et al., 2010; NIDA, 2020). Já a resina concentrada que é extraída das inflorescências da planta, conhecida como haxixe, é produzida principalmente em alguns países do norte da África, no Oriente Médio e no Sudeste Asiático (UNODC, 2019). A partir da resina ou do material vegetal, pode-se obter o extrato líquido de cânabis através de extração com solvente orgânico. O solvente é posteriormente evaporado, resultando em um produto

de consistência oleosa, utilizado tanto para fins recreativos quanto medicinais (BORILLE, 2016; UNODC, 2009). Ainda, a fim de evitar a inalação de fumaça, alguns usuários utilizam vaporizadores, que são dispositivos que convertem em vapor o extrato líquido ou a droga vegetal (NIDA, 2020).

Nas últimas décadas, houve um avanço significativo nas técnicas de cultivo de canábis, inclusive no plantio doméstico (*indoor*), com condições de crescimento controladas. Podem ser utilizadas linhagens geneticamente selecionadas, com aumento dos rendimentos das colheitas, como o *skunk*, que são plantas híbridas derivadas do cruzamento entre as subespécies *Cannabis sativa* ssp. *indica* e *Cannabis sativa* ssp. *sativa*. As condições de cultivo desse híbrido tornam o ciclo de crescimento da planta mais rápido e aumentam a potência (teor de THC). O cultivo selecionado e a domesticação também resultaram na seleção de variedades que, além de teores cada vez mais altos de THC, contêm níveis mais baixos de CBD (MUDGE; MURCH; BROWN, 2018; UNODC, 2019).

O principal canabinoide psicoativo é o THC, sendo o CBD capaz de modular os seus efeitos (ELSOHLY, 2007; HUESTIS, 2002). A partir do uso de canábis, os fitocannabinoides ultrapassam a barreira hematoencefálica, podendo então se ligar aos receptores canabinoides do SNC. Embora haja indicativo da existência de outros subtipos de receptores canabinoides, são bem descritos os receptores CB₁ (centrais) e CB₂ (periféricos) (GROTENHERMEN, 2003; HUESTIS, 2002). O THC possui afinidade pelos receptores CB₁, encontrados em abundância no hipocampo, cerebelo, substância nigra, nas vias dopaminérgicas mesolímbicas e córtex, que são responsáveis, entre outros, pela cognição, aprendizagem, memória, equilíbrio e coordenação motora.

Em relação ao uso terapêutico, o THC tem sido usado em casos de anorexia associado à perda de peso em pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida, para manejo de náusea e vômito relacionados à quimioterapia e em casos de dor crônica e espasticidade, como em dor neuropática e esclerose múltipla (HAZEKAMP; GROTENHERMEN, 2010; KOWAL; HAZEKAMP; GROTENHERMEN, 2016). Mas quando usado de forma indiscriminada por pessoas saudáveis, o THC pode induzir sintomas psicóticos e ansiedade, além de debilitar a memória e o controle psicomotor (PERTWEE, 2014; SOLYMOSI; KOFALVI, 2017). Em contrapartida, ao CBD tem sido atribuída propriedade de reduzir a ansiedade e outros efeitos indesejáveis produzidos pelo THC quando coadministrados em mesmas proporções (ELSOHLY, 2007; HUESTIS, 2002). Contudo, as plantas que produzem altas concentrações de THC, em geral,

possuem pouco CBD (UNODC, 2019), provavelmente por possuírem rota biossintética concorrente no metabolismo da planta.

O uso crônico, a associação a outras drogas como o álcool e cocaína e a elevação do teor de THC nos produtos de uso recreativo podem levar a efeitos semelhantes aos observados em alucinógenos, além de ansiedade, confusão, paranoia, alucinação, delírio, pânico, despersonalização, comportamento agressivo e psicose tóxica (D'SOUZA et al., 2005; DI FORTI et al., 2019; HUESTIS, 2002; MORGAN et al., 2010). Assim, a incidência de transtornos psicóticos em usuários frequentes pode ter implicações importantes na saúde pública, podendo induzir a sérios problemas sociais, tanto nos locais onde o uso é proibido quanto naqueles em que o uso é descriminalizado ou até mesmo legalizado.

3.2 Regulamentação do uso terapêutico e recreativo

Por milhares de anos a canábis foi considerada uma planta de variado uso medicinal, mas no século XX seu uso e cultivo foram banidos na maioria dos países. Em 1925, quando o uso recreativo era restrito a pequenos grupos, a Liga das Nações incluiu a canábis como droga proibida, obrigando os países signatários do tratado a controlar seu comércio (PAIN, 2015). A partir da segunda metade do século, o uso de maconha se disseminou entre os jovens, com grande importância social na cultura ocidental (ZUARDI, 2006).

Os primeiros estudos com fitocanabinoides ocorreram na década de 1960, sendo que na década de 1980 se iniciaram os pesquisas acerca do sistema endocanabinoide a partir da descoberta dos receptores CB₁ cerebrais, estimulando mais estudos sobre o potencial terapêutico da canábis e substâncias relacionadas (PAIN, 2015). Desde o fim da década de 1990, o uso medicinal de canábis tem recebido grande atenção e diversos países têm modificado a legislação a respeito, mesmo com certa carência de estudos clínicos para algumas indicações terapêuticas (KOWAL; HAZEKAMP; GROTENHERMEN, 2016).

O uso recreativo ainda é proibido na maioria dos países, ainda que em alguns estão sendo adotadas políticas de descriminalização. Recentemente, alguns países estão permitindo o uso não medicinal de canábis: o Uruguai em 2013, algumas jurisdições dos Estados Unidos, a partir de 2014, e Canadá (CANADA, 2018), África do Sul (BBC, 2018) e Geórgia (RFE/RL, 2018) em 2018. A legalidade do comércio de

canábis é variável nestes locais, sendo que em outros países onde ainda é considerada ilegal, como Holanda e Espanha, a venda é tolerada em determinadas circunstâncias (KOWAL; HAZEKAMP; GROTENHERMEN, 2016).

Ainda é cedo para avaliar o impacto de muitas destas medidas, mas são apontadas algumas tendências, como a permanência de grupos de crime organizado que obtém lucro pela venda ilícita de canábis nos locais onde o uso recreativo foi permitido legalmente, principalmente em Washington e no Colorado, nos Estados Unidos. Além disso, são os lucros de indústrias de produtos de canábis que direcionam o perfil de consumo, e não os interesses de saúde pública. A disponibilidade de produtos de maior potência, em extratos concentrados e até mesmo na maconha, está relacionado à maior procura por tratamento para desordens por uso de canábis (UNODC, 2019).

3.2.1 Legislação brasileira

Com o objetivo de harmonizar os aspectos legais acerca de entorpecentes, foi realizada em 1961 a Convenção Única sobre Entorpecentes em Nova York, promulgada no Brasil por meio do Decreto nº 54.216 de 1964. A espécie *C. sativa*, incluindo-se resinas, extratos e tinturas, está sujeita a fiscalização no país desde então. Atualmente, está em vigor a Lei nº 11.343/2006, de 26 de agosto de 2006, que institui o sistema de políticas públicas sobre drogas no Brasil. Apesar de elencar diferentes sanções para os crimes de posse de drogas ilícitas para consumo próprio e de produção e distribuição não autorizados, não há uma distinção objetiva entre consumo pessoal e tráfico.

Para esta Lei, denominam-se drogas substâncias entorpecentes, psicotrópicas, precursoras e outras sob controle especial da Portaria SVS/MS nº 344, de 12 de maio de 1998. Esta portaria aprova o Regulamento Técnico sobre substâncias e medicamentos sujeitos a controle especial, onde a espécie *Cannabis sativa* L. encontra-se na Lista “E”, que relaciona as plantas proscritas que podem originar substâncias entorpecentes e/ou psicotrópicas. Apesar de as plantas da Lista “E” não poderem ser objeto de prescrição e manipulação de medicamentos alopáticos e homeopáticos, a RDC nº 66 de 2016 traz uma atualização, autorizando a prescrição e manipulação de medicamentos registrados na Anvisa contendo *Cannabis sp* ou produtos importados contendo CBD e/ou THC para uso próprio, mediante prescrição médica. Estes produtos devem apresentar alguns requisitos estabelecidos pela RDC nº 17 de 2015, como por exemplo a exigência de conhecimento pela Anvisa da concentração máxima de THC.

O CBD está presente na Lista “C1” da Portaria 344/1998, que traz substâncias cuja prescrição está sujeita a Receita de Controle Especial. Já o THC, juntamente com as classes estruturais dos canabinoides sintéticos, estão presentes na Lista “F2” de substâncias psicotrópicas de uso proscrito no Brasil. Ou seja, em regra, tanto o THC quanto as substâncias canabimiméticas são de uso proscrito, enquanto o CBD é sujeito a controle especial. No entanto, a RDC nº 66 de 2016 trouxe uma exceção, encontrada no adendo 6 da Lista “F2”, que exclui dos controles da lista “F2” os medicamentos contendo THC com registro na Anvisa.

Em dezembro de 2019 foi aprovada a criação de uma nova categoria de produtos derivados de *Cannabis* para fins medicinais (BRASIL, 2019). De forma semelhante ao que tem ocorrido em outros países, os novos produtos não serão considerados medicamentos, mas sim uma nova categoria que não exige a realização de pesquisas clínicas para comprovar sua eficácia.

Estes novos produtos, de administração via oral e nasal, visam a atender pacientes que podem se beneficiar desse tipo de tratamento, mas que atualmente não estão disponíveis no mercado nacional. O comércio será feito, mediante receita de controle especial, exclusivamente por farmácias e drogarias, sendo proibida a elaboração em farmácias de manipulação. É prevista uma nova revisão das regras em até três anos, em razão do estágio técnico-científico em que se encontram os produtos à base de canábis mundialmente (BRASIL, 2019).

Apesar da movimentação em torno do uso medicinal de canábis, o uso recreativo se mantém ilegal. A Lei de Drogas (Lei nº 11.343/2006) estabelece penalidades para usuários e traficantes, apesar de não haver uma definição expressa para distingui-los. Ao usuário, são previstas penas alternativas e medidas para dissuadir o uso drogas, sendo vedada sua detenção ou prisão. Já ao traficante, as penalidades previstas são mais severas. A repressão às drogas é forte no país, com operações policiais para exterminar produtores e distribuidores. A PFB divulga estatísticas sobre apreensões, sendo maconha a droga de maior expressão, com recorde de apreensão em 2017, totalizando 354 toneladas (Figura 3).

O continente americano tem grande participação nas apreensões mundiais de material vegetal de canábis, principalmente a América do Sul, com 38% do total global de apreensões de 2017 (5109 toneladas). Nos anos anteriores, a América do Norte ocupava o papel de maior participação nas apreensões, mas desde 2010 houve declínio nos números de apreensões norte americanos. Em 2017, pela primeira vez, o Paraguai

relatou a maior quantidade de canábis apreendida globalmente. Naquele ano, 77% da canábis produzida no Paraguai teve como destino o Brasil. É na fronteira entre os dois países que estão concentradas as maiores plantações paraguaias (UNODC, 2019).

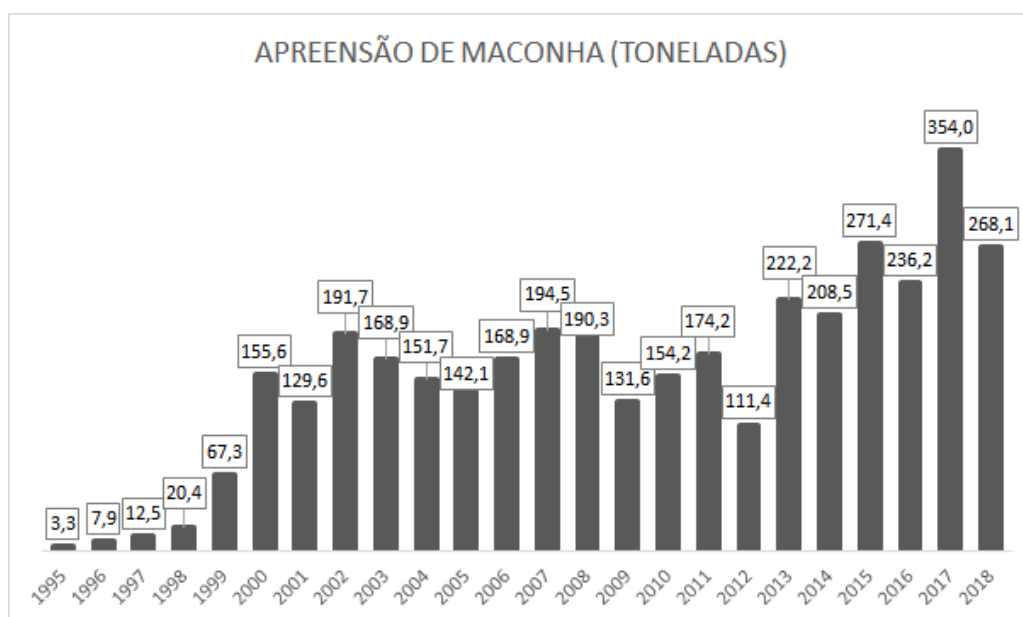


Figura 3. Quantidades de maconha apreendidas, em toneladas, de 1995 a 2018. Fonte: Polícia Federal.

3.3 Análises químicas da planta e seus derivados

A UNODC editou um manual, em 2009, com métodos recomendados para identificação e análise de canábis e seus produtos. No manual, recomendado para uso em laboratórios nacionais de análises de drogas, constam técnicas validadas de GC e LC. Para as análises em GC são utilizados detectores de ionização de chama (FID) ou MS, e o aquecimento necessário para a separação dos compostos em fase gasosa ocasiona a descarboxilação dos canabinoides ácidos presentes nas amostras. Para impedir a conversão em canabinoides neutros, deve ser feita uma derivatização dos analitos (por exemplo, sililação), possibilitando a quantificação individual dos canabinoides ácidos e neutros.

Em análises que visam a determinação de THC total (THC + THCA), não é feita a derivatização prévia, e o conteúdo de THCA é convertido a THC durante a análise, ou a descarboxilação é realizada previamente. Entretanto, alguns trabalhos sugerem que a conversão às formas neutras dos canabinoides ácidos não ocorre de forma quantitativa, o que levaria a resultados de concentração subestimada (CITTI et al., 2018a; LEGHISSA; HILDENBRAND; SCHUG, 2018).

Nesse sentido, por trabalhar em temperaturas próximas à temperatura ambiente, nas técnicas baseadas em LC não ocorre degradação da amostra, sendo o método de preferência para análises de canabinoides ácidos (BORILLE et al., 2017c; UNODC, 2009). O método por LC apresentado pela UNODC tem como finalidade a quantificação de THC total com detector de arranjo de diodos, podendo também ser utilizado o detector por MS. A detecção por absorção no UV não permite a discriminação entre alguns canabinoides neutros que costumam coeluir, como CBG e CBD. Nesse caso, a detecção por MS permite a identificação destes canabinoides, já que possuem diferentes razões m/z de seus íons moleculares (CITTI et al., 2018a; HAZEKAMP et al., 2005).

As colunas mais empregadas como fase estacionária nos métodos de LC descritos na literatura são aquelas de fase reversa C_{18} , como pode ser visualizado na Tabela 1, que destaca trabalhos recentes englobando essa técnica analítica para análise de fitocanabinoides. Já para fase móvel, água e solventes orgânicos acidificados são muito empregados, geralmente com eluição gradiente.

Dentre os métodos para detecção de canabinoides por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) a partir de material vegetal, destaca-se o trabalho publicado em 2016 por Citti e colaboradores, no qual é realizado um estudo focado na otimização dos parâmetros cromatográficos. Os autores desenvolveram uma metodologia de LC-MS com analisador sequencial de quadrupolo e tempo de voo (QToF) para quantificação de canabinoides em extratos medicinais a base de canábis. Foi empregada eluição em modo isocrático em uma corrida de 10 minutos, com coluna C_{18} com tecnologia Fused-Core®, que promove melhor separação dos compostos. Os analitos foram os mesmos observados no método por HPLC-UV previsto pela UNODC: CBD, CBN, THC, THCA; e ainda o CBDA.

Em análises forenses, a GC-MS é a técnica de referência, pois permite avaliar o perfil químico das amostras com alta especificidade. Ainda assim, os métodos instrumentais mais utilizados são GC-FID e HPLC-UV (BORILLE et al., 2017c), pois são instrumentos comuns a outras técnicas analíticas utilizadas rotineiramente em análises forenses. Atualmente, as novas metodologias buscam avaliar uma maior diversidade de canabinoides, devido tanto à possibilidade de melhor caracterização de amostras, quanto à possibilidade destes de influenciar os efeitos apresentados pelos usuários de canábis. Citti e colaboradores, em revisão de 2018, indicam a cromatografia líquida como método de escolha para análise de canabinoides, pois é possível determinar a composição real de espécies neutras e ácidas, sem necessidade de uma etapa prévia de derivatização.

Tabela 1. Métodos de análise por cromatografia líquida de canabinoides extraídos de material vegetal.

| Análitos | Solvente de extração | Coluna | Fase móvel | Detecção | Referência |
|--|------------------------------|--|---|---------------------|-----------------------------------|
| CBDA, CBD, CBN, THC, THCA | MeOH | C ₁₈ NexLeaf CBX, 2,7 µm (150 × 4,6 mm) | H ₂ O + 0,085% ácido fosfórico e ACN + 0,085% ácido fosfórico | UV (220 nm) | (DEI CAS et al., 2020) |
| CBDV, CBG, CBD, THCV, CBN, Δ ⁸ -THC, THC, CBC, CBL, CBDVA, CBDA, CBGA, THCA | MeOH | C ₁₈ Mediterranean, 3 µm (250 × 4,6 mm) | H ₂ O + ACN 5% + 0,1% AcF e ACN + H ₂ O 5% + 0,1% AcF | QToF | (DELGADO-POVEDANO et al., 2020) |
| THCA, CBGA, CBDA, THC, CBD, CBC, CBG, CBN, CBDV | EtOH | Kinetex C ₁₈ -XB, 2,6 µm (100 × 2,1 mm) | H ₂ O + AcF 5 mM e ACN + AcF 5 mM | MS/MS | (PALMIERI et al., 2019) |
| CBG, CBD, CBGA, CBDA | EtOH | Ascentis Express C ₁₈ , 2,7 µm (150 × 3,0 mm) | H ₂ O + AcF 0,1% e ACN + AcF 0,1% | UV (210 e 220 nm) | (BRIGHENTI et al., 2019) |
| CBDA, CBGA, CBG, CBD, THCV, CBN, THC, Δ ⁸ -THC, CBC, THCA | MeOH:CHCl ₃ (9:1) | C ₁₈ Nex-Leaf CBX, 2,7 µm (150 × 4,6 mm) | H ₂ O + 0,085% ácido fosfórico e ACN + 0,085% ácido fosfórico | UV (220 nm) | (MANDRIOLI et al., 2019) |
| CBDA, CBD, THCA, THC, CBN | MeOH | Cortecs C ₁₈ , 2,7µm (100 × 2,1 mm) | H ₂ O + 0,1% AcF e ACN + 0,1% AcF | MS/MS | (PROTTI et al., 2019) |
| CBDVA, CBDV, CBDA, CBGA, CBG, CBD, THCV, CBN, THC, Δ ⁸ -THC, THCA, CBC | EtOH | Supelco Ascentis Express C ₁₈ , 2,0 µm (150 × 2,1 mm) | H ₂ O + formiato de amônia 20 mM (pH 3,2) e ACN | UV (240 nm) ou QToF | (VACLAVIK et al., 2019) |
| CBDA, THCA, CBD, THC, CBN | MeOH:hexano (9:1) | Kinetex C ₈ , 2,6 µm (100 × 2,1 mm) | H ₂ O + 0,1% AcF e ACN + 0,1% AcF | UV (210 nm) | (HÄDENER; KÖNIG; WEINMANN, 2019) |
| CBD, CBN, THC, THCA | EtOH | Nucleodur C ₁₈ Gravity, 5 µm (250 × 4,6 mm) | H ₂ O + ácido fosfórico 50 mM e ACN | UV (211 e 220 nm) | (BURNIER; ESSEIVA; ROUSSEL, 2019) |
| CBN, CBG, CBD, CBC, CBDA, CBGA, THCA, THC | ACN | XSelect HSS T3 C ₁₈ , 2,5 µm (2,1 × 50 mm) | H ₂ O e MeOH | MS/MS | (BROWN et al., 2019) |
| CBDV, CBDA, CBGA, CBG, CBD, CBN, THC, THCA | H ₂ O:ACN (1:1) | Kinetex XB-C ₁₈ , 1,7 µm (150 × 2,1 mm) | H ₂ O + AcF 0,1% e ACN + AcF 0,1% | UV (220 nm) | (ZIVOVINOVIC et al., 2018) |

Tabela 1. *Continuação.*

| | | | | | |
|---|------------------------------|---|---|------------------------------------|----------------------------------|
| CBG, CBD, CBN, THC, Δ^8 -THC, CBL, CBC, CDVA, CBDV, CBDA, CBGA, THCV, THCA | EtOH | Kinetex C ₁₈ , 2,6 μ m (150 x 2,1 mm) | H ₂ O + AcA 0,1%; ACN + AcA 0,1% e MeOH | MS/MS | (BERMAN et al., 2018) |
| CBD, THC, CBDA, THCA, CBN | EtOH | MacMod ACE 5 C ₁₈ -AR, 5 μ m (4,6 x 250 mm) | H ₂ O + AcA 0,5% e ACN | UV (diversos comprimentos de onda) | (CIOLINO; RANIERI; TAYLOR, 2018) |
| CBDA, THCA, CBD, THC, CBN | EtOH ou óleo de oliva | Poroshell 120 EC-C ₁₈ , 2,7 μ m (3,0 x 50 mm) | H ₂ O + AcF 0,1% e ACN + AcF 0,1% | QToF | (CITTI et al., 2018b) |
| CBD, THC, CBN, CBG, CBDA, THCA, CBGA | isopropanol | Synergi Hydro RP C ₁₈ , 4 μ m (150 x 2 mm) | H ₂ O + AcF 0,1% e ACN | MS (Orbitrap) | (CALVI et al., 2018) |
| CBDA, CBGA, CBG, CBD, THCV, CBN, THC, Δ^8 -THC, CBL, CBC, THCA | ACN:MeOH (8:2) | Cortec UPLC C ₁₈ , 1,6 μ m (100 x 2,1mm) | H ₂ O + AcF 0,05% e ACN + AcF 0,05% | UV (220 nm) ou MS | (WANG et al., 2018) |
| CBDA, CBG, CBD, CBN, THC, CBC, THCA | MeOH:CHCl ₃ (9:1) | Acquity UPLC HSS C ₁₈ , 1,8 μ m (2,1 x 150 mm) | H ₂ O + AcF 0,1% e ACN | MS/MS | (PACIFICI et al., 2017) |
| CBDA, CBGA, CBD, CBG | EtOH | Ascentis Express C ₁₈ , 2,7 μ m (150 x 3,0 mm) | H ₂ O + AcF 0,1% e ACN + AcF 0,1% | UV (210 e 220 nm) ou MS | (BRIGHENTI et al., 2017) |
| THC, THCA, Δ^8 -THC, CBD, CBDA, CBG, CBN, CBC, THCV | MeOH 80% | Kinetex C ₁₈ , 1,7 μ m, (100 x 3,0 mm) | H ₂ O + formiato de amônio 10 mM (pH 3,6) e ACN | UV (220 nm) | (MUDGE; MURCH; BROWN, 2017) |
| CBGA, CBG, CBDA, CBD, THCA, THC, Δ^8 -THC, CBN | MeOH:CHCl ₃ (9:1) | Poroshell 120 SB-C ₁₈ , 2,7 μ m (3 x 75 mm) | H ₂ O + acetato de amônio 25 mM (pH 4,75) e MeOH | UV (235 nm) | (PATEL; WENE; FAN, 2017) |
| CBD, CBDA, CBG, CBGA, CBN, THC, THCA | EtOH:CHCl ₃ (9:1) | Nucleosil C ₈ , 3 μ m (125 x 4 mm) | H ₂ O + AcA 0,1% e MeOH | UV (230 nm) | (AIZPURUA-OLAIZOLA et al., 2016) |

Tabela 1. *Continuação.*

| | | | | | |
|--|------------------------------|--|---|---------------------|----------------------------------|
| CBDA, CBD, THCA, THC, CBN | EtOH ou óleo de oliva | Poroshell 120 SB-C ₁₈ , 2,7 µm (2,1 × 100 mm) | H ₂ O + AcF 0,1% e ACN | UV (228 nm) ou QToF | (CITTI et al., 2016) |
| CBDA, CBGA, THCA, CBD, CBG, THC, CBN e flavonoides | AcOEt:EtOH 40% (1:10) | Zorbax RX-C ₁₈ , 5 µm (4,6 × 250 mm) | H ₂ O:ACN (65:35, TFA 0,1%) e ACN | UV (214 nm) | (PESCHEL; POLITI, 2015) |
| CBDA, CBGA, CBG, CBD, CBN, THC, Δ ⁸ -THC, THCA e outros canabinoides (TI) | EtOH | Poroshell 120 EC-C ₁₈ , 2,7 µm (150 × 2,1 mm) | H ₂ O + AcF 0,1% e ACN + AcF 0,1% | UV (214 nm) | (GIESE et al., 2015) |
| THC, THCA | hexano:AcOEt (9:1) | LiChrospher 100 RP-18, 5 µm (125 × 4 mm) | tampão fosfato-trietilamina 25 mM pH 3 e ACN | UV (210 nm) | (TASCHWER; SCHMID, 2015) |
| CBD, THCA, CBN, THC, CBG, THCV | fluido supercrítico | Kinetex C ₁₈ , 2,6 µm (150 × 3 mm) | H ₂ O + 0,1% AcF e MeOH + 0,1% AcF | QToF | (AIZPURUA-OLAIZOLA et al., 2014) |
| CBD, CBN, THC | MeOH:CHCl ₃ (9:1) | Onyx Monolithic column (100 mm × 4,6 mm) | MeOH e H ₂ O | UV (220 nm) | (AHMAD; MUNIANDY; HASSAN, 2014) |
| CBD, CBN, THC, THCA | MeOH:hexane (9:1) | LiChrospher 60, RP-Select B, 5 µm (125 × 4 mm) | tampão fosfato-trietilamina 25 nM e ACN | UV (210 nm) | (AMBACH et al., 2014) |

AcA: ácido acético, AcF: ácido fórmico, ACN: acetonitrila, AcOEt: acetato de etila, EtOH: etanol, MeOH: metanol, TFA: ácido trifluoracético.

3.3.1 MS aplicada a canabinoides

A MS é especialmente relevante na área forense, pois permite analisar a fragmentação dos íons moleculares e deduzir a estrutura molecular do analito, mesmo na ausência de uma substância de referência, com grande sensibilidade. A Figura 4 apresenta um diagrama esquemático de um espectrômetro de massas. Os principais componentes são a fonte de ionização, onde são geradas espécies iônicas a partir de átomos ou moléculas neutras, e o analisador de massas, que separa os íons com base em suas massas.

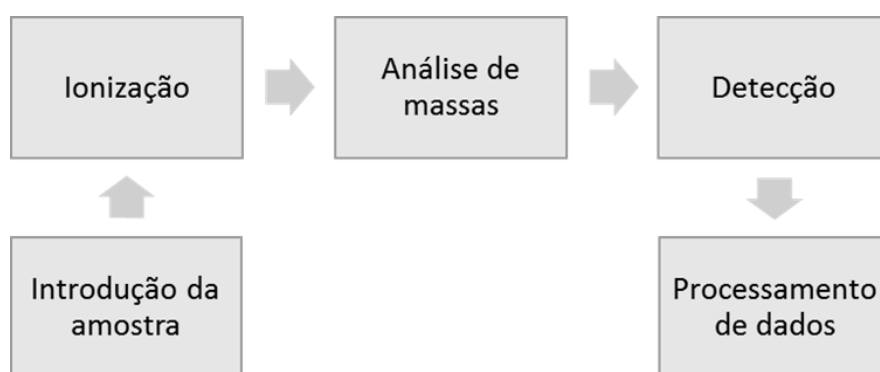


Figura 4. Esquema das principais etapas de um espectrômetro de massas.

Com o desenvolvimento de novos métodos de ionização, os detectores de MS puderam ser acoplados a cromatógrafos a líquido e aumentaram a versatilidade da técnica, que antes se restringia a moléculas de peso molecular relativamente baixo, termoestáveis e capazes de serem volatilizadas. A ionização por eletrospray (ESI) é uma técnica a pressão atmosférica que transfere íons em solução para fase gasosa, pela dessolvatação de gotículas altamente carregadas (VESSECCI et al., 2011). Os analitos devem estar em solução ácida ou básica, possibilitando a protonação $[M+H]^+$ ou desprotonação $[M-H]^-$ das moléculas. Os íons também podem ser formados por adutos: $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, $[M+NH_4]^+$ ou $[M+Cl]^-$. A ionização por ESI é o método mais abrangente para gerar os íons que irão para o analisador de massas, sendo aplicável inclusive para macromoléculas, como polímeros, ácidos nucleicos e proteínas (DEMARQUE et al., 2016).

Diferentes tipos de analisadores de massas foram desenvolvidos para discriminar os íons produzidos. Dependendo do princípio aplicado para fazer a separação entre os íons de diferentes razões massa/carga (m/z), os analisadores podem ser de baixa ou alta resolução. O mais comum é o quadrupolo, de baixa resolução. Os analisadores de

massa de alta resolução medem a massa exata do isótopo mais abundante. O analisador por tempo de voo (ToF, do inglês *Time of Flight*) é capaz de separar diferentes íons baseado em quanto tempo eles levam para cruzar uma região livre de campo após serem acelerados. Como pode ser visto na Tabela 1, geralmente o analisador ToF é associado a um quadrupolo (QToF) quando aplicado para detecção de canabinoides em cromatografia líquida, permitindo a distinção entre isômeros mesmo quando ocorre coeluição (CITTI et al., 2018a).

Entretanto, a cromatografia pode ser prescindível nas análises por MS, principalmente pela grande seletividade das técnicas de alta resolução. Nesses casos, a introdução da amostra pode ser feita por infusão direta no compartimento de ionização do espectrômetro, ou por injeção de fluxo (FIA, do inglês *flow injection analysis*), em que a solução de análise é injetada num fluxo de eluente para a fonte de íons. Nascimento e colaboradores, em 2015, identificaram 21 espécies de canabinoides em amostras apreendidas pela polícia, que após preparo, foram diretamente infundidas para análise por FT-ICR MS. A fonte ESI no modo negativo apresentou melhores resultados, comparado ao modo positivo de ionização. Em 2017, Borille e colaboradores cultivaram 68 sementes de *Cannabis* e realizaram um estudo semelhante, também por infusão direta em FT-ICR MS. Através de uma análise do perfil químico, foram identificadas, no modo positivo de ionização, 123 substâncias como canabinoides ou metabólitos, além de oito não canabinoides.

Devido à complexidade dos resultados obtidos por análises de MS de alta resolução, muitos trabalhos lançam mão de ferramentas de análise estatística multivariada. Quando aplicadas em dados obtidos de análises químicas em que diversas variáveis são medidas simultaneamente, a análise multivariada de dados chama-se quimiometria (CORREIA; FERREIRA, 2007).

Uma das principais aplicações da quimiometria é o reconhecimento de padrões para agrupamento de amostras em categorias segundo suas similaridades. A partir de informações químicas ou espectrais das amostras, é possível associar as que possuem uma origem comum, por exemplo, e assim detectar tendências nos dados (RIBEIRO et al., 2007). Nesse sentido, a quimiometria pode atuar no reconhecimento de padrões no perfil químico de diferentes amostras, gerando resultados que podem ser utilizados para estabelecer modelos e prever classificação de amostras desconhecidas.

4 CAPÍTULO I. PERFIL QUALITATIVO DE CANABINOIDES POR
CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

4.1 Introdução

A canábis (*Cannabis sativa* L.) é utilizada historicamente por suas propriedades medicinais, ou para fins recreativos devido a seus efeitos psicotrópicos. Apesar da discussão atual acerca da sua regulamentação, a planta e seus produtos permanecem proibidos na maioria dos países. O continente americano tem grande participação nas apreensões mundiais de canábis, principalmente a América do Sul, com 38% do total global de apreensões de 2017. Além disso, o Relatório Mundial sobre Drogas de 2019 aponta o Brasil como um dos países com maior extensão de cultivo e produção de canábis (UNODC, 2019). É conhecida por produzir uma classe de compostos terpenofenólicos de 21 átomos de carbono denominados canabinoides, encontrados exclusivamente nessa espécie. A planta sintetiza as formas ácidas dos canabinoides, que sofrem descarboxilação, originando as formas neutras. O THC é o principal canabinoide psicoativo presente em produtos derivados de canábis consumidos como droga de abuso, sendo que seu teor está relacionado à potência da droga. O THCA é o bioprecursor do THC na canábis, e o CBN é resultado de sua degradação por oxidação (HANUŠ et al., 2016; HARTSEL et al., 2016).

A LC é o método de escolha para determinação qualitativa e quantitativa de canabinoides em materiais vegetais, pois permite identificar espécies neutras e ácidas, avaliando a composição das amostras de forma fidedigna (CITTI et al., 2018a). Para análises forenses, a avaliação da composição de diferentes amostras de canábis é uma ferramenta muito significativa para a identificação de perfis químicos desses produtos. Esse tipo de caracterização pode ser utilizada pela inteligência policial para subsidiar estudos criminalísticos, visando o delineamento de possíveis rotas de tráfico (BORILLE, 2016).

Em 2016, Mariotti e colaboradores cultivaram sementes de canábis provenientes de apreensões realizadas pela PFB, e avaliaram canabinoides neutros por GC-MS em amostras coletadas após diferentes períodos de cultivo (de 4,5 até 12 semanas). Dentre os canabinoides detectados, a concentração de THC aumentou com a idade da planta, sendo que essa correlação não foi observada para os outros canabinoides quantificados (MARIOTTI et al., 2016).

Considerando que as amostras provenientes de operações policiais de apreensão e erradicação de cultivos clandestinos estão em estágios de crescimento desconhecido, a estimativa de potência da planta é problemática. Mesmo que sejam empregados

métodos quantitativos, o teor de THC e outros canabinoides pode estar subestimado devido à idade da planta (AIZPURUA-OLAIZOLA et al., 2016). Nesse sentido, este capítulo apresenta um trabalho envolvendo a avaliação qualitativa de canabinoides em diferentes amostras de canábis e produtos derivados. O objetivo consiste em analisar essas amostras por meio de um método de LC capaz de identificar de maneira confiável e eficiente oito canabinoides majoritariamente presentes em amostras de apreensão (THCA, THC, CBN, CBDA, CBD, CBGA, CBG e Δ^8 -THC).

4.2 Materiais e métodos

4.2.1 Padrões e amostras

Os padrões certificados de canabinoides (Cerilliant®) foram obtidos nas concentrações de 1 mg/mL, solubilizados em metanol (THC, CBN, CBD, CBG e Δ^8 -THC) ou acetonitrila (THCA, CBDA, CBGA) e mantidos a -20 °C. Para preparo das soluções, foram diluídos em metanol de grau HPLC (Sigma-Aldrich®).

As amostras de canábis (partes aéreas e material vegetal prensado) foram fornecidas por meio do Convênio de Cooperação Técnico-Científica vigente entre a UFRGS, através do Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia, e a Superintendência Regional da Polícia Federal do Rio Grande do Sul. Vinte e cinco amostras foram obtidas de um estudo prévio acerca de tráfico de sementes (BORILLE et al., 2017b). As sementes apreendidas foram cultivadas *indoor* no Departamento de Polícia Federal do Rio Grande do Sul (DPF/RS), conforme descrito por Borille e colaboradores (2017b). Outras dez amostras, de material vegetal compactado, foram apreendidas na cidade de Manaus e cedidas à Polícia Federal do Acre e do Rio Grande do Sul. As outras quarenta e sete amostras foram obtidas de plantas apreendidas durante operações da PFB na região do Vale do Rio São Francisco, nos estados de Pernambuco e Bahia.

4.2.2 Metodologia

As amostras foram preparadas a partir das indicações do manual publicado pela UNODC para uso por laboratórios nacionais de análises de drogas (UNODC, 2009). Após secagem em temperatura ambiente, as partes aéreas foram moídas e homogeneizadas. Para extração dos canabinoides, em 100 mg de amostra foi adicionado

1 mL de metanol:clorofórmio (9:1 v/v), conforme designado pelo manual, ou 1 mL de metanol, e procedeu-se com as seguintes etapas: 10 segundos de agitação em vórtex, 15 minutos de banho ultrassônico (com agitação a cada 5 minutos) e centrifugação. O sobrenadante foi diluído até a concentração final de 2 mg/mL e filtrado. Para as amostras em que havia maior quantidade disponível, as extrações foram preparadas em triplicata. Para algumas amostras a quantidade de material vegetal disponível era muito escassa, e quando não foi possível prepará-las nem mesmo em duplicata, foi feita apenas uma amostragem com três injeções no ensaio cromatográfico.

O equipamento utilizado para as análises foi o cromatógrafo a líquido de alta eficiência Agilent modelo LC 1200 Series, equipado com uma bomba quaternária, um autoinjeter, compartimento com termostato e detector de arranjo de diodos. O sistema utilizado para aquisição de dados e análise de resultados foi o software ChemStation (Versão B03.02). O desenvolvimento do método para identificação de canabinoides em material vegetal teve como ponto de partida as condições empregadas em trabalho anterior do grupo de pesquisa (resultados não publicados), cujas condições estabelecidas para identificação e quantificação de cinco canabinoides por HPLC acoplado a detector de massas *single* quadrupolo (HPLC-MS) encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2. Condições cromatográficas pré-estabelecidas anteriormente, para identificação e quantificação de cinco canabinoides por HPLC-MS.

| | |
|-----------------------|---|
| Equipamento | Agilent 1260 Infinity Series |
| Fase móvel | Metanol:água + acetato de amônio 10 mM (8:2) |
| pH | 5,2 |
| Vazão da fase móvel | 0,5 mL/min |
| Coluna cromatográfica | Kinetex [®] C ₁₈ 100 Å, 100 x 4.6mm, 2.6 µm |
| Temperatura da coluna | 30 °C |
| Volume de injeção | 10 µL |

Optou-se por manter a coluna cromatográfica e a composição e pH da fase móvel, mas foram realizados testes para escolha de um gradiente de eluição que possibilitasse a melhor separação dos analitos, além de diferentes fluxos, temperaturas e volumes de injeção. Outro ponto avaliado foi o melhor comprimento de onda para a detecção simultânea dos oito canabinoides, por meio da avaliação do espectro UV das substâncias.

A adequabilidade do sistema foi avaliada a partir de seis injeções de uma mistura dos padrões dos oito analitos a 20 µg/mL. Foram considerados os seguintes parâmetros, a partir dos valores de média e desvio padrão relativo: tempo de retenção, fator de capacidade, área, fator de simetria, fator de cauda, número de pratos teóricos e resolução. Para as diferentes amostras analisadas, além da detecção dos canabinoides, foi feita uma estimativa da concentração. A área determinada para cada analito presente na amostra foi comparada com a área de referência para cada substância no dia da análise, a partir da injeção da mistura de padrões contendo 10, 15 ou 20 µg/mL de cada analito em metanol.

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Otimização do método

Para análise de canabinoides por HPLC, muitos métodos utilizam apenas solventes orgânicos não clorados como metanol e etanol na etapa de extração (Tabela 1), por questões de segurança no laboratório, redução de custos e impacto ambiental (MUDGE; MURCH; BROWN, 2017), além do fato do clorofórmio estar relacionado à maior instabilidade do CBD (CIOLINO; RANIERI; TAYLOR, 2018). No entanto, a UNODC indica em seu manual que a extração a partir de material vegetal seja feita com a mistura de solventes metanol e clorofórmio, na proporção 9:1 (v/v). Seis amostras foram extraídas com a mistura de solventes e somente com metanol, para avaliar se a área dos picos dos canabinoides seria alterada. Para todas as amostras, nas quais foram detectados CBGA, THCA, CBN e THC, a área encontrada foi maior quando a extração foi feita utilizando apenas metanol, com aumento médio nas áreas de, respectivamente, 31,51%, 22,32%, 13,19% e 17,11%. Portanto, o método de extração recomendado pela UNODC foi modificado, utilizado apenas metanol, para aplicação em todas as amostras em estudo.

Conforme mencionado acima, recentemente, em nosso grupo de pesquisa, foi desenvolvido um método cromatográfico com eluição isocrática para análise de CBDA, THCA, CBD, CBN e THC em material vegetal por LC-MS (artigo em fase de redação). Utilizando a mesma composição de fase móvel e mesma coluna cromatográfica, nesse trabalho o método foi adaptado para identificar mais três substâncias, CBGA, CBG e Δ^8 -THC, por HPLC-UV.

Para determinação do comprimento de onda de detecção, verificou-se os valores relatados na literatura (Tabela 1), além da avaliação dos espectros de absorção de cada analito na faixa de 200 a 400 nm, apresentados na Figura 5. O caráter ácido ou neutro do canabinoide define seu perfil de absorção no ultravioleta. Em geral, para os neutros a absorção diminui com o aumento do comprimento de onda, e para os ácidos há um pico na região de 220 nm e picos menores nas regiões de 256 e 300 nm. A exceção é o CBN, que possui dois anéis aromáticos devido à ciclização de sua porção não fenólica e apresenta aumento na absorção na região de 280 nm. Os cromatogramas foram monitorados nos seguintes comprimentos de onda: 220 nm, 225 nm, 256 nm, 280 nm e 300 nm, e definiu-se 220 nm como o comprimento de onda para detecção e medidas de áreas. Apesar de em comprimentos de onda menores (200 – 210 nm) haver melhora na sensibilidade (HAZEKAMP et al., 2005), nessa região há maior interferência de outros compostos.

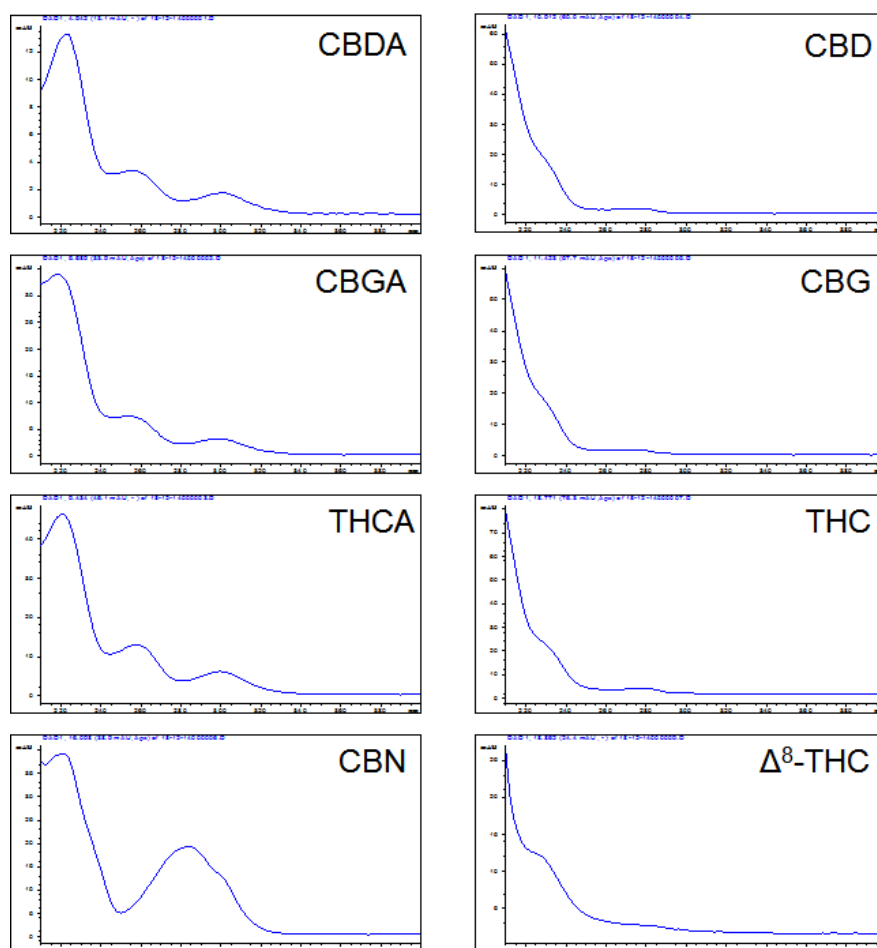


Figura 5. Espectros de absorção dos canabinoides, medidos em soluções metanólicas a 20 µg/mL, entre 200 e 400 nm.

Inicialmente foi feita uma tentativa de reproduzir o método cromatográfico desenvolvido anteriormente com detecção por MS, que empregava eluição isocrática de metanol:acetato de amônio 10 mM (pH = 5,2), na proporção 8:2. No entanto, os canabinoides ácidos tiveram tempos de retenção muito baixos e não foram separados. Diversas condições de gradiente foram testadas para conseguir a melhor separação dos analitos, sendo que as resoluções entre CBD e CBG e entre THC e Δ^8 -THC foram critérios decisivos para estabelecer os parâmetros cromatográficos. A temperatura de 30 °C e o volume de injeção de 10 μ L foram mantidos conforme método anterior do nosso grupo de pesquisa (Tabela 2), apesar de terem sido realizados testes a 35 °C e com injeção de 20 μ L, que apresentaram resultados menos satisfatórios. Quando aumentou-se a temperatura, a resolução entre CBD e CBG diminuiu; e quando o volume de injeção foi aumentado, os canabinoides ácidos apresentaram picos irregulares. Já para o fluxo, notou-se que o aumento não prejudicava a resolução entre os picos dos analitos, mas diminuía os seus tempos de retenção. Dessa forma, optou-se por aumentar para 0,7 mL/min, resultando em uma análise mais rápida.

Em relação ao gradiente, a concentração inicial de metanol na fase móvel foi diminuída de modo a retardar a eluição dos canabinoides ácidos, já que no teste inicial, empregando concentração de 80%, eles foram eluídos junto ao volume morto. Após avaliação de diversas condições, estabeleceu-se a concentração inicial de 72% de metanol, mantida por 3,5 minutos, e após, aumentando de forma linear até 77% aos 10 minutos. Manteve-se essa concentração por quatro minutos, quando foi aumentada linearmente até 92% aos 18 minutos, mantendo-se até 22 minutos, quando a concentração inicial foi reestabelecida e mantida por mais seis minutos, para estabilizar a linha de base, totalizando 28 minutos de corrida (Figura 6).

| tempo (min) | GRADIENTE | |
|-------------|-----------|----------|
| | % MeOH | % tampão |
| 0 | 72 | 28 |
| 3,5 | 72 | 28 |
| 10 | 77 | 23 |
| 14 | 77 | 23 |
| 18 | 92 | 8 |
| 22 | 92 | 8 |
| 22,1 | 72 | 28 |
| 28 | 72 | 28 |

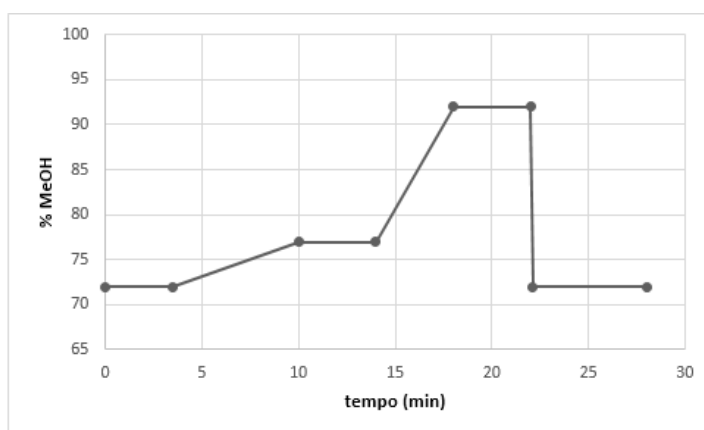


Figura 6. Esquema ilustrativo do gradiente definido para o método de separação de canabinoides por cromatografia líquida.

Um cromatograma ilustrativo da análise cromatográfica está apresentado na Figura 7. Os canabinoides ácidos são os primeiros a serem eluídos, pois a carboxila lhes confere menor lipofilicidade em relação aos seus derivados neutros. O CBDA é o composto com menor tempo de retenção (5,116 min), seguido pelo CBGA (6,003 min) e pelo THCA (11,041 min). A detecção dos canabinoides neutros inicia com o CBD (14,764 min) e o CBG (15,612) eluindo bastante próximos, pois ambos apresentam as hidroxilas do anel aromático livres. O CBD é eluído antes do CBG pois a porção terpênica do CBG (cadeia isoprênica aberta) apresenta lipofilicidade ligeiramente maior que a do CBD (análogo ao limoneno). Em seguida, ocorre a eluição do CBN (20,022 min), do THC (21,082 min) e, por fim, do Δ^8 -THC (21,440 min), que possuem o anel dihidropirano. O CBN possui um anel aromático na porção terpênica, que apresenta maior polaridade que o ciclohexeno. O Δ^8 -THC apresenta o maior tempo de retenção devido à isomerização da dupla ligação (BERMAN et al., 2018).

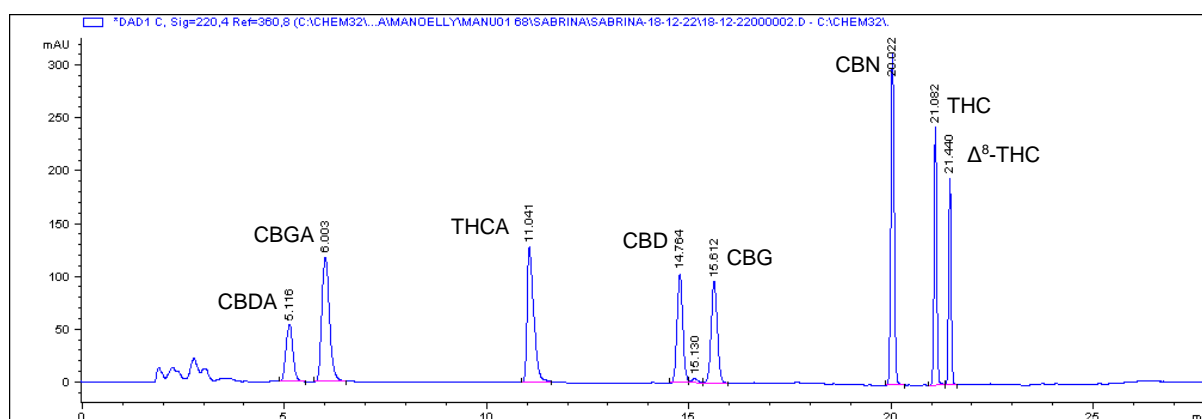


Figura 7. Cromatograma de solução de padrões de canabinoides a 20 $\mu\text{g/mL}$ obtido durante desenvolvimento de método por HPLC-UV, com correção da linha de base.

Além disso, quando foram injetadas misturas de padrões em concentrações acima de 10 $\mu\text{g/mL}$, percebeu-se um pico desconhecido entre CBD e CBG, relatado também por Patel e colaboradores em 2017. Esse pico está relacionado provavelmente a uma impureza ou a um isômero presente já na solução do padrão fornecido pela Cerilliant®.

Para as condições cromatográficas estabelecidas, as purezas dos picos foram avaliadas em uma análise com uma mistura de padrões a 20 $\mu\text{g/mL}$ cada, para garantir que cada pico corresponde a um único analito. Os espectros UV correspondentes ao início e fim de cada pico cromatográfico se sobrepuseram, e todos os picos apresentaram fatores de pureza dentro do limite calculado pelo *software* ChemStation. Além disso, foi realizada uma avaliação da adequabilidade do sistema, cujos valores médios e de desvio

padrão relativo de cada parâmetro avaliado para as oito substâncias estão apresentados na Tabela 3. Destaca-se que todos os valores de resolução foram maiores que 1,5, inclusive entre CBD e CBG (1,821), que é o par de canabinoides com maior problemática em relação à resolução na linha de base, mesmo em métodos que empregam colunas de maior eficiência (CITTI et al., 2018a; GIESE et al., 2015). Dessa forma, o método desenvolvido supre a demanda científica por uma técnica rápida para identificação de oito canabinoides simultaneamente.

Tabela 3. Médias e desvio padrão relativo dos parâmetros de avaliação da adequabilidade do sistema para cada analito, calculados a partir de seis injeções.

| Analito | Tempo de Retenção (min) | Fator de Capacidade (k') | Área | Fator de Simetria (As) | Fator de Cauda (T) | Número de Pratos Teóricos (N) | Resolução (Rs) |
|-----------------|-------------------------|--------------------------|-----------------|------------------------|--------------------|-------------------------------|----------------|
| CBDA | 5,136 | 1,404 | 656,666 | 1,027 | 1,100 | 4161 | - |
| | 0,25% | 0,44% | 0,66% | 0,56% | 0,46% | 1,19% | - |
| CBGA | 6,027 | 1,821 | 1579,344 | 0,855 | 1,243 | 4903 | 2,684 |
| | 0,27% | 0,42% | 2,20% | 0,38% | 0,26% | 1,22% | 0,56% |
| THCA | 11,079 | 4,185 | 1470,617 | 0,453 | 1,845 | 22830 | 15,823 |
| | 0,23% | 0,28% | 0,33% | 0,49% | 0,52% | 0,98% | 0,24% |
| CBD | 14,813 | 5,932 | 1019,911 | 0,919 | 1,068 | 52155 | 13,486 |
| | 0,21% | 0,25% | 0,34% | 0,11% | 0,20% | 1,10% | 0,36% |
| CBG | 15,665 | 6,331 | 1026,912 | 0,906 | 1,080 | 50956 | 1,821 |
| | 0,21% | 0,25% | 0,45% | 0,23% | 0,31% | 0,43% | 0,83% |
| CBN | 20,049 | 8,383 | 1755,658 | 0,943 | 1,054 | 306910 | 20,728 |
| | 0,08% | 0,09% | 0,39% | 0,19% | 0,42% | 1,38% | 0,26% |
| THC | 21,103 | 8,876 | 1083,355 | 0,944 | 1,028 | 508123 | 7,996 |
| | 0,06% | 0,06% | 2,48% | 0,47% | 0,31% | 1,09% | 0,14% |
| Δ^8 -THC | 21,459 | 9,043 | 851,804 | 0,910 | 1,041 | 593600 | 3,094 |
| | 0,05% | 0,06% | 0,63% | 0,79% | 0,45% | 0,10% | 0,28% |

4.3.2 Análise de canabinoides nas amostras

As 82 amostras analisadas neste trabalho foram nomeadas de acordo com a sua procedência. A maior parte, totalizando 47 amostras, foram obtidas de operações da PFB para erradicação de plantações clandestinas na região do Rio São Francisco, sendo nomeadas pelo prefixo “M”. O restante é proveniente de diferentes operações policiais, sendo que 25 amostras foram cultivadas pelo DPF/RS a partir de sementes apreendidas, nomeadas pelo prefixo “I”; e outras 10 amostras eram de material vegetal prensado, apreendido e cedido pela PFB, nomeadas pelo prefixo “A”. As concentrações estimadas

de cada canabinoide, calculadas em gramas para 100 gramas de amostra de material vegetal (massa%) encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4. Concentrações estimadas de cada canabinoide, calculadas em gramas para 100 gramas de amostra de material vegetal (g%).

| Amostras | CBDA | CBGA | THCA | CBD | CBG | CBN | THC | Δ^8 -THC |
|----------|------|------|------|------|------|------|------|-----------------|
| A001 | ND | ND | 0,11 | ND | 0,07 | 1,51 | 0,49 | ND |
| A002 | ND | ND | 0,13 | ND | 0,18 | 1,79 | 0,59 | ND |
| A003 | ND | ND | 0,08 | ND | 0,06 | 1,57 | 0,30 | ND |
| A004 | ND | ND | 0,08 | ND | 0,09 | 1,67 | 0,34 | ND |
| A005 | ND | ND | 0,10 | ND | 0,14 | 1,77 | 0,95 | ND |
| A006 | ND | ND | 0,10 | ND | 0,11 | 1,69 | 0,42 | ND |
| A007 | ND | ND | 0,31 | ND | 0,23 | 1,08 | 5,20 | ND |
| A008 | ND | ND | 0,21 | ND | ND | 0,37 | 0,50 | ND |
| A009 | ND | ND | 0,38 | ND | ND | 0,47 | 1,21 | ND |
| A010 | ND | ND | 0,14 | ND | 0,11 | 1,86 | 0,32 | ND |
| I001 | ND | ND | 0,37 | 0,06 | ND | 0,01 | 0,16 | ND |
| I002 | ND | ND | 0,10 | ND | ND | 0,01 | 0,05 | ND |
| I003 | ND | ND | 0,26 | 0,04 | ND | 0,01 | 0,18 | ND |
| I004 | ND | ND | ND | ND | ND | 0,60 | 0,47 | ND |
| I005 | ND | ND | 0,33 | 0,07 | ND | 0,01 | 0,17 | ND |
| I006 | ND | ND | 0,58 | 0,10 | ND | 0,01 | 0,40 | ND |
| I007 | ND | ND | 0,64 | 0,04 | 0,05 | ND | 0,34 | ND |
| I008 | ND | 0,02 | 0,28 | ND | ND | ND | 0,12 | ND |
| I009 | ND | ND | 0,24 | 0,05 | ND | ND | 0,14 | ND |
| I010 | ND | ND | 0,52 | ND | 0,06 | ND | 0,30 | ND |
| I011 | 0,80 | 0,03 | 0,13 | ND | ND | ND | 0,03 | ND |
| I012 | ND | ND | 0,06 | ND | ND | ND | 0,04 | ND |
| I013 | ND | ND | 0,14 | ND | 0,05 | 0,04 | 0,02 | ND |
| I014 | ND | 0,03 | 0,24 | ND | ND | ND | 0,13 | ND |
| I015 | ND | ND | 0,11 | ND | ND | ND | 0,07 | ND |
| I016 | ND | ND | 0,24 | ND | 0,05 | ND | 0,12 | ND |
| I017 | ND | ND | 0,60 | ND | 0,06 | ND | 0,19 | ND |
| I018 | ND | 0,03 | 0,16 | ND | ND | ND | 0,12 | ND |
| I021 | ND | ND | 0,16 | ND | ND | 0,01 | 0,16 | ND |
| I022 | ND | 0,04 | 2,92 | ND | ND | 0,01 | 0,19 | ND |
| I023 | ND | ND | 0,17 | ND | ND | ND | 0,10 | ND |
| I026 | ND | ND | 0,87 | ND | 0,08 | 0,01 | 0,51 | ND |
| I027 | ND | 0,05 | 0,68 | ND | 0,07 | 0,01 | 0,12 | ND |
| I028 | ND | ND | 0,11 | ND | ND | ND | 0,06 | ND |
| I029 | ND | ND | 0,45 | 0,08 | ND | ND | 0,16 | ND |
| M003 | ND | 0,03 | ND | ND | ND | 0,23 | 0,02 | ND |
| M094 | ND | ND | ND | ND | ND | 0,02 | ND | ND |
| M095 | ND | ND | ND | ND | ND | 0,10 | ND | ND |
| M096 | ND | ND | ND | ND | ND | 0,10 | ND | ND |

Tabela 4. *Continuação.*

| | | | | | | | | |
|------|----|------|------|------|------|------|------|------|
| M098 | ND | ND | ND | 0,04 | 0,04 | 0,36 | 0,09 | ND |
| M099 | ND | ND | ND | ND | ND | 0,04 | ND | ND |
| M100 | ND | ND | ND | ND | ND | 0,05 | 0,01 | ND |
| M101 | ND | ND | ND | ND | ND | 0,10 | ND | ND |
| M104 | ND | ND | ND | ND | ND | 0,12 | 0,04 | ND |
| M105 | ND | ND | ND | ND | 0,05 | 0,50 | 0,04 | 0,05 |
| M106 | ND | ND | ND | ND | 0,06 | 0,23 | 0,21 | ND |
| M107 | ND | 0,03 | ND | ND | 0,11 | 0,28 | 0,15 | ND |
| M110 | ND | ND | ND | ND | ND | 0,20 | 0,05 | ND |
| M111 | ND | ND | ND | ND | ND | 0,24 | 0,02 | ND |
| M112 | ND | ND | ND | ND | ND | 0,18 | 0,05 | ND |
| M113 | ND | ND | ND | ND | ND | 0,24 | 0,03 | ND |
| M114 | ND | ND | 0,01 | ND | ND | 0,17 | ND | ND |
| M115 | ND | ND | ND | ND | ND | 0,14 | 0,02 | ND |
| M116 | ND | ND | ND | ND | ND | 0,14 | 0,03 | ND |
| M117 | ND | ND | ND | ND | ND | 0,13 | 0,03 | ND |
| M118 | ND | ND | ND | ND | ND | 1,83 | 0,25 | ND |
| M119 | ND | ND | 0,02 | ND | ND | 0,50 | ND | ND |
| M121 | ND | ND | ND | ND | ND | 0,11 | 0,04 | ND |
| M122 | ND | ND | ND | ND | 0,03 | 0,18 | 0,23 | ND |
| M123 | ND | ND | ND | ND | 0,05 | 0,81 | 0,18 | ND |
| M124 | ND | ND | ND | ND | ND | 3,20 | ND | ND |
| M151 | ND | 0,04 | 0,16 | ND | ND | 0,03 | 0,23 | ND |
| M152 | ND | ND | 0,20 | ND | ND | 0,04 | 0,14 | ND |
| M153 | ND | 0,03 | 0,21 | ND | ND | 0,03 | 0,31 | ND |
| M154 | ND | ND | 0,43 | ND | ND | 0,11 | 0,80 | ND |
| M155 | ND | ND | 0,75 | ND | ND | 0,18 | 1,08 | ND |
| M156 | ND | 0,06 | 0,39 | ND | 0,02 | 0,11 | 0,74 | ND |
| M157 | ND | ND | 0,30 | ND | ND | 0,05 | 0,26 | ND |
| M158 | ND | 0,03 | 0,50 | ND | ND | 0,05 | 0,58 | ND |
| M159 | ND | 0,03 | 0,23 | ND | ND | 0,04 | 0,27 | ND |
| M160 | ND | ND | 0,50 | ND | ND | 0,04 | 0,48 | ND |
| M161 | ND | 0,02 | 0,44 | ND | ND | 0,03 | 0,35 | ND |
| M162 | ND | 0,04 | 0,22 | ND | ND | 0,02 | 0,19 | ND |
| M163 | ND | ND | 0,08 | ND | ND | 0,05 | 0,08 | ND |
| M164 | ND | 0,02 | 0,45 | ND | ND | 0,11 | 0,51 | ND |
| M165 | ND | ND | 0,15 | ND | ND | 0,05 | 0,08 | ND |
| M166 | ND | 0,13 | 0,36 | ND | 0,09 | 0,06 | 0,49 | ND |
| M167 | ND | ND | 0,26 | ND | ND | 0,02 | 0,26 | ND |
| M168 | ND | ND | 0,26 | ND | ND | 0,04 | 0,30 | ND |
| M169 | ND | 0,03 | 0,26 | ND | ND | 0,08 | 0,45 | ND |
| M170 | ND | 0,02 | 0,23 | ND | ND | 0,04 | 0,24 | ND |
| M171 | ND | 0,02 | 0,29 | ND | ND | 0,04 | 0,33 | ND |

ND: não detectado.

Em todas as amostras foi detectado pelo menos um canabinoide, mas nenhum dos canabinoides avaliados foi detectado em todas as amostras. O THC foi o mais presente, detectado em 74 amostras, seguido pelo CBN e THCA, detectados em 68 e 54 amostras, respectivamente. A Figura 8 apresenta as frequências de identificação de cada canabinoide para cada grupo de amostras.

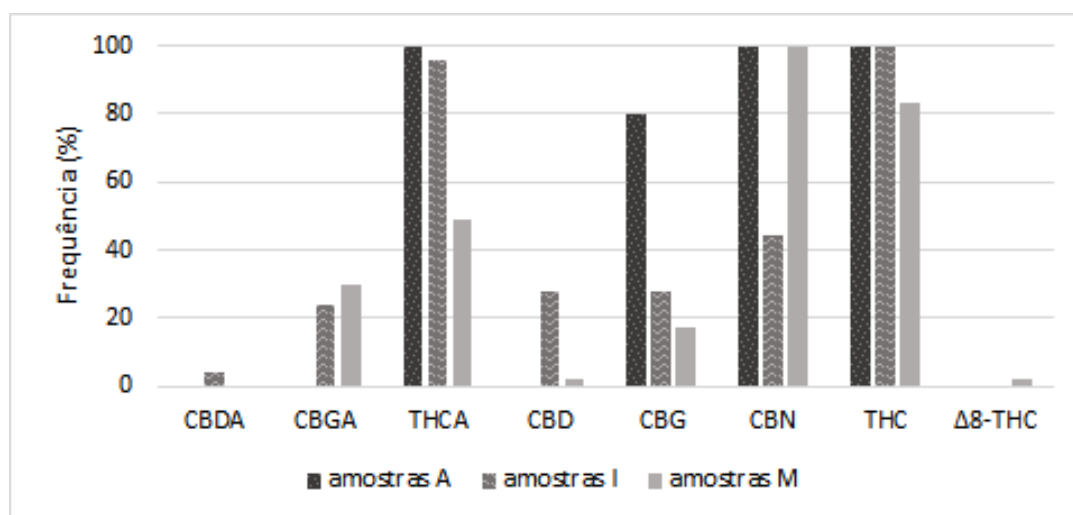


Figura 8. Frequência de identificação dos canabinoides nas amostras.

Todas as amostras “M” apresentaram CBN, sendo a concentração estimada mais alta de aproximadamente 3,41 g%, em uma amostra em que nenhum outro canabinoide foi identificado (M124). O CBN é considerado resultado da oxidação somente de THC, e portanto, assim como o THCA (precursor do THC), pode ser relacionado à potência da amostra. Além disso, o CBN é indicativo de armazenamento inadequado ou por longos períodos (HARTSEL et al., 2016).

Outros canabinoides detectados nas amostras “M” foram THC, THCA, CBGA, CBG, CBD e Δ⁸-THC. A Figura 9 apresenta um diagrama representando o quantitativo das amostras “M” contendo CBN, THC e THCA, os canabinoides mais frequentes nesse grupo. Percebe-se que em 21 delas foram detectados as três substâncias, em 18 foram detectados CBN e THC, em seis somente CBN, e em apenas duas foi detectado CBN e THCA.

Para o grupo de amostras “I”, o THC foi detectado em todas as amostras, e o THCA não foi detectado em apenas uma amostra. Neste grupo foi calculada a maior concentração de THCA, de 2,92 g% (I022). O CBN foi identificado em 11 amostras, indicando um possível armazenamento longo ou inadequado também para este grupo. Além desses canabinoides, também foram identificados CBD (7), CBG (7), CBGA (6) e

CBDA (1) em amostras do grupo “I”. Em relação ao CBD, canabinoide capaz de contrapor alguns efeitos psicoativos do THC, ele esteve mais presente nas amostras “I”, provenientes de apreensões de sementes de marcas variadas ou até mesmo sem identificação.

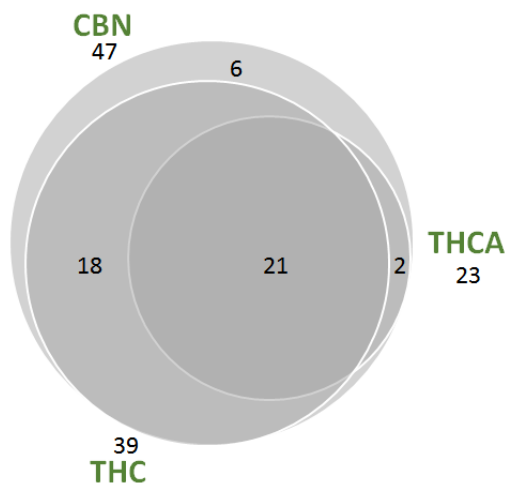


Figura 9. Diagrama ilustrativo da quantidade de amostras do grupo M contendo CBN, THC e THCA.

Já para as amostras “A”, observou-se maior homogeneidade na presença de canabinoides. Em todas as 10 amostras foram identificados CBN, THC e THCA, e em oito, CBG. Nenhum outro canabinoide foi detectado, indicando amostras de composição mais simples em relação a essas substâncias. Neste grupo foi estimada a maior concentração de THC, de 5,20 g% (A007).

O CBD é um importante modulador da atividade do THC, além de ser o metabólito da *Cannabis* de grande interesse para uso medicinal (KOWAL; HAZEKAMP; GROTENHERMEN, 2016). Apesar disso, ele e seu precursor ácido, foram pouco frequentes nas amostras (Figura 8). O CBD foi detectado principalmente nas amostras do grupo I, proveniente da apreensão de sementes que posteriormente foram cultivadas pela PFB. Somente a amostra I011 apresentou CBDA, na concentração estimada 0,80 g%, maior do que os outros canabinoides detectados nessa amostra (CBGA, THCA e THC), destoando da composição predominante de CBN, THCA e THC, que foram os canabinoides de maiores concentrações estimadas em 33, 28 e 17 amostras, respectivamente.

4.4 Conclusões

O método desenvolvido nesse trabalho pode ser usado com segurança para análise de material vegetal de canábis. As separações entre CBD e CBG e entre THC e Δ^8 -THC são pontos críticos para métodos de análise de canabinoides por LC, e nesse trabalho foi possível obter boas resoluções para esses pares (1,821 e 3,094). O método é capaz de separar e identificar de forma simultânea e confiável oito canabinoides comumente presentes nas amostras de canábis, traçando um perfil químico qualitativo que pode auxiliar a rastrear a origem de materiais apreendidos pelas forças policiais.

Os principais canabinoides encontrados nas análises das amostras foram THC, CBN, seu produto de degradação, e THCA, seu precursor biológico na canábis. Os resultados vão ao encontro de tendências mundiais associadas ao uso recreativo, que apontam para menor presença de CBD, e THC em níveis cada vez mais elevados, tanto em amostras lícitas quanto ilícitas, indo na contramão do que é preconizado para plantas de interesse medicinal. Altos teores de THC podem agravar casos de epilepsia, sendo necessário balanços específicos entre teores de CBD e THC, conforme a aplicação terapêutica pretendida.

5 CAPÍTULO II. FRAGMENTATION OF CANNABINOIDS BY FLOW
INJECTION ANALYSIS TANDEM MASS SPECTROMETRY

5.1 Manuscrito

O texto completo do capítulo II, que ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 60 – 87, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Consta da descrição de um estudo realizado a partir de experimentos de dissociação induzida por colisão com padrões de oito canabinoides e cinco amostras de canábis de diferentes procedências. Foram realizadas análises de injeção de fluxo em espectrômetro de massas de alta resolução, com objetivo de avaliar a fragmentação das substâncias ionizadas por eletrospray em modo positivo e negativo.

De acordo com o Relatório Mundial sobre Drogas de 2019 (UNODC, 2019), os produtos derivados de canábis, de maneira geral, continuam sendo as drogas ilícitas mais consumidas no mundo, sendo que praticamente todos os países do mundo produzem ou poderiam produzir a planta. Em relação ao combate ao tráfico, os esforços policiais são direcionados para investigações baseadas em informação e inteligência, incluindo operações para erradicação de cultivos de canábis em áreas críticas.

Paralelamente, há um notável aumento nas produções *indoor* em ambientes fechados e controlados (desde os mais rudimentares até os mais elaborados), que está relacionado a novas formas de tráfico internacional de drogas, como o despacho de pequenas quantidades de semente de canábis por empresas de transporte e logística. Dessa forma, sementes de diversas variedades, que produzirão plantas com diferentes especificações, têm chegado aos centros urbanos (MARIOTTI et al., 2016). Além disso, os recentes processos de liberação da canábis para uso medicinal ou recreativo originaram a existência de cultivos autorizados, tornando o processo de caracterização e estimativa em relação aos níveis de produção urgente e de difícil diagnóstico (FETT, 2017).

Nesse sentido, quanto mais abrangentes forem as informações relacionadas à dinâmica de produção e consumo de canábis e seus derivados, maior o subsídio para o desenvolvimento de mecanismos de prevenção e intervenção eficientes no combate ao uso ilícito. Esse trabalho faz parte de uma pesquisa continuada acerca do perfil químico de amostras de canábis apreendidas pela PFB, e apresentou uma avaliação qualitativa da composição de canabinoides de diferentes amostras, junto a um estudo do fragmentação dessas substâncias por FIA-ESI(\pm) MS/MS.

O método desenvolvido para avaliação do perfil qualitativo de canabinoides em material vegetal emprega uma técnica analítica (HPLC-UV) de uso corriqueiro em laboratórios de análises químicas, inclusive para análises forenses. O método descrito é capaz de identificar, em uma mesma corrida cromatográfica, oito substâncias comumente encontradas na canábis e em seus produtos derivados: CBDA, CBGA, THCA, CBD, CBG, CBN, THC e Δ^8 -THC.

Nos métodos descritos na literatura, os pares CBDA/CBGA, CBD/CBG e THC/ Δ^8 -THC muitas vezes apresentam tempos de retenção muito próximos, com baixa resolução entre os picos. Com a detecção por absorção no UV, uma boa resolução é um aspecto

crucial, já que o espectro de absorção de canabinoides é muito semelhante, apresentando, em geral, um perfil para os canabinoides neutros e outro para os ácidos. Em métodos cromatográficos com detecção por MS, a diferenciação entre os pares CBDA/CBGA e CBD/CBG pode se dar pelas massas, já que possuem fórmulas moleculares distintas. Mas, nos casos em que há coeluição do par de isômeros THC/ Δ^8 -THC, a diferenciação pode ser problemática mesmo com a detecção por MS, já que além de possuírem a mesma massa monoisotópica, a dissociação do íon molecular gera fragmentos de mesma razão m/z . No método apresentado, a otimização das condições cromatográficas permitiu separar adequadamente os pares, com valores de resolução adequados ($> 1,8$), tornando possível a identificação dos canabinoides pela detecção por absorção UV.

O método foi aplicado a diferentes amostras compartilhadas pela PFB. Apesar de ser uma técnica muito utilizada, ainda não existem trabalhos publicados com a análise de amostras brasileiras de canábis por LC-UV. Trabalhos que analisaram o conteúdo de canabinoides em amostras brasileiras empregaram GC-FID (DE OLIVEIRA et al., 2008), em uma abordagem quantitativa, e mais recentemente, de forma qualitativa, pelas técnicas de GC-MS (DOS SANTOS et al., 2018a; MARIOTTI et al., 2016), LC-MS (DOS SANTOS et al., 2018a; TOSE et al., 2017) e MS (BORILLE et al., 2017a; DOS SANTOS et al., 2018b; NASCIMENTO et al., 2015).

As análises cromatográficas das amostras avaliadas vão ao encontro da tendência mundial de produção de canábis para fins recreativos com alta potência (UNODC, 2019). Os principais canabinoides detectados foram THC, canabinoide psicoativo, CBN, seu produto de degradação, e THCA, seu precursor na planta.

A avaliação da fragmentação dos padrões de canabinoides por FIA-MS/MS foi avaliada nos modos positivo e negativo de ESI. Ambos os modos foram eficientes para a ionização das substâncias. Em análises por FIA-ESI(+) MS, observou-se sinais de íons produto nos espectros dos canabinoides, exceto para o CBN, indicando que, mesmo que ESI seja uma técnica de ionização suave, ocorre fragmentação na fonte quando canabinoides são ionizados no modo positivo.

Os experimentos de colisão induzida (FI-ESI(\pm) MS/MS) foram realizados em cada canabinoide no modo positivo e negativo de ionização. De forma geral, a ionização positiva gerou espectros com uma menor fragmentação, independente da energia de

colisão aplicada. Além disso, a discriminação entre os isômeros CBDA/THCA e Δ^8 -THC/CBD foi insatisfatória por FIA-ESI(+) MS/MS, pois os íons formados apresentaram a mesma razão m/z , com intensidades relativas muito semelhantes. Já para as análises de FIA-ESI(-) MS/MS, observou-se maior variedade na fragmentação das moléculas, facilitando a diferenciação entre elas, inclusive entre os isômeros. Sendo assim, a avaliação da fragmentação de padrões de canabinoides foi satisfatória por FIA-ESI(-) MS/MS, e a técnica foi empregada para análise de cinco amostras de canábis.

Para estas análises, o quadrupolo do equipamento foi programado para selecionar os íons moleculares correspondentes aos canabinoides avaliados. Em cada $[M-H]^-$ selecionado, foi aplicada uma energia de colisão, e os fragmentos formados foram analisados pelo ToF, gerando cinco espectros diferentes para cada amostra. Diante da complexidade dos resultados obtidos, decidiu-se por desenvolver um modelo preditivo e avaliar a capacidade de classificação de amostras cuja composição era previamente conhecida.

Foram construídos dois modelos utilizando PLS-DA. O primeiro foi elaborado considerando a predominância do íon precursor de m/z 313, relacionado aos isômeros CBD, THC e Δ^8 -THC; e o segundo considerando o íon precursor de m/z 357, relacionado aos isômeros CBDA e THCA. A predição realizada pelo segundo modelo classificou as amostras de forma mais satisfatória, sendo que as amostras T1 e T2, cujas concentrações estimadas de canabinoides ácidos era maior em relação aos neutros, foram separadas daquelas cuja concentração de CBN e/ou THC era mais significativa. As amostras T1 e T2 são provenientes de apreensões de sementes que foram posteriormente cultivadas pela PFB, e podem estar relacionadas às diferentes variedades de canábis comercializadas de forma ilegal.

O trabalho foi desenvolvido tendo em vista o cenário das análises forenses, em que apreensões de sementes, plantações e produtos prontos para o consumo são realizadas pelas equipes de perícia. Associado a ferramentas quimiométrica, o método de FIA-ESI(-) MS/MS pode ser aplicado em um grande volume de amostras de forma rápida e eficaz para classificar amostras que pertencem a um mesmo grupo - por exemplo, correlacionar amostras de diferentes apreensões a uma mesma origem geográfica.

- ✓ Foi desenvolvido um método analítico por HPLC-UV para identificação simultânea de oito canabinoides majoritariamente detectados em material vegetal;
- ✓ As amostras analisadas pelo método desenvolvido apresentaram composição condizente com o esperado, sendo o THC, CBN e THCA os canabinoides mais presentes nas amostras;
- ✓ O perfil de fragmentação de canabinoides pôde ser avaliado com êxito por FIA-ESI(-) MS/MS, com distinção entre moléculas isômeras;
- ✓ Os modelos de predição propostos por PLS-DA foram capazes de classificar amostras de material vegetal de canábis de acordo com os tipos de amostra.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, U. K.; MUNIANDY, Y.; HASSAN, M. S. Physical Analysis and Chemical Profiling of Illicit Herbal *Cannabis* using Multivariate Analysis. **Malaysian Journal of Forensic Sciences**, v. 5, n. 1, p. 26–34, 2014.

AIZPURUA-OLAIZOLA, O. et al. 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.

AIZPURUA-OLAIZOLA, O. et al. Evolution of the Cannabinoid and Terpene Content during the Growth of *Cannabis sativa* Plants from Different Chemotypes. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 2, p. 324–331, 26 fev. 2016.

AMBACH, L. et al. Simultaneous quantification of delta-9-THC, THC-acid A, CBN and CBD in seized drugs using HPLC-DAD. **Forensic Science International**, v. 243, p. 107–111, out. 2014.

BALLABIO, D.; CONSONNI, V. Classification tools in chemistry. Part 1: linear models. PLS-DA. **Analytical Methods**, v. 5, n. 16, p. 3790, 2013.

BASTOS, F. I. P. M. et al. **III Levantamento Nacional sobre o uso de drogas pela população brasileira**. Rio de Janeiro: [s.n.].

BBC. **South Africa's highest court legalises cannabis use**. Disponível em: <<https://www.bbc.com/news/world-africa-45559954>>. Acesso em: 18 jan. 2020.

BERMAN, P. et al. A new ESI-LC/MS approach for comprehensive metabolic profiling of phytocannabinoids in *Cannabis*. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 14280, 24 dez. 2018.

BORILLE, B. T. **Caracterização química da planta *Cannabis sativa* L. a partir de sementes apreendidas pela Polícia Federal no estado do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2016.

BORILLE, B. T. et al. Chemical profiling and classification of cannabis through electrospray ionization coupled to Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry and chemometrics. **Analytical Methods**, v. 9, n. 27, p. 4070–4081, 2017a.

BORILLE, B. T. et al. Near infrared spectroscopy combined with chemometrics for growth stage classification of cannabis cultivated in a greenhouse from seized seeds. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 173, p. 318–323, 2017b.

BORILLE, B. T. et al. *Cannabis sativa*: A systematic review of plant analysis. **Drug Analytical Research**, v. 1, p. 1–23, 2017c.

BRASIL. DECRETO Nº 54.216, DE 27 DE AGOSTO DE 1964. **Diário Oficial da União**, p. 7801, 1964.

BRASIL. LEI Nº 11.343, DE 23 DE AGOSTO DE 2006. **Diário Oficial da União**, 2006.

BRASIL, (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). Portaria/SVS nº 344, DE 12 DE MAIO DE 1998. **Diário Oficial da União**, 1998.

BRASIL, (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 325, DE 3 DE DEZEMBRO DE 2019. **Diário Oficial da União**, p. 85, 2019.

BRIGHENTI, V. et al. Development of a new extraction technique and HPLC method for the analysis of non-psychoactive cannabinoids in fibre-type *Cannabis sativa* L. (hemp). **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 143, p. 228–236, set. 2017.

BRIGHENTI, V. et al. Development of a new method for the analysis of cannabinoids in honey by means of high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionisation-tandem mass spectrometry detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1597, p. 179–186, jul. 2019.

BROECKER, S.; PRAGST, F. Isomerization of cannabidiol and Δ^9 -tetrahydrocannabinol during positive electrospray ionization. In-source hydrogen/deuterium exchange experiments by flow injection hybrid quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 26, n. 12, p. 1407–1414, 2012.

BROWN, A. K. et al. Validated quantitative cannabis profiling for Canadian regulatory compliance - Cannabinoids, aflatoxins, and terpenes. **Analytica Chimica Acta**, v. 1088, p. 79–88, dez. 2019.

BURNIER, C.; ESSEIVA, P.; ROUSSEL, C. Quantification of THC in *Cannabis* plants by fast-HPLC-DAD: A promising method for routine analyses. **Talanta**, v. 192, n. September 2018, p. 135–141, jan. 2019.

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

CANADA, (GOVERNMENT OF). **Cannabis Act**. Disponível em: <<https://laws-lois.justice.gc.ca/eng/acts/C-24.5/FullText.html>>. Acesso em: 18 jan. 2020.

CIOLINO, L. A.; RANIERI, T. L.; TAYLOR, A. M. Commercial cannabis consumer products part 2: HPLC-DAD quantitative analysis of cannabis cannabinoids. **Forensic Science International**, v. 289, p. 438–447, ago. 2018.

CITTI, C. et al. Medicinal cannabis: Principal cannabinoids concentration and their stability evaluated by a high performance liquid chromatography coupled to diode array and quadrupole time of flight mass spectrometry method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 128, p. 201–209, 2016.

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

CITTI, C. et al. 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, mar. 2018b.

CITTI, C. et al. Cannabinoid Profiling of Hemp Seed Oil by Liquid Chromatography Coupled to High-Resolution Mass Spectrometry. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n. February, p. 1–17, 13 fev. 2019.

CLARKE, W. **Chapter 1 - Mass spectrometry in the clinical laboratory: determining the need and avoiding pitfalls**. [s.l.] Elsevier Inc., 2017.

CORREIA, P. R. M.; FERREIRA, M. M. C. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 481–487, abr. 2007.

D'SOUZA, D. C. et al. Delta-9-tetrahydrocannabinol effects in schizophrenia: Implications for cognition, psychosis, and addiction. **Biological Psychiatry**, v. 57, n. 6, p. 594–608, mar. 2005.

DE OLIVEIRA, G. L. et al. Cannabinoid contents in cannabis products seized in São Paulo, Brazil, 2006–2007. **Forensic Toxicology**, v. 26, n. 1, p. 31–35, 20 jun. 2008.

DEI CAS, M. et al. The Italian panorama of cannabis light preparation: Determination of cannabinoids by LC-UV. **Forensic Science International**, v. 307, p. 110113, fev. 2020.

DELGADO-POVEDANO, M. M. et al. Untargeted characterization of extracts from *Cannabis sativa* L. cultivars by gas and liquid chromatography coupled to mass spectrometry in high resolution mode. **Talanta**, v. 208, n. September 2019, p. 120384, fev. 2020.

DEMARQUE, D. P. et al. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. **Natural Product Reports**, v. 33, n. 3, p. 432–455, 2016.

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

DOS SANTOS, N. et al. Analysis of Isomeric Cannabinoid Standards and Cannabis Products by UPLC-ESI-TWIM-MS: a Comparison with GC-MS and GC × GC-QMS. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 1, p. 60–70, 2018a.

DOS SANTOS, N. A. et al. Identification of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) in *Cannabis* seeds by Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry (ESI(-)FT-ICR MS). **Orbital: The Electronic Journal of Chemistry**, v. 10, n. 5, p. 381–385, 30 jun. 2018b.

ELSOHLY, M. A. **Marijuana and the Cannabinoids**. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2007.

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

FETT, M. S. **Métodos aplicados à rastreabilidade de *Cannabis sativa* L. (maconha) em território brasileiro**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2017.

GIESE, M. W. et al. Method for the Analysis of Cannabinoids and Terpenes in *Cannabis*. **Journal of AOAC International**, v. 98, n. 6, p. 1503–1522, 8 dez. 2015.

GROTENHERMEN, F. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Cannabinoids. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 42, n. 4, p. 327–360, 2003.

HÄDENER, M.; KÖNIG, S.; WEINMANN, W. Quantitative determination of CBD and THC and their acid precursors in confiscated cannabis samples by HPLC-DAD. **Forensic Science International**, v. 299, p. 142–150, jun. 2019.

HANUŠ, L. O. et al. Phytocannabinoids: a unified critical inventory. **Natural Product Reports**, v. 33, n. 12, p. 1357–1392, 2016.

HARTSEL, J. A. et al. *Cannabis sativa* and Hemp. In: GUPTA, R. C. (Ed.). **Nutraceuticals**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 735–754.

HAZEKAMP, A. et al. Chromatographic and Spectroscopic Data of Cannabinoids from *Cannabis sativa* L. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 28, n. 15, p. 2361–2382, 6 set. 2005.

HAZEKAMP, A.; GROTENHERMEN, F. Review on clinical studies with cannabis and cannabinoids 2005-2009. **Cannabinoids**, v. 5, n. Special Issue, p. 1–21, 2010.

HONÓRIO, K. M.; ARROIO, A.; DA SILVA, A. B. F. Aspectos terapêuticos de compostos da planta *Cannabis sativa*. **Quimica Nova**, v. 29, n. 2, p. 318–325, 2006.

HUESTIS, M. A. Cannabis (Marijuana) - Effects on Human Performance and Behavior. **Forensic science review**, v. 14, n. 1–2, p. 15–60, fev. 2002.

ITIS, (INTEGRATED TAXONOMIC INFORMATION SYSTEM). ***Cannabis* L.** Disponível em:

<https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&anchorLocation=SubordinateTaxa&credibilitySort=TWG_standards_met&rankName=Subspecies&search_value=19108&print_version=SCR&source=from_print#SubordinateTaxa>. Acesso em: 3 jan. 2020.

KOWAL, M.; HAZEKAMP, A.; GROTENHERMEN, F. Review on clinical studies with cannabis and cannabinoids 2010-2014. **Multiple sclerosis**, v. 6, 2016.

LAURSEN, L. Botany: The cultivation of weed. **Nature**, v. 525, n. 7570, p. S4–S5, 23 set. 2015.

LEGHISSA, A.; HILDENBRAND, Z. L.; SCHUG, K. A. A review of methods for the chemical characterization of cannabis natural products. **Journal of Separation Science**, v. 41, n. 1, p. 398–415, 2018.

MANDRIOLI, M. et al. Fast Detection of 10 Cannabinoids by RP-HPLC-UV Method in *Cannabis sativa* L. **Molecules**, v. 24, n. 11, p. 2113, 4 jun. 2019.

MARIOTTI, K. DE C. et al. Seized cannabis seeds cultivated in greenhouse: A chemical study by gas chromatography–mass spectrometry and chemometric analysis. **Science & Justice**, v. 56, n. 1, p. 35–41, jan. 2016.

MEHMEDIC, Z. et al. Potency Trends of Δ^9 -THC and Other Cannabinoids in Confiscated Cannabis Preparations from 1993 to 2008*. **Journal of Forensic Sciences**, v. 55, n. 5, p. 1209–1217, set. 2010.

MORGAN, C. J. A. et al. Cannabidiol attenuates the appetitive effects of Δ^9 -tetrahydrocannabinol in humans smoking their chosen cannabis. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 9, p. 1879–1885, 2010.

MUDGE, E. M.; MURCH, S. J.; BROWN, P. N. Leaner and greener analysis of cannabinoids. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 409, n. 12, p. 3153–3163, 23 maio 2017.

MUDGE, E. M.; MURCH, S. J.; BROWN, P. N. Chemometric Analysis of Cannabinoids: Chemotaxonomy and Domestication Syndrome. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 13090, 30 dez. 2018.

NASCIMENTO, I. R. et al. Chemical identification of cannabinoids in street marijuana samples using electrospray ionization FT-ICR mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 7, n. 4, p. 1415–1424, 2015.

NIDA, (NATIONAL INSTITUTION ON DRUG ABUSE). **DrugFacts: Marijuana**. Disponível em: <<https://www.drugabuse.gov/publications/drugfacts/marijuana>>. Acesso em: 3 jan. 2019.

OEDT, O. E. DA D. E DA T. **Relatório Europeu sobre Drogas 2018: Tendências e evoluções**. Luxemburgo: [s.n.].

PACIFICI, R. et al. Evaluation of cannabinoids concentration and stability in standardized preparations of cannabis tea and cannabis oil by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 55, n. 10, p. 1555–1563, 2017.

PAIN, S. A potted history. **Nature**, v. 525, n. 7570, p. S10–S11, 23 set. 2015.

PALMIERI, S. et al. Identification of *Cannabis sativa* L. (hemp) Retailers by Means of Multivariate Analysis of Cannabinoids. **Molecules**, v. 24, n. 19, p. 3602, 7 out. 2019.

PATEL, B.; WENE, D.; FAN, Z. T. Qualitative and quantitative measurement of

cannabinoids in cannabis using modified HPLC/DAD method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 146, p. 15–23, 2017.

PERTWEE, R. G. **Handbook of Cannabis**. Oxford: Oxford University Press, 2014.

PESCHEL, W.; POLITI, M. 1 H NMR and HPLC/DAD for Cannabis sativa L. chemotype distinction, extract profiling and specification. **Talanta**, v. 140, p. 150–165, ago. 2015.

PROTTI, M. et al. 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, n. 4, p. 539–544, 11 abr. 2019.

RFE/RL, (RADIO FREE EUROPE/RADIO LIBERTY). **Georgian Court Abolishes Fines For Marijuana Consumption**. Disponível em: <<https://www.rferl.org/a/georgian-constitutional-court-abolishes-fines-for-marijuana-consumption/29399496.html>>. Acesso em: 18 jan. 2020.

RIBEIRO, F. A. L. et al. Quimiometria: inovação no desenvolvimento e validação de métodos analíticos para controle de qualidade na indústria química. **Informativo CRQ**, v. IV, p. 14–15, 2007.

SAMHSA, (SUBSTANCE ABUSE AND MENTAL HEALTH SERVICES ADMINISTRATION). **Results from the 2018 National Survey on Drug Use and Health: Detailed tables**. Disponível em: <<https://www.samhsa.gov/data/>>. Acesso em: 3 jan. 2020.

SOLYMOSI, K.; KOFALVI, A. Cannabis: A Treasure Trove or Pandora’s Box? **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 13, p. 1223–1291, 31 jul. 2017.

TASCHWER, M.; SCHMID, M. G. Determination of the relative percentage distribution of THCA and Δ^9 -THC in herbal cannabis seized in Austria – Impact of different storage temperatures on stability. **Forensic Science International**, v. 254, p. 167–171, set. 2015.

TOSE, L. V. et al. Isomeric separation of cannabinoids by UPLC combined with ionic mobility mass spectrometry (TWIM-MS)—Part I. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 418, p. 112–121, jul. 2017.

UNODC, (UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME). **Recommended methods for the identification and analysis of cannabis and cannabis products**. New York: United Nations Publications, 2009.

UNODC, (UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME). **World Drug Report 2019**. Viena: [s.n.].

USDA, (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE). **Cannabis L**. Disponível em: <<https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=CANNA>>. Acesso em: 10 dez. 2019.

VACLAVIK, L. et al. Quantitation of Cannabinoids in *Cannabis* Dried Plant Materials,

Concentrates, and Oils Using Liquid Chromatography–Diode Array Detection Technique with Optional Mass Spectrometric Detection: Single-Laboratory Validation Study, First Action 2018.11. **Journal of AOAC International**, v. 102, n. 6, p. 1822–1833, 1 nov. 2019.

VESSECCHI, R. et al. Nomenclaturas de Espectrometria de Massas em Língua Portuguesa. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1875–1887, 2011.

WANG, Y.-H. et al. Quantitative Determination of Δ^9 -THC, CBG, CBD, Their Acid Precursors and Five Other Neutral Cannabinoids by UHPLC-UV-MS. **Planta Medica**, v. 84, n. 4, p. 260–266, 20 mar. 2018.

ZIVOVINOVIC, S. et al. Determination of cannabinoids in *Cannabis sativa* L. samples for recreational, medical, and forensic purposes by reversed-phase liquid chromatography-ultraviolet detection. **Journal of Analytical Science and Technology**, v. 9, n. 1, p. 27, 24 dez. 2018.

ZUARDI, A. W. History of cannabis as a medicine: a review. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 28, n. 2, p. 153–157, jun. 2006.