



UnB

Instituto de Química
Programa de Pós-graduação em Química

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DETERMINAÇÃO DE FITOCANABINOIDES EM PRODUTOS DE *CANNABIS SATIVA L.*
POR HPLC-DAD E AVALIAÇÃO DOS SEUS EFEITOS EMBRIOTÓXICOS EM
ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*)**

MARIA VITÓRIA DOS SANTOS VILLA BANDE

Orientadora

Prof. Dra. Ana Cristi Basile Dias

Coorientadora

Prof. Dra. Fernanda Vasconcelos de Almeida

BRASÍLIA, DF
2024.



UnB

Instituto de Química
Programa de Pós-graduação em Química

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DETERMINAÇÃO DE FITOCANABINOIDES EM PRODUTOS DE *CANNABIS SATIVA L.*
POR HPLC-DAD E AVALIAÇÃO DOS SEUS EFEITOS EMBRIOTÓXICOS EM
ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*)**

MARIA VITÓRIA DOS SANTOS VILLA BANDE

*Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Química da Universidade
de Brasília como requisito parcial para a
obtenção do Título de Mestre em Química.*

Orientadora: Prof. Dra. Ana Cristi Basile Dias

Coorientadora: Prof. Dra. Fernanda Vasconcelos de Almeida

BRASÍLIA, DF
2024.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida, pela saúde e força de vontade para superar os desafios.

À minha família e especialmente à minha mãe, Nilza. Obrigada por sempre me apoiar e pela educação e criação que você tanto lutou para me fornecer. A meu pai, José Luiz, e à minha irmã Luna que sempre estiveram ao meu lado. Aos meus gatos, que também são família, por serem um aconchego no fim do dia.

À minha orientadora, professora Ana Cristi, por todos os ensinamentos durante os últimos 6 anos trabalhando juntas, que ajudaram a construir quem eu sou hoje. Sou eternamente grata por toda paciência, convivência, aprendizado e amizade. À professora Fernanda, minha coorientadora, pelas conversas e conselhos valiosos que ajudaram a enriquecer esse trabalho e pela paixão pelo mundo da Cannabis. A ambas, por acreditarem no meu potencial e serem um modelo como profissional, como mulher e cientista.

Às amigas de bancada, Juliana, Letícia, Marcela, Bruna, Eloíza, Isaura e Marina, obrigada pelos almoços e cafés compartilhados, pelo trabalho em equipe e pelas conversas que tornaram os dias mais leves, seja sobre a pesquisa ou sobre a vida. Agradeço também aos demais professores e alunos do grupo AQQUA.

Sou grata também aos meus amigos, que ofereceram um ombro nos momentos mais difíceis, obrigada por compreenderem a minha ausência em muitas ocasiões. Em especial, agradeço aos meus amigos de vida, Maria Rita, Isis, Thor e Paula, por estarem sempre ao meu lado e celebrarem comigo cada pequena conquista.

À equipe do laboratório LDPQ, em especial aos professores José Linares e Fabrício, obrigada pelo acesso ao equipamento de HPLC, indispensável para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço também ao professor César Grisólia, Ramon e Diego, pela imensa ajuda e assistência nos testes biológicos e ao professor Jez pelas análises por RMN.

Às associações APEPI, Abrapango e Flor do Amor pelas trocas, colaborações e pelas amostras gentilmente doadas para a execução desse trabalho de mestrado.

Agradeço ao Instituto de Química da Universidade de Brasília e ao Programa de Pós-graduação em Química pela oportunidade de pesquisar. Às agências de fomento, pelos incentivos financeiros e principalmente à CAPES pela bolsa de mestrado.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma acreditaram em mim e fizeram parte da minha formação.

RESUMO

A *Cannabis sativa L.* é uma das plantas mais versáteis utilizadas por diversas culturas ao redor do mundo. Como consequência da variabilidade da Cannabis, que pode ser afetada pela sua genética, condições de crescimento e coleta, se mostra desafiadora a pesquisa sobre essa planta e a padronização de medicamentos e produtos à base de Cannabis. Esse projeto de Mestrado teve como um dos objetivos a otimização de um método de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de fotodiodos (HPLC-DAD), visando identificar e quantificar fitocanabinoides minoritários e majoritários em óleos e extratos concentrados de Cannabis de produzidos no Brasil por associações de produtores. Além da otimização do método cromatográfico, o estudo visou investigar os efeitos embriotóxicos de 4 extratos quantificados, utilizando o zebrafish (*Danio rerio*) como modelo *in vivo*. Os resultados indicaram a eficácia do método otimizado na quantificação de oito canabinoides em 15 amostras diferentes. As curvas de calibração demonstraram boa linearidade, com um R^2 superior a 0,999 para todos os analitos, e limites de detecção e quantificação satisfatórios. A avaliação comparativa do método proposto com método de referência demonstrou desvios padrão relativos no teor de canabinoides majoritários inferiores a 5% para 4 óleos de Cannabis. Os ensaios embriotóxicos indicaram CL_{50} (96 h) de 5,97, 5,63 6,24 e 1,17 mg L⁻¹ para os extratos de quimiotipos de CBD, de Δ^9 -THC, balanceado de CBD e Δ^9 -THC e de CBG, respectivamente. Efeitos subletais, como atraso na eclosão dos ovos e alterações morfológicas também foram observados em todos os extratos avaliados. Dessa maneira, conclui-se que os resultados obtidos são promissores para a expansão da aplicação do método cromatográfico na determinação de fitocanabinoides em produtos de Cannabis produzidos por associações brasileiras, para atender a demanda de controle de qualidade. A compreensão dos efeitos toxicológicos de extratos complexos de Cannabis é crucial, especialmente no contexto do crescente uso medicinal da planta. Nesse trabalho foi avaliado, de forma pioneira, o efeito de embriotoxicidade de um extrato de Cannabis rico em CBG, canabinoide com crescente aplicação terapêutica, ressaltando a importância desses estudos.

Palavras-chave: *Cannabis sativa L.*, CBD, Δ^9 -THC, CBG, HPLC-DAD, Produtos terapêuticos à base de Cannabis, Zebrafish.

ABSTRACT

Cannabis sativa L. is one of the most versatile plants used by different cultures around the world as a source of food, fiber and medicine. Due to the variability of Cannabis, influenced by its genetics, growth conditions, and the collection process, research on this plant and the standardization of medications and Cannabis-based products prove to be challenging. One of the objectives of this Master's project is the optimization of a high-performance liquid chromatography method with photodiode array detection (HPLC-DAD), aiming to identify and quantify minor and major cannabinoids in oils and concentrated Cannabis extracts produced in Brazil by producer associations. In addition to optimizing the chromatographic method, the study aims to investigate the embryotoxic effects of these extracts using zebrafish (*Danio rerio*) as an *in vivo* model. The results demonstrated the effectiveness of the optimized method in quantifying eight cannabinoids across 15 different samples. The calibration curves showed excellent linearity, with an R^2 value greater than 0.999 for all analytes, along with satisfactory limits of detection and quantification. A comparative evaluation of the proposed method with a reference method showed relative standard deviations for the major cannabinoids below 5% for four Cannabis oils. Embryotoxicity assays revealed LC_{50} (96 h) values of 5.97, 5.63, 6.24, and 1.17 mg/L for extracts from CBD, Δ^9 -THC, balanced CBD and Δ^9 -THC, and CBG chemotypes, respectively. Sublethal effects, including delayed hatching and morphological alterations, were also observed in all evaluated extracts. In conclusion, the results obtained are promising for expanding the application of the chromatographic method in the determination of cannabinoids in Cannabis products produced by Brazilian associations, addressing the demand for quality control. Understanding the toxicological effects of complex Cannabis extracts is essential, particularly given the growing medicinal use of the plant. This study also pioneered the evaluation of the embryotoxic effects of a CBG-rich Cannabis extract, a cannabinoid increasingly used for its therapeutic potential, emphasizing the importance of such research.

Keywords: *Cannabis sativa L.*, CBD, Δ^9 -THC, CBG, HPLC-DAD, Cannabis-based therapeutic products, Zebrafish.

ÍNDICE

RESUMO.....	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE ABREVIATURAS E ACRONIMOS.....	viii
LISTA DE TABELAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	13
CAPÍTULO 1: Desenvolvimento e Otimização de Método Cromatográfico HPLC- DAD para a Determinação de Fitocanabinoides em Produtos de <i>Cannabis Sativa L.</i> de Diferentes Cultivares Produzidos no Brasil	15
1. Revisão Bibliográfica.....	15
1.1. <i>Cannabis Sativa L.</i>	15
1.2. Usos da Cannabis	17
1.3. Composição Química da <i>Cannabis sativa L.</i>	19
1.3.1. Δ^9 -tetrahydrocannabinol.....	22
1.3.2. Canabidiol.....	22
1.3.3. Canabigerol.....	23
1.4. Cannabis no Brasil.....	23
1.5. Produtos Terapêuticos à Base de Cannabis	25
1.6. Métodos de Identificação e Análise de Produtos de Cannabis	28
1.6.1. Determinação de Fitocanabinoides por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção por Arranjo de Fotodiodos.....	29
2. Materiais e Métodos	32
2.1. Reagentes e Amostras.....	32
2.2. Instrumentação.....	34
2.3. Procedimentos Experimentais	34
2.3.1. Desenvolvimento Preliminar do Método Cromatográfico	34
2.3.2. Adaptação do Método Cromatográfico	35

2.3.3.	Curvas de Calibração.....	36
2.3.4.	Preparo de Amostra	36
2.3.5.	Análise Comparativa do Método Proposto.....	37
3.	Resultados e Discussão	38
3.1.	Desenvolvimento Preliminar do Método Cromatográfico	38
3.2.	Adaptação do Método Cromatográfico	40
3.3.	Curvas de Calibração.....	47
3.4.	Análise das Amostras de Óleos e Extratos Concentrados	51
3.5.	Análise comparativa do Método Proposto	56
CAPÍTULO 2: Avaliação dos Efeitos Embriotóxicos de Extratos de <i>Cannabis Sativa</i>		
L. Utilizando Zebrafish (<i>Danio Rerio</i>) Como Espécie Modelo		
1.	Revisão Bibliográfica.....	59
1.1	Sistema Endocanabinoide.....	59
1.2.	Zebrafish como Espécie-Modelo.....	60
1.3.	Efeito Entourage	60
2.	Materiais e Métodos	62
2.1.	Condições Físico-químicas do Biotério de Peixes	62
2.2.	Testes de Solubilidade dos Extratos de Cannabis	62
2.3.	Produção e Diferenciação dos Ovos Fertilizados	62
2.4.	Fish Embryo Toxicity (FET – Test) ⁶⁵	62
3.	Resultados e Discussão	65
3.1.	Testes de Solubilidade dos Extratos de Canabinoides.....	65
3.2.	Fish Embryo Toxicity (FET – Test) ⁶⁵	65
CONCLUSÃO.....		72
BIBLIOGRAFIA		73

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRONIMOS

ABRACE	Associação Brasileira de Apoio Cannabis Esperança
Abrapango	Associação Brasileira do Pito do Pango
AMA+ME	Associação Brasileira de Pacientes de Cannabis Medicinal
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
AOEV	Azeite de Oliva Extravirgem
APEPI	Apoio à Pesquisa e Pacientes de Cannabis Medicinal
CB1	Receptor Canabinoide 1
CB2	Receptor Canabinoide 2
CBC	Canabicromeno
CBD	Canabidiol
CBDA	Ácido Canabidiólico
CBE	Canabielsoína
CBG	Canabigerol
CBGA	Ácido Canabigerólico
CBL	Canabiciclol
CBN	Canabinol
CBND	Canabinodiol
CBT	Canabitriol
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CL ₅₀	Concentração Letal média
COA	Certificado de Análise
DMSO	Dimetilsulfóxido
GC-FID	Cromatografia Gasosa com Detecção por Ionização em Chama
GC-MS	Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas
HPLC-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção de Arranjo de Fotodiodos
HPLC-MS	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada à Espectrometria de Massas
LOD	Limite de Detecção
LOQ	Limite de Quantificação
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico

qNMRH	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio quantitativa
THCA	Ácido Tetrahydrocanabidiólico
TCM	Triglicerídeo de Cadeia Média
Δ^8 -THC	Δ^8 -tetrahydrocannabinol
Δ^9 -THC	Δ^9 -tetrahydrocannabinol

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação Taxonômica da Cannabis sativa L. ¹⁸	15
Tabela 2: Principais subclasses de fitocanabinoides	20
Tabela 3: Conjunto de amostras analisadas, seu tipo, característica e associação de origem.....	33
Tabela 4: Experimentos da otimização multivariada das condições cromatográficas ...	35
Tabela 5: Tempo de retenção dos picos obtidos nos ensaios da otimização multivariada	38
Tabela 6: Resolução entre os picos CBG e CBD nas corridas	42
Tabela 7: Resolução entre os picos obtidos da mistura comercial de 8 fitocanabinoides neutros	46
Tabela 8: Parâmetros otimizados do HPLC-DAD	46
Tabela 9: Parâmetros analíticos de quantificação do 8 canabinoides neutros pelo método HPLC-DAD.....	51
Tabela 10: Teor dos fitocanabinoides nas amostras de óleos e extratos concentrados de Cannabis (n=3)	52
Tabela 11: Resultados das análises dos óleos de Cannabis Doctor da APEPI.....	56
Tabela 12: Resultados para o método proposto e para o método de referência na amostra Harle Tsu em % (m/m).....	57
Tabela 13: Resultados para o método proposto e para o método de referência na amostra Purple Wreck em % (m/m).....	57
Tabela 14: Resultados para o método proposto e para o método de referência na amostra Schanti em % (m/m).....	57
Tabela 15: Resultados para o método proposto e para o método de referência na amostra OCBG em % (m/m).....	58
Tabela 16: Teor de fitocanabinoides e teor total presente nos 4 quimiotipos de extrato concentrado. Os fitocanabinoides Δ^8 -THC e CBN foram omitidos por não estarem presentes em nenhum dos extratos	68
Tabela 17: Valores de LC ₅₀ para os diferentes extratos avaliados, em relação ao teor do fitocanabinoide majoritário e a quantidade total de canabinoides.....	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Anatomia da Cannabis, adaptado de Sensi Seeds ²¹	16
Figura 2: Cannabis sativa L. (a) planta de cultivo indoor (b) inflorescência (c) folhas (d) inflorescência com destaque aos estigmas e aos tricomas da planta. Fonte: Acervo Pessoal.	17
Figura 3: Usos da planta Cannabis Sativa L., adaptado de Balant et al ¹⁵	18
Figura 4: Reação de descarboxilação do ácido canabidiólico	22
Figura 5: Esquema da biossíntese de a partir do CBGA	23
Figura 6: Esquema do tipo de produto de Cannabis com relação ao espectro ⁴²	26
Figura 7: Fluxograma resumido da metodologia mais comum para o preparo do óleo medicinal de Cannabis. Rota 1: extração hidroalcolica; rota 2: extração final com veículo oleoso. Adaptado de Gouvêa-Silva et al ⁴⁵	28
Figura 8: Cromatogramas da otimização. (A): Ensaios em metanol; (B): ensaios em acetonitrila	39
Figura 9: Cromatogramas sobrepostos da mistura de CBD e Δ^9 -THC e seus padrões separados	40
Figura 10: Estrutura molecular do CBD e Δ^9 -THC com destaque na diferença das estruturas.....	40
Figura 11: Cromatograma do método otimizado em 3.1 utilizando coluna de 150 mm	41
Figura 12: Cromatogramas sobrepostos. Modificação na proporção de acetonitrila de 80, 75 e 70% e modificação no fluxo do método de 1 para 0,5 mL/min.....	42
Figura 13: Cromatogramas da mistura padrão de fitocanabinoides e de CBD, CBG, CBN e Δ^9 -THC, adicionados separadamente a essa mistura.....	44
Figura 14: Parâmetros do método de avaliação do padrão presente no COA	44
Figura 15: Cromatograma da análise do padrão presente no COA	45
Figura 16: Cromatograma de separação dos 8 canabinoides neutros da mistura comercial em 228 nm de acordo com a sequência proposta.....	45
Figura 17: Curvas de calibração de CBD, CBN e CBC nos comprimentos de onda de 210, 220 e 280 nm	47
Figura 18: Espectros de absorção dos picos de fitocanabinoides registrados. (a) CBDV (b) CBG (c) CBD (d) THCV (e) CBN (f) Δ^9 -THC (g) Δ^8 -THC (h) CBC.....	49
Figura 19: Curvas de calibração, concentração em $\mu\text{g/mL}$ vs área. (a) CBDV (b) CBG (c) CBD (d) THCV (e) CBN (f) Δ^9 -THC (g) Δ^8 -THC (h) CBC	50

Figura 20: Amostras de óleos de Cannabis. (a): Óleo Schanti, diluído em AOEV; (b) Óleo Rainbow, diluído em TCM	53
Figura 21: Amostras de extratos concentrados de Cannabis. (a): Extrato HCBD; (b) extrato destilado; (c) extrato ECBG	54
Figura 22: Cromatogramas sobrepostos da mistura de fitocanabinoides neutros e a amostra Fenoqueen	54
Figura 23: Estrutura molecular do CBDV e THCV	55
Figura 24: Distribuição dos receptores CB1 e CB2 no corpo. Adaptado de Uthayakumaran et al. ⁶²	59
Figura 25: Esquema do procedimento do teste de toxicidade aguda (FET) em embriões de zebrafish. Adaptado de OECD ⁶⁶	63
Figura 26: Embriões 24 horas pós exposição, evidenciando o extrato Purple Wreck sobre a superfície do córion quando comparado ao controle negativo.....	65
Figura 27: Efeitos dos extratos nos estágios iniciais de desenvolvimento do zebrafish durante 96 horas de exposição. A proporção de organismos mortos, vivos e eclodidos foi representada pelas diferentes barras. (A) Doctor, (B) Purple Wreck (C) Schanti (D) EBCBG.....	67
Figura 28: Curvas de concentração resposta (mortalidade) dos organismos expostos por 96 h aos diferentes extratos concentrados	69
Figura 29: Larvas do zebrafish após a exposição ao extrato Schanti e Doctor por 96 h. Concentração de 0 mg/L (controle negativo) e 3,2 mg/L.....	71

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A planta *Cannabis sativa L.* é amplamente conhecida devido sua história e impacto social e farmacológico¹. Nos últimos anos, o uso terapêutico de produtos medicamentosos à base de Cannabis vêm aumentando, devido ao maior interesse da sociedade no potencial desses produtos. Foram identificados mais de 500 compostos na Cannabis sativa, sendo 144 deles canabinoides ou fitocannabinoides².

Os fitocannabinoides de maior interesse científico devido ao seu potencial terapêutico, e sendo assim considerados os mais importantes, são o canabidiol (CBD) e o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC). O CBD é o principal composto investigado para fins medicinais apresentando atividades antioxidantes e anti-inflamatórias, além de ter propriedades ansiolíticas e anticonvulsivantes que vem sendo exploradas para o tratamento de várias doenças¹. Já o segundo, apesar de também ter um papel terapêutico importante, é o principal componente psicoativo presente na planta e está intimamente relacionado ao uso recreativo da Cannabis^{3,4}.

No Brasil, o consumo de Cannabis é proibido. Porém, atualmente, a Anvisa autoriza a prescrição de produtos de CBD e extratos de Cannabis para o tratamento de várias doenças bem como a importação desses produtos⁵. Entretanto, esses produtos ainda têm alto custo associado, dificultando o acesso para muitas pessoas. Associações se consolidaram no país com o intuito de auxiliar os pacientes e familiares na aquisição de produtos de Cannabis, importados ou formulados pelas próprias associações⁶. A Anvisa também deliberou sobre a produção para o uso pessoal mediante a liminar, habeas corpus, além de conceder autorização judicial para a produção e comercialização de produtos medicinais derivados da Cannabis para algumas associações⁶.

Devido a aprovação desses produtos de *Cannabis sativa L.* e a constante inserção de novos produtos para aprovação, se tem uma demanda crescente de métodos de quantificação precisos e confiáveis dos fitocannabinoides nesses produtos para o controle de qualidade⁹. Vários trabalhos têm evidenciado a eficácia da cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de arranjo de fotodiodos (HPLC-DAD) para a quantificação dos canabinoides em diversas amostras, como óleos, extratos e resinas de Cannabis. Além disso, a separação por cromatografia líquida evita o aquecimento da amostra, possibilitando a determinação dos fitocannabinoides e a correlação da quantidade de cada composto nos produtos com seus efeitos farmacológicos^{9,10}.

Com o crescimento exponencial do uso terapêutico dos produtos à base de Cannabis, há uma maior exposição da população aos canabinoides. Dessa forma, conhecer o potencial de toxicidade desses compostos é essencial para garantir segurança aos pacientes e confiabilidade da comunidade científica¹¹.

O uso do zebrafish como modelo *in vivo* de estudos embriotóxicos apresenta certas vantagens em relação ao uso de modelos de mamíferos. Destaca-se sua alta homologia genética quando comparado aos mamíferos, incluindo humanos, e a expressão gênica de receptores de canabinoides no zebrafish mesmo em estágios iniciais do seu desenvolvimento^{12,13}. Além disso, seus embriões semitransparentes se desenvolvem externamente em um córion (ovo) em meio aquático, sendo possível controlar com maior precisão a concentração e o tempo de exposição em comparação com animais placentários¹⁴.

Face ao exposto, a presente Dissertação de Mestrado teve como objetivo principal a otimização de um método cromatográfico (HPLC-DAD) para a identificação e quantificação dos fitocanabinoides majoritários, CBD e Δ^9 -THC, e outros canabinoides minoritários em óleos e extratos concentrados de Cannabis a partir de diferentes cultivares produzidos por associações no Brasil.

Esse projeto também teve como objetivos investigar os efeitos embriotóxicos dos extratos concentrados de Cannabis utilizados na preparação de óleos terapêuticos, usando zebrafish (*Danio rerio*) como espécie modelo. Os objetivos específicos do trabalho englobaram a realização das seguintes etapas:

- Desenvolvimento e otimização de um método de HPLC-DAD para a determinação de fitocanabinoides em produtos à base de *Cannabis sativa L.*;
- Determinação do perfil cromatográfico de fitocanabinoides em amostras de óleos e extratos concentrados de Cannabis de associações brasileiras e análise comparativa do método;
- Testes de solubilidade dos extratos concentrados de Cannabis;
- Ensaio de toxicidade em embriões de zebrafish dos extratos concentrados de 4 quimiotipos diferentes de Cannabis para determinar a toxicidade aguda, bem como efeitos subletais desses extratos.

CAPÍTULO 1: Desenvolvimento e Otimização de Método Cromatográfico HPLC-DAD para a Determinação de Fitocanabinoides em Produtos de *Cannabis Sativa L.* de Diferentes Cultivares Produzidos no Brasil

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. *Cannabis Sativa L.*

A *Cannabis sativa L.* é uma planta milenar que tem sido utilizada por diversas culturas ao redor do mundo por ser uma planta versátil e todas as suas partes poderem ser aproveitadas. Detalhes sobre sua origem ainda são controversos, porém estudos recentes indicam que ela foi originada no nordeste do planalto do Tibete^{15,16}.

Sua coexistência e distribuição mundial acarretou uma grande variabilidade genética, morfológica e química. Essa variabilidade dificultou a classificação taxonômica da planta, inicialmente o gênero *Cannabis* foi dividido em três espécies (*C. sativa L.*; *C. indica Lam.*; e *C. ruderalis Janisch.*), porém o cruzamento contínuo dessas espécies para gerar plantas com diferentes perfis químicos levou a sua classificação como apenas uma espécie, *Cannabis sativa Linnaeus.*, com diferentes subespécies ou quimiotipos^{1,15,17}. Dessa forma, de acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos¹⁸, a classificação taxonômica da espécie *Cannabis sativa L.* está descrita na Tabela 1.

Tabela 1: Classificação Taxonômica da *Cannabis sativa L.*¹⁸

Reino	Plantae (planta)
Sub-reino	Tracheobionta (planta vascular)
Subdivisão	Spermatophyta (planta com sementes)
Divisão	Magnoliophyta (planta com flores)
Classe	Magnoliopsida (Dicotiledônea)
Subclasse	Hamamelididae
Ordem	Urticales
Família	Cannabaceae
Gênero	<i>Cannabis L.</i>
Espécie	<i>Cannabis sativa L.</i>

A *Cannabis* é uma planta geralmente dioica, ou seja, suas flores masculinas e femininas se desenvolvem em plantas separadas. Com um ciclo de floração anual, ela completa seu ciclo

de vida, desde a germinação até a produção de sementes, em um ano^{19,20}. A planta pode atingir de 1 a 4 metros de altura a depender da subespécie, do ambiente, do solo e das condições climáticas de cultivo²⁰.

Dentre as características morfológicas da Cannabis, destacam-se seu caule angular e ramificado com interior lenhoso ou oco (Figura 1), suas sementes do tipo aquênio com casca rígida e coloração amarronzada ou acinzentada e mosqueadas (Figura 1)^{19,20}. Ela possui raízes do tipo pivotante (Figura 1) que se desenvolvem mais ou menos a depender do solo de cultivo²⁰. Suas folhas são a característica mais marcante da planta, de formato palmado e com 5 ou 7 segmentos desiguais, alongados e com margens serrilhadas (Figura 1 e Figura 2c.)^{19,20}.

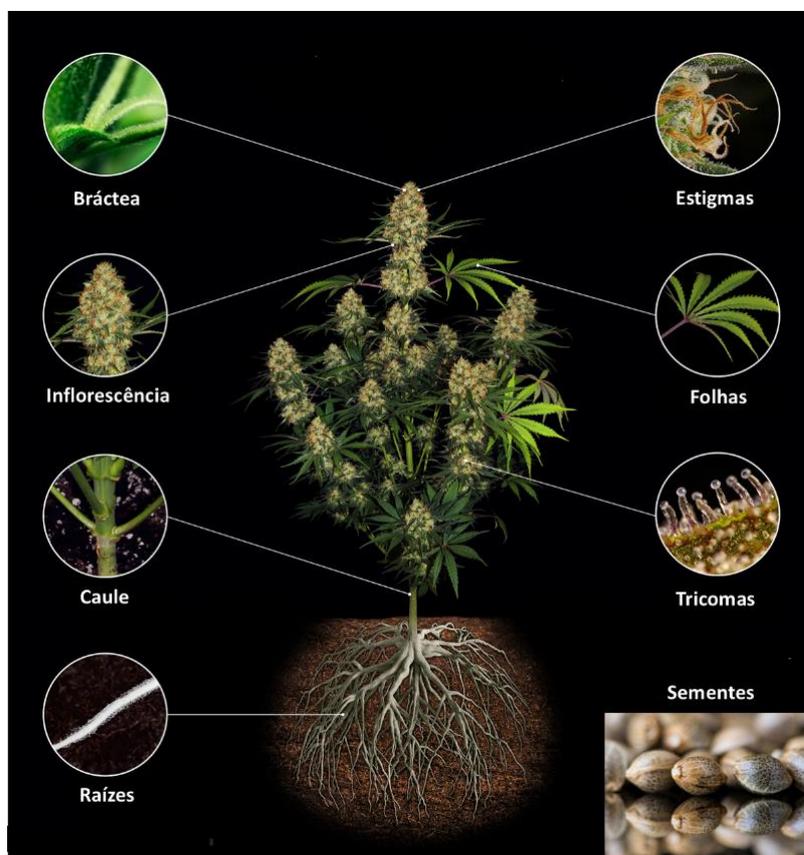


Figura 1: Anatomia da Cannabis, adaptado de Sensi Seeds²¹.

Essa planta também se caracteriza por inflorescências femininas pistiladas longas e finas (Figura 2b.) que não possuem pétalas e são compostas de 2 longos estigmas que podem ser brancos, amarelos ou rosados (Figura 2d.)^{19,20}. Além disso, a Cannabis apresenta tricomas, estruturas microscópicas evidenciadas na Figura 1 (ampliada no microscópio) e na Figura 2d. (visíveis a olho nu) que recobrem principalmente as brácteas — folhas modificadas ou estruturas foliares que envolvem as flores e protegem a semente da Cannabis — e as folhas

que crescem nas inflorescências da planta. Os tricomas são glândulas resinosas com formato característico, similar a um cogumelo, responsáveis por tornar a Cannabis pegajosa e perfumada^{3,19,20}.



Figura 2: *Cannabis sativa* L. (a) planta de cultivo indoor (b) inflorescência (c) folhas (d) inflorescência com destaque aos estigmas e aos tricomas da planta. Fonte: Acervo Pessoal.

1.2. Usos da Cannabis

O uso tradicional da Cannabis na produção de papel, fibras, cordas e tecidos se deu há mais de 10.000 anos, no qual a planta foi uma das primeiras culturas agrícolas do planeta¹⁶. Na Ásia, a semente de Cannabis era valorizada como um dos cinco grãos essenciais junto com a cevada, o arroz, a soja e o milho. Seu óleo é uma fonte rica de ácidos graxos essenciais como ômega 3 e ômega 6, macronutrientes como proteínas e fibras, vitaminas e minerais^{3,15,22}.

A associação de virtudes sagradas à planta fez com que seu uso psicoativo fosse relacionado a rituais religiosos diversos desde o período Paleolítico^{15,16}. Além disso, a Cannabis tem desempenhado um papel valioso na medicina tradicional por mais de 5.000 anos, com relatos do seu uso terapêutico presentes no *pen-ts'ao ching*, a mais antiga farmacopeia do mundo¹⁶.

Apesar do uso da terapêutico da Cannabis ser milenar, nos últimos 20 anos, devido as mudanças legislativas, socioculturais e econômicas em diversos países, várias linhas de pesquisa emergiram para investigar o potencial dos compostos bioativos presentes na planta para tratar inúmeras patologias^{16,23}.

O interesse da população pelas propriedades terapêuticas da Cannabis tem crescido significativamente como alternativa para o tratamento doenças, visando minimizar os efeitos adversos dos medicamentos sintéticos convencionais¹³. Apesar de todas as partes da planta terem sido exploradas e utilizadas para fins medicinais, como ilustrado na Figura 3, é importante ressaltar que elas foram aplicadas para tratamentos diferentes devido às diferenças em seus perfis químicos e compostos bioativos¹⁵.

As inflorescências e folhas da Cannabis apresentam propriedades citotóxicas, antimicrobianas, antioxidantes e estimulantes de apetite. O extrato das inflorescências é a parte mais explorada na medicina moderna e tem sido eficaz para tratar uma variedade de doenças metabólicas e crônicas³. As sementes foram frequentemente aplicadas para o tratamento do sistema digestivo além de serem utilizadas no alívio de dores e inflamações. Já as raízes da planta, apesar de ainda serem pouco exploradas clinicamente, apresentam um potencial efeito anti-inflamatório¹⁵.

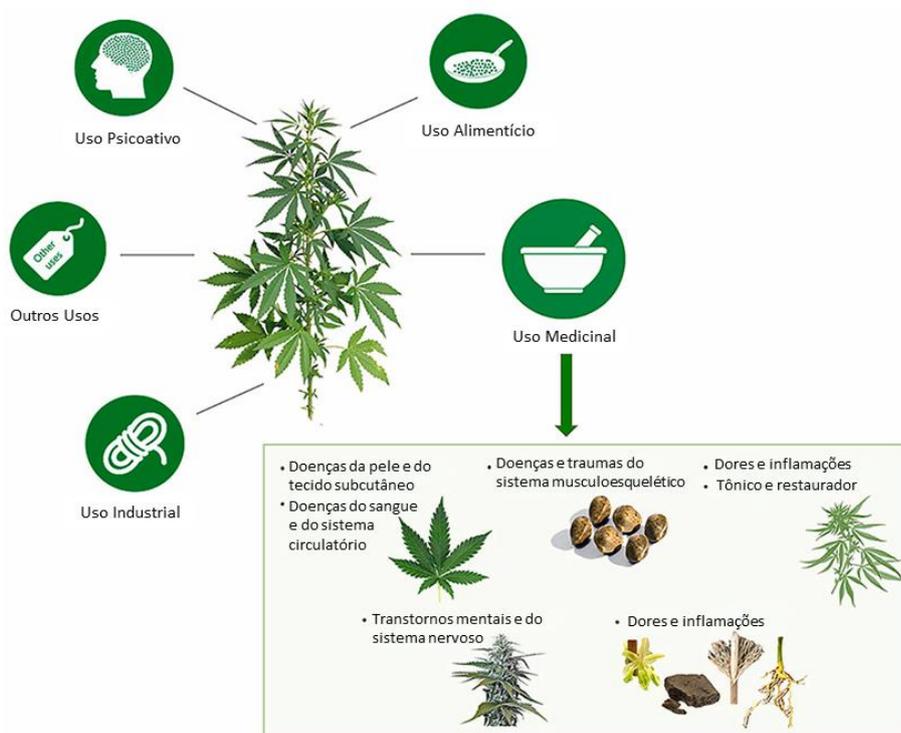


Figura 3: Usos da planta Cannabis Sativa L., adaptado de Balant et al¹⁵.

A Cannabis é rica em compostos ativos, e o estudo da composição química da planta, que tem sido investigado extensivamente, é de extrema relevância, visto que, a concentração, a proporção e a interação dos seus constituintes conferem diferentes efeitos medicinais²⁰.

1.3. Composição Química da *Cannabis sativa* L.

Mais de 500 compostos bioativos foram identificados e isolados na Cannabis, incluindo terpenos, polifenóis, alcalóides, fitocanabinoides — uma classe de compostos única e característica da planta — entre outros^{3,19}. As folhas e inflorescências da Cannabis são ricas em fitocanabinoides, alcaloides, terpenos e polifenóis. O caule e as raízes da planta contêm predominantemente terpenos e esteróis^{20,24}. As sementes da Cannabis, por sua vez, são compostas por aproximadamente 40% de óleo, rico em triacilgliceróis e ácidos graxos poli-insaturados, além disso, sua semente contém polifenóis e fitosteróis²⁰.

Estudos realizados em diferentes partes da planta mostram que terpenos, polifenóis e fitocanabinoides são os principais metabólitos secundários presentes na Cannabis²⁰. Terpenos são compostos aromáticos presentes em uma ampla variedade de plantas, desempenhando várias funções biológicas, como atrair polinizadores e proteger a planta de predadores³. Na Cannabis, os terpenos estão presentes nas inflorescências, nas raízes, folhas e nos tricomas glandulares, que são os principais locais de sua produção²⁰.

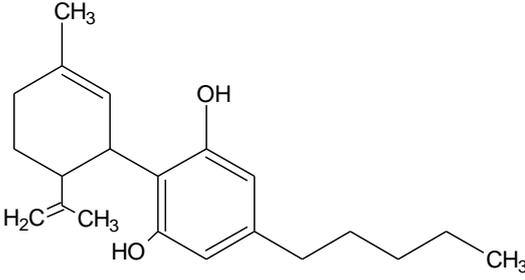
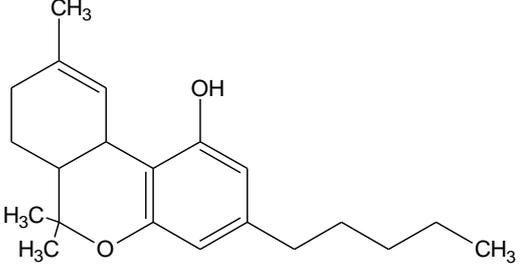
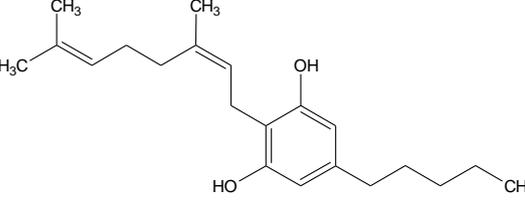
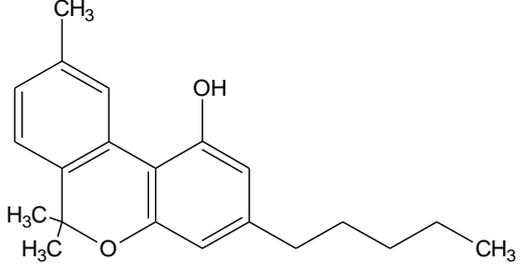
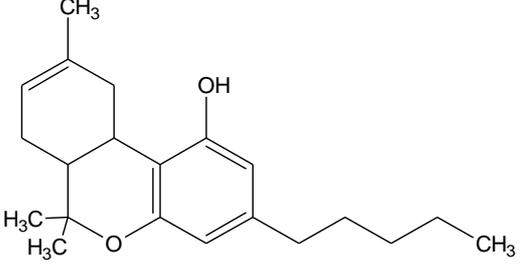
Quanto aos polifenóis, a maioria são flavonoides, classificados nas subclasses das flavonas e flavonóis. Os flavonoides são encontrados principalmente nas folhas, inflorescências e nas brácteas durante o desenvolvimento da planta, exercendo funções de proteção na planta. Sua concentração pode variar dependendo das condições ambientais, como temperatura e umidade, ou condições de estresse^{3,20}.

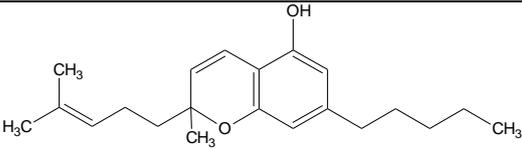
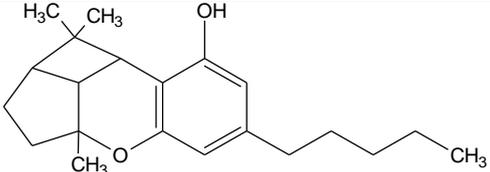
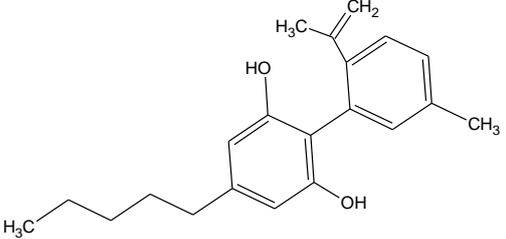
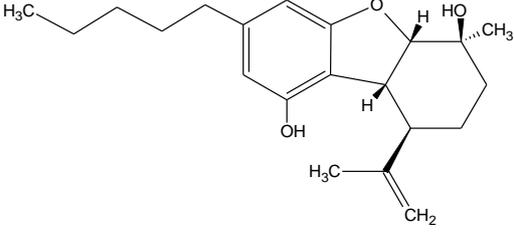
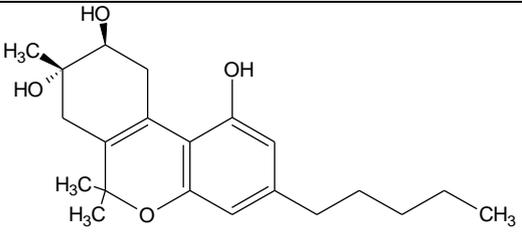
Canabinoides são compostos que interagem com o corpo humano a partir de um sistema de neurônios conhecido como sistema endocanabinoide. Eles são classificados em endocanabinoides, fitocanabinoides e canabinoides sintéticos¹⁹. Fitocanabinoides, ou simplesmente canabinoides, constituem uma classe única de terpeno-fenóis contendo 21 carbonos, produzidos pela *Cannabis sativa* L. Eles são produzidos nos tricomas e encontrados em altas concentrações principalmente nas inflorescências e folhas da planta².

Foram isolados e identificados mais de 140 fitocanabinoides até os dias atuais, essa classe de substâncias é dividida em 11 subclasses dependendo da sua estrutura química, sendo

do tipo: canabigerol (CBG), Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), canabidiol (CBD), canabicromeno (CBC), canabinol (CBN), Δ^8 -tetrahydrocannabinol (Δ^8 -THC), canabicitrol (CBL), canabinodiol (CBND), canabielsoína (CBE), canabitriol (CBT) e tipos variados^{2,3,19,25}. As estruturas químicas dos fitocanabinoides, bem como suas propriedades físico-químicas estão expostas na Tabela 2.

Tabela 2: Principais subclasses de fitocanabinoides

Nomenclatura	Estrutura Química	Propriedades Físico-Químicas ^{3,17}
Canabidiol CBD		Fórmula Molecular: $C_{21}H_{30}O_2$ Massa Molar: 314,46 g mol ⁻¹ pKa: 9,7 log P: 5,79 (octanol/água)
Δ^9 -tetrahydrocannabinol Δ^9 -THC		Fórmula Molecular: $C_{21}H_{30}O_2$ Massa Molar: 314,46 g mol ⁻¹ pKa: 10,6 log P: 6,99 (octanol/água)
Canabigerol CBG		Fórmula Molecular: $C_{21}H_{32}O_2$ Massa Molar: 316,48 g mol ⁻¹
Canabinol CBN		Fórmula Molecular: $C_{21}H_{26}O_2$ Massa Molar: 310,43 g mol ⁻¹ log P: 6,23 (octanol/água)
Δ^8 -tetrahydrocannabinol (Δ^8 -THC)		Fórmula Molecular: $C_{21}H_{30}O_2$ Massa Molar: 314,46 g mol ⁻¹

Canabicromeno CBC		Fórmula Molecular: $C_{21}H_{30}O_2$ Massa Molar: 314,46 g mol ⁻¹
Canabiciolol CBL		Fórmula Molecular: $C_{21}H_{30}O_2$ Massa Molar: 314,46 g mol ⁻¹
Canabinodiol CBND		Fórmula Molecular: $C_{21}H_{26}O_2$ Massa Molar: 310,43 g mol ⁻¹
Canabielsoína CBE		Fórmula Molecular: $C_{21}H_{30}O_3$ Massa Molar: 330,46 g mol ⁻¹
Canabitriol CBT		Fórmula Molecular: $C_{21}H_{30}O_4$ Massa Molar: 346,46 g mol ⁻¹

Esses compostos são inicialmente biosintetizados em sua forma ácida e passam por processos de descarboxilação fotolítica ou térmica para assumirem a forma neutra, como exemplificado na Figura 4^{2,9}. Além disso, os fitocanabinoides ácidos são considerados farmacologicamente inativos, visto que eles não atravessam a barreira hematoencefálica, por isso, a presença desses compostos em alta concentração nos produtos de Cannabis indica um processo ineficaz de extração e/ou produção^{10,26,27}.

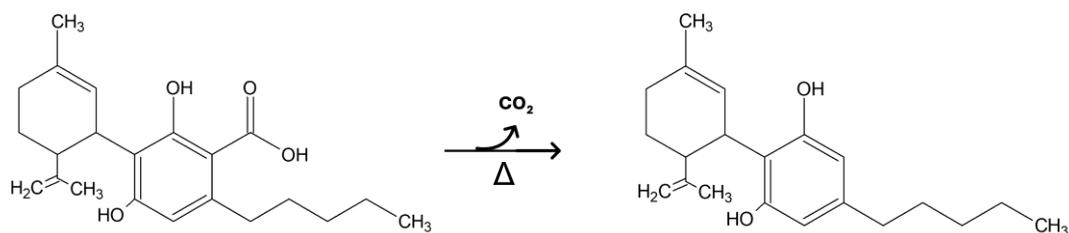


Figura 4: Reação de descarboxilação do ácido canabidiólico

O perfil fitoquímico, assim como a concentração de cada fitocanabinoide, varia a depender da cultivar, forma de cultivo, parte da planta extraída, etc²⁸. A seguir serão abordados os principais fitocanabinoides que serão estudados nesse projeto, bem suas propriedades farmacológicas.

1.3.1. Δ^9 -tetrahydrocannabinol

O Δ^9 -THC é o principal componente psicoativo presente na *Cannabis sativa L.* e geralmente está correlacionado ao uso recreacional da planta²⁹. A depender do teor de Δ^9 -THC na Cannabis, a planta é comumente diferenciada como cânhamo ou marijuana. Cânhamo se refere a Cannabis com menos de 0,3% (m/m) de Δ^9 -THC, além de geralmente conter uma alta concentração de CBD, também conhecido como *fiber-type*. Já marijuana se refere a plantas com mais de 0,3% (m/m) de Δ^9 -THC, também chamadas de *drug-type*^{15,30}.

Estudos indicam que a dose de Δ^9 -THC está intrinsecamente relacionada ao efeito ansiolítico associado ao senso de euforia e recompensa da planta, enquanto baixas doses induzem efeitos ansiolíticos, doses mais elevadas causam respostas contrárias^{29,31}. Na medicina, o Δ^9 -THC é usado devido às suas propriedades antieméticas e estimulantes de apetite. Ele é empregado principalmente para o controle de náuseas e vômitos induzidos pela quimioterapia e no tratamento de anorexia e perda de peso em pessoas com HIV/AIDS²⁴. Além disso, o Δ^9 -THC tem sido investigado no tratamento de glaucoma, enxaqueca, ansiedade e como analgésico²⁷.

1.3.2. Canabidiol

O CBD, assim como o Δ^9 -THC, é o fitocanabinoide majoritário na *Cannabis sativa L.* Ele não possui efeitos psicotrópicos e é o composto mais utilizado e amplamente estudado para fins medicinais reduzindo crises de náuseas e vômito, como ansiolítico, antipsicótico, antirreumático, estimulante de apetite, bem como remédio natural para doenças como Doença

de Parkinson, Alzheimer, doenças inflamatórias intestinais, esclerose múltipla, epilepsia severa, dentre outras^{11,29,32}.

1.3.3. Canabigerol

Além do THC e o CBD, o CBG também vem despertando interesse científico nos últimos anos devido seu potencial de estimular o apetite e suas propriedades anti-inflamatórias. O CBG foi o primeiro composto purificado da resina de Cannabis³ e é o produto de descarboxilação do ácido canabigerólico (CBGA), principal precursor de vários fitocanabinoides por catálise enzimática, esquematizado na Figura 5^{2,24,33,34}.

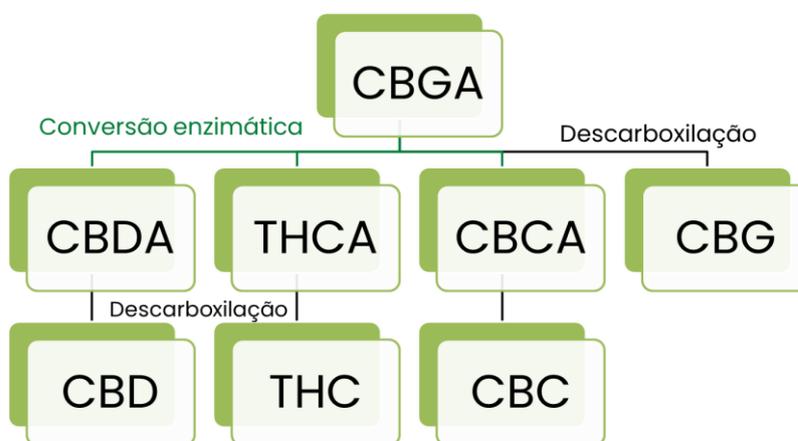


Figura 5: Esquema da biossíntese de a partir do CBGA

Apesar das concentrações de CBGA na Cannabis serem geralmente muito baixas devido a sua rápida conversão em THCA, CBDA e CBCA, técnicas recentes conseguem evitar essa conversão natural, permitindo a seleção de cepas com alto teor de CBGA. O CBG tem sido investigado para o tratamento de dores, doenças neurodegenerativas, lesões cerebrais, inflamações, asma, câncer e diabetes^{35,36}. Além disso o CBG pode ser uma alternativa ao Δ^9 -THC, por ser um canabinoide sem efeito psicoativo, no tratamento de anorexia estimulando o apetite e o consumo de alimentos³⁷.

1.4. Cannabis no Brasil

A *Cannabis sativa L.* chegou ao Brasil no século XVI através de pessoas africanas escravizadas³⁸. Brandão propõe uma análise da evolução da percepção da Cannabis no Brasil, destacando quatro distintos ciclos de atenção ao longo da história³⁹. O primeiro ciclo tem origem no período colonial, onde o cultivo de cânhamo era direcionado para a produção de

fibras têxteis, desempenhando um papel importante na produção de velas e cordas para navegação.

O segundo ciclo foi marcado pela disseminação de ideais racistas por parte dos médicos no início do século XX, associando o uso recreativo da Cannabis à população negra e a distúrbios mentais. Essa visão preconceituosa contribuiu para estigmatizar o consumo da planta. O terceiro ciclo é caracterizado pela criminalização do uso da Cannabis, repressão e perseguição justificadas em nome da segurança. Esse período reflete uma abordagem punitiva, enfatizando a marginalização dos seus usuários³⁹.

Por fim, o quarto ciclo surge com a redemocratização do país a partir da década de 1980. A liberdade de expressão desempenha um papel fundamental, proporcionando legitimidade e visibilidade aos movimentos anti-proibicionistas. A Marcha da Maconha e sua legalidade, reafirmada pelo Supremo Tribunal Federal em 2011, são marcos desse ciclo. Ele representa uma mudança significativa na percepção social, abrindo espaço para discussões e políticas menos repressivas³⁹.

Atualmente, o uso da *Cannabis sativa L.* no Brasil é ilegal e classificado como crime, conforme estabelecido na Lei de Drogas de nº 11.343, de agosto de 2006. No entanto, em 2015, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) promulgou a RDC nº 17 que permite a prescrição médica e a importação de produtos de Cannabis para fins medicinais, contendo CBD ou outros canabinoides, dependendo do caso⁵.

Posteriormente, em 2019, por meio da RDC nº 327 a Anvisa deliberou sobre a concessão de Autorização Sanitária para empresas permitindo a importação, fabricação e comercialização de produtos de Cannabis⁸. A partir dessa resolução foram aprovados 23 produtos à base de CBD e 13 produtos à base de extrato de *Cannabis sativa L.*⁴⁰ No ano de elaboração desta dissertação de mestrado, a Anvisa lançou a Consulta Pública nº 1.233, abrindo espaço para comentários e sugestões do público geral sobre monografias de diversas plantas. A Cannabis (inflorescências) foi incluída na proposta de atualização, voltando a Farmacopeia Brasileira, da qual fez parte até 1959, evidenciando a crescente relevância dessa temática nas pesquisas científicas no Brasil⁴¹.

As principais vias de acesso aos produtos de Cannabis no Brasil, mediante prescrição médica, incluem: (1) a importação por pessoa física; (2) aquisição nacional de produtos à base de Cannabis, produzidos por empresas autorizadas pela RDC nº 327, que estão disponíveis em farmácias ou drogarias⁴²; e (3) associações ou organizações canábicas. Essas associações, formadas por mães, familiares e pacientes junto de ativistas, advogados e pesquisadores,

começaram a se consolidar no país em busca de informações técnico-científicas com o objetivo principal de auxiliar os pacientes na aquisição desses produtos, importados ou formulados pelas próprias associações a partir de autorizações judiciais^{6,42}.

Como grande parte dos produtos das associações é cultivada e beneficiada em solo nacional, eles costumam apresentar valores mais acessíveis em comparação com as outras vias, permitindo que um maior número de pacientes tenha acesso ao tratamento. Além disso, algumas associações oferecem formas de acesso a pessoas em situação de vulnerabilidade financeira, como subsídios ou fornecimentos gratuitos⁴².

Dentre mais de 100 associações destacam-se a APEPI (RJ), ABRACE (PB), AMA+ME (MG), Liga Canábica (PB), Mariaflor (SP), Abrapango (DF), Flor do Amor (DF) entre outras. Para acessar o produto dessas associações, o paciente deve se filiar, o que geralmente envolve a apresentação de laudos e/ou receitas médicas, além de contribuir financeiramente com a associação por meio de mensalidades ou doações. A compra dos produtos de Cannabis não é realizada de forma direta. Atualmente, pelo menos 16 das associações no Brasil já possuem autorização judicial para o cultivo da Cannabis e o fornecimento dos seus produtos aos associados⁴².

1.5. Produtos Terapêuticos à Base de Cannabis

Devido ao crescente interesse e ao potencial terapêutico da Cannabis, uma ampla variedade de produtos derivados têm sido desenvolvidos, tais como tinturas, óleos, capsulas, cremes, gomas etc⁴³. Eles são comumente classificados com base na via de administração, forma farmacêutica, tipo de espectro, entre outros critérios⁴².

A via de administração refere-se à forma que o medicamento entra em contato com o organismo e é dividida em (1) via enteral e (2) via parenteral. Enquanto a primeira é ligada às vias digestivas, a segunda se refere a outras vias como vias respiratórias, camadas da pele, vasos sanguíneos etc⁴². A escolha da via de administração depende de vários fatores como o tempo que se espera que a substância tenha efeito, a dose desejada, a condição médica do paciente e o período de tratamento. Por exemplo, a vaporização oferece efeitos quase imediatos, mas sua duração é menor quando comparada à administração oral⁴⁴.

A forma farmacêutica refere-se à apresentação ou estado físico de um medicamento ou composto ativo. Ela podem ser classificadas em (i) sólidas: comprimidos, capsulas; (ii) semi-sólidas: cremes, pomadas, géis; (iii) líquidas: óleos, tinturas; (iv) gasosas: vapores; e (v) outras formas: gomas, adesivos transdérmicos, entre outros⁴².

Quando classificados em relação ao tipo de espectro, os produtos de Cannabis são divididos em (1) *full-spectrum* (2) *broad-spectrum* e (3) canabinoides isolados, como ilustrado na Figura 6⁴². Produtos *full-spectrum* (espectro completo) contém todos os fitocanabinoides e compostos ativos presentes na Cannabis *in natura*. Esse tipo de medicamento vem sendo utilizado devido ao potencial terapêutico e farmacológico da complexa interação sinérgica entre seus compostos⁴⁵.

Broad-spectrum (espectro amplo) se refere a produtos que contém todos os compostos da Cannabis, exceto o Δ^9 -THC. Esses produtos são indicados para pacientes que apresentam reações adversas ao Δ^9 -THC ou em casos em que seu uso não é apropriado. Além do *full-spectrum* e do *broad-spectrum*, existem os canabinoides isolados, que são produtos com canabinoides como CBD, Δ^9 -THC, CBG, ou misturas purificadas em proporções específicas⁴².



Figura 6: Esquema do tipo de produto de Cannabis com relação ao espectro⁴²

Os produtos das associações incluem cremes, sabonetes, gomas, pomadas, sprays e os óleos de Cannabis, o principal produto⁴². É importante ressaltar a diferença entre os óleos medicinais de Cannabis com seus óleos essenciais e o óleo extraído das suas sementes. Os óleos medicinais de Cannabis recebem essa nomenclatura devido ao uso de um veículo diluente oleoso, durante ou após o processo de extração, ou a substâncias isoladas como o CBD⁴⁵. Os óleos de Cannabis podem ser separados de acordo com a razão entre Δ^9 -THC e CBD, se classificando como Δ^9 -THC majoritário (Δ^9 -THC:CBD \geq 5:1), balanceado de Δ^9 -THC e CBD (Δ^9 -THC:CBD \leq 1:4 e CBD: Δ^9 -THC \leq 1:4) e CBD majoritário (CBD: Δ^9 -THC \geq 5:1)⁴⁵.

A extração hidroalcolica é uma das metodologias mais comuns para a formulação dos óleos de Cannabis^{45,46}. De forma simplificada, o processo inicia-se com o preparo das

inflorescências secas para a extração, a biomassa é moída e pode ser peneirada para uniformizar o tamanho das partículas⁴⁶.

Em seguida, é adicionado álcool de cereais ou álcool absoluto para a extração por maceração dinâmica, geralmente em baixas temperaturas para evitar a extração de pigmentos e ceras, que poderiam conferir características organolépticas indesejadas ao produto⁴⁵. O extrato bruto é então filtrado para separar a biomassa sólida, podendo passar por etapas adicionais de purificação.

O solvente é evaporado, sob vácuo ou não, obtendo-se o extrato concentrado. Este extrato é submetido ao processo de descarboxilação, o aquecimento a 115 °C por 90 minutos efetivo para converter o CBDA e THCA em suas formas ativas⁴⁵. Em seguida, o extrato é diluído em veículos como azeite de oliva extravirgem (AOEV), óleo de coco e TCM (triglicerídeos de cadeia média, derivados do óleo de coco) para atingir a concentração final desejada. Esses diluentes também podem agregar características positivas ao medicamento^{26,45,46}.

Além disso, a degradação de terpenos presentes na planta pode ocorrer durante a etapa de descarboxilação. Dessa forma, pesquisadores e produtores propõem a adição de óleos essenciais ricos em terpenos, extraídos ou não da Cannabis, à formulação final, buscando potencializar os efeitos terapêuticos e aprimorar o aroma e sabor do óleo^{45,46}.

O fluxograma da metodologia descrita está apresentado de forma simplificada na Figura 7. A etapa de descarboxilação pode ser feita com as inflorescências secas ou após o processo de extração e evaporação, no extrato concentrado. Além disso, o fluxograma também ilustra o método de extração direta com o veículo diluente, no qual as inflorescências são adicionadas ao veículo e submetidas a aquecimento em banho-maria. Esse tipo de extração também é bastante utilizado por ser mais simples e não envolver solventes, porém geralmente tem um menor teor de canabinoides extraídos e pode conter maior quantidade de ceras no produto⁴⁵.

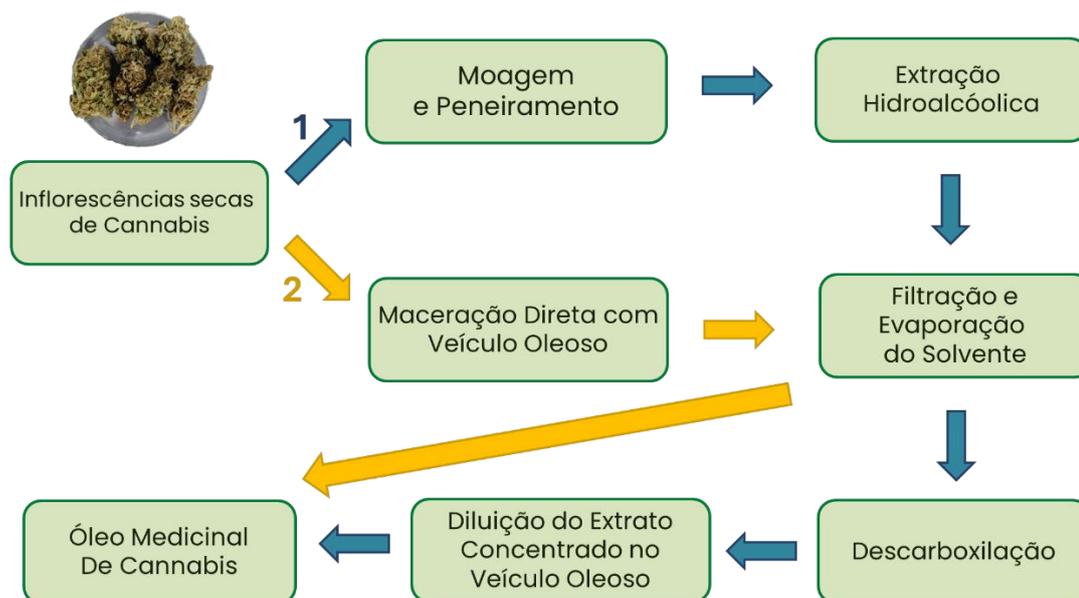


Figura 7: Fluxograma resumido da metodologia mais comum para o preparo do óleo medicinal de Cannabis. Rota 1: extração hidroalcolólica; rota 2: extração final com veículo oleoso. Adaptado de Gouvêa-Silva et al⁴⁵.

Dentre as vantagens dos óleos terapêuticos de Cannabis, destaca-se a facilidade no ajuste das doses individuais por meio da simples diluição do extrato concentrado. Na perspectiva de que diferentes fitocanabinoides e suas associações podem favorecer o tratamento de diversas patologias, é crucial determinar a composição e a concentração desses compostos tanto nos extratos concentrados, para a formulação, quanto no óleo produzido, para o doseamento⁴⁵.

1.6. Métodos de Identificação e Análise de Produtos de Cannabis

Com a iminente aprovação de cultivos de Cannabis pela Anvisa e a constante inserção de novos produtos pelas associações, surge uma demanda crescente por métodos analíticos robustos e simples para a análise rotineira da composição dos produtos medicamentosos, de forma a garantir o controle de qualidade de acordo com os padrões regulamentados⁹.

Uma grande variedade de técnicas analíticas e metodologias têm sido utilizadas para identificação e análise de produtos de Cannabis. Desde técnicas mais simples que dispensam instrumentação como testes colorimétricos e cromatografia de camada delgada (CCD) até técnicas instrumentais mais precisas como a cromatografia líquida (CL) e a cromatografia gasosa (CG) acopladas a diferentes detectores, combinados ou não¹⁷. Exemplos incluem o detector de ionização em chamas (FID) e espectrometria de massas (MS) para a CG e detectores espectroscópicos como UV ou arranjo de fotodiodos (DAD) e detecção por MS para a CL^{2,17}.

A CG é uma técnica simples, de boa detectabilidade e alta sensibilidade, principalmente quando acoplada a MS, mas é importante ressaltar que os fitocanabinoides são biosintetizados na sua forma ácida nos tecidos da planta (CBDA, Δ^9 -THCA, CBGA)^{1,10,23}. Dentre as etapas de produção dos medicamentos, inclui-se a descarboxilação desses compostos para sua forma ativa, sendo fundamental monitorar a presença ou ausência dos mesmos para avaliar a eficiência do processo⁴⁵. Os fitocanabinoides ácidos não podem ser prontamente quantificados por terem baixa volatilidade e serem termolábeis, podendo ser descarboxilados no injetor ou durante a análise^{23,28,34}. Assim, etapas adicionais de derivatização são necessárias²⁸. Como alternativa, a CL tem sido amplamente utilizada em estudos mais recentes para a obtenção do perfil cromatográfico de produtos de Cannabis²³.

Entre os detectores acoplados à CL, o detector por MS destaca-se como o mais empregado⁴⁷. Esse tipo de detector permite confirmar a identidade dos picos no cromatograma, mesmo sem estarem bem resolvidos e sem a necessidade do uso de padrões analíticos, pelos seus padrões de fragmentação e abundância relativa. Porém, essa técnica requer treinamento do analista, além de ter alto custo de operação e manutenção, tornando-se inviável para análises rotineiras de fitocanabinoides²³.

Em contrapartida, os detectores UV-Vis ou DAD são muito mais baratos, mais simples de serem operados e mostram-se adequados, visto que os canabinoides são compostos cromóforos, absorvendo radiação na região ultravioleta²³. Fitocanabinoides ácidos e neutros possuem diferentes espectros de absorção enquanto os primeiros têm picos de absorção máxima em 270 e 310 nm, já os segundos possuem picos em 210 e 220 nm, o uso de HPLC-DAD permite a análise simultânea desses compostos e diferenciar amostras de produtos de *Cannabis sativa L.* de diferentes cepas quem variam em polaridade e perfis fitoquímicos⁴⁷.

1.6.1. Determinação de Fitocanabinoides por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção por Arranjo de Fotodiodos

A maioria das análises de fitocanabinoides por HPLC-DAD são baseadas na separação por partição dos componentes utilizando sistema de cromatografia de fase reversa, na qual utiliza-se uma fase móvel polar, mistura de metanol ou acetonitrila e água, e uma fase estacionária apolar, principalmente C18, sílica quimicamente ligada com grupos octadecil, ou modificações com grupos bifenis⁴⁷.

Citti e colaboradores¹⁰ desenvolveram um método de HPLC-DAD para a determinação qualitativa e quantitativa dos fitocanabinoides principais, CBD e Δ^9 -THC, suas formas ácidas

e CBN em amostras de extratos de Cannabis medicinal em azeite de oliva e etanol, extraídos a partir de inflorescências com composição padronizada por uma empresa na Itália. Além disso, foi utilizada espectrometria de massas de alta resolução para confirmar a identidade e pureza dos analitos. O método proposto foi validado utilizando várias figuras de mérito e foram obtidas recuperações maiores de 85% para as amostras extraídas com azeite de oliva e maiores que 93% para amostras extraídas com etanol.

Um método de HPLC-DAD e MS foi desenvolvido por Brighenti e colaboradores para a análise de fitocanabinoides não psicoativos em amostras de material seco de inflorescências de Cannabis (fiber-type) e produtos farmacêuticos¹. Foi utilizada de forma pioneira uma coluna com tecnologia de partículas fused-core, de forma a melhorar a performance cromatográfica separando os componentes em menos tempo e com menor uso de solvente. Foram obtidas recuperações de 74 a 91% dos analitos em uma amostra de inflorescência.

Carvalho e colaboradores²⁶ desenvolveram e validaram um método de HPLC-DAD para a determinação de CBD, Δ^9 -THC, CBDA, THCA e CBN em veículos oleosos e extratos de Cannabis. As amostras avaliadas foram medicamentos de extratos de Cannabis produzidos no Brasil, as quais foram comparadas com óleos ricos em CBD importados. Foi destacado pelos autores a importância do método para a produção farmacêutica e para avaliação de risco desses medicamentos.

A dificuldade para aquisição de padrões analíticos de canabinoides, devido seu alto preço e limitações de disponibilidade, é um impedimento para seu uso em análises de rotina. Hall²³ e colaboradores desenvolveram um método para quantificar 10 canabinoides em amostras de inflorescências secas e óleos de Cannabis usando o tempo de retenção relativo dos canabinoides em relação ao CBD e CBDA, padrões de referência de mais fácil aquisição. Foram obtidas recuperações, a partir da fortificação em matriz surrogada, entre 90,1 e 109,3%, demonstrando resultados adequados para uma determinação rápida e simples de fitocanabinoides.

O trabalho de Sofrás e colaboradores⁴⁸ teve como objetivo desenvolver e validar um método simples e rápido de HPLC-UV para a identificação e quantificação de CBDA, CBG, CBD, CBN, Δ^9 -THC, CBC e THCA em extratos concentrados de Cannabis, inflorescências e óleos terapêuticos. Com base nesse método, foi possível separar os compostos em menos de 20 minutos, com recuperações variando de 80 a 115% em diferentes matrizes. Além disso, os autores evidenciaram que o método desenvolvido é adequado para análises de rotina e também foi proposto para ser incluído na Farmacopeia Argentina.

Diante do exposto, o uso da técnica de HPLC-DAD tem sido eficiente e pertinente na determinação de fitocanabinoides em amostras diversas de *Cannabis sativa L.* Dessa forma, mostra-se de grande importância a aquisição do perfil cromatográfico e a concentração dos fitocanabinoides nos produtos de *Cannabis sativa L.* produzidos por associações no Brasil para fins medicinais. Além disso poucos trabalhos exploram o CBG, principalmente devido a sua baixa resolução em relação ao CBD, geralmente co-eluem em concentrações maiores que 10% nos extratos². Devido seu potencial terapêutico, a identificação e separação desse fitocanabinoide é relevante.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Reagentes e Amostras

Metanol e acetonitrila grau HPLC ($\geq 99,9\%$) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Álcool anidro grau HPLC/espectro (mistura de etanol 89-91%, metanol e isopropanol) foi adquirido da Tedia. Ácido fórmico reagent grade ($\geq 95\%$) foi obtido da Sigma-Aldrich. Os padrões de referência de CBD, CBN, CBG e Δ^9 -THC foram obtidos em ampolas de 1,0 mL contendo $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ em metanol (Supelco).

Adicionalmente, foi adquirida uma mistura de oito canabinoides neutros — CBD, Δ^9 -THC, Δ^8 -THC, CBG, CBN, CBC, CBDV e THCV — na concentração de $500 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol (Supelco), utilizada para a construção das curvas analíticas. Uma ampola de Δ^9 -THC, previamente aberta, foi disponibilizada no laboratório, sendo empregada exclusivamente para fins qualitativos nos estudos preliminares. Todos os padrões analíticos foram armazenados no freezer ($-9,5 \pm 1,5 \text{ } ^\circ\text{C}$) em vials âmbar. As soluções aquosas foram preparadas utilizando água ultrapura Tipo I, resistividade de $18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ a $22 \pm 2 \text{ } ^\circ\text{C}$, obtida de um sistema Arium® Mini (Sartorius).

As amostras de óleos e extratos concentrados de Cannabis analisadas foram doadas pelas associações APEPI (RJ), Abrapango (DF) e Flor do Amor (DF), por meio de parcerias estabelecidas entre o grupo de pesquisa e essas associações. As descrições com relação a característica (quimiotipo), o tipo e a associação de origem das amostras estão apresentados na Tabela 3. Os extratos concentrados foram armazenados no freezer ($-9,5 \pm 1,5 \text{ } ^\circ\text{C}$) até o momento da análise e antes do uso foi esperado cerca de 15 minutos até eles atingirem a temperatura ambiente. Os óleos de Cannabis foram mantidos em um ambiente arejado, protegido da luz e em temperatura ambiente.

Tabela 3: Conjunto de amostras analisadas, seu tipo, característica e associação de origem

#	Amostra	Tipo de Amostra	Característica	Associação
1	Doctor	Óleo em AOEV*	Alto teor de CBD	APEPI
2	OCBG	Óleo em AOEV*	Alto teor de CBG	APEPI
3	Schanti	Óleo em AOEV*	Balanceado de CBD e Δ^9 -THC	APEPI
4	Purple Wreck	Óleo em AOEV*	Alto teor de Δ^9 -THC	APEPI
5	Harle Tsu	Óleo em AOEV*	Alto teor de CBD	APEPI
6	Rainbow	Óleo em TCM*	Alto teor de Δ^9 -THC	Abrapango
7	EBDoctor	Extrato Concentrado	Alto teor de CBD	APEPI
8	EBCBG	Extrato Concentrado	Alto teor de CBG	APEPI
9	EBSchanti	Extrato Concentrado	Balanceado de CBD e Δ^9 -THC	APEPI
10	EBPurple Wreck	Extrato Concentrado	Alto teor de Δ^9 -THC	APEPI
11	OG Mix	Extrato Concentrado	Alto teor de Δ^9 -THC	Abrapango
12	Fenoqueen	Extrato Concentrado	Alto teor de CBD	Flor do Amor
13	Extrato Destilado	Extrato Concentrado	Alto teor de Δ^9 -THC	Abrapango
14	HCBD	Extrato Concentrado	Alto teor de CBD	Abrapango
15	HTHC	Extrato Concentrado	Alto teor de Δ^9 -THC	Abrapango

*Veículo diluente do óleo terapêutico, AOEV: Azeite de Oliva Extravirgem; TCM: Triglicerídeo de Cadeia Média (Extraído e isolado do óleo de coco). As denominações EB: extrato bruto e O: óleo foram utilizadas para diferenciar as amostras da APEPI

2.2. Instrumentação

Todas as corridas cromatográficas foram realizadas utilizando um HPLC (Shimadzu) composto de uma bomba quaternária LC-20AD, um módulo de desgaseificação DGU-20A5R, um amostrador automático SIL-20AHT, um forno de coluna CTO-20A e um detector de arranjo de fotodiodos SPD-M20A conectados a um módulo de comunicação CMB-20A. O controle do equipamento e a aquisição de dados foi feita utilizando o software comercial Lab Solutions® (Shimadzu).

Os estudos preliminares foram feitos utilizando uma coluna C-18 Zorbax Eclipse Plus® (Agilent), com dimensões de 250 x 4,6 mm e diâmetro de partícula de 5 µm. As separações cromatográficas foram feitas utilizando uma coluna Poroshell 120 EC-C18® (Agilent), com dimensões de 150 x 3 mm e diâmetro de partícula de 2,7 µm.

As pesagens foram feitas numa balança analítica AX200 com precisão de 0,0001 g (Shimadzu). Foi utilizado banho ultrassônico (Eco-sonics, Ultronique) e um agitador tipo vórtex (KASVI) para auxiliar a solubilização das amostras.

2.3. Procedimentos Experimentais

2.3.1. Desenvolvimento Preliminar do Método Cromatográfico

Foi feita uma revisão na literatura, a partir de métodos oficiais e artigos científicos, de forma a escolher os parâmetros que mais se adequariam à separação eficiente dos fitocanabinoides com alta resolução cromatográfica^{4,22,23,26,48}. A escolha dos parâmetros englobou a leitura de duas revisões sistemáticas para análise de fitocanabinoides, com artigos de 2005 até 2020^{49,50}. Foi considerado para a escolha desses parâmetros as especificações da coluna cromatográfica disponível, além de ter dado enfoque a métodos de HPLC-DAD ou UV.

O método consistiu em uma corrida isocrática composta de uma fase móvel A (0,1% de ácido fórmico, HCOOH, em água ultrapura) e um solvente orgânico B de composição otimizada de forma a determinar a melhor condição de separação dos padrões de fitocanabinoides, CBD e Δ^9 -THC. O padrão secundário de Δ^9 -THC utilizado nos testes preliminares, apesar de não conter impurezas, não tinha concentração definida com confiabilidade, portanto foi utilizado apenas qualitativamente de forma a otimizar sua separação do CBD.

As variáveis estudadas foram a composição do solvente B, metanol (MeOH) ou acetonitrila (MeCN), a adição ou não de ácido fórmico (0,1%, v/v) nesse solvente e a proporção do solvente B (50 ou 80%). Dessa forma, os experimentos realizados com uma

mistura binária de soluções padrão contendo Δ^9 -THC e CBD ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) estão resumidos na Tabela 4, a ordem dos 8 experimentos foi aleatorizada pelo software Microsoft Office Excel® e para cada ensaio foi feita injeção ($10 \mu\text{L}$) em duplicata. O DAD foi ajustado nos comprimentos de onda de 210, 220 e 280 nm. A coluna foi mantida a temperatura ambiente com um fluxo de 1 mL min^{-1} .

Uma vez determinadas as condições que otimizaram a separação cromatográfica, os padrões de Δ^9 -THC e CBD ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) foram injetados separadamente de forma a confirmar a identidade dos picos.

Tabela 4: Experimentos da otimização multivariada das condições cromatográficas

Ensaio	Solvente B	Ácido Fórmico	Proporção de B
1	MeOH	Não	50%
2	MeOH	Sim	50%
3	MeCN	Não	50%
4	MeCN	Sim	50%
5	MeOH	Não	80%
6	MeOH	Sim	80%
7	MeCN	Não	80%
8	MeCN	Sim	80%

2.3.2. Adaptação do Método Cromatográfico

O método cromatográfico foi adaptado para substituir a coluna 250 mm por uma de 150 mm, utilizando uma mistura ternária de CBD, Δ^9 -THC e CBG. Os parâmetros do método que foram ajustados incluíram a proporção do solvente orgânico (B) na corrida isocrática, testada em 80%, 75% e 70%, e o fluxo da fase móvel, avaliado em 1,0 e 0,5 mL/min.

A adaptação foi baseada na resolução entre os picos de CBD e CBG obtidos em 210 nm, segundo a Equação 1, na qual, t_{R1} e t_{R2} representam o tempo de retenção de cada pico ($t_{R1} < t_{R2}$), e $W_{0,5h1}$ e $W_{0,5h2}$ correspondem a largura à meia altura dos picos.

$$R_s = 1,18 * \left[\frac{t_{R2} - t_{R1}}{(W_{0,5h1} + W_{0,5h2})} \right]$$

Equação 1: Cálculo da resolução entre 2 picos cromatográficos

Após a determinação das condições que otimizaram a separação cromatográfica, a mistura padrão de fitocanabinoides neutros foi injetada na concentração de $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, e a resolução entre cada par de picos foi calculada a partir da Equação 1. Para confirmar a identidade dos compostos, padrões individuais de CBD, CBG, CBN e Δ^9 -THC foram adicionados separadamente à mistura padrão ($1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Além disso, o perfil de separação obtido para os oito fitocanabinoides foi comparado com o certificado de análise do padrão utilizado, garantindo a correspondência dos tempos de retenção e a confiabilidade dos resultados. Essa abordagem combinada assegurou a correta identificação dos compostos presentes.

2.3.3. Curvas de Calibração

Uma solução estoque ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi preparada diretamente a partir do padrão de mistura de fitocanabinoides, a qual foi diluída para obter uma curva de calibração externa de seis pontos, nas seguintes concentrações: 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 e $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. A quantificação fitocanabinoides foi realizada com base na área dos picos obtidos em 210 nm, e cada padrão foi injetado em triplicata no HPLC-DAD segundo o método otimizado em 2.3.2.

2.3.4. Preparo de Amostra

As amostras foram preparadas seguindo as recomendações descritas por um método oficial da AOAC⁵¹ com adaptações. Os óleos foram homogeneizados manualmente e aproximadamente 0,5 g de cada óleo ($n=3$) foram pesados em um balão volumétrico de 25 mL, ao qual foi adicionado álcool anidro. A mistura foi solubilizada com auxílio de agitador do tipo vórtex e banho ultrassônico por 1-2 minutos para a total dissolução do óleo, e em seguida, o balão foi avolumado. As amostras foram filtradas através de uma membrana de PVDF $0,22 \mu\text{m}$.

Para os extratos concentrados aproximadamente 0,05 g de cada amostra ($n=3$) foram pesados em um béquer de 10 mL, ao qual foram adicionados 3 mL de álcool anidro. A amostra foi dissolvida manualmente e transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 25 mL que foi completado. Os extratos foram filtrados através de uma membrana de PVDF $0,22 \mu\text{m}$.

As diluições das amostras foram realizadas para ajustar a concentração do fitocanabinoide majoritário à curva analítica. Para algumas amostras, injeções preliminares foram realizadas antes da análise quantitativa. As diluições variaram de 60 a 300 vezes,

utilizando balões volumétricos de 5 mL. Além disso, todas as amostras submetidas a diluições de 10 vezes em balões volumétricos de 5 mL, de forma a determinar o perfil cromatográfico e quantificar os fitocanabinoides minoritários. As amostras diluídas foram então transferidas para vials âmbar e analisadas por HPLC-DAD, conforme o método otimizado no item 2.3.2.

2.3.5. Análise Comparativa do Método Proposto

Foram obtidos 3 óleos Doctor, conforme descrito no item 2.1, de um mesmo lote e doados pela APEPI. A partir de cada óleo foram retiradas três alíquotas, que foram preparadas de acordo com procedimento descrito em 2.3.4. Os óleos foram analisados e os teores obtidos para o CBD, em mg/mL, foram comparados com a concentração nominal informada no rótulo, 33 mg/mL, e com o limite máximo permitido de Δ^9 -THC de 0,3% ou 3 mg/mL.

Adicionalmente, para avaliar a eficiência e a confiabilidade do método proposto de HPLC-DAD, foram comparados os resultados obtidos com 4 óleos de quimiotipos diferentes produzidos pela APEPI — Harle Tsu, Schanti, Purple Wreck e CBG — descritos no item 2.3.1, com os obtidos pela análise desses óleos utilizando Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio quantitativa (qNMRH). Essas análises foram feitas em colaboração com o grupo de pesquisa AQQUA, que também engloba o presente projeto.

Para análise de referência por RMN de H foram pesadas aproximadamente 100 mg (entre 98,3 e 101,7 mg) de cada amostra em microtubos de plástico de 2,0 mL, no qual foram adicionados 0,7 mL de clorofórmio deuterado com auxílio de uma micropipeta. Para obter o volume final real a partir da densidade do líquido, o clorofórmio foi pesado. Em seguida, as amostras foram levadas ao banho ultrassônico por 10 minutos e centrifugadas por 10 minutos a 5000 rpm.

Após esses processos, o extrato obtido foi filtrado com algodão. Aproximadamente 0,6 mL das soluções filtradas foram transferidas para tubos de RMN de 5 mm para serem analisados posteriormente. O padrão foi feito com dimetilsulfona, foram pesados entre 700 e 900 mg, e posteriormente adicionado 0,7 mL de clorofórmio também em tubo de RMN de 5 mm. Na determinação por RMN de H, as análises foram realizadas em um espectrômetro da marca Bruker de 600 MHz, foi utilizado o método de RMN quantitativo, em RMN de hidrogênio e o sinal utilizado foi de 1,08 ppm.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Desenvolvimento Preliminar do Método Cromatográfico

Os resultados do tempo de retenção dos picos obtidos em cada ensaio estão resumidos na Tabela 5. Nos ensaios de 1 a 4, os quais a proporção de solvente orgânico foi de 50%, não foram observados picos no cromatograma durante as corridas cromatográficas em 50 minutos, indicando que a força do solvente da fase móvel não foi suficiente para quebrar as interações e retirar os analitos retidos na fase estacionária. Esses resultados são justificados pela alta hidrofobicidade dos fitocanabinoides que pode ser expressa na forma de constante de partição octanol-água (P), na qual $\log P$ varia de 4,86 até 6,99⁵².

Tabela 5: Tempo de retenção dos picos obtidos nos ensaios da otimização multivariada

Ensaio	1º Pico (min)	2º Pico (min)
1	-	-
2	-	-
3	-	-
4	-	-
5	12,58	29,11
6	12,70	29,34
7	7,73	14,48
8	7,67	14,57

Já para os ensaios 5 a 8, foram obtidos 2 picos nos cromatogramas, que estão ilustrados na Figura 8. Nos experimentos com acetonitrila, Figura 8B, os tempos de retenção foram significativamente menores, praticamente metade, quando comparados aos experimentos utilizando metanol, Figura 8A. Além disso, os picos apresentaram maior intensidade e menor largura nos ensaios em acetonitrila, indicando melhor separação.

A força de eluição de uma fase móvel é determinada pela polaridade do solvente, denominada série eluotrópica. De acordo com Snyder (1968), os valores de P' , parâmetro de polaridade para cromatografia de partição, do metanol e da acetonitrila são respectivamente 5,1 e 5,8⁵³. Na qual solventes fortes diminuem a retenção dos analitos, assim como foi observado nos resultados. Também, foi possível observar que as corridas conduzidas em metanol tiveram uma pressão maior, decorrente da maior viscosidade desse solvente e consequentemente da fase móvel^{48,53}.

Além disso, a adição de ácido fórmico no solvente orgânico não teve efeito na separação cromatográfica, na qual os tempos de retenção dos picos não apresentaram diferença significativa em relação ao mesmo solvente sem ácido, num nível de 95% de confiança, atestada pelo teste t de Student. Também foi observado que para o ensaio 6, metanol acidificado, a linha de base do cromatograma não se estabilizou, em vermelho na Figura 8A, esse efeito pode ter ocorrido devido a um equilíbrio incompleto da fase móvel.

Dessa forma, foi escolhido como melhor condição para otimizar o método cromatográfico o solvente orgânico B descrito pelo ensaio 7, acetonitrila 80% sem adição de ácido fórmico, que foi utilizado para os estudos subsequentes.

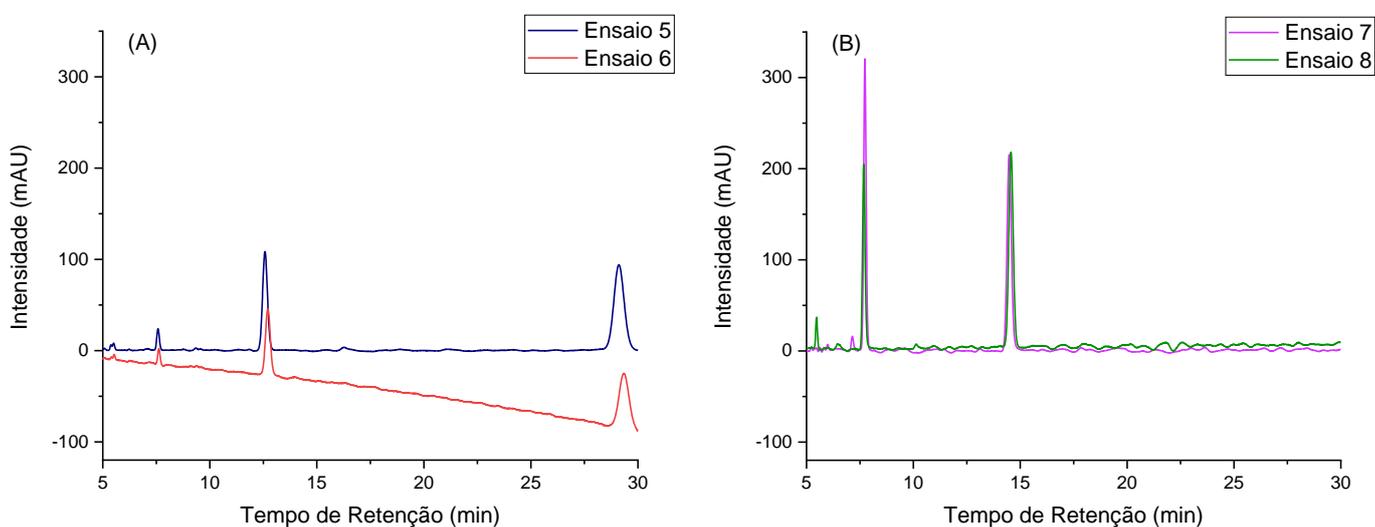


Figura 8: Cromatogramas da otimização. (A): Ensaios em metanol; (B): ensaios em acetonitrila

Foram injetados separadamente os padrões de CBD e Δ^9 -THC utilizando o método otimizado para confirmar os tempos de retenção de cada um dos analitos e os cromatogramas obtidos foram sobrepostos com a mistura dos padrões (Figura 9). Dessa forma, o pico em 7,7 minutos equivale ao CBD e o pico em 14,5 minutos equivale ao Δ^9 -THC.

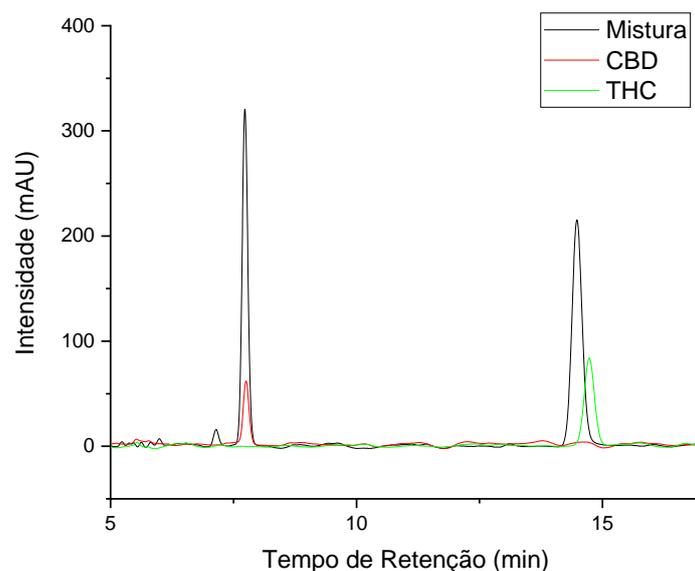


Figura 9: Cromatogramas sobrepostos da mistura de CBD e Δ^9 -THC e seus padrões separados

Era esperado que o Δ^9 -THC tivesse um maior tempo de retenção visto que seu log P (6,99) é uma ordem de grandeza maior que do CBD (5,79)¹⁷. Como é ilustrado na Figura 10, a estrutura do CBD contém um grupo resorcinol (anel benzeno-1,3-diol)¹⁹, que favorece interações do tipo dipolo-dipolo entre os grupos hidroxila e o par de elétrons da acetonitrila. Por outro lado, o Δ^9 -THC possui apenas um grupo fenol (único OH disponível para interação) e um grupo éter, além de anel fechado conferindo menor polaridade ao composto.

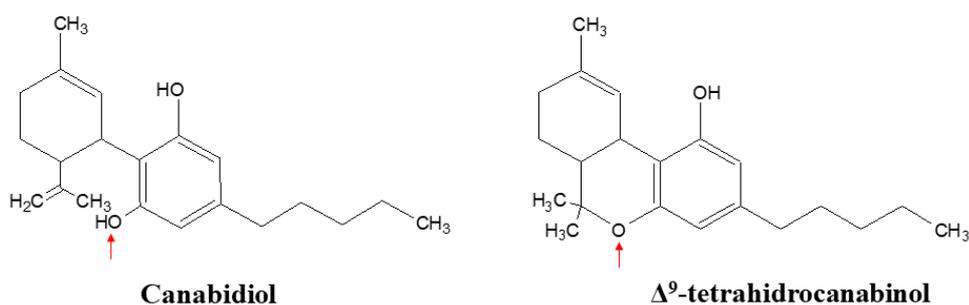


Figura 10: Estrutura molecular do CBD e Δ^9 -THC com destaque na diferença das estruturas

3.2. Adaptação do Método Cromatográfico

Foi adquirida uma coluna cromatográfica de dimensões menores para diminuir o tempo de corrida e, conseqüentemente, das análises, além de menor consumo de solvente. Inicialmente, o método otimizado no item 2.1 foi empregado com a injeção de uma mistura

ternária contendo CBD, CBG e Δ^9 -THC para verificar o perfil de separação desses compostos com a nova coluna. Observando o cromatograma obtido (Figura 11), é possível identificar uma separação insuficiente entre os picos de CBD e CBG, efeito esperado devido a semelhança estrutural e de polaridade desses compostos⁵⁴. A partir da Equação 1, foi obtida resolução de 1,12 entre esses picos, evidenciando esses resultados.

Collins prediz que resoluções $\geq 1,5$ entre picos garantem a separação completa entre eles, sendo que um método eficiente para aumentar a resolução é melhorar a seletividade, a partir de ajustes na composição da fase móvel ou substituindo a fase estacionária⁵³. No entanto, para alguns compostos muito similares, em relação à polaridade e estrutura, esses ajustes podem provocar alargamento dos picos, efeitos de cauda ou aumento significativo do tempo de retenção se não forem feitos moderadamente. Dessa forma, para análises quantitativas, resoluções $\geq 1,25$ são consideradas satisfatórias⁵³.

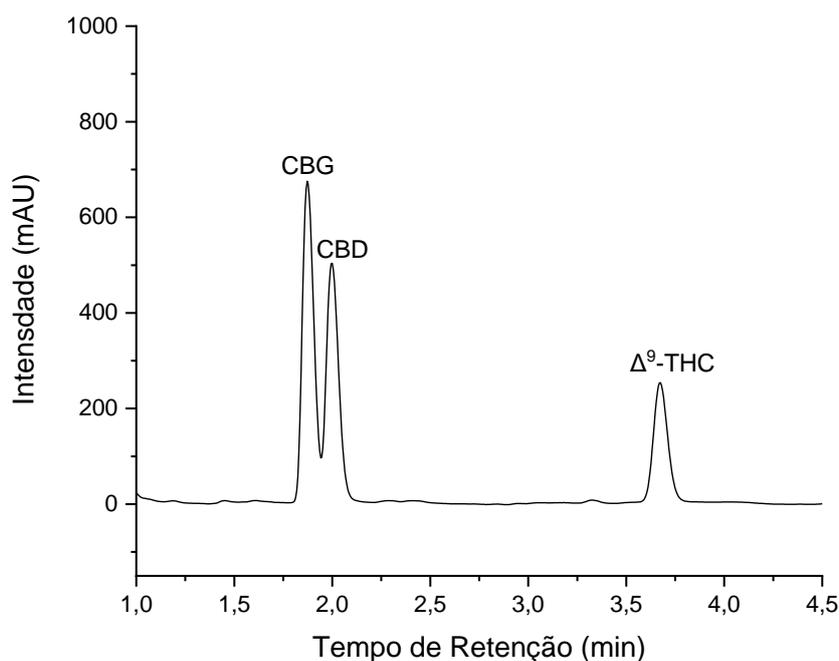


Figura 11: Cromatograma do método otimizado em 3.1 utilizando coluna de 150 mm

Diante desses resultados, variou-se a proporção de acetonitrila na fase móvel, diminuindo a força de eluição, com o objetivo de melhorar a separação. Foram avaliadas proporções de 75 e 70% de acetonitrila. Além disso, o fluxo da fase móvel também foi variado, de 1 mL/min para 0,5 mL/min. Com a diminuição do fluxo, esperava-se aumentar o tempo de interação entre os compostos e a fase estacionária podendo melhorar a resolução. Os cromatogramas dessas modificações estão ilustrados na Figura 12 e a resolução entre CBG e CBD em cada uma delas está exposta na Tabela 6.

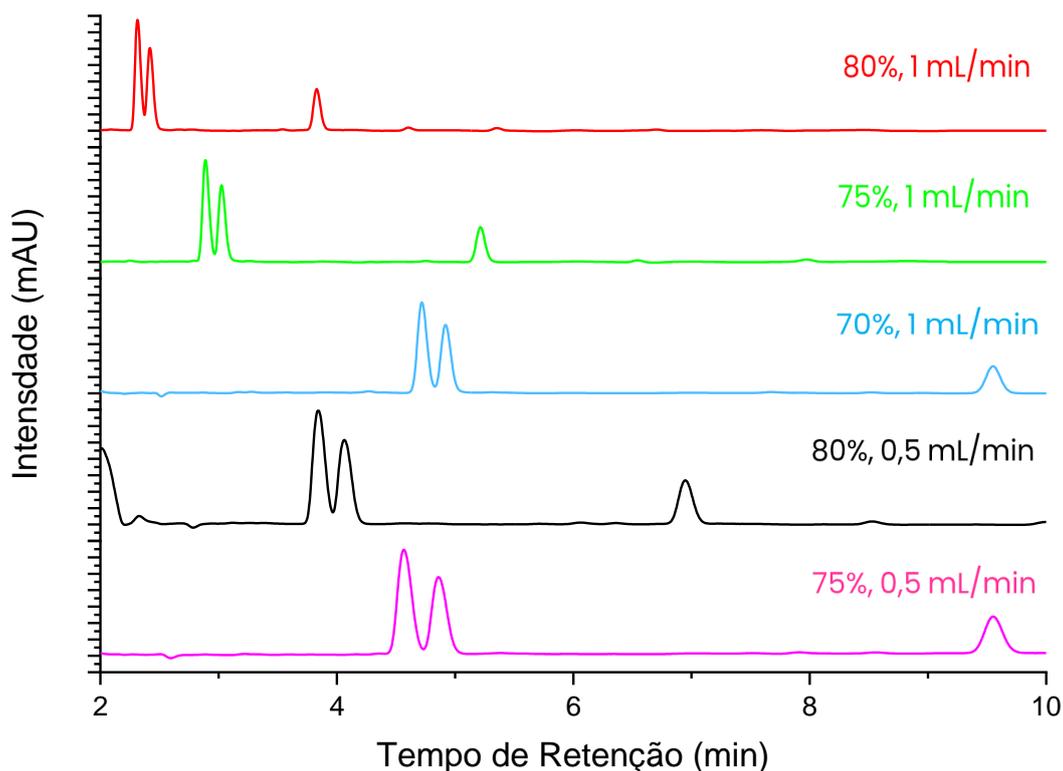


Figura 12: Cromatogramas sobrepostos. Modificação na proporção de acetonitrila de 80, 75 e 70% e modificação no fluxo do método de 1 para 0,5 mL/min

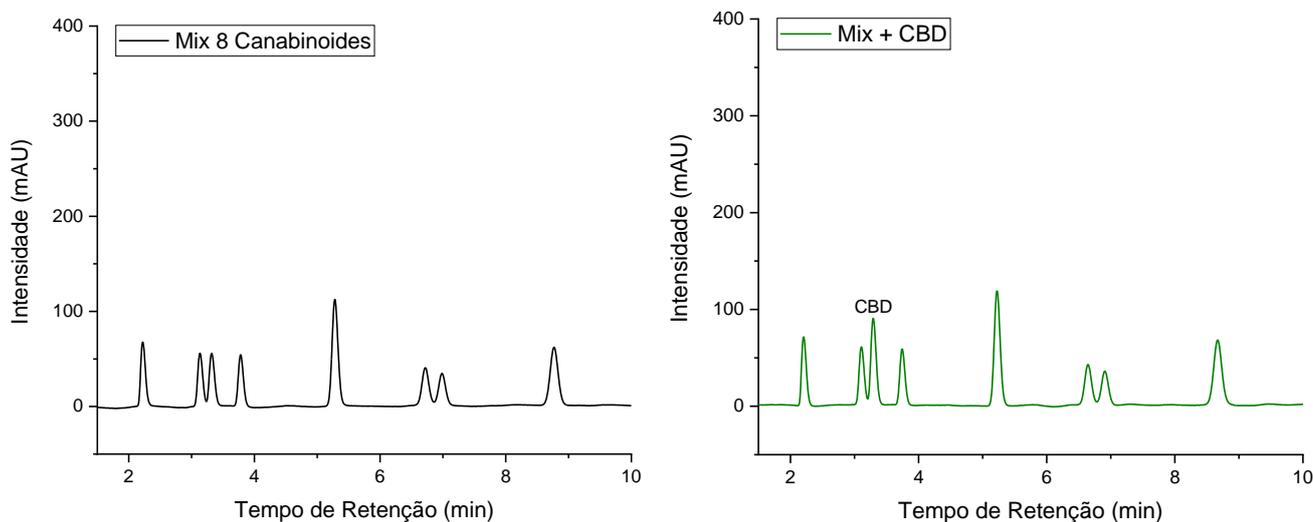
De acordo com os resultados obtidos, foi possível observar que a diminuição da proporção de acetonitrila na fase móvel (Figura 12) resultou em um aumento significativo na resolução entre os picos ao diminuir a proporção de 80 para 75%. Porém, ao reduzir de 75 para 70%, a resolução não mudou significativamente, sendo acompanhado de alargamento dos picos e um aumento de quase duas vezes no tempo de retenção do Δ^9 -THC, fitocanabinoide mais hidrofóbico presente na mistura. Além disso, a redução do fluxo da fase móvel (Figura 12) não resultou em um aumento na resolução entre os picos, essa mudança também contribuiu para o alargamento dos picos e aumento dos tempos de retenção.

Tabela 6: Resolução entre os picos CBG e CBD nas corridas

Método	Resolução
80% de acetonitrila, fluxo 1	1,12
75% de acetonitrila, fluxo 1	1,27
70% de acetonitrila, fluxo 1	1,26
80% de acetonitrila, fluxo 0,5	1,09
75% de acetonitrila, fluxo 0,5	1,26

Diante disso, foi escolhido como melhor condição para otimizar a separação cromatográfica na coluna de menores dimensões 75% de acetonitrila na fase móvel, em um fluxo de 1 mL/min, visando corridas mais rápidas. Correia e colaboradores⁴ empregaram a mesma fase móvel, 25% de ácido fórmico em água ultrapura e 75% de acetonitrila, para identificar e quantificar 6 fitocanabinoides — CBD e Δ^9 -THC, suas formas ácidas, Δ^8 -THC e CBN — em produto de Cannabis, demonstrando ser um método rápido e direto. O emprego de gradiente de concentração⁴⁸ na fase móvel poderia ser uma alternativa para separar ainda mais CBG e CBD, porém optou-se por manter o método simples, isocrático e rápido, com resolução $\geq 1,25$.

Em seguida a mistura padrão de fitocanabinoides foi injetada segundo o método otimizado e os padrões individuais de CBD, CBG, CBN e Δ^9 -THC foram adicionados individualmente à mistura. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 13, na qual é possível identificar e confirmar posição desses compostos na separação cromatográfica da mistura. Foi observada uma variação considerável na temperatura ambiente e, conseqüentemente, na temperatura do forno, que até então não possuía controle de temperatura. Como resultado, o tempo de retenção variou a cada injeção. Para corrigir esse efeito, o forno da coluna foi mantido a 30 °C em todas as corridas subsequentes.



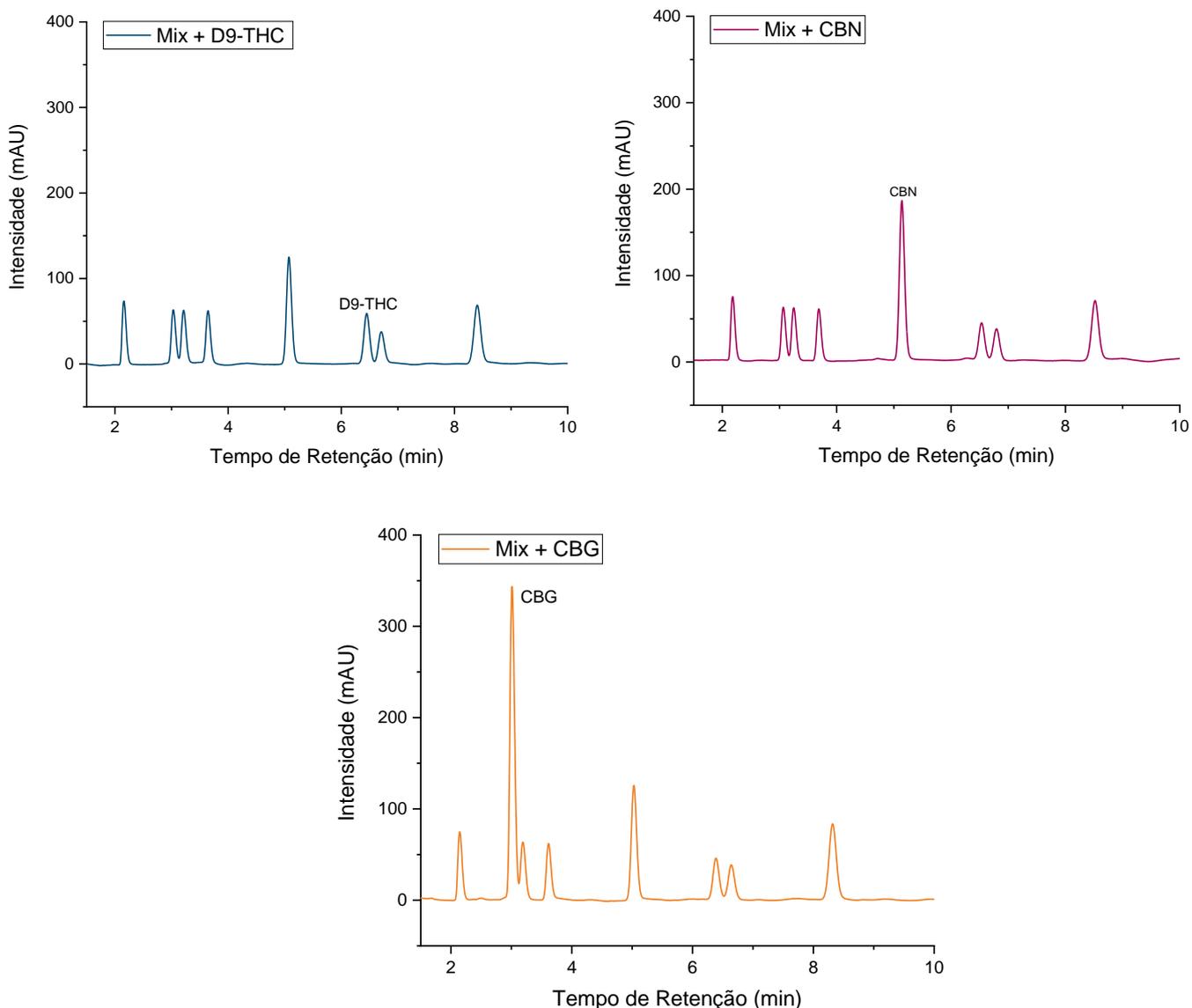


Figura 13: Cromatogramas da mistura padrão de fitocanabinoides e de CBD, CBG, CBN e Δ^9 -THC, adicionados separadamente a essa mistura

Por fim, o perfil de separação obtido foi comparado com o certificado de análise do padrão de mistura de fitocanabinoides (Supleco). No certificado os analitos foram separados e quantificados por HPLC-UV seguindo os parâmetros descritos na Figura 14.

Standard Solution Assay Parameters		Calibration Curve	
Analysis Method:	HPLC/UV	Calibration Curve:	Linear Regression
Column:	Ascentis Express C18, 2.7 μ m, 3.0 x 100 mm	Number of Points:	1
Mobile Phase:	Acetonitrile:0.1% Phosphoric acid in Water (70:30)		
Flow Rate:	1.5 mL/min		
Wavelength:	228 nm		

Figura 14: Parâmetros do método de avaliação do padrão presente no COA

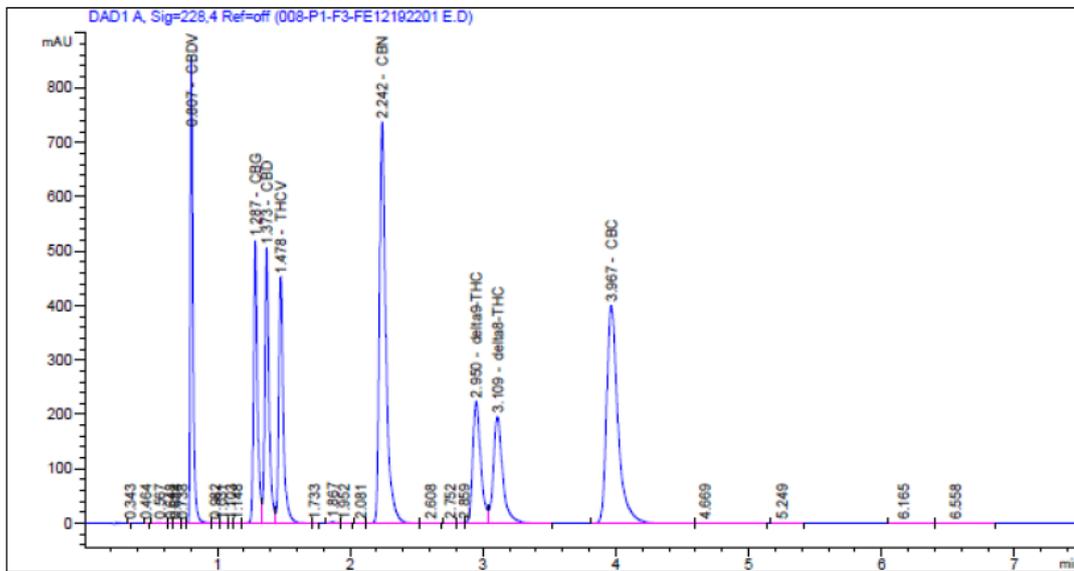


Figura 15: Cromatograma da análise do padrão presente no COA

Comparando a separação obtida (Figura 13) com o perfil de separação do certificado de análise (Figura 15) é possível observar correspondências entre as intensidades dos picos e a separação dos compostos. Além disso, para CBG, CBD, CBN e Δ^9 -THC, os quais foram adicionados a mistura e injetados utilizando o método otimizado (Figura 13), foi obtido aumento nos picos de posições iguais as desses fitocanabinoides presentes na separação do COA. Dessa forma, propõe-se que a separação tenha a mesma sequência de fitocanabinoides (Figura 16).

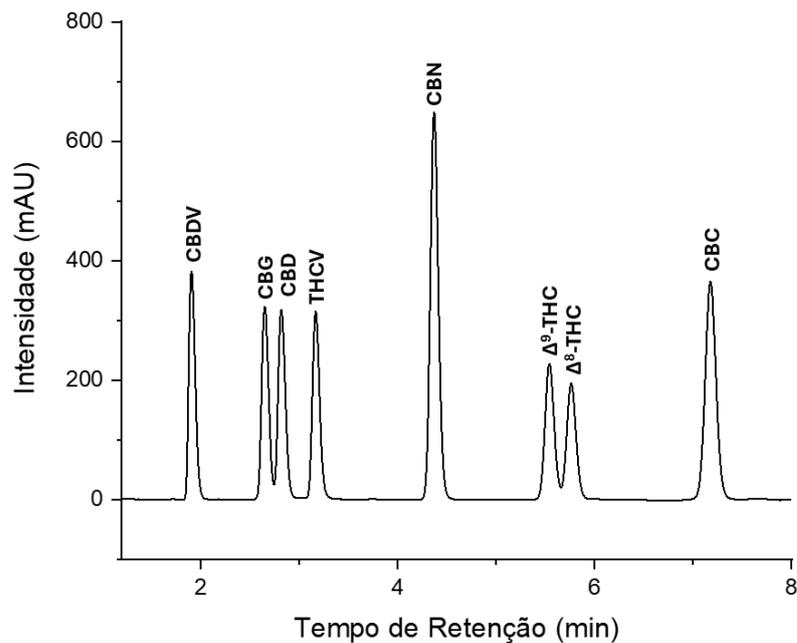


Figura 16: Cromatograma de separação dos 8 canabinoides neutros da mistura comercial em 228 nm de acordo com a sequência proposta

O perfil de separação da mistura padrão comercial de 8 fitocanabinoides neutros está ilustrado na Figura 16 e a resolução entre cada par de picos está resumida na Tabela 7. O perfil foi obtido em 228 nm para comparar com o certificado de análise (COA) do padrão. Foi possível separar os 8 compostos em menos de 10 minutos e com resolução satisfatória mesmo em pares críticos como CBG/CBD e Δ^9 -THC/ Δ^8 -THC, destacados na Tabela 7.

Tabela 7: Resolução entre os picos obtidos da mistura comercial de 8 fitocanabinoides neutros

Picos	Resolução
CBDV e CBG	6,9
CBG e CBD	1,27
CBD e THCV	2,77
THCV e CBN	8,96
CBN e Δ^9 -THC	7,54
Δ^9 -THC e Δ^8 -THC	1,31
Δ^8 -THC e CBC	7,84

Assim, as condições cromatográficas da separação otimizada, que foram utilizadas para todos os ensaios quantitativos estão resumidas na Tabela 8.

Tabela 8: Parâmetros otimizados do HPLC-DAD

Volume de Injeção	10 μ L
Temperatura da Coluna	30 ° C
Fluxo	1 mL/min
Fase Móvel	A: 0,1% HCOOH em água B: acetonitrila
Corrida	Isocrática: 25% A e 75% B
Faixa de Comprimento de Onda	200 a 400 nm
Comprimentos de Onda	210, 220 e 280 nm

3.3. Curvas de Calibração

Os fitocanabinoides são cromóforos e apresentam mais de um comprimento máximo de absorção, dessa forma, foram avaliadas para 3 fitocanabinoides — CBN, CBC e CBD — a construção da curva nos comprimentos de onda de 210, 220 e 280 nm. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 17.

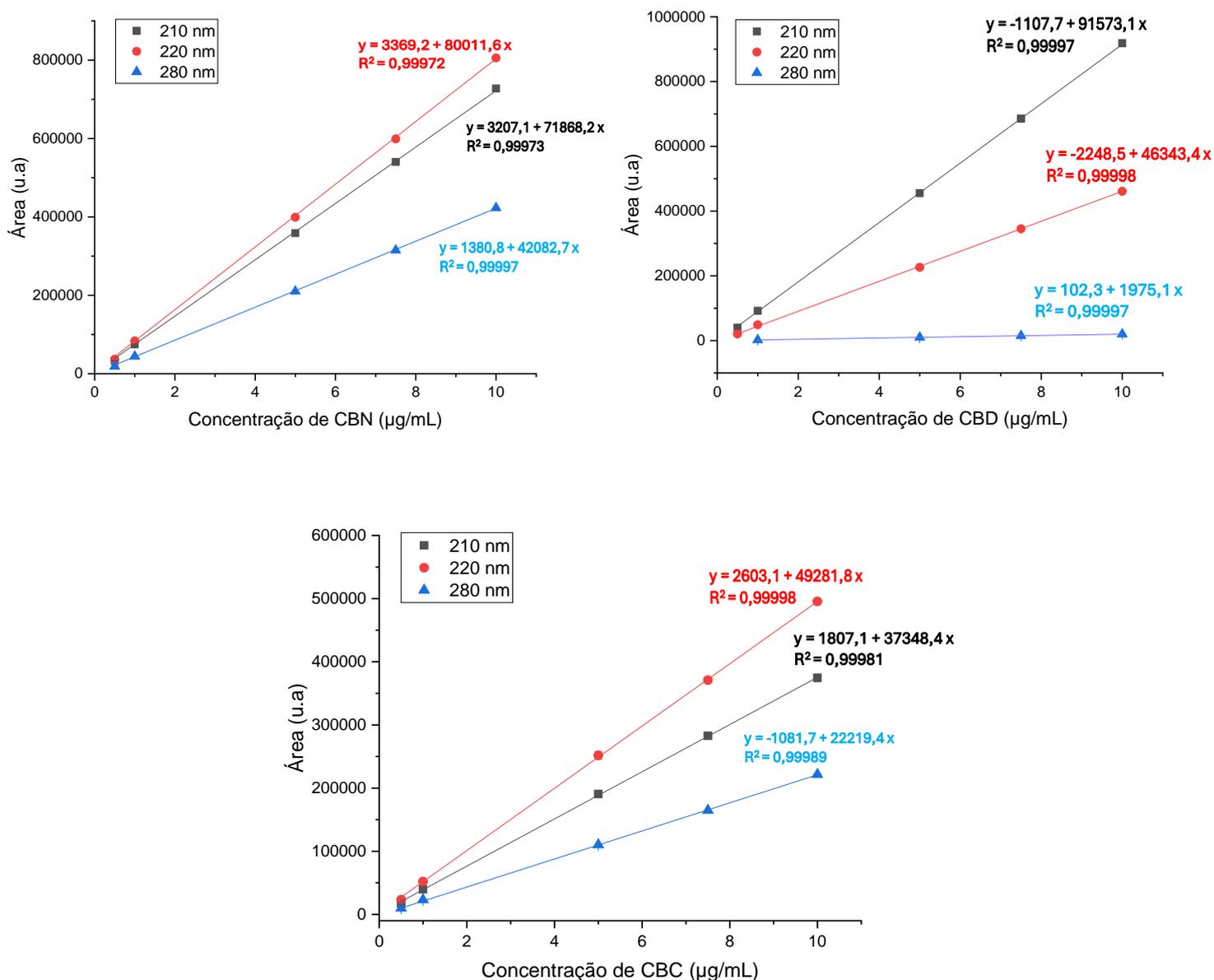
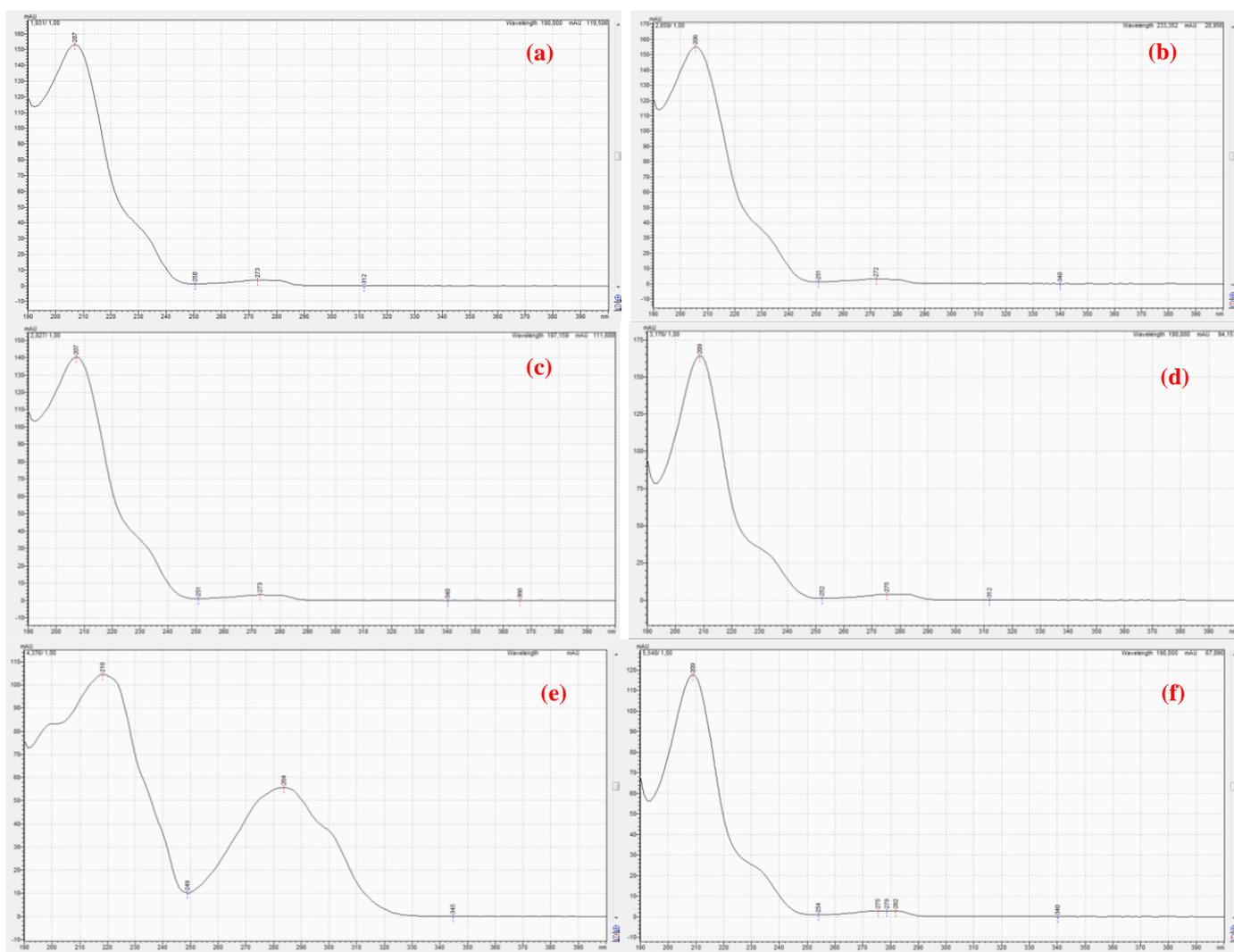


Figura 17: Curvas de calibração de CBD, CBN e CBC nos comprimentos de onda de 210, 220 e 280 nm

Com base nos resultados, para CBD o comprimento de 210 nm foi o que apresentou maior sensibilidade, sendo capaz de detectar pequenas variações na concentração do analito. Por outro lado, em 280 nm, a absorbância desse composto é muito baixa, de modo que, na

menor concentração da curva de calibração ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) o composto não foi quantificado com confiabilidade, resultando na sua exclusão da curva de calibração. Já para o CBN e CBC, foram obtidas curvas de boa sensibilidade e linearidade em todos os comprimentos de onda avaliados, sendo 220 nm o comprimento de onda mais sensível.

Utilizando o post-run do software de aquisição de dados é possível, devido ao uso do detector DAD, visualizar o espectro de absorção em cada pico. A Figura 18 ilustra os espectros obtidos para os 8 canabinoides neutros separados da mistura padrão. É possível observar um pico de absorção mais intenso em 210 nm para a maioria dos canabinoides neutros, assim como o CBD. O CBN (Figura 18e) apresenta 2 picos de absorção característicos em 220 e 280 nm e o CBC (Figura 18h) em 230 e 280 nm. Diante disso, foi escolhido o comprimento de onda de 210 nm para as análises quantitativas, nas quais foi possível identificar os 8 canabinoides na faixa de concentração estudada.



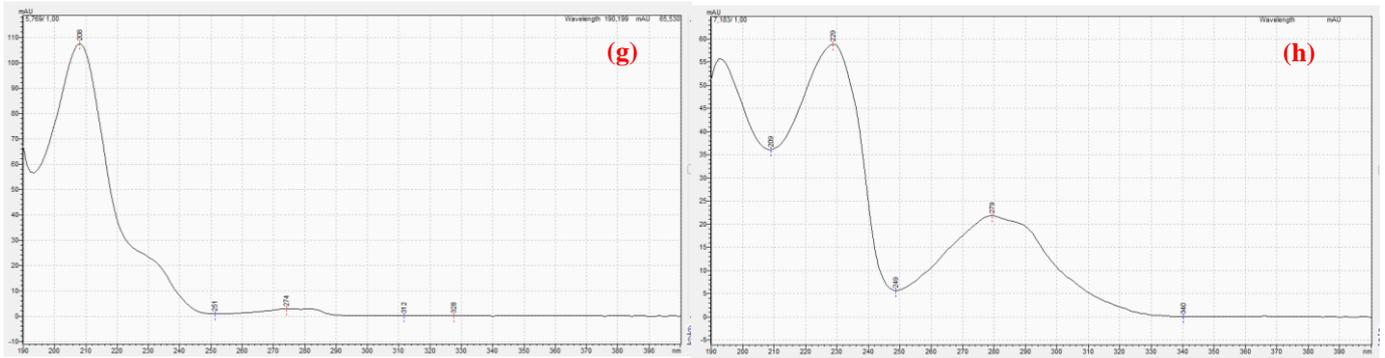
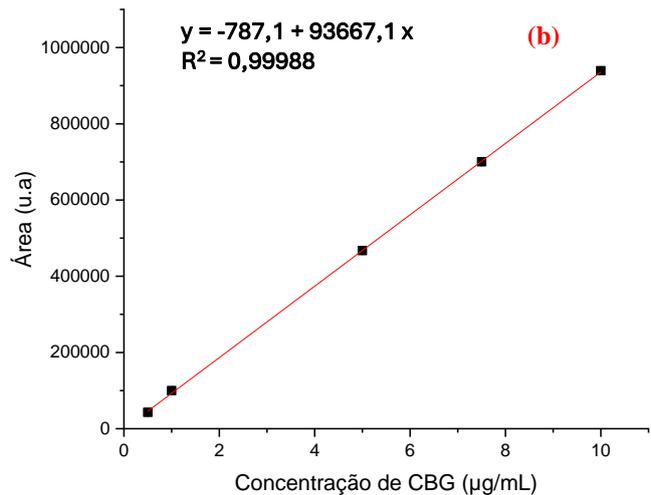
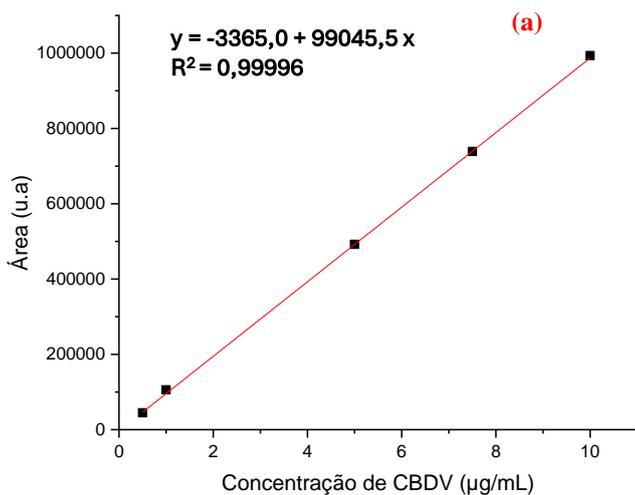


Figura 18: Espectros de absorção dos picos de fitocanabinoides registrados. (a) CBDV (b) CBG (c) CBD (d) THCV (e) CBN (f) Δ^9 -THC (g) Δ^8 -THC (h) CBC

As curvas analíticas para quantificação do 8 fitocanabinoides neutros em 210 nm estão ilustradas na Figura 19. Foram calculados os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) do método de acordo com o predito pela Anvisa, RDC N° 166/2017⁵⁵, descritos pelas equações 2 e 3. Nas quais $s_{x/y}$ é o desvio padrão dos resíduos da curva analítica de inclinação b.

$$LOD = \frac{3,3s_{x/y}}{b} \quad LOQ = \frac{10s_{x/y}}{b}$$

Equação 2 e 3: Limite de Detecção e Limite de Quantificação



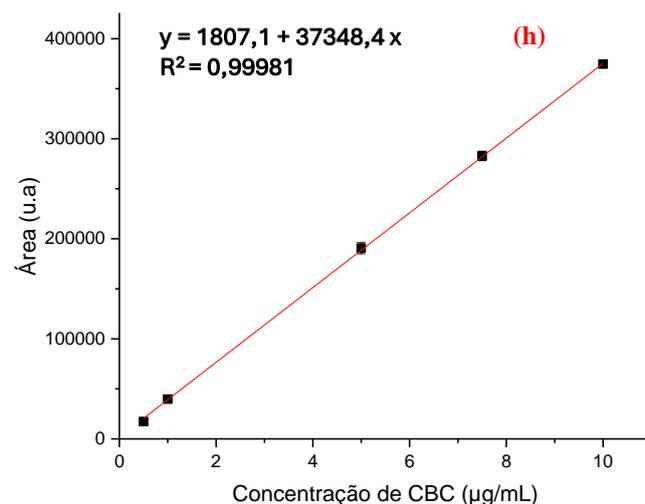
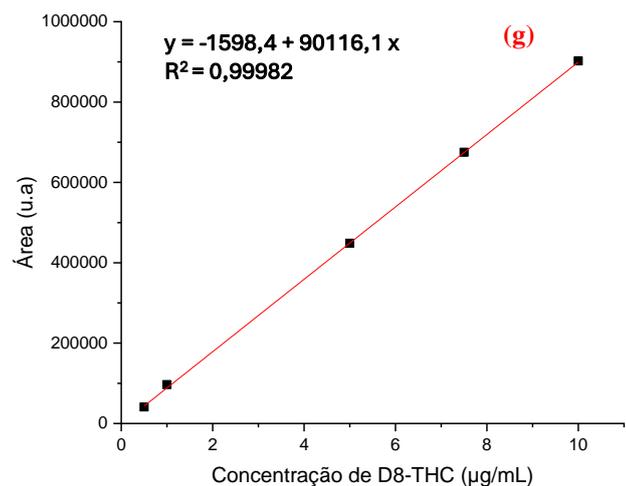
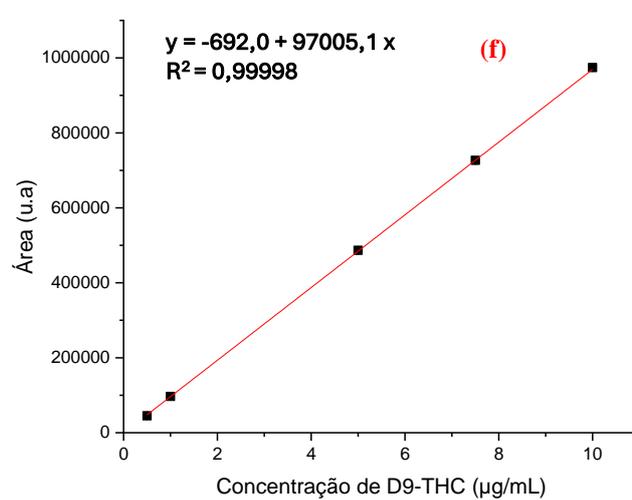
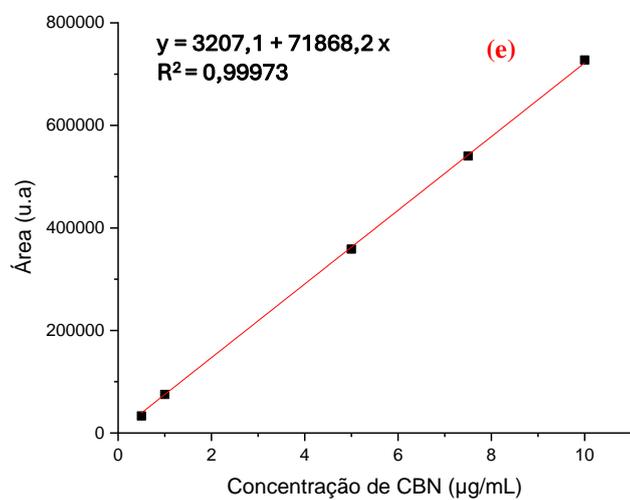
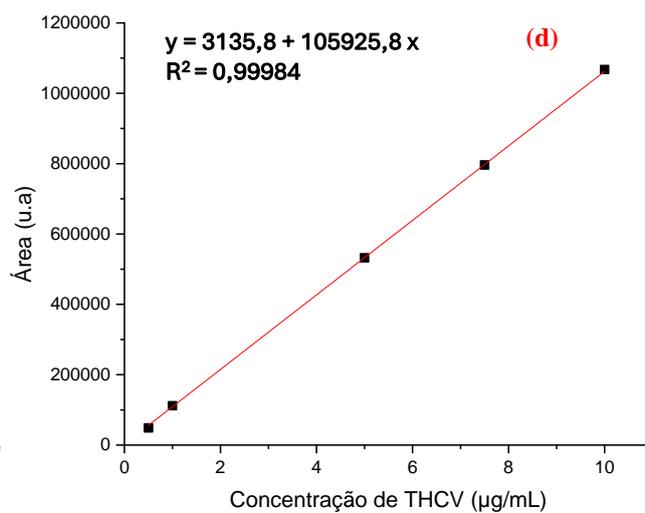
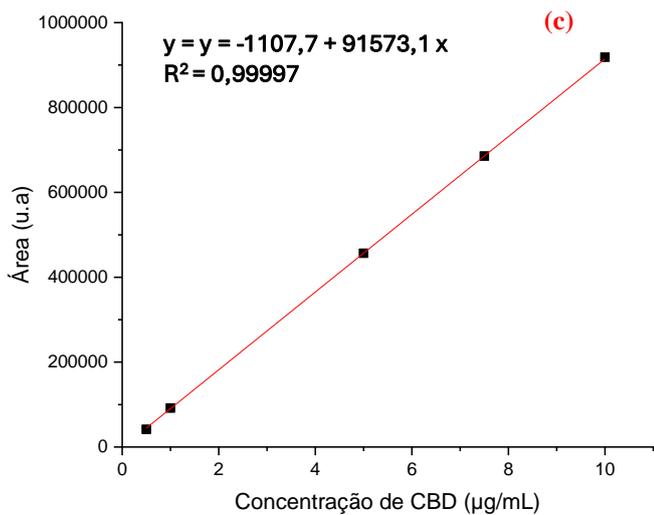


Figura 19: Curvas de calibração, concentração em $\mu\text{g/mL}$ vs área. (a) CBDV (b) CBG (c) CBD (d) THCV (e) CBN (f) Δ^9 -THC (g) Δ^8 -THC (h) CBC

Alguns parâmetros analíticos do método otimizado estão resumidos na Tabela 9. A linearidade das curvas foi avaliada a partir do seu coeficiente de relação R^2 , que foi maior que 0,9997 para todos fitocanabinoides, indicando uma boa linearidade do método. Na concentração de $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ foi obtido um desvio de pelo menos -20% entre a área obtida experimentalmente e a área predita na equação da reta, prejudicando a linearidade do método. Dessa forma, esse ponto foi retirado das curvas de calibração para a quantificação dos analitos nas amostras.

Tabela 9: Parâmetros analíticos de quantificação do 8 canabinoides neutros pelo método HPLC-DAD

Analito	Faixa linear ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Equação da Reta	R^2	LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
CBDV	0,5 a 10	$y = -3365,0 + 99045,5 x$	0,99996	0,07	0,21
CBG	0,5 a 10	$y = -787,1 + 93667,1 x$	0,99988	0,10	0,32
CBD	0,5 a 10	$y = -1107,7 + 91573,1 x$	0,99997	0,07	0,21
THCV	0,5 a 10	$y = 3135,8 + 105925,8 x$	0,99984	0,09	0,28
CBN	0,5 a 10	$y = 3207,1 + 71868,2 x$	0,99973	0,04	0,11
Δ^9-THC	0,5 a 10	$y = -692,0 + 97005,1 x$	0,99998	0,05	0,16
Δ^8-THC	0,5 a 10	$y = -1598,4 + 90116,1 x$	0,99982	0,11	0,34
CBC	0,5 a 10	$y = 1807,1 + 37348,4 x$	0,99981	0,08	0,24

3.4. Análise das Amostras de Óleos e Extratos Concentrados

O método desenvolvido foi aplicado para análise de 5 amostras de óleo de Cannabis e 9 extratos concentrados de Cannabis de diferentes cultivares produzidos pelas associações APEPI, Abrapango e Flor do Amor. O teor de cada fitocanabinoide nas amostras (% , m/m

para os extratos e mg mL⁻¹ para os óleos) foi calculado considerando a massa inicial pesada e os fatores de diluição de cada amostra, para os óleos foi considerada também a densidade dos veículos diluentes (AOEV e TCM). Os resultados obtidos estão expostos na Tabela 10.

Tabela 10: Teor dos fitocanabinoides nas amostras de óleos e extratos concentrados de Cannabis (n=3)

Óleos (mg mL ⁻¹)								
Amostra	CBDV	CBG	CBD	THCV	CBN	Δ ⁹ -THC	Δ ⁸ -THC	CBC
OCBG	ND	23,47 ± 0,43	< LOQ	ND	ND	0,35 ± 0,02	ND	1,51 ± 0,05
Schanti	ND	0,51 ± 0,01	11,72 ± 0,18	ND	ND	5,90 ± 0,02	ND	0,43 ± 0,005
Purple Wreck	ND	0,20 ± 0,02	< LOQ	0,37 ± 0,01	< LOQ	7,53 ± 0,82	ND	ND
Harle Tsu	1,60 ± 0,01	1,00 ± 0,01	37,47 ± 0,16	ND	ND	1,07 ± 0,02	ND	1,42 ± 0,07
Rainbow	ND	0,159 ± 0,01	ND	0,06 ± 0,002	0,05 ± 0,002	6,88 ± 0,13	ND	< LOQ
Extratos Concentrados (% , m/m)								
Amostra	CBDV	CBG	CBD	THCV	CBN	Δ ⁹ -THC	Δ ⁸ -THC	CBC
EBDoctor	0,80 ± 0,02	2,14 ± 0,06	42,94 ± 1,67	ND	ND	2,23 ± 0,05	ND	2,62 ± 0,05
EBCBG	ND	45,68 ± 0,62	ND	ND	< LOQ	0,63 ± 0,01	ND	2,96 ± 0,07
EBSchanti	ND	1,26 ± 0,04	30,46 ± 0,14	ND	ND	32,98 ± 1,05	ND	1,43 ± 0,19
EBPurple Wreck	ND	2,47 ± 0,03	2,93 ± 0,06	2,47 ± 0,02	ND	42,24 ± 0,49	ND	1,08 ± 0,07
OG Mix	ND	3,85 ± 0,03	ND	0,33 ± 0,01	0,24 ± 0,02	42,30 ± 1,32	ND	< LOQ
Fenoqueen	1,27 ± 0,005	0,79 ± 0,57	55,52 ± 0,57	ND	ND	2,63 ± 0,01	ND	2,56 ± 0,02

Extrato Destilado	< LOQ	1,12 ± 0,01	0,46 ± 0,01	ND	2,28 ± 0,03	21,67 ± 0,01	ND	< LOQ
HCBD	0,65 ± 0,01	1,61 ± 0,02	52,84 ± 0,83	ND	ND	2,39 ± 0,08	ND	2,75 ± 0,04
HTHC	ND	1,41 ± 0,03	< LOQ	0,51 ± 0,01	1,79 ± 0,03	29,94 ± 0,91	ND	1,02 ± 0,04

Foram analisados cinco óleos de Cannabis, sendo um diluído em TCM e os outros em AOEV. A diferença no veículo diluente confere propriedades distintas aos óleos, uma vez que o TCM apresenta maior polaridade e miscibilidade com álcoois⁵⁶. No entanto, essa variação no diluente e, conseqüentemente, na matriz da amostra não demonstrou interferir no seu preparo e na quantificação dos fitocanabinoides presentes. As diferenças visuais entre as amostras estão ilustradas na Figura 20.

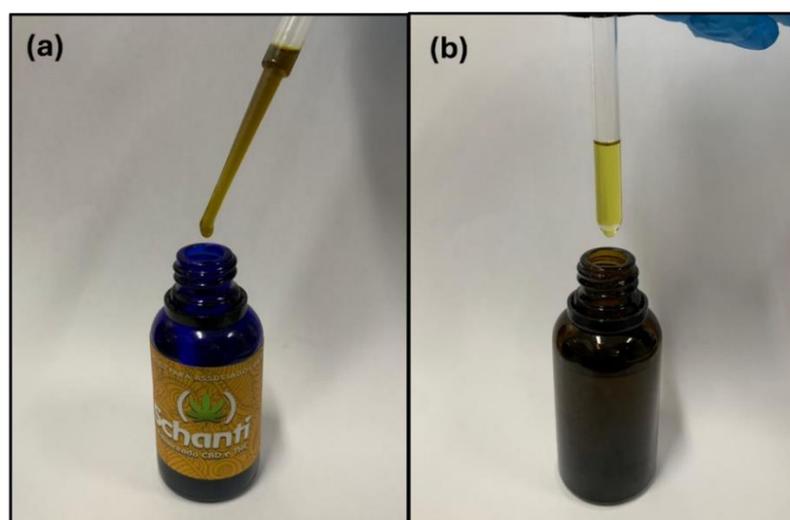


Figura 20: Amostras de óleos de Cannabis. (a): Óleo Schanti, diluído em AOEV; (b) Óleo Rainbow, diluído em TCM

Entre os extratos concentrados analisados, o extrato diluído fornecido pela associação Abrapango foi a amostra que mais se destacou em relação aos demais. Esse extrato passou por processo de remoção da clorofila e destilação, resultando em uma menor viscosidade e em um tom amarelo dourado (Figura 21b), contrastando com os outros extratos, que são viscosos e têm cor verde-escura devido à presença de clorofila (Figura 21a). Além disso, o extrato rico em CBG também apresentou aparência distinta, com uma textura mais pastosa, em comparação aos demais extratos (Figura 21c).

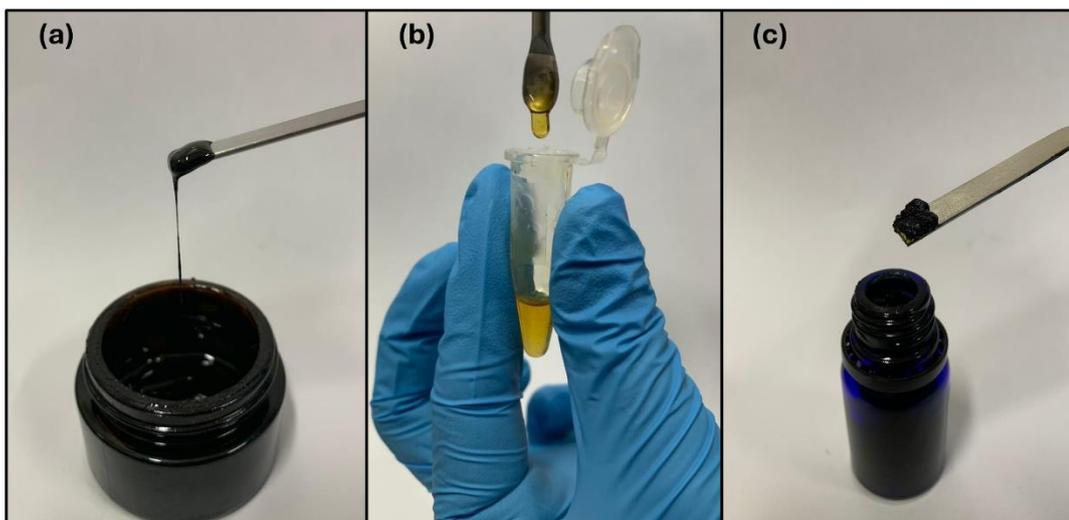


Figura 21: Amostras de extratos concentrados de Cannabis. (a): Extrato HCBD; (b) extrato destilado; (c) extrato ECBG

A Figura 22 apresenta o cromatograma de uma das amostras analisadas, extrato concentrado Fenooqueen, sobreposto a mistura de padrões de fitocanabinoides neutros. Para garantir a confiabilidade na determinação do perfil cromatográfico das amostras, antes de cada análise foi realizada a injeção em duplicata de uma diluição da mistura padrão. Esse procedimento permitiu ajustar eventuais variações no tempo de retenção dos analitos, que poderiam ocorrer devido a pequenas variações na pressão do sistema entre os dias de análise.

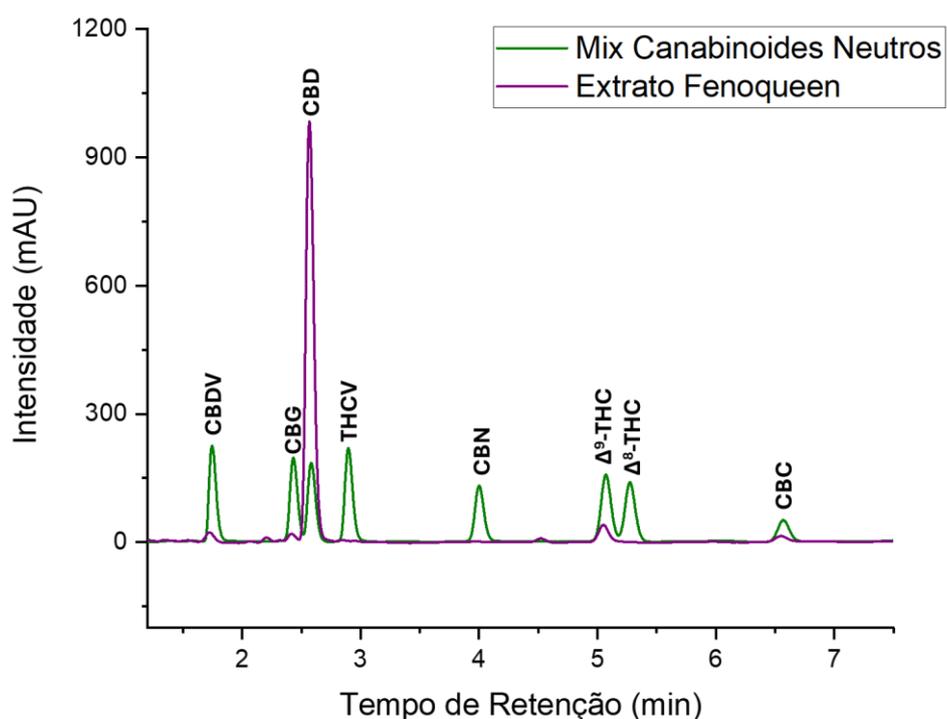


Figura 22: Cromatogramas sobrepostos da mistura de fitocanabinoides neutros e a amostra Fenooqueen

Ao analisar os dados obtidos das amostras (Tabela 10), é possível observar que todas as amostras têm Δ^9 -THC e CBG em concentrações maiores que o LOQ. Além disso, o CBD e o CBC foram identificados na maioria das amostras. O CBG é a forma neutra do CBGA, precursor dos demais fitocanabinoides na planta, por esse motivo, é esperado encontrar ele como componente minoritário em amostras diversas de Cannabis^{1,24,36}. O CBD, Δ^9 -THC e CBC são os principais fitocanabinoides neutros derivados do CBGA¹⁹, então também é esperado que eles estejam presentes nas amostras.

Além disso, foi observado que as respectivas “varinas”, CBDV e THCV, foram identificadas e quantificadas nas amostras cujo análogo é majoritário. Ou seja, em amostras de quimiotipos ricos em CBD, foi identificado a presença de CBDV em níveis significativos, e o mesmo foi observado para o THCV em amostras ricas em Δ^9 -THC. É predito que o CBDV é encontrado em variedades de Cannabis *landraces* com altas concentrações de CBD e baixas de Δ^9 -THC¹⁵, os resultados obtidos corroboram com a literatura. As varinas são uma variação dos fitocanabinoides contendo 19 carbonos ao invés de 21, nas quais a cadeia lateral n-pentil é substituída por n-propil durante sua biossíntese. Suas estruturas estão ilustradas na Figura 23.

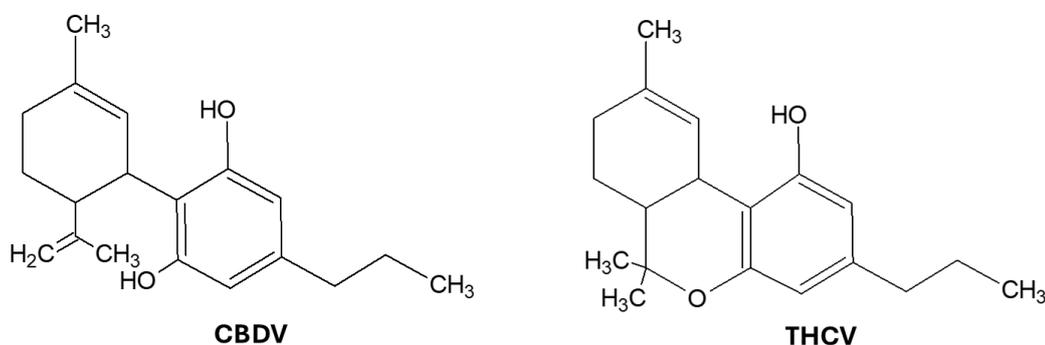


Figura 23: Estrutura molecular do CBDV e THCV

Foram também observados desvios padrão relativos maiores na concentração dos fitocanabinoides entre as replicatas das amostras de extratos concentrados, em comparação aos desvios padrão dos óleos de Cannabis. Apesar de que esse desvio não ultrapassou 5% para nenhuma amostra. Esse efeito pode ser justificado pela maior heterogeneidade dessas amostras, que são semi-sólidas e viscosas, enquanto os óleos podem ser homogeneizados com maior facilidade.

3.5. Análise comparativa do Método Proposto

Foram analisadas três amostras diferentes do mesmo lote do óleo de Cannabis Doctor, quimiotipo rico em CBD da APEPI, e os resultados obtidos foram comparados com as informações do rótulo do produto. Os resultados obtidos estão resumidos na Tabela 11. Foi escolhido esse óleo para avaliar o método e o preparo de amostra, pois a partir de uma parceria com a Universidade de Campinas (UNICAMP), os óleos dessa associação estão padronizados dentro de um nível de concentração aceitável⁵⁷.

Tabela 11: Resultados das análises dos óleos de Cannabis Doctor da APEPI.

Teor dos Fitocanabinoides (mg mL ⁻¹)								
Amostra	CBDV	CBG	CBD	THCV	CBN	Δ^9 -THC	Δ^8 -THC	CBC
Doctor 1	0,45	1,24	32,69	ND	ND	1,32	ND	1,39
	$\pm 0,01$	$\pm 0,01$	$\pm 0,34$			$\pm 0,01$		$\pm 0,03$
Doctor 2	0,43	1,18	32,33	ND	ND	1,27	ND	1,44
	$\pm 0,01$	$\pm 0,02$	$\pm 0,29$			$\pm 0,04$		$\pm 0,04$
Doctor 3	0,45	1,21	32,48	ND	ND	1,31	ND	1,47
	$\pm 0,02$	$\pm 0,01$	$\pm 0,33$			$\pm 0,02$		$\pm 0,04$

Diante dos resultados apresentados, os óleos apresentam concentração média de $32,50 \pm 0,34$ mg mL⁻¹ de CBD, resultado que representa erro relativo entre o valor do rótulo de - 1,51%. Os óleos da APEPI aceitam uma variabilidade máxima de $\pm 15\%$ no teor dos ativos, de acordo com o padrão para fitoterápicos previsto pela Instrução Normativa n°4 de 13 de Maio de 2018⁵⁷. Logo o valor obtido está dentro da variabilidade máxima permitida como esperado. Além disso, o teor de Δ^9 -THC foi em média $1,30 \pm 0,03$ mg mL⁻¹, valor inferior ao limite máximo de 3%. Esses resultados evidenciam a precisão do método analítico proposto, além de demonstrar boa repetibilidade do procedimento de preparo de amostra, na qual o teor de todos os fitocanabinoides identificados nos 3 óleos diferentes de um mesmo lote concordam entre si, em um nível de confiança de 95%.

Adicionalmente, quatro óleos de diferentes quimiotipos de Cannabis da APEPI foram analisados por RMN de Hidrogênio quantitativo. Escolheu-se essa técnica devido a sua vantagem de usar calibração com padrões externos, não sendo necessário padrões de referência idênticos à amostra. Ela permite quantificar simultaneamente vários compostos

com alta precisão e exatidão a partir da relação entre o sinal obtido e quantidade de núcleos de hidrogênio responsáveis por aquele sinal⁵⁸. Os resultados obtidos estão expostos nas Tabelas 12 a 15. Os teores foram expressos em % (m/m) para comparar com os resultados obtidos pela técnica de qHNMR.

Tabela 12: Resultados para o método proposto e para o método de referência na amostra Harle Tsu em % (m/m)

Harle Tsu				
Fitocanabinoide	Método Proposto	Método de Referência	Erro Absoluto	Erro Relativo
	HPLC-DAD	(qHNMR)		(%)
CBG	0,109 ± 0,001	0,130	0,021	-16,2
CBD	4,080 ± 0,018	4,217	0,137	-3,2
Δ⁹-THC	0,117 ± 0,002	0,127	0,010	-7,9
CBC	0,155 ± 0,008	0,145	0,010	6,9

Tabela 13: Resultados para o método proposto e para o método de referência na amostra Purple Wreck em % (m/m)

Purple Wreck				
Fitocanabinoide	Método Proposto	Método de Referência	Erro Absoluto	Erro Relativo
	HPLC-DAD	(qHNMR)		(%)
CBG	0,023 ± 0,002	0,023	0,004	-1,9
Δ⁹-THC	0,818 ± 0,003	0,826	0,008	-1,0

Tabela 14: Resultados para o método proposto e para o método de referência na amostra Schanti em % (m/m)

Schanti				
Fitocanabinoide	Método Proposto	Método de Referência	Erro Absoluto	Erro Relativo
	HPLC-DAD	(qHNMR)		(%)
CBG	0,056 ± 0,001	0,051	0,005	9,8
CBD	1,277 ± 0,019	1,220	0,057	4,7
Δ⁹-THC	0,643 ± 0,008	0,617	0,026	4,2
CBC	0,047 ± 0,001	0,048	0,001	-2,1

Tabela 15: Resultados para o método proposto e para o método de referência na amostra OCBG em % (m/m)

OCBG				
Fitocanabinoide	Método Proposto HPLC-DAD	Método de Referência (qHNMR)	Erro Absoluto	Erro Relativo (%)
CBG	2,884 ± 0,047	2,980	0,096	-3,2
Δ⁹-THC	0,038 ± 0,002	0,036	0,002	5,6
CBC	0,164 ± 0,006	0,154	0,010	6,5

Os resultados obtidos para fitocanabinoides minoritários nas amostras apresentaram erros relativos com magnitude variando de 2,1 a 16,2% em relação ao método de qNMRH. Com exceção do erro relativo de 16,2%, referente a concentração de CBG na amostra Harle Tsu, foram obtidos erros relativos menores que 10% para os fitocanabinoides minoritários em todas as amostras. Essa margem de erro é aceitável devido às baixas concentrações desses compostos nas amostras, que tornam a interferência da matriz significativa e aumentam a suscetibilidade a variações analíticas.

Por outro lado, para os fitocanabinoides majoritários, os erros relativos tiveram magnitude inferior a 5% para todas as amostras. Esses resultados destacam a exatidão e confiabilidade do método proposto na quantificação desses compostos presentes em concentrações elevadas.

Diante dos resultados expostos, evidencia-se a adequabilidade do método analítico proposto, aplicado em 15 amostras diferentes. Apesar da necessidade de alguns ajustes futuros para a validação analítica, o método já possui precisão e exatidão suficiente para análises de rotina, atendendo às demandas práticas.

Um dos objetivos de aplicações futuras desse método é oferecer suporte a associações de produtores de Cannabis, especialmente as menores, que ainda não tem um controle de qualidade adequado em seus produtos, de forma a garantir maior confiabilidade e segurança para os pacientes.

CAPÍTULO 2: Avaliação dos Efeitos Embriotóxicos de Extratos de *Cannabis Sativa L.* Utilizando Zebrafish (*Danio Rerio*) Como Espécie Modelo

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Sistema Endocanabinoide

O sistema endocanabinoide é formado por um conjunto de receptores, endocanabinoides, enzimas responsáveis pelo seu metabolismo e genes que codificam essas proteínas^{13,59}. Os receptores são particularmente expressos em áreas do cérebro envolvidas no controle da aprendizagem e memória, comportamento motor, emoções e funções autônomas e endócrinas¹³.

Os endocanabinoides são fatores essenciais no desenvolvimento neural, no apetite e metabolismo, no funcionamento do sistema imune, na memória, e em outros processos fisiológicos. Eles modulam a liberação de neurotransmissores excitatórios e inibitórios, por meio da ativação de receptores canabinoides (CB), contribuindo para a homeostase⁶⁰. Em vertebrados o sistema endocanabinoide age nos receptores CB1 e CB2 (Figura 24), enquanto o CB1 concentra-se no sistema nervoso central e periférico, o receptor CB2 é expresso principalmente no sistema imune^{61,62}.

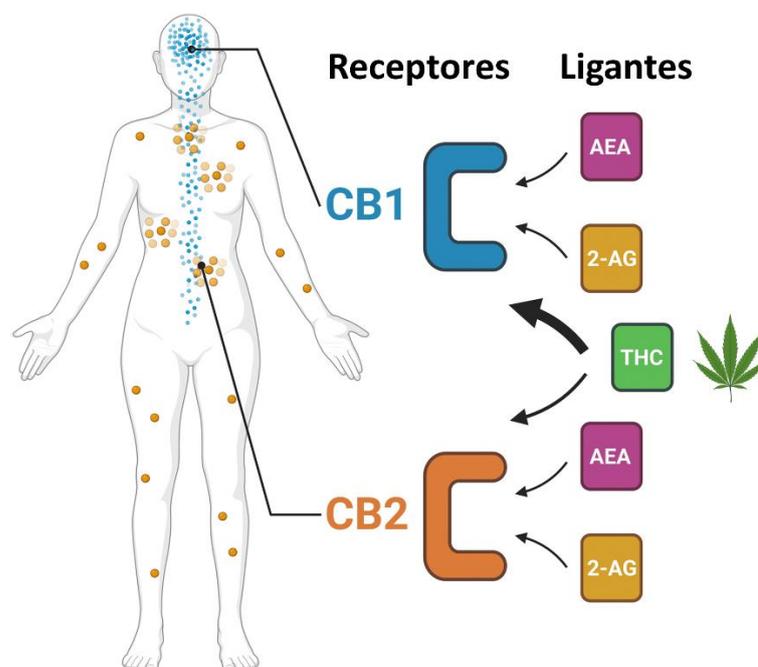


Figura 24: Distribuição dos receptores CB1 e CB2 no corpo. Adaptado de Uthayakumaran et al.⁶²

Esses receptores são ativados tanto por ligantes endógenos, como a anandamina (AEA) e o 2-araquidonilglicerol (2-AG), quanto por fitocanabinoides exógenos¹³. O CBD tem uma menor afinidade (cerca de 10 vezes menor) pelos receptores CB1 encontrados no cérebro do que o Δ^9 -THC, o que confere a esse fitocanabinoide ausência de efeito psicotrópico^{13,61,63}.

1.2. Zebrafish como Espécie-Modelo

Embora a maioria dos estudos publicados até o momento sobre Cannabis e canabinoides consistem em experimentos realizados em modelos *in vitro* ou em roedores, o zebrafish (*Danio rerio*) vem ganhando relevância como modelo *in vivo* devido às suas características distintas. Dentre elas destacam-se seus embriões translúcidos que permitem avaliações teratogênicas com uma melhor visualização, seu rápido desenvolvimento embrionário, baixo custo e simples cultivo em cativeiro¹³.

O zebrafish é comumente aplicado como espécie-modelo para testes de drogas e fármacos e estudos ambientais, visto que ele pode absorver pequenas moléculas presentes na água durante todas as etapas de desenvolvimento^{12,59}. Além disso, destaca-se a alta homologia genética com mamíferos, descoberto a partir do sequenciamento do seu genoma, 70% dos genes humanos tem pelo menos um ortólogo de zebrafish¹³.

O uso do zebrafish como modelo *in vivo*, vem sendo aplicado nos últimos anos em estudos com canabinoides visto que ele expressa ambos os receptores CB1 e CB2 em estágios iniciais do seu desenvolvimento. O sistema endocanabinoide no zebrafish tem sido associado com vício, ansiedade, desenvolvimento, homeostase energética e ingestão de alimentos, função do sistema imune, aprendizagem e memória¹².

1.3. Efeito Entourage

A grande maioria dos estudos de toxicidade envolvendo os fitocanabinoides avaliam os efeitos das substâncias separadamente ou de razões variadas de CBD/ Δ^9 -THC, que já demonstram ter interações complexas e um papel importante nos efeitos sintomáticos da Cannabis¹³. Porém, atualmente se tem uma forte indicação que os efeitos benéficos da Cannabis estão relacionados à sinergia entre os diversos compostos presentes na planta, fitocanabinoides, terpenos e flavonoides, chamado de efeito entourage^{33,64,65}.

Estudos clínicos indicam que para o tratamento de pacientes com epilepsia, extratos de Cannabis tiveram maior redução na frequência de convulsões, bem como menos efeitos colaterais do que doses equivalentes de CBD^{15,23}. Assim, mostra-se vantajosa a avaliação do

potencial efeito toxicológico dos extratos de Cannabis, de composição complexa e variável, e não somente padrões analíticos dos seus principais compostos, Δ^9 -THC e CBD, de forma a elucidar a segurança e eficácia dos produtos à base desses extratos^{59,64}. Além disso, poucos estudos têm sido feitos com extratos à base de CBG, tornando a análise pioneira e bastante relevante.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Condições Físico-químicas do Biotério de Peixes

Para a avaliação toxicológica dos extratos de *Cannabis sativa L.*, o projeto foi realizado em parceria com o laboratório de Genética Toxicológica (GTox) da Universidade de Brasília (UnB), do qual os peixes do seu biotério foram mantidos em condições físicas e químicas regulares de acordo com o predito na diretriz nº236 da OECD (2013)⁶⁶: pH 7,2 - 7,6; dureza 6.7 ppm; temperatura de 26 ± 1 °C; condutividade 468 μ S, e com um fotoperíodo de 12h de luz e 12h de escuro.

2.2. Testes de Solubilidade dos Extratos de Cannabis

Foram realizados ensaios preliminares para determinar a necessidade do uso de solvente orgânico e a sua concentração para a solubilização dos extratos de Cannabis, devido a sua natureza hidrofóbica. O solvente utilizado para esses estudos foi o dimetilsulfóxido (DMSO), que não ultrapassou a concentração de 1% (v/v) de forma a não influenciar nos testes embriotóxicos. Foi avaliada a solubilidade de extratos de quatro quimiotipos diferentes de Cannabis doados pela APEPI: Schanti (balanceado de CBD e Δ^9 -THC), Doctor (alto teor de CBD), Purple Wreck (alto teor de Δ^9 -THC) e EBCBG (alto teor de CBG).

2.3. Produção e Diferenciação dos Ovos Fertilizados

Um dia antes dos testes, foram colocados peixes adultos machos e fêmeas, numa proporção de 1:2, em caixas de acasalamento, que possuem barreiras físicas que foram retiradas no dia seguinte, um pouco antes das luzes se acenderem possibilitando a desova. Devido ao desenvolvimento acelerado do zebrafish, há uma necessidade de retirada e tratamento dos ovos de forma rápida.

Os ovos foram lavados pelo menos três vezes com água do meio de cultivo (água do sistema). Posteriormente, foi realizada uma triagem a olho nu, retirando os ovos coagulados, seguida de uma seleção no estereomicroscópio, na qual foram escolhidos ovos em estágios similares e sem anomalias. Por fim, os embriões viáveis foram escolhidos e distribuídos aleatoriamente.

2.4. Fish Embryo Toxicity (FET – Test)⁶⁶

Uma solução estoque de 100 mg L⁻¹ de cada um dos extratos foi preparada segundo o procedimento otimizado no item 2.2. Aproximadamente 25 mg do extrato concentrado foram

pesados em um béquer de 10 mL ao qual foi adicionado 2,5 mL de DMSO para total dissolução. A amostra foi vertida em um balão de 250 mL que foi completado com a água do sistema de zebrafish. Dessa solução foram preparadas diluições de 0,1; 0,56; 3,16; e 17,78 mg L⁻¹. A solução estoque (100 mg L⁻¹) também foi avaliada como uma das concentrações dos testes embriotóxicos.

Os ensaios foram realizados de acordo com o protocolo OECD n° 236 com adaptações. A Figura 25 apresenta um esquema simplificado do teste FET em embriões de zebrafish.

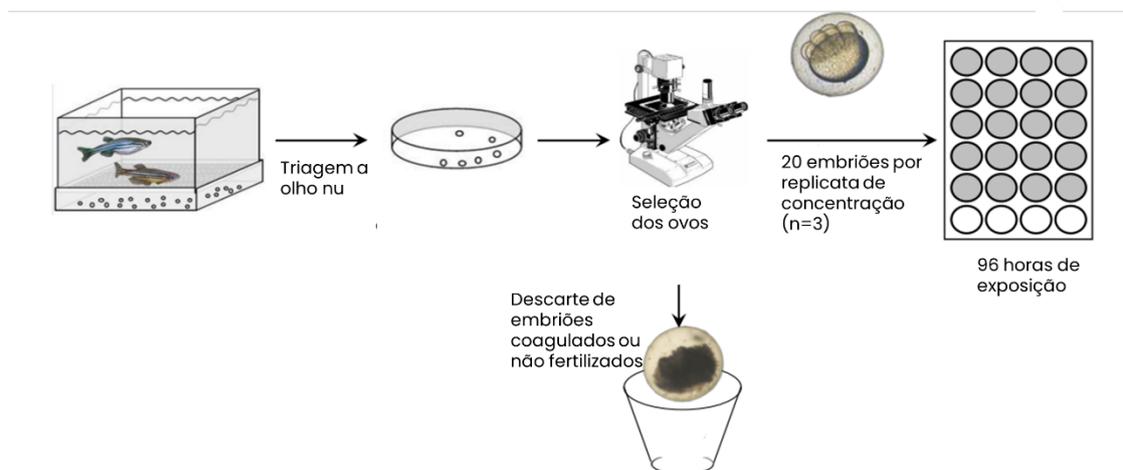


Figura 25: Esquema do procedimento do teste de toxicidade aguda (FET) em embriões de zebrafish. Adaptado de OECD⁶⁶

Logo após a seleção dos ovos fertilizados, os embriões foram emergidos nas soluções teste em placas de Petri para que fosse garantida a exposição nos estágios iniciais. Paralelamente a essa etapa, as triplicatas experimentais para a exposição foram preparadas.

A exposição foi realizada em placas de 96 poços, com 200 µL por poço e os ovos fertilizados foram distribuídos nos poços da placa na seguinte disposição:

- 20 ovos por réplica para cada concentração, realizada em triplicata, totalizando 60 indivíduos por grupo;
- 20 ovos como controle de solvente, DMSO 1%, porcentagem determinada em 2.2, dissolvido na água do sistema;
- 1 controle interno com água do sistema em cada placa contendo 10 ovos;
- 20 ovos como controle negativo, apenas a água do sistema (características físico-químicas previamente descritas).

Os testes realizados tiveram duração de 96 h sendo as placas condicionadas em uma câmara climática a 27°C e com fotoperíodo de 12:12 (claro:escuro). Por fim, em 24 hpf (horas

após a fertilização), 48 hpf, 72 hpf e 96 hpf os embriões foram observados com o estereomicroscópio. As seguintes observações indicaram toxicidade aguda e, conseqüentemente, morte dos embriões: coagulação do embrião, não desprendimento da cauda do saco vitelínico, ausência de formação de somitos e ausência de batimentos cardíacos. Pode-se também observar sinais de teratogenicidade não letais como curvatura da coluna vertebral (escoliose), formação de edemas, número de batimentos cardíacos, entre outros⁶⁶.

De acordo com os regulamentos éticos internacionais e nacionais, estudos com larvas de zebrafish até 120 hpf são considerados modelos *in vitro*, não sendo necessário submissão de Comissão de Ética no Uso de Animais^{66,67}.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Testes de Solubilidade dos Extratos de Canabinoides

Os fitocannabinoides são compostos altamente hidrofóbicos que são solúveis em álcoois, solventes orgânicos e gorduras, o que confere a eles eficiência em atravessar membranas no corpo e se acumular no tecido adiposo^{12,13,17}. Dessa forma, foi necessário o uso de solvente orgânico para auxiliar na solubilização dos extratos de Cannabis.

O DMSO é um solvente polar aprótico de baixa toxicidade por qualquer via de administração e baixo risco ambiental em baixas concentrações. Ele é o solvente mais utilizado para auxiliar na solubilização de compostos e extratos em bioensaios com zebrafish, no qual os embriões e larvas são comumente expostos a níveis de até 1% de DMSO⁶⁸. Para todos os extratos de Cannabis avaliados, o limite de solubilidade foi 100 mg L⁻¹ dos extratos com auxílio de banho ultrassônico de 5 a 10 minutos e vórtex.

3.2. Fish Embryo Toxicity (FET – Test)⁶⁶

Após a exposição dos embriões a diferentes níveis de concentração dos extratos concentrados, ao controle de solvente e controle negativo, foram observados a taxa de sobrevivência, eclosão e batimentos cardíacos, bem como uma série de alterações morfológicas. As diferentes concentrações do extrato estavam homogêneas no momento da dissolução, entretanto, no dia das leituras dos ensaios foi observado que parte do composto decantou, cobrindo a superfície do córion do organismo, a Figura 26 ilustra esse efeito em um dos extratos, o Purple Wreck. Não há evidências que esse efeito tenha alterado a toxicidade do extrato, porém supõe-se que ele ocorra devido a hidrofobicidade dos compostos e a baixa solubilidade no meio aquático⁶¹.

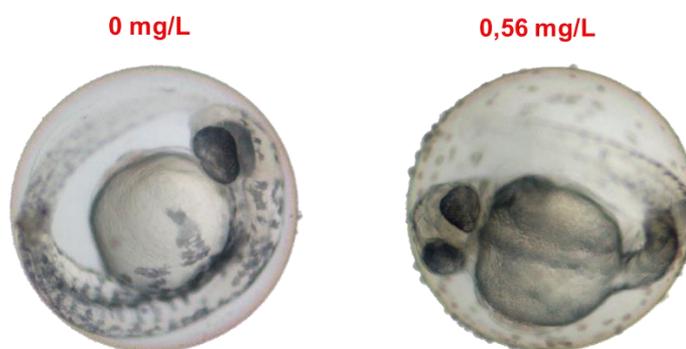
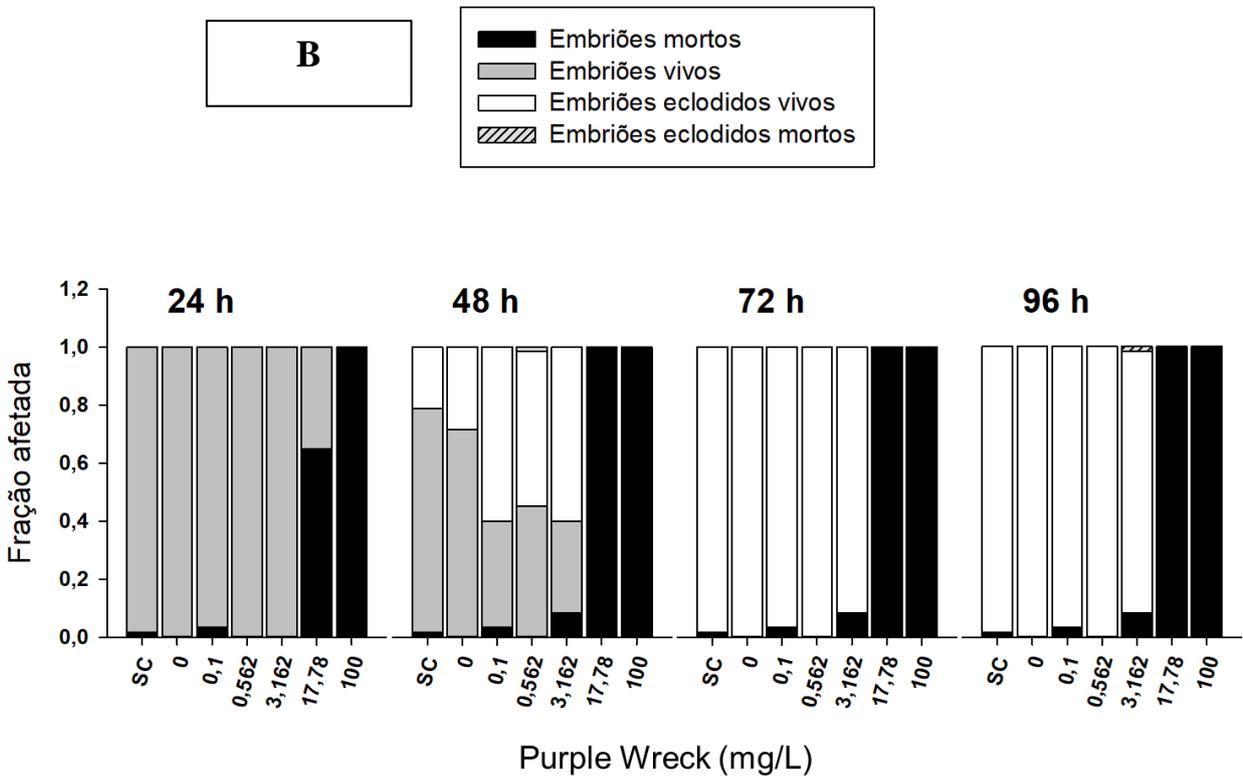
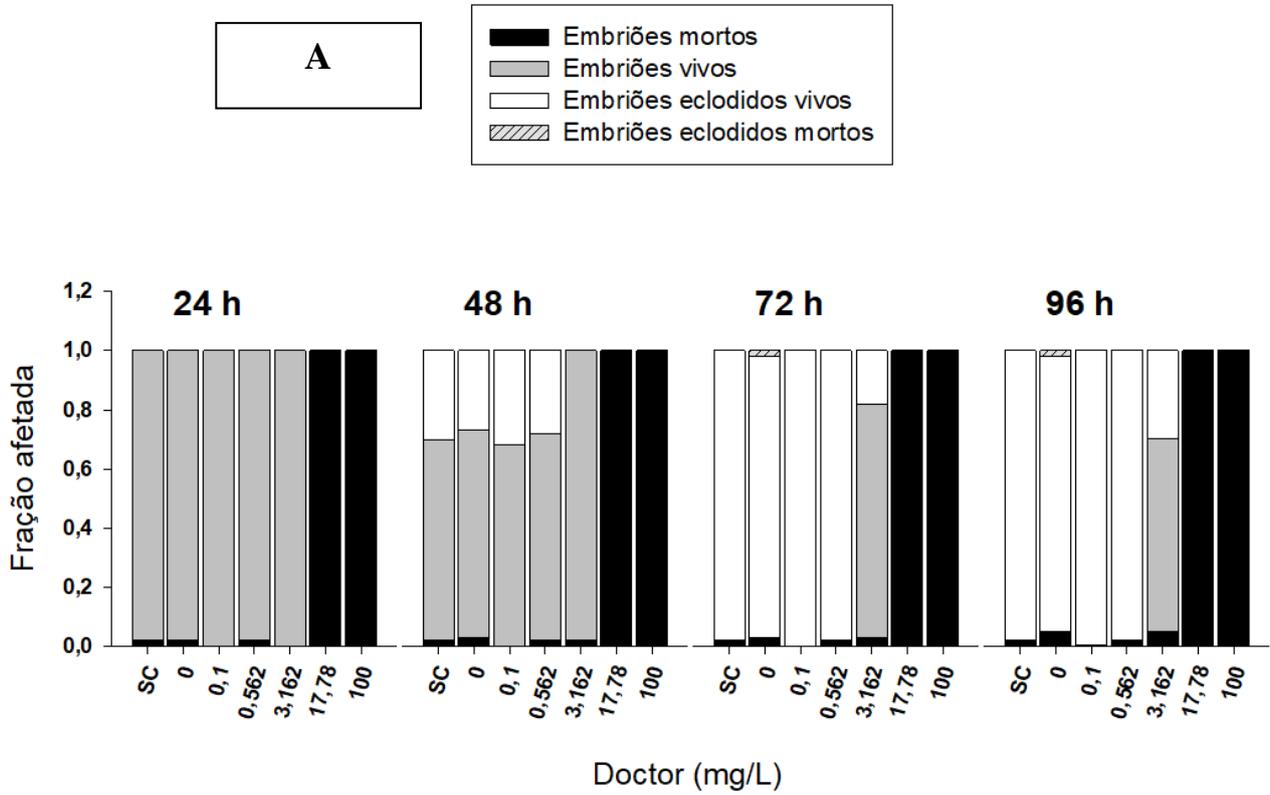


Figura 26: Embriões 24 horas pós exposição, evidenciando o extrato Purple Wreck sobre a superfície do córion quando comparado ao controle negativo

A porcentagem de mortalidade dos embriões/larvas posterior a exposição de 96 h nas concentrações crescentes de cada um dos extratos está ilustrada na Figura 27.



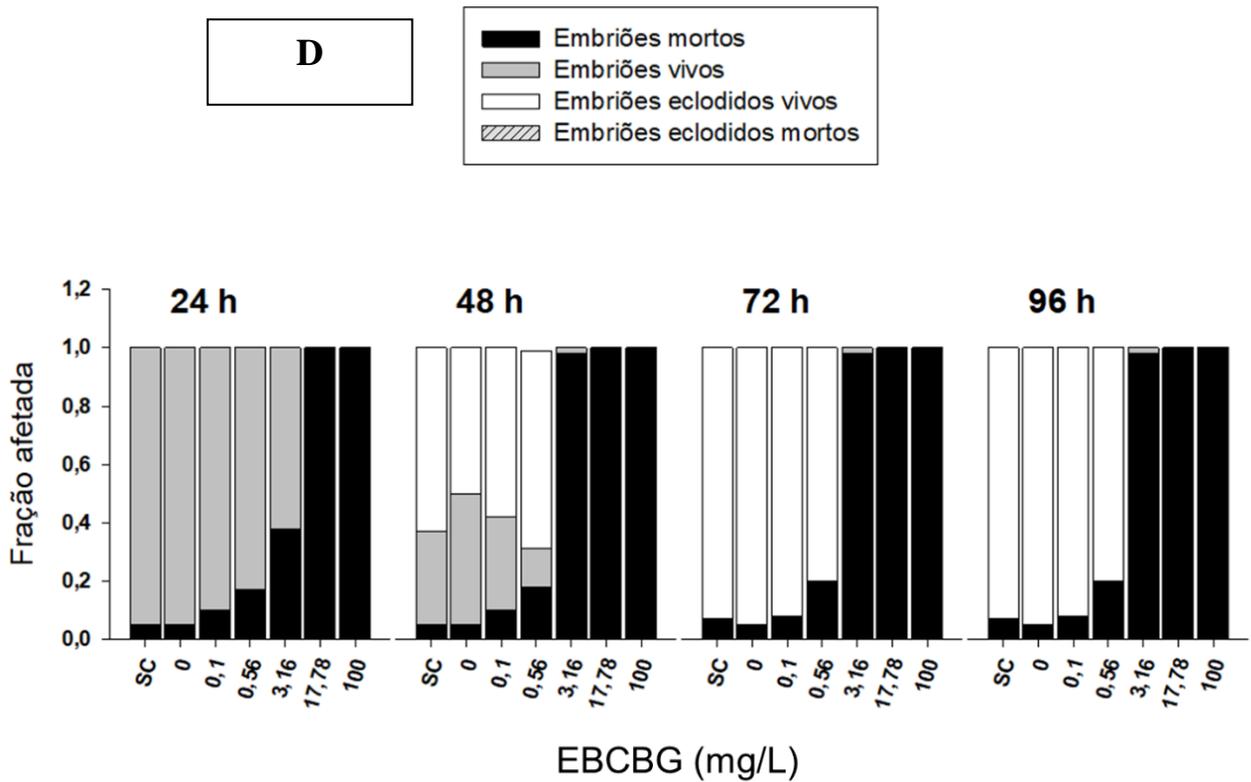
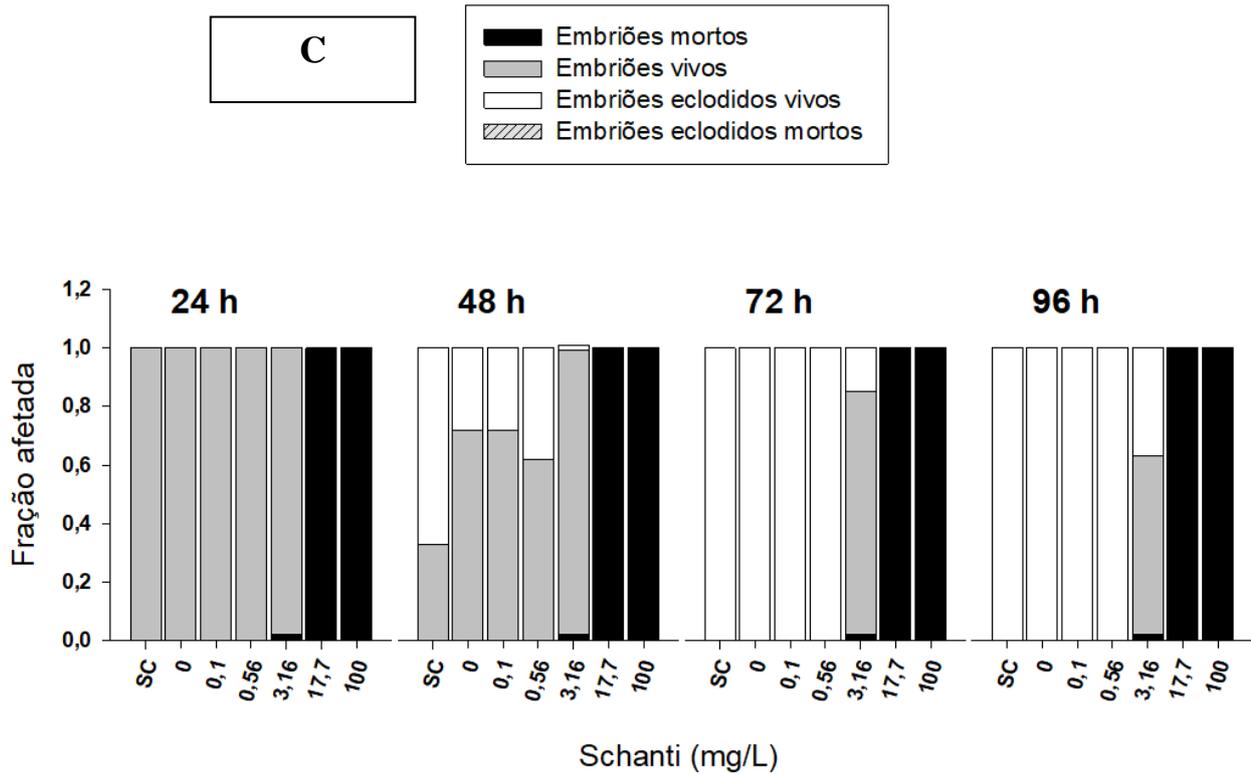


Figura 27: Efeitos dos extratos nos estágios iniciais de desenvolvimento do zebrafish durante 96 horas de exposição. A proporção de organismos mortos, vivos e eclodidos foi representada pelas diferentes barras. (A) Doctor, (B) Purple Wreck (C) Schanti (D) EBCBG

Foram observados que para todos os extratos as duas concentrações mais altas foram completamente letais em 48 horas após a exposição. Para extrato concentrado rico em CBG (Figura 27B), a terceira concentração mais alta, de 3,16 mg/L, em 48 horas também demonstrou ser praticamente letal, indicando que esse extrato tem maior efeito toxicológico.

Em relação aos efeitos subletais causados pelos extratos, os extratos Doctor e Schanti, na concentração de 3,16 mg/L, apresentaram efeito significativo em 96 hpf, com atraso na eclosão de mais de 60% dos ovos (Figura 27A e Figura 27C). O atraso na eclosão já foi um efeito reportado na literatura relacionado aos efeitos não letais da exposição ao CBD e Δ^9 -THC^{11,14,59}. Esse efeito não foi observado nos extratos Purple Wreck e CBG, sugerindo que o CBD pode ter um impacto maior na eclosão.

De forma a elucidar melhor os efeitos embriotóxicos dos extratos avaliados, os resultados obtidos em relação aos teores de cada fitocanabinoide presente, determinados no Capítulo 1, foram considerados para comparar a toxicidade dos extratos com a concentração nominal e total desses compostos. A concentração de cada fitocanabinoide bem como a concentração total de fitocanabinoides presentes nos extratos estão apresentadas na Tabela 16.

Tabela 16: Teor de fitocanabinoides e teor total presente nos 4 quimiotipos de extrato concentrado. Os fitocanabinoides Δ^8 -THC e CBN foram omitidos por não estarem presentes em nenhum dos extratos

Amostra	Teor de Fitocanabinoides % (m/m)						
	CBDV	CBG	CBD	THCV	Δ^9 -THC	CBC	Total
EBDoctor	0,80	2,14	42,94	ND	2,23	2,62	50,73
	$\pm 0,02$	$\pm 0,06$	$\pm 1,67$		$\pm 0,05$	$\pm 0,05$	$\pm 1,85$
EBCBG	ND	45,68	ND	ND	0,63	2,96	49,27
		$\pm 0,62$			$\pm 0,01$	$\pm 0,07$	$\pm 0,70$
EBSchanti	ND	1,26	30,46	ND	32,98	1,43	66,13
		$\pm 0,04$	$\pm 0,14$		$\pm 1,05$	$\pm 0,19$	$\pm 1,42$
EBPurple Wreck	ND	2,47	2,93	2,47	42,24	1,08	51,19
		$\pm 0,03$	$\pm 0,06$	$\pm 0,02$	$\pm 0,49$	$\pm 0,07$	$\pm 0,67$

A Figura 28 apresenta as curvas de fração afetada após 96 h de exposição versus concentração dos extratos. Os valores de LC₅₀, concentração na qual se tem morte de 50% dos

indivíduos, foram calculados baseados na mortalidade cumulativa no final do experimento. A CL_{50} (96h) foi definida a partir do ajuste dos dados utilizando uma equação de ajuste sigmoidal ou Weibull 4 parâmetros utilizando o programa SigmaPlot ($R^2 = 0,99$) $p < 0,0001$.

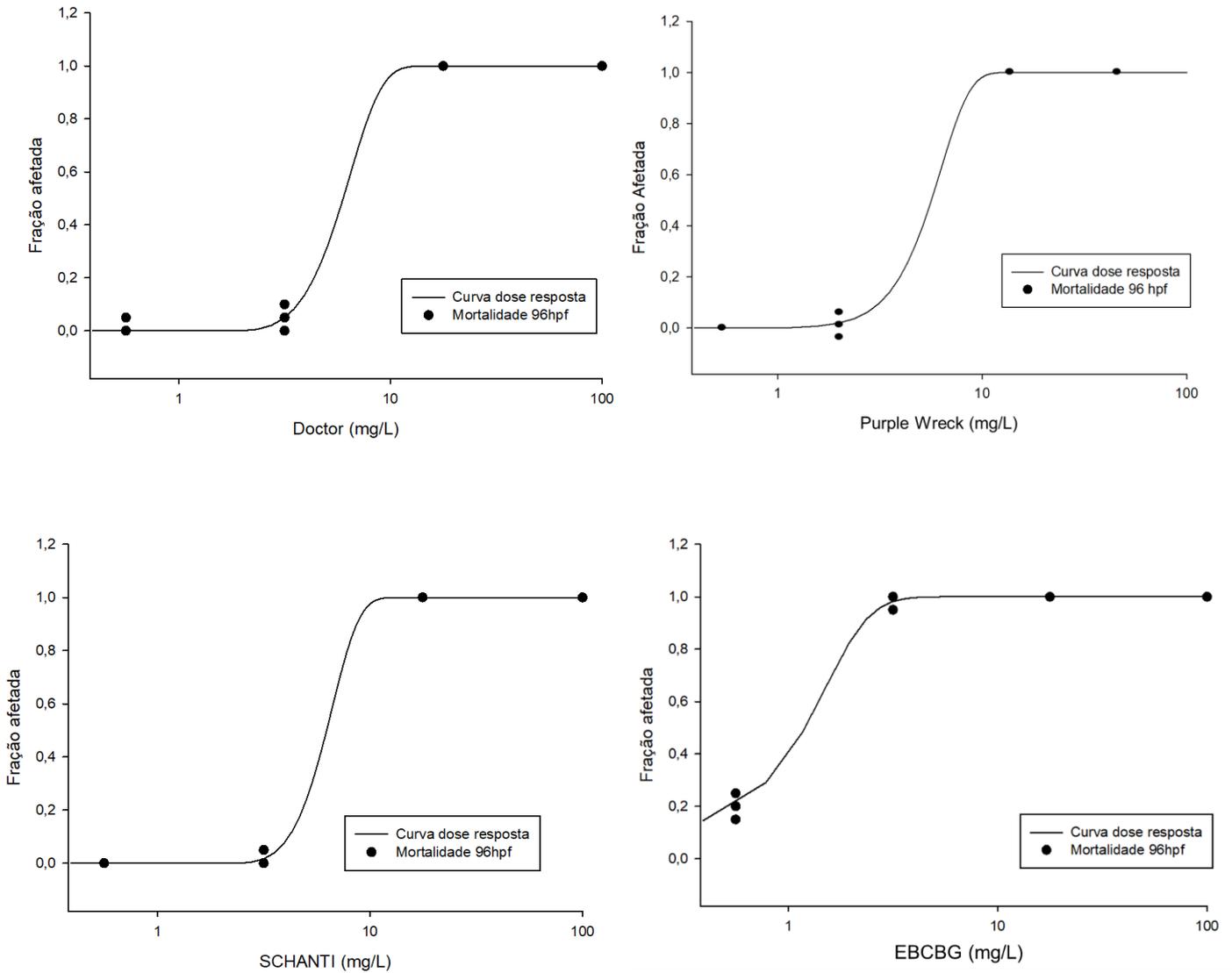


Figura 28: Curvas de concentração resposta (mortalidade) dos organismos expostos por 96 h aos diferentes extratos concentrados

Os resultados obtidos de LC_{50} com o modelo zebrafish para cada um dos extratos, a correspondência desses valores convertidos em relação ao fitocanabinoide majoritário e em relação ao total de canabinoides estão apresentados na Tabela 17. A conversão dos valores de LC_{50} foram obtidas a partir dos teores apresentados na Tabela 16 e pela de LC_{50} calculada a partir da equação de ajuste das curvas de concentração resposta de cada extrato.

Tabela 17: Valores de LC₅₀ para os diferentes extratos avaliados, em relação ao teor do fitocanabinoide majoritário e a quantidade total de canabinoides

	Doctor	Purple Wreck	Schanti	EBCBG
LC₅₀ - extrato (mg/L)	5,97	5,63	6,24	1,17
LC₅₀ - majoritário (mg/L)	2,56 (CBD)	2,57 (THC)	1,90 (CBD) 2,06 (THC)	0,53 (CBG)
LC₅₀ - can total (mg/L)	2,77	2,77	4,13	0,58

Estudos da literatura registraram valores de LC₅₀ em embriões de zebrafish utilizando padrões isolados de CBD e Δ^9 -THC. Para o CBD foram reportados valores de 0,53 e 1,84 mg/L^{61,69}. Comparando esses valores com o extrato Doctor, a LC₅₀ em relação à concentração de CBD foi maior, indicando que o extrato aumentou a tolerância dos embriões de zebrafish a esse composto. Por outro lado, para o Δ^9 -THC foram reportados valores LC₅₀ entre 1,54 e 3,65^{12,29,61}. A LC₅₀ obtida para o extrato Purple Wreck, em relação à concentração de Δ^9 -THC foi um valor médio dentro dessa faixa, corroborando com os resultados da literatura.

O extrato Schanti, apesar de ser um balanceado de CBD e Δ^9 -THC e conter uma maior proporção de fitocanabinoides em sua matriz, foi o extrato de menor toxicidade estudado. Esse resultado sugere que, assim como os efeitos benéficos da Cannabis são sinérgicos entre os compostos presentes na planta^{33,64}, os efeitos de toxicidade em embriões de zebrafish também não são cumulativos, indicando interações complexas. Nesse extrato, também foi observado que a LC₅₀ em relação à concentração de CBD foi maior que reportado na literatura, e o valor relação à concentração de Δ^9 -THC está dentro da faixa reportada.

Além disso, nesse trabalho obteve-se de forma pioneira a LC₅₀ de um extrato de CBG utilizando zebrafish como espécie modelo, não foram encontrados na literatura também testes FET e valores de a LC₅₀ em embriões de zebrafish para esse composto isolado. A partir dos resultados obtidos, observa-se que esse extrato apresentou maior toxicidade dentre os estudados, LC₅₀ de cerca de 5 vezes menor, além de uma LC₅₀ para o CBG de 0,53 mg/L.

A Figura 29 ilustra as larvas de zebrafish após 96 horas de exposição ao extrato Schanti e Doctor, exemplificando algumas alterações morfológicas que foram observadas para todos os extratos. O extrato EBCBG foi o que apresentou mais efeitos de formação de edemas no pericárdio e no saco vitelino e deformações na cauda como encurtamento e curvatura foram

observados com mais expressão no extrato Purple Wreck. O extrato Schanti foi o que teve uma menor taxa de alterações durante esses testes. Essas alterações morfológicas também foram observadas para o CBD e o Δ^9 -THC em outros estudos da literatura^{12,61,69}.

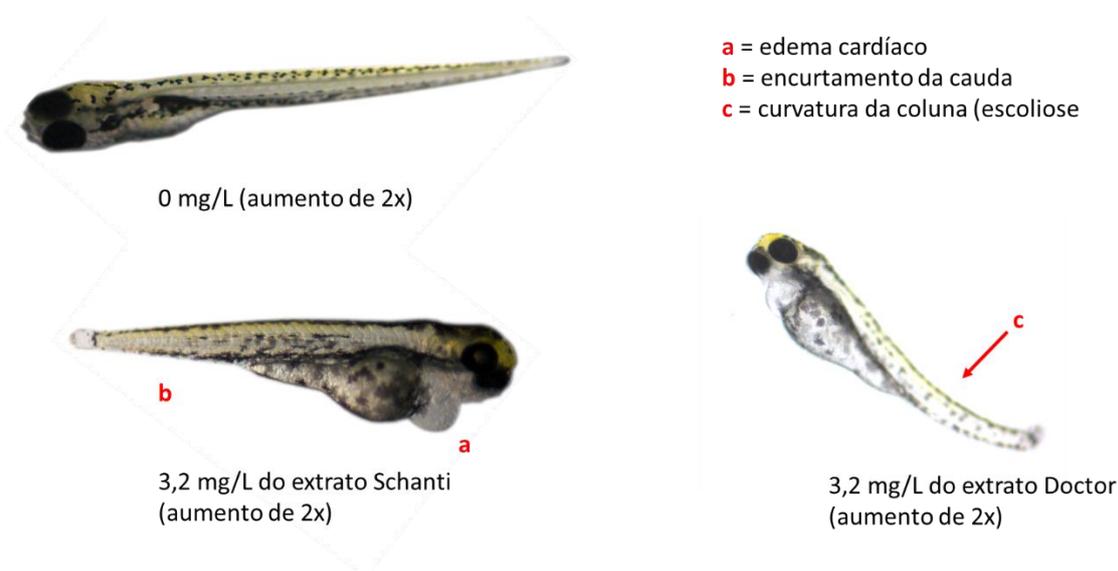


Figura 29: Larvas do zebrafish após a exposição ao extrato Schanti e Doctor por 96 h. Concentração de 0 mg/L (controle negativo) e 3,2 mg/L

Os resultados obtidos demonstraram uma visão abrangente sobre a toxicidade e efeitos subletais de diferentes extratos concentrados de Cannabis em embriões de zebrafish. Foi demonstrado que a toxicidade variou em função do perfil de fitocanabinoides dos extratos. Todos os extratos tiveram toxicidade alta-moderada em relação a produtos naturais. Devido à alta lipofilicidade desses compostos, os fitocanabinoides tem a tendência a interagir com o córion dos embriões e bioacumular causando efeitos no seu desenvolvimento. Essa interação é favorecida em ambientes aquáticos, devido à baixa solubilidade desses compostos⁶¹.

CONCLUSÃO

Os resultados apresentados nesta dissertação destacam a eficiência do método cromatográfico otimizado, demonstrando sua alta versatilidade e aplicabilidade em 15 diferentes amostras de óleos e extratos de Cannabis. A condição que melhor separou oito fitocanabinoides neutros em menos de 10 minutos, foi a fase móvel composta por acetonitrila 75:25 com uma solução aquosa 0,1% de ácido fórmico. Para a quantificação dos fitocanabinoides foram obtidas curvas de calibração com boa linearidade, R^2 maior que 0,9997 para todos os analitos, com limite de detecção e de quantificação adequados para as amostras de interesse.

A precisão e exatidão do método foi avaliada a partir de uma análise comparativa com método de referência (qNMRH), na qual obteve-se erros relativos em relação ao método padrão menores que 5% para os fitocanabinoides majoritários e menores que 10% para fitocanabinoides minoritários presentes em quatro amostras diferentes. É possível concluir que o método de HPLC-DAD se mostrou eficiente para atender as necessidades práticas de associações brasileiras, principalmente as menores, que ainda se consolidam no país e precisam de ter um monitoramento na formulação e controle de qualidade de seus produtos atendendo às exigências regulatórias.

Os ensaios embriotóxicos indicaram concentração letal média de 5,97; 5,63; 6,24 e 1,17 mg L⁻¹ para os extratos de quimiotipos de CBD, de Δ^9 -THC, balanceado de CBD e Δ^9 -THC e de CBG, respectivamente. A diferença nesses valores destaca a relação entre a variabilidade no quimiotipo de Cannabis e seu perfil toxicológico em embriões de zebrafish. Os resultados demonstraram a complexidade das interações dos compostos presentes nos extratos de Cannabis. De forma pioneira, foi determinada a toxicidade de um extrato de CBG majoritário, cujos resultados apontaram maior toxicidade em relação aos demais quimiotipos avaliados.

Além disso, efeitos subletais como atraso na eclosão dos ovos e alterações morfológicas (edema cardíaco e encurtamento da cauda) foram observados em concentrações menores dos extratos. Dessa forma, conclui-se que os resultados do FET se mostraram relevantes evidenciando a necessidade de estudar os efeitos toxicológicos de extratos de Cannabis, de composição complexa e variável.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Brighenti, V.; Pellati, F.; Steinbach, M.; Maran, D.; Benvenuti, S. Development of a New Extraction Technique and HPLC Method for the Analysis of Non-Psychoactive Cannabinoids in Fibre-Type Cannabis Sativa L. (Hemp). *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2017**, *143*, 228–236. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.05.049>.
- (2) Pourseyed Lazarjani, M.; Torres, S.; Hooker, T.; Fowlie, C.; Young, O.; Seyfoddin, A. Methods for Quantification of Cannabinoids: A Narrative Review. *J. Cannabis Res.* **2020**, *2* (1). <https://doi.org/10.1186/s42238-020-00040-2>.
- (3) Fordjour, E.; Manful, C. F.; Sey, A. A.; Javed, R.; Pham, T. H.; Thomas, R.; Cheema, M. Cannabis: A Multifaceted Plant with Endless Potentials. *Front. Pharmacol.* **2023**, *14* (June), 1–36. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1200269>.
- (4) Correia, B.; Ahmad, S. M.; Quintas, A. Determination of Phytocannabinoids in Cannabis Samples by Ultrasound-Assisted Solid-Liquid Extraction and High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector Analysis. *J. Chromatogr. A* **2023**, *1705*, 464191. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.464191>.
- (5) ANVISA. Resolução Da Diretoria Colegiada - RDC N° 17. **2015**, 50–51.
- (6) Policarpo, F. O Debate Em Torno Da Maconha No Brasil: Um Breve Panorama Das Controvérsias e Disputas Atuais. In *Drogas e sociedade: estudos comparados Brasil e Portugal*; Pinto, J. B., Ed.; Letra Capital Editora: Rio de Janeiro, 2019; pp 109–123.
- (7) ANVISA. Resolução Da Diretoria Colegiada RDC N° 66. 2016.
- (8) ANVISA. Resolução Da Diretoria Colegiada RDC N° 327. **2019**.
- (9) Song, L.; Carlson, S.; Valenzuela, G.; Chao, M.; Pathipaka, S. B. Development of a Validated Method for Rapid Quantification of up to Sixteen Cannabinoids Using Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Diode-Array Detector with Optional Electrospray Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry Detection. *J. Chromatogr. A* **2022**, *1670*, 462953. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.462953>.
- (10) Citti, C.; Ciccarella, G.; Braghiroli, D.; Parenti, C.; Vandelli, M. A.; Cannazza, G. 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. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, *128*, 201–209. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.05.033>.
- (11) Valim Brigante, T. A.; Abe, F. R.; Zuardi, A. W.; Hallak, J. E. C.; Crippa, J. A. S.; de Oliveira, D. P. Cannabidiol Did Not Induce Teratogenicity or Neurotoxicity in Exposed

- Zebrafish Embryos. *Chem. Biol. Interact.* **2018**, *291* (June), 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.06.008>.
- (12) Chatzimitakos, T.; Chousidis, I.; Leonardos, D.; Stalikas, C.; Leonardos, I. In the Swim of Cannabis: Developmental Toxicity and Metabolomic Pathway Alterations of Zebrafish Larvae Exposed to THC for the Assessment of Its Potential Environmental and Human Health Impact. *Molecules* **2022**, *27* (17). <https://doi.org/10.3390/molecules27175506>.
- (13) Licitra, R.; Marchese, M.; Naef, V.; Ogi, A.; Martinelli, M.; Kiferle, C.; Fronte, B.; Santorelli, F. M. A Review on the Bioactivity of Cannabinoids on Zebrafish Models: Emphasis on Neurodevelopment. *Biomedicines* **2022**, *10* (8), 1–28. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10081820>.
- (14) Ahmed, K. T.; Amin, M. R.; Shah, P.; Ali, D. W. Motor Neuron Development in Zebrafish Is Altered by Brief (5-Hr) Exposures to THC (Δ^9 -Tetrahydrocannabinol) or CBD (Cannabidiol) during Gastrulation. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28689-z>.
- (15) Balant, M.; Gras, A.; Ruz, M.; Vallès, J.; Vitales, D.; Garnatje, T. Traditional Uses of Cannabis: An Analysis of the CANNUSE Database. *J. Ethnopharmacol.* **2021**, 279. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114362>.
- (16) Charitos, I. A.; Gagliano-Candela, R.; Santacroce, L.; Bottalico, L. The Cannabis Spread throughout the Continents and Its Therapeutic Use in History. *Endocrine, Metab. Immune Disord. - Drug Targets* **2020**, *21* (3), 407–417. <https://doi.org/10.2174/1871530320666200520095900>.
- (17) UNODC. Recommended Methods and Analysis of Cannabis for the Identification and Cannabis Products. **2022**.
- (18) United States Department of Agriculture (USDA). *USDA Plants Database Plant Profile General. Cannabis sativa L.* <https://plants.usda.gov/plant-profile/CASA3> (accessed 2024-11-23).
- (19) dos Santos, N. A.; Romão, W. Cannabis – A State of the Art about the Millenary Plant: Part I. *Forensic Chem.* **2023**, *32* (November 2022). <https://doi.org/10.1016/j.forc.2023.100470>.
- (20) Hourfane, S.; Mechqoq, H.; Bekkali, A. Y.; Rocha, J. M.; El Aouad, N. A Comprehensive Review on Cannabis Sativa Ethnobotany, Phytochemistry, Molecular Docking and Biological Activities. *Plants* **2023**, *12* (6), 1–43.

- <https://doi.org/10.3390/plants12061245>.
- (21) Sensi Seeds. *Anatomy of the Cannabis Plant: From Roots to Pistils*. <https://sensiseeds.com/en/blog/the-parts-of-the-cannabis-plant/> (accessed 2024-11-24).
 - (22) Layton, C.; Reuter, W. M. Analysis of Cannabinoids in Hemp Seed Oils by HPLC Using PDA Detection. **2015**.
 - (23) Hall, D. R.; Sinclair, J. S.; Bhuyan, D. J.; Khoo, C.; Li, C. G.; Sarris, J.; Low, M. Quality Control of Cannabis Inflorescence and Oil Products: Response Factors for the Cost-Efficient Determination of Ten Cannabinoids by HPLC. *Talanta Open* **2022**, *5* (March), 100112. <https://doi.org/10.1016/j.talo.2022.100112>.
 - (24) Jin, D.; Dai, K.; Xie, Z.; Chen, J. Secondary Metabolites Profiled in Cannabis Inflorescences, Leaves, Stem Barks, and Roots for Medicinal Purposes. *Sci. Rep.* **2020**, *10* (1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60172-6>.
 - (25) Sainz Martinez, A.; Lanaridi, O.; Stigel, K.; Halbwirth, H.; Schnürch, M.; Bica-Schröder, K. Extraction Techniques for Bioactive Compounds of Cannabis. *Nat. Prod. Rep.* **2023**, *40* (3), 676–717. <https://doi.org/10.1039/d2np00059h>.
 - (26) Carvalho, V. M.; Aguiara, A. F. L.; Barattob, L. C.; Souza, F. L. C.; Rocha, E. D. QUANTIFICAÇÃO DE CANABINOIDES EM EXTRATOS MEDICINAIS DE Cannabis POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA. *Quim. Nov.* **2020**, *43* (1), 90–97.
 - (27) Elkins, A. C.; Deseo, M. A.; Rochfort, S.; Ezernieks, V.; Spangenberg, G. Development of a Validated Method for the Qualitative and Quantitative Analysis of Cannabinoids in Plant Biomass and Medicinal Cannabis Resin Extracts Obtained by Super-Critical Fluid Extraction. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2019**, *1109* (December 2018), 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.01.027>.
 - (28) Burnier, C.; Esseiva, P.; Roussel, C. Quantification of THC in Cannabis Plants by Fast-HPLC-DAD: A Promising Method for Routine Analyses. *Talanta* **2019**, *192* (March 2018), 135–141. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.09.012>.
 - (29) Licitra, R.; Marchese, M.; Naef, V.; Ogi, A.; Martinelli, M.; Kiferle, C.; Fronte, B.; Santorelli, F. M. A Review on the Bioactivity of Cannabinoids on Zebrafish Models: Emphasis on Neurodevelopment. *Biomedicines*. **2022**, pp 1–28. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10081820>.
 - (30) De Backer, B.; Debrus, B.; Lebrun, P.; Theunis, L.; Dubois, N.; Decock, L.; Verstraete, A.; Hubert, P.; Charlier, C. Innovative Development and Validation of an HPLC/DAD

- Method for the Qualitative and Quantitative Determination of Major Cannabinoids in Cannabis Plant Material. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2009**, 877 (32), 4115–4124. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.11.004>.
- (31) Stewart, A. M.; Kalueff, A. V. The Behavioral Effects of Acute Δ^9 -Tetrahydrocannabinol and Heroin (Diacetylmorphine) Exposure in Adult Zebrafish. *Brain Res.* **2014**, 1543, 109–119. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.11.002>.
- (32) Maroon, J.; Bost, J. Review of the Neurological Benefits of Phytocannabinoids. *Surg. Neurol. Int.* **2018**, 9 (1). https://doi.org/10.4103/SNIL.SNI_45_18.
- (33) Russo, E. B. The Case for the Entourage Effect and Conventional Breeding of Clinical Cannabis: No “Strain,” No Gain. *Front. Plant Sci.* **2019**, 9 (January), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01969>.
- (34) Wang, Y. H.; Avula, B.; Elsohly, M. A.; Radwan, M. M.; Wang, M.; Wanas, A. S.; Mehmedic, Z.; Khan, I. A. Quantitative Determination of Δ^9 -THC, CBG, CBD, Their Acid Precursors and Five Other Neutral Cannabinoids by UHPLC-UV-MS. *Planta Med.* **2018**, 84 (4), 260–266. <https://doi.org/10.1055/s-0043-124873>.
- (35) Nachnani, R.; Raup-Konsavage, W. M.; Vrana, K. E. The Pharmacological Case for Cannabigerol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2021**, 376 (2), 204 LP – 212. <https://doi.org/10.1124/jpet.120.000340>.
- (36) Deiana, S. *Potential Medical Uses of Cannabigerol: A Brief Overview*; Elsevier Inc., 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800756-3.00115-0>.
- (37) Walsh, K. B.; McKinney, A. E.; Holmes, A. E. Minor Cannabinoids: Biosynthesis, Molecular Pharmacology and Potential Therapeutic Uses. *Front. Pharmacol.* **2021**, 12 (November), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.777804>.
- (38) Carlini, E. A. A História Da Maconha No Brasil. *J. Bras. Psiquiatr.* **2006**, 55 (4), 314–317. <https://doi.org/10.1590/S0047-20852006000400008>.
- (39) Brandão, M. D. Ciclos de Atenção à Maconha No Brasil. *Rev. da Biol.* **2014**, 13 (1), 1–10. <https://doi.org/10.7594/revbio.13.01.01>.
- (40) ANVISA. *Consulta - Agência Nacional de Vigilância Sanitária: Produtos de Cannabis*.
- (41) ANVISA. Consulta Pública N° 1.233, de 15 de Fevereiro de 2024 D.O.U. **2024**, 4–6.
- (42) Kaya Mind. *Anuário Da Cannabis Medicinal: Os Avanços Legislativos e o Impacto Da Regulamentação No Mercado e Na Saúde No Brasil*; 2023. <https://doi.org/10.18294/sc.2022.3991>.
- (43) Wadsworth, E.; Craft, S.; Calder, R.; Hammond, D. Prevalence and Use of Cannabis

- Products and Routes of Administration among Youth and Young Adults in Canada and the United States: A Systematic Review. *Addict. Behav.* **2022**, *129* (January), 107258. <https://doi.org/10.1016/j.addbeh.2022.107258>.
- (44) Nahtigal, I.; Blake, A.; Hand, A.; Florentinus-Mefailoski, A.; Sohi, H. H.; Friedberg, J. The Pharmacological Properties of Cannabis. *Cannabis Med. Asp.* **2017**, *9* (4), 71–82.
- (45) Gouvêa-Silva, J. G.; Costa-Oliveira, C. Da; Ramos, Y. J.; Mantovanelli, D. F.; Cardoso, M. S.; Viana-Oliveira, L. D.; Costa, J. L.; Moreira, D. D. L.; Maciel-Magalhães, M. Is There Enough Knowledge to Standardize a Cannabis Sativa L. Medicinal Oil Preparation with a High Content of Cannabinoids? *Cannabis Cannabinoid Res.* **2023**, *8* (3), 476–486. <https://doi.org/10.1089/can.2022.0076>.
- (46) Ternelli, M.; Brighenti, V.; Anceschi, L.; Poto, M.; Bertelli, D.; Licata, M.; Pellati, F. Innovative Methods for the Preparation of Medical Cannabis Oils with a High Content of Both Cannabinoids and Terpenes. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2020**, *186*, 113296. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113296>.
- (47) Leghissa, A.; Hildenbrand, Z. L.; Schug, K. A. A Review of Methods for the Chemical Characterization of Cannabis Natural Products. *J. Sep. Sci.* **2018**, *41* (1), 398–415. <https://doi.org/10.1002/jssc.201701003>.
- (48) Silva Sofrás, F. M.; Alonso, R.; Retta, D. S.; Di Leo Lira, P.; Desimone, M. F.; van Baren, C. M. Development and Validation of a Simple, Fast, and Accessible HPLC-UV Method for Cannabinoids Determination in Cannabis Sativa L. Extracts and Medicinal Oils. *Curr. Pharm. Des.* **2023**, *29* (24), 1918–1928. <https://doi.org/10.2174/1381612829666230809094304>.
- (49) Deidda, R.; Dispas, A.; De Bleye, C.; Hubert, P.; Ziemons, É. Critical Review on Recent Trends in Cannabinoid Determination on Cannabis Herbal Samples: From Chromatographic to Vibrational Spectroscopic Techniques. *Anal. Chim. Acta* **2022**, *1209*. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.339184>.
- (50) Nahar, L.; Onder, A.; Sarker, S. D. A Review on the Recent Advances in HPLC, UHPLC and UPLC Analyses of Naturally Occurring Cannabinoids (2010–2019). *Phytochem. Anal.* **2020**, *31* (4), 413–457. <https://doi.org/10.1002/pca.2906>.
- (51) Vaclavik, L.; Benes, F.; Fenclova, M.; Hricko, J.; Krmela, A.; Svobodova, V.; Hajslova, J.; Mastovska, K. Quantitation of Cannabinoids in Cannabis Dried Plant Materials, Concentrates, and Oils Using Liquid Chromatography–Diode Array Detection Technique with Optional Mass Spectrometric Detection: Single-Laboratory Validation

- Study, First Action 2018.11. *J. AOAC Int.* **2019**, *102* (6), 1822–1833. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.18-0426>.
- (52) Madej, K.; Chmiólek, A.; Szlachta, K.; Piekoszewski, W. Hplc-Dad Analysis of Hemp Oil Supplements for Determination of Four Cannabinoids: Cannabidiol, Cannabidiolic Acid, Cannabinol and Delta 9-Tetrahydrocannabinol. *Separations* **2021**, *8* (12). <https://doi.org/10.3390/separations8120227>.
- (53) Collins, C. H.; Braga, G. L.; Pierina, S. B. *Fundamentos de Cromatografia*; Editora da Unicamp: Campinas, 2006.
- (54) Ciolino, L. A.; Ranieri, T. L.; Taylor, A. M. Commercial Cannabis Consumer Products Part 2: HPLC-DAD Quantitative Analysis of Cannabis Cannabinoids. *Forensic Sci. Int.* **2018**, *289*, 438–447. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.05.033>.
- (55) ANVISA. Resolução Da Diretoria Colegiada RDC N° 166. **2017**, *2017*, 87.
- (56) Wang, C.; Zhang, X.; Zhao, R.; Freeman, K.; McHenry, M. A.; Wang, C.; Guo, M. Impact of Carrier Oil on Interfacial Properties, CBD Partition and Stability of Emulsions Formulated by Whey Protein or Whey Protein-Maltodextrin Conjugate. *Lwt* **2022**, *168* (June), 113933. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113933>.
- (57) APEPI. *Óleos da APEPI - óleos à base de Cannabis*. <https://apepi.org/oleosdaapepi/>.
- (58) Pauli, G. F.; Gödecke, T.; Jaki, B. U.; Lankin, D. C. Quantitative ¹H NMR. Development and Potential of an Analytical Method: An Update. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75* (4), 834–851. <https://doi.org/10.1021/np200993k>.
- (59) Licitra, R.; Martinelli, M.; Jasinski, L. P.; Marchese, M.; Kiferle, C.; Fronte, B. In Vivo Evaluation of Cannabis Sativa Full Extract on Zebrafish Larvae Development, Locomotion Behavior and Gene Expression. *Pharmaceuticals* **2021**, *14* (12). <https://doi.org/10.3390/ph14121224>.
- (60) Zou, S.; Kumar, U. Cannabinoid Receptors and the Endocannabinoid System: Signaling and Function in the Central Nervous System. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19* (3). <https://doi.org/10.3390/ijms19030833>.
- (61) Carty, D. R.; Thornton, C.; Gledhill, J. H.; Willett, K. L. Developmental Effects of Cannabidiol and D9-Tetrahydrocannabinol in Zebrafish. *Toxicol. Sci.* **2018**, *162* (1), 137–145. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx232>.
- (62) Uthayakumaran, K.; Sunil, M.; Ratcliffe, E. M. Evaluating the Role of the Endocannabinoid System in Axon Guidance: A Literature Review. *Cannabis Cannabinoid Res.* **2024**, *9* (1), 12–20. <https://doi.org/10.1089/can.2023.0138>.

- (63) Cammà, G.; Verdouw, M. P.; van der Meer, P. B.; Groenink, L.; Batalla, A. Therapeutic Potential of Minor Cannabinoids in Psychiatric Disorders: A Systematic Review. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **2024**, *91* (November 2024), 9–24. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2024.10.006>.
- (64) Nixon, J.; Abramovici, H.; Cabecinha, A.; Martinez-Farina, C.; Hui, J.; Ellis, L. Assessing the Bioactivity of Cannabis Extracts in Larval Zebrafish. *J. Cannabis Res.* **2021**, *3* (1). <https://doi.org/10.1186/s42238-021-00103-y>.
- (65) Nachnani, R.; Raup-Konsavage, W. M.; Vrana, K. E. The Pharmacological Case for Cannabigerol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2021**, *376* (2), 204–212. <https://doi.org/10.1124/jpet.120.000340>.
- (66) OECD. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. **2013**, No. July, 1–22.
- (67) Canedo, A.; Saiki, P.; Santos, A. L.; da Silva Carneiro, K.; de Souza, A. M.; Qualhato, G.; da Silva Brito, R.; Mello-Andrade, F.; Rocha, T. L. O Peixe-Zebra (Danio Rerio) Encontra a Bioética: Os Princípios Éticos Dos 10Rs Na Pesquisa. *Cienc. Anim. Bras.* **2022**, *23* (19). <https://doi.org/10.1590/1809-6891V22E-70884>.
- (68) Maes, J.; Verlooy, L.; Buenafe, O. E.; de Witte, P. A. M.; Esguerra, C. V.; Crawford, A. D. Evaluation of 14 Organic Solvents and Carriers for Screening Applications in Zebrafish Embryos and Larvae. *PLoS One* **2012**, *7* (10), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043850>.
- (69) Wei, Y.; Chen, X.; Li, Y.; Guo, Y.; Zhang, S.; Jin, J.; Li, J.; Wu, D. Toxicological Mechanism of Cannabidiol (CBD) Exposure on Zebrafish Embryonic Development. *Food Chem. Toxicol.* **2024**, *193* (August). <https://doi.org/10.1016/j.fct.2024.114929>.

DECLARAÇÃO DE ORIGINALIDADE DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO OU TESE DE DOUTORADO

Declaro que a presente dissertação/tese é original, elaborada especialmente para este fim, não tendo sido apresentada para obtenção de qualquer título e que identifico e cito devidamente todas as autoras e todos os autores que contribuíram para o trabalho, bem como as contribuições oriundas de outras publicações de minha autoria.

Declaro estar ciente de que a cópia ou o plágio podem gerar responsabilidade civil, criminal e disciplinar, consistindo em grave violação à ética acadêmica.

Brasília, 30 de dezembro de 2024.

Assinatura do/a discente: _____

Programa: Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ-UnB)

Nome completo: Maria Vitória dos Santos Villa Bande

Título do Trabalho: DETERMINAÇÃO DE FITOCANABINOIDES EM PRODUTOS DE *CANNABIS SATIVA L.* POR HPLC-DAD E AVALIAÇÃO DOS SEUS EFEITOS EMBRIOTÓXICOS EM ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*)

Nível: Mestrado Doutorado

Orientador/a: Ana Cristi Basile Dias