

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

**METODOLOGIAS DE DETECÇÃO E DE CONFIRMAÇÃO DE
CANABINOIDES EM AMOSTRAS BRUTAS DE *Cannabis sativa* L. E EM
AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE FLUIDO ORAL**

Jonathaline Apollo Duarte

Porto Alegre, 2021.

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

Tese de Doutorado

**METODOLOGIAS DE DETECÇÃO E DE CONFIRMAÇÃO DE
CANABINOIDES EM AMOSTRAS BRUTAS DE *Cannabis sativa* L. E EM
AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE FLUIDO ORAL**

Jonathaline Apollo Duarte

Tese apresentada por **Jonathaline
Apollo Duarte** para obtenção do TÍTULO
DE DOUTOR em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Pereira Limberger

Coorientador: Prof. Dr. Flavio Pechansky

Porto Alegre, 2021.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 29 de março de 2021, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Miriam Apel

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Dr. Adriano Otávio Maldaner

Polícia Federal – Brasil

Dr. Jorge Zacca

Polícia Federal – Brasil

Dra. Máira Kerpel dos Santos

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

CIP - Catalogação na Publicação

Duarte, Jonathaline Apollo
Metodologias de Detecção e de Confirmação de
Canabinoides em Amostras Brutas de Cannabis sativa L.
e em Amostras Biológicas de Fluido Oral / Jonathaline
Apollo Duarte. -- 2021.
210 f.
Orientadora: Renata Pereira Limberger.

Coorientador: Flávio Pechansky.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre,
BR-RS, 2021.

1. Canabinoides. 2. Dispositivos de triagem. 3.
CG/DIC e número efetivo de carbono. 4. Quimiometria.
I. Pereira Limberger, Renata, orient. II. Pechansky,
Flávio, coorient. III. Título.

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

O presente estudo foi desenvolvido sob a orientação da Profa. Dra. Renata Pereira Limberger, no Laboratório de Análises e Pesquisas em Toxicologia (LABTOXICO) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, o qual disponibilizou os equipamentos e os materiais necessários para a realização do trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus! Por me guiar e proteger sempre, por todo aprendizado adquirido com as pessoas que colocou em meu caminho, pois com algumas aprendi a como devo ser e com outras a como não ser, e principalmente, por ter me feito uma pessoa de muita sorte! Sorte de ter encontrado pessoas dispostas a me ajudar nessa caminhada e principalmente por ter nascido na família que tenho, embora não seja perfeita, é a minha família, a qual é composta por sobreviventes, empreendedores e desafiadores de barreiras. Pessoas que buscam o sim mesmo quando o não é garantido, afinal somos movidos pelo “por que não?”

Aos meus pais, Helena e Jonatas por terem me ensinado que nós somos o que queremos ser. Que por traz de toda dificuldade existe uma oportunidade de nos tornamos melhores. E que corajoso não é quem não sente medo, mas sim quem vai à luta mesmo com medo. Obrigada por sempre me lembrarem que não devo desistir no primeiro “não” e que a vida é isso, uma eterna busca pela nossa melhor versão, onde a desconstrução e a reconstrução são necessárias. E que a paciência e dedicação são uma árvore que gera belos frutos. Embora eu ache que a minha deva ser uma noqueira-pecã. Obrigada por tudo!

A minha irmã, por me ensinar que sempre é possível recomeçar e que as pessoas podem SIM falar mil coisas sobre você,mas elas NÃO podem mudar quem você realmente é! Obrigada por me ensinar que cada um da ao outro o que tem!

A Susana Apollo Duarte, minha tia, que me ajudou e incentivou durante todo o processo do doutorado. Que me amparou em diferentes momentos e foi a minha família de Porto Alegre. Obrigada tia por me mostrar que as mulheres da nossa família são mais fortes do que pensamos e que podemos sempre ser melhores do que já somos. Obrigada pelo acolhimento, carinho, panchos e por sempre se preocupar em fazer com que eu me sentisse em casa. Estar com a Sra, o Gi e o Chu fez essa caminhada ser mais leve. Obrigada por ter me recebido e pelo exemplo de ser humano que a Sra. é!

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Aos membros da banca por todo conhecimento, sugestões e tempo disponibilizado para contribuir com o presente trabalho.

Aos professores do PPGCF da UFRGS, que contribuíram para a minha formação, pelos conhecimentos compartilhados e por serem exemplos de profissionais.

Agradeço a minha orientadora, Profa. Dra. Renata Pereira Limberger. Obrigada professora por todas as oportunidades, desafios, conhecimento e experiências ofertadas durante o doutorado. Obrigada por ter confiado o conteúdo dessa tese a minha pessoa. Fazer parte do Labtoxico sem dúvida me proporcionou um crescimento profissional e pessoal imensurável. Consigo ver nitidamente a diferença entre a Jonathaline de 2017 e a de 2021. A Jonathaline de 4 anos atrás não fazia idéia do que era capaz de se tornar e aprender. Obrigada por tudo!

Ao Rafael Ortiz, agradeço pelo compartilhamento de conhecimento e a idéia da quantificação indireta de canabinoides. Sem essa troca de informação o desafio e o universo dos números de carbonos efetivos não fariam parte da minha formação. Agradeço também por todas as sugestões e contribuições fornecidas neste trabalho.

A profa. Miriam Apel por todas as sugestões e contribuições fornecidas no exame de qualificação de doutorado. Profa. obrigada pelos socorros e conversas sobre CGs!

Ao professor Andreas Mendez. Professor obrigado por todas as vezes que o Sr. abriu mão de uns minutos do seu tempo para me ajudar. E principalmente por sempre me lembrar onde eu construí a minha base. Sim, o Sr. não tem idéia de como é bacana ouvir “a Jonathaline, foi minha aluna na Unipampa”. Assim como encontrar o Sr. nos corredores e ouvir o seu “olá Jonathaline, tudo bom? Como estão as coisas? E o povo?”, fazia sentir-me em casa e pronta para voltar para a bancada e dar o meu melhor. Sem saber o Sr.

me ajudou a manter-me firme. Em busca da minha versão analítica. Obrigada de coração!

A todo o grupo Labtoxico, pela colaboração e contribuição no desenvolvimento do meu trabalho, por todo companheirismo, risadas e ajudas no desenvolvimento dos experimentos, eu aprendi muito com todos vocês!

A Marina González, agradeço por todo suporte, amizade e apoio nesses 4 anos de doutorado. Nina, você foi e é um dos muitos presentes que o doutorado me deu. Você me apresentou ao GC/MS e teve muita paciência para me ensinar a trabalhar com ele. Você esteve presente e me apoio em diversos momentos dessa jornada e não me refiro só ao profissional. Em meio a um doutorado eu aprendi com você que a reconstrução pode doer, mas que ela nos torna mais forte. Queria que você pudesse se ver como eu te vejo, para saber a pessoa incrível e a grande profissional que você é. Obrigada por tudo mesmo!

A Maíra Kerpel, por toda ajuda, sugestões e conhecimento compartilhado. Por sempre estar disposta a contribuir com o trabalho e pela amizade. Obrigada por tudo Maíra.

A Maíra Ribeiro, por toda parceria, conhecimento, ajuda, risadas e amizade. Maira você me ensinou muito. Obrigada por ser um exemplo de profissional e de pessoa. Tenho muito orgulho de ter te conhecido!

A Roberta Petry, por toda ajuda e parceria nos trabalhos. Obrigada Robe por sempre ter comprado e ser uma grande parceira das idéias de trabalho.

A Maria Cristina Frank, pelas sugestões e discussões de metodologias. Por sempre estar disposta a ajudar. Obrigada Cris, você me ajudou a me tornar uma profissional melhor.

A Juliana Butzge, agradeço pela grande amizade que construímos nesses 4 anos. Juju, você é a pessoa mais corajosa que conheço. Sim. Você é a pessoa mais gentil e generosa que tive o prazer de conviver, e ser assim no mundo que vivemos é sinônimo de coragem. Obrigada por todo o apoio, suporte, parceria, risada, abraços e por não desistir da minha pessoa. Você me

ensinou a ser uma pessoa melhor e vou te levar para a vida. Obrigada por toda paciência e por toda ajuda com as vidrarias. Você é um presente que a vida me deu. Ter a sua amizade significa muito para minha pessoa. Ju você é um ser humano incrível e uma profissional competente. Acompanhar-te nesses anos foi um prazer, crescemos juntas cada uma enfrentando e superando seus desafios. Obrigada Juju!

A Joyce Bulcão, pela parceria, amizade, companheirismo, risadas e caronas. Joy obrigada por sempre estar presente em todos os momentos. Iniciamos juntas essa jornada e aprendemos e crescemos muito durante esses anos. Obrigada por toda ajuda, acolhimento e conhecimento compartilhado. Irei te levar para a vida.

A todos os alunos de iniciação científica, em especial a Luiza Caffarate. Lu, obrigada pela parceria, comprometimento, amizade e companheirismos nesses anos. Você foi a IC que eu precisava e é uma excelente aluna!

Aos amigos antigos e novos, agradeço por todo incentivo, ajuda, conhecimento e experiências compartilhadas, vocês foram muito solidários e fazem parte dessa conquista!

Agradeço a cada pessoa que contribui e me ajudou nessa etapa!

EPIGRAFE

*Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente
você estará fazendo o impossível.*

São Francisco de Assis

RESUMO

A *Cannabis sativa* L. (Cannabaceae) é uma das drogas mais consumidas no mundo. Os efeitos psicoativos dessa planta podem ser associados majoritariamente à presença de Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), motivo pelo qual esse é considerado o marcador de escolha para análises toxicológicas conforme a legislação de diversos países. Considerando o atual cenário do Brasil, em que a legalização e/ou descriminalização da *Cannabis sativa* encontram-se em discussão, torna-se evidente a necessidade de metodologias simples, de baixo custo e que sejam confiáveis, permitindo a detecção, a identificação e a quantificação dos canabinoides presentes tanto em amostras de apreensão quanto em amostras biológicas. Assim, esta tese tem como objetivo desenvolver e validar uma metodologia analítica confirmatória para a quantificação indireta do Δ^9 -THC empregando o método de número de carbonos efetivos, bem como desenvolver uma metodologia de triagem para uma possível estimativa da idade da amostra, utilizando análise multivariada de imagens; ambas em amostras brutas de *Cannabis sativa*. Adicionalmente, desenvolver uma revisão sistemática a respeito de métodos imunocromatográficos de triagem para investigação da presença de canabinoides (Δ^9 -THC, canabidiol e canabinol) em fluido oral. No capítulo I, são apresentados os resultados da metodologia analítica proposta para a quantificação indireta de Δ^9 -THC por CBN empregando cromatografia em fase gasosa acoplada a detector de ionização de chama (CG/DIC), a qual mostrou-se viável tanto para quantificação indireta quanto para a direta de Δ^9 -THC, proporcionando resultados semelhantes em ambas as abordagens. Assim, o método pode ser considerado uma alternativa para a análise de Δ^9 -THC, permitindo análises rápidas e de baixo custo para laboratórios forenses. Após a validação do método analítico, os extratos líquidos foram fotografados e as imagens foram submetidas à análise de PCA e de HCA com o *software* ChemoStat[®] e com o aplicativo PhotoMetrix PRO[®]. No capítulo II, são apresentados os resultados desses experimentos, os quais mostram um padrão de gradiente de cor que poderia diferenciar amostras e combinar concentrações quantificadas de Δ^9 -THC e CBN, ou somente CBN. O uso de quimiometria em análises forenses pode ajudar na triagem, contribuindo na

análise de amostras brutas de *Cannabis sativa*. Por fim, no capítulo III, os resultados da revisão sistemática demonstram que apenas dois dispositivos no mercado apresentam sensibilidade e especificidade satisfatórias. Entretanto, esses testes apresentam também algumas limitações, incluindo um ponto de corte superior ao recomendado por diretrizes internacionais (2ng/mL). Assim, existe a necessidade de mais estudos na área, bem como é destacada a importância de análises confirmatórias. Dessa forma, a presente tese de doutorado consiste em três capítulos de relevância e impacto para a ciência forense, contemplando a importância do desenvolvimento de metodologias eficientes e de custo reduzido de análise para o monitoramento de canabinoides em diferentes matrizes.

Palavras-chave: canabinoides; dispositivos de triagem; CG/DIC e número efetivo de carbono; quimiometria.

ABSTRACT

Cannabis sativa L. (CANNABACEAE) is one of the most consumed drugs in the world. The psychoactive effects of this plant can be mainly associated with the presence of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), which is why it is considered the marker of choice for toxicological analyzes according to the legislation of several countries. Considering the current scenario in Brazil, in which the legalization and/or decriminalization of cannabis are under discussion, it becomes evident the need for simple, low-cost and reliable methodologies, allowing the detection, identification and quantification of cannabinoids present in both seizure and biological samples. Thus, this thesis aims to develop and validate a confirmatory analytical methodology for indirect quantification of Δ^9 -THC using the effective carbon number method, as well as to develop a screening methodology for a possible estimate of the sample age, using multivariate analysis images; both in raw cannabis samples. Additionally, develop a systematic review regarding immunochromatographic screening methods to investigate the presence of cannabinoids (Δ^9 -THC, cannabidiol and cannabinol) in oral fluid. In chapter I, the results of the proposed analytical methodology for the indirect quantification of Δ^9 -THC are presented by CBN using gas chromatography coupled to a flame ionization detector (GC/FID), which proved to be viable for both indirect and direct quantification of Δ^9 -THC, providing similar results in both approaches. Thus, the method can be considered an alternative approach for the analysis of Δ^9 -THC, allowing for fast and low-cost analysis for forensic laboratories. After validation of the analytical method, the liquid extracts were photographed and the images were subjected to analysis of PCA and HCA with the software ChemoStat[®] and with the application PhotoMetrix PRO[®]. In chapter II, the results of these experiments are presented, which show a color gradient pattern that could differentiate samples and combine quantified concentrations of Δ^9 -THC and CBN, or only CBN. The use of chemometrics in forensic analysis can help in screening, contributing to the analysis of raw cannabis samples. Finally, in Chapter III, the results of the systematic review demonstrate that only two devices on the market have satisfactory sensitivity and specificity. However, these tests also have some limitations, including a cut-off point higher than that recommended

by international guidelines (2ng/mL). Thus, there is a need for further studies in the area, as well as the importance of confirmatory analyzes is highlighted. Thus, the present doctoral thesis consists of three chapters of relevance and impact for forensic science, contemplating the importance of developing efficient and low cost analysis methodologies for monitoring cannabinoids in different matrices.

Keywords: cannabinoids; devices screening; GC/FID and effective carbon number; chemometrics.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	25
2.OBJETIVOS.....	29
2.1.Geral.....	30
2.2.Específicos.....	30
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	33
3.1. <i>Cannabis sativa</i> L.....	34
3.2. Canabinoides.....	37
3.3. Aspectos legais.....	40
3.4. Análise Toxicológica.....	43
3.4.1. Métodos de triagem.....	43
3.4.2. Método confirmatório.....	45
3.4.3. Desenvolvimento de Métodos Analíticos.....	46
3.5. Análise de canabinoides.....	48
3.6.Método do Número de Carbonos Efetivo.....	49
3.7. Análise Multivariada de Dados.....	53
3.7.1. Métodos Não-Supervisionados.....	53
3.7.2. Análise Multivariada de Imagens.....	55
3.8. Materiais biológicos para análise toxicológica de monitoramento do uso de SPAs.....	56
3.8.1. Fluido Oral.....	57
4. Capítulo I.....	61
5. Capítulo II.....	99
6. Capítulo III.....	129
7. DISCUSSÃO GERAL.....	169
8. CONCLUSÃO.....	183
9. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	185
10.REFERÊNCIAS.....	187

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01:** Florescimento da planta do sexo masculino e 36
florescimento da planta do sexo feminino
- Figura 02:** Rota biossintética dos principais canabinoides presentes 39
na planta *Cannabis sativa* L.
- Figura 03:** Linha do tempo do desenvolvimento e aplicação do 52
método de NCE para canabinoides
- Figura 04:** Localização das glândulas salivares envolvidas na 58
produção de saliva.

LISTA DE QUADROS

Quadro 01. Classificação taxonômica da <i>Cannabis sativa</i> L.	35
Quadro 02. Conceitos de métodos não-supervisionados	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Contribuições no número de carbono efetivo dos grupos 51 funcionais presentes nas moléculas de Δ^9 -THC e CBN.

LISTA DE ABREVIATURAS

AT	Acidente de Trânsito
CBC	Canabicromeno
CBCA	Ácido Canabicromênico
CBD	Canabidiol
CBDA	Ácido Canabidiólico
CBG	Canabigerol
CBGA	Ácido Canabigerólico
CBGVA	Ácido Canabigerovarínico
CBN	Canabinol
CG	Cromatografia em Fase Gasosa
CL	Cromatografia Líquida
DUID	Dirigindo sob a influência de drogas (<i>Driving Under the Influence of Drugs</i>)
DWI	Dirigir intoxicado (<i>Driving While Intoxicated</i>)
EM	Detector de Espectro de Massas
DIC	Detector de Ionização por Chama
FO	Fluido oral
FRR	Fator Resposta Relativo
FRt	Fator Resposta Teórico
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
MM	Massas Moleculares
NCE	Número de Carbono Efetivo
SNC	Sistema Nervoso Central
SPA	Substância Psicoativa
TF	Toxicologia Forense
THCA	Ácido Δ^9 -Tetraidrocanabinólico
UNODC	Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime (<i>United Nations Office on Drugs and Crime</i>)
Δ^9-THC	Δ^9 -Tetraidrocanabinol

1. INTRODUÇÃO

A *Cannabis sativa* L. (Cannabaceae) é uma das drogas mais consumidas no mundo (AIZPURUA-OLAIZOLA *et al.*, 2016). Os canabinoides presentes na *Cannabis sativa* L. são os compostos mais ativos da planta, e são secretados pelos tricomas glandulares, em conjunto com outros metabólitos secundários, como mecanismo de defesa contra herbívoros e pragas (BONINI *et al.*, 2018; CIOLINO; RANIERI; TAYLOR, 2018). O ciclo de vida da *Cannabis sativa* inclui a germinação e um estado vegetativo, seguido pela floração e pela formação de sementes e, no final, a senescência (BONINI *et al.*, 2018; GONZÁLEZ, 2018; BORILLE *et al.*, 2017b). Durante essas fases, as condições ambientais e de armazenamento de folhas, seu estágio de desenvolvimento e a genética da semente, são fatores que influenciam diretamente na composição fitoquímica da planta, bem como no teor dos canabinoides (BONINI *et al.*, 2018; GONZÁLEZ, 2018; BORILLE *et al.*, 2017b).

Apesar de a *Cannabis sativa* ser regulamentada em muitas jurisdições, essa ainda é a droga ilegal mais consumida no mundo, e seu consumo é um fenômeno cada vez mais comum (CARRIERI; MADIO; PRINCIPE, 2020; CIOLINO; RANIERI; TAYLOR, 2018; BERGERON; PAQUETTE, 2014). No Brasil, a lei nº 11.343, de 23 de agosto de 2006 institui o Sistema Nacional de Políticas Públicas sobre Drogas; esta prescreve medidas para prevenção do uso indevido, a atenção e a reinserção social de usuários e dependentes de drogas (BRASIL, 2006). Ela estabelece normas para repressão à produção não autorizada e ao tráfico ilícito de drogas como a *Cannabis sativa* e seus produtos; definindo como crimes (BRASIL, 2006). Embora a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) tenha aprovado a regulamentação de produtos de *Cannabis sativa* no país (BRASIL, 2019b), a legalização e a descriminalização da *Cannabis sativa* ainda encontra-se em discussão no Brasil. Considerando este cenário do país, é de suma importância que a ciência desenvolva metodologias eficientes, de baixo custo, de rápida análise e de fácil aplicabilidade, que permitam identificar e quantificar canabinoides em diferentes matrizes (droga bruta, medicamentos, planta, fluido oral, entre outras). Os efeitos psicoativos da planta são associados, majoritariamente, ao Δ^9 -tetraidrocanabinol (Δ^9 -THC), além deste ser uma das substâncias psicoativas (SPAs) ilícitas mais comumente detectadas em amostras de fluido

oral (ALVAREZ *et al.*, 2021; AIZPURUA-OLAIZOLA *et al.*, 2016; WOLFF; JOHNSTON, 2014). Desta forma, este passou a ser considerado o marcador de escolha para análises toxicológicas conforme a legislação de diversos países (AIZPURUA-OLAIZOLA *et al.*, 2016; UNODC, 2010b). Assim, o desenvolvimento e a aplicação de métodos analíticos confiáveis para a quantificação Δ^9 -THC em amostras de *Cannabis sativa* L. e seus derivados é de suma importância para a ciência forense

No entanto, alguns fatores devem ser considerados no planejamento e no desenvolvimento de métodos analíticos. A dificuldade na obtenção de padrões analíticos de canabinoides é um problema que impacta, significativamente, a viabilidade do desenvolvimento e da aplicação de métodos que dependam total ou parcialmente de sua utilização. No Brasil, as substâncias obtidas a partir de *C. sativa* são controladas pela portaria nº 344/98 (BRASIL, 1998), e a sua importação, seu transporte e sua utilização estão condicionados à obtenção de Autorização de Importação Específica, emitida pela ANVISA (BRASIL, 2016).

Desta forma, outro fator impactante a ser considerado, é o processo de importação dos padrões de canabinoides no país, o qual é limitado pelas cotas anuais ou suplementares para a importação (limite máximo autorizado), além dos custos relacionados à sua aquisição, que são bastante elevados. Assim, tem-se buscado alternativas eficientes para o desenvolvimento de abordagens que permitam a quantificação de substâncias controladas, a exemplo do Δ^9 -THC, de forma indireta (quantificar Δ^9 -THC por CBN), reduzindo ou eliminando a necessidade de utilização de seus padrões nas análises de rotina. Nesse contexto, o Departamento das Nações Unidas sobre Drogas e Crimes (*United Nations Office on Drugs and Crime* - UNODC) disponibilizou, em 2010, um manual intitulado *Métodos Recomendados para a Identificação e Análise de Cannabis sativa e Produtos de Cannabis sativa* (UNODC, 2010a). Esse manual prevê, entre outras abordagens, a possibilidade de quantificação de Δ^9 -THC frente a outros canabinoides como o canabinol (CBN) e o canabidiol (CBD), tendo como referenciado estudo desenvolvido em 1999 por POORTMAN-VAN der MEER e HUIZER, que considera o número de carbonos efetivos (NCE) e os Fatores de Resposta Relativos (FRR) dessas substâncias. Embora o

método seja uma das abordagens propostas no manual da UNODC, (2010a), os dados referentes à validação para a forma de quantificação indireta não foram descritos detalhadamente no manual. As ferramentas analíticas evoluíram muito nos últimos anos, fato que deve ser considerado, uma vez que o fator de resposta relativo pode variar entre equipamentos. Além disto, outras técnicas de triagem surgiram ou sofreram melhorias nos últimos anos e essas podem ser eficientes na estimativa da idade planta e do teor dos canabinoides em amostra de apreensão e/ou no monitoramento *in loco* destes em amostras de fluido oral.

Face ao exposto, a presente tese de doutorado teve por objetivo desenvolver e validar uma nova proposta de método analítico para a quantificação indireta do Δ^9 -THC frente ao CBN (canabinoide mais estável) em amostras de *Cannabis sativa* de apreensão, compartilhadas pela Polícia Federal do Rio Grande do Sul e realizar análise multivariada em imagens digitais dos extratos das amostras de *Cannabis sativa* L, com o propósito desta ser uma ferramenta qualitativa de triagem que possibilite a correlação entre a cor do extrato e seu conteúdo canabinoide para uma possível estimativa da idade da amostra. Ainda, a tese propõe a realização de uma revisão sistemática a respeito dos dispositivos imunocromatográficos de triagem utilizados para investigação da presença de canabinoides (Δ^9 -THC, CBN e CBD) em fluido oral, uma vez que inúmeros fabricantes têm investido nos últimos anos em pesquisas para aprimorar critérios como sensibilidade, especificidade, *cut-off* entre outros.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Desenvolver e validar uma metodologia analítica confirmatória para a quantificação indireta do delta-9-tetraidrocanabinol (Δ^9 -THC) em amostras de apreensão de *Cannabis sativa* L. (Cannabaceae) empregando o método de número de carbonos efetivos, bem como a aplicação de análise multivariada em imagens de extrato de *Cannabis sativa* para verificar a possibilidade de correlação entre a cor do extrato e seu conteúdo canabinoide, para uma possível estimativa da idade da amostra. Além da realização de revisão sistemática de método de triagem para investigação da presença de canabinoides (Δ^9 -terahidrocanabinol, canabidiol e canabinol) em fluido oral de condutores de veículos.

2.2. Específicos

- Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para a quantificação de delta-9-tetraidrocanabinol (Δ^9 -THC) por canabinol (CBN), por meio da aplicação do conceito de número de carbonos efetivos, empregando cromatografia em fase gasosa acoplada a detector de ionização de chama (CG/DIC);
- Aplicação da metodologia desenvolvida para quantificação de delta-9-tetraidrocanabinol (Δ^9 -THC) por canabinol (CBN) por meio da técnica de cromatografia em fase gasosa acoplada a detector de ionização por chama (CG/DIC) em amostras de apreensão de *Cannabis sativa* realizadas pela Polícia Federal do Rio Grande do Sul;
- Uso da técnica de análise multivariada em imagens (MIA) em extrato de *Cannabis sativa* para diferenciar as amostras por suas intensidades de cor, usando softwares ChemoStat® e PhotoMetrix PRO® comparados com valores quantitativos conhecidos de Δ^9 -THC e CBN para verificar a possibilidade de correlação entre a cor do extrato e seu conteúdo canabinoide, para uma possível estimativa da idade da amostra;

- Elaboração de revisão sistemática dos últimos 10 anos referente a dispositivos imunocromatográficos utilizados para detecção de canabinoides, enfocando suas principais vantagens, desvantagens e seu uso *in loco*.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. *Cannabis sativa* L.

Cannabis sativa L. é uma planta herbácea, dióica, pertencente à família Cannabaceae, conhecida também como cânhamo indiano e, embora seja originária do centro-oeste asiático, essa pode ser encontrada em todos os continentes (NATIONS, 2020; BONINI *et al.*, 2018; BRIGHENTI *et al.*, 2017; ELSOHLY *et al.*, 2017; FARAG; KAYSER, 2017).

Por se tratar de uma espécie dióica, as flores masculinas e femininas desenvolvem-se em plantas diferentes, caracterizando uma reprodução sexuada, o que permite durante o período de florescência diferenciá-las morfológicamente (NATIONS, 2020; ELSOHLY *et al.*, 2017; UNODC, 2010b). De modo geral, suas folhas são simples, palmatissectas, longo pecioladas, levemente ásperas, com seguimentos lineares, serrilhadas nas bordas, contendo número ímpares de folíolos, além de apresentarem hastes verdes, finas e fibrosas, eretas e ocas, com estrias longitudinais e tricomas, e raízes axiais (BONINI *et al.*, 2018; PASSAGLI, 2018). Também são encontrados tricomas (protuberâncias glandulares epidérmicas) revestindo as folhas, brácteas e caules da planta (BONINI *et al.*, 2018). A espécime feminina é responsável pela geração de aquênios, que são os pequenos frutos da planta, os quais são muitas vezes denominados como sementes; no entanto, a verdadeira semente encontra-se no pericarpo e são ricas em nutrientes, sendo uma forma de reserva para a fase de germinação da planta (CITTI *et al.*, 2018; UNODC, 2010b). As flores pistiladas são sensíveis, se apresentam em pares e cada uma possui uma bráctea, a qual envolve o ovário com dois estigmas projetados acima da bráctea (BONINI *et al.*, 2018; BRIGHENTI *et al.*, 2017; AIZPURUA-OLAIZOLA *et al.*, 2016; UNODC, 2010b). Já as plantas masculinas, apresentam folhas mais alongadas e suas flores (estaminadas) são compostas por cinco pétalas de coloração verde e esbranquiçado, cobertas com filamentos e cinco estames pendurados (**Figura 01**) (BONINI *et al.*, 2018; PASSAGLI, 2018; BRIGHENTI *et al.*, 2017; UNODC, 2010b).

Inicialmente a classificação taxonômica da planta foi determinada, sendo descrito na literatura três espécies (*C. sativa* L., *C. indica* L. e *C. ruderalis* J.),

que se diferenciavam na altura, estrutura das fibras e quimicamente (quantidade de substâncias psicoativas), de modo que a *Cannabis indica* L. era considerada a que apresentava maior nível de Δ^9 -THC (BONINI *et al.*, 2018; BRIGHENTI *et al.*, 2017). A *Cannabis sativa* é um gênero monotípico (**Quadro 01**) e os seus produtos derivados foram subdivididos inicialmente em três quimiotipos: planta tipo fibra, planta tipo droga e planta tipo intermediária, utilizando-se como base a razão existente entre os canabinoides presentes (**Equação 01**) (AIZPURUA-OLAIZOLA *et al.*, 2016; BORILLE, 2016). No entanto, recentemente tem se discutido a existência de um quarto e quinto quimiotipos, porém esses são encontrados em menor frequência comparados aos outros. O quarto quimiotipo apresenta o canabigerol (CBG) como principal canabinoide presente na amostra, já no quinto quimiotipo as quantidades dos canabinoides são indetectáveis ou muito baixas (BRIGHENTI *et al.*, 2017; AIZPURUA-OLAIZOLA *et al.*, 2016; BRUCI *et al.*, 2012). No Brasil, bem como em diversos países, ainda não foi implementada a distinção legal das amostras apreendidas de *C. sativa* e de produtos de *C. sativa* em seus quimiotipos (GONZÁLEZ, 2018; BORILLE *et al.*, 2017b).

Quadro 01. Classificação taxonômica da *Cannabis sativa* L. Adaptado de (ELSOHLY *et al.*, 2017).

Reino	Plantae
Sub-domínio	Tracheobionta (plantas vasculares)
Superdivisão	Spermatophyta (plantas com semente)
Divisão	Magnoliophyta (plantas com flores)
Classe	Magnolipsida (dicotiledôneas)
Subclasse	Hamamelidida
Ordem	Urticales
Família	Cannabaceae
Gênero	<i>Cannabis</i>
Espécie	<i>sativa</i>
Abreviação da Autoridade Taxonômica	<i>EU.</i>

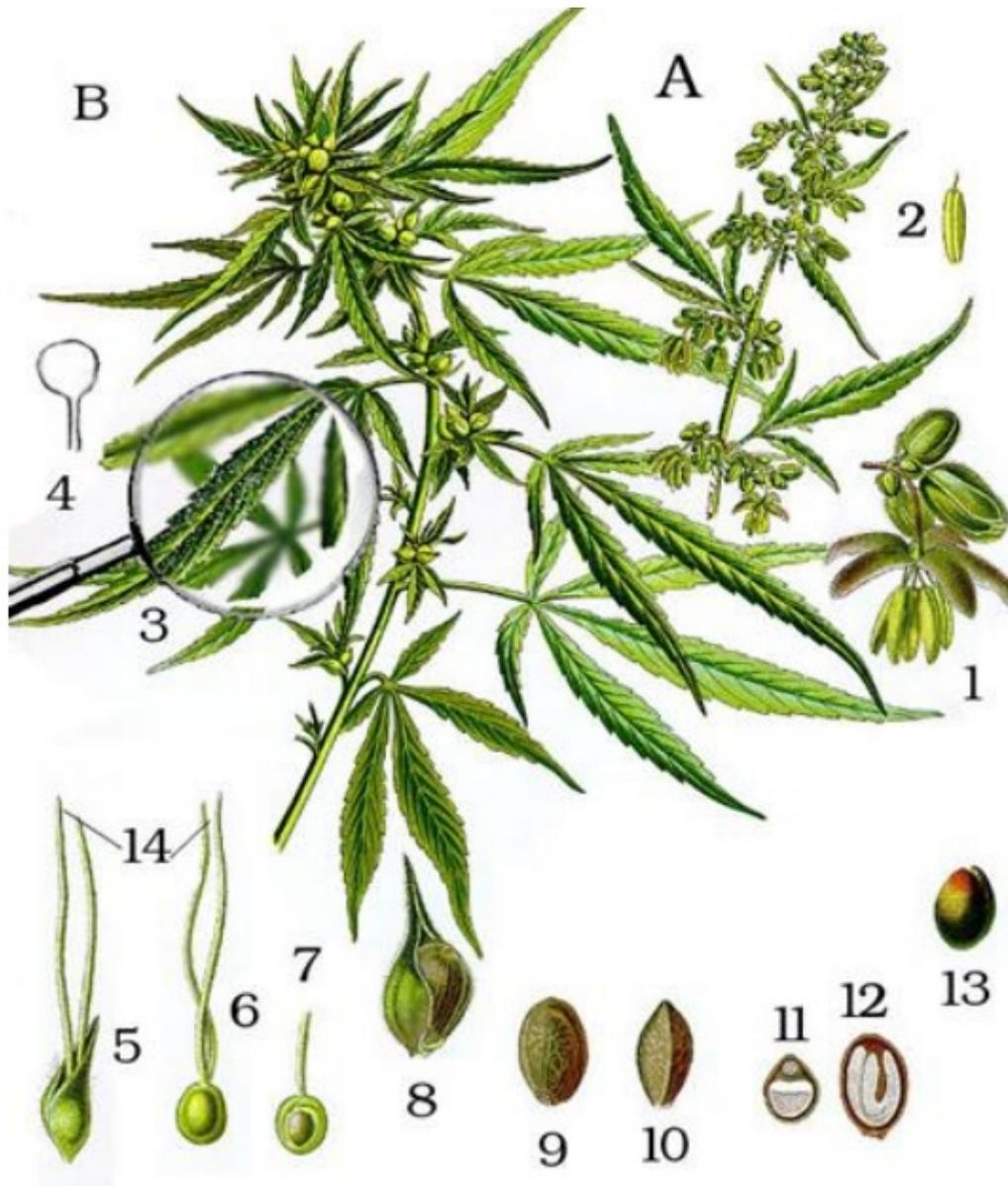


Figura 01: A- florescimento da planta do sexo masculino; B- florescimento da planta do sexo feminino; 1-conjunto de flor da planta do sexo masculino (detalhe ampliado); 2-flor da planta do sexo masculino: estame (antera e filamento curto); 3-folha da planta do sexo feminino coberta por tricomas (detalhe ampliado); 4-desenho ilustrativo de um tricoma; 5-flor da planta do sexo feminino: pistilo com bráctea; 6-flor da planta do sexo feminino: pistilo sem bráctea; 7-flor da planta do sexo feminino: pistilo mostrando ovário (secção longitudinal); 8-semente (aquênio: semente única com bráctea); 9-semente sem bráctea; 10-semente, vista lateral; 11-semente, secção transversal; 12-semente, secção longitudinal; 13-semente sem pericarpo; 14-estilos (UNODC, 2010b).

Equação 01

$$X = [\Delta^9\text{THC}] + [\text{CBN}]/[\text{CBD}]$$

Onde, $[\Delta^9\text{-THC}]$ é correspondente a área de $\Delta^9\text{-THC}$ no cromatograma obtido por CG-DIC. $X > 1$ a amostra é considerada tipo droga, enquanto que $X < 1$ a amostra é considerada tipo fibra.

Na composição fitoquímica da planta foram identificados diferentes compostos, dentre eles estavam os flavonóides, os compostos das famílias de estilbenóides, ácidos graxos, alcalóides, carboidratos e polifenóis (CALVI *et al.*, 2018; HUESTIS, 2002). Além destes, estudos realizados por volta das décadas 40 e 60 também relataram a descoberta de um grupo de metabólitos secundários que foram denominados como terpenofenólicos ou canabinoides (QAMAR *et al.*, 2021^a; FISCHEDICK *et al.*, 2010). Atualmente, foram identificados aproximadamente 554 compostos; desses, 113 são canabinoides (compostos mais ativos) e 120 são terpenos (responsável por seu aroma característico) (BONINI *et al.*, 2018; CALVI *et al.*, 2018; AIZPURUA-OLAIZOLA *et al.*, 2016). Entre os metabólitos da *Cannabis sativa* L. mais investigados hoje estão os canabinoides, fato diretamente relacionado às diferentes atividades biológicas que eles apresentam (AMIN; ALI, 2019; WHITE, 2019).

3.2. Canabinoides

Os canabinoides são os compostos mais ativos da planta, secretados pelos tricomas glandulares em conjunto com outros metabólitos secundários como mecanismo de defesa contra herbívoros e pragas (QAMAR *et al.*, 2021^a; BONINI *et al.*, 2018; CIOLINO; RANIERI; TAYLOR, 2018). Estes pertencem à uma classe de terpenofenóis, identificados na maioria das vezes pela presença do esqueleto carbônico C_{21} , além de apresentarem em suas moléculas uma estrutura lipídica com porções alquilresorcinol e monoterpênicas (BONINI *et al.*, 2018; CIOLINO; RANIERI; TAYLOR, 2018; IBRAHIM *et al.*, 2018; ELSOHLY *et al.*, 2017), e esses compostos encontram-se em maior abundância nos

tricomas glandulares presentes nas flores e inflorescências femininas não fertilizadas antes da senescência (BONINI *et al.*, 2018; LEWIS; RUSSO; SMITH, 2018). Entre fatores que influenciam nas concentrações dos canabinoides na amostra estão a quantidade de tricomas, mais abundantes em plantas femininas; os fatores genéticos da planta; as condições do solo; variações sazonais; período da colheita; período de secagem e a forma de estocagem (BONINI *et al.*, 2018; BRUCI *et al.*, 2012).

Um dos primeiros canabinoides na rota biossintética é o ácido canabigerólico (CBGA), o qual é originário da reação do ácido olivetólico com geranylpirofosfato por uma preniltransferase. Na sequência, esse sofre ação das enzimas canabinoidessintase, dando origem os ácidos tetrahydrocanabinólico (THCA), canabidiólico (CBDA) e canabicromênico (CBCA), cada um por uma sintase específica (BONINI *et al.*, 2018; AIZPURUA-OLAIZOLA *et al.*, 2016). Já o ácido canabigerovarínico (CBGVA), é originário da reação de difosfatogeranyl e ácido divarínico, e, a partir desse, são sintetizados o ácido Δ^9 -tetraidrocanabivarina (Δ^9 -THCVA), o ácido canabidivarina (CBDVA) e o ácido canabicromevarina (CBCVA). Dessa forma, na planta fresca são encontrados os precursores (ácidos), os quais, após sofrerem descarboxilação, passam a promover suas principais atividades biológicas (CARDENIA *et al.*, 2018), tornando-se esses os mais estudados (**Figura 02**) (MICALIZZI *et al.*, 2021; BONINI *et al.*, 2018; CARDENIA *et al.*, 2018; TIPPARAT *et al.*, 2012).

Estima-se que 90% do total de Δ^9 -THC na planta fresca encontra-se disponível na sua forma ácida de THCA (AMBACH *et al.*, 2014), uma vez que os canabinoides de modo geral são biossintetizados em sua forma ácida (Δ^9 -THCA, CBNA, CBDA, CBGA) (MICALIZZI *et al.*, 2021). No entanto, esses passam por um processo de descarboxilação em função da temperatura e/ou da luz, resultando na geração de suas formas neutras (Δ^9 -THC, CBN, CBD, CBG). Assim, a sua conversão em homólogos neutros é principalmente dependente de uma reação química que pode ser espontânea ou induzida pelo calor (CITTI *et al.*, 2018; AIZPURUA-OLAIZOLA *et al.*, 2014, 2016). Além da descarboxilação, os canabinoides também podem sofrer oxidação e se converterem, como no caso do Δ^9 -THC que se transforma em CBN após etapa

de oxidação, podendo essa relação ser empregada para avaliar condições e tempo de armazenamento do material vegetal (BRIGHENTI *et al.*, 2017; AIZPURUA-OLAIZOLA *et al.*, 2016; AMBACH *et al.*, 2014).

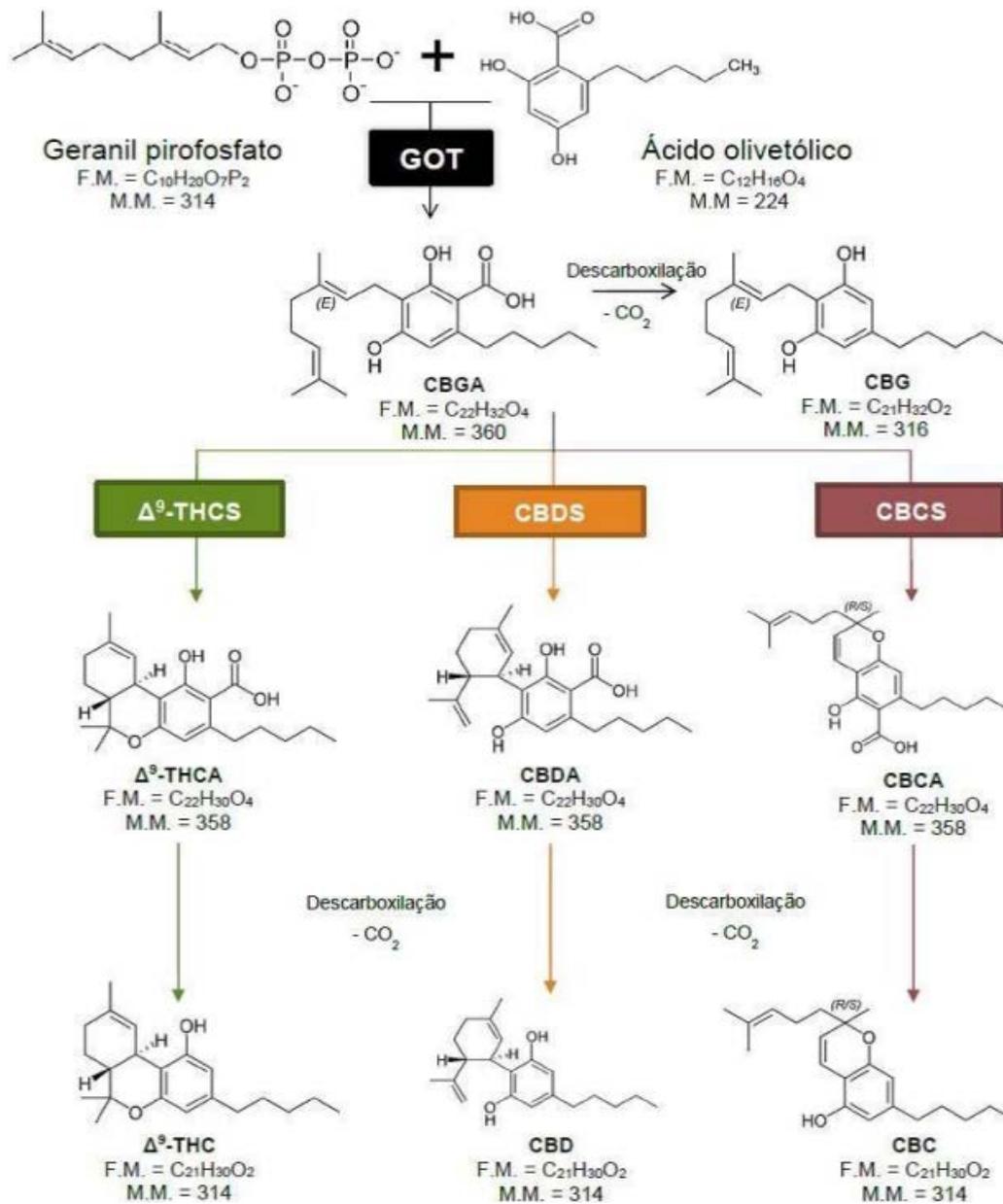


Figura 02: Rota biossintética dos principais canabinoides presentes na planta *Cannabis sativa* L. GOT: geranylpirofosfato- olivetolato geranyl transferase; CBGA: ácido canabigerólico;CBG: canabigerol; Δ⁹- THCA: ácido Δ⁹-tetrahydrocanabinólico; CBDA: ácido canabidiólico; CBCA: ácido canabicromênico; Δ⁹-THCA: ácido Δ⁹-tetrahydrocanabinólica sintase; CBDAS: ácido canabidiólica sintase;CBCAS: ácido canabicromênica sintase; Δ⁹-THC:

Δ^9 -tetrahydrocannabinol; CBD: canabidiol; CBC: canabicromeno. Fonte: Adaptado de (SALENTIJN *et al.*, 2015).

O interesse científico nos canabinoides cresceu exponencialmente nos últimos anos, devido às diferentes atividades biológicas que têm demonstrado (AMIN; ALI, 2019; WHITE, 2019; CARDENIA *et al.*, 2018). Dentre os metabólitos secundários da planta que apresentam atividades biológicas, estão: o Δ^9 -THC, principal substância psicoativa presente na planta; o CBD, atividade antiinflamatória, antiepiléptica, analgésica, neuroprotetora, antipsicótica, anticonvulsivante, anticancerígena, antioxidante entre outras; o canabinol (CBN) de efeito sedativo ou estupefaciente; o canabicromeno (CBC) que está presente na planta fresca e tem efeitos de normalização da motilidade intestinal *in vivo* em processo de inflamação; o canabicromeno (CBG), atividade antibacteriana, analgésica, antiinflamatória e a tetrahydrocannabivarina (THCV), com efeitos anoréxicos, antiepiléticos e para o tratamento da enxaqueca (BURNIER; ESSEIVA; ROUSSEL, 2019; BONINI *et al.*, 2018; CARDENIA *et al.*, 2018; CITTI *et al.*, 2018 BRIGHENTI *et al.*, 2017; AIZPURUA-OLAIZOLA *et al.*, 2014; BRUCI *et al.*, 2012). Contudo, os canabinoides não são os únicos metabólitos encontrados na planta; logo, tem-se estudado a existência de uma ação sinérgica entre os canabinoides e os terpenos frente aos receptores do sistema endocanabinoide em humanos (CALVI *et al.*, 2018; AIZPURUA-OLAIZOLA *et al.*, 2016). Desse modo, a *Cannabis sativa* L. é uma das plantas mais controversas, e muito tem-se discutido sobre o seu potencial para o tratamento de diversas patologias (AMIN; ALI, 2019; BRUCI *et al.*, 2012).

3.3. Aspectos legais

Historicamente, a *Cannabis sativa* L. é usada como planta medicinal, intoxicante e como droga (PARVEZ; LEWIS; AFZAL, 2021; SHEBABY *et al.*, 2021; FISCHEDICK *et al.*, 2010), a qual é consumida por diferentes vias, principalmente as aérea e oral (CITTI *et al.*, 2016). Os produtos mais

conhecidos obtidos do material vegetal de *Cannabis sativa* L. são a maconha, a qual consiste das folhas e principalmente dos "brotos" ou flores da planta (contém a maioria dos canabinoides psicoativos- Δ^9 -THC), a resina (também denominada de haxixe), o óleo de haxixe e as sementes de *Cannabis sativa* usadas para produzir óleo ou para ser consumida *in natura* (LEGHISSA; HILDENBRAND; SCHUG, 2018).

Embora o consumo de *Cannabis sativa* L. seja proibido em diferentes países, essa é uma das drogas mais consumidas no mundo, e o seu consumo teve um aumento significativo nos últimos 10 anos (NATIONS, 2020; ČERVENÝ *et al.*, 2017). O comércio ilícito desta afeta tanto países em desenvolvimento como desenvolvidos, justificando assim o seu controle em muitas regiões do mundo (NATIONS, 2020; PASSAGLI, 2018; AIZPURUA-OLAIZOLA *et al.*, 2016). Apesar de o seu consumo ser mais conhecido para fins recreativos, ela vem sendo empregada na terapêutica para tratamento de diversas doenças, como esclerose múltipla, dor crônica, glaucoma e asma (AMIN; ALI, 2019; AIZPURUA-OLAIZOLA *et al.*, 2014). O uso na terapêutica está associado principalmente à presença de outros canabinoides, como o CBD, que diferente do Δ^9 -THC, não apresenta atividade psicotrópica, e modula os efeitos do Δ^9 -THC (CIOLINO; RANIERI; TAYLOR, 2018; CITTI *et al.*, 2018).

Dessa forma, quando discutida a sua proibição, o principal argumento levantado está relacionado ao seu potencial risco-benefício à saúde. Entretanto, a ciência ainda carece de informações mais precisas referentes aos efeitos indesejados e/ou desejáveis do consumo de produtos de *Cannabis sativa* L. na saúde do usuário (ČERVENÝ *et al.*, 2017). Assim, tem-se estudado propostas para o uso consciente dessa planta, incluindo: a legalização, a qual resultaria na eliminação de qualquer sanção associada à posse, uso ou distribuição de quaisquer SPAs controladas; a descriminalização com remoção de conduta ou atividade da esfera do direito penal e/ou a sua despenalização o que resultaria na eliminação de multas de custódia (FÉLIX; PORTUGAL, 2017).

Legislações de vários países como Portugal e Países Baixos permitem o seu consumo e descriminalizaram a sua posse em pequenas quantidades (LEGHISSA; HILDENBRAND; SCHUG, 2018). No entanto, no Brasil a

Cannabis sativa L. e os seus produtos são proscritos e controlados pela portaria 344/98 (plantas proscritas que podem originar substâncias entorpecentes e/ou psicotrópicas – lista E) (BRASIL, 1998). Já a RDC nº 17 de maio de 2015 estabelece critérios e procedimentos para a importação, em caráter de excepcionalidade, de produtos à base de canabidiol em associação com outros canabinoides, dentre eles o Δ^9 -THC (BRASIL, 2015).

Em fevereiro de 2019, por meio da RDC nº 265, as listas de substâncias sob controle especial (anexo I) sofreram atualizações e os medicamentos registrados na ANVISA contendo CBD e Δ^9 -THC passaram a apresentar um limite de concentração de 30mg/mL para ambos os compostos (BRASIL, 2019c). No final desse mesmo ano, a ANVISA aprovou a regulamentação de produtos de *Cannabis sativa* para fins terapêuticos, de modo que o paciente passou a poder comprar o medicamento em farmácias mediante apresentação de receita médica (BRASIL, 2019b). A RDC nº 327/2019, estabelece para estes um conjunto de requisitos regulamentares mínimos, como a certificação do local de produção em Boas Práticas de Fabricação, bem como a avaliação de parâmetros básicos de qualidade, e a apresentação de comprovantes de segurança e eficácia (BRASIL, 2019a). Já a autorização individual de importação de acordo com a RDC nº 335/2020, permite que os pacientes possam também importar os produtos farmacêuticos à base de *Cannabis sativa* (BRASIL, 2020). Entretanto, é importante salientar que muitos dos produtos importados são registrados como suplementos alimentares em seus países de origem, portanto não foram sujeitos à aprovação regulamentar como medicamentos, assim, parâmetros relevantes quanto à sua qualidade, segurança e eficácia podem ter sido negligenciados. Além disso, outro fator a ser avaliado é que apesar dos avanços recentes no marco regulatório do país em relação à *C. sativa* medicinal, existe uma parcela da população que ainda tem acesso limitado a produtos farmacêuticos de qualidade. Fato que contribui para que estes recorram a alternativas como o autocultivo ou redes de distribuição ilegais. Por se tratar de produtos clandestinos, os pacientes acabam por colocar a sua saúde em risco, considerando que são produtos sem controle de qualidade. Com base nessas informações, torna-se evidente que, para fins forenses e legislativos, é fundamental a determinação dos

canabinoides presentes tanto em medicamentos registrados no país quanto em amostras de apreensão, permitindo a classificação do produto através da razão entre o somatório de Δ^9 -THC e CBN divididos pelo valor de CBD (tipo droga, fibra e intermediário), além de garantir a segurança do paciente (TETTEY *et al.*, 2021; HAZEKAMP; FISCHEDICK, 2012).

3.4. Análise Toxicológica

A Toxicologia Forense (TF) é uma ciência multidisciplinar que faz uso da toxicologia, química analítica e farmacologia para auxiliar a investigação médica ou legal em casos de uso de drogas de abuso, envenenamento e/ou intoxicação. O fim “forense” é designado para a aplicação desse conjunto de técnicas científicas afim de responder questões relacionadas ao direito civil ou criminal (PASSAGLI, 2018).

As análises em TF têm por objetivo investigar qualitativa e quantitativamente, por meio de métodos de triagem e confirmação, a presença de SPAs e outras substâncias que possam estar presente nas diferentes amostras, buscando elucidar a dinâmica dos casos em investigações criminais (SAMANIDOU, 2021; IALM, 2006; MANOUSI). Os resultados gerados em laboratório dependem da qualidade dos métodos empregados e da excelência na sua execução, sendo que a marcha analítica preconizada envolve desenvolvimento de testes de rastreamento, seguido de, pelo menos, um método confirmatório - cromatográficos e espectrométricos (AAFS, 2018; IALM, 2006; SWGTOX, 2013; WALSH *et al.*, 2008). O desenvolvimento de tais métodos baseia-se em diretrizes estabelecidas por órgãos como a *Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology da American Academy Of Forensic Sciences* (AAFS, 2018) e *Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime* (NATIONS, 2020). No Brasil, a maioria dos laboratórios de análises toxicológicas segue as normativas estabelecidas pelas guias supracitadas, associando-se aos guias gerais preconizados pela ANVISA.

3.4.1. Métodos de triagem

Para verificar a presença de SPAs em amostras biológicas de vítimas de AT atendidas em hospitais (pedestres, condutores e passageiros), são realizados testes de triagem, os quais têm como propósito identificar a substância de interesse de forma rápida, porém necessitando-se de análises confirmatórias posteriores (AAFS, 2018; SWGTOX, 2013; WALSH *et al.*, 2008; IALM, 2006).

Normalmente, os métodos de triagem mais empregados em pesquisa de SPAs em fluidos biológicos são colorimétricos (imunoensaios), sendo considerados como adequados aqueles que proporcionam a pesquisa de diferentes substâncias de interesse (multianalíticos), com baixo custo, fácil e rápida execução e que não tenham a necessidade de uma etapa de preparação da amostra (QAMAR *et al.*, 2021b; MOREAU; SIQUEIRA, 2015; UNODC, 2014; SWGTOX, 2013). Dentre os testes mais usados para a identificação de SPAs nos diferentes cenários relacionados a acidentes de trânsito, destaca-se o *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) o qual tem o seu mecanismo baseado em uma reação entre antígeno e anticorpo (SPA). Sua principal vantagem é a alta seletividade e sensibilidade, entretanto, requer equipamentos e local específico para processamento das análises, inviabilizando exames *in loco*. Nesse contexto, a imunocromatografia seria a técnica de escolha, contudo ainda está em desenvolvimento, com altas probabilidades de resultados equivocados, como reatividade cruzada (falso-positivo) ou imperícia de leitura (falso-negativo) como constatado em estudos que investigam motoristas que estavam dirigindo sob a influência de drogas (*Driving Under the Influence of Drugs – DUID*) em diferentes países (PECHANSKY *et al.*, 2019;; GJERDE *et al.*, 2018; DOMINGO-SALVANY *et al.*, 2017; MOREAU; SIQUEIRA, 2015; UNODC, 2014; LIMBERGER *et al.*, 2010).

Dentre as análises confirmatórias que devem ser realizadas após os testes de triagem, destacam-se a cromatografia em fase gasosa acoplada a detector de massas (CG/EM), a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de massas (CLAE/EM) e a CG-EM/EM ou CLAE-EM/EM em função da especificidade e seletividade (SWGTOX, 2013; UNODC, 2014, 2010c).

3.4.2. Métodos confirmatórios

Quando uma determinada SPA é identificada nas amostras durante a análise de triagem, é necessário que seja submetida a uma fase confirmatória por métodos analíticos que permitam separar, identificar e, se possível, quantificar, a substância de interesse, como preconizado pela SOFT em 2006. Para isso, deve-se escolher um sistema analítico que permita a geração de dados confiáveis e fidedignos após o processamento das amostras (UNODC, 2014; SWGTOX, 2013).

Durante o desenvolvimento dessa fase confirmatória, são usados métodos cromatográficos (separação) associados a espectrométricos (identificação e quantificação) (UNODC, 2014; SWGTOX, 2013; LIMBERGER *et al.*, 2010), que geralmente são a CG/EM e CLAE/EM e, em alguns casos, sugere-se o uso de um desses sistemas acoplado a mais de um sistema de espectrometria de massas (EM/EM) de forma a aumentar a sensibilidade devido à especificidade das transições.

O uso de detector de massas acoplado a técnicas cromatográficas é uma ferramenta valiosa no desenvolvimento de métodos analíticos, por contribuir no esclarecimento da estrutura em misturas complexas de compostos orgânicos (WILLARD; JR; DEAN, 1974). O conceito da EM é relativamente simples, os compostos presentes em uma amostra sofrem ionização, os íons gerados são separados a partir da sua razão massa/carga (m/z) e o número de íons formados é proporcional a cada unidade de m/z , sendo registrados em um espectro (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005). Assim, o uso de EM é considerado padrão-ouro em análises, uma vez que promove elevada especificidade e a sua associação com técnicas cromatográficas na TF, tem como propósito a detecção, identificação e quantificação de SPA e de seus respectivos derivados, com alto grau de confiabilidade, como apoio a processos judiciais (MOREAU; SIQUEIRA, 2015; SWGTOX, 2013; UNODC, 2014).

A cromatografia em fase gasosa (CG) é utilizada como método de separação para compostos que apresentam a propriedade de se volatilizar, tendo sido a primeira técnica cromatográfica a ser associada a detector de

massas (WATSON, 2012). O processamento de uma amostra por CG/EM, ocorre por meio de um fluxo gasoso que sai do sistema cromatográfico, por intermédio de colunas tubulares que conduzem até a câmara de ionização do espectrômetro de massas, fornecendo ao final, o espectro de massa do componente presente em uma amostra injetada na unidade cromatográfica (PAVIA *et al.*, 2010).

Já a cromatografia em fase líquida (CL) permite a separação de compostos solúveis na fase móvel, baseada na afinidade entre a tríade analito-eluyente-fase estacionária. A CL hifenizada à espectrometria de massas está entre as técnicas que sofreram maior incremento no seu desenvolvimento nos últimos anos (WATSON, 2012). Na CL/EM a unidade cromatográfica está acoplada ao espectrômetro (ou detector) de massas por meio de uma interface especial de modo que as substâncias presentes na amostra irão eluir pela coluna e o efluente cromatográfico seguirá o percurso do espectrômetro de massas, passando pelas etapas de ionização, fragmentação, separação, detecção e geração de seus respectivos espectros, os quais poderão ser analisados e comparados a espectros da substância de referência (PAVIA *et al.*, 2010).

Entretanto, cada técnica tem sua limitação, na CG, por exemplo, é necessário acrescentar uma etapa de derivatização ou descarboxilação, uma vez que o método não é capaz de identificar diretamente os canabinoides em sua forma ácida, diferentemente da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em que essa etapa não se faz necessária (IBRAHIM *et al.*, 2018; AIZPURUA-OLAIZOLA *et al.*, 2014) podendo se tornarem ferramentas analíticas complementares.

3.4.3. Desenvolvimento de Métodos Analíticos

Na última década, tem-se estimado que o uso de método validado seja o ponto inicial para garantir a qualidade dos resultados obtidos (BARWICK, 2016). Assim, a validação tem por objetivo comprovar a eficiência do método analítico para o propósito que esse foi desenvolvido (RAPOSO; IBELLI-BIANCO, 2020; ICH, 2005) . A eficiência de um método depende da análise de

todas as etapas e da avaliação do quanto as variáveis podem interferir na estimativa do analito na matriz por meio de ensaios experimentais (NATA, 2012; BRASIL, 2011), garantindo que todas as análises futuras forneçam resultados muito próximos ao valor real do analito investigado na amostra (RAMBLA-ALEGRE; ESTEVE-ROMERO; CARDA-BROCH, 2012). Para isso, a finalidade do método analítico deve estar bem estabelecida, uma vez que esta determinará as figuras de mérito elegíveis como parâmetros da validação em questão (RAPOSO; IBELLI-BIANCO, 2020; ICH, 2005). Os critérios de validação são dependentes das particularidades de cada técnica analítica, a qual é definida de acordo com o analito de interesse, a matriz, o tempo necessário para obtenção dos resultados e a estrutura laboratorial disponível (RUIZ-ANGEL *et al.*, 2014).

Os parâmetros normalmente avaliados na validação são seletividade, linearidade, exatidão, precisão, faixa de trabalho, limite de quantificação, limite de detecção e robustez (IBELLI-BIANCO, 2020; BRASIL, 2017b; RAPOSO; THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002). Para auxiliar na escolha dos critérios de avaliação, existem guias e documentos disponibilizados por diversos órgãos conceituados. Ano a ano, diferentes instituições internacionais e nacionais discutem e fornecem diretrizes para o processo de validação de métodos analíticos ou bioanalíticos. Entre as guias internacionais destacam-se: (1) a *Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics - Guidance for Industry* disponibilizada pelo *Food and Drug Administration* (FDA) (FDA, 2015), que descreve como realizar a elaboração do protocolo e do relatório de validação referente a determinado método analítico (FDA *et al.*, 1996); (2) as da Society of Forensic Toxicologists (IALM, 2006); (3) a *Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology*, fornecida pela SWGTOX (SWGTOX, 2013); (4) a *Guidelines for research on drugged driving* do Walsh e colaboradores, que especifica os limites de detecção e de quantificação para métodos confirmatórios em cada matriz relacionados a acidentes de trânsito. Todas são altamente empregadas em diferentes países. Já, no Brasil, a ANVISA, por meio da Resolução da Diretoria Colegiada 166/17, regulamenta a validação de métodos analíticos aplicados ao controle da qualidade de insumos farmacêuticos e medicamentos (BRASIL, 2017a). Já o

documento Orientação Sobre Validação De Métodos Analíticos do Inmetro também aborda parâmetros de validação tendo por objetivo auxiliar os laboratórios sendo desenvolvido de acordo com o descrito e preconizado nas diretrizes internacionais e este foi atualizado em 2016 (INMETRO, 2016). Além deste, há o Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, que discute e estabelece os parâmetros de desempenho e os critérios de aceitação mínimos para a validação de método analítico (BRASIL, 2011).

Com isso, o processo de validação deve ser devidamente documentado por meio de protocolos e relatórios de validação, contendo todos os detalhes de cada etapa e os resultados da aplicação do método (RUIZ-ANGEL *et al.*, 2014). Ao final, os dados analíticos devem ser devidamente registrados (BRASIL, 2015), uma vez que a validação prioriza a qualidade metrológica dos resultados (BRASIL, 2011).

3.5. Análise de canabinoides

Devido às inúmeras propriedades biológicas associadas aos diferentes canabinoides presente na planta, é imprescindível a realização da identificação e quantificação desses (CARVALHO *et al.*, 2020; WHITE, 2019; GIESE *et al.*, 2015). São descritos na literatura, diferentes métodos para a identificação e quantificação de canabinoides, tanto em extratos da planta quanto em produtos derivados dessa (IBRAHIM *et al.*, 2018; ELSOHLY *et al.*, 2017; UNODC, 2010b). O uso de ferramentas analíticas que proporcione a separação e a detecção dos compostos, como, por exemplo, o uso de técnicas cromatográficas (CG e/ou CLAE) associadas a detectores diversos, como UV, EM, FID e IV são os mais empregados na análise de canabinoides (MICALIZZI *et al.*, 2021; AIZPURUA-OLAIZOLA *et al.*, 2014; BRUCI *et al.*, 2012).

O método de CG acoplado a detector de ionização por chama (FID) ou detector de espectrômetro de massas (EM) tem sido o mais empregado nas análises forenses para a quantificação de Δ^9 -THC e CBD em produtos de

Cannabis sativa apreendidos, tornando o preparo da amostra uma etapa crítica, sendo necessária a inclusão da etapa de descarboxilação forçada (exposição à luz e/ou calor) ou etapa de derivatização (IBRAHIM *et al.*, 2018; LEGHISSA; HILDENBRAND; SCHUG, 2018; BRIGHENTI *et al.*, 2017). Assim, o preparo da amostra é dependente da finalidade do método e das condições laboratoriais disponíveis. Quando o objetivo do método for análise de teor, o processo de descarboxilação é uma alternativa que tem como vantagem ser de baixo custo; no entanto, deve ser considerada como uma etapa crítica, devido à complexidade da matriz, a qual é composta por canabinoides em sua forma ácida e neutra. Dessa forma, a determinação da temperatura ideal para esse processo é crucial para a eficiência do método, considerando que esses metabólitos são termolábeis (CITTI *et al.*, 2018). Já, quando o objetivo do método é determinação do perfil fitoquímico do material vegetal, o preparo da amostra deve apresentar uma etapa de derivatização por silição ou metilação/esterificação (LEGHISSA; HILDENBRAND; SCHUG, 2018). Entretanto, esta etapa é mais complexa e dependente de agentes derivatizantes, elevando o custo da análise (CARDENIA *et al.*, 2018; LEGHISSA; HILDENBRAND; SCHUG, 2018).

Assim, independente da ferramenta analítica e do preparo de amostra empregado no método, os laboratórios de análises devem garantir a eficiência do método por meio da realização da sua validação demonstrando que esse atende ao objetivo proposto (GIESE *et al.*, 2015; SWGTOX, 2013).

3.6. Método do Número de Carbonos Efetivos

Um fator limitante para o desenvolvimento e validação de métodos analíticos no Brasil é a obtenção de padrões analíticos de substâncias controladas pela portaria n° 344/98 (BRASIL, 1998), afetando, desse modo, as mais diferenciadas áreas relacionadas à TF. Assim, tem-se buscado alternativas eficientes para o desenvolvimento e validação de métodos analíticos que permitam a quantificação de SPAs nas mais diferenciadas matrizes forenses, brutas e biológicas, como a quantificação de Δ^9 -THC em

amostras de apreensão. No entanto, a problemática para obtenção de padrões analíticos de SPAs não é exclusividade do país e, sim, de âmbito internacional. Considerando o fator limitante, a UNODC, publicou o manual de Métodos Recomendados para a Identificação e Análise de *Cannabis sativa* e Produtos de *Cannabis sativa* (UNODC, 2010b), que preconiza, entre diferentes métodos, a possibilidade da realização da quantificação indireta de Δ^9 -THC por CBN, produto de degradação mais estável ou por CBD, canabinoides agora admitidos no Brasil, mediante prescrição médica (BRASIL, 2015).

O princípio da proposta de quantificação indireta de Δ^9 -THC por CBN baseia-se no número de carbonos efetivos (NCE) e no fator resposta relativo ou teórico (FRR ou FRt) dos dois canabinoides, permitindo a realização da sua quantificação sem que haja uso de padrão analítico para cada analito. O método do NCE foi proposto há mais de 50 anos por STERNBERG e colaboradores com o intuito de prever os fatores resposta dos analitos dos quais não se disponibilizavam padrões puros (ARH *et al.*, 2011; SOBRADO *et al.*, 2016). Com base nos estudos de STERNBERG e colaboradores (1962), o NCE pode ser previsto, calculado e a sua determinação é dada por meio das contribuições dos diferentes grupos funcionais presentes na molécula, que influenciam diretamente na resposta (FAIOLA *et al.*, 2012; JORGENSEN; PICEL; STAMOUDIS, 1990; STERNBERG, J.C., GALLAWAY, W.S., JONES, 1962; ZHU *et al.*, 2017). Já, o FRR é determinado por meio da relação existente entre as respostas das duas moléculas frente ao detector e é determinado para cada analito (DE SAINT LAUMER *et al.*, 2010).

A ferramenta analítica que melhor responde aos princípios de NCE e FRR é o cromatógrafo a gás acoplado ao detector de ionização por chama (CG/DIC) (SOBRADO *et al.*, 2016). A resposta do DIC é proporcional ao número de carbonos que constitui as moléculas orgânicas voláteis, sendo considerado o detector de escolha para ser acoplado ao cromatógrafo a gás (ZHU *et al.*, 2017; SOBRADO *et al.*, 2016), inclusive, porque é o detector de mais baixo custo de aquisição, fácil operação e robustez (POOLE, 2015; SLEMR *et al.*, 2004).

Considerando essas informações, POORTMAN-VAN der MEER e HUIZER em (POORTMAN-VAN DER MEER; HUIZER, 1999), discutiram e propuseram a aplicação do uso do FRR associado ao NCE para a quantificação de Δ^9 -THC por CBN e/ou CBD, compostos esses estruturalmente parecidos. Assim, eles desenvolveram e aplicaram uma fórmula matemática (**equação 02**) que permite a quantificação indireta do Δ^9 -THC por CG/DIC. A fórmula proposta utiliza um fator resposta teórico que foi previamente calculado por meio da relação existente entre o NCE e as massas moleculares (MM) de cada analito (**equação 03**). O NCE foi calculado com base em dados tabelados por STERNBERG (1962) e JORGENSEN e colaboradores (1990) disponibilizados no trabalho de POORTMAN-VAN der MEER e HUIZER em (1999) (**Tabela 01**).

Equação02

$$[\Delta^9THC] = FR_t \times [CBN] \times \frac{Área_{\Delta^9THC}}{Área_{CBN}}$$

$$[\Delta^9THC] = 1,018 \times [CBN] \times \frac{Área_{\Delta^9THC}}{Área_{CBN}}$$

Onde, a concentração de Δ^9 -THC ($[\Delta^9\text{-THC}]$) é igual ao fator resposta teórico (FRt) multiplicado pela concentração de CBN ($[CBN]$) multiplicado pela razão das áreas de Δ^9 -THC e CBN. O fator resposta relativo teórico é de 1,018.

Equação 03

$$FRt = (MM_{\Delta^9THC}/NCE_{\Delta^9THC})/(MM_{CBN}/NCE_{CBN})$$

Onde, o fator resposta relativo teórico de 1,018 é determinado pela razão entre a massa molecular de Δ^9 -THC (MM Δ^9 -THC), pelo número de carbonos efetivos de Δ^9 -THC (NCE Δ^9 -THC), divididos pela razão da massa molecular de CBN (MM CBN), pelo número de carbonos efetivos de CBN (NCE CBN). O Número de carbonos efetivos é resultante do somatório de números de carbonos e suas respectivas as contribuições.

Tabela 01: Contribuições no número de carbono efetivo dos grupos funcionais presentes nas moléculas de Δ^9 -THC e CBN. Adaptado de (POORTMAN-VAN DER MEER; HUIZER, 1999).

Grupo Funcional	Contribuição no NCE
Álcool	-0,64
Alceno	-0,05
Éter	-0,78
Fenol	-0,64

Dessa forma, este estudo tornou-se a referência base para a quantificação indireta de Δ^9 -THC por CBN e/ou CBD, e é reportado pela UNODC como um dos métodos aceitáveis e viáveis para a quantificação de Δ^9 -THC em amostras de *Cannabis sativa* ou produtos de *Cannabis sativa*. Essa metodologia é aplicada em diferentes países como, por exemplo, pela polícia judiciária de Portugal (**Figura 03**). No entanto, cabe ressaltar que é necessário o desenvolvimento e validação prévia do método por cada laboratório antes da sua aplicação na rotina.

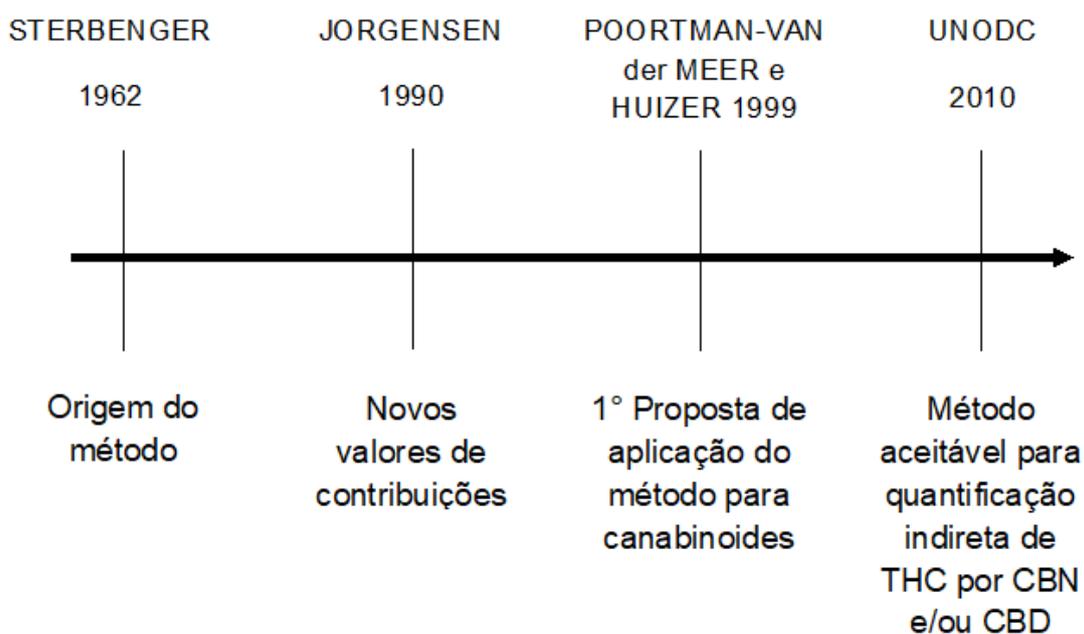


Figura03. Linha do tempo do desenvolvimento do método de referência para quantificação indireta de Δ^9 -THC por CBN e/ou CBD.

3.7. Análise Multivariada de Dados

A análise multivariada de dados envolve a aplicação de métodos matemáticos, estatísticos e computacionais para investigar, planejar e fazer previsão de conjuntos de dados de interesse químico. Uma das principais vertentes dessa ciência para uso na química analítica é o reconhecimento de padrões nas amostras, maximizando o conjunto de informações relevantes quando comparado a métodos univariados, possibilitando, por exemplo, agrupar as amostras de acordo com a sua semelhança química. Os dados químicos são arranjados em uma matriz de dados que é tratada de acordo com os métodos multivariados a serem aplicados (PÉREZ-COVA; JAUMOT; TAULER, 2021; FERREIRA, 2015; BRERETON, 2009).

Os métodos utilizados para identificar as semelhanças, as diferenças e fazer a classificação de amostras de um conjunto de dados estão divididos em métodos não-supervisionados e métodos supervisionados. Ambos se baseiam na validade das seguintes suposições: amostras do mesmo tipo são semelhantes; existem diferenças significativas entre diferentes tipos de amostras e o conjunto de medidas disponíveis é capaz de detectar as semelhanças e as diferenças. Os métodos diferem quanto à classificação das amostras, nos métodos supervisionados há informação prévia sobre o conjunto de dados e nos métodos não-supervisionados não se tem conhecimento de muitas informações sobre as amostras (FERREIRA, 2015).

Em virtude de não termos conhecimento prévio das amostras utilizadas, fizemos uso dos métodos não-supervisionados especificados a seguir:

3.7.1. Métodos Não-Supervisionados

São métodos mais simples e ao mesmo tempo eficazes para o reconhecimento de padrões e classificação de amostras a partir de análise visual dos resultados experimentais. A Análise por Agrupamento Hierárquico

(HCA) e a Análise de Componentes Principais (PCA) são dois exemplos de métodos matemáticos não-supervisionados mais utilizados e que permitem a visualização gráfica de todo o conjunto de dados, mesmo quando o número de amostras e variáveis é elevado (FERREIRA, 2015). O quadro a seguir descreve o comportamento dos dados quando do uso desses métodos (**Quadro02**).

Quadro 02. Conceitos de métodos não-supervisionados. Adaptado de Ferreira (2015).

Método	Conceito
HCA	<p>Descobre padrões naturais no conjunto de amostras, agrupando-as em classes com base na similaridade dos grupos de mesma classe e nas diferenças em grupos distintos. Uma maneira de determinar o quanto um objeto é semelhante ao outro é através do cálculo da distância entre eles, sendo a distância Euclidiana um exemplo de medida de distância utilizado. A representação gráfica obtida a partir da HCA é chamada de dendrograma, um gráfico bidimensional na forma de uma árvore hierárquica, em que os ramos da árvore representam o grau de similaridade entre as amostras.</p>
PCA	<p>Projeta os dados multivariados em um espaço de dimensão menor, reduzindo assim a dimensionalidade original do conjunto de dados sem que as relações entre as amostras sejam afetadas. Este método permite o agrupamento de amostras, mas também identifica amostras de comportamento anômalo inseridas no conjunto de dados. Há a construção de um novo sistema de eixos que são denominados rotineiramente de fatores, componentes principais, variáveis latentes ou ainda autovetores, para representar as amostras, no qual a natureza multivariada dos dados pode ser visualizada em poucas dimensões. Novas variáveis são obtidas em</p>

ordem decrescente de quantidade de informação estatística que descrevem, ou seja, a primeira componente principal aponta a direção de maior variação dos dados, a segunda, que é ortogonal à primeira, aponta outra direção que descreve a maior variação restante dos dados e assim por diante.

3.7.2. Análise Multivariada de Imagens

Uma imagem digital pode ser representada por uma matriz de dados onde cada posição contém valor discreto denominado *pixel* (*Picture element*). Um *pixel* é definido como o menor componente de uma imagem digital, que juntos formam uma imagem inteira. De modo geral, quanto maior a quantidade de *pixels* em uma imagem, maior será a sua resolução (DAMASCENO *et al.*, 2015).

As imagens podem ser monocromáticas ou coloridas. No caso das coloridas, as imagens RGB, abreviatura do sistema de cores aditivas formadas por vermelho (*red*), verde (*green*) e azul (*blue*) são as que apresentam um maior número de aplicações. Outro modelo bastante utilizado para descrever as propriedades de imagem é o HSV, onde H é definido como a matiz da cor (*hue*), S a saturação (*saturation*) e V o valor (*value*). Este modelo está ligado à percepção humana de cor. Matiz é associado ao comprimento de onda dominante em uma mistura das ondas de luz, ou seja, é o tom predominante em determinada imagem. A saturação refere-se à pureza relativa ou à quantidade de luz branca misturada à matiz, ou seja, a intensidade da cor. E o valor está relacionado ao brilho da imagem (DAMASCENO *et al.*, 2015).

As principais vantagens de procedimentos que utilizam as imagens digitais, como as análises multivariadas, são a simplicidade de uso, o baixo custo de aplicação, a rapidez de geração e a interpretação dos resultados, com possibilidade de análise *in loco* (GRASEL *et al.*, 2016). O uso desses métodos

em química analítica, por exemplo, acelera os processos produtivos e faz testagem de amostras ainda em seu desenvolvimento (BÖCK *et al.*, 2018). Igualmente, pode ser empregado em diferentes áreas como nas Ciências Forenses, concomitante a métodos instrumentais na sugestão de testes de triagem em amostras de apreensão ou análise de documentos. A exemplo, tem-se o trabalho de Gorziza *et al.* (2020), em que a análise multivariada de diferenciação de canetas utilizando imagens digitais com o aplicativo para *smartphones* de uso livre, o PhotoMetrix PRO®, onde foram aplicados os métodos não-supervisionados já citados com intuito de desenvolver a ferramenta nas perícias de documentos (GORZIZA *et al.*, 2020).

Assim, o emprego das imagens digitais nas análises multivariadas pode ser puro ou associado a métodos instrumentais com intuito de reforçar os resultados encontrados pelos métodos analíticos e/ou servirem de análise prévia ao emprego dos métodos químicos, possibilitando o direcionamento e a racionalização das análises (GRASEL *et al.*, 2016).

3.8. Materiais biológicos para análise toxicológica de monitoramento do uso de SPAs

Existem diferentes matrizes biológicas de interesse para monitoramento do uso de SPAs e seus respectivos produtos de biotransformação em vítimas de acidentes de trânsito (condutores, passageiros e pedestres), sendo as matrizes o sangue total, o fluido oral (FO) e a urina, nessa ordem de prioridade, consideradas as de escolha (MANOUSI; SAMANIDOU, 2021; WALSH *et al.*, 2008). Cada matriz apresenta suas vantagens e desvantagens, permitindo avaliar diferentes parâmetros (ex. uso recente, droga inalterada, uso pretérito, coleta *in loco*), em condutores, passageiros e pedestres envolvidos em AT, incluindo os casos onde há hospitalização. Para a investigação da relação do consumo de SPAs por condutores e seus reflexos no trânsito, é preconizado seguir diretrizes como a desenvolvida por Walsh e colaboradores de 2008 (*Guidelines for research on drugged driving*), a qual foi abordada por

pesquisadores especializados e conceituados na área, em consonância com o preconizado pela Sociedade de Toxicologia Forense e Academia Americana de Ciências Forenses (SOFT/AAFS) (IALM, 2006). Assim, é estabelecido por esse guia o uso do sangue como matriz biológica padrão-ouro, pois permite avaliar a concentração de SPAs e/ou de seus derivados, relacionando-a com alterações físicas ou clínicas do indivíduo. Na impossibilidade de coleta ou processamento do sangue total, o guia preconiza o uso de fluido oral (FO), que apresenta vantagens como facilidade de coleta *in loco* e monitoramento da droga inalterada, refletindo o uso recente com boa correlação com a concentração sanguínea de SPAs, em especial, no caso de drogas básicas. Na impossibilidade de coleta ou processamento de sangue e FO, o guia de Walsh preconiza o uso de urina como matriz biológica, com ressalvas, sobretudo relacionada à perda da correlação com o uso recente.

3.8.1. Fluido Oral (FO)

É considerado como FO a mistura de células da mucosa bucal, resíduo de alimentos e saliva (MANOUSI; SAMANIDOU, 2021; BORDIN *et al.*, 2015). O processo de salivação é desenvolvido pela ação de glândulas salivares esparsas (pequenas e bem distribuídas pela mucosa oral) e três pares de glândulas presentes na cavidade oral (GUYTON; HALL, 2015; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). As três glândulas mais envolvidas na produção da saliva são as submandibulares (células mucosas e serosas – secreção moderadamente viscosa), parótidas (células serosas – secreção de água) e as sublinguais (células mucosas e serosas - secreção viscosa), correspondendo a 70%, 25% e 5% da produção total de saliva respectivamente (**Figura 04**) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Estima-se que, diariamente, um indivíduo secreta em torno de 800 a 1500 uL de saliva em condições normais e o seu pH se mantém na faixa entre 6,0 e 7,4 (GUYTON; HALL, 2015). A saliva é composta por enzimas (lípase lingual e ptialina), glicoproteínas (mucinas), imunoglobulinas (IgA), água, lisina, lactoferrina, proteínas ricas em prolina,

eletrólitos em concentrações semelhante às encontradas no plasma (GUYTON; HALL, 2015).

Na última década, o FO vem sendo considerado uma matriz biológica de grande relevância para a investigação de SPAs (MANOUSHI; SAMANIDOU, 2021; DESROSIERS; HUESTIS, 2019; VINDENES *et al.*, 2012), destacando-se, principalmente, no monitoramento *in loco*, durante *blitz* policiais. O mecanismo de transporte das SPAs para o FO ocorre por ultrafiltração ou difusão passiva, permitindo que essas possam ser detectadas basicamente na forma inalterada. As SPAs que tendem a ser detectadas em maiores concentrações em FO são as de caráter básico (LAUDE; FILLMORE, 2016; BORDIN *et al.*, 2015).

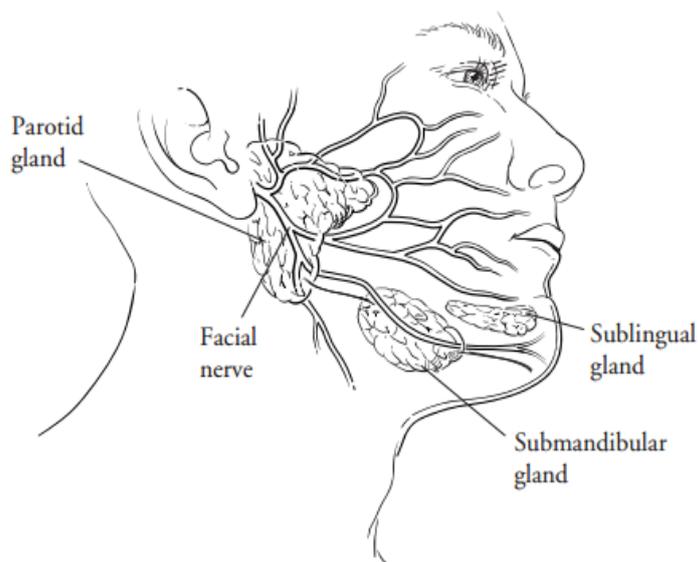


Figura 04: Localização das glândulas salivares envolvidas na produção de saliva. Fonte: Memorial Sloan Kettering Cancer Center –Sloan Kettering Institute.

O FO é considerado um material biológico de grande importância, e com crescimento significativo, para análises toxicológicas de monitoramento *in loco*, pois o FO é uma matriz que reflete uso recente de SPAs e permite traçar um paralelo com as concentrações sanguíneas (SCHERER, 2017; XU *et al.*, 2019; FIORENTIN *et al.*, 2017; ZANCANARO *et al.*, 2012; LIMBERGER *et al.*, 2010). A literatura dispõe de estudos que comprovam essa relação; o estudo

desenvolvido por Vindenes e colaboradores (VINDENES *et al.*, 2012), por exemplo, investigou em 100 amostras de FO de condutores suspeitos de direção perigosa na Noruega, constatando a presença de 25 SPAs, confirmando a sua presença no sangue, o que permitiu traçar uma relação de uso entre os dois materiais biológicos.

Além disso, a coleta de FO não é considerada invasiva, a amostragem rápida e de fácil obtenção, não gera constrangimentos ao indivíduo, permitindo a supervisão da coleta, facilidade de transporte, armazenamento e processamento, e é um método que promove baixo risco para os profissionais que irão manipular as amostras, o que justifica seu uso em inúmeros estudos de DUID (MANOUSI; SAMANIDOU, 2021; REINSTADLER *et al.*, 2019; SCHERER, 2017; FIORENTIN *et al.*, 2017; LAUDE; FILLMORE, 2016; JÚNIOR; BAPTISTA; BARBOSA, 2015; ZANCANARO *et al.*, 2012; LIMBERGER *et al.*, 2010).

4. CAPITULO I- Artigo I Quantificação de Δ^9 -tetraidrocannabinol usando o número de carbonos efetivos

4. CAPITULO I- Artigo I

O capítulo I é constituído pelo artigo científico intitulado “**Quantification of Δ^9 -tetrahydrocannabinol using the number of effective carbons approach**” em preparação para publicação no Periódico *Analytical Methods*. Consiste de desenvolvimento, validação e aplicação de um método analítico que permite a determinação indireta do teor de Δ^9 -THC e CBN em amostras de *Cannabis sativa* L., utilizando o método do número de carbono efetivo e fator resposta relativo através de cromatografia em fase gasosa acoplada ao detector de ionização de chama (CG/DIC).

**5. Capítulo II- Artigo II-
Aplicação da Análise Multivariada em Imagens Digitais de Extratos de
Cannabis sativa L- Artigo publicado na Revista Brasileira de Ciências
Policiais**

5. Capítulo II

O capítulo II é constituído pelo artigo científico intitulado “*Application of Multivariate Analysis on Digital Images of Cannabis sativa L. Extracts*”, publicado na Revista Brasileira de Ciências Policiais, Brasília, v. 11, n. 3, p. 25-48, set/dez 2020. Consta de 52 extratos de *Cannabis sativa* L. que foram fotografados e submetidos à análise de PCA e HCA pelo *software* ChemoStat® e aplicativo PhotoMetrix PRO® após serem analisadas por GC/DIC para quantificar THC e CBN. Com o propósito de diferenciar amostras de extratos de *Cannabis sativa* por suas intensidades de cor, usando técnicas de MIA. Os resultados foram comparados com valores quantitativos conhecidos de THC e CBN, utilizando o GC/DIC, com a finalidade de verificar a possibilidade de correlação entre a cor do extrato e seu conteúdo canabinoide, para uma possível estimativa de idade das amostras.

6. CAPITULO III. Dispositivos de triagem por imunocromatografia para canabinoides em amostra de fluido oral- Artigo aceito para publicação no periódico Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences

6. Capítulo III

O capítulo III é constituído pelo artigo de revisão intitulado “*Immunochemistry screening devices for cannabinoids in oral fluid sample*”, aceite para publicação no próximo semestre de 2021 no periódico Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. O presente artigo é uma revisão sistemática dos últimos 10 anos sobre dispositivos imunocromatográficos para detecção *in loco* de canabinoides em fluido oral, discutindo sua sensibilidade, especificidade, valores de corte e métodos confirmatórios. Ao final, mostram a importância da escolha de um dispositivo de triagem e reforçam a necessidade de sua implantação no Brasil.

7. DISCUSSÃO GERAL

No Brasil, apesar da legalização e da descriminalização da *Cannabis sativa* ainda encontrar-se em discussão, em dezembro de 2019 foi aprovada a regulamentação de produtos de *Cannabis sativa* no país pela ANVISA (BRASIL, 2019b), e esta tem levantado inúmeras discussões. Os avanços nos marcos regulamentários da *Cannabis sativa* medicinal no Brasil permitem por meio da autorização individual de importação que os pacientes possam obter os produtos farmacêuticos à base de *Cannabis sativa* produzidos em outros países (BRASIL, 2020). Entretanto, é importante salientar que muitos dos produtos importados são registrados como suplementos alimentares em seus países de origem, portanto não foram submetidos à aprovação regulamentar como medicamentos. Além disso, muitos pacientes ainda têm acesso limitado a estes, fato que contribui para que muitos pacientes recorram a alternativas como o autocultivo ou redes de distribuições ilegais, o que representa risco a suas saúdes. O primeiro medicamento registrado no Brasil foi o Mevatyl, o qual é constituído de um extrato hidroalcoólico de *Cannabis sativa* contendo o THC (27mg/ mL) e o CBD (25 mg/mL). Por apresentar elevada concentração de THC este é contra-indicado ao tratamento de controle de convulsões e para pacientes menores de 18 anos (CARVALHO *et al.*, 2020). Atualmente o único fitofármaco produzido e autorizado pela ANVISA no país é o canabidiol da indústria Prati-Donaduzzi, e este é isento de THC (200; 50 e 20 mg/mL de CBD na forma de solução oral) (PRATI-DONADUZZI, 2021). No entanto, cabe ressaltar que outros produtos também são importados, muitos destes são registrados como suplementos em seu país de origem. Na maioria dos rótulos destes produtos é descrito como veículo o triglicerídeo de cadeia média (TCM). Já na preparação artesanal, a resina de *Cannabis sativa* é geralmente dissolvida em óleos (de oliva, de coco ou de girassol) (CARVALHO *et al.*, 2020). Assim, a fiscalização e monitoramento com fins de saúde pública são necessárias, bem como a padronização de métodos de controle de qualidade aplicáveis ao insumo farmacêutico ativo vegetal (IFAV) e aos extratos formulados em veículos oleosos (CARVALHO *et al.*, 2020). As matérias primas utilizadas na produção dos extratos medicinais de *Cannabis sativa* são suas sumidades florais da espécie pistiladas (ricas em THCA e ou CBDA), essas são submetidas a um processo de descarboxilação por aquecimento para obtenção de seus homólogos neutros (CARVALHO *et al.*, 2020; LEWIS; RUSSO; SMITH,

2018). Contudo, as condições de armazenamento, o tempo e a temperatura da descarboxilação da matéria-prima pode favorecer o surgimento do produto de degradação do THC, o CBN. Assim o THCA, o CBDA, o THC, o CBD e o CBN são marcadores empregados no controle de qualidade de produtos medicinais de *Cannabis sativa* (CARVALHO *et al.*, 2020). Tanto para fins forenses quanto para os legislativos, uma das questões mais discutidas é a determinação dos canabinoides presentes tanto em medicamentos registrados no país quanto em amostras de apreensão, de modo a permitir a classificação do produto com base na razão entre Δ^9 -THC e CBD (tipo droga, fibra e intermediário), com o propósito de garantir a segurança do paciente (CARVALHO *et al.*, 2020; HAZEKAMP; FISCHEDICK, 2012). Assim, faz-se necessária a fiscalização e o monitoramento destes nas diferentes formas de apresentação da *Cannabis sativa*, demonstrando desta forma a necessidade do desenvolvimento e validação de métodos analíticos eficientes, rápidos e de baixo custo para identificação e quantificação dos canabinoides.

Entretanto, dentro do cenário brasileiro, principalmente para as análises forenses, existem algumas dificuldades no desenvolvimento de métodos analíticos confirmatórios, um exemplo é a obtenção de licença de importação de padrões analíticos de SPAs controladas. Dessa forma, é necessário buscar alternativas viáveis para a realização de análises toxicológicas confirmatórias para o monitoramento dos canabinoides em diferentes matrizes e cenários. Pensando nessa problemática, em 2010 a UNODC lançou um guia específico para identificação e quantificação de *Cannabis sativa* e seus derivados. Este documento traz a possibilidade de uma quantificação indireta de Δ^9 -THC por CBN. A viabilidade dessa quantificação consiste na aplicação de um fator resposta teórico, o qual a UNODC estabelece como 1, sugerindo assim, a possibilidade de desenvolver e validar um método para quantificação de CBN e aplicá-lo também a de Δ^9 -THC. O estudo base para essa abordagem é o de POORTMAN VAN DER MEER e HUIZER (1999), que propõem a quantificação de Δ^9 -THC por CBN e/ou CBD, e fundamenta o seu estudo com base no número de carbonos efetivos (NCE) e no fator resposta relativo (FRR) existente entre essas moléculas. No entanto, o manual da UNODC não fornece os dados completos referentes a validação para esse método de quantificação indireta.

Na literatura, são descritos diferentes métodos analíticos para a identificação e quantificação de canabinoides em *Cannabis sativa* L. e seus derivados (CARVALHO *et al.*, 2020; IBRAHIM *et al.*, 2018; BORILLE *et al.*, 2017a; ELSOHLY *et al.*, 2017; MARIOTTI *et al.*, 2016; UNODC, 2010b) envolvendo a aplicação de diferentes técnicas cromatográficas e detectores (CARVALHO *et al.*, 2020; BORILLE *et al.*, 2017a; AIZPURUA-OLAIZOLA *et al.*, 2014; BRUCI *et al.*, 2012). Cabe observar que estes métodos propõem quantificação direta de canabinoides, e muitos utilizam o EM como detector, sendo o estudo desenvolvido por POORTMAN VAN DER MEER e HUIZER em 1999, o último publicado que aplica o conceito de NCE e FRR para quantificação indireta de canabinoides.

Assim, nesse contexto, o capítulo I da presente tese de doutorado apresenta o desenvolvimento, a validação e a aplicação do método de quantificação indireta de Δ^9 -THC por CBN, aplicando o método de carbonos efetivos e o fator resposta relativo. Em análises forenses, é comum a determinação do teor de Δ^9 -THC total (soma dos teores de THCA e Δ^9 -THC) nas amostras de apreensão por CG/DIC ou CG/MS. O detector de ionização de chama (DIC) é a ferramenta analítica mais utilizada para cromatografia em fase gasosa, devido ao seu baixo custo de aquisição, fácil operação e robustez. Porém o CG/DIC apresenta algumas limitações, como a não detecção de canabinoides ácidos, tornando-se dependente de etapa de derivatização a qual faz uso de agente derivatizante elevando custo de análise, ou de descarboxilação por aquecimento, que é relativamente simples, rápida e de baixo custo. Para o método desenvolvido nesse estudo, o qual tem como finalidade a quantificação do teor total de Δ^9 -THC presente na amostra, optou-se por utilizar uma etapa de descarboxilação forçada por aquecimento no preparo da amostra. Este foi adaptado do descrito no manual da UNODC (2010) e representa uma etapa crítica, devido ao processo de descarboxilação por aquecimento (conversão dos canabinoides ácidos em seus homólogos neutros). O método desenvolvido foi validado e demonstrou ser adequado para a finalidade proposta, atendendo aos critérios de aceitação pré-estabelecidos para os parâmetros linearidade ($r \geq 0,99$), seletividade e especificidade, ausência de efeito matriz e *carry over*, precisão $< 7\%$ para as análises conduzidas no mesmo dia e $< 13\%$ para as análises conduzidas em dias

distintos e exatidão satisfatórias ($\leq 10\%$). Além disso, constatou-se que nenhum dos desvios observados entre os resultados obtidos aplicando a quantificação direta e a indireta era maior que 5%. A análise rápida de 12 minutos e o preparo relativamente simples de amostra demonstram a aplicabilidade do método na rotina de laboratórios forenses para análise de amostras de apreensão. A capacidade de um método analítico permanecer inalterado diante de pequenas alterações, como troca de equipamento (cromatógrafo), substituição de coluna (lotes ou fabricante diferente) e alteração do fluxo e da fase móvel (solvente ou gás de arraste) o torna um método robusto (ICH Q2(R1), 2005). Outro fator importante de ser avaliado é a estabilidade da amostra, principalmente quando se trabalha com analitos fotossensíveis e termolábeis como os canabinoides, fornecendo informações referentes ao período máximo pelo qual as soluções amostradas podem ser armazenadas antes da análise e às condições necessárias à manutenção de suas características. Desta forma, a robustez do método foi avaliada por meio de sua transposição para outro equipamento, utilizando N_2 como gás de arraste. Nessas condições, foi observada uma discreta alteração no tempo de retenção dos canabinoides (± 2 segundos), com pouco potencial de causar impactos nos resultados obtidos. A estabilidade da amostra também foi avaliada e demonstrou ser dependente das condições de armazenamento, de modo que a condição ideal foi de refrigeração, durante o período de 24 horas e a ausência de alterações significativas na amostra foi observada. Com base nos resultados, também foi possível observar que a condição menos favorável para o armazenamento da amostra foi de exposição à luz, pois foram constatadas alterações significativas desde as primeiras 24 horas, o que é perfeitamente compreensível, uma vez que os canabinoides são termolábeis e fotossensíveis. O FRR encontrado foi de 0,9637, o qual divergiu ligeiramente do descrito na literatura (FRt de 1,018 e de FR 0,982), demonstrando desta forma que o método antes de ser implementado na rotina, deve ter o FRR confirmado frente ao detector a ser usado e nas condições de trabalho do laboratório. Assim, o FRR usado nas análises deve ser condizente com as respostas reais dos analitos frente ao detector empregado e essa é variável entre equipamentos. O método foi aplicado no conjunto de 52 amostras de apreensão compartilhadas

pela Policia Federal do Rio Grande do Sul e o Δ^9 -THC foi quantificado frente ao CBN e este frente a ele mesmo.

Este método foi desenvolvido visando a sua implementação em laboratórios de toxicologia forense, sendo considerada a realidade destes no país, em que muitos não dispõem de EM. Desta forma, foi priorizado um preparo de amostra simples e independente de agente derivatizante, com uso de uma ferramenta analítica robusta e presente nestes, possibilitando uma análise do teor de Δ^9 -THC rápida e efetiva. O método atualmente usado pelo laboratório da Policia Federal do Rio Grande do Sul é um método de quantificação direta, adaptado de Broséus e colaboradores (BROSÉUS; ANGLADA; ESSEIVA, 2010). Por este método, as amostras são processadas em um CG/EM, resultando em análises de elevado custo, com tempo de análise aproximado de 26 minutos e volume de injeção de 2 μ L. Assim, o método proposto nessa tese de doutorado é plenamente adequado para análise de canabinoides e uma excelente opção na ausência do espectrômetro de massas nas unidades de criminalística. Considerando que o EM é um equipamento de maior valor aquisitivo e de maior custo de manutenção quando comparado ao DIC, e que em muitas unidades de criminalística o último é a única opção de detector, fica evidente a viabilidade da aplicação deste método.

Os resultados desse estudo contêm todas as informações necessárias para sua implementação; permitindo a compreensão do conceito do método de número de carbonos efetivos e fator resposta relativo aplicado na proposta de validação. Assim, a tese abre novas possibilidades de quantificação indireta de SPAs controladas no país, podendo o resultado ser aplicado para a quantificação de outros canabinoides e também para outras SPAs que enfrentam a mesma problemática. Além disso, o método possibilita o uso de apenas um padrão analítico para identificação e quantificação de 2 canabinoides, o que melhora a sua viabilidade economicamente, já que reduz o custo financeiro e temporal na importação dos padrões. Desse modo, o NCE e o FRR ressurgem como uma ferramenta viável para amenizar as problemáticas relacionadas com obtenção de padrões de SPAs controladas no país pela Portaria 344/98.

As análises de triagem também possuem grande relevância para a ciência forense. Esses testes permitem a redução de custos, excluindo amostras negativas antes da realização da análise confirmatória. Cabe ressaltar que as concentrações dos canabinoides nas amostras são influenciadas por inúmeros fatores, como a quantidade de tricomas; os fatores genéticos da planta; as condições do solo; variações sazonais; período da colheita; período de secagem; a forma de estocagem e a idade da planta (BONINI *et al.*, 2018; BRUCI *et al.*, 2012). Além disto, na senescência da planta também ocorre a degradação da clorofila, o que resulta na perda de cor das folhas (HÖRTENSTEINER, 2006). Nesse contexto, em estudo realizado para a planta latino-americana *Ilex paraguariensis*, a alteração da cor das suas folhas foi associada a sua degradação e idade, em termos de qualidade e armazenamento de alimentos (LEWINSKI *et al.*, 2015; NABECHIMA *et al.*, 2014). As metodologias analíticas que empregam análise multivariada de Imagens (MIA) surgem como uma opção para verificação da senescência da planta, uma vez que, a clorofila e os canabinoides sofrem degradação quando expostos a luz, a calor e a oxigênio (IBRAHIM *et al.*, 2018; BORILLE *et al.*, 2017a; ELSOHLY *et al.*, 2017; BRUCI *et al.*, 2012). Além disto, estas metodologias apresentam inúmeras vantagens como; rapidez, baixo custo, menor geração de resíduos e maior facilidade logística quando comparadas às metodologias analíticas convencionais (DAMASCENO *et al.*, 2015) e têm sido estudadas em diversas áreas de acordo com a variabilidade de cores (BRERETON, 2009). A MIA é composta por um conjunto de ferramentas que podem ser aplicadas à caracterização de diferentes amostras, como Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise de Cluster Hierárquica (HCA). Para sua aplicação, pode ser usado Software livre como ChemoStat® e PhotoMetrix PRO®. O software ChemoStat® foi projetado para análise exploratória de dados. Este software trabalha em dados espectrais, adquiridos de infravermelho ou quimiometria de imagem, para decomposição de camadas de cores por meio de pixels (HELPER *et al.*, 2015). Já o PhotoMetrix PRO® (HELPER *et al.*, 2017), foi desenvolvido para dispositivos móveis, sendo uma ferramenta de análise colorimétrica, a qual usa os métodos PCA, HCA e PLS. Exemplo disso, é o trabalho desenvolvido por Gorziza e colaboradores, onde realizou-se um estudo com tintas de caneta utilizando este software. Ao final

deste estudo, os resultados mostraram adequada diferenciação entre as canetas esferográficas coloridas e a existência de uma tendência satisfatória de separação para as diferentes marcas de canetas esferográficas azuis, mais utilizadas no Brasil (GORZIZA *et al.*, 2020). Vittorazzi e colaboradores, o utilizou para a realização de estudo para diferenciar cédulas autênticas e falsas, constatando ao final do estudo, que esta é uma ferramenta promissora para diferenciação de cédulas falsificados das verdadeiras (VITTORAZZI *et al.*, 2020). Estudo associando a cor com a concentração de canabinoide já foi descrito na literatura. Porém, utilizando outra ferramenta, Anselmo (2019) realizou análise por imagem digital para quantificação de canabinoides em *Cannabis sativa* com base na reação de Duquenois Levine. O método desenvolvido neste estudo utilizou a espuma seca de poliuretano. A imagem obtida após ser escaneada foi tratada com o auxílio do ImageJ (software de livre acesso). Este software faz a leitura de diferentes formatos de imagem e realiza funções padrão de processamento de imagem (contraste, nitidez, suavização, detecção de bordas e filtragem mediana, transformações geométricas e calibração espacial). A sua utilização em determinações quantitativas é dada pelo cálculo estatístico de valores de área e pixel em regiões selecionadas e resultando na geração de gráficos de histogramas de densidade e de perfil de linha para cada um dos canais RGB (ANSELMO, 2019; FERREIRA; RASBAND, 2012). A intensidade da cor da espuma foi responsável pela obtenção de um sinal analítico diretamente proporcional à concentração dos canabinoides, de modo a permitir a quantificação de canabinoides em amostra real (ANSELMO, 2019).

Considerando o exposto, entende-se que a MIA pode ser empregada como um método qualitativo de controle de degradação de amostra recebida e processada por laboratórios forenses. Assim o capítulo II desta tese de doutorado traz um estudo de diferenciação das amostras de extratos de *Cannabis sativa* quanto à intensidade de cor, utilizando técnicas deste método (softwares Chemostat[®] e PhotoMetrix PRO[®]). Os resultados deste foram comparados com valores de quantificação conhecidos de Δ^9 -THC e CBN, obtidos após processamento das amostras pelo método anteriormente discutido. Os resultados sugerem que os conteúdos de Δ^9 -THC e CBN em extratos de *Cannabis sativa* são reproduzíveis entre eles próprios,

possibilitando o uso do aplicativo para dispositivos móveis (Photometrix PRO®), como teste de triagem para amostras de extrato de *C. sativa*.

Outro fator a ser considerado é que os softwares Chemostat® e Photometrix PRO® são ferramentas simples e de baixo custo que podem ser úteis para a análise de amostras de *Cannabis sativa* na área forense. Porém, alguns cuidados devem ser tomados, como verificar a reprodutibilidade do uso do MIA, pois a coleta de imagens digitais por diferentes dispositivos móveis e em condições não padronizadas pode interferir nos resultados (VITTORAZZI *et al.*, 2020). Conseqüentemente é fundamental minimizar as variações, padronizando a distância de aquisição de imagem e realização de análises repetitivas para verificar a reprodutibilidade dos resultados. Ademais, seguindo os princípios básicos da ciência forense, usando diferentes métodos que têm como objetivo principal gerar os mesmos resultados, a proposta com este estudo é não correlacionar diretamente as concentrações de canabinoides com as imagens. E sim propor um método alternativo simples para o agrupamento mencionado anteriormente que podem preceder análises cromatográficas, auxiliar em estudos de perfis químicos ou simplesmente que agrupe amostras de perfis semelhantes para serem analisados em conjunto. Dessa forma, a senescência da planta, que pode ocorrer devido a degradação da clorofila, e também pela oxidação do Δ^9 -THC em CBN, pode ser observado através de um gradiente de cor que varia de intenso verde para verde mais claro, que identifica as diferenças quantificadas de canabinoides (Δ^9 -THC e CBN) entre os extratos de *Cannabis sativa* estudados.

Cabe ressaltar que a avaliação realizada baseia-se apenas na relação preliminar entre a análise de Δ^9 -THC e CBN por CG/DIC e MIA. Muitos outros metabólitos vegetais contribuem para a coloração de extratos, incluindo outros canabinoides, precursores e/ou derivados de Δ^9 -THC e CBN. Como método qualitativo de triagem, o MIA nem sempre fornecerá separação para todos grupos de amostras. Neste caso, uma ferramenta analítica, como CG/DIC, CG/EM e/ou CL/EM/EM deve ser usada, considerando a necessidade da análise confirmatória. Entretanto, o MIA pode indicar uma tendência à separação, ajudando os cientistas forenses a interpretar e diferenciar entre as amostras de *Cannabis sativa*.

Por fim, esta tese de doutorado também apresenta a discussão de métodos de triagem para canabinoides em fluido oral (FO). Os testes imunocromatográficos para FO são comumente empregados para monitoramento de drogas de abuso *in loco*. A revisão da literatura permite investigar dados de sensibilidade, especificidade e acurácia dos dispositivos utilizados em estudos de monitoramento de canabinoides *in loco*, de modo a obter informações já descritas a respeito dos dispositivos disponíveis no mercado e verificar qual destes melhor se aplica à realidade do país. O uso de SPAs como a *Cannabis sativa* para as análises forenses voltadas ao cenário do trânsito é considerado crime (HNR, 2020). Países como o Canadá e a Austrália, realizaram estudos prévios do possível reflexo da legalização da *Cannabis sativa* no trânsito. Dessa forma, estudos de desempenho dos dispositivos de triagem para monitoramento de canabinoides no fluido oral de motoristas foram realizados para posterior definição de quais dispositivos seriam aceitos e usados na rotina (CCSUA, 2020; CANADA, 2019; GJERDE *et al.*, 2018; BEIRNESS; SMITH, 2017).

No Brasil, estudos têm demonstrado que os canabinoides estão entre as principais SPAs relacionadas à acidentes de trânsito (PECHANSKY *et al.*, 2019; PELIÇÃO *et al.*, 2016; SALDANHA *et al.*, 2014). Embora haja previsão legal de monitoramento do uso de substâncias psicoativas pela lei brasileira, não está estabelecido nem regulamentado o monitoramento do uso de SPAs por condutores (PECHANSKY *et al.*, 2019; BORGES; OROZCO; MACDONALD, 2013). Assim, se faz necessário a implementação de um dispositivo de triagem no país. Desta forma, o capítulo III desta tese apresenta uma compilação de resultados de estudos anteriores sobre dispositivos imunocromatográficos para detecção de canabinoides, focando em suas principais vantagens e desvantagens.

Foi efetuada a revisão sistemática dos últimos 10 anos e selecionou-se artigos originais em 5 bases de dados (PubMed, Google Scholar, Science Direct, Scopus and Science.gov). As palavras-chaves usadas foram “*Cannabis sativa* ou canabinoides e detecção de fluido oral”, resultando em 32 artigos para análise de dispositivos imunocromatográficos e análise de canabinoides em FO *in loco*. Os artigos selecionados forneceram dados para 16 dispositivos de triagem de marcas distintas. De todos os dispositivos avaliados, apenas dois

(DrägerDrugTest®5000 e o Alere™ DDS®2) apresentaram sensibilidade e seletividade adequadas, conforme recomendação de guias internacionais ($\geq 80\%$ e $\geq 90\%$ respectivamente) (NEWMAYER *et al.*, 2017; STRANO-ROSSI *et al.*, 2012). Estes dispositivos foram utilizados em pesquisas de diferentes países, e em um número considerável de estudos apresentaram sensibilidade e especificidade superiores a 80% (GJERDE *et al.*, 2018; ROHRIG *et al.*, 2018; NEWMAYER *et al.*, 2017; BEIRNESS; SMITH, 2017; SWORTWOOD *et al.*, 2017; STRANO-ROSSI *et al.*, 2012). No entanto, é importante salientar que alguns trabalhos verificaram baixa especificidade embora tenham constatado sensibilidade satisfatória para o dispositivo DDT5000 (LEMA-ATÁN *et al.*, 2019; DOMINGO-SALVANY *et al.*, 2017). Já para os dispositivos DDS2, VEITENHEIMER e WAGNER, (2017) constataram especificidade de 100%, entretanto sensibilidade abaixo do definido nos projetos anteriormente citados (75%). Além disso, algumas limitações importantes que devem ser consideradas e aprimoradas foram constatadas, como os *cut-off* dos dispositivos que em alguns casos eram superiores ao recomendado por diretrizes internacionais (*cut-off* > 2ng/mL). A baixa sensibilidade dos testes de triagem já foi reportada em estudos de DUID (PECHANSKY *et al.*, 2019; MUSSHOF *et al.*, 2014; BLENCOWE *et al.*, 2011), e esta pode estar associada aos *cut-offs*, que para alguns dispositivos de triagem ainda são superiores ao determinados pelos laboratórios certificados (DOMINGO-SALVANY *et al.*, 2017). Já a baixa especificidade dos dispositivos de triagem para *Cannabis sativa* é mais difícil de elucidar (DOMINGO-SALVANY *et al.*, 2017). A possibilidade de reações cruzadas também deve ser considerada, uma vez que estas podem levar a resultados falsos positivos.

Apesar dos dispositivos de triagem apresentarem algumas desvantagens que devem ser consideradas, eles ainda são uma ferramenta importante e continuam sendo utilizada em alguns países. A exemplo disso, em 2015, o Serviço de Polícia Móvel Norueguês (NMPS) começou a usar o dispositivo de triagem DrägerDrugTest 5000 (DDT5000) para FO no monitoramento de DUID *in loco* de substâncias psicoativas, bem como metabolitos da *Cannabis sativa* (GJERDE *et al.*, 2018). O NMPS reportou que o dispositivo de triagem DDT5000 não identificava corretamente os infratores de DUID, porém o dispositivo ainda é uma ferramenta importante que pode auxiliar

na identificação de possíveis suspeitos de DUID (GJERDE *et al.*, 2018). Apesar das limitações, os dispositivos de triagem atualmente são, em muitos países, uma ferramenta importante e de escolha para casos de DUID. Estudo realizado na Itália com diferentes dispositivos, em que policiais treinados abordaram aleatoriamente motoristas durante patrulhas rodoviárias e coletando seus FOs reportou que apenas o DDT5000 apresentou sensibilidade aceitável para investigação *in loco* (STRANO-ROSSI *et al.*, 2012). Na Espanha, os dispositivos DDS2 e DDT5000 estão entre os dispositivos de triagem escolhidos pela lei espanhola para a Polícia Rodoviária realizar os exames *in loco* de detecção de álcool e drogas (HERRERA-GÓMEZ *et al.*, 2018). Lema-Atán e colaboradores (2019) também investigaram o desempenho do dispositivo e constataram uma sensibilidade adequada considerando os *cut-off* dos dispositivos para canabinoides (LEMA-ATÁN *et al.*, 2019). As amostras foram coletadas por policiais durante a investigação do uso de SPAs em motoristas espanhóis, entre 2013 e 2015 (LEMA-ATÁN *et al.*, 2019). No Canadá, o governo aprovou uma legislação que permitiria o uso de dispositivos de triagem para investigação *in loco* de canabinoides em FO de motoristas suspeitos (CCSUA, 2020). De acordo com este documento, o dispositivo de triagem pode ajudar a polícia a decidir quais ações serão tomadas para supostos motoristas em risco de causar um acidente (CCSUA, 2020) e permite ao oficial de trânsito decretar flagrante e remover motoristas drogados das estradas. O DrägerDrugTest® 5000 é um dos dispositivos aprovados para monitorar casos de DUID pelo governo canadense, desde que seja usado em conjunto com o dispositivo DrägerDrugTest 5000® STK-CA. Outro dispositivo aprovado inclui o SoToxa™, contanto que seja usado em conjunto com o cartucho de teste AbbottSoToxa™ e o dispositivo de coleta AbbottSoToxa™ FO (CANADA, 2019). PECHANSKY e colaboradores (2019) avaliaram quatro dispositivos para análise de triagem no trânsito brasileiro (DDS2, o DOA MultiScreen, o DrägerDrugTest 5000®, e o Multi-DrugMulti-Line Twist Screen®), usando o FO como matriz de escolha. A coleta de FO foi realizada em motoristas da região metropolitana de Porto Alegre, RS, Brasil. Ao final das análises constatou-se que cocaína e *Cannabis sativa* foram as SPAs ilícitas mais encontradas no FO dos mesmos. Além disso, foi reportado no estudo problema relacionado à leitura e coleta do material para um dos dispositivos

testados (DOA MultiScreen) (PECHANSKY *et al.*, 2019). No Brasil, o Ministério da Justiça e Segurança organizou uma equipe de trabalho composta por integrantes da Secretaria Nacional de Política de Drogas (SENAD), Polícia Rodoviária Federal (PRF) e Secretaria Nacional de Segurança Pública (SENASP), com o objetivo de assessorar na implementação do uso de dispositivos de triagem para monitoramento SPA (MJSP, 2020). Cabe ressaltar, que para obter sucesso neste processo, é imprescindível ter informações sólidas e baseadas em evidências, considerando os contextos locais (SCHERER, 2017).

Avaliando o impacto legal e emocional que os falsos positivos podem causar na vida dos motoristas que não estão sob a influência da SPA e o risco potencial que os falsos negativos representam para o trânsito, o aprimoramento dos dispositivos de triagem pelos fabricantes é essencial e tem ocorrido nos últimos anos (LEE; HUESTIS, 2014). Os resultados dos testes de triagem de drogas podem auxiliar os policiais na apuração da infração de flagrante delito, evitando possíveis acidentes de trânsito. No entanto, as análises confirmatórias por CG/EM, CG-EM/EM e/ou CL-EM/EM também são necessárias. Por todo o exposto, estas análises não devem ser avaliadas isoladamente, mas em associação com resultados confirmatórios e traços observacionais (mudanças comportamentais), para um melhor entendimento do cenário do trânsito. Cabe ressaltar que a implementação de testes de triagem de canabinoides na beira das estradas ainda pode ser muito útil por reduzir os acidentes de trânsito no Brasil, bem como em alguns países desenvolvidos que foram reportados no presente estudo (GJERDE *et al.*, 2018; ROHRIG *et al.*, 2018; BEIRNESS; SMITH, 2017; NEWMAYER *et al.*, 2017; SWORTWOOD *et al.*, 2017). Assim, os resultados encontrados nessa revisão sistemática reforçam a importância da escolha de um dispositivo de triagem e a necessidade de sua implantação no trânsito do brasileiro.

No atual cenário do país, a presente tese de doutorado consiste em três capítulos de relevância e de impacto para a ciência forense, demonstrando a importância de metodologias eficientes, rápidas e de menor custo de análise para o monitoramento de canabinoides em diferentes matrizes e cenários.

8. CONCLUSÃO GERAL

O método proposto para a quantificação indireta de Δ^9 -THC em amostras de apreensão de *Cannabis sativa* L. atendeu aos critérios de aceitação pré-estabelecidos para os parâmetros avaliados. Assim, este provou ser viável e aplicável em laboratórios forenses, e contribuirá futuramente para redução da necessidade do uso de padrões analíticos de SPAs proscritas, e para novas propostas de quantificação de analito de âmbito forense. Já, à análise de PCA e HCA realizadas pelos softwares ChemoStat[®] e o aplicativo PhotoMetrix PRO[®], mostraram um padrão de gradiente de cor que poderia diferenciar amostras e combinar concentrações quantificadas de Δ^9 -THC e CBN ou apenas CBN. Dessa forma, o uso de quimiometria em análises forenses pode ajudar na triagem analítica, mas cabe ressaltar que não é possível substituir o uso de outros métodos analíticos padrão. Assim, o presente estudo demonstra a necessidade de mais pesquisas na área, uma vez que, seu uso pode reforçar os resultados analíticos em amostras de *Cannabis sativa*. A revisão sistemática dos últimos 10 anos para dispositivos imunocromatográficos usados no monitoramento de canabinoides em fluido oral de motoristas revelou que os dispositivos de triagem ainda apresentam algumas limitações. E que apenas 2 dispositivos atendem os critérios exigidos para a sua implementação no trânsito. Demonstrando assim, a necessidade de mais estudos na área e a importância da análise confirmatória geralmente realizada por como CLAE-EM/EM, CG-EM/EM ou CG-EM. Dessa forma, as análises de triagem não devem ser avaliadas isoladamente, mas em associação com resultados confirmatórios e traços observacionais (mudanças comportamentais). Assim, a presente tese de doutorado propõe e discute metodologias eficientes, rápidas e de menor custo de análise para o monitoramento de canabinoides em diferentes matrizes e cenários.

9. PERSPECTIVAS FUTURAS

Como perspectivas futuras, o conceito de NCE e FRR poderá ser aplicado no desenvolvimento e validação de métodos analíticos para outros canabinoides proscritos no país, em diferentes matrizes, visando a quantificação desses frente ao CBD, único canabinoide sujeito a controle especial no Brasil. As metodologias analíticas que empregam análise multivariada de Imagens (MIA) surgem como uma opção para verificação da senescência da planta, uma vez que, a clorofila e os canabinoides sofrem degradação quando expostos a luz, a calor e a oxigênio. Podendo ser empregada como um método qualitativo de controle de senescência e de degradação das amostras recebidas nos laboratórios forenses. A revisão sistemática da literatura para monitoramento de canabinoides em FO *in loco* surge como trabalho de grande contribuição, de modo a contribuir para estudos futuros e nas escolhas de dispositivos de triagem para aplicação no trânsito brasileiro.

10.REFERÊNCIAS

1. AAFC, AMERICAN ACADEMY OF FORENSIC SCIENCES. **Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology** ASB Standard **036**, 2018.
2. AIZPURUA-OLAIZOLA, C., Jone; NAVARRO, Patricia; OLIVARES, Maitane; ETXEBARRIA, Nestor; USOBIAGA, Aresatz. Identification and quantification of cannabinoids in *Cannabis sativa* L. plants by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [S. l.], v. 406, n. 29, p. 7549–7560, 2014. DOI: 10.1007/s00216-014-8177-x. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-014-8177-x>.
3. AIZPURUA-OLAIZOLA, Oier; SOYDANER, Umut; ÖZTÜRK, Ekin; SCHIBANO, Daniele; SIMSIR, Yilmaz; NAVARRO, Patricia; ETXEBARRIA, Nestor; USOBIAGA, Aresatz. Evolution of the Cannabinoid and Terpene Content during the Growth of *Cannabis sativa* Plants from Different Chemotypes. **Journal of Natural Products**, [S. l.], v. 79, n. 2, p. 324–331, 2016. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.5b00949.
4. ALVAREZ, Liliana; COLONNA, Robert; KIM, Sean; CHEN, Caron; CHIPPURE, Katherine; GREWAL, Jasleen; KIMM, Chris; RANDELL, Travis; LEUNG, Victoria. Young and under the influence: A systematic literature review of the impact of cannabis on the driving performance of youth. **Accident Analysis & Prevention**, [S. l.], v. 151, n. January, p. 105961, 2021. DOI: 10.1016/j.aap.2020.105961. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aap.2020.105961>.
5. AMBACH, Lars; PENITSCHKA, Franziska; BROILLET, Alain; KÖNIG, Stefan; WEINMANN, Wolfgang; BERNHARD, Werner. Simultaneous quantification of delta-9-THC, THC-acid A, CBN and CBD in seized drugs using HPLC-DAD. **Forensic Science International**, [S. l.], v. 243, p. 107–111, 2014. DOI: 10.1016/j.forsciint.2014.06.008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2014.06.008>.
6. AMIN, Md Ruhul; ALI, Declan W. Pharmacology of Medical Cannabis. *In: Recent Advances in Cannabinoid Physiology and Pathology*. [s.l.] : Springer, Cham, 2019. p. 151–165. DOI: 10.1007/978-3-030-21737-2_8. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-21737-2_8.

7. ANSELMO, Daniela Rosa Ferreira De. **USO DE ANÁLISE POR IMAGEM DIGITAL PARA QUANTIFICAÇÃO DE CANABINÓIDES EM CANNABIS SATIVA**. 2019. Universidade Federal Fluminense, [S. l.], 2019.
8. ANZILLOTTI, Luca; CASTRIGNANÒ, Erika; ROSSI, Sabina Strano; CHIAROTTI, Marcello. Cannabinoids determination in oral fluid by SPME-GC/MS and UHPLC-MS/MS and its application on suspected drivers. **Science and Justice**, [S. l.], v. 54, n. 6, p. 421–426, 2014. DOI: 10.1016/j.scijus.2014.08.004.
9. ARH, Gregor; KLASINC, Leo; VEBER, Marjan; POMPE, Matevž. Calibration of mass selective detector in non-target analysis of volatile organic compounds in the air. **Journal of Chromatography A**, [S. l.], v. 1218, n. 11, p. 1538–1543, 2011. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.01.037.
10. ARROYO, Amparo; SANCHEZ, Marta; BARBERIA, Eneko; BARBAL, María; MARRÓN, M. Teresa; MORA, Agustí. Comparison of the Cozart DDS 801 on-site drug test device and gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) confirmation results of cannabis and cocaine in oral fluid specimens. **Australian Journal of Forensic Sciences**, [S. l.], v. 46, n. 3, p. 272–281, 2014. DOI: 10.1080/00450618.2013.832796.
11. BARWICK, V. (Editor). **Eurachem/CITAC Guide: Guide to Quality in Analytical Chemistry: An Aid to Accreditation**. 3^a ed. [s.l.: s.n.]. Disponível em: www.eurachem.org.
12. BEIRNESS, Douglas J.; SMITH, D'Arcy R. An assessment of oral fluid drug screening devices. **Canadian Society of Forensic Science Journal**, [S. l.], v. 50, n. 2, p. 55–63, 2017. DOI: 10.1080/00085030.2017.1258212. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/00085030.2017.1258212>.
13. BERGERON, Jacques; PAQUETTE, Martin. Relationships between frequency of driving under the influence of cannabis, self-reported reckless driving and risk-taking behavior observed in a driving simulator. **Journal of Safety Research**, [S. l.], v. 49, p. 19–24, 2014. DOI: 10.1016/j.jsr.2014.02.002. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022437514000206>.
14. BLENCOWE, Tom *et al.* An analytical evaluation of eight on-site oral fluid drug screening devices using laboratory confirmation results from oral fluid. **Forensic Science International**, [S. l.], v. 208, n. 1–3, p. 173–179, 2011.

DOI: 10.1016/j.forsciint.2010.11.026.

15. BÖCK, Fernanda C.; HELFER, Gilson A.; DA COSTA, Adilson B.; DESSUY, Morgana B.; FERRÃO, Marco F. Rapid Determination of Ethanol in Sugarcane Spirit Using Partial Least Squares Regression Embedded in Smartphone. **Food Analytical Methods**, [S. l.], v. 11, n. 7, p. 1951–1957, 2018. DOI: 10.1007/s12161-018-1167-4.
16. BONINI, Sara Anna; PREMOLI, Marika; TAMBARO, Simone; KUMAR, Amit; MACCARINELLI, Giuseppina; MEMO, Maurizio; MASTINU, Andrea. Cannabis sativa: A comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history. **Journal of Ethnopharmacology**, [S. l.], v. 227, n. May, p. 300–315, 2018. DOI: 10.1016/j.jep.2018.09.004.
17. BORDIN, Dayanne Cristiane Mozaner; MONEDEIRO, Fernanda F. da Silva Souza; CAMPOS, Eduardo Geraldo De; ALVES, Marcela Nogueira Rabelo; BUENO, Laís Helena Picolo; MARTINIS, Bruno Spinosa De. Técnicas de preparo de amostras biológicas com interesse forense. **Scientia Chromatographica**, [S. l.], v. 7, n. 2, p. 125–143, 2015. DOI: 10.4322/sc.2015.022. Disponível em: <http://www.scientiachromatographica.com/doi/10.4322/sc.2015.022>.
18. BORGES, Guilherme; OROZCO, Ricardo; MACDONALD, Scott. Relative risk of injury from alcohol: findings from case crossover analysis. *In: Prevention of alcohol-related injuries in the Americas: from evidence to policy action*. [s.l.] : Pan American Health Organization, 2013. p. 69–78.
19. BORILLE, B. T. **CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA PLANTA CANNABIS SATIVA L. A PARTIR DE SEMENTES APREENDIDAS PELA POLÍCIA FEDERAL NO ESTADO DO RIO GRANDE D SUL**. 2016. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, [S. l.], 2016.
20. BORILLE, Bruna 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**, [S. l.], v. 9, n. 27, p. 4070–4081, 2017. a. DOI: 10.1039/c7ay01294b.
21. BORILLE, Bruna Tassi; GONZÁLEZ, Marina; STEFFENS, Luiza; ORTIZ, Rafael Scorsatto; LIMBERGER, Renata Pereira. Cannabis Sativa: a Systematic Review of Plant Analysis. **Drug Analytical Research**, [S. l.], v. 1, n. 1, p. 1–23, 2017. b. DOI: 10.22456/2527-2616.73676.

22. BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Do. RDC Nº 327, DE 9 DE DEZEMBRO DE 2019. . 2019 a, p. 16.
23. BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Do. RDC Nº 335, DE 24 DE JANEIRO DE 2020. . 2020, p. 3.
24. BRASIL, Ministério das Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Do. PORTARIA Nº 344, DE 12 DE MAIO DE 1998. . 1998, p. 31.
25. BRASIL, Ministério das Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Do. RDC Nº 17, DE 06 DE MAIO DE 2015. . 2015, p. 8.
26. BRASIL, Ministério das Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Do. Manual de Solicitação de Autorização de Importação Específica, AEP, ADA, CNI e 2ª via de documentos. . 2016, p. 58.
27. BRASIL, Ministério das Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Do. RESOLUÇÃO RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017. . 2017 a, p. 12.
28. BRASIL, Ministério das Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Do. RDC Nº 325, DE 3 DE DEZEMBRO DE 2019. . 2019 b, p. 33.
29. BRASIL, Ministério das Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Do. RESOLUÇÃO-RDC Nº 265, DE 8 DE FEVEREIRO DE 2019. . 2019 c, p. 28.
30. BRASIL, Presidência da República Do. LEI Nº 11.343, DE 23 DE AGOSTO DE 2006. . 2006, p. 23.
31. BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica. . 2011, p. 78.
32. BRASIL, Ministério das Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia Para Tratamento Estatístico Da Validação Analítica. . 2017 b, p. 19.
33. BRERETON, Richard G. **Chemometrics for Pattern Recognition**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2009. DOI: 10.1002/9780470746462. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470746462>.
34. BRIGHENTI, Virginia; PELLATI, Federica; STEINBACH, Marleen; MARAN, Davide; BENVENUTI, Stefania. 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**, [S. l.], v. 143, p. 228–236, 2017. DOI:

- 10.1016/j.jpba.2017.05.049. Disponível em:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2017.05.049>.
35. BROSEÚS, Julian; ANGLADA, Frédéric; ESSEIVA, Pierre. The differentiation of fibre- and drug type Cannabis seedlings by gas chromatography/mass spectrometry and chemometric tools. **Forensic Science International**, [S. l.], v. 200, n. 1–3, p. 87–92, 2010. DOI: 10.1016/j.forsciint.2010.03.034.
36. BRUCI, Zana; PAPOUTSIS, Ioannis; ATHANASELIS, Sotirios; NIKOLAOU, Panagiota; PAZARI, Ermira; SPILIOPOULOU, Chara; VYSHKA, Gentian. First systematic evaluation of the potency of Cannabis sativa plants grown in Albania. **Forensic Science International**, [S. l.], v. 222, n. 1–3, p. 40–46, 2012. DOI: 10.1016/j.forsciint.2012.04.032. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2012.04.032>.
37. BURNIER, Céline; ESSEIVA, Pierre; ROUSSEL, Christophe. Quantification of THC in Cannabis plants by fast-HPLC-DAD: A promising method for routine analyses. **Talanta**, [S. l.], v. 192, n. March 2018, p. 135–141, 2019. DOI: 10.1016/j.talanta.2018.09.012.
38. CALVI, Lorenzo *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**, [S. l.], v. 150, p. 208–219, 2018. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.11.073. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2017.11.073>.
39. CANADA, Criminal Code. Approved Drug Screening Equipment Order. . 2019, p. R.S.C., 1985, c. C–46.
40. CARDENIA, Vladimiro; GALLINA TOSCHI, Tullia; SCAPPINI, Simona; RUBINO, Rosamaria Cristina; RODRIGUEZ-ESTRADA, Maria Teresa. Development and validation of a Fast gas chromatography/mass spectrometry method for the determination of cannabinoids in Cannabis sativa L. **Journal of Food and Drug Analysis**, [S. l.], v. 26, n. 4, p. 1283–1292, 2018. DOI: 10.1016/j.jfda.2018.06.001. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.06.001>.
41. CARRIERI, Vincenzo; MADIO, Leonardo; PRINCIPE, Francesco. Do-It-Yourself medicine? The impact of light cannabis liberalization on

- prescription drugs. **Journal of Health Economics**, [S. l.], v. 74, p. 102371, 2020. DOI: 10.1016/j.jhealeco.2020.102371. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jhealeco.2020.102371>.
42. CARVALHO, Virgínia; AGUIAR, Andrey; BARATTO, Leopoldo; SOUZA, Fábio; ROCHA, Ernesto. QUANTIFICAÇÃO DE CANABINOIDES EM EXTRATOS MEDICINAIS DE Cannabis POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA. **Química Nova**, [S. l.], v. 43, n. 1, p. 90–97, 2020. DOI: 10.21577/0100-4042.20170457. Disponível em: http://quimicanova.sbq.org.br/audiencia_pdf.asp?aid2=7016&nomeArquivo=NT20190233.pdf.
43. CCSUA, Canadian Centre on Substance Use and Addiction. **Oral Fluid Drug Screening**, 2020. Disponível em: <https://www.ccsa.ca/sites/default/files/2020-04/CCSA-Oral-Fluid-Drug-Screening-Policy-Brief-2020-en.pdf>.
44. ČERVENÝ, Jakub; CHOMYNOVÁ, Pavla; MRAVČÍK, Viktor; VAN OURS, Jan C. Cannabis decriminalization and the age of onset of cannabis use. **International Journal of Drug Policy**, [S. l.], v. 43, p. 122–129, 2017. DOI: 10.1016/j.drugpo.2017.02.014. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955395917300622>.
45. CIOLINO, Laura A.; RANIERI, Tracy L.; TAYLOR, Allison M. Commercial cannabis consumer products part 1: GC–MS qualitative analysis of cannabis cannabinoids. **Forensic Science International**, [S. l.], v. 289, p. 429–437, 2018. DOI: 10.1016/j.forsciint.2018.05.032. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.05.032>.
46. CITTI, Cinzia; CICCARELLA, Giuseppe; BRAGHIROLI, Daniela; PARENTI, Carlo; VANDELLI, Maria Angela; CANNAZZA, Giuseppe. 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**, [S. l.], v. 128, p. 201–209, 2016. DOI: 10.1016/j.jpba.2016.05.033. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2016.05.033>.
47. CITTI, Cinzia; PACCHETTI, Barbara; VANDELLI, Maria Angela; FORNI, Flavio; CANNAZZA, Giuseppe. Analysis of cannabinoids in commercial

- hemp seed oil and decarboxylation kinetics studies of cannabidiolic acid (CBDA). **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [S. l.], v. 149, p. 532–540, 2018. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.11.044. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2017.11.044>.
48. DAMASCENO, Deangelis; TOLEDO, Thiago G.; GODINHO, Mariana S.; DA SILVA, Cassiano P.; DE OLIVEIRA, Sérgio B.; DE OLIVEIRA, Anselmo E. Análise multivariada de imagens na química: Um experimento para determinação do pH de águas potáveis. **Química Nova**, [S. l.], v. 38, n. 6, p. 836–841, 2015. DOI: 10.5935/0100-4042.20150082.
49. DAVEY, Jeremy; ARMSTRONG, Kerry; MARTIN, Peter. Results of the Queensland 2007-2012 roadside drug testing program: The prevalence of three illicit drugs. **Accident Analysis and Prevention**, [S. l.], v. 65, p. 11–17, 2014. DOI: 10.1016/j.aap.2013.12.007.
50. DE SAINT LAUMER, Jean Yves; CICCHETTI, Esmeralda; MERLE, Philippe; EGGER, Jonathan; CHAINTREAU, Alain. Quantification in gas chromatography: Prediction of flame ionization detector response factors from combustion enthalpies and molecular structures. **Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 82, n. 15, p. 6457–6462, 2010. DOI: 10.1021/ac1006574.
51. DESROSIERS, Nathalie A.; HUESTIS, Marilyn A. Oral Fluid Drug Testing: Analytical Approaches, Issues and Interpretation of Results. **Journal of Analytical Toxicology**, [S. l.], v. 43, n. 6, p. 415–443, 2019. DOI: 10.1093/jat/bkz048. Disponível em: <https://academic.oup.com/jat/article/43/6/415/5524345>.
52. DESROSIERS, Nathalie A.; LEE, Dayong; SCHWOPE, David M.; MILMAN, Garry; BARNES, Allan J.; GORELICK, David A.; HUESTIS, Marilyn A. On-site test for cannabinoids in oral fluid. **Clinical Chemistry**, [S. l.], v. 58, n. 10, p. 1418–1425, 2012. DOI: 10.1373/clinchem.2012.189001.
53. DOMINGO-SALVANY, Antonia; HERRERO, M. Jesús; FERNANDEZ, Beatriz; PEREZ, Julio; DEL REAL, Pilar; GONZÁLEZ-LUQUE, Juan Carlos; DE LA TORRE, Rafael. Prevalence of psychoactive substances, alcohol and illicit drugs, in Spanish drivers: A roadside study in 2015. **Forensic Science International**, [S. l.], v. 278, p. 253–259, 2017. DOI: 10.1016/j.forsciint.2017.07.005. Disponível em:

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2017.07.005>.
54. ELSOHLY, Mahmoud A.; RADWAN, Mohamed M.; GUL, Waseem; CHANDRA, Suman; GALAL, Ahmed. **Phytochemistry of Cannabis sativa L.** [s.l: s.n.]. v. 103 DOI: 10.1007/978-3-319-45541-9_1.
 55. FAIOLA, C. L.; ERICKSON, M. H.; FRICAUD, V. L.; JOBSON, B. T.; VANREKEN, T. M. Quantification of biogenic volatile organic compounds with a flame ionization detector using the effective carbon number concept. **Atmospheric Measurement Techniques**, [S. l.], v. 5, n. 8, p. 1911–1923, 2012. DOI: 10.5194/amt-5-1911-2012.
 56. FARAG, S.; KAYSER, O. The Cannabis Plant: Botanical Aspects. *In: Handbook of Cannabis and Related Pathologies*. [s.l.] : Elsevier, 2017. p. 3–12. DOI: 10.1016/B978-0-12-800756-3.00001-6. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128007563000016>.
 57. FDA, Food and Drug Administration; HSS, U. S. Department of Health and Human Services; CDER, Center for Drug Evaluation and Research; CBER, Center for Biologics Evaluation and Research. **Guidance for Industry Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology**, 1996.
 58. FDA, U. S. Food and Drug Administration. **Guidance, Compliance, & Regulatory Information**. 2015. Disponível em: <https://www.fda.gov/drugs/guidance-compliance-regulatory-information/guidances-drugs>. Acesso em: 20 maio. 2021.
 59. FÉLIX, Sónia; PORTUGAL, Pedro. Drug decriminalization and the price of illicit drugs. **International Journal of Drug Policy**, [S. l.], v. 39, p. 121–129, 2017. DOI: 10.1016/j.drugpo.2016.10.014.
 60. FERREIRA, Marcia Miguel Castro. **Quimiometria: Conceitos, Métodos e Aplicações**. 1ª ed. [s.l.] : Editora da Unicamp, 2015.
 61. FERREIRA, Tiago; RASBAND, Wayne. **ImageJ User Guide**, 2012. Disponível em: <https://imagej.nih.gov/ij/docs/guide/user-guide.pdf>.
 62. FIERRO, Inmaculada; GONZÁLEZ-LUQUE, Juan Carlos; ÁLVAREZ, F. Javier. The relationship between observed signs of impairment and THC concentration in oral fluid. **Drug and Alcohol Dependence**, [S. l.], v. 144, p. 231–238, 2014. DOI: 10.1016/j.drugalcdep.2014.09.770.
 63. FIORENTIN, Taís Regina; D'AVILA, Felipe Bianchini; COMIRAN, Eloisa; ZAMBONI, Amanda; SCHERER, Juliana Nichterwitz; PECHANESKY, Flavio;

- BORGES, Paulo Eduardo Mayorga; FRÖEHLICH, Pedro Eduardo; LIMBERGER, Renata Pereira. Simultaneous determination of cocaine/crack and its metabolites in oral fluid, urine and plasma by liquid chromatography-mass spectrometry and its application in drug users. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, [S. l.], v. 86, n. November 2016, p. 60–66, 2017. DOI: 10.1016/j.vascn.2017.04.003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vascn.2017.04.003>.
64. FISCHEDICK, Justin Thomas; HAZEKAMP, Arno; ERKELENS, Tjalling; CHOI, Young Hae; VERPOORTE, Rob. Metabolic fingerprinting of *Cannabis sativa* L., cannabinoids and terpenoids for chemotaxonomic and drug standardization purposes. **Phytochemistry**, [S. l.], v. 71, n. 17–18, p. 2058–2073, 2010. DOI: 10.1016/j.phytochem.2010.10.001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.10.001>.
65. GENTILI, Stefano; SOLIMINI, Renata; TITTARELLI, Roberta; MANNOCCHI, Giulio; BUSARDÒ, Francesco Paolo. A Study on the Reliability of an On-Site Oral Fluid Drug Test in a Recreational Context. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, [S. l.], v. 2016, p. 1–10, 2016. DOI: 10.1155/2016/1234581.
66. GIESE, Matthew W.; LEWIS, Mark A.; GIESE, Laura; SMITH, Kevin M. Development and validation of a reliable and robust method for the analysis of cannabinoids and terpenes in cannabis. **Journal of AOAC International**, [S. l.], v. 98, n. 6, p. 1503–1522, 2015. DOI: 10.5740/jaoacint.15-116.
67. GJERDE, Hallvard; CLAUSEN, Grethe Brennhovd; ANDREASSEN, Espen; FURUHAUGEN, Håvard. Evaluation of Dräger DrugTest 5000 in a Naturalistic Setting. **Journal of analytical toxicology**, [S. l.], v. 42, n. 4, p. 248–254, 2018. DOI: 10.1093/jat/bky003.
68. GOESSAERT, An Sofie; PIL, Kristof; VERAMME, Jolien; VERSTRAETE, Alain. Analytical evaluation of a rapid on-site oral fluid drug test. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [S. l.], v. 396, n. 7, p. 2461–2468, 2010. DOI: 10.1007/s00216-010-3463-8.
69. GONZÁLEZ, Marina. **PERFIL QUÍMICO DE AMOSTRAS DE CANÁBIS APREENDIDAS NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL**. 2018. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, [S. l.], 2018. Disponível em: [http://awsassets.wfnz.panda.org/downloads/earth_summit_2012_v3.pdf%](http://awsassets.wfnz.panda.org/downloads/earth_summit_2012_v3.pdf%20)

0Ahttp://hdl.handle.net/10239/131%0Ahttps://www.uam.es/gruposinv/meva/publicaciones_jesus/capitulos_espanyol_jesus/2005_motivacion_para_el_aprendizaje_Perspectiva_alumnos.pdf%0Ahttps://ww.

70. GORZIZA, R. P.; CARVALHO, C. M. B.; GONZÁLEZ, M.; ORTIZ, R. S.; HELFER, G. A.; FERRÃO, M. F.; LIMBERGER, R. P. Blue Ballpoint Pen Inks Differentiation using Multivariate Image Analysis of Digital Images Captured with PhotoMetrix PRO®. **Brazilian Journal of Forensic Sciences, Medical Law and Bioethics**, [S. l.], v. 9, n. 3, p. 331–355, 2020. DOI: 10.17063/bjfs9(3)y2020331. Disponível em: <http://www.ipebj.com.br/forensicjournal/edicoes?volume=9&numero=3&artigo=394>.
71. GRASEL, Fábio S.; FERRÃO, Marco F.; HELFER, Gilson A.; COSTA, Adilson B. Principal Component Analysis of Commercial Tannin Extracts Using Digital Images on Mobile Devices. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [S. l.], 2016. DOI: 10.5935/0103-5053.20160135. Disponível em: <http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/0103-5053.20160135>.
72. GRIFFITHS, Andrew; LEONARS, Richard; HADLEY, Lenore; STEPHENSON, Mark; TEALE, Richard. Smoke on the water — Oral fluid analysis at sea. **Forensic Science International**, [S. l.], v. 278, p. 361–366, 2017. DOI: 10.1016/j.forsciint.2017.07.028.
73. GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Textbook of Medical Physiology**. 13^a ed. Philadelphia, USA: Saunders Company, 2015.
74. HAZEKAMP, A.; FISCHEDICK, J. T. Cannabis - from cultivar to chemovar. **Drug testing and analysis**, [S. l.], v. 4, n. 7–8, p. 660–667, 2012. DOI: 10.1002/dta.407.
75. HELFER, Gilson A.; BOCK, Fernanda; MARDER, Luciano; FURTADO, João C.; DA COSTA, Adilson B.; FERRÃO, Marco F. Chemostat, um software gratuito para análise exploratória de dados multivariados. **Quimica Nova**, [S. l.], v. 38, n. 4, p. 575–579, 2015. DOI: 10.5935/0100-4042.20150063.
76. HELFER, Gilson A.; MAGNUS, Vinícius S.; BÖCK, Fernanda C.; TEICHMANN, Aline; FERRÃO, Marco F.; DA COSTA, Adilson B. PhotoMetrix: An application for univariate calibration and principal

- components analysis using colorimetry on mobile devices. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [S. l.], v. 28, n. 2, p. 328–335, 2017. DOI: 10.5935/0103-5053.20160182.
77. HERRERA-GÓMEZ, Francisco; GARCÍA-MINGO, Mercedes; COLÁS, Mónica; GONZÁLEZ-LUQUE, Juan Carlos; ÁLVAREZ, F. Javier. Opioids in oral fluid of Spanish drivers. **Drug and Alcohol Dependence**, [S. l.], v. 187, p. 35–39, 2018. DOI: 10.1016/j.drugalcdep.2018.02.016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2018.02.016>.
78. HNR, Health News Review. **Understanding medical tests: sensitivity, specificity and positive predictive value**. 2020. Disponível em: <https://www.healthnewsreview.org/toolkit/tips-for-understanding-studies/understanding-medical-tests-sensitivity-specificity-and-positive-predictive-value/>. Acesso em: 20 maio. 2020.
79. HÖRTENSTEINER, S. CHLOROPHYLL DEGRADATION DURING SENESCENCE. **Annual Review of Plant Biology**, [S. l.], v. 57, n. 1, p. 55–77, 2006. DOI: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105212. Disponível em: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105212>.
80. HUESTIS, M. A. Cannabis (Marijuana) - Effects on Human Performance and Behavior. **Forensic Science Reviews**, [S. l.], p. 15–60, 2002.
81. IALM, International Academy of Legal Medicine. **FORENSIC TOXICOLOGY LABORATORY GUIDELINES**, 2006. Disponível em: https://www.ialm.info/forensic_toxicology/forensic_toxicology_laboratory_guidelines_2006/.
82. IBRAHIM, Elsayed A. *et al.* Determination of Acid and Neutral Cannabinoids in Extracts of Different Strains of Cannabis sativa Using GC-FID. **Planta Medica**, [S. l.], v. 84, n. 4, p. 250–259, 2018. DOI: 10.1055/s-0043-124088.
83. ICH. **ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology**International Conference on Harmonization. [s.l: s.n.]. DOI: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf.
84. INMETRO. **Guidance in validation of analytical methods (in Portuguese)**, 2016. Disponível em: [198](http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-</p>
</div>
<div data-bbox=)

8_05.pdf.

85. JORGENSEN, Andrew D.; PICEL, Kurt C.; STAMOUDIS, Vassiiis C. Prediction of Gas Chromatography Flame Ionization Detector Response Factors from Molecular Structures. **Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 62, n. 7, p. 683–689, 1990. DOI: 10.1021/ac00206a007.
86. JÚNIOR, Sebastião André Barbosa; BAPTISTA, Raíssa Ivna Alquete de Arreguy; BARBOSA, Clara Nilce. Fisiologia Comparada Do Fluido Oral E Suas Principais Aplicações Clínicas. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zootecia da UNIPAR**, [S. l.], v. 18, n. 4, p. 259–268, 2015. DOI: doi.org/10.25110/arqvet.v18i4.5754. Disponível em: <http://www.revistas.unipar.br/index.php/veterinaria/article/viewFile/5754/3257>.
87. JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 8ª ed. Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan S. A., 2008.
88. KROTULSKI, Alex J.; MOHR, Amanda L. A.; FRISCIA, Melissa; LOGAN, Barry K. Field detection of drugs of abuse in oral fluid using the Alere™ DDS®2 mobile test system with confirmation by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Journal of Analytical Toxicology**, [S. l.], v. 42, n. 3, p. 170–176, 2017. DOI: 10.1093/jat/bkx105.
89. LAUDE, Jennifer R.; FILLMORE, Mark T. Drivers who self-estimate lower blood alcohol concentrations are riskier drivers after drinking. **Psychopharmacology**, [S. l.], v. 233, n. 8, p. 1387–1394, 2016. DOI: 10.1007/s00213-016-4233-x. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00213-016-4233-x>.
90. LEE, Dayong; HUESTIS, Marilyn A. Current Knowledge on Cannabinoids in Oral Fluid. **Drug Testing and Analysis**, [S. l.], v. 6, n. 0, p. 88–111, 2014. DOI: 10.1002/dta.1514.
91. LEGHISSA, Allegra; HILDENBRAND, Zacariah L.; SCHUG, Kevin A. A review of methods for the chemical characterization of cannabis natural products. **Journal of Separation Science**, [S. l.], v. 41, n. 1, p. 398–415, 2018. DOI: 10.1002/jssc.201701003.
92. LEMA-ATÁN, José Ángel; DE CASTRO, Ana; LENDOIRO, Elena; LÓPEZ-RIVADULLA, Manuel; CRUZ, Angelines. Toxicological oral fluid results among Spanish drivers testing positive on on-site drug controls from 2013

- to 2015. **Drug and Alcohol Dependence**, [S. l.], v. 195, n. July 2018, p. 106–113, 2019. DOI: 10.1016/j.drugalcdep.2018.12.003. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2018.12.003>.
93. LENDOIRO, E.; DE CASTRO, A.; FERNÁNDEZ-VEGA, H.; CELA-PÉREZ, M. C.; LÓPEZ-VILARIÑO, J. M.; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, M. V.; CRUZ, A.; LÓPEZ-RIVADULLA, M. Molecularly imprinted polymer for selective determination of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol carboxylic acid using LC-MS/MS in urine and oral fluid Forensic Toxicology. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [S. l.], v. 406, n. 15, p. 3589–3597, 2014. DOI: 10.1007/s00216-013-7599-1.
94. LEWINSKI, Cleomara Salete; GONÇALVES, Itamar Luís; PIOVEZAN BORGES, Ana Cláudia; DARTORA, Nessana; DE SOUZA, Lauro Mera; VALDUGA, Alice Teresa. Effects of UV light on the physic-chemical properties of yerba-mate. **Nutrition & Food Science**, [S. l.], v. 45, n. 2, p. 221–228, 2015. DOI: 10.1108/NFS-07-2014-0065. Disponível em: <https://www.emerald.com/insight/content/doi/10.1108/NFS-07-2014-0065/full/html>.
95. LEWIS, Mark; RUSSO, Ethan; SMITH, Kevin. Pharmacological Foundations of Cannabis Chemovars. **Planta Medica**, [S. l.], v. 84, n. 04, p. 225–233, 2018. DOI: 10.1055/s-0043-122240. Disponível em: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0043-122240>.
96. LIMBERGER, R. P.; FRÖEHLICH, P. E.; BOEHL, P. O.; ZAGO, D. S.; ZANCANARO, I.; MARIOTTI, K. C.; COMIRAN, E.; PRUSCH, D. S.; OLIVEIRA, F. Testes toxicológicos para aferição de substâncias psicoativas em condutores. *In: Uso de bebidas alcoólicas e outras drogas nas rodovias brasileiras*. Porto Alegre.
97. LOGAN, Barry K.; MOHR, Amanda L. A.; TALPINS, Stephen K. Detection and prevalence of drug use in arrested drivers using the dräger drug test 5000 and affiniton DrugWipe oral fluid drug screening devices. **Journal of Analytical Toxicology**, [S. l.], v. 38, n. 7, p. 444–450, 2014. DOI: 10.1093/jat/bku050.
98. MANOUSI, Natalia; SAMANIDOU, Victoria. Green sample preparation of alternative biosamples in forensic toxicology. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, [S. l.], v. 20, n. November 2020, p. 100388, 2021. DOI:

- 10.1016/j.scp.2021.100388. Disponível em:
<https://doi.org/10.1016/j.scp.2021.100388>.
99. MARIOTTI, Kristiane de Cássia; MARCELO, Marcelo Caetano Alexandre; ORTIZ, Rafael S.; BORILLE, Bruna Tassi; DOS REIS, Monique; FETT, Mauro Sander; FERRÃO, Marco Flôres; LIMBERGER, Renata Pereira. Seized cannabis seeds cultivated in greenhouse: A chemical study by gas chromatography–mass spectrometry and chemometric analysis. **Science & Justice**, [S. l.], v. 56, n. 1, p. 35–41, 2016. DOI: 10.1016/j.scijus.2015.09.002. Disponível em:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1355030615001112>.
100. MATZOPOULOS, Richard; LASAROW, Avi; BOWMAN, Brett. A field test of substance use screening devices as part of routine drunk-driving spot detection operating procedures in South Africa. **Accident Analysis and Prevention**, [S. l.], v. 59, p. 118–124, 2013. DOI: 10.1016/j.aap.2013.05.015.
101. MICALIZZI, Giuseppe; VENTO, Federica; ALIBRANDO, Filippo; DONNARUMMA, Danilo; DUGO, Paola; MONDELLO, Luigi. Cannabis Sativa L.: a comprehensive review on the analytical methodologies for cannabinoids and terpenes characterization. **Journal of Chromatography A**, [S. l.], v. 1637, p. 461864, 2021. DOI: 10.1016/j.chroma.2020.461864. Disponível em:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967320311389>.
102. MJSP, Ministério da Justiça e Segurança Pública. **MJSP cria Grupo de Trabalho para implantar aparelho que flagra uso de drogas por motoristas**. 2020. Disponível em:
[https://www.justica.gov.br/news/collective-nitf-content-1555076113.46#:~:text=Brasília%2C%2012%2F04%2F2019,detecção de substâncias psicoativas em. Acesso em: 20 maio. 2020](https://www.justica.gov.br/news/collective-nitf-content-1555076113.46#:~:text=Brasília%2C%2012%2F04%2F2019,detecção%20de%20substâncias%20psicoativas%20em%20Acesso%20em%2020%20maio%202020).
103. MOLNAR, Anna; FU, Shanlin; LEWIS, John; ALLSOP, David J.; COPELAND, Jan. The detection of THC, CBD and CBN in the oral fluid of Sativex® patients using two on-site screening tests and LC-MS/MS. **Forensic Science International**, [S. l.], v. 238, p. 113–119, 2014. DOI: 10.1016/j.forsciint.2014.03.004.
104. MOORE, Christine; KELLEY-BAKER, Tara; LACEY, John. Field testing

- of the Alere DDS2 mobile test system for drugs in oral fluid. **Journal of Analytical Toxicology**, [S. l.], v. 37, n. 5, p. 305–307, 2013. DOI: 10.1093/jat/bkt022.
105. MOREAU, Regina Lúcia de Moraes; SIQUEIRA, Maria Elisa Pereira Bastos De. **Ciências Farmacêuticas - Toxicologia Analítica**. 2ª ed. Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan, 2015.
106. MUSSHOF, Frank; HOKAMP, Eva Große; BOTT, Ulrich; MADEA, Burkhard. Performance evaluation of on-site oral fluid drug screening devices in normal police procedure in Germany. **Forensic Science International**, [S. l.], v. 238, p. 120–124, 2014. DOI: 10.1016/j.forsciint.2014.02.005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2014.02.005>.
107. NABECHIMA, Gilson Hideki; PROVESI, João Gustavo; HENRIQUEZ MANTELLI, Márcia Barbosa; VIEIRA, Manoela Alano; DE MELLO CASTANHO AMBONI, Renata Dias; AMANTE, Edna Regina. Effect of the mild temperature and traditional treatments on residual peroxidase activity, color, and chlorophyll content on storage of mate (*Ilex paraguariensis*) tea. **Journal of Food Science**, [S. l.], v. 79, n. 2, 2014. DOI: 10.1111/1750-3841.12329.
108. NATA, National Association of Testing Authorities (Australia). Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative test methods. . 2012.
109. NATIONS, United. **UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME (UNODC)**. 2020. Disponível em: <https://wdr.unodc.org/wdr2020/index.html>. Acesso em: 20 maio. 2021.
110. NEWMAYER, Matthew N.; SWORTWOOD, Madeleine J.; ANDERSSON, Maria; ABULSEOUD, Osama A.; SCHEIDWEILER, Karl B.; HUESTIS, Marilyn A. Cannabis edibles: Blood and oral fluid cannabinoid pharmacokinetics and evaluation of oral fluid screening devices for predicting Δ^9 -tetrahydrocannabinol in blood and oral fluid following cannabis brownie administration. **Clinical Chemistry**, [S. l.], v. 63, n. 3, p. 647–662, 2017. DOI: 10.1373/clinchem.2016.265371.
111. PARVEZ, Ashak Mahmud; LEWIS, Jonathan David; AFZAL, Muhammad T. Potential of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) for bioenergy production

- in Canada: Status, challenges and outlook. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [S. l.], v. 141, n. August 2019, p. 110784, 2021. DOI: 10.1016/j.rser.2021.110784. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.110784>.
112. PASSAGLI, M. **Toxicologia Forense – Teoria e Prática**. 5ª ed. Campinas, SP: Editora Millenium, 2018.
113. PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introduction to Spectroscopy**. 4ª ed. USA: Cengage Learning, 2010.
114. PECHANESKY, Flavio; SCHERER, Juliana Nichterwitz; SCHUCH, Jaqueline B.; ROGLIO, Vinícius; TELLES, Yeger Moreschi; SILVESTRIN, Roberta; PASA, Graciela; SOUSA, Tanara. User experience and operational feasibility of four point-of-collection oral fluid drug-testing devices according to Brazilian traffic agents. **Traffic Injury Prevention**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 30–36, 2019. DOI: 10.1080/15389588.2018.1537486. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/15389588.2018.1537486>.
115. PEHRSSON, Anna; BLENCOWE, Tom; VIMPARI, Kari; IMPINEN, Antti; GUNNAR, Teemu; LILLSUNDE, Pirjo. Performance evaluation of the DrugWipe® 5/5+ on-site oral fluid screening device. **International Journal of Legal Medicine**, [S. l.], v. 125, n. 5, p. 675–683, 2011. a. DOI: 10.1007/s00414-010-0493-x.
116. PEHRSSON, Anna; BLENCOWE, Tom; VIMPARI, Kari; LANGEL, Kaarina; ENGBLOM, Charlotta; LILLSUNDE, Pirjo. An evaluation of on-site oral fluid drug screening devices drugwipe® 5+ and rapid STAT® using oral fluid for confirmation analysis. **Journal of Analytical Toxicology**, [S. l.], v. 35, n. 4, p. 211–218, 2011. b. DOI: 10.1093/anatox/35.4.211.
117. PELIÇÃO, Fabrício Souza; PERES, Mariana Dadalto; PISSINATE, Jauber Fornaciari; DE PAULA, Daniela Mendes Louzada; DE FARIA, Maria das Graças Corrêa; NAKAMURA-PALACIOS, Ester Miyuki; DE MARTINIS, Bruno Spinosa. Predominance of alcohol and illicit drugs among traffic accidents fatalities in an urban area of Brazil. **Traffic Injury Prevention**, [S. l.], v. 17, n. 7, p. 663–667, 2016. DOI: 10.1080/15389588.2016.1146824. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15389588.2016.1146824>.
118. PÉREZ-COVA, Miriam; JAUMOT, Joaquim; TAULER, Romà. Untangling

- comprehensive two-dimensional liquid chromatography data sets using regions of interest and multivariate curve resolution approaches. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 137, p. 116207, 2021. DOI: 10.1016/j.trac.2021.116207. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993621000297>.
119. POOLE, Colin F. Ionization-based detectors for gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, [S. l.], v. 1421, p. 137–153, 2015. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.02.061. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2015.02.061>.
120. POORTMAN-VAN DER MEER, A. J.; HUIZER, H. A contribution to the improvement of accuracy in the quantitation of THC. **Forensic Science International**, [S. l.], v. 101, n. 1, p. 1–8, 1999. DOI: 10.1016/S0379-0738(99)00004-3. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0379073899000043>.
121. PRATI-DONADUZZI. **Prati-Donaduzzi**. 2021. Disponível em: <https://www.pratidonaduzzi.com.br/canabidiol>. Acesso em: 20 maio. 2021.
122. QAMAR, Sadia; TORRES, Yady J. M.; PAREKH, Harendra S.; ROBERT FALCONER, James. Extraction of medicinal cannabinoids through supercritical carbon dioxide technologies: A review. **Journal of Chromatography B**, [S. l.], v. 1167, n. July 2020, p. 122581, 2021. a. DOI: 10.1016/j.jchromb.2021.122581. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.122581>.
123. QAMAR, Sadia; TORRES, Yady J. M.; PAREKH, Harendra S.; ROBERT FALCONER, James. Extraction of medicinal cannabinoids through supercritical carbon dioxide technologies: A review. **Journal of Chromatography B**, [S. l.], v. 1167, 2021. b. DOI: 10.1016/j.jchromb.2021.122581. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023221000611>.
124. RAMBLA-ALEGRE, Maria; ESTEVE-ROMERO, Josep; CARDA-BROCH, Samuel. Is it really necessary to validate an analytical method or not? That is the question. **Journal of Chromatography A**, [S. l.], v. 1232, p. 101–109, 2012. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.10.050. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.10.050>.
125. RAPOSO, Francisco; IBELLI-BIANCO, Carolina. Performance

- parameters for analytical method validation: Controversies and discrepancies among numerous guidelines. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 129, p. 115913, 2020. DOI: 10.1016/j.trac.2020.115913. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115913>.
126. REINSTADLER, Vera; LIERHEIMER, Stefan; BOETTCHER, Michael; OBERACHER, Herbert. A validated workflow for drug detection in oral fluid by non-targeted liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [S. l.], v. 411, n. 4, p. 867–876, 2019. DOI: 10.1007/s00216-018-1504-x. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-018-1504-x>.
127. RÖHRICH, J.; ZÖRNTLEIN, S.; BECKER, J.; URBAN, R. Detection of Δ 9-tetrahydrocannabinol and amphetamine-type stimulants in oral fluid using the rapid stat™ point-of-collection drug-testing device. **Journal of Analytical Toxicology**, [S. l.], v. 34, n. 3, p. 155–161, 2010. DOI: 10.1093/jat/34.3.155.
128. ROHRIG, Timothy P. *et al.* Roadside drug testing: An evaluation of the Alere DDS ® 2 mobile test system. **Drug Testing and Analysis**, [S. l.], v. 10, n. 4, p. 663–670, 2018. DOI: 10.1002/dta.2297.
129. RUIZ-ANGEL, M. J.; GARCÍA-ALVAREZ-COQUE, M. C.; BERTHOD, A.; CARDA-BROCH, S. Are analysts doing method validation in liquid chromatography? **Journal of Chromatography A**, [S. l.], v. 1353, p. 2–9, 2014. DOI: 10.1016/j.chroma.2014.05.052. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2014.05.052>.
130. SALDANHA, Raquel Forgiarini; PECHANSKY, Flavio; BENZANO, Daniela; DE BARROS, Carlos Alberto Sampaio Martins; DE BONI, Raquel Brandini. Diferenças entre homens e mulheres vítimas de acidente de trânsito atendidos em emergências de Porto Alegre, RS, Brasil. **Ciencia e Saude Coletiva**, [S. l.], v. 19, n. 9, p. 3925–3930, 2014. DOI: 10.1590/1413-81232014199.12892013.
131. SALENTIJN, Elma M. J.; ZHANG, Qingying; AMADUCCI, Stefano; YANG, Ming; TRINDADE, Luisa M. New developments in fiber hemp (*Cannabis sativa* L.) breeding. **Industrial Crops and Products**, [S. l.], v. 68, p. 32–41, 2015. DOI: 10.1016/j.indcrop.2014.08.011. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669014004919>.

132. SCHERER, Juliana Nichterwitz. **Substâncias Psicoativas no Trânsito: Estudo sobre Fatores de Risco e Tecnologias de Detecção in loco**. 2017. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), [S. l.], 2017.
133. SHEBABY, Wassim *et al.* In vivo and in vitro anti-inflammatory activity evaluation of Lebanese Cannabis sativa L. ssp. indica (Lam.). **Journal of Ethnopharmacology**, [S. l.], v. 270, n. August 2020, p. 113743, 2021. DOI: 10.1016/j.jep.2020.113743. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037887412033631X>.
134. SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 7^a ed. New Jersey, USA: John Wiley & Sons, Ltd, 2005.
135. SLEMR, J.; SLEMR, F.; D'SOUZA, H.; PARTRIDGE, R. Study of the relative response factors of various gas chromatograph-flame ionisation detector systems for measurement of C 2-C 9 hydrocarbons in air. **Journal of Chromatography A**, [S. l.], v. 1061, n. 1, p. 75–84, 2004. DOI: 10.1016/j.chroma.2004.10.037.
136. SOBRADO, Laura Alonso; FREIJE-CARRELO, Laura; MOLDOVAN, Mariella; ENCINAR, Jorge Ruiz; ALONSO, J. Ignacio García. Comparison of gas chromatography-combustion-mass spectrometry and gas chromatography-flame ionization detector for the determination of fatty acid methyl esters in biodiesel without specific standards. **Journal of Chromatography A**, [S. l.], v. 1457, p. 134–143, 2016. DOI: 10.1016/j.chroma.2016.06.033. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2016.06.033>.
137. STERNBERG, J.C., GALLAWAY, W.S., JONES, D. T. .. **THE MECHANISM OF RESPONSE OF FLAME IONISATION**. Gas Chroma ed. New York.
138. STRANO-ROSSI, Sabina *et al.* Evaluation of four oral fluid devices (DDS®, Drugtest 5000®, Drugwipe 5+® and RapidSTAT®) for on-site monitoring drugged driving in comparison with UHPLC–MS/MS analysis. **Forensic Science International**, [S. l.], v. 221, n. 1–3, p. 70–76, 2012. DOI: 10.1016/j.forsciint.2012.04.003.
139. SWGTOX, Scientific Working Group on Forensic Toxicology. Scientific

del Cannabis y los Productos del Cannabis Métodos Recomendados para la Identificación y el Análisis del Cannabis y los Productos del Cannabis. [s.l.: s.n.]. DOI: 10.18356/ef4cdd0c-es.

146. UNODC, United Nations Office on Drugs and Crime. **Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos** New York, 2010. b. Disponible em: https://www.unodc.org/documents/scientific/Validation_Manual_STNAR41_Ebook_S.pdf?fbclid=IwAR3IIYZJRWgHNgrmgWBzd63n1XQAio96gn2fXvqwB3K8t3h8ppBs3c3BNtU.
147. UNODC, United Nations Office on Drugs and Crime. **Métodos Recomendados para la Identificación y el Análisis del Cannabis y los Productos del Cannabis** New York United Nations Office on Drugs and Crime, , 2010. c. DOI: 10.18356/ef4cdd0c-es. Disponible em: <https://www.un-ilibrary.org/content/books/9789210558099>.
148. UNODC, United Nations Office on Drugs and Crime. **Guidelines for the analysis of drugs in hair** New York United Nations, , 2014. Disponible em: https://www.unodc.org/documents/scientific/ST_NAR_30_Rev.3_Hair_Sweat_and_Oral_Fluid.pdf.
149. VANDERLINDEN, T.; WILLE, S. M. R.; RAMÍREZ-FERNANDEZ, M.; VERSTRAETE, A. G.; SAMYN, N. Roadside drug testing: Comparison of two legal approaches in Belgium. **Forensic Science International**, [S. l.], v. 249, p. 148–155, 2015. DOI: 10.1016/j.forsciint.2015.01.034.
150. VEITENHEIMER, Allison M.; WAGNER, Jarrad R. Evaluation of oral fluid as a specimen for DUID. **Journal of Analytical Toxicology**, [S. l.], v. 41, n. 6, p. 517–522, 2017. DOI: 10.1093/jat/bkx036.
151. VINDENES, V.; LUND, H. M. E.; ANDRESEN, W.; GJERDE, H.; IKDAHL, S. E.; CHRISTOPHERSEN, A. S.; ØIESTAD, E. L. Detection of drugs of abuse in simultaneously collected oral fluid, urine and blood from Norwegian drug drivers. **Forensic Science International**, [S. l.], v. 219, n. 1–3, p. 165–171, 2012. DOI: 10.1016/j.forsciint.2012.01.001. Disponible em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2012.01.001>.
152. VITTORAZZI, Bruno; COSTA, Rayana; COELHO, Larissa; ISIDORO, Marsele; LIMA, Kássio; FILGUEIRAS, Paulo; ROMÃO, Wanderson.

CLASSIFICANDO CÉDULAS BRASILEIRAS (R\$) USANDO ANÁLISE DE IMAGEM POR SMARTPHONE. **Química Nova**, [S. l.], v. 43, n. 4, p. 447–454, 2020. DOI: 10.21577/0100-4042.20170508. Disponível em: http://quimicanova.s bq.org.br/audiencia_pdf.asp?aid2=8064&nomeArquivo=AR20190487.pdf.

153. WALSH, J. Michael; VERSTRAETE, Alain G.; HUESTIS, Marilyn A.; MØRLAND, Jørg. Guidelines for research on drugged driving. **Addiction**, [S. l.], v. 103, n. 8, p. 1258–1268, 2008. DOI: 10.1111/j.1360-0443.2008.02277.x. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1360-0443.2008.02277.x>.
154. WATSON, D. G. **Pharmaceutical Analysis**. 3ª ed. Amsterdã, Holanda: Elsevier Ltd., 2012.
155. WHITE, C. Michael. Pharmacologic and clinical assessment of kratom: An update. **American Journal of Health-System Pharmacy**, [S. l.], v. 76, n. 23, p. 1915–1925, 2019. DOI: 10.1093/ajhp/zxz221. Disponível em: <https://academic.oup.com/ajhp/article/76/23/1915/5593614>.
156. WILLARD, Hobart H.; JR, Lynne L. Merritt; DEAN, John A. **Instrumental methods of analysis**. 5ª ed. New York, USA: Van Nostrand, 1974.
157. WILLE, Sarah M. R.; SAMYN, Nele; RAMÍREZ-FERNÁNDEZ, Maria del Mar; DE BOECK, Gert. Evaluation of on-site oral fluid screening using Drugwipe-5+®, RapidSTAT® and Drug Test 5000® for the detection of drugs of abuse in drivers. **Forensic Science International**, [S. l.], v. 198, n. 1–3, p. 2–6, 2010. DOI: 10.1016/j.forsciint.2009.10.012.
158. WOLFF, Kim; JOHNSTON, Atholl. Cannabis use: a perspective in relation to the proposed UK drug-driving legislation. **Drug Testing and Analysis**, [S. l.], v. 6, n. 1–2, p. 143–154, 2014. DOI: 10.1002/dta.1588. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/dta.1588>.
159. XU, Chuting; WANG, Weimin; WANG, Shuang; HOU, Keyong; LI, Haiyang. Potential analytical methods for on-site oral drug test: Recent developments and applications. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 120, 2019. DOI: 10.1016/j.trac.2019.115649. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993619303334>.
160. ZANCANARO, Ivomar; LIMBERGER, Renata Pereira; BOHEL, Paula O.; DOS SANTOS, Maíra Kerpel; DE BONI, Raquel B.; PECHANESKY, Flavio;

CALDAS, Eloisa Dutra. Prescription and illicit psychoactive drugs in oral fluid-LC-MS/MS method development and analysis of samples from Brazilian drivers. **Forensic Science International**, [S. l.], v. 223, n. 1–3, p. 208–216, 2012. DOI: 10.1016/j.forsciint.2012.08.048.

161. ZHU, Gangli; ZHAO, Feng; WANG, Dan; XIA, Chungu. Extended effective carbon number concept in the quantitative analysis of multi-ethers using predicted response factors. **Journal of Chromatography A**, [S. l.], v. 1513, p. 194–200, 2017. DOI: 10.1016/j.chroma.2017.07.036. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2017.07.036>.