



CENTRO DE CIÊNCIAS MATEMÁTICAS E DA NATUREZA

INSTITUTO DE QUÍMICA

CURSO DE QUÍMICA – ATRIBUIÇÕES TECNOLÓGICAS

DÉBORA CRISTINA DINIZ ESTEVAM

OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA DA QUANTIFICAÇÃO DE FITOCANABINOIDES EM
EXTRATOS MEDICINAIS DE *CANNABIS* POR CLUE-EMAR/EM

Rio de Janeiro

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

DÉBORA CRISTINA DINIZ ESTEVAM

OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA DA QUANTIFICAÇÃO DE FITOCANABINOIDES EM
EXTRATOS MEDICINAIS DE *CANNABIS* POR CLUE-EMAR/EM

Projeto Final de Curso apresentado ao Instituto de
Química da Universidade Federal do Rio de
Janeiro, como parte dos requisitos para obtenção
do título de Bacharel em Química, sob orientação
da Prof^a. Dr^a. Monica Costa Padilha.

Rio de Janeiro

2024

DÉBORA CRISTINA DINIZ ESTEVAM

OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA DA QUANTIFICAÇÃO DE FITOCANABINOIDES EM
EXTRATOS MEDICINAIS DE *CANNABIS* POR CLUE-EMAR/EM

Projeto Final de Curso apresentado ao Instituto de
Química da Universidade Federal do Rio de
Janeiro, como parte dos requisitos para obtenção
do título de Bacharel em Química, sob orientação
da Prof^a. Dr^a. Monica Costa Padilha.

Aprovado em:

Prof^a. Dr^a. Monica Costa Padilha - IQ/UFRJ

Dr^a. Clarisse Lacerda Torres - IQ/UFRJ

Dr. Gustavo Ramalho Cardoso dos Santos - IQ/UFRJ

AGRADECIMENTOS

À minha mãe e ao meu padrasto, Márcio, por todo apoio, compreensão e dedicação. Não foi uma trajetória fácil, mas com o suporte de vocês conseguir vencer mais essa etapa e crescer como pessoa, com certeza sem vocês eu não teria chegado aonde cheguei.

Quero agradecer às minhas amigas Monique e Luiza, por sempre estarem ao meu lado, mesmo quando eu só sabia reclamar do quanto as coisas estavam difíceis, vocês não soltaram a minha mão. Obrigada por tudo, o apoio de vocês foi essencial.

Tenho um agradecimento muito especial ao meu amigo João, ou só Jojo. Muito obrigada por estar comigo no desenvolvimento desse trabalho e, mais do que isso, obrigada pelas dicas e por me impulsionar na parte da escrita nos meus momentos de maior dificuldade, sua ajuda foi essencial para que eu chegasse até aqui.

Não posso deixar de agradecer aos amigos que fiz ao longo dessa caminhada, Bernardo, Carol, Bruna, Jojo, João e Barbara. O dia a dia com vocês, as risadas, os almoços, fizeram tudo ficar mais leve, muito obrigada.

Agradeço ao pessoal do LAPAA e das triagens no LBCD, em especial ao Gabriel e a Vanessa por me ensinarem os primeiros passos no LC e por sempre estarem dispostos a me ajudar sempre que eu precisava. Estendo todos os meus agradecimentos a Andressa, Jéssica, Millena, Márcio e Gustavo Cavalcanti, de alguma forma vocês contribuíram com a minha formação nesse período e sempre estiveram dispostos a contribuir com o conhecimento de vocês.

À minha orientadora, Monica Padilha, por sempre manter as portas do laboratório abertas para mim e acreditar no meu potencial e no meu trabalho. Por fim, ao Instituto de Química da UFRJ e ao LBCD pela oportunidade de utilizar a sua infraestrutura e pelo acolhimento.

RESUMO

A *cannabis* é um gênero de plantas altamente diverso, complexo e polimórfico, conhecida pela capacidade de biossíntese de uma extensa variedade de metabólitos. O potencial psicoativo da *cannabis* já é conhecido historicamente e a busca por seu aproveitamento terapêutico se encontra em expansão, principalmente na forma de extratos oleosos medicinais. Conforme avanços judiciais ocorrem quanto a sua regulamentação, métodos de avaliação de risco e de controle de qualidade têm sido desenvolvidos e padronizados. No que tange os principais grupos-alvo e o controle de qualidade, destaca-se a identificação e quantificação de fitocanabinoides, o principal grupo de metabólitos de propriedades terapêuticas desta matriz vegetal. Por isso, o objetivo do trabalho é desenvolver um método analítico otimizado para quantificação de Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), canabidiol (CBD) e cannabinol (CBN) em extratos oleosos de *cannabis* por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massa de alta resolução em série. Os parâmetros instrumentais da fonte de ionização por *electrospray* foram otimizados seguindo um planejamento Plackett-Burman para sete variáveis, além disso uma avaliação criteriosa do padrão interno (PI) foi realizada mediante as opções disponíveis (Δ^9 -THC-COOH-D₉ e Δ^9 -THC-COOH-D₃). Obtendo-se como resultado 2%, 2% e 5% de coeficiente de variação (CV%) para CBD, Δ^9 -THC e CBN, respectivamente. O método de preparo foi otimizado seguindo um planejamento fatorial completo 2³ para identificação dos parâmetros significativos na extração líquido-líquido com metanol: hexano (9:1) de 100 mg de óleos de coco fortificados com os analitos e padrão interno. As variáveis tempo de agitação em agitador automático (V₁), tempo de ultrassom (V₂) e volume de solvente de extração (V₃) se apresentaram significativas e todas foram mantidas para modelagem por Box-Behnken. O método foi otimizado para os três analitos, obtendo-se uma otimização global de 84%. A otimização dos parâmetros da fonte de ionização assim como o uso do Δ^9 -THC-COOH-D₉ como PI promoveram maior precisão instrumental quanto a ionização e detecção dos analitos alvo. As variáveis significativas do método de extração foram identificadas e otimizadas de maneira robusta e representa uma alternativa mais rápida quando comparada a outros métodos na literatura.

Palavras-chave: *Cannabis*, Otimização multivariada, Box-Behnken, Cromatografia Líquida, Espectrometria de massas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Pesquisa bibliográfica dos avanços da pesquisa em <i>cannabis</i> após o isolamento do Δ 9-THC na base de dados <i>scopus</i>	17
Figura 2. Estruturas dos principais endocanabinoides a) anandamida (AEA) e b) 2-araquidonoil-glicerol (2-AG). Adaptada de (RIBEIRO, 2014).....	20
Figura 3. Estruturas químicas dos isômeros a) Δ 9-THC e b) CBD.....	22
Figura 4. Característica da estrutura química dos fitocanabinoides, exemplificada com o CBD.....	30
Figura 5. Reações de descarboxilação que convertem os fitonabinoides da sua forma ácida para sua forma neutra a) Δ 9-THC b) CBD.....	31
Figura 6. Biossíntese dos principais fitocanabinoides encontrados na <i>cannabis</i> . Adaptado de (BONINI et al., 2018).....	32
Figura 7. Reação de degradação do Δ 9-THC à CBN.....	33
Figura 8. Diagrama de blocos do EM.....	38
Figura 9. Esquema da configuração do EM híbrido quadrupolo- <i>Orbitrap</i> . Adaptado de (MAKAROV; SCIGELOVA, 2010).....	40
Figura 10. Esquema visual do modo de aquisição <i>Full MS</i> . Adaptado de (MAKAROV; SCIGELOVA, 2010).....	41
Figura 11. Esquema visual do modo de aquisição <i>PRM</i> . Adaptado de (MAKAROV; SCIGELOVA, 2010).....	42
Figura 12. Pesquisa bibliográfica para o uso de DoE em estudos referente a <i>cannabis</i> na base de dado <i>scopus</i>	48
Figura 13. Gradiente da corrida cromatográfica.....	51
Figura 14. Resumo do preparo das soluções e imagem do equipamento em que as amostras foram submetidas à análise de padrões dos analitos.....	52
Figura 15. Procedimento experimental para a otimização do método de extração. ...	54
Figura 16. Espectro de massas da fragmentação do Δ 9-THC. Contém os fragmentos monitorados e energia de colisão aplicada.	58
Figura 17. Espectro de massas da fragmentação do CBD. Contém os fragmentos monitorados e energia de colisão aplicada.	59
Figura 18. Espectro de massas da fragmentação do CBN. Contém os fragmentos monitorados e energia de colisão aplicada.	60

Figura 19. Espectro de massas da fragmentação do Δ^9 -THC-COOH-D ₉ . Contém os fragmentos monitorados e energia de colisão aplicada.	61
Figura 20. Espectro de massas da fragmentação do Δ^9 -THC-COOH-D ₃ . Contém os fragmentos monitorados e energia de colisão aplicada.	62
Figura 21. Cromatograma com os t _R 's dos 3 analitos a) CBD b) CBN e c) Δ^9 -THC.	65
Figura 22. Cromatograma com os t _R 's dos 2 PI's a) Δ^9 -THC-COOH-D ₉ e b) Δ^9 -THC-COOH-D ₃	66
Figura 23. Coeficiente de variação (CV%) para "Área do analito/Área do PI" para cada experimento da matriz a) Δ^9 -THC-COOH-D ₃ b) Δ^9 -THC-COOH-D ₉	67
Figura 24. Superfícies de respostas tridimensionais	73
Figura 25. Superfícies de respostas Bidimensional.....	74
Figura 26. Curva analítica para o CBD.....	76
Figura 27. Curva analítica para o CBN.....	77
Figura 28. Curva analítica para o Δ^9 -THC.	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Alguns quadros clínicos em que os fitocannabinoides atuam e os possíveis receptores envolvidos. Adaptado de (BONINI et al., 2018).	24
Tabela 2. Alguns exemplos das substâncias já identificadas da <i>cannabis</i>	28
Tabela 3. Comparação entre as principais características da CG e da CLAE. Adaptada de (COLLINS, BRAGA, BONATO, 2006).	36
Tabela 4. Descrição da função de cada variável estudada no processo de ionização ESI.	43
Tabela 5. Massa exata, fórmula molecular e energia aplicada à célula de colisão para os analitos CBD, Δ^9 -THC, CBN, PI's Δ^9 -THC-COOH-D ₉ e Δ^9 -THC-COOH-D ₃	51
Tabela 6. Variáveis estudadas no planejamento do tipo Plackett-Burman e seus respectivos níveis.	52
Tabela 7. Matriz de experimentos do planejamento do tipo Plackett-Burman.	53
Tabela 8. Variáveis estudadas no planejamento do tipo Fatorial Completo e seus respectivos níveis.	54
Tabela 9. Matriz de experimentos do planejamento do tipo Fatorial Completo.	54
Tabela 10. Variáveis estudadas no planejamento do tipo Box-Behnken e seus respectivos níveis.	55
Tabela 11. Matriz de experimentos do planejamento do tipo Box-Behnken.	55
Tabela 12. Analitos monitorados, suas fórmulas moleculares, íons precursores e íons produtos, respectivos erros de massa, energias de colisão aplicadas e referências bibliográficas que suportam o resultado encontrado.	63
Tabela 13. Parâmetros da fonte de ionização ESI otimizada.	68
Tabela 14. Coeficientes lineares, coeficientes das variáveis e interações e p-valor obtidos por ANOVA.	71
Tabela 15. Análise dos parâmetros por ANOVA, p-valores do modelo predito, falta de ajuste e valor dos coeficientes para cada analito.	73
Tabela 16. Comparação de valores experimentais e previstos pelo modelo, assim como a precisão do modelo.	75
Tabela 17. Precisão, expressa pela repetibilidade (apenas 1 analista) e recuperação para cada analito em cada nível de concentração. Resultados expressos em CV% e % de recuperação.	78

Tabela 18. Valores das inclinações, interceptos e suas respectivas médias e desvios padrões para cada replicata da curva.	78
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(N)CE	Energia de colisão normalizada
2-AG	2-araquidonoil-glicerol
Δ9-THC	Δ 9-Tetrahydrocanabinol
Δ9-THCA	Ácido Δ -9-tetrahydrocanabinólico
Δ9-THCV	Δ 9-tetrahydrocanabivarino
Δ9-THCVA	Ácido Δ -9-tetrahydrocannabivarínico
Δ9-THC-COOH-D₉	Δ 9-Tetrahydrocanabinol-carboxi-D ₉
Δ9-THC-COOH-D₃	Δ 9-Tetrahydrocanabinol-carboxi-D ₃
AA	Absorção Atômica
AEA	Anandamida
AGC	<i>Automatic Gain Control</i>
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BBD	Planejamento Box-Behnken
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
CB1	Receptor canabinoide 1
CB2	Receptor canabinoide 2
CBC	Canabicromeno
CBCA	Ácido canabicromênico
CBCV	Canabivaricromeno
CBCVA	Ácido canabicromovarínico
CBD	Canabidiol

CBDA	Ácido canabidiólico
CBDV	Canabidivarino
CBDVA	Ácido canabidivarínico
CBGA	Ácido canabigerólico
CBGVA	Ácido canabigerovarínico
CBL	Canabicitrolol
CBLV	Canabivaricitrolol
CBN	Canabinol
CBNV	Canabinovarino
CCD	Planejamento composto central
CG	Cromatografia Gasosa
CG/DIC	Cromatografia gasosa acoplada a detecção por ionização de chama
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CID	Dissociação induzida por colisão
CL	Cromatografia Líquida
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE/DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detecção por arranjo de diodos
CLUE-EMAR/EM	Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas de alta resolução
CV	Coeficiente de variação
DAD	Detector de arranjo de diodos
DIC	Detector por ionização de chama
DM	do inglês, <i>Doehlert Matrix</i>

DoE	do inglês, <i>Design of Experiments</i>
ELL	Extração Líquido-Líquido
EM	Espectrometria de massas
EMAR	Espectrometria de massas de alta resolução
<i>ESI</i>	do inglês, <i>Electrospray</i>
FE	Fase estacionária
FM	Fase Móvel
<i>FWHM</i>	do inglês, <i>Full width at half maximum</i>
<i>HCD</i>	célula de colisão, do inglês, <i>Higher-energy Collisional Dissociation</i>
ICP-MS	Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado
ICP-OES	Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado
<i>IT</i>	do inglês, <i>Maximum Injection Time</i>
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
PI	Padrão interno
<i>PRM</i>	do inglês, <i>Parallel Reaction Monitoring</i>
SEC	Sistema endocanabinoide
SNC	Sistema Nervoso Central
<i>ToF</i>	do inglês, <i>Time-of-flight</i>
t_R	Tempo de retenção

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 CANNABIS	15
1.1.1 Histórico e Variações.....	15
1.1.2 Expansão comercial e farmacológica.....	16
1.1.3 Mecanismo de ação	18
1.1.4 Outras formulações da <i>cannabis</i>	24
1.1.5 Extratos medicinais	26
1.2 CONTROLE DE QUALIDADE DE CANNABIS	27
1.2.1 Grupos de monitoramento.....	28
1.2.2 Fitocanabinoides	30
1.2.3 Técnicas analíticas utilizadas na caracterização da <i>cannabis</i>	33
1.3 CLAE-EM.....	35
1.3.1 Espectrometria de Massas.....	39
1.4 PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS.....	44
1.4.1 <i>Screening</i>	45
1.4.2 <i>Modelagem</i>	46
1.4.3 DoE para <i>cannabis</i>	48
2. OBJETIVO	48
2.1 OBJETIVO GERAL	48
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	48
3. EQUIPAMENTOS, PADRÕES E REAGENTES	49
3.1 PADRÕES E REAGENTES	49
3.2 EQUIPAMENTOS	49
3.2.1 Geral	49
3.2.2 CLUE-EMAR/EM.....	50
4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS E MÉTODOS	51
4.1 OTIMIZAÇÃO DA FONTE DE IONIZAÇÃO	51

4.2 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO	53
4.3 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO ANALÍTICO	56
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1 CROMATOGRAFIA E ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	57
5.2 OTIMIZAÇÃO DA FONTE DE IONIZAÇÃO	66
5.3 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO	69
5.3.1 Preparo de amostra.....	69
5.3.2 <i>Screening</i>	70
5.3.3 <i>Modelagem</i>	72
5.3.4 Avaliação do desempenho analítico	76
6. CONCLUSÃO	79
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

1. INTRODUÇÃO

1.1 CANNABIS

1.1.1 Histórico e Variações

Ao longo da história da vida humana, a busca pelo potencial único das plantas, principalmente no ramo medicinal, tem sido explorada. Evidências que datam de mais de 60 mil anos mostram a sua segurança, efetividade e baixo risco de efeitos adversos, o que impulsiona a utilização de recursos naturais para uso medicinal frente a medicamentos sintéticos (FORDJOUR et al., 2023).

Neste âmbito, a *Cannabis sativa* L. é uma planta pertencente à família *Cannabaceae*, com características altamente complexas, polimórficas e variáveis, conhecida desde os primórdios (ALIFERIS; BERNARD-PERRON, 2020; FORDJOUR et al., 2023). Sua origem é incerta, porém evidências são favoráveis a regiões temperadas da Ásia, mais especificamente do sul do Cáspio, Sibéria, China ou Himalaia (FORDJOUR et al., 2023). A *cannabis* é uma planta amplamente difundida mundo afora e que pode ser encontrada em ambientes variados, seja em diferentes habitats, altitudes, solos e condições climáticas (ALIFERIS; BERNARD-PERRON, 2020; FORDJOUR et al., 2023). Além disso, sendo utilizada por diversos grupos a mais de 5000 anos, é a fonte de fibra e alimento provinda de planta mais antiga (FORDJOUR et al., 2023).

O termo “maconha” é comumente utilizado para se referir a *cannabis*, e junto dele vem um grande estigma associado a seu efeito psicoativo, o qual é verdadeiro apenas para porção da planta contendo altos níveis de Δ 9-Tetrahydrocannabinol (Δ 9-THC). Em contrapartida, quando a espécie vegetal apresenta baixos níveis de Δ 9-THC e altos níveis de canabidiol (CBD), sendo esse segundo uma substância sem efeitos psicoativos, recebe a classificação de “cânhamo”. Esta espécie é historicamente referida ao uso da *cannabis* como fonte de fibra e para produção de diversos produtos (CARVALHO et al., 2020; NIE; HENION; RYONA, 2019).

Os tipos botânicos de *cannabis* diferem entre si pelo tipo de habitat em que crescem, sua composição química e altura da planta (BONINI et al., 2018; FORDJOUR et al., 2023). Existem três principais espécies de *cannabis* (i.e., *sativa*, *indica* e *ruderalis*) e quatro subespécies que se diferem em características morfológicas e químicas, tais como forma da fruta e teor de Δ 9-THC. A subespécie *sativa* var. *sativa*

apresenta baixo teor de $\Delta 9$ -THC; a *sativa* var. *spontanea*, baixo teor de $\Delta 9$ -THC; a *indica* var. *indica*, alto teor de $\Delta 9$ -THC e a *indica* var. *kafiristanica*, alto teor de $\Delta 9$ -THC (ALIFERIS; BERNARD-PERRON, 2020; FORDJOUR et al., 2023). Ambas as variantes da subespécie *sativa* são vastamente cultivadas na América do Norte, Europa e Ásia e mostram um baixo potencial intoxicante quando comparadas a outras variantes. Em contrapartida, as variantes da subespécie *indica* possuem um alto potencial intoxicante e são encontradas substancialmente no continente asiático (FORDJOUR et al., 2023). Na América Latina e no Brasil há uma predominância no cultivo da espécie *sativa*, uma vez que ela é a mais comum mundo afora.

1.1.2 Expansão comercial e farmacológica

Apesar de não refletir seus efeitos como um todo, a *cannabis* é classificada como um “narcótico” principalmente em contextos populares, e algumas vezes legalmente também, e isso se dá principalmente devido à presença do seu princípio ativo psicoativo $\Delta 9$ -THC. Além disso, a *cannabis* e os opioides são legalmente agrupados, porém são farmacologicamente distintos. Nesse contexto, a *cannabis* vem sendo criminalizada desde a Segunda Guerra Mundial pelo seu extenso uso de propósito recreacional, o que levou a privação de pesquisas na área na maior parte do Século XX (FORDJOUR et al., 2023). Entretanto, com o isolamento do $\Delta 9$ -THC em 1964 (GAONI; MECHOULAM, 1964) e sua síntese total no ano seguinte (MECHOULAM; GAONI, 1965), o interesse em pesquisa e desenvolvimento em áreas relacionadas à *cannabis* se encontra em expansão (Figura 1) (ALIFERIS; BERNARD-PERRON, 2020).

Figura 1. Pesquisa bibliográfica dos avanços da pesquisa em *cannabis* após o isolamento do Δ 9-THC na base de dados *scopus*.



Na pesquisa bibliográfica representada na Figura 1, foi utilizada apenas a palavra-chave “*cannabis*” no período de 1900 até 2023. A busca resultou em um total de 68.017 documentos, porém com apenas 199 até o ano de 1963. O aumento substancial em pesquisas na área ocorreu após a elucidação da estrutura do Δ 9-THC em 1964.

No entanto, antes das ondas modernas de criminalização da *cannabis*, seus efeitos farmacológicos já haviam sido explorados há mais de 4000 anos, tanto para fins recreacionais quanto religiosos. Seu potencial medicinal é extensamente descrito, apesar de ter menos de 100 anos da elucidação estrutural dos seus constituintes. Mesmo com o longo histórico do seu uso em humanos e animais, com os avanços em pesquisas e com a busca de novas aplicações, o uso da *cannabis* é proibido em diversos países, incluindo o Brasil, causando dificuldades para o desenvolvimento de pesquisas na área (NIE; HENION; RYONA, 2019).

Apesar da sua proibição, as descobertas dos seus usos terapêuticos fazem com que o mercado da *cannabis* no Brasil apresente um cenário com muito potencial de crescimento e desenvolvimento. Atualmente, pacientes que necessitam, com prescrição médica, de produtos à base de *cannabis* para tratamento podem obter de três formas: em farmácias, por meio de associações ou por importação (BRITO

SIQUEIRA, DE et al., 2023). A importação de extratos medicinais de *cannabis* é regulamentada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e é autorizada desde 2015 através da RDC N°17/2015 (BRASIL, 2015). Quando a ANVISA liberou o registro do medicamento Mevatyl® em 2017, indicado para controle da espasticidade na esclerose múltipla e constituído por extrato hidroalcoólico de *Cannabis sativa L.* contendo 27 mg/mL de Δ 9-THC e 25 mg/mL de CBD, foi dito como o início da comercialização de medicamentos contendo canabinoides no Brasil (BRITO SIQUEIRA, DE et al., 2023; CARVALHO, Virgínia M. et al., 2020).

Em 2019, no Brasil, foi publicada a RDC N°327/2019 pela ANVISA, que estabelece requisitos para comercialização, prescrição, dispensação, monitoramento e fiscalização dos produtos de *cannabis*, cuja prescrição é rigidamente restrita a profissionais registrados no Conselho Federal de Medicina (CFM). A resolução afirma que os produtos de *cannabis* devem possuir majoritariamente CBD e não mais que 0,2% de Δ 9-THC, salvo os casos em que eventualmente contenham quantidades superiores a 0,2% de Δ 9-THC devem ser destinados exclusivamente para cuidados paliativos (BRITO SIQUEIRA, DE et al., 2023; BRASIL, 2019).

Apesar da liberação pelo órgão regulador, os produtos importados são de alto custo e não são de fácil acesso pela maior parte da população que o necessita. A solução que pacientes e associações não-governamentais encontraram foi buscar na justiça a liberação para o cultivo de *Cannabis sativa L.*, seguido da produção de seu extrato medicinal. Atualmente, alguns pacientes possuem *Habeas corpus* como medida protetiva para poder cultivar e garantir seu medicamento e algumas associações possuem medidas legais para cultivarem, produzirem e fornecerem extratos de *cannabis* para centenas de pacientes que precisem do medicamento a menor custo (CARVALHO, Virgínia Martins et al., 2022).

1.1.3 Mecanismo de ação

A *cannabis* é uma planta de uso extremamente versátil. As flores e folhas, por exemplo, apresentam um aroma específico e o extrato da planta apresenta uma vasta variedade de flavonoides, terpenos e de outras substâncias benéficas que atuam como inseticidas, fungicidas e agentes terapêuticos. A flor, as folhas, o óleo e o tricoma da planta, por sua vez, se mostraram ser antioxidantes, antimicrobianos, citotóxicos, estimulantes ao apetite, antipiréticos e anti-hipertensivos (FORDJOUR et al., 2023).

Um fenômeno que atrai grande interesse de pesquisas é o fato de que metabólitos não psicoativos da *cannabis* (e.g., terpenos) podem agir de maneira sinérgica com os canabinoides. Tal fenômeno contribui para o que se chama de “efeito *entourage*” de extratos medicinais de *cannabis*, gerando implicações para seu uso clínico (ALIFERIS; BERNARD-PERRON, 2020; WALSH; NELSON; MAHMOUD, 2003).

O “efeito *entourage*” é o responsável pela observação de que extratos brutos de *cannabis*, que contêm uma variedade de substâncias em sua composição, exibem uma eficácia terapêutica superior quando comparados à forma isolada de uma substância específica. Esse aumento na atividade biológica ocorre devido às interações sinérgicas de canabinoides com outros canabinoides ou de terpenos com outros terpenos (efeito intra-*entourage*), e também de canabinoides com terpenos (efeito inter-*entourage*). A interação sinérgica é caracterizada por combinações de substâncias cujos efeitos combinados superam a simples soma dos efeitos individuais de cada uma (KOLTAI; NAMDAR, 2020).

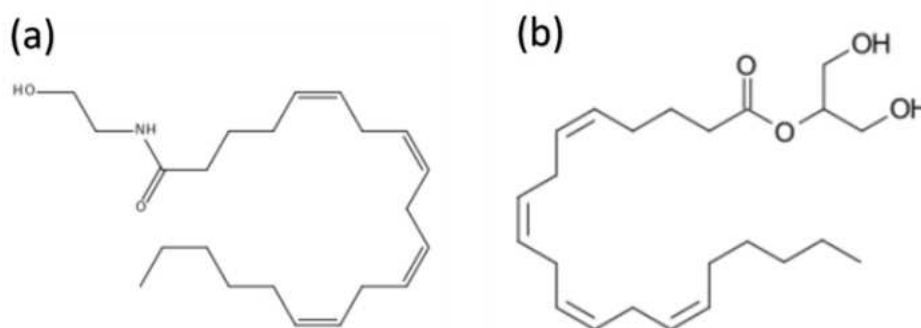
1.1.3.1 Sistema Endocanabinoide

Durantes os anos 80 e 90, os estudos baseados no isolamento de canabinoides, entendimento de suas estruturas e estereoquímica, sua farmacologia e seus efeitos fisiológicos permitiram a identificação de receptores canabinoides específicos (CB's) e de canabinoides endógenos (RIBEIRO, 2014). Em meados dos anos 90, foi descoberto o Sistema Endocanabinoide (SEC) a partir da identificação de receptores de membrana específicos para o Δ^9 -THC (BRITO SIQUEIRA, DE et al., 2023; MAROON; BOST, 2018). As principais funções do SEC estão associadas à regulação dos sistemas nervoso e imunológico, os quais desempenham papéis em diversos processos fisiológicos (e.g., memória, sono, apetite, aprendizado e liberação hormonal), abrangendo desde o metabolismo de lipídios e apetite até a neuroproteção e neurogênese (BRITO SIQUEIRA, DE et al., 2023).

O SEC é composto por um conjunto de lipídios neuromoduladores e seus receptores, os quais desempenham um papel em diversas condições fisiológicas e patológicas. Os principais endocanabinoides são a anandamida (AEA) e o 2-araquidonoil-glicerol (2-AG) (Figura 2), que são ligantes de ácidos graxos biologicamente ativos, e os principais receptores são do tipo acoplados a proteínas G, o CB1 e o CB2 (AGHAZADEH TABRIZI et al., 2016).

Do ponto de vista farmacológico, AEA e 2-AG atuam como agonistas dos receptores canabinoides, com a AEA atuando como um agonista parcial de CB1 e CB2, e o 2-AG como um agonista pleno desses receptores, principalmente de CB1 (AGHAZADEH TABRIZI et al., 2016). Diversos tipos de agonistas para os receptores canabinoides podem ser classificados de acordo com dois fatores: potência de interação com o receptor canabinoide, que determina a dose efetiva do fármaco, e a eficácia (RIBEIRO, 2014).

Figura 2. Estruturas dos principais endocanabinoides a) anandamida (AEA) e b) 2-araquidonoil-glicerol (2-AG). Adaptada de (RIBEIRO, 2014).



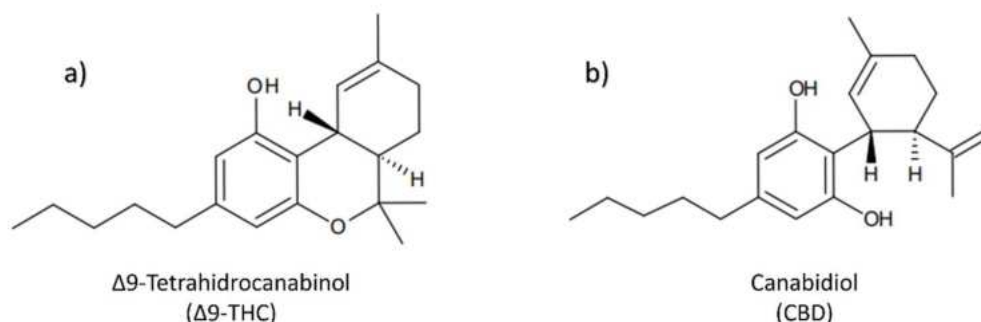
O cérebro humano possui elevados níveis de receptores canabinoides, cerca de 10x mais que os receptores opióides. Eles estão localizados no cérebro dos mamíferos e por todo o Sistema Nervoso Central (SNC) e periférico, incluindo os tecidos associados ao sistema imunológico. Além disso, CB1 e CB2 também podem coexistir em diversas concentrações nos mesmos locais (BONINI et al., 2018; MAROON; BOST, 2018). Os CB1 são um dos mais abundantes receptores de canabinoides acoplados a proteína G em cérebro de mamíferos (ALIFERIS; BERNARD-PERRON, 2020). Eles são altamente expressos no SNC e, principalmente, em diferentes áreas do cérebro que estão relacionadas ao controle motor, funções cognitivas, regiões envolvidas no humor, processamento da dor, respostas emocionais, dentre outros (AGHAZADEH TABRIZI et al., 2016; BONINI et al., 2018; MAROON; BOST, 2018). Também foram localizados receptores CB1, em menor grau, em regiões periféricas como tecido adiposo e fígado (ALIFERIS; BERNARD-PERRON, 2020; BONINI et al., 2018).

Ao contrário dos receptores CB1, os receptores CB2 não são amplamente expressos no SNC. No entanto, eles ainda podem ser encontrados no cérebro, embora em proporções muito menores em comparação com os receptores CB1 (ALIFERIS; BERNARD-PERRON, 2020; BONINI et al., 2018; MAROON; BOST, 2018). Além de compartilhar o SNC com os receptores CB1, os receptores CB2 estão amplamente distribuídos nas células do sistema imunológico. Esses receptores CB2 fazem parte de um sistema protetor geral, contribuindo para a regulação das respostas imunes e inflamatórias. O fato de os receptores CB2 estarem presentes nos componentes do sistema imunológico permite que eles sejam um possível alvo para o tratamento de estados inflamatórios (AGHAZADEH TABRIZI et al., 2016; ALIFERIS; BERNARD-PERRON, 2020).

As disparidades entre os receptores CB1 e CB2 sugerem a existência de substâncias terapêuticas seletivas que atuariam exclusivamente sobre um ou outro receptor, ativando-o ou bloqueando-o. No entanto, as diferenças entre eles são pequenas, o que permite que a maioria dos canabinoides interajam com ambos os receptores (RIBEIRO, 2014). Com os avanços em pesquisas nas últimas décadas, uma série de canabinoides capazes de modular os receptores CB1, CB2 e o metabolismo dos endocanabinoides, AEA e 2-AG, foram identificados (BONINI et al., 2018).

Inicialmente, acreditava-se que os canabinoides endógenos possuíam estruturas similares ao Δ^9 -THC (Figura 3a), o que poderia levar a uma explicação como a de interação “chave-fechadura” que ativaria o sistema de mensagem celular, porém estudos evidenciaram a diferença estrutural entre o Δ^9 -THC e a AEA. Quando comparada com o Δ^9 -THC, a AEA apresenta uma afinidade de quatro a vinte vezes menor pelo receptor canabinoide CB1 e é mais rapidamente metabolizada por hidrólise pelas amidases (RIBEIRO, 2014).

Figura 3. Estruturas químicas dos isômeros a) Δ^9 -THC e b) CBD.



Os endocanabinoides, além de se ligarem aos receptores CBs, têm a capacidade de interagir com outros receptores. Essa capacidade de interação permite uma variedade de ações biológicas e farmacológicas. Como resultado, os endocanabinoides não apenas regulam a atividade dos receptores CBs, mas também controlam a homeostase celular por meio de interações coordenadas e precisas com diferentes locais de receptores. Os receptores canabinoides também podem ser diretamente ativados por ligantes exógenos, como o Δ^9 -THC, um dos principais constituintes da *cannabis* (AGHAZADEH TABRIZI et al., 2016).

Os fitocanabinoides e os canabinoides endógenos atuam como mensageiros retrógrados, fornecendo inibição de *feedback* tanto da transmissão excitatória quanto inibitória no cérebro, por meio da ativação dos receptores CB1 pré-sinápticos. Algumas dessas substâncias foram identificadas como atuando de forma única nos receptores CB1 e CB2 separadamente e simultaneamente, e/ou para inibir ou ativar as funções dos receptores (MAROON; BOST, 2018).

Os receptores CB1 e CB2 estão negativamente acoplados à adenilato ciclase, exercem um efeito inibitório na produção de adenosina monofosfato cíclico (cAMP) e modulam a via da quinase ativada por mitógeno (MAPK). Além disso, os receptores CB1 inibem os canais de cálcio N- e P/Q-tipo pré-sinápticos, ativam os canais de potássio para dentro e reduzem a excitabilidade neuronal e a liberação de neurotransmissores (AGHAZADEH TABRIZI et al., 2016). Esse efeito, por exemplo, levou ao estudo de fitocanabinoides para o tratamento de epilepsia, uma vez que o

Δ 9-THC pode diminuir o efeito das convulsões por ser um agonista do CB1 e agir diretamente no cérebro (BRITO SIQUEIRA, DE et al., 2023; MAROON; BOST, 2018).

Muitos dos efeitos psicoativos associados ao Δ 9-THC podem ser atribuídos à ativação do receptor CB1 que é encontrado em abundância no cérebro, e essa interação é responsável pelo sentimento de euforia atribuído ao uso da *cannabis* (APPENDINO; CHIANESE; TAGLIALATELA-SCAFATI, 2011; MAROON; BOST, 2018). A interação do Δ 9-THC com o receptor CB2 está associada aos seus efeitos na função imunológica, uma vez que esse receptor é predominantemente encontrado nas células do sistema imunológico (MAROON; BOST, 2018).

A interação do CBD com os receptores CB2 é mais complexa, mas assim como o Δ 9-THC, acredita-se que ele reduza a resposta inflamatória. O CBD pode afetar a neuroinflamação por meio de várias vias, incluindo a ação com o receptor CB2. Tanto o CBD quanto o Δ 9-THC modulam a atividade dos receptores acoplados à proteína G associados ao SEC. O CBD pode funcionar como um agonista parcial e antagonizar o Δ 9-THC, o que pode contrariar em certa medida os efeitos psicoativos do Δ 9-THC em doses mais altas (MAROON; BOST, 2018). O Δ 9-THC apresenta maior afinidade a ambos os receptores, enquanto CBD e Δ 9-tetrahidrocanabivarina (Δ 9-THCV) atuam como agonistas inversos do CB1 (APPENDINO; CHIANESE; TAGLIALATELA-SCAFATI, 2011).

Os canabinoides, sendo o primeiro grupo identificado de metabólitos potentes da *cannabis*, possuem propriedades medicinais atribuídas à sua interferência com os receptores de canabinoides acoplados à proteína G (GPCRs) CB1 e CB2 do SEC. Embora os receptores CB2 não sejam amplamente expressos no SNC, eles ainda podem ser encontrados no cérebro, embora em proporções muito menores em comparação com os receptores CB1. Os canabinoides interagem com neurotransmissores, como dopamina, glutamato, serotonina e ácido gama-aminobutírico, e isso, juntamente com a expressão de receptores de canabinoides no sistema nervoso, sugere que a *cannabis* pode ter grande potencial médico (ALIFERIS; BERNARD-PERRON, 2020; BONINI et al., 2018). Na Tabela 1 estão exemplificados alguns quadros clínicos em que os fitocanabinoides já se mostram eficazes.

Tabela 1. Alguns quadros clínicos em que os fitocannabinodes atuam e os possíveis receptores envolvidos. Adaptado de (BONINI et al., 2018).

Quadro clínico	Fitocanabinoide	Receptores envolvidos
<i>Dor</i>	Δ^9 -THC, CBD	CB1, CB2 e outros.
<i>Esclerose múltipla</i>	Δ^9 -THC, CBD	CB1 e CB2.
<i>Anorexia</i>	Δ^9 -THC, CBG	CB1 e CB2.
<i>Náusea e vômito</i>	Δ^9 -THC	CB1 e CB2.
<i>Colite</i>	CBD, CBC, CBG, Δ^9 -THCA	CB2
<i>Distúrbio do sono</i>	Δ^9 -THC, CBD	CB1 e CB2.
<i>Síndrome de Tourette</i>	Δ^9 -THC, CBD	CB1 e CB2.
<i>Ansiedade</i>	CBD	CB2.
<i>Epilepsia</i>	Δ^9 -THC, CBD, Δ^9 -THCV	CB1 e CB2.
<i>Esquizofrenia</i>	CBD	CB2 e receptores de dopamina e serotonina.
<i>Doença de Alzheimer</i>	Δ^9 -THC, CBD	CB1, CB2 e outros.
<i>Doença de Parkinson</i>	Δ^9 -THC, CBD, Δ^9 -THCV	CB1 e CB2.

1.1.4 Outras formulações da *cannabis*

Embora a indústria da *cannabis* ainda esteja no seu início, já é uma área que movimenta milhões de dólares por ano globalmente, com uma previsão de movimentar US\$ 197 bilhões até 2028 na indústria global (NIE; HENION; RYONA, 2019; MATOS, 2023). Como resultado, há um interesse crescente de investimento por empresas, se mostrando ser um mercado lucrativo (NIE; HENION; RYONA, 2019).

Além disso, com a recente legalização da *cannabis* medicinal em muitos países em adição com as importantes propriedades das substâncias presentes na planta, se faz cada vez mais necessária a intensificação da pesquisa e desenvolvimento na área. A *cannabis*, devido a sua versatilidade e, principalmente, bioatividade dos seus metabólitos, representa uma fonte incalculável para o desenvolvimento para novas

aplicações em diversas áreas como: cosméticos, alimentos, medicina, e muitos outros (ALIFERIS; BERNARD-PERRON, 2020).

Já existem no mercado atual produtos derivados de diversas partes da *cannabis*. As fibras de cânhamo, por exemplo, são utilizadas em tecidos, fios e fibras, papel, carpetes, artigos de decoração, materiais de construção e isolamento, peças de automóveis e compósitos (JOHNSON, 2017). As folhas e flores de *cannabis*, por sua vez, possuem um aroma distinto e o extrato inclui uma variedade de flavonoides, terpenos e outros compostos benéficos que podem atuar como eficientes inseticidas, fungicidas e agentes terapêuticos (FORDJOUR et al., 2023).

No ramo de alimentos e bebidas, algumas marcas de vinhos nos Estados Unidos já os produzem com infusão de CBD ou de cânhamo (NIE; HENION; RYONA, 2019). No que se refere a utilização da planta como um todo, tradicionalmente, utilizavam-se as sementes para fazer óleo, enquanto as folhas eram a segunda parte mais consumida da planta, as quais eram usadas como farinha, temperos e até adicionadas diretamente na comida. Atualmente, as sementes de *cannabis* ainda são utilizadas na indústria de alimentos e podem ser encontradas nas mais variadas formas, como chocolates, leite, farinha, molho, entre outros. Neste mercado, nota-se o uso majoritário das sementes, mas outras partes da planta como brotos, flores e folhas também são consumidos crus em pratos e bebidas (FORDJOUR et al., 2023).

Na indústria de cosméticos também é observada uma crescente utilização da *cannabis* devido aos seus inúmeros benefícios. Já foi reportado seu uso em produtos de cuidados com a pele e cabelos. A semente é a parte da planta que é frequentemente usada, principalmente para cuidados com os cabelos, devido ao seu alto conteúdo de óleo, esse que pode ser usado em uma variedade de tratamentos capilares, além de poder ser adicionado em shampoos e condicionadores (FORDJOUR et al., 2023).

O óleo ainda apresenta altas concentrações de clorofila, que possui propriedade antibacteriana além de ajudar na cicatrização, o tornando também uma ótima opção para tratamento de problemas de pele, como acne e úlceras. Ele é facilmente absorvido na pele sem causar obstrução dos poros, além dos diversos outros benefícios, o fazendo ser uma boa escolha em formulações de protetores solares e loções (FORDJOUR et al., 2023).

Além das suas diversas aplicações nos mais diversos segmentos, a *cannabis* vem atraindo grande interesse na área da medicina devido ao potencial terapêutico das suas substâncias. Muitos estudos já foram e vem sendo conduzidos para a avaliação do seu uso no tratamento de diversos quadros clínicos (BRITO SIQUEIRA, DE et al., 2023; FORDJOUR et al., 2023).

1.1.5 Extratos medicinais

Já se conhece o uso medicinal da *cannabis* na Índia há muitos anos, porém, quando chegou à América e Europa no século XIX ficaram conhecidas apenas suas propriedades narcóticas e estimulantes. Com a descoberta do Δ^9 -THC, SEC, os receptores, o sistema de enzimas e seus efeitos fisiológicos foi possível impulsionar as pesquisas sobre o uso medicinal da *cannabis*. Apesar de todo estigma ainda associado a ela, diversos estudos corroboram com a evidente eficácia da *cannabis* para o tratamento de uma variedade de doenças e condições clínicas (ALIFERIS; BERNARD-PERRON, 2020; BRITO SIQUEIRA, DE et al., 2023; FORDJOUR et al., 2023; NIE; HENION; RYONA, 2019).

Os extratos medicinais oleosos de *cannabis* são obtidos a partir das flores fêmeas da planta *Cannabis sativa* L. por meio de um processo de extração sólido-líquido, que pode ser realizado utilizando diferentes métodos, como hidrodestilação, extração por arraste de vapor, maceração, Soxhlet, entre outros (CARVALHO, Virgínia M. et al., 2020). Devido à natureza lipofílica dos canabinoides, que possuem maior afinidade por solventes menos polares, ao final do processo de extração, eles são dissolvidos em uma matriz oleosa conhecida como "veículo" (CASIRAGHI et al., 2022). Nos produtos importados de *cannabis*, o veículo mais comum é o triglicerídeo de cadeia média, enquanto em preparações artesanais, a resina de *cannabis* geralmente é dissolvida em óleos de oliva, coco ou girassol (CARVALHO, Virgínia M. et al., 2020).

Os extratos das flores de *cannabis* possuem atividade antioxidante e possuem propriedades antienvhecimento e "promotoras de saúde", assim são utilizados para tratar uma variedade de distúrbios crônicos e metabólicos, como glaucoma, dor, depressão, esclerose múltipla, náuseas e vômitos relacionados a pacientes com câncer e AIDS, dentre outros (ALIFERIS; BERNARD-PERRON, 2020; BRITO SIQUEIRA, DE et al., 2023; FORDJOUR et al., 2023).

Apesar dos potenciais benefícios terapêuticos da *cannabis*, a pesquisa sobre seu uso ainda é limitada devido a restrições no acesso à quantidade, qualidade e tipo de produtos de *cannabis*. Além disso, barreiras regulatórias em diferentes países também limitam as pesquisas relacionadas ao uso terapêutico da *cannabis* e seus efeitos na saúde humana (BRITO SIQUEIRA, DE et al., 2023).

1.2 CONTROLE DE QUALIDADE DE CANNABIS

A *cannabis* é largamente utilizada globalmente, com mais de 4% da população mundial com idade entre 15 e 64 anos (aproximadamente 209 milhões de pessoas) usando *cannabis* em 2020, um aumento de 23% em relação a 170 milhões em 2010 (FORDJOUR et al., 2023). Atualmente, mais de 47 países cultivam cânhamo para fins de pesquisa e/ou comerciais, e aproximadamente 25 mil produtos baseados em cânhamo existem no mercado global. Neste contexto, os países possuem diferentes modelos regulatórios para legalizar o cânhamo: 36 países já adotaram medidas práticas e, em outros 20, estes modelos estão em desenvolvimento (ARYAL et al., 2024).

O mercado de *cannabis* no Brasil movimenta cerca de R\$ 130 milhões por ano e a expectativa é que, após a regulamentação médica, industrial e recreacional, o setor gere R\$ 26,1 bilhões para a economia do país e crie mais de 328 mil empregos formais e informais em 4 anos. O mercado continua aquecido, com quase 100 solicitações de patente relacionadas a *cannabis* e seus fitocanabinoides no Brasil, sendo que 5% delas foram enviadas para aprovação pela ANVISA (BRITO SIQUEIRA, DE et al., 2023).

Conforme se expande a busca pelo seu máximo aproveitamento terapêutico e os avanços judiciais, a indústria de *cannabis* enfrenta um desafio relacionado ao desenvolvimento de medicamentos: a produção de extratos padronizados que atendam às normas estabelecidas pelas agências reguladoras correspondentes. As práticas agrícolas, condições de crescimento da planta e processos de extração desempenham papéis chave na consistência do conteúdo dos extratos (ALIFERIS; BERNARD-PERRON, 2020).

No Brasil, atualmente, os extratos de *cannabis* utilizados no tratamento de epilepsias refratárias e outros quadros patológicos são provenientes principalmente de importação, onde são registrados como suplementos alimentares, além de


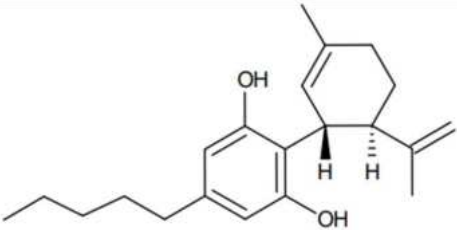
produtos nacionais obtidos no mercado ilícito ou elaborados artesanalmente. O desenvolvimento e padronização para avaliação de risco dos produtos de *cannabis*, bem como seu controle de qualidade, e a pesquisa sobre a planta e seus constituintes bioativos se fazem extremamente necessários (ALIFERIS; BERNARD-PERRON, 2020; CARVALHO, Virgínia M. et al., 2020).

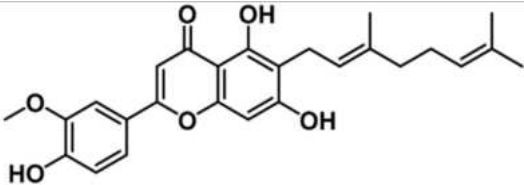
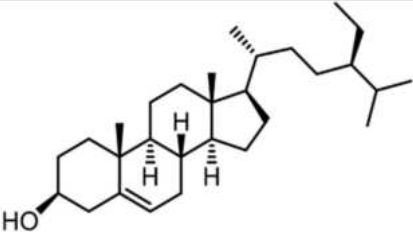
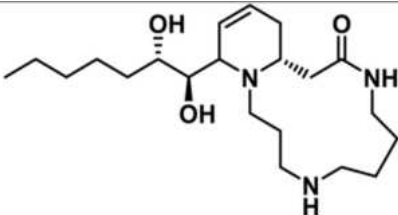
1.2.1 Grupos de monitoramento

A *Cannabis sativa* L. é uma planta anual que pode atingir 5 m de altura, possui uma variedade de tricomas glandulares e não glandulares em suas flores onde, majoritariamente nas plantas fêmeas, são produzidas as substâncias de interesse. 566 substâncias já foram identificadas e isoladas, encontradas em alta abundância nas flores e folhas da planta e constituem mais de 18 classes de diferentes metabólitos secundários encontrados na planta (ALIFERIS; BERNARD-PERRON, 2020; FORDJOUR et al., 2023).

Dentre essas substâncias identificadas, 198 são não canabinoides, 125 são canabinoides, 120 são terpenos, 34 flavonoides, 42 fenóis, alguns esteroides e alcaloides, como são mostrados em alguns exemplos na Tabela 2. As plantas fêmeas possuem um aroma característico que se deve aos terpenos por elas produzidos, como pineno, limoneno, terpineol e borneol. Essa característica, juntamente com os fitocanabinoides, desempenham o papel de defesa da planta a partir da sua interação com pragas (BONINI et al., 2018; FORDJOUR et al., 2023).

Tabela 2. Alguns exemplos das substâncias já identificadas da *cannabis*.

SUBSTÂNCIA	EXEMPLO	ESTRUTURA QUÍMICA
Terpenos	Mirceno	
Canabinoides	CBD	

Flavonoides	Canflavina A	
Esteroides	β -Sitosterol	
Alcaloides	Cannabisativina	

Os terpenos na *cannabis* são armazenados como óleos essenciais, e sua concentração pode variar devido a vários fatores genéticos e ambientais (BONINI et al., 2018; FORDJOUR et al., 2023). Mais de 50 tipos diferentes de terpenos foram identificados, incluindo linalol, ocimeno, mirceno, α -pineno, humuleno, β -cariofileno e terpinoleno. Além disso, é importante destacar que vários terpenos encontrados existem como hidrocarbonetos, que são produtos diretos de enzimas sintases de terpenos, enquanto outros mais complexos requerem ajustes por outras enzimas, como a citocromo P450. Portanto, a sua diversidade química na *cannabis* é um reflexo direto das enzimas codificadoras presentes na planta (FORDJOUR et al., 2023).

A *cannabis* tem pelo menos 26 flavonoides distintos, onde muitos deles possuem função de proteção, sendo assim sua produção é dependente de fatores ambientais tais como temperatura, umidade, precipitação e altitude. Dentre os diversos flavonóides, se destacam a orientina, vitexina, luteolina-7-O-glicosídeo e apigenina-7-O-glicosídeo, além do potente antioxidante quercetina. Os canflavinas são compostos exclusivos da *cannabis*, formados por três substâncias químicas: Canflavina A, B e C, os quais foram descobertos nas folhas e flores da planta. A Canflavina A é conhecida por ser 30 vezes mais anti-inflamatória do que a aspirina (FORDJOUR et al., 2023).

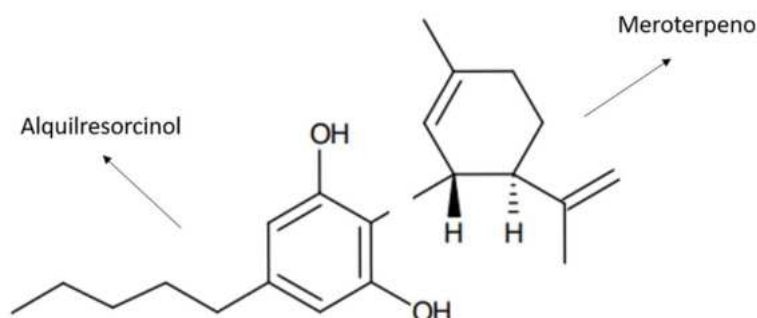
Alguns esteroides, tais como campesterol, sitosterol e estigmasterol, foram identificados nas raízes, flores, folhas e caules da planta de *cannabis*. Os alcaloides são componentes do mecanismo de defesa química utilizado pelas plantas para repelir herbívoros. Em 1971, foram isolados e nomeados quatro alcaloides distintos, denominados canabininas A-D. Esses alcaloides demonstraram possuir efeitos diuréticos, analgésicos, anticancerígenos, antipiréticos e antieméticos (FORDJOUR et al., 2023).

1.2.2 Fitocanabinoides

Apesar da planta possuir mais de 400 substâncias, os fitocanabinoides, como são chamados os canabinoides que ocorrem naturalmente na planta, se destacam (BRITO SIQUEIRA, DE et al., 2023; FORDJOUR et al., 2023). Foram identificados até o momento 120 fitocanabinoides, os quais foram classificados em 11 categorias distintas (FORDJOUR et al., 2023). Os fitocanabinoides são encontrados principalmente na *Cannabis sativa* e na *Cannabis indica* (BRITO SIQUEIRA, DE et al., 2023).

Quimicamente, os fitocanabinoides são caracterizados por meroterpenos e alquilresorcinóis em suas moléculas, como mostrado na Figura 4 (BONINI et al., 2018; BRITO SIQUEIRA, DE et al., 2023). Eles são encontrados principalmente na resina secretada pelos tricomas das plantas femininas, ao passo que as folhas masculinas de *cannabis* possuem poucos tricomas glandulares capazes de produzir quantidades reduzidas dessas substâncias. Além disso, os fitocanabinoides podem ser categorizados como neutros (sem grupo carboxila) e ácidos (com grupo carboxila) (BONINI et al., 2018).

Figura 4. Característica da estrutura química dos fitocanabinoides, exemplificada com o CBD.



Os canabinoides são produzidos naturalmente na planta por meio de biossíntese e são acumulados em sua forma ácida. No entanto, durante o processo de secagem, armazenamento ou aquecimento, eles podem sofrer descarboxilação e se converter em suas formas neutras correspondentes, por meio de reações catalíticas não enzimáticas, como mostrado na Figura 5 (ALIFERIS; BERNARD-PERRON, 2020; BONINI et al., 2018; FORDJOUR et al., 2023).

Um resumo da biossíntese é mostrado na Figura 6, em que a alquilação do ácido olivetólico com geranil-pirofosfato por uma preniltransferase produz o ácido canabigerólico (CBGA). Pela ação de enzimas sintases de canabinoides, o CBGA gera o ácido canabidiólico (CBDA), o ácido canabícromênico (CBCA) e o ácido Δ -9-tetrahidrocanabinólico (Δ 9-THCA). A partir da descarboxilação desses precursores, são formados o Δ -9-tetrahidrocanabinol (Δ 9-THC) e seu metabólito canabinol (CBN), canabidiol (CBD), canabícromeno (CBC) e seu artefato químico canabíciclol (CBL). Por outro lado, a partir do geranil difosfato e do ácido divarínico, é formado o ácido canabigerovarínico (CBGVA). A partir do CBGVA, são sintetizados o ácido Δ -9-tetrahidrocannabivarínico (Δ 9-THCVA), o ácido canabidivarínico (CBDVA) e o ácido canabícromovarínico (CBCVA). Sua descarboxilação forma os respectivos canabinoides, Δ 9-THCV, CBNV, CBDV, CBCV e CBLV (BONINI et al., 2018).

Figura 5. Reações de descarboxilação que convertem os fitonabinoides da sua forma ácida para sua forma neutra a) Δ 9-THC b) CBD.

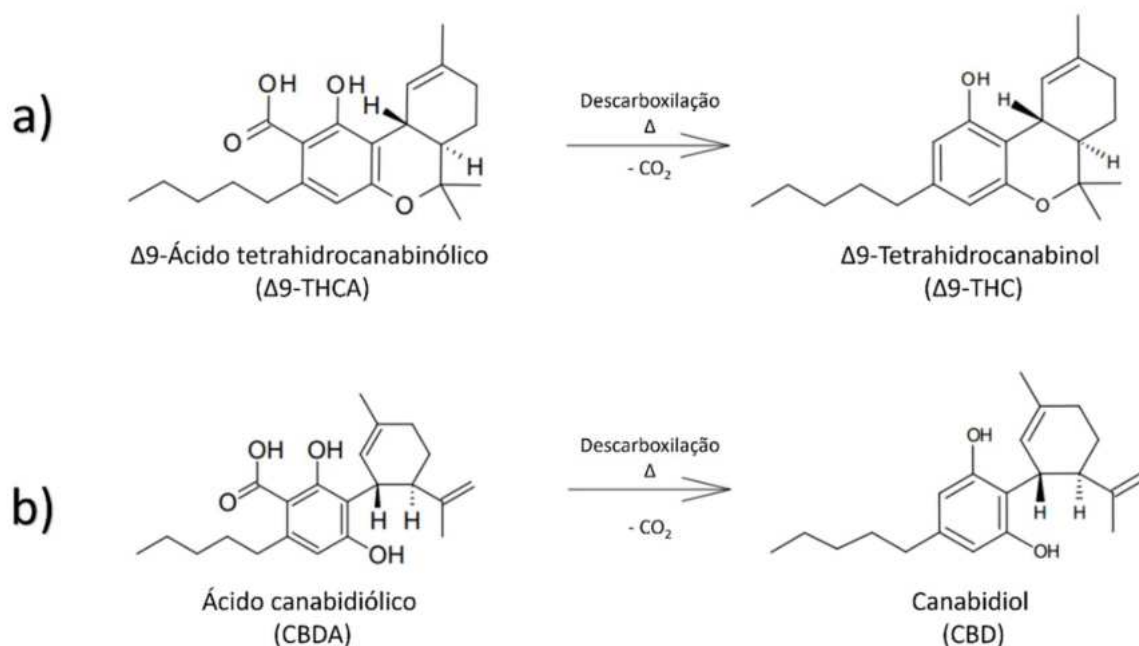
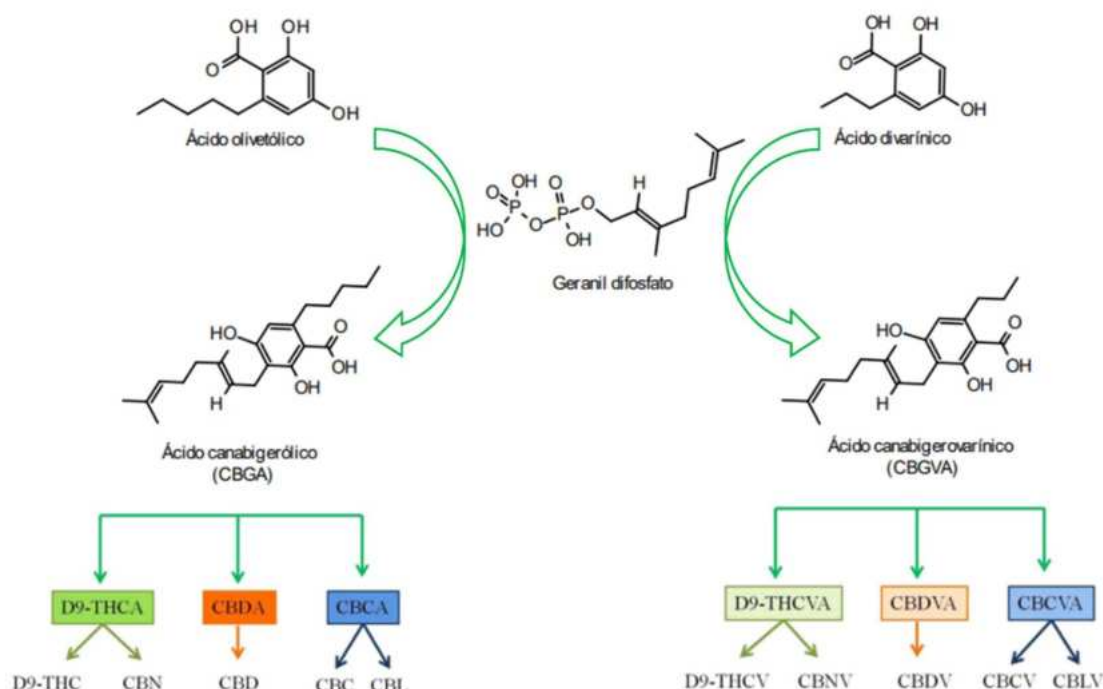


Figura 6. Biossíntese dos principais fitocanabinoides encontrados na *cannabis*.

Adaptado de (BONINI et al., 2018).



Os metabólitos $\Delta 9$ -THC e o CBD são os dois principais canabinoides encontrados na planta e os mais estudados. Eles estão presentes em várias concentrações nas diferentes variações da *cannabis*, sendo um dos parâmetros determinantes das suas propriedades farmacêuticas (ALIFERIS; BERNARD-PERRON, 2020;BRITO SIQUEIRA, DE et al., 2023).

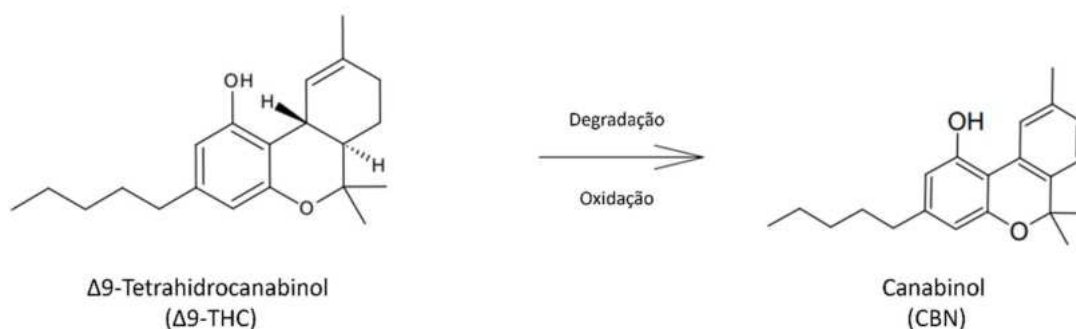
O CBD é um dos fitocanabinoides mais abundantes na planta. Apesar da sua similaridade com o $\Delta 9$ -THC, tem baixo agonismo pelos receptores canabinoides, sendo considerado modulador alostérico negativo dos receptores CB1 e CB2. Evidências atuais mostram que o CBD exerce efeitos farmacológicos por meio de alvos moleculares específicos, como receptores de adenosina, glicina, opióides, serotonina, proteína G não endocanabinoide, nicotínicos de acetilcolina e ativados por proliferadores. Além das propriedades farmacológicas já mencionadas, como anticonvulsivantes e ansiolíticas, o CBD apresenta outras propriedades benéficas (BONINI et al., 2018).

O $\Delta 9$ -THC é a substância da *cannabis* com efeitos psicoativos significativos, que incluem ansiedade, paranoia, alterações perceptuais e déficits cognitivos. Vários estereoisômeros do $\Delta 9$ -THC, produtos de degradação ou produtos gerados por

enzimas são produzidos como menores constituintes dessa classe. A degradação ocorre de maneira quase espontânea e é oxidativa. Farmacologicamente, ele é um agonista parcial de ambos os receptores canabinoides (BONINI et al., 2018).

O CBN é um produto da degradação do Δ^9 -THC (Figura 7) e sua concentração depende do tempo e condições de armazenamento. Ele é altamente estável à degradação oxidativa. Em termos farmacológicos, constatou-se que o CBN apresenta baixa afinidade pelos receptores CB1 e CB2 (BONINI et al., 2018; CARVALHO, Virgínia M. et al., 2020).

Figura 7. Reação de degradação do Δ^9 -THC à CBN.



Os extratos medicinais de *cannabis* utilizados no tratamento de diversos quadros clínicos contêm como principais princípios ativos o Δ^9 -THC e o CBD, cujas proporções variam de acordo com a indicação. A matéria-prima pode conter o produto de degradação do Δ^9 -THC, o canabinol (CBN), dependendo das condições de armazenamento, temperatura e tempo de descarboxilação. O monitoramento desses três canabinoides é uma alternativa para controlar a qualidade desses produtos (CARVALHO, Virgínia M. et al., 2020).

1.2.3 Técnicas analíticas utilizadas na caracterização da *cannabis*

O conhecimento preciso desta composição da planta é de grande importância para aplicabilidade de produtos à base da *cannabis*. A ressonância magnética nuclear (RMN) pode analisar metabólitos primários e secundários da planta e a integração dos seus vários modos de operação torna capaz a elucidação estrutural de metabólitos mais complexos, representando uma vantagem em termos de pesquisa e desenvolvimento na área da *cannabis* (ALIFERIS; BERNARD-PERRON, 2020).

Os canabinoides podem ser analisados com o uso de analisadores em conjunto tanto com a cromatografia gasosa (CG) quanto com a cromatografia líquida (CL).

Porém, alguns canabinoides, como o Δ^9 -THC, podem sofrer conversões térmicas quase que de maneira espontânea, gerando produtos de degradação indesejados, como o CBN, então a utilização da CG é restrita devido a necessidade de altas temperaturas, o que prejudica a quantificação, e de possível derivatização das substâncias para sanar o problema; tendo em vista as limitações apresentadas, analisadores em conjunto com CL são preferíveis (ALIFERIS; BERNARD-PERRON, 2020). A técnica analítica mais utilizada para determinar a composição dos constituintes da planta que suporta a indústria da *cannabis* é a Cromatografia Líquida da Alta Eficiência (CLAE) usando um detector de arranjo de diodos (DAD) ou CLAE/DAD. Essa é uma tecnologia muito aceita devido a sua facilidade de uso e economia, porém ela não é tão sensível e seletiva quanto um espectrômetro de massas (EM), o que acarreta em poder existir possíveis coeluições e interferentes. O acoplamento de EM aos métodos cromatográficos, devido a sua alta seletividade, pode reduzir substancialmente interferências e coeluições que se apresentavam problemáticas na técnica mais usualmente empregada (NIE; HENION; RYONA, 2019).

Devido à variedade de processos de extração usados para isolar os canabinoides da planta, solvente residual pode ser encontrado em amostras. Alguns deles podem ser prejudiciais à saúde (e.g., hexano), então o monitoramento de seu resíduo é importante. Essa análise geralmente é feita por *headspace* acoplada à CG com detector por ionização de chama (DIC) ou CG/DIC, mas também pode-se usar CG/EM com fonte de ionização do tipo impacto de elétrons como alternativa (NIE; HENION; RYONA, 2019).

À medida que o uso da *cannabis*, especialmente para propósitos medicinais, está em ascensão, a implementação de medidas de segurança para produtos derivados da *cannabis* está se tornando cada vez mais crucial. A crescente preocupação com os pesticidas em relação à segurança das plantas de *cannabis* e os produtos que derivam dela ressalta a necessidade de níveis extremamente baixos ou nulos dessas substâncias. Por muito tempo utilizou-se CG/DIC como técnica de quantificação, porém mais recentemente CG/EM, CG/EM/EM, CL/EM ou CL/EM/EM tem ganhado preferência (NIE; HENION; RYONA, 2019).

As plantas de *cannabis* são capazes de fazer fitorremediação, ou seja, são capazes de remover metais pesados do solo. Esse fenômeno as faz concentrar os

metais nela mesma, o que posteriormente pode residir em produtos derivados da *cannabis*. Esses metais pesados podem ser analisados por várias formas de espectrometria atômica, a qual inclui: Absorção Atômica (AA), Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (do inglês, *inductively coupled plasma optical emission spectroscopy* ICP-OES) e Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado (do inglês, *inductively coupled plasma mass spectrometry* ICP-MS). Devido à baixa sensibilidade e o fato de analisar apenas um elemento por vez, AA não é a técnica de preferência. Em contrapartida, ICP-OES e ICP-MS são capazes de fazer análises multielementar e por isso são mais utilizadas nesse ramo (NIE; HENION; RYONA, 2019).

As diversas variedades de plantas de *cannabis* apresentam perfis de terpenos distintos, os quais, quando combinados com proporções específicas de canabinoides, têm a capacidade de proporcionar diversos efeitos medicinais (NIE; HENION; RYONA, 2019). A semelhança estrutural dessa classe de substâncias dificulta sua identificação, mas usualmente para sua determinação CG/DIC se mostra adequado e, mais recentemente, CG/EM também vem sendo empregado (ALIFERIS; BERNARD-PERRON, 2020; NIE; HENION; RYONA, 2019).

O uso da técnica de EM para análises de *cannabis* e seus produtos derivados se mostra em constante crescimento, visto a necessidade de técnicas cada vez mais sensíveis e seletivas para estudos quantitativos. A Espectrometria de Massas de Alta Resolução (EMAR), como o analisador *Orbitrap*, representa um dos avanços mais recentes na área de análise, apresentando um vasto potencial em sua utilização para avaliar a qualidade dos produtos derivados da *cannabis* (ALIFERIS; BERNARD-PERRON, 2020).

1.3 CLAE-EM

A cromatografia é um método de separação de componentes de uma mistura e é um dos mais modernos métodos de análise. Em conjunto ou não com outras técnicas instrumentais, como a espectrofotometria e a espectrometria de massas, ela também é capaz de identificar e quantificar substâncias. A separação ocorre pelo contato de duas fases, uma estacionária (FE) e uma móvel (FM), e a mistura a ser separada percorre por elas e então os seus componentes ficam seletivamente retidos na FE, resultando em migrações diferenciais dessas substâncias (COLLINS, BRAGA, BONATO, 2006).

Dentre as vantagens da técnica, destacam-se a alta seletividade e a eficiência de separação (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008). Existem diversos tipos de cromatografia (e.g. cromatografia em papel, cromatografia em camada delgada, cromatografia por adsorção, entre outros), mas as mais comuns e utilizadas em análises atualmente são: cromatografia gasosa (CG) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Na Tabela 3 estão descritas as principais diferenças entre elas.

Tabela 3. Comparação entre as principais características da CG e da CLAE.

Adaptada de (COLLINS, BRAGA, BONATO, 2006).

Fator	CG	CLAE
Requisito da amostra	Amostra ou derivado volátil (termicamente estável).	Amostra solúvel da FM.
Tipo de amostra	Gases e líquidos. Massas molares de 2 a 1,200 Da.	Líquidos, iônicos ou covalentes. Massas molares de 32 a 4,000,000 Da.
Coluna	Capilar, longa.	Recheada, curta.
Fase móvel	Gás inerte.	Líquido (polaridade depende se é fase reversa ou fase normal).
Temperatura	Temperaturas elevadas (>150°C).	Pode trabalhar em temperatura ambiente.

A CLAE se mostra uma alternativa interessante especialmente por trabalhar em baixas temperaturas, permitindo a separação de compostos termicamente instáveis, além de possuir uma variedade de FE, a permitindo atuar em vários mecanismos de separação (COLLINS, BRAGA, BONATO, 2006). A CLAE pode ser de fase normal, onde a FE é polar e a FM é apolar, ou fase reversa, em que a FE é apolar e a FM é polar, sendo a última a mais utilizada.

Na CLAE a FM desempenha um papel essencial no processo de separação, pois ela não apenas carrega os componentes da amostra pelo sistema, mas participa ativamente da separação através da interação com as substâncias da mistura. Visto

isso, algumas características precisam ser observadas nela: precisam possuir alto grau de pureza; dissolver a amostra sem decompor os componentes; não dissolver nem decompor a FE; baixa viscosidade e ponto de ebulição; ser compatível com o detector; se for mistura, possuir miscibilidade completa. Além disso, precisa-se levar em consideração a força cromatográfica da FM, ou seja, sua capacidade de interagir com os componentes da amostra (COLLINS, BRAGA, BONATO, 2006).

A coluna em CLAE também é um dos principais componentes da cromatografia líquida. Os recheios mais usados atualmente são de sólido rígido ou semirrígidos à base de sílica, sendo esse último constituído de partículas porosas de poliestireno entrecruzado com divinilbenzeno. As partículas do recheio das colunas podem ser classificadas de acordo com alguns aspectos: rigidez, estrutura, forma e tamanho. Diversos grupos funcionais ou camadas poliméricas podem ser ligados à superfície da sílica, expandindo suas possibilidades de uso em várias técnicas de CLAE (COLLINS, BRAGA, BONATO, 2006).

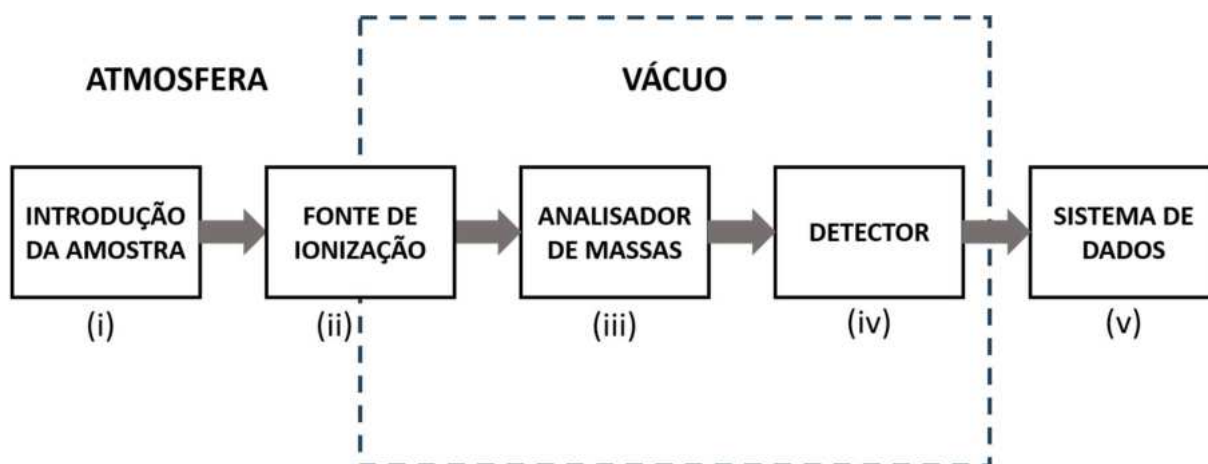
O desenvolvimento de detectores mais amplos (*e.g.*, espectrofotômetros que operam em comprimentos de onda variáveis), utilização de detectores eletroquímicos (*e.g.*, fluorescência e fluorescência induzida por *laser*), além do acoplamento com a espectrometria de massas permitiu a identificação e quantificação de uma faixa mais extensa de substâncias, inclusive em baixas concentrações, presente em amostras complexas, como matizes biológicas, solos, alimentos, entre outros (COLLINS, BRAGA, BONATO, 2006).

O acoplamento da CLAE à espectrometria de massas (EM) combina as vantagens da cromatografia com a possibilidade de elucidação estrutural, massa molar e aumento de seletividade adquirido pela EM. Para que seja possível realizar esse acoplamento, modificações químicas não controladas nos analitos e perda de amostra não podem ocorrer durante a transferência de um equipamento para o outro (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

O EM é composto por cinco componentes (

Figura 8): (i) unidade de introdução de amostra; (ii) fonte de ionização; (iii) analisador de massas; (iv) detector; (v) sistema de dados.

Figura 8. Diagrama de blocos do EM.



Na fonte de ionização as moléculas presentes na amostra passam a íons na fase gasosa (PAVIA et al., 2016). Como algumas substâncias que são separadas por CLAE são relativamente pouco voláteis e/ou sensíveis a temperatura, isso torna difícil a utilização das técnicas usuais de ionização em EM (e.g. impacto de elétrons e ionização química). Então, modos de ionização alternativos e mais brandos são necessários para que possa ser eliminada a FM e introduzir os analitos no ambiente de alto vácuo do EM. Dentre as fontes de ionização atuais utilizadas para CLAE-EM destacam-se: *electrospray* (ESI), ionização química à pressão atmosférica e, mais recentemente, fotoionização à pressão atmosférica (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

Os íons são acelerados por um campo elétrico e entram no analisador de massas, onde eles são separados e/ou fragmentados de acordo com as suas razões massa/carga (m/z). Assim como a ionização tem diversas formas, também existem diferentes analisadores de massa, alguns mais versáteis que outros (PAVIA et al., 2016). Dos analisadores mais utilizados pode-se citar o quadrupolo e *ion-trap*; e os de alta resolução por tempo de voo (do inglês, *Time-of-Flight* ToF) e *Orbitrap*. Além disso, é possível utilizar a técnica EM-EM, que consiste em dois estágios de espectrometria de massas, ou seja, dois analisadores (e.g. triplo quadrupolo, quadrupolo-ToF, quadrupolo-*Orbitrap*). Essa abordagem é comumente empregada em conjunto com a cromatografia para detectar compostos em baixas concentrações em amostras complexas. Isso permite aumentar a sensibilidade, reduzir interferências espectrais e obter mais informações estruturais das substâncias presentes (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

Após os íons estarem separados e fragmentados, eles seguem para detecção, em sua maioria, por meio de multiplicadores de elétrons. Um sinal com menos ruídos que é registrado pelo sistema de dados, onde é gerado um espectro de massas de abundância relativa vs. m/z (PAVIA et al., 2016).

1.3.1 Espectrometria de Massas

1.3.1.1 Orbitrap

O acoplamento de detectores mais abrangentes e sensíveis a cromatografia impacta diretamente na qualidade do conhecimento adquirido. A utilização de espectrômetros de massas (EM) em CL é um cenário cada vez mais comum e a utilização de analisadores de massa de alta resolução como tempo de voo (do inglês, *time-of-flight*, *ToF*) e *Orbitrap* tem sido a principal escolha pois fornecem a massa exata dos analitos (MAKAROV; SCIGELOVA, 2010).

O *Orbitrap* foi primeiramente descrito no ano 2000, o fazendo ser uma das mais novas tecnologias nessa área. Ele é um analisador de massas que atua tanto como analisador quanto detector e que permite o acoplamento com fontes contínuas de ionização (e.g., *ESI* e fonte de ionização química de pressão atmosférica). A performance analítica do *Orbitrap* pode suportar uma variedade de aplicações que vão desde análises de rotina até outras em níveis traços em matrizes mais complexas (MAKAROV; SCIGELOVA, 2010; Thermo Fisher Scientific White paper 65147).

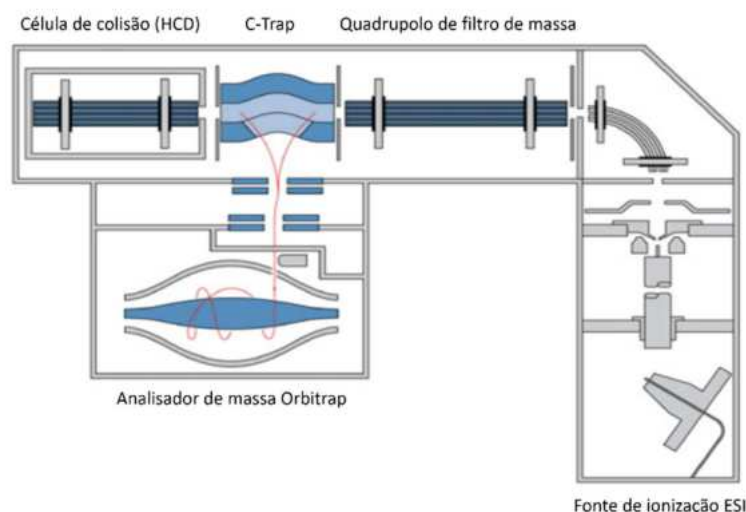
A análise e detecção pelo *Orbitrap* ocorre à medida que os íons, quando entram no espaço entre o eletrodo central e o externo que o envolve, são empurrados por um forte campo elétrico para dentro da armadilha, iniciando oscilações axiais, enquanto a rotação em torno do eletrodo central impede que os íons “caiam” sobre ele. A dependência da rotação nas energias, ângulos e posições iniciais dos íons força cada pacote de íons a se espalhar rapidamente sobre a coordenada angular, formando um anel rotativo fino. Esse anel oscila harmonicamente ao longo do eletrodo central com um período proporcional a $(m/z)^{1/2}$. A detecção desse sinal é seguida por uma transformada de Fourier para converter o sinal registrado em uma frequência e, em seguida, em um espectro m/z (MAKAROV; SCIGELOVA, 2010).

1.3.1.1.1 Modos de aquisição

Devido a sua configuração (Figura 9) e a alta sensibilidade e abrangência do analisador, há uma vasta possibilidade de experimentos de massas que podem ser

realizados: *Full MS*, *Full MS/AIF*, *Targeted-SIM*, *PRM*, *Targeted-MS²*, *Full MS/dd-MS²*, *Targeted SIM/dd-MS²*, *Full MS/AIF NL/dd-MS²*, *DIA*, *Multiplexing*, além de combinações entre eles (Thermo Fisher Scientific White paper 65147).

Figura 9. Esquema da configuração do EM híbrido quadrupolo-*Orbitrap*. Adaptado de (MAKAROV; SCIGELOVA, 2010).



Para entender os modos de aquisição segue uma rápida definição de alguns componentes do EM:

Quadrupolo: Diferentemente do seu uso convencional em outros EM's em série, ele atua como um filtro de massa para transmissão de faixa de massas amplas (e.g., 10 a 100 Da) ou estreitas (e.g., 0,4 a 2 Da) (Thermo Fisher Scientific White paper 65147).

C-Trap: É um dispositivo de armazenamento e desaceleração dos íons para então direcioná-los ao *Orbitrap* para detecção ou à célula de colisão para fragmentação (Thermo Fisher Scientific White paper 65147).

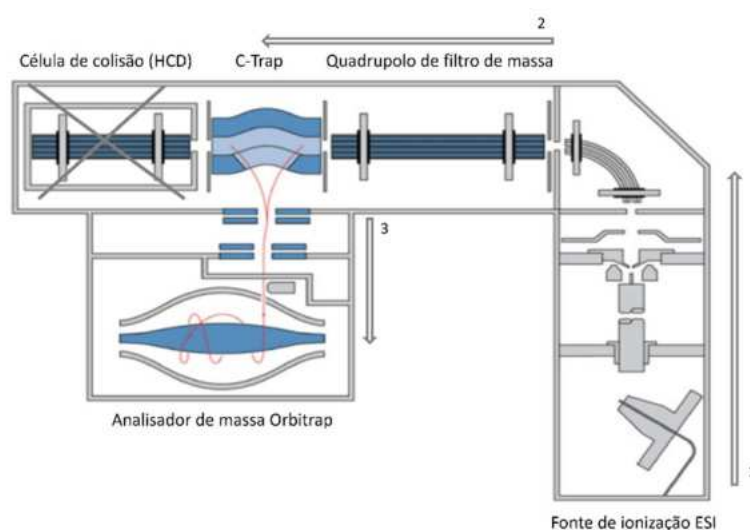
Célula de colisão de alta energia (do inglês, *Higher-energy collision dissociation cell*, *HCD*): É utilizada para fragmentar os íons que passam pelo quadrupolo de filtro de massa. Ao passo que os íons são acelerados da *C-Trap* para a HCD, ocorre a fragmentação dos íons quando colidem com o gás residual de nitrogênio (Thermo Fisher Scientific White paper 65147).

Full MS

No modo de aquisição de *Full MS* (Figura 10) não ocorre a fragmentação na *HCD* e o quadrupolo opera como um filtro de massa amplo. Essa abordagem permite

que todas as substâncias que foram ionizadas e possuam m/z dentro na faixa definida sejam detectadas, uma vez que a faixa de massa do quadrupolo pode ser ajustada a fim de garantir que tudo presente na amostra seja detectado. Todos os íons dentro da faixa de massa definida passam pelo quadrupolo, passam na *C-Trap* e já são injetados no analisador de massa. Esse é um modo de aquisição muito utilizado para análise retrospectiva (Thermo Fisher Scientific White paper 65147).

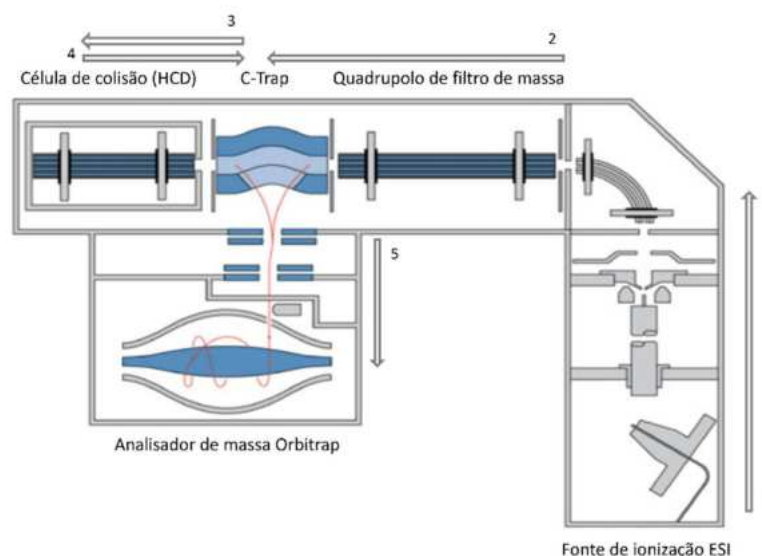
Figura 10. Esquema visual do modo de aquisição *Full MS*. Adaptado de (MAKAROV; SCIGELOVA, 2010).



Monitoramento de reações paralelas (do inglês, Parallel Reaction Monitoring, PRM)

No *PRM* (Figura 11) são feitos escaneamentos do tipo EM/EM a partir de uma lista de inclusão especificada, contendo seus analitos com suas respectivas razões m/z e energias de colisão. Nesse modo de aquisição, o quadrupolo isola os íons precursores e então, devido a quantidade de substâncias que está sendo injetada ser menor, uma faixa estreita de massa que entra na *C-Trap*, evitando que ela com fique com excesso de íons. Em seguida os íons são transmitidos à *HCD* para fragmentação, depois retornam a *C-Trap* para, por fim, serem injetados no analisador de massas. O *PRM* se assemelha ao modo de aquisição de varredura de íon produto (do inglês, *product ion scan*) nos EM do tipo triplo quadrupolo, mas apesar da semelhança o *PRM* apresenta maior seletividade e sensibilidade (Thermo Fisher Scientific White paper 65147).

Figura 11. Esquema visual do modo de aquisição *PRM*. Adaptado de (MAKAROV; SCIGELOVA, 2010).



1.3.1.2 Fonte de ionização ESI

A fonte de ionização *ESI* é um dos modos de ionização em espectrometria de massas mais comuns, principalmente quando acoplada à cromatografia líquida. Por ser uma ionização branda, ela é extremamente versátil, podendo ser aplicada em diversas áreas do conhecimento, além de ser sensível, seletiva e de rápida ionização dos analitos. Sua eficiência está diretamente ligada à sensibilidade e reprodutibilidade do método, então a otimização dos seus parâmetros instrumentais é um passo importante para o desenvolvimento de um método analítico. Além disso, é um modo de ionização especialmente útil para substâncias polares (THERMO SCIENTIFIC, 2009).

A ionização dos analitos e sua posterior introdução no espectrômetro de massas ocorre por uma série de processos: 1. A solução da amostra contendo os analitos entra na agulha da *ESI*, a qual recebe uma alta voltagem; 2. Essa agulha pulveriza a solução em uma fina névoa de gotículas que estão eletricamente carregadas em sua superfície; 3. A densidade de carga elétrica na superfície das gotículas aumenta ao passo que o solvente evapora. O gás auxiliar aquecido auxilia na evaporação do solvente na *ESI*; 4. A densidade de carga elétrica na superfície das gotículas aumenta até o ponto crítico conhecido como Limite de instabilidade de Rayleigh, em que as gotículas se dividem em gotículas menores devido a uma repulsão maior do que a tensão superficial do solvente; 5. O processo é repetido

inúmeras vezes até obter-se gotículas muito pequenas e a repulsão eletrostática ejete os íons carregados para a fase gasosa; 6. Os íons entram no ambiente de ultra alto vácuo do espectrômetro de massas através do tubo de transferência de íons, em fase gasosa, e são analisados. Para esse processo ocorrer existem um conjunto de parâmetros na fonte que trabalham juntos, e alguns deles estão listados, assim como suas funções, na Tabela 4. No *ESI* as análises podem ser realizadas tanto no modo negativo quanto no modo positivo, dependendo das propriedades do analito (THERMO SCIENTIFIC, 2009).

Alguns fatores podem afetar o processo de ionização *ESI*, como o tamanho das gotículas, a carga na sua superfície, tensão superficial do solvente, volatilidade do solvente e a força de solvatação dos íons. Dessa forma, uma alta condutividade, baixa volatilidade, forte solvatação dos íons, baixa carga superficial e gotículas grandes com alta tensão superficial impedem uma boa ionização. Em relação a solventes utilizados em CL, solventes orgânicos como metanol, acetonitrila e isopropanol apresentam um desempenho superior a água no processo de ionização, ao passo que sais em concentrações acima de 10 mM são extremamente prejudiciais (THERMO SCIENTIFIC, 2009).

Tabela 4. Descrição da função de cada variável estudada no processo de ionização *ESI*.

VARIÁVEL	DESCRIÇÃO
<i>Temperatura de aquecimento do gás auxiliar (°C)</i>	Temperatura aplicada ao gás auxiliar, gerando impacto diretamente na dessolvatação.
<i>Temperatura do capilar (°C)</i>	Temperatura aplicada ao capilar para auxiliar no processo de dessolvatação das gotículas carregadas.
<i>Voltagem do electrospray (kV)</i>	A voltagem aplicada ao capilar determinará as cargas dos íons que constituirão as gotículas no <i>spray</i> .

<i>Sheath gas (u.a.)</i>	Gás nitrogênio coaxial interno à agulha ESI que nebuliza a solução da amostra.
<i>Gás auxiliar (u.a.)</i>	Gás nitrogênio aquecido, coaxial externo à agulha ESI, que auxilia na dessolvatação da solução da amostra.
<i>S-lens (V)</i>	Voltagem aplicada ao guia de íons <i>S-lens</i> para focalização e transmissão de íons.
<i>Sweep gas (u.a.)</i>	Gás de nitrogênio que atua dentro do espectrômetro de massas para fora para redução de ruído químico.

1.4 PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS

A análise univariada foi muito utilizada até o início do século XIX. Ela consiste no teste de uma variável por vez, enquanto as outras são mantidas constantes. Entre os anos 20 e 30, Ronald A. Fisher conduzindo um estudo em agricultura foi o primeiro a utilizar Planejamento de Experimentos (do inglês, *Design of Experiments*, DoE), e a partir de então cresceu-se o interesse na área com múltiplos avanços (DURAKOVIC, 2017).

DoE é uma metodologia para conduzir e planejar experimentos visando extrair o máximo de informações com o menor número de análises. Um experimento planejado é uma ferramenta utilizada para coletar dados. Características comuns de um planejamento experimental incluem o planejamento de testes, abordagem na análise de dados, variação simultânea de fatores e uma abordagem científica (VANAJA; RANI, 2007).

Nos últimos anos cada vez mais ferramentas quimiométricas vem sendo utilizadas para a otimização multivariada de métodos analíticos. Dentre as suas principais vantagens, podem ser citados a diminuição do número de experimentos, a

redução considerável no consumo de reagentes e de tempo de trabalho e um mapeamento consolidado da metodologia.

A otimização multivariada permite a construção de um modelo matemático que possibilita estudar a significância estatística das variáveis estudadas tanto em relação ao seu comportamento individual quanto a suas interações, uma vez que elas variam simultaneamente, e também a localização de um ponto máximo de desempenho. O primeiro passo para esta otimização é o experimento de triagem (do inglês, *screening*), onde as variáveis estatisticamente significativas são identificadas e, em seguida, selecionadas para consecutivos planejamentos mais complexos, na etapa de *modelagem* (FERREIRA, S. L. C. et al., 2007).

1.4.1 Screening

Diversas vezes, em um sistema, uma gama de variáveis pode influenciar na resposta esperada, então uma etapa de triagem (do inglês, *screening*) é importante para que se possa definir as que realmente impactam significativamente no resultado desejado. Além disso, ela ajuda na melhoria do controle de qualidade de processos, uma vez que determina valores limites, máximos e mínimos, para uma variável de estudo. Na execução desta etapa a determinação das variáveis principais e, na maioria dos casos, suas interações são essenciais para entender o comportamento do sistema (TEÓFILO; FERREIRA, 2006; VANAJA; RANI, 2007).

Como planejamento de *screening* mais simples, o fatorial completo estuda as variáveis em dois níveis, de forma que o número de experimentos necessários para avaliar k variáveis é igual a 2^k (DURAKOVIC, 2017; TEÓFILO; FERREIRA, 2006). Pode-se dizer que é vantajoso utilizar esse tipo de planejamento, uma vez que ele permite a investigação da influência das variáveis e suas interações na resposta, sem que haja confusão entre os efeitos das variáveis principais e interações (CAVAZZUTI, 2013; TEÓFILO; FERREIRA, 2006). Em contrapartida, à medida que aumenta o número de variáveis observa-se um crescimento exponencial no número de experimentos a serem realizados, então pode-se inferir que o planejamento fatorial completo seria mais eficiente ao ser empregado em estudos com poucas variáveis (CAVAZZUTI, 2013; DURAKOVIC, 2017; TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

Conforme aumenta-se o número de variáveis ($k > 4$), observa-se que as interações de ordens muito elevadas são, quase sempre, não significativas e então

estimá-las seria irrelevante (TEÓFILO; FERREIRA, 2006). Devido a essa premissa, foi introduzido o planejamento fatorial fracionário, cujo fundamento consiste na execução de apenas uma fração do fatorial completo, de forma que o tamanho do desenho experimental seria reduzido à metade, um quarto, e assim por diante (CAVAZZUTI, 2013). Nesse planejamento, é possível ainda obter-se informações acerca dos efeitos das variáveis principais e de algumas interações de ordem inferior (CAVAZZUTI, 2013; DURAKOVIC, 2017).

De modo a ter mais economia em número de experimentos realizados a medida em se aumenta as variáveis pode-se utilizar ainda o planejamento Plackett-Burman. É um tipo de planejamento altamente econômico, de modo que se é possível avaliar valores de k muito elevados com uma quantidade mínima de experimentos, sendo essa sua principal vantagem frente a outros planejamentos. Devido à propriedade projetiva e ao fato de as colunas serem ortogonais, lhe garantindo uma simetria, no planejamento Plackett-Burman os efeitos principais são capazes de serem determinados separada e eficientemente das interações (CAVAZZUTI, 2013; VANAJA; RANI, 2007).

O planejamento Plackett-Burman possui resolução III, ou seja, os efeitos principais não estão confundidos com outros efeitos principais. No entanto, a desvantagem do planejamento Plackett-Burman é que o padrão de confusão das variáveis é mais complexo, porque cada efeito principal está confundido com uma interação de segunda ordem que não o envolve. Assim, a falta de ajuste é difícil de avaliar e os efeitos principais são confundidos com os efeitos das interações, ou seja, os efeitos principais são passíveis de interpretação, porém as interações não serão pois não podem ser separadas dos efeitos principais os quais elas estão confundidas (VANAJA; RANI, 2007).

1.4.2 Modelagem

Uma vez realizada a etapa de *screening* e as variáveis significativas foram selecionadas, o próximo passo é a execução da metodologia de superfície de resposta, também chamada de *modelagem* (FERREIRA, S. L. C. et al., 2007; TELFORD, 2007; TEÓFILO; FERREIRA, 2006). Essa fase consiste em prever um modelo matemático, frequentemente quadrático, que melhor represente o sistema em estudo, permitindo sua exploração e levando à otimização do mesmo (POLAT; SAYAN, 2019; TELFORD, 2007; TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

Dessa forma, otimizar envolve definir as condições ótimas em que o resultado se apresenta robusto, ou seja, permanece estável e reproduzível mesmo diante de pequenas variações nos valores nominais das variáveis experimentais estabelecidas (FERREIRA, S. L. C. et al., 2007; TEÓFILO; FERREIRA, 2006). Certos requisitos são necessários para que a *modelagem* seja eficaz na estimativa dos coeficientes de um modelo estimado, sendo os principais: fornecer estimativas precisas para todos os coeficientes com um número reduzido de experimentos e permitir a avaliação dos coeficientes e do modelo, por meio da regressão e da falta de ajuste (TEÓFILO; FERREIRA, 2006). Essa etapa pode ser realizada aplicando-se planejamentos mais complexos como matriz Doehlert (do inglês, *Doehlert matrix* DM), composto central (do inglês, *central composite designs* CCD) e planejamentos de três níveis, como o Box-Behnken (do inglês, *Box-Behnken design* BBD) (FERREIRA, S. L. C. et al., 2007).

O BBD é um tipo de planejamento de segunda ordem, rotativo ou quase rotativo, ou seja, a variância da resposta prevista em qualquer ponto é função apenas da distância do ponto central, e é baseado em planejamentos fatoriais incompletos de três níveis (CAVAZZUTI, 2013; FERREIRA, S. L. C. et al., 2007). O número de experimentos (N) necessários para execução do BBD pode ser definida como $N = 2k(k - 1) + C_0$ (C_0 é a quantidade de pontos centrais) (FERREIRA, S. L. C. et al., 2007).

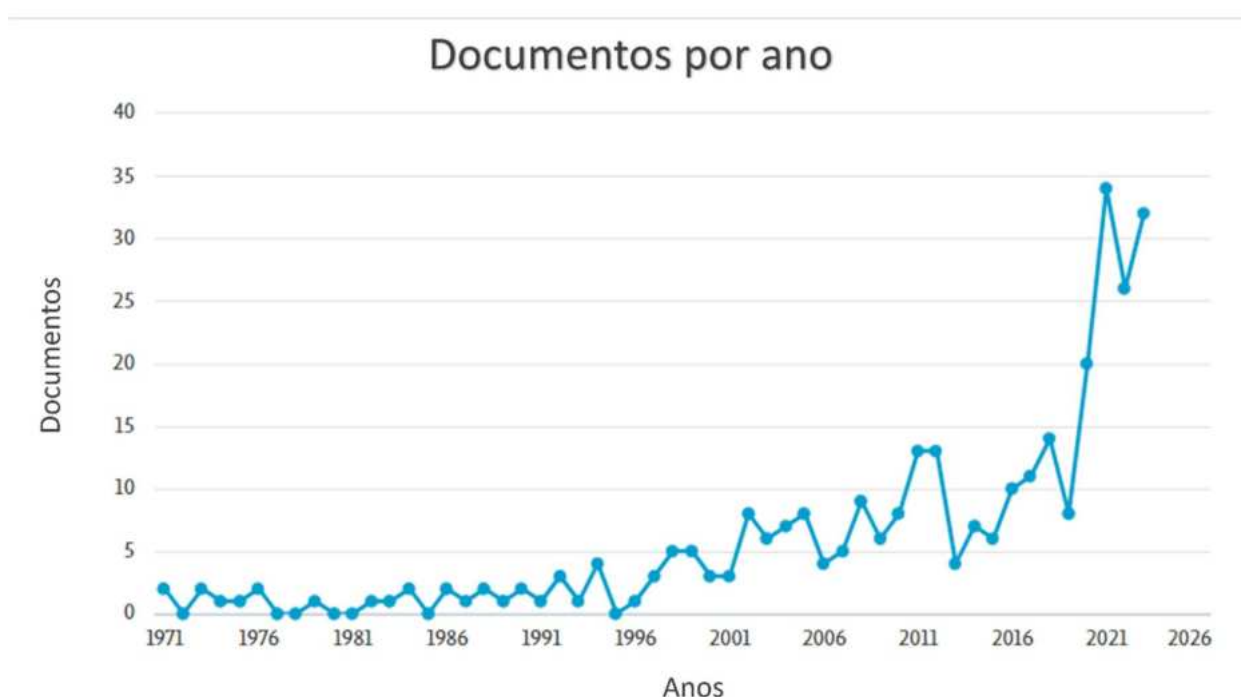
Quando comparado a outros planejamentos de *modelagem* (e.g. CCD, DM e fatorial completo à três níveis), BBD e DM se mostraram mais eficientes que CCD e fatorial completo à três níveis. Outra vantagem do BBD é o fato de não existir uma combinação em que as variáveis estejam todas em seus níveis mais altos ou mais baixos ao mesmo tempo, o que é vantajoso uma vez que evita a ocorrência de experimentos em condições extremas, gerando resultados não satisfatórios (FERREIRA, S. L. C. et al., 2007).

O BBD é uma ferramenta extremamente útil e eficiente para a etapa de *modelagem* pois permite a estimativa de uma modelo quadrático para determinar os fatores, utiliza um número mínimo de experimentos, detecta falta de ajuste e o planejamento mais desejado para análises de valores que se encontram nos pontos médios da superfície e no seu centro (FERREIRA, S. L. C. et al., 2007; POLAT; SAYAN, 2019).

1.4.3 DoE para *cannabis*

A utilização da estratégia de planejamento de experimentos para estudo de *cannabis* se mostra como algo inovador, visto que é uma ferramenta relativamente recente em um contexto geral. Pesquisas bibliográficas corroboram com a premissa anterior (Figura 12), uma vez que se encontram apenas 309 documentos na área quando se pesquisa “*design of experiments*” AND “*cannabis*”, na base de dados *scopus*, em um período de 50 anos.

Figura 12. Pesquisa bibliográfica para o uso de DoE em estudos referente a *cannabis* na base de dado *scopus*.



2. OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um método de quantificação de $\Delta 9$ -Tetrahydrocannabinol ($\Delta 9$ -THC), Canabidiol (CBD) e Canabinol (CBN) por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas de alta resolução (CLUE-EMAR/EM) em extratos oleosos medicinais de *cannabis*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

→ Explorar ferramentas de planejamento de experimentos na otimização das condições instrumentais da técnica analítica e do protocolo de preparo de amostra;

- Avaliar o desempenho de dois candidatos a padrão interno para os analitos alvo;
- Avaliar o desempenho analítico a partir da repetibilidade, recuperação e sensibilidade do presente método desenvolvido, de acordo com a RDC 166/17 da ANVISA.

3. EQUIPAMENTOS, PADRÕES E REAGENTES

3.1 PADRÕES E REAGENTES

Para o preparo das amostras, Metanol e n-Hexano, ambos grau GC, foram adquiridos de Tedia (Fairfield, OH, EUA). Para a análise por CLUE-EMAR/EM, foi utilizado Metanol grau HPLC adquirido da BIOGRADE (Goiás, Brasil), ácido fórmico da SUPELCO e formiato de amônio da SPECTRUM (New Brunswick, Canada). Água ultrapura (18.2 MΩcm) foi fornecida pelo sistema de purificação Millipore Milli-Q (Billerica, MA, EUA).

Os padrões de Canabidiol (CBD), Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) e Canabinol (CBN) foram adquiridos da Absolute Standards Inc. (Connecticut, EUA) nas concentrações de 1000,5 µg/mL, 102,1 µg/mL e 1001,0 µg/mL, respectivamente. Δ^9 -Tetrahydrocannabinol-carboxi-D₉ (Δ^9 -THC-COOH-D₉) e Δ^9 -Tetrahydrocannabinol-carboxi-D₃ (Δ^9 -THC-COOH-D₃) foram adquiridos de Cerilliant Corporation (Texas, EUA) nas concentrações de 101,2 µg/mL e 100,0 µg/mL, respectivamente.

3.2 EQUIPAMENTOS

3.2.1 Geral

Agitador orbital (Thermo Fisher Scientific – MaxQ 2000)

Banho ultrassônico (Elmasonic – S60H)

Centrífuga (Thermo Fisher Scientific – Heraeus Multifuge X3R Centrifuge)

Evaporador com fluxo de N₂ (Biotage - TurboVap®LV)

Vórtex (Thermo Fisher Scientific – LP vortex mixer)

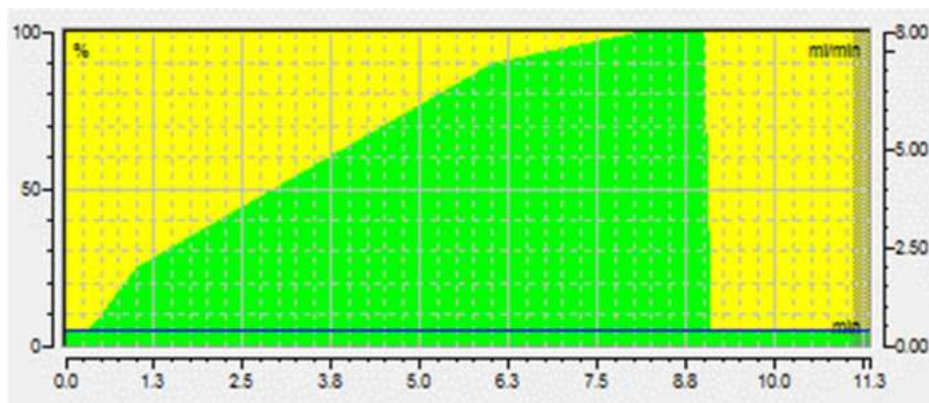
Micropipetas (Eppendorf research plus)

Freezer -30°C (Thermo Fisher Scientific)

3.2.2 CLUE-EMAR/EM

Um sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemanha) acoplado a um espectrômetro de massas híbrido quadrupolo-*Orbitrap* (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemanha) com uma fonte de ionização *electrospray* (do inglês, *Electrospray Ionization, ESI*) foi empregado. Para a separação cromatográfica, uma coluna de fase reversa ACE UltraCore 2.5 SuperC18 (50 mm x 2,1 mm; 2,5 µm) foi utilizada, a qual foi mantida em um forno a 50 °C a um fluxo constante de 400 µL/min, com um volume de injeção de 5 µL de amostra. O gradiente da corrida cromatográfica começou em 5% de fase móvel B, aumentando para 10% em 0,5 minutos, em seguida para 25% em 1 minuto e 90% em 6 minutos. Após alcançar 100% em 8 minutos e manter a proporção até 9 minutos, a condição cromatográfica inicial foi restaurada de 9,1 a 11,1 minutos (Figura 13). A fonte de ionização ESI, operada em modo positivo, foi calibrada diariamente com uma solução do fabricante (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemanha). Os dados em varredura total (do inglês, *Full Scan*) foram adquiridos na faixa de *m/z* 80-800, com uma resolução de 70.000 à largura à meia-altura (do inglês, *full width at half maximum, FWHM*), com o Controle de Ganho Automático (do inglês, *Automatic Gain Control, AGC*) de 1x10⁶ e Tempo de Injeção máximo (do inglês, *maximum Injection Time, IT*) de 100 ms. Os dados em Monitoramento Paralelo de Reação (do inglês, *Parallel Reaction Monitoring, PRM*) foram realizados com resolução de 70.000 *FWHM*, *AGC* de 1x10⁵, *IT* de 50 ms, *Loop Count* de 2 e janela de isolamento de 1,0 *m/z*. Os analitos CBD, THC e CBN, assim como os padrões internos (PI's) Δ⁹-THC-COOH-D₉ e Δ⁹-THC-COOH-D₃, foram selecionados por uma lista de inclusão para fragmentação de massa em uma célula de colisão *Higher-energy Collisional Dissociation (HCD)* com energia de colisão normalizada (N)CE segundo a Tabela 5. Os dados foram adquiridos e processados com o software Thermo Scientific™ TraceFinder™ 4.1 software (Thermo Fisher Scientific, Austin, TX, USA), considerando ± 5 ppm de tolerância de massa.

Figura 13. Gradiente da corrida cromatográfica.

Tabela 5. Massa exata, fórmula molecular e energia aplicada à célula de colisão para os analitos CBD, $\Delta 9$ -THC, CBN, PI's $\Delta 9$ -THC-COOH-D₉ e $\Delta 9$ -THC-COOH-D₃.

Nome	Massa exata (<i>m/z</i>) [M+H] ⁺	(N)CE (%)
$\Delta 9$ -THC-COOH-D ₉	354,26252	35
$\Delta 9$ -THC-COOH-D ₃	348,22487	35
CBD	315,23185	40
$\Delta 9$ -THC	315,23185	40
CBN	311,20055	37

4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS E MÉTODOS

4.1 OTIMIZAÇÃO DA FONTE DE IONIZAÇÃO

Soluções dos padrões de CBD e CBN foram preparadas separadamente na concentração de 1 µg/mL em uma mistura 60:40 v/v de metanol com 0,1% v/v de ácido fórmico e de água ultrapura com 0,1% v/v ácido fórmico e formiato de amônio 5 mM. O mesmo procedimento foi realizado para $\Delta 9$ -THC na concentração de 0,5 µg/mL. A cada um dos *vials*, os PI's $\Delta 9$ -THC-COOH-D₃ e $\Delta 9$ -THC-COOH-D₉ foram adicionados para avaliação de suas adequações à análise. Em seguida os padrões diluídos e, FM foram levados à análise no sistema cromatográfico por CLUE-EMAR/EM (Figura 14).

Figura 14. Resumo do preparo das soluções e imagem do equipamento em que as amostras foram submetidas à análise de padrões dos analitos.



Para a otimização da fonte de ionização *ESI*, os *vials* foram injetados segundo um planejamento do tipo Plackett-Burman, onde foram estudadas 7 variáveis a 2 níveis (Tabela 6) com apenas 8 experimentos (Tabela 7). Os experimentos foram conduzidos de maneira aleatória e em triplicata.

Tabela 6. Variáveis estudadas no planejamento do tipo Plackett-Burman e seus respectivos níveis.

	Variáveis	Nível (-1)	Nível (+1)
1	Temperatura de aquecimento do gás auxiliar (°C)	250	350
2	Temperatura do capilar (°C)	250	350
3	Voltagem do <i>electrospray</i> (kV)	2,5	4,0
4	<i>Sheath Gas</i> (u.a.)	30	50
5	Gás Auxiliar (u.a.)	10	20
6	<i>S-lens</i> (V)	50	80
7	<i>Sweep gas</i> (u.a.)	0	1

Tabela 7. Matriz de experimentos do planejamento do tipo Plackett-Burman.

Matriz de experimentos							
Exp	Temperatura de aquecimento do gás auxiliar (°C)	Temperatura do capilar (°C)	Voltagem do <i>electrospray</i> (kV)	<i>Sheath</i> Gas (u.a.)	Gás Auxiliar (u.a.)	<i>S-lens</i> (V)	<i>Sweep</i> gas (u.a.)
1	350	350	4,0	30	20	50	0
2	350	350	2,5	50	10	50	1
3	350	250	4,0	30	10	80	1
4	250	350	2,5	30	20	80	1
5	350	250	2,5	50	20	80	0
6	250	250	4,0	50	20	50	1
7	250	350	4,0	50	10	80	0
8	250	250	2,5	30	10	50	0

4.2 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO

O protocolo de extração se dá a partir de uma extração líquido-líquido (ELL) seguida por uma extração assistida por ultrassom com uma mistura de metanol:hexano 9:1 v/v, conforme resumido na Figura 15.

Para a etapa de *screening*, 25 µL de uma solução contendo os analitos CBD, Δ9-THC e CBN a 1,2 µg/mL foram adicionados ao tubo seco e levados ao evaporador com fluxo de N₂ a 28°C para completa secagem do solvente. Em seguida, 100 mg de óleo de coco foram adicionados e agitados vigorosamente em vórtex para completa homogeneização, obtendo-se uma concentração de 300 ng/g dos analitos. Para a otimização do procedimento de extração, foi utilizado o planejamento do tipo Fatorial Completo para 3 variáveis a 2 níveis (Tabela 8) acrescidos de dois pontos centrais, totalizando 10 experimentos (Tabela 9). O tempo de *shaker* a 400 rpm, o tempo de ultrassom e o volume de solvente foram avaliados de acordo com os experimentos da Tabela 9. Após a extração, a mistura foi levada para refrigeração à – 30°C por 30 min, centrifugada à 4000 rpm por 20 min e, por fim, a fase orgânica foi separada e seu volume foi ajustado para 7,5 mL. Em um *vial*, adicionou-se uma alíquota de 975 µL de amostra e 25 µL de solução de 10 µg/mL de padrão interno Δ9-THC-COOH-D₉, o qual foi levado para a análise instrumental em CLUE-EMAR/EM.

Figura 15. Procedimento experimental para a otimização do método de extração.



Tabela 8. Variáveis estudadas no planejamento do tipo Fatorial Completo e seus respectivos níveis.

	Variáveis	Nível (-1)	Nível (0)	Nível (+1)
1	Tempo de shaker (min)	5	10	15
2	Tempo de ultrassom (min)	15	30	45
3	Volume de solvente de extração (mL)	2,50	5,00	7,50

Tabela 9. Matriz de experimentos do planejamento do tipo Fatorial Completo.

Matriz de Experiências			
Exp	Shaker	Ultrassom	Volume
1	5	15	2,50
2	15	15	2,50
3	5	45	2,50
4	15	45	2,50
5	5	15	7,50
6	15	15	7,50
7	5	45	7,50
8	15	45	7,50

9	10	30	5,00
10	10	30	5,00

Na etapa de *modelagem* e construção de superfície de resposta, foi utilizado o planejamento do tipo Box-Behnken para 3 variáveis a 3 níveis (Tabela 10) acrescidos de 5 pontos centrais, totalizando 17 experimentos (Tabela 11). O mesmo procedimento experimental de preparo das amostras foi realizado em relação à etapa de *screening*, com exceção de que foi utilizada uma alíquota de 937,5 µL de amostra e 62,5 µL de solução de 4 µg/mL de padrão interno Δ^9 -THC-COOH-D₉.

Tabela 10. Variáveis estudadas no planejamento do tipo Box-Behnken e seus respectivos níveis.

	Variáveis	Nível (-1)	Nível (0)	Nível (+1)
1	Tempo de <i>shaker</i> (min)	10	15	20
2	Tempo de ultrassom (min)	15	30	45
3	Volume de solvente de extração (mL)	5,00	7,50	10,0

Tabela 11. Matriz de experimentos do planejamento do tipo Box-Behnken.

Matriz de experiências			
Exp	Shaker	Ultrassom	Volume
1	10	15	7,50
2	20	15	7,50
3	10	45	7,50
4	20	45	7,50
5	10	30	5,00
6	20	30	5,00
7	10	30	10,0
8	20	30	10,0
9	15	15	5,00
10	15	45	5,00
11	15	15	10,0
12	15	45	10,0

13	15	30	7,50
14	15	30	7,50
15	15	30	7,50
16	15	30	7,50
17	15	30	7,50

4.3 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO ANALÍTICO

O desempenho analítico foi avaliado pela análise da repetibilidade, recuperação e sensibilidade do método desenvolvido. Para precisão, definida como a proximidade entre os resultados obtidos por meio do método analítico, a repetibilidade foi estimada através da preparação, por um único analista, de triplicatas de amostras reais fortificadas com CBD, Δ 9-THC e CBN em três níveis de concentração (i.e., baixo, médio e alto), definidos a partir da linearidade e do intervalo de trabalho (BRASIL, 2017).

Amostras reais com concentrações desconhecidas apenas de CBD foram fortificadas nos níveis baixo, médio e alto nas concentrações de 50 ng/g, 100 ng/g e 150 ng/g, respectivamente, de uma solução contendo um mix de CBD, Δ 9-THC e CBD a 0,1 ng/ μ L. A curva analítica contendo seis pontos nas concentrações de 25 ng/g, 50 ng/g, 75 ng/g, 100 ng/g, 125 ng/g e 150 ng/g foi preparada em óleo de coco e foi fortificada com a mesma solução do mix de CBD, Δ 9-THC e CBD a 0,1 ng/ μ L.

As amostras e a curva analítica foram preparadas conforme o método analítico descrito no item 4.2 com as condições otimizadas descritas no item 5.3.3.

A exatidão, definida como o grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo e um valor aceito como verdadeiro, foi avaliada por meio de ensaios de recuperação de CBD, Δ 9-THC e CBN em triplicatas de amostras reais em três níveis de concentração (ou seja, baixo, médio e alto), definidos a partir da linearidade e do intervalo de trabalho. A concentração obtida foi comparada com o valor teórico de concentração.

As amostras e curvas utilizadas foram as mesmas da precisão.

Para avaliar a sensibilidade, foram estabelecidos Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ) para cada analito. O LD, representando a menor concentração

do analito em uma amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, é calculado por $3.3 \times \frac{\text{desvio padrão do intercepto}}{\text{inclinação da curva analítica}}$. Já o LQ, definido como a menor concentração do analito em uma amostra que pode ser determinado com precisão e exatidão aceitáveis, é estabelecido por $10 \times \frac{\text{desvio padrão do intercepto}}{\text{inclinação da curva analítica}}$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CROMATOGRAFIA E ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A fim de confirmar a estrutura de cada um dos analitos e de seus fragmentos, experimentos de dissociação induzida por colisão (CID) foram realizados, nos quais os íons gerados na fonte de ionização colidem com uma molécula de gás inerte em uma câmara de colisão *HCD*. Os espectros de massas obtidos para cada analito estão representados nas Figura 16, Figura 17, Figura 18, Figura 19 e Figura 20 e na Tabela 12 é apresentado um resumo para todos os analitos e PI's considerados no estudo.

Figura 16. Espectro de massas da fragmentação do Δ^9 -THC. Contém os fragmentos monitorados e energia de colisão aplicada.

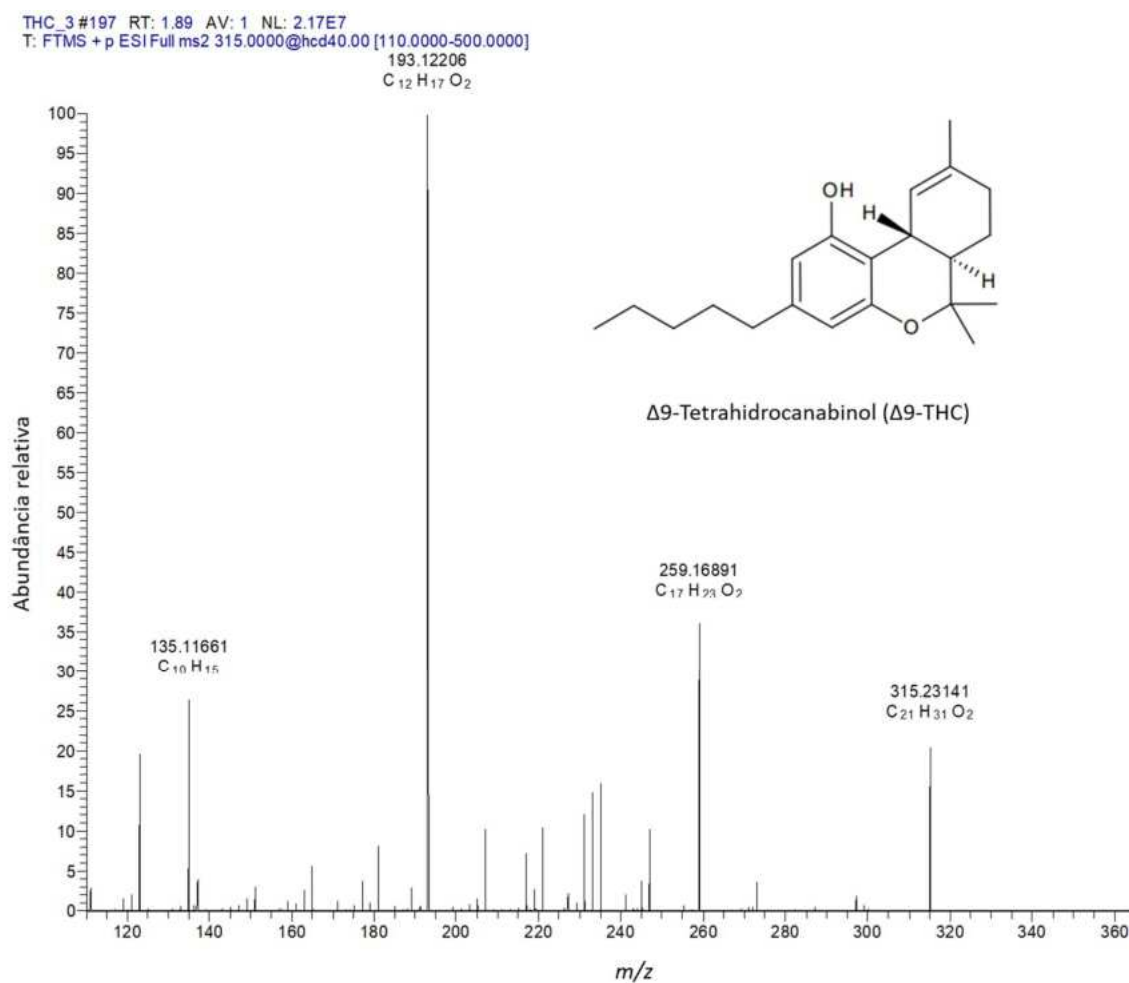


Figura 17. Espectro de massas da fragmentação do CBD. Contém os fragmentos monitorados e energia de colisão aplicada.

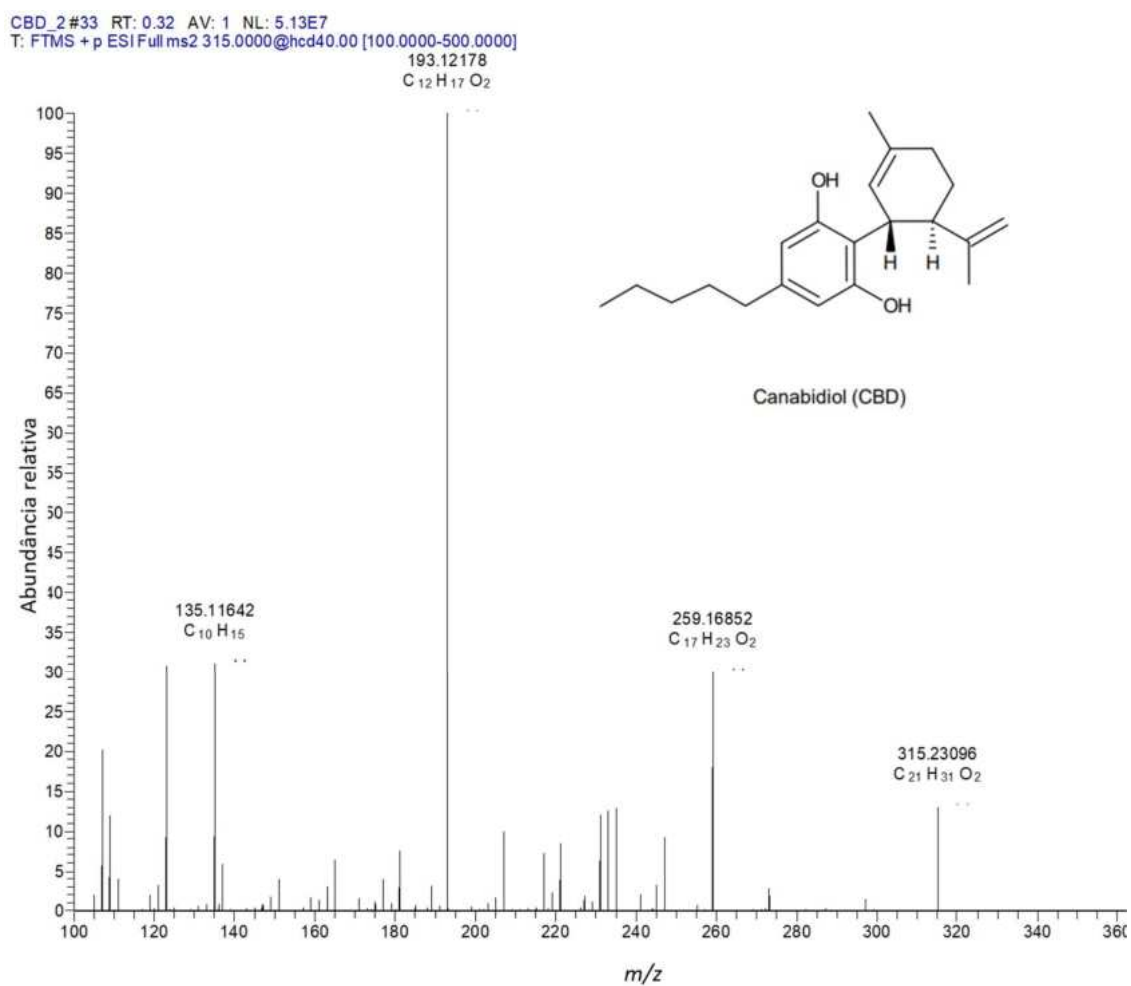


Figura 18. Espectro de massas da fragmentação do CBN. Contém os fragmentos monitorados e energia de colisão aplicada.

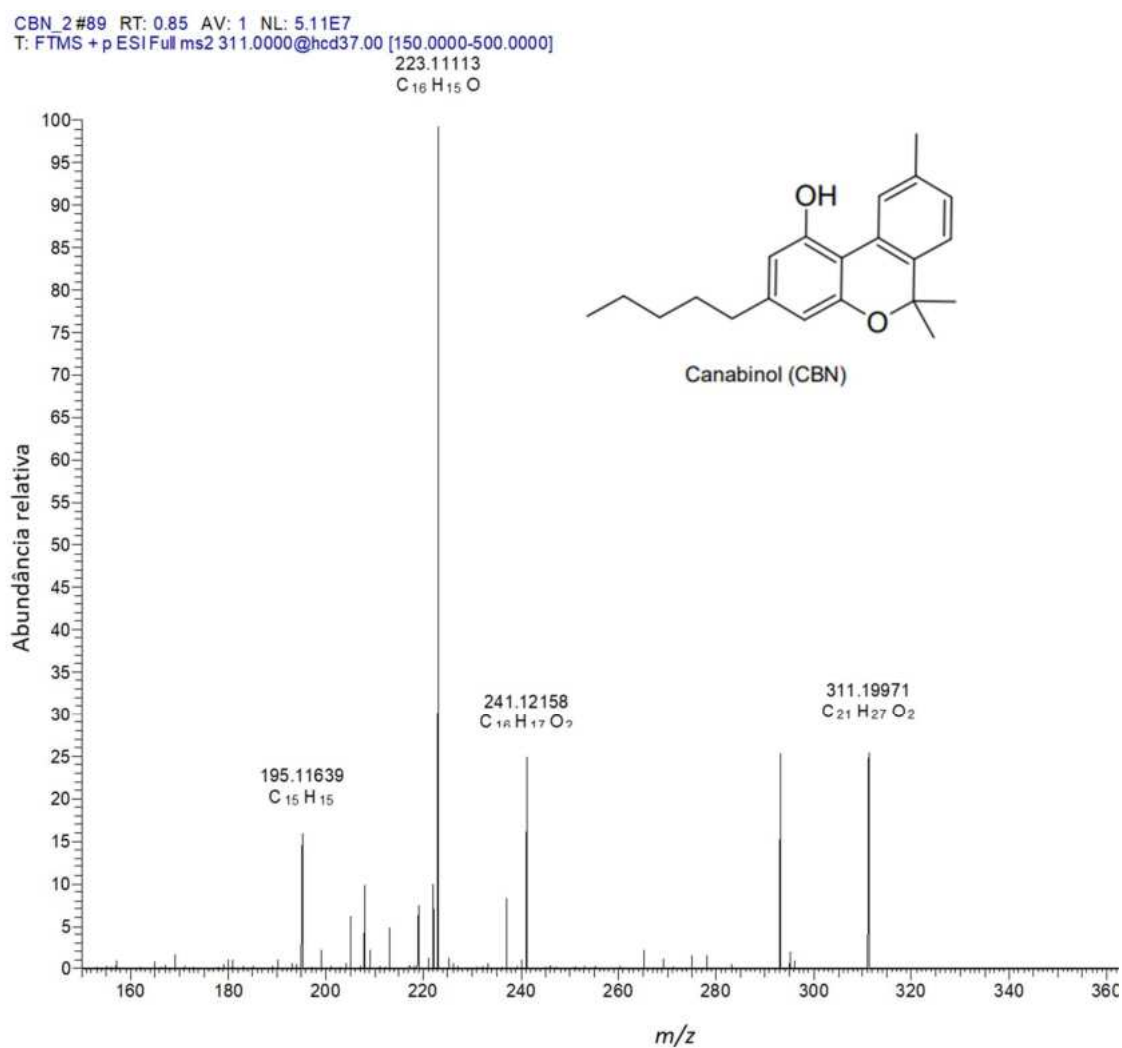


Figura 19. Espectro de massas da fragmentação do Δ^9 -THC-COOH-D₉. Contém os fragmentos monitorados e energia de colisão aplicada.

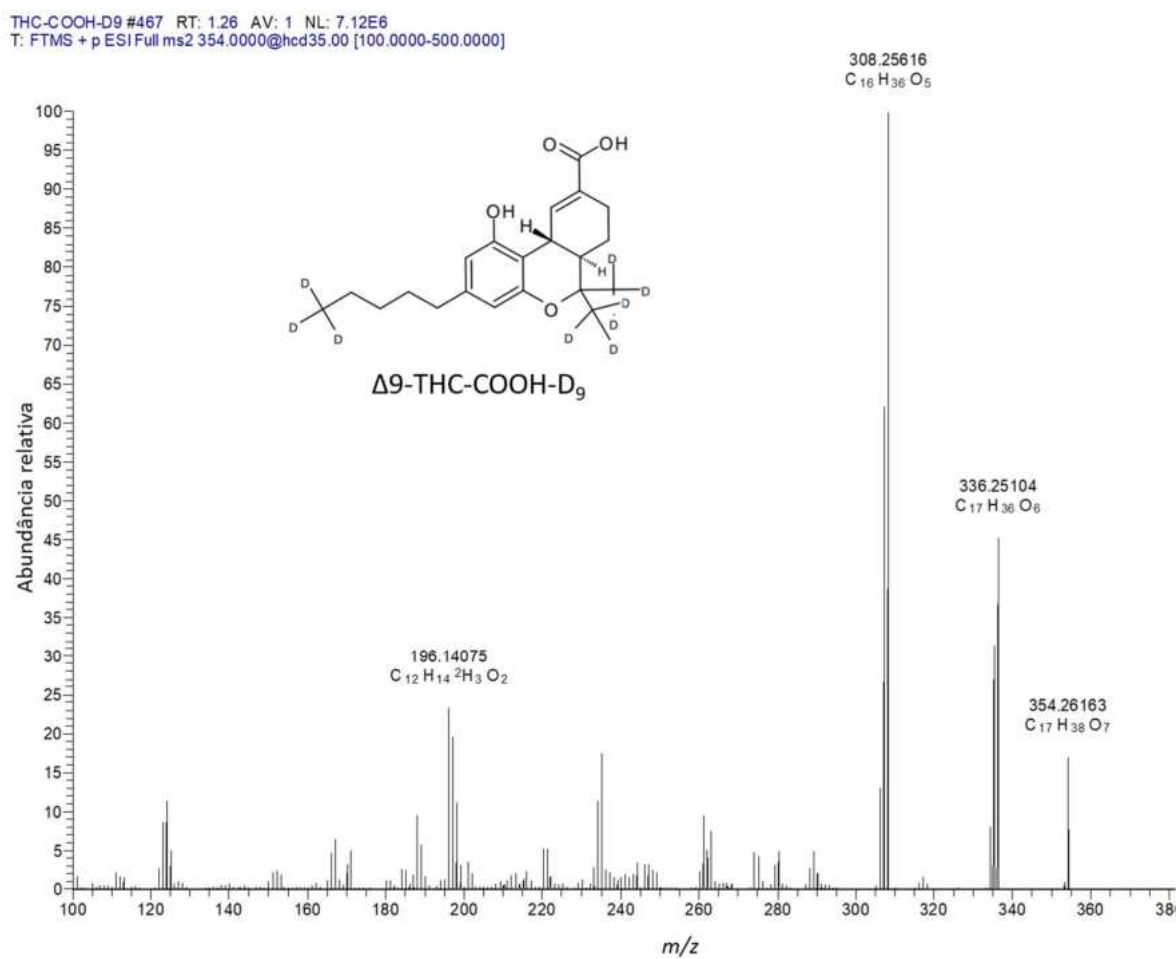


Figura 20. Espectro de massas da fragmentação do Δ^9 -THC-COOH-D₃. Contém os fragmentos monitorados e energia de colisão aplicada.

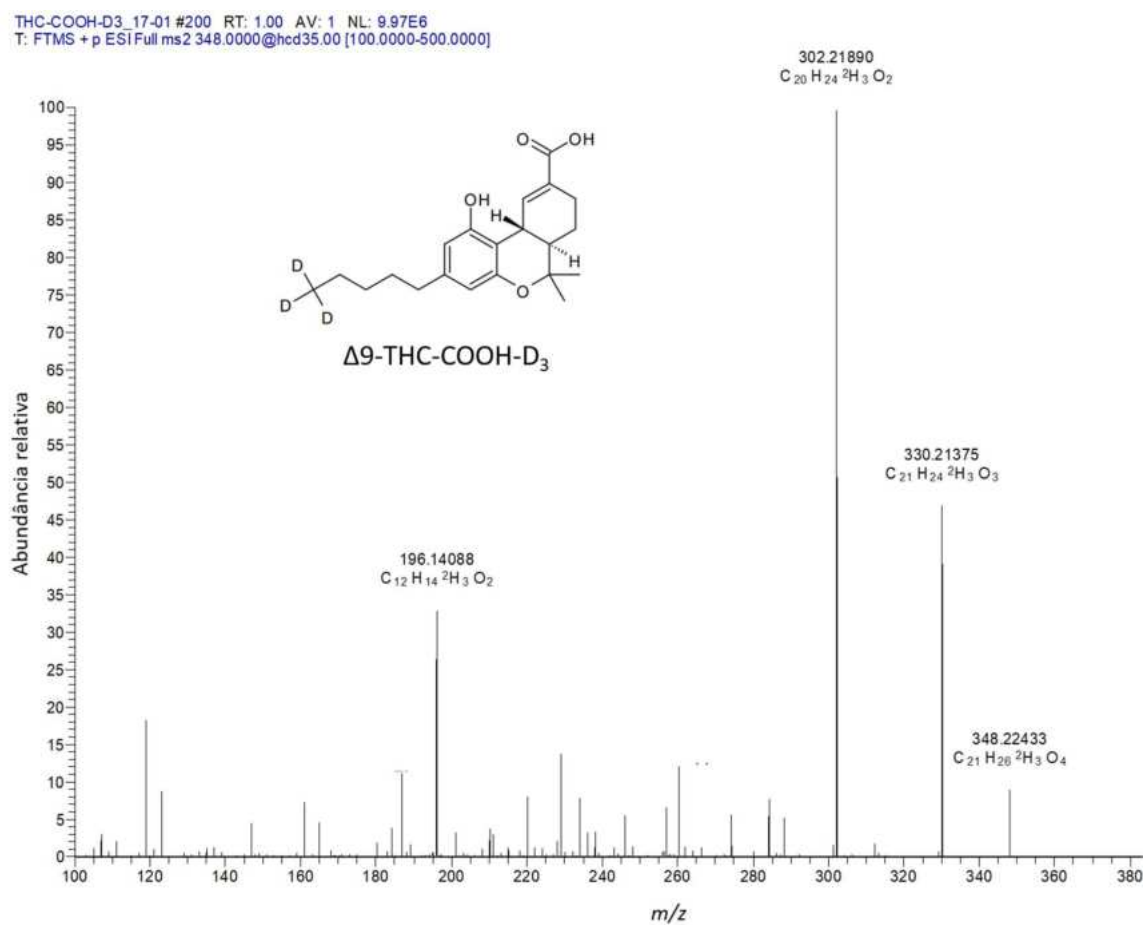


Tabela 12. Analitos monitorados, suas fórmulas moleculares, íons precursores e íons produtos, respectivos erros de massa, energias de colisão aplicadas e referências bibliográficas que suportam o resultado encontrado.

Analito	Fórmula molecular [M]	Íon precursor (m/z) [M+H] ⁺	Erro de massa (ppm)	(N)CE (%)	Íon produto (m/z) [M+H] ⁺	Erro de massa (ppm)	Referência
CBD	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	315,23185	2,85	40	193,12231 ^a	2,88	(CITTI et al., 2019; SANTOS, DOS et al., 2019)
					259,16910 ^b	2,85	(CITTI et al., 2019; SANTOS, DOS et al., 2019)
					135,11684 ^b	2,87	(CITTI et al., 2019)
Δ9-THC	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	315,23185	1,40	40	193,12231 ^a	1,38	(CITTI et al., 2019; SANTOS, DOS et al., 2019)
					259,16916 ^b	1,44	(CITTI et al., 2019; SANTOS, DOS et al., 2019)
					135,1168 ^b	1,40	(CITTI et al., 2019)
CBN	C ₂₁ H ₂₆ O ₂	311,20055	2,73	37	223,1174 ^a	2,74	(CITTI et al., 2019)
					241,12216 ^b	3,00	(CITTI et al., 2019)
					195,11682 ^b	2,22	(CITTI et al., 2019)
Δ9-THC-COOH-D₃	C ₂₁ H ₂₅ D ₃ O ₄	348,22487	1,26	35	302,21939 ^a	1,40	(BIJLSMA et al., 2011)
					196,14114 ^b	1,05	(BIJLSMA et al., 2011)
					330,21430 ^b	1,50	(BIJLSMA et al., 2011)
Δ9-THC-COOH-D₉	C ₂₁ H ₁₉ D ₉ O ₄	354,26252	1,19	35	308,25705 ^a	1,52	(HEHET et al., 2022)
					196,14114 ^b	1,99	(HEHET et al., 2022)
					336,25196 ^b	1,18	(HEHET et al., 2022)

a = íon de quantificação; b = íon de identificação

Como o Δ9-THC e o CBD são isômeros constitucionais, eles apresentam perfil de fragmentação similares. Assim, a forma de diferenciá-los na análise é a partir dos tempos de retenção distintos na cromatografia. Em modo positivo, para o CBD e o Δ9-THC (*m/z* 315,23185), a transição *m/z* 315,23185 → *m/z* 193,12231 referente a uma perda neutra de 122 Da (C₄H₁₄), que é monitorada como íon de quantificação e possui a maior intensidade, pode ser explicada pela protonação e clivagem do anel de terpeno após a quebra da ligação C-O oriunda da função éter. As perdas de 56 Da

(m/z 315,23185 \rightarrow m/z 259,16910 para CBD; e m/z 315,23185 \rightarrow m/z 259,16916 para Δ^9 -THC) e de 180 Da (m/z 315,23185 \rightarrow m/z 135,11684 para CBD; e m/z 315,23185 \rightarrow m/z 135,1168 para Δ^9 -THC), que são monitoradas como íons de identificação, podem ser explicadas pela clivagem da cadeia lateral da molécula de canabinoide, grupo C_4H_8 , e é a parte de terpenoide comumente encontrada em canabinoides quando se trabalha em modo de ionização positivo (CITTI et al., 2019; SANTOS, DOS et al., 2019).

Por outro lado, o CBN (m/z 311,20055) origina o íon de identificação de m/z 241,12216 (perda de 70 Da) devido a clivagem da cadeia alifática de 5 carbonos do íon precursor (FERRER, 2020; LELARIO et al., 2021). O íon de quantificação de m/z 223, 1174 (perda de 88 Da) resulta da perda de água do fragmento de m/z 241, 12216 (FERRER, 2020). Um segundo íon de identificação monitorado, de m/z 195, 11682 (perda de 116 Da), pode ser explicado como sendo a parte corresponde ao resorcinol (CITTI et al., 2019) ou a perda sequencial da cadeia lateral de pentil seguida de duas metilas do CBN desidratado (LELARIO et al., 2021). Devido à estabilidade do anel aromático, os fragmentos gerados pelo CBN são muito distintos em comparação aos que foram mostrados anteriormente e que apresentam o mesmo perfil, e isso ocorre porque a ligação C-C entre dois anéis de benzeno é mais forte, ou seja, mais difícil de ser rompida, do que a ligação C-C entre um anel de benzeno e a parte de terpeno (FERRER, 2020; LELARIO et al., 2021).

Em relação aos padrões internos, ainda em modo de ionização positivo, perdas de 46 Da (m/z 348, 22487 \rightarrow m/z 302, 21939), 152 Da (m/z 348, 22487 \rightarrow m/z 196, 14114) e 18 Da (m/z 348, 22487 \rightarrow m/z 330, 21430) foram monitoradas para o Δ^9 -THC-COOH- D_3 e, analogamente, para o Δ^9 -THC-COOH- D_9 as transições utilizadas foram m/z 354, 26252 \rightarrow m/z 308, 25705, m/z 354, 26252 \rightarrow m/z 196, 14114 (perda de 158 Da) e m/z 354, 26252 \rightarrow m/z 336, 25196. Para a primeira transição, para ambos os padrões, que gera os fragmentos m/z 302, 21939 e m/z 308, 25705, possivelmente é devido a perda do grupamento carboxi presente no anel de seis membros, enquanto para o íon em comum m/z 196 a possibilidade é que ocorra a perda do propeno (C_3H_6), no caso do Δ^9 -THC-COOH- D_3 , e do C_3D_6 , no caso do Δ^9 -THC-COOH- D_9 , onde em ambos acontece a abertura dos anéis de seis membros (BIJLSMA et al., 2011). Para a última transição, é provável que se refira a perda não específica de água.

Por fim, os três analitos alvos do trabalho e os PI's em avaliação foram submetidos à corrida cromatográfica descrita no item 3.2.2., a fim de identificar qualquer problema de eluição ou possível coeluição de algum deles. Na Figura 21, pode-se constatar que os analitos são eluídos em tempos de retenção (t_R) distintos. Apesar da coeluição parcial entre CBN e $\Delta 9$ -THC, isso não representa um problema, pois essas duas substâncias podem ser distinguíveis no EM devido à seletividade da técnica. No entanto, a coeluição entre $\Delta 9$ -THC e CBD não seria possível, uma vez que são isômeros e apresentam perfis de fragmentação semelhantes, sendo diferenciados apenas por meio da cromatografia. Quando analisamos os PI's $\Delta 9$ -THC-COOH-D₃ e $\Delta 9$ -THC-COOH-D₉ (Figura 22), pode-se observar que eles apresentam t_R 's próximos entre si e entre os analitos.

Figura 21. Cromatograma com os t_R 's dos 3 analitos a) CBD b) CBN e c) $\Delta 9$ -THC.

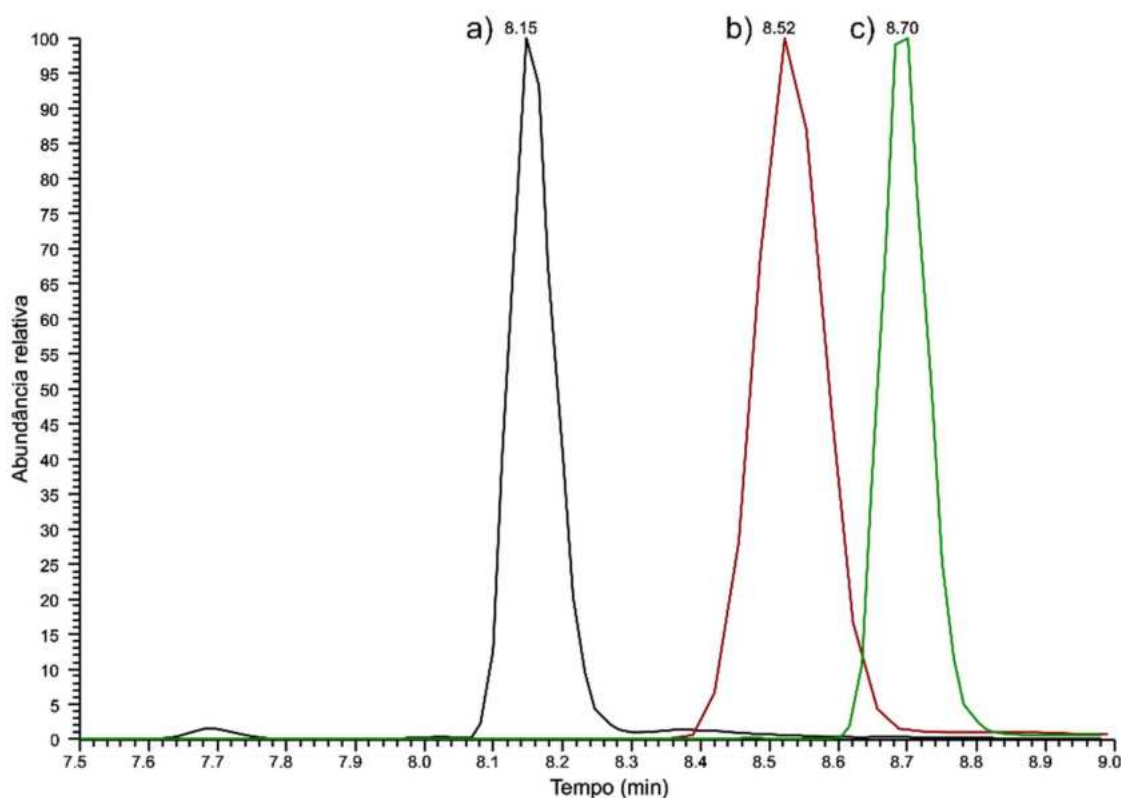
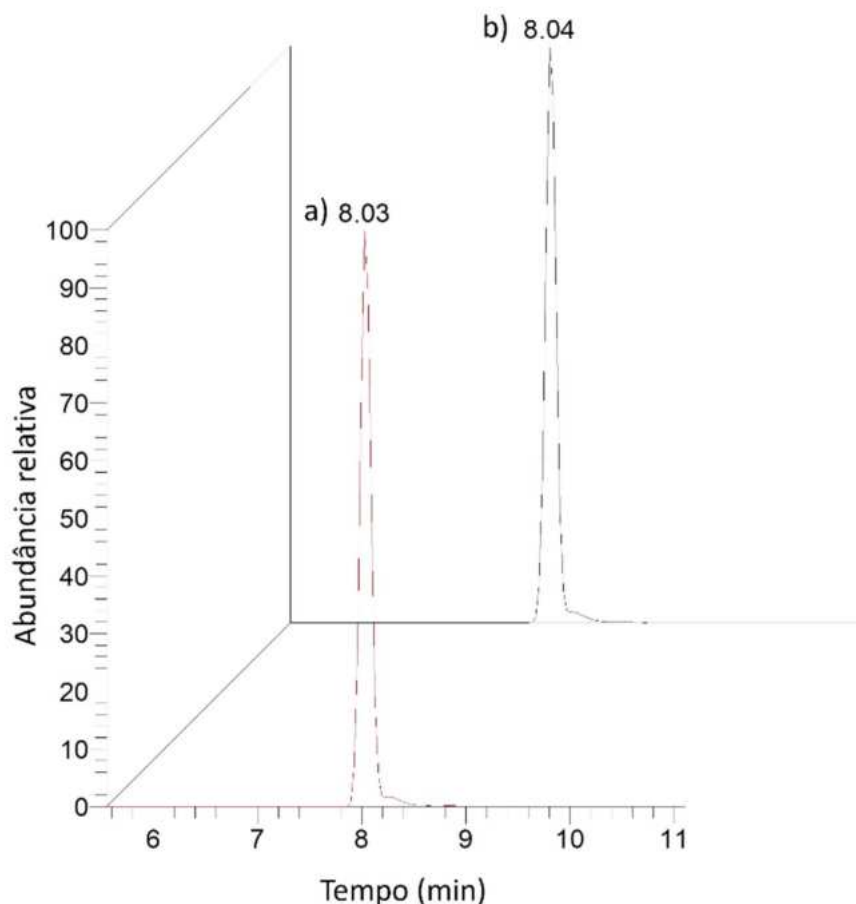


Figura 22. Cromatograma com os t_R 's dos 2 PI's a) Δ^9 -THC-COOH-D₉ e b) Δ^9 -THC-COOH-D₃.



5.2 OTIMIZAÇÃO DA FONTE DE IONIZAÇÃO

Testes iniciais com padrões dos analitos (CBD, CBN e Δ^9 -THC) reconstituídos em fase móvel foram conduzidos visando a otimização dos parâmetros da fonte de ionização para um método de quantificação robusto. A partir de ensaios preliminares, verificou-se que a variação da “Área analito/Área PI” estava com um CV% acima de 10% para a injeção dos padrões em solvente, resultado que sofreria um aumento maior quando a matriz fosse adicionada.

É importante ressaltar que devido a fotossensibilidade dos analitos e a possibilidade de degradação do Δ^9 -THC, principalmente, na presença de altas temperaturas alguns cuidados foram tomados, tais como a utilização de frascos âmbar para armazenamento das soluções e ultrassom com a tampa aberta para evitar

aumento da temperatura interna. Para as análises foram utilizados *vials* transparentes pois são feitas no mesmo momento.

Para a otimização da fonte de ionização *ESI*, foi escolhido o planejamento do tipo Plackett-Burman devido a possibilidade de estudo de um maior número de variáveis realizando um menor número de experimentos (VANAJA; RANI, 2007).

Para fins de comparação:

Fatorial completo: $2^7=128$ experimentos

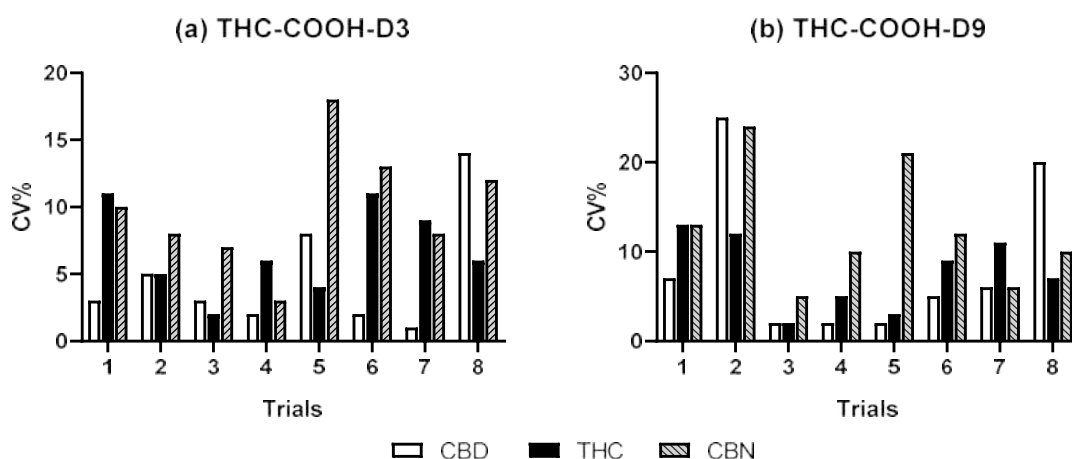
Fatorial fracionário: $2^{7-2}=32$ experimentos; $2^{7-3}=16$ experimentos

Plackett-Burman: 7 variáveis à 2 níveis = 8 experimentos

Ao se observar o número de experimentos a serem realizados em outros tipos de planejamento *screening*, a escolha do Plackett-Burman se mostrou a melhor alternativa.

Após os experimentos serem conduzidos conforme a matriz do planejamento a resposta avaliada correspondeu a razão “Área analito/Área PI” obtidos através do *software TraceFinder*. Como cada experimento foi realizado em triplicata, obteve-se o CV% (Equação 1) da razão de áreas para cada um dos dois PI avaliados, os quais estão representados na Figura 23.

Figura 23. Coeficiente de variação (CV%) para “Área do analito/Área do PI” para cada experimento da matriz a) Δ^9 -THC-COOH-D₃ b) Δ^9 -THC-COOH-D₉.



Como buscava-se minimizar a flutuação dos resultados, pode-se observar que, no geral, o $\Delta 9$ -THC-COOH-D₉ promoveu um menor CV% para todos os analitos na maioria das condições instrumentais empregadas. Dentre eles se destaca o experimento 3 que, com o $\Delta 9$ -THC-COOH-D₉, apresentou o CV% mais satisfatório para todos os analitos de 2%, 2% e 5% para CBD, $\Delta 9$ -THC e CBN, respectivamente. As condições instrumentais empregadas nesse experimento estão listadas na Tabela 13 e foram empregadas no método instrumental.

Acredita-se que a diferença observada entre os resultados obtidos com o $\Delta 9$ -THC-COOH-D₉ e o $\Delta 9$ -THC-COOH-D₃ deve-se ao fato do possível decaimento à D₀ mais acelerado do $\Delta 9$ -THC-COOH-D₃ do que o $\Delta 9$ -THC-COOH-D₉, fazendo esse último ser mais estável. Tal fenômeno que pode ser impulsionado pela presença do solvente prótico em que os analitos estão presentes.

Equação 1: Coeficiente de variação em porcentagem (CV%)

$$CV\% = \frac{\sigma}{\bar{X}} \times 100$$

Onde,

σ , é o desvio padrão das triplicatas;

\bar{X} , é a média das triplicatas.

Tabela 13. Parâmetros da fonte de ionização ESI otimizada.

FONTE DE IONIZAÇÃO (ESI) OTIMIZADA	
<i>Temperatura de aquecimento do gás auxiliar (°C)</i>	350
<i>Temperatura do capilar (°C)</i>	250
<i>Voltagem do electrospray (kV)</i>	4
<i>Sheath gas (u.a.)</i>	30
<i>Gás auxiliar (u.a.)</i>	10
<i>S-lens (V)</i>	80
<i>Sweep gas (u.a.)</i>	1

5.3 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO

5.3.1 Preparo de amostra

A ELL é uma das mais técnicas mais utilizadas para preparo de amostras para análises quantitativas e qualitativas (CANTWELL; LOSIER, 2002). Ela se baseia no princípio do equilíbrio de partição e na diferença de solubilidade das moléculas dos analitos de interesse no solvente de extração (DEVANSHU et al., 2018). A extração ocorre a partir da transferência de massa entre duas fases líquidas, devendo essas serem imiscíveis entre si (LI; JIAN; FU, 2019; MAZZOLA et al., 2008).

Uma dessas fases é a amostra onde está contida o analito, que geralmente é aquosa, porém pode ser extrato de matéria vegetal, e a outra é o solvente de extração, em sua grande maioria, um solvente orgânico. Após a adição do solvente orgânico às amostras, elas são agitadas vigorosamente via *shaker* ou *vórtex* por um certo tempo, a fim de facilitar a difusão dos analitos entre as fases (LI; JIAN; FU, 2019). Depois de realizada a extração propriamente dita é necessário fazer a separação das fases. A técnica de centrifugação é a mais utilizada nessa etapa, mas também, em casos em que a fase orgânica fica no topo, pode-se congelar a fase inferior para facilitar a separação (LI; JIAN; FU, 2019).

O processo de separação de fases pode ser lento, principalmente quando surgem emulsões. Essa situação se mostra uma dificuldade específica em amostras, tais como urina e extratos, pois estes contêm agentes tensoativos que adsorvem na interface líquido-líquido, gerando emulsões (CANTWELL; LOSIER, 2002).

A utilização da técnica de extração assistida por ultrassom atrai grande interesse devido a sua habilidade de agitar e misturar um sistema sem alterar suas características químicas. Esse fato faz com que seja interessante incorporá-la junto a ELL no procedimento de preparo de amostra, uma vez que agitação por ultrassom favorece a transferência de massa e, dependendo das condições operacionais empregadas, destrói a emulsão formada (LUQUE DE CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2007).

Durante os processos de extração com ultrassom, ocorre a propagação de ondas mecânicas através do meio, alternando entre ciclos de compressão e rarefação em frequências acima de 20 kHz. Essas ondas induzem o fenômeno conhecido como cavitação, que engloba a nucleação, crescimento e colapso de microbolhas nos

líquidos. Esse processo resulta em um aumento localizado da temperatura e pressão no meio onde as ondas se propagam, além da geração de microjatos. Esses que são responsáveis pela erosão e/ou fragmentação das partículas sólidas presentes no meio (FERREIRA, B. L. et al., 2020).

No trabalho em questão foi realizada uma ELL assistida por ultrassom, então uma série de fatores podem influenciar sua eficácia, tais como: volume de solvente de extração, tempo de extração, pH das fases, polaridade do solvente de extração, tempo de sonicação, entre outros (LI; JIAN; FU, 2019).

5.3.2 Screening

Para otimização do protocolo de ELL assistida por ultrassom um planejamento do tipo fatorial completo foi escolhido para avaliar a influência das 3 variáveis estudadas (volume de solvente de extração, tempo de agitação em *shaker*, tempo de extração assistida por ultrassom) no processo. Como elas foram estudadas em apenas 2 níveis, nesta etapa um planejamento deste tipo foi a melhor escolha pelo fato de fornecer informações concretas a respeito tanto das variáveis isoladas quanto de suas interações além de ser econômico em número de experimentos.

Por depender da transferência de massa entre duas fases líquidas imiscíveis, o tempo de agitação (*shaker*) e o tempo de ultrassom se mostram parâmetros importantes a serem otimizados, pois geram um grande impacto na eficiência da ELL. A agitação geralmente tem uma relação proporcional com a eficiência da ELL, onde a maior agitação promove maior eficiência de extração. Porém, os extratos oleosos não são totalmente solúveis em metanol, então a maior agitação do sistema irá promover a formação de emulsificações estáveis, o que não se busca em um protocolo de ELL eficiente (PROTTI et al., 2019). Além disso, alta velocidade de agitação pode ainda promover a mistura por refluxo, diminuindo ainda mais a eficiência. A agitação por ultrassom pode agitar eficazmente um sistema pelo fenômeno da cavitação sem alterar suas propriedades químicas, ao mesmo tempo que acelera a transferência de massa e destrói a emulsão, entretanto é necessário o estudo da melhor condição para evitar a formação de emulsão (LUQUE DE CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2007).

A eficiência de extração em ELL está fortemente ligada a relação entre o volume de amostra-solvente usados. Normalmente elas possuem uma relação proporcional, onde altas recuperações são obtidas quando grandes volumes de solvente orgânico

são empregados, porém essa grande diluição compromete a sensibilidade analítica (EHRESMAN, 2003;WELLS, 2003). Esse estudo de otimização dos parâmetros representa não somente a melhoria na eficiência da extração dos canabinoides, mas também reflete nos custos do método.

Assim como na otimização da fonte de ionização a resposta avaliada dos experimentos correspondeu a razão “Área analito/ Área PI ($\Delta 9$ -THC-COOH-D₉)”, obtidos através do *software TradeFinder*. Uma análise de variância (ANOVA) foi realizada com os resultados e os valores dos coeficientes, p-valor e coeficiente linear para as variáveis isoladas e suas interações para cada analito estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14. Coeficientes lineares, coeficientes das variáveis e interações e p-valor obtidos por ANOVA.

	CBD		$\Delta 9$ -THC		CBN	
R ²	0,898347837		0,983028544		0,985708593	
	Coeficiente	p-valor	Coeficiente	p-valor	Coeficiente	p-valor
b₀	0,011824833	3,177E-06	0,01941713	1,2268E-06	0,02833266	1,15886E-06
b₁	0,000109646	0,8186839	-0,0030005	0,00456516	-0,0043494	0,00447206
b₂	-0,000957418	0,0886606	-0,0045023	0,0007468	-0,0078726	0,000302831
b₃	0,000397276	0,4214152	0,00042532	0,52015229	-0,0002234	0,81127587
b₁₂	0,001422767	0,0258101	0,00587231	0,00021367	0,00937891	0,00013111
b₁₃	-0,000550314	0,2794426	0,00055588	0,4076778	0,00104273	0,292942056
b₂₃	-5,49704E-05	0,9083081	0,00190228	0,02710109	0,00200936	0,072982505
b₁₂₃	0,001120033	0,0566709	0,00229816	0,01349636	0,00230818	0,048207623

O parâmetro usado para avaliação da significância dos coeficientes, e consequentemente das variáveis e suas interações, foi o p-valor. Ele possui como critério ser menor do que 0,050 (ou 5%) para que determinado coeficiente, que é relativo a uma variável ou interação de variáveis, seja significativo.

Os coeficientes b₁ e b₂ representam tempo de agitação em *shaker* e tempo no ultrassom, respectivamente, e elas independentes se mostraram variáveis significativas para o $\Delta 9$ -THC e CBN com um efeito negativo, ou seja, o mínimo de ambos os parâmetros sugere a maximização do sinal analítico. Além disso, a interação

de segunda ordem dessas variáveis é significativa para todos os analitos em questão, reforçando sua importância em seguir para a próxima etapa da otimização.

O coeficiente b_3 se refere ao volume do solvente de extração, e ele sozinho não se mostrou significativo para nenhum analito, porém sua interação de segunda ordem com b_2 e sua interação de terceira ordem com b_1 e b_2 se mostrou ser significativa apenas para o $\Delta 9$ -THC.

Pôde-se observar que o CBN e o $\Delta 9$ -THC apresentaram uma similaridade de em termos de variáveis que se mostraram significativas, enquanto que o CBD divergiu completamente deles. Ao analisarmos as estruturas químicas deles (Figura 3 e Figura 7), nota-se que o CBD apresenta 2 H ácidos livres, o fazendo ser mais fácil de ser extraído da amostra pela a interação deles com metanol do solvente de extração. Tal fato pode explicar o perfil tão discrepante de variáveis significativas do CBD frente o CBN e o $\Delta 9$ -THC.

O $\Delta 9$ -THC tem um papel crítico na indústria da *cannabis* medicinal, uma vez que sua concentração é determinante para avaliar o potencial farmacológico do produto a base da *cannabis*. Logo, devido a sua importância, decidiu-se seguir também com a variável de volume de solvente de extração para a próxima etapa da otimização do método de preparo de amostra.

5.3.3 Modelagem

Volume de solvente de extração, tempo de agitação em *shaker* e tempo no ultrassom, além de serem fatores que influenciam na maximização da eficiência da ELL também impactam nos custos e tempo de preparo de amostra. Então, a otimização desses parâmetros a fim de se utilizar volumes e tempos mínimos são desejados para que se possa ter um protocolo de preparo de amostra econômico tanto com a diminuição de custos quanto com a diminuição de tempo.

Um planejamento do tipo Box-Behnken foi conduzido para os três fatores e um modelo para as áreas analito/PI em função do volume de solvente, tempo de agitação e tempo de ultrassom foi avaliado simultaneamente para CBD, $\Delta 9$ -THC e CBN. Os coeficientes e figuras de mérito do modelo estão listadas na Tabela 15 e as superfícies de respostas tridimensionais que correspondem a soma das superfícies geradas pelos analitos individualmente, assim como sua representação bidimensional se encontram nas

Figura 24 e Figura 25, respectivamente.

Tabela 15. Análise dos parâmetros por ANOVA, p-valores do modelo predito, falta de ajuste e valor dos coeficientes para cada analito.

	CBD	$\Delta 9$-THC	CBN
R²	0,8554	0,8800	0,8571
R² (Adj.)	0,6695	0,7257	0,6733
Modelo	0,028	0,016	0,027
Falta de ajuste	0,080	0,601	0,901
b_o	-0,01910	-0,0471	-0,0936
b_1	0,001479	0,00222	0,00383
b_2	-0,000291	0,000679	0,00249
b_3	0,00529	0,01004	0,02052
$b_{1,2}$	0,000037	0,000029	0,000018
$b_{1,3}$	-0,000055	0,000006	0,000261
$b_{2,3}$	-0,000033	-0,000107	-0,000261
$b_{1,1}$	-0,000054	-0,000084	-0,000188
$b_{2,2}$	0,000001	-0,000008	-0,000017
$b_{3,3}$	-0,000266	-0,000546	-0,001316

Figura 24. Superfícies de respostas tridimensionais

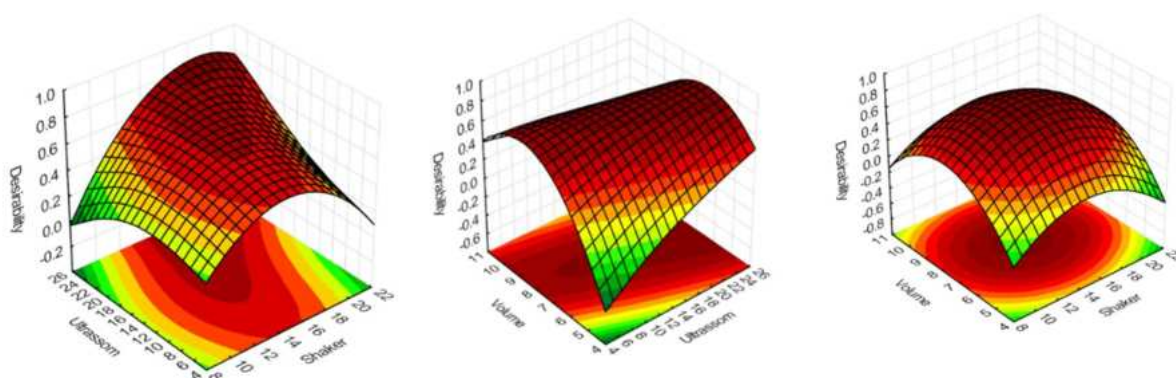
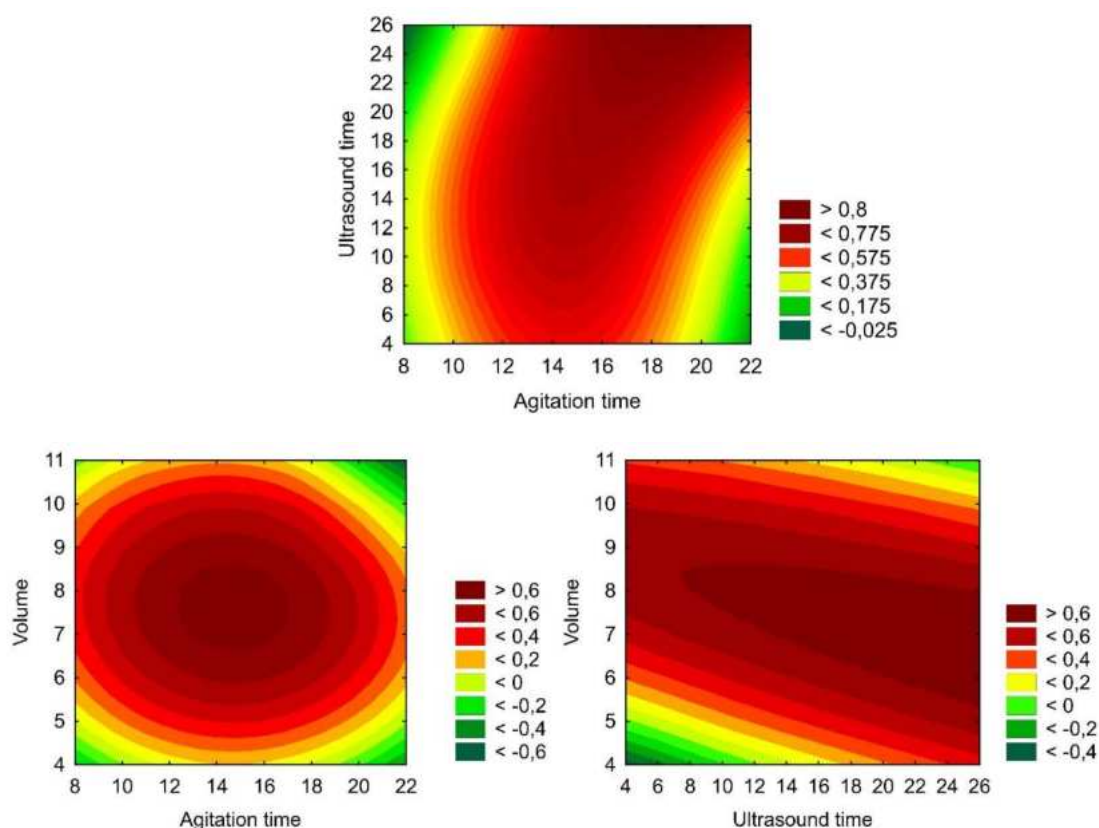


Figura 25. Superfícies de respostas Bidimensional



Os resultados apresentados possuem uma região robusta com um ponto ótimo e de máxima resposta. A região ótima de resposta para os analitos está compreendida em 18 minutos de agitação em *shaker*, 25 minutos de ultrassom e 7 mL de volume de solvente de extração, o que representa uma otimização individual de 89%, 80% e 82% para CBD, Δ^9 -THC e CBN, respectivamente. E, por fim, pela soma, uma otimização global de 84% foi alcançada.

BERMAN *et al.* (2018) buscava o perfil metabólico dos fitocanabinoides na flor de *cannabis* utilizando 10 mL de solvente de extração, 30 minutos em ultrassom e 15 minutos de agitação em *shaker*, além de haver a necessidade de filtração por membrana das amostras (BERMAN *et al.*, 2018). PROTTI *et al.* (2019) também extrai os fitocanabinoides, utiliza 10 mL de solvente de extração, depois leva uma primeira vez ao ultrassom por 30 minutos e, em seguida, agita em vórtex por 1 minuto e retorna ao ultrassom por mais 15 minutos, em um tempo total de ultrassom de 45 minutos, além de também precisar submeter as amostras a filtração por membrana (PROTTI *et al.*, 2019). CARVALHO, Virgínia M. *et al.* (2020) quantifica fitocanabinoides em

extratos medicinais de *cannabis* com a utilização de 10 mL de solvente de extração, agitação por 1 minuto e 30 minutos de ultrassom, e também há a necessidade da filtração por membrana das amostras (CARVALHO, Virgínia M. et al., 2020).

Em comparação a métodos existentes na literatura como os apresentados acima, o protocolo otimizado apresenta uma alternativa mais rápida e simples com seu desempenho estatisticamente otimizado.

A fim de verificar a adequação do modelo previsto, foi feita a comparação de valores experimentais do planejamento Box-Behnken com os valores previstos no modelo conforme mostrado na Tabela 16. A precisão do modelo está por volta de 86 – 120 % para CBD, 89 – 110 % para Δ^9 -THC e 95 – 104 % para CBN. Esses valores mostram que o modelo se adequa de forma satisfatória para todos os analitos.

Tabela 16. Comparação de valores experimentais e previstos pelo modelo, assim como a precisão do modelo.

Exp.	CBD		Δ^9 -THC		CBN	
	Exp.	Previsto (% Acurácia)	Exp.	Previsto (%Acurácia)	Exp.	Previsto (%Acurácia)
1	0,009	0,01 (111)	0,012	0,012 (100)	0,028	0,028 (100)
2	0,007	0,006 (86)	0,012	0,011 (92)	0,031	0,031 (100)
3	0,006	0,007 (117)	0,010	0,011 (110)	0,032	0,032 (100)
4	0,012	0,011 (92)	0,016	0,015 (94)	0,039	0,038 (97)
5	0,007	0,006 (86)	0,009	0,008 (89)	0,024	0,025 (104)
6	0,007	0,008 (114)	0,009	0,010 (111)	0,021	0,023 (110)
7	0,008	0,007 (88)	0,011	0,010 (91)	0,024	0,023 (96)
8	0,005	0,006 (120)	0,011	0,011 (100)	0,034	0,033 (97)
9	0,007	0,007 (100)	0,007	0,007 (100)	0,019	0,018 (95)
10	0,009	0,009 (100)	0,014	0,013 (93)	0,037	0,036 (97)
11	0,009	0,009 (100)	0,014	0,014 (100)	0,034	0,035 (103)
12	0,007	0,008 (114)	0,010	0,010 (100)	0,026	0,027 (104)
13	0,010	0,010 (100)	0,015	0,015 (100)	0,039	0,039 (100)

5.3.4 Avaliação do desempenho analítico

Para a precisão, os resultados foram analisados pelo CV% (Equação 1) das concentrações obtidas pela curva analítica das amostras preparadas e injetadas por um único analista, em um único dia e no mesmo equipamento. Já na recuperação a média das concentrações obtidas foi comparada com o valor teórico de concentração, conforme a Equação 2.

Equação 2: Cálculo da recuperação

$$REC = \frac{\bar{X}}{Conc. teórica} \times 100$$

Onde,

\bar{X} , é a média das triplicatas.

As curvas analíticas para cada analito utilizada para estimar a concentração estão apresentadas nas Figura 26, Figura 27, Figura 28.

Figura 26. Curva analítica para o CBD.

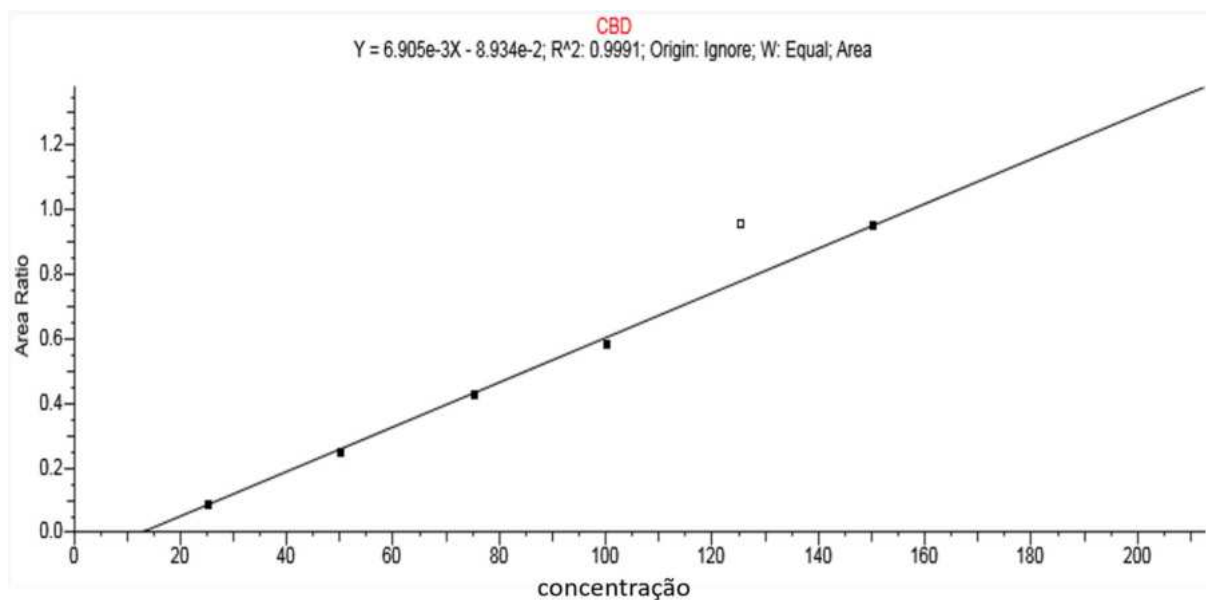
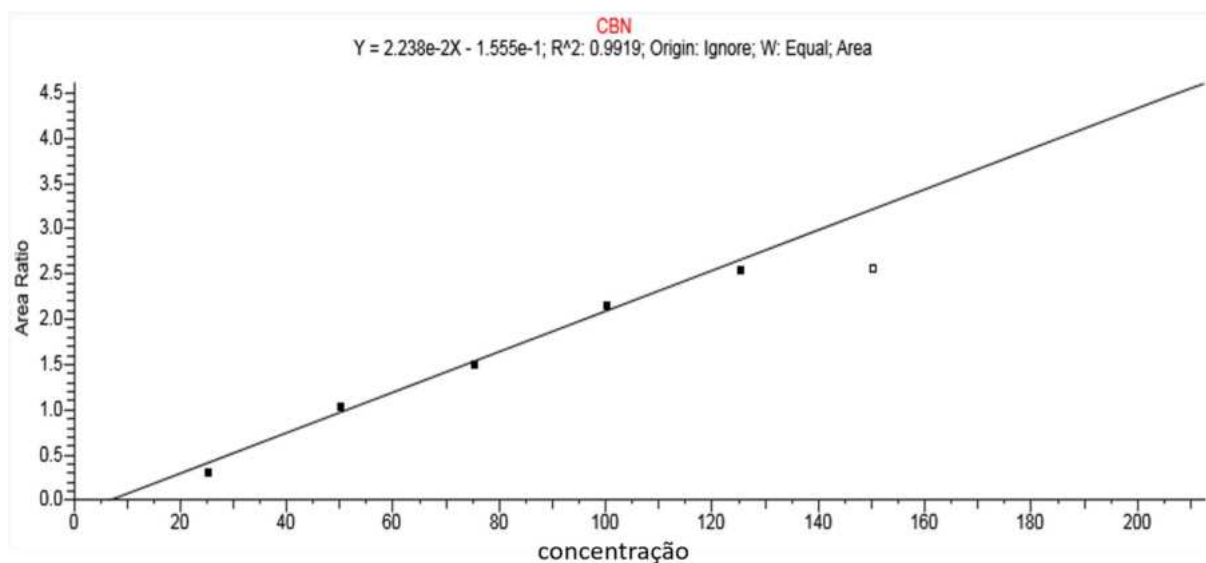
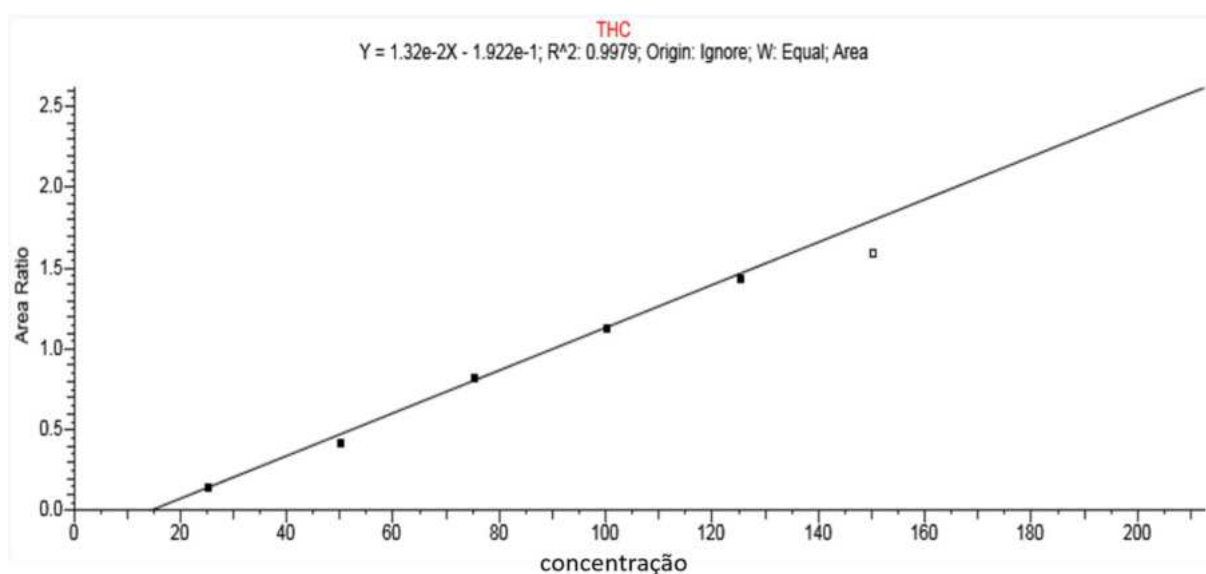


Figura 27. Curva analítica para o CBN.

Figura 28. Curva analítica para o Δ^9 -THC.

Com base nos resultados encontrados para repetibilidade e recuperação por CARVALHO, Virgínia M. et al., 2020, os parâmetros de precisão e recuperação deste presente trabalho obtidos para todos os três analitos em todos os três níveis de concentração abordados foram satisfatórios (Tabela 17). Assim, reafirmando a pertinência do método à questão analítica aqui apresentada.

Tabela 17. Precisão, expressa pela repetibilidade (apenas 1 analista) e recuperação para cada analito em cada nível de concentração. Resultados expressos em CV% e % de recuperação.

	CBD			Δ9-THC			CBN		
Nível (ng/g)	50	100	150	50	100	150	50	100	150
Precisão (repetibilidade) (%)	4	4	7	14	6	7	13	14	6
Recuperação (%)	86	84	98	69	77	80	76	86	90

Para o cálculo dos limites de detecção de quantificação os valores das inclinações, interceptos das curvas analíticas e suas respectivas médias e desvios padrões estão apresentados na Tabela 18. As curvas foram feitas em óleo de coco.

Tabela 18. Valores das inclinações, interceptos e suas respectivas médias e desvios padrões para cada replicata da curva.

	INCLINAÇÃO			INTERCEPTO		
	CBD	Δ9-THC	CBN	CBD	Δ9-THC	CBN
R1	0,001591	0,001477	0,002759	-0,01581	-0,005324	0,0164
R2	0,001407	0,001451	0,002521	-0,01539	-0,01263	0,01048
R3	0,001321	0,001366	0,002473	-0,001344	0,008241	0,0312
MÉDIA	0,001440	0,001431	0,002584	-0,010847	-0,003237	0,019362
DESVIO PADRÃO	0,0001	0,0001	0,00015	0,0082	0,0106	0,01067

Os valores do desvio padrão do intercepto e da inclinação da curva foram utilizados para o cálculo dos limites de detecção e quantificação a partir das fórmulas:

$$LD = 3.3 \times \frac{\text{desvio padrão do intercepto}}{\text{inclinação da curva analítica}}$$

$$LQ = 10 \times \frac{\text{desvio padrão do intercepto}}{\text{inclinação da curva analítica}}$$

Limites de Detecção (18, 24 e 13 ng/g) e Limites de Quantificação (57, 74 e 41 ng/g) foram estimados para cada CBD, Δ 9-THC e CBN, respectivamente. Com base nos valores encontrados por CARVALHO, Virgínia M. et al., 2020 na quantificação de extratos de *cannabis* por meio de um método de extração e uma técnica analítica similar a que foi utilizada no presente trabalho, os valores calculados para LD e LQ representam concentrações cerca de 1.000.000 vezes inferiores às esperadas em amostras reais, demonstrando assim uma abordagem analítica quantitativa adequada.

6. CONCLUSÃO

O uso da *cannabis* desempenha um papel de constante crescimento e importância na medicina moderna devido ao seu uso terapêutico para o tratamento de diversos quadros clínicos. Isso ocorre devido, principalmente, a atuação dos fitocanabinoides no sistema endocanabinoide, então CBD, Δ 9-THC e CBN se mostram como alvos interessantes de serem monitorados em métodos de controle de qualidade de produtos medicinais de *cannabis*. Diversas técnicas analíticas já são empregadas em estudos do tipo, mas a CLUE-EMAR/EM se demonstrou ser uma alternativa eficiente de detecção e quantificação dos fitocanabinoides.

A abordagem do DoE forneceu resultados de maneira rápida, eficaz e confiável, permitindo a otimização de condições instrumentais e do protocolo de preparo de amostra. A utilização da ferramenta apresenta uma alternativa inovadora em estudos na área de desenvolvimento de métodos na área da *cannabis*, e é vantajosa por sua economia em número de experimentos e eficiência.

Por meio do DoE foi possível otimizar os parâmetros da fonte de ionização de maneira eficiente, encontrando condições que mais se adequavam a análise. O uso de Δ 9-THC-COOH-D₉ como PI se mostrou ser o mais adequado, uma vez que promoveu maior precisão instrumental, conforme os resultados obtidos do CV% de, na condição otimizada da fonte de ionização, 2%, 2% e 5% para CBD, Δ 9-THC e CBN, respectivamente.

No protocolo de preparo de amostra as variáveis significativas foram identificadas e levadas para *modelagem*, em que a condição ótima foi identificada de forma robusta e representa uma alternativa mais rápida e estatisticamente otimizada quando comparada à métodos similares na literatura. Por fim, o desempenho analítico

do método foi avaliado de forma simples apenas pela repetibilidade, recuperação e sensibilidade, e apresentaram resultados dentro do requerido para um desenvolvimento de método de quantificação, mas a exploração dos parâmetros completos de validação ainda se faz necessária.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGHAZADEH TABRIZI, M. et al. **Medicinal Chemistry, Pharmacology, and Potential Therapeutic Benefits of Cannabinoid CB2Receptor Agonists.** *Chemical Reviews*, [s.l.], v. 116, nº 2, p. 519–560, 2016. ISSN: 15206890, DOI: 10.1021/acs.chemrev.5b00411.

ALIFERIS, K. A.; BERNARD-PERRON, D. **Cannabinomics: Application of Metabolomics in Cannabis (Cannabis sativa L.) Research and Development.** *Frontiers in Plant Science*, [s.l.], v. 11, nº May, p. 1–20, 2020. ISSN: 1664462X, DOI: 10.3389/fpls.2020.00554.

APPENDINO, G.; CHIANESE, G.; TAGLIALATELA-SCAFATI, O. **Cannabinoids: Occurrence and Medicinal Chemistry.** *Current Medicinal Chemistry*, [s.l.], v. 18, nº 7, p. 1085–1099, 2011. ISSN: 09298673, DOI: 10.2174/092986711794940888.

ARYAL, K. et al. **Knowledge mapping for a secure and sustainable hemp industry: A systematic literature review.** *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*, [s.l.], v. 9, nº November 2023, p. 100550, 2024. ISSN: 26660164, DOI: 10.1016/j.cscee.2023.100550.

BERMAN, P. et al. **A new ESI-LC/MS approach for comprehensive metabolic profiling of phytocannabinoids in Cannabis.** *Scientific Reports*, [s.l.], v. 8, nº 1, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-32651-4.

BIJLSMA, L. et al. **Fragmentation pathways of drugs of abuse and their metabolites based on QTOF MS/MS and MS E accurate-mass spectra.** *Journal of Mass Spectrometry*, [s.l.], v. 46, nº 9, p. 865–875, 2011. ISSN: 10765174, DOI: 10.1002/jms.1963.

BONINI, S. A. et al. **Cannabis sativa: A comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history.** *Journal of Ethnopharmacology*, [s.l.],

v. 227, nº September, p. 300–315, 2018. ISSN: 18727573, DOI: 10.1016/j.jep.2018.09.004.

BRASIL. **RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA Nº17**. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). 2015. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2015/rdc0017_06_05_2015.pdf. Acessado em: 05 fev. 2024.

BRASIL. **RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA Nº327**. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). 2019. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2019/rdc0327_09_12_2019.pdf. Acessado em: 05 fev. 2024.

BRASIL. **RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA Nº166**. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). 2017. Disponível em: https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401. Acessado em: 05 fev. 2024.

BRITO SIQUEIRA, A. L. G. DE et al. **Phytocannabinoids: Pharmacological effects, biomedical applications, and worldwide prospection**. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, [s.l.], v. 13, nº 6, p. 575–587, 2023. ISSN: 22254110, DOI: 10.1016/j.jtcme.2023.08.006.

CANTWELL, F. F.; LOSIER, M. **Liquid-liquid extraction**. *Comprehensive Analytical Chemistry*. [s.l.]: [s.n.], 2002. v. 37, p. 297–340. ISSN: 0166526X, DOI: 10.1016/S0166-526X(02)80048-4.

CARVALHO, Virgínia M. et al. **Cannabinoids quantification in medicinal cannabis extracts by high performance liquid chromatography**. *Quimica Nova*, [s.l.], v. 43, nº 1, p. 90–97, 2020. ISSN: 16787064, DOI: 10.21577/0100-4042.20170457.

CARVALHO, Virgínia Martins et al. **Chemical profiling of Cannabis varieties cultivated for medical purposes in southeastern Brazil**. *Forensic Science International*, [s.l.], v. 335, p. 111309, 2022. ISSN: 18726283, DOI: 10.1016/j.forsciint.2022.111309.

CASIRAGHI, A. et al. **Ultrasound-Assisted Extraction of Cannabinoids from Cannabis Sativa for Medicinal Purpose**. *Pharmaceutics*, [s.l.], v. 14, nº 12, 2022. DOI: 10.3390/pharmaceutics14122718.

CAVAZZUTI, M. **Optimization methods: From theory to design scientific and technological aspects in mechanics**. *Optimization Methods: From Theory to Design*

Scientific and Technological Aspects in Mechanics, [s.l.], p. 1–262, 2013. ISBN: 9783642311871, DOI: 10.1007/978-3-642-31187-1.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. **The state of the art of chromatography associated with the tandem mass spectrometry for toxic compound analyses in food.** *Quimica Nova*, [s.l.], v. 31, nº 3, p. 623–636, 2008. ISSN: 16787064, DOI: 10.1590/s0100-40422008000300030.

CITTI, C. et al. **Cannabinoid Profiling of Hemp Seed Oil by Liquid Chromatography Coupled to High-Resolution Mass Spectrometry.** *FRONTIERS IN PLANT SCIENCE*, AVENUE DU TRIBUNAL FEDERAL 34, LAUSANNE, CH-1015, SWITZERLAND, v. 10, 2019. ISSN: 1664-462X, DOI: 10.3389/fpls.2019.00120.

COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia.** Campinas: Editora da UNICAMP, 2006. 453p.

DEVANSHU, S. et al. **Quantitative bioanalysis by LC-MS / MS : a review.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, [s.l.], v. 7, nº 7, p. 1–9, 2018.

DURAKOVIC, B. **Design of experiments application, concepts, examples: State of the art.** *Periodicals of Engineering and Natural Sciences*, [s.l.], v. 5, nº 3, p. 421–439, 2017. ISSN: 23034521, DOI: 10.21533/pen.v5i3.145.

EHRESMAN, D. **Chapter 9 Liquid-liquid extraction: Strategies for method development and optimization.** *Progress in Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, [s.l.], v. 5, p. 307–326, 2003. ISSN: 14643456, DOI: 10.1016/S1464-3456(03)80011-X.

FERREIRA, B. L. et al. **Ultrasound assisted extraction for lipids determination in food: A laboratory experiment.** *Quimica Nova*, [s.l.], v. 43, nº 9, p. 1320–1325, 2020. ISSN: 16787064, DOI: 10.21577/0100-4042.20170592.

FERREIRA, S. L. C. et al. **Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods.** *Analytica Chimica Acta*, [s.l.], v. 597, nº 2, p. 179–186, 2007. ISSN: 00032670, DOI: 10.1016/j.aca.2007.07.011.

FERRER, I. **Analyses of cannabinoids in hemp oils by LC/Q-TOF-MS.** *Comprehensive Analytical Chemistry*. 1 ed. [s.l.]: Elsevier B.V., 2020. v. 90, 415–452 p. ISBN: 9780444643414, ISSN: 0166526X, DOI: 10.1016/bs.coac.2020.04.014.

FORDJOUR, E. et al. **Cannabis: a multifaceted plant with endless potentials.** *Frontiers in Pharmacology*, [s.l.], v. 14, n° June, p. 1–36, 2023. ISSN: 16639812, DOI: 10.3389/fphar.2023.1200269.

GAONI, Y.; MECHOULAM, R. **Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish.** *Journal of the American Chemical Society*, [s.l.], v. 86, p. 1646–1647, 1964.

HEHET, P. et al. **Fast and highly sensitive determination of tetrahydrocannabinol (THC) metabolites in hair using liquid chromatography-multistage mass spectrometry (LC-MS3).** *DRUG TESTING AND ANALYSIS*, 111 RIVER ST, HOBOKEN 07030-5774, NJ USA, v. 14, n° 9, p. 1614–1622, 2022. ISSN: 1942-7603, DOI: 10.1002/dta.3330.

JOHNSON, R. **Hemp as an Agricultural Commodity** Renée Johnson Specialist in **Agricultural Policy.** *Congressional Research Service*, [s.l.], p. 48, 2017.

KOLTAI, H.; NAMDAR, D. **Cannabis Phytomolecule 'Entourage': From Domestication to Medical Use.** *Trends in Plant Science*, [s.l.], v. 25, n° 10, p. 976–984, 2020. ISSN: 13601385, DOI: 10.1016/j.tplants.2020.04.007.

LELARIO, F. et al. **Hemp chemotype definition by cannabinoids characterization using lc-esi(+)-ltq-fticr ms and infrared multiphoton dissociation.** *Separations*, [s.l.], v. 8, n° 12, 2021. DOI: 10.3390/separations8120245.

LI, W.; JIAN, W.; FU, Y. **Basic Sample Preparation Techniques in LC-MS Bioanalysis.** *Sample Preparation in LC-MS Bioanalysis*, [s.l.], p. 1–30, 2019. DOI: 10.1002/9781119274315.ch1.

LUQUE DE CASTRO, M. D.; PRIEGO-CAPOTE, F. **Ultrasound assistance to liquid-liquid extraction: A debatable analytical tool.** *Analytica Chimica Acta*, [s.l.], v. 583, n° 1, p. 2–9, 2007. ISSN: 00032670, DOI: 10.1016/j.aca.2006.09.039.

MAKAROV, A.; SCIGELOVA, M. **Coupling liquid chromatography to Orbitrap mass spectrometry.** *Journal of Chromatography A*, [s.l.], v. 1217, n° 25, p. 3938–3945, 2010. ISSN: 00219673, DOI: 10.1016/j.chroma.2010.02.022.

MAROON, J.; BOST, J. **Review of the neurological benefits of phytocannabinoids.** *Surgical Neurology International*, [s.l.], v. 9, nº 1, 2018. ISSN: 21527806, DOI: 10.4103/SNI.SNI_45_18.

MATOS, F. **Cannabis: quanto movimentou a indústria da maconha no Brasil e no mundo.** 2023. Metrôpoles. Disponível em: <https://www.metropoles.com/negocios/cannabis-quanto-movimentou-a-industria-da-maconha-no-brasil-e-no-mundo>. Acessado em: 01 fev. 2024.

MAZZOLA, P. G. et al. **Liquid-liquid extraction of biomolecules: An overview and update of the main techniques.** *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, [s.l.], v. 83, nº 2, p. 143–157, 2008. ISSN: 02682575, DOI: 10.1002/jctb.1794.

MECHOULAM, R.; GAONI, Y. **A Total Synthesis of di- Δ^1 -Tetrahydrocannabinol, the Active Constituent of Hashish.** *Journal of the American Chemical Society*, [s.l.], v. 87, nº 14, p. 3273–3275, 1965.

NIE, B.; HENION, J.; RYONA, I. **The Role of Mass Spectrometry in the Cannabis Industry.** *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, [s.l.], v. 30, nº 5, p. 719 – 730, 2019. DOI: 10.1007/s13361-019-02164-z.

PAVIA, D. L. et al. **Introdução à Espectroscopia.** Tradução da 5ª edição americana. São Paulo: Cengage Learning, 2016. 733p. ISBN: 9788522123384.

POLAT, S.; SAYAN, P. **Application of response surface methodology with a Box–Behnken design for struvite precipitation.** *Advanced Powder Technology*, [s.l.], v. 30, nº 10, p. 2396–2407, 2019. ISSN: 15685527, DOI: 10.1016/j.ap.2019.07.022.

PROTTI, M. et al. **Cannabinoids from Cannabis sativa L.: A New Tool Based on HPLC-DAD-MS/MS for a Rational Use in Medicinal Chemistry.** *ACS Medicinal Chemistry Letters*, [s.l.], v. 10, nº 4, p. 539–544, 2019. ISSN: 19485875, DOI: 10.1021/acsmmedchemlett.8b00571.

RIBEIRO, J. A. C. **A Cannabis e suas aplicações terapêuticas.** Porto, 2014. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas) - Universidade Fernando Pessoa - Faculdade de Ciências da Saúde, 2014.

SANTOS, N. A. DOS et al. **Analysis of isomeric cannabinoid standards and cannabis products by UPLC-ESI-TWIM-MS: A comparison with GC-MS and GC ×**

GC-QMS. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, [s.l.], v. 30, nº 1, p. 60–70, 2019. ISSN: 16784790, DOI: 10.21577/0103-5053.20180152.

TELFORD, J. K. **A brief introduction to design of experiments.** *Johns Hopkins APL Technical Digest (Applied Physics Laboratory)*, [s.l.], v. 27, nº 3, p. 224–232, 2007. ISSN: 02705214.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. **Chemometrics II: Spreadsheets for experimental design calculations, A tutorial.** *Quimica Nova*, [s.l.], v. 29, nº 2, p. 338–350, 2006. ISSN: 01004042, DOI: 10.1590/s0100-40422006000200026.

THERMO FISHER SCIENTIFIC INC. **HESI-II PROBE – User Guide.** Revision C. 2009.

THERMO FISHER SCIENTIFIC INC. **Selecting the best Q Exactive Orbitrap mass spectrometer scan mode for your application.** White paper 65147.

VANAJA, K.; RANI, R. H. S. **Design of experiments: Concept and applications of plackett burman design.** *Clinical Research and Regulatory Affairs*, [s.l.], v. 24, nº 1, p. 1–23, 2007. ISSN: 10601333, DOI: 10.1080/10601330701220520.

WALSH, D.; NELSON, K. A.; MAHMOUD, F. A. **Established and potential therapeutic applications of cannabinoids in oncology.** *Supportive Care in Cancer*, [s.l.], v. 11, nº 3, p. 137–143, 2003. ISSN: 09414355, DOI: 10.1007/s00520-002-0387-7.

WELLS, D. A. **Chapter 8 Liquid-liquid extraction: High throughput techniques.** *Progress in Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. [s.l.]: [s.n.], 2003. v. 5, p. 277–306. ISSN: 14643456, DOI: 10.1016/S1464-3456(03)80010-8.