



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

LÍLIAN DE ARAÚJO LIMA

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETECÇÃO E  
QUANTIFICAÇÃO DE CANNABIDIOL,  $\Delta$ 9-THC E PRODUTOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO  
EM FLUIDO ORAL POR LC-MS/MS

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF ANALYTICAL METHOD FOR DETECTION AND  
QUANTIFICATION OF CANNABIDIOL,  $\Delta$ 9-THC AND METABOLITES IN ORAL FLUID BY  
LC-MS/MS

Campinas

2024

LÍLIAN DE ARAÚJO LIMA

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETECÇÃO E  
QUANTIFICAÇÃO DE CANNABIDIOL,  $\Delta$ 9-THC E PRODUTOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO  
EM FLUIDO ORAL POR LC-MS/MS

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF ANALYTICAL METHOD FOR DETECTION AND  
QUANTIFICATION OF CANNABIDIOL,  $\Delta$ 9-THC AND METABOLITES IN ORAL FLUID BY  
LC-MS/MS

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Dissertation presented to Faculty of Medical Sciences of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the master's degree in pharmacology.

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ LUIZ DA COSTA

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO  
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO  
ALUNO LÍLIAN DE ARAÚJO LIMA, E ORIENTADA PELO  
PROF. DR. JOSÉ LUIZ DA COSTA.

Campinas  
2024

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

L628d Lima, Lílian de Araújo, 1997-  
Desenvolvimento e validação de método analítico para detecção e quantificação de canabidiol, ?9-THC e produtos de biotransformação em fluido oral por LC-MS/MS / Lílian de Araújo Lima. – Campinas, SP : [s.n.], 2024.

Orientador: José Luiz da Costa.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Faculdade de Ciências Médicas.

1. Canabinoides. 2. Espectrometria de massas. 3. Cromatografia líquida. 4. Saliva. I. Costa, José Luiz da. II. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações Complementares

**Título em outro idioma:** Development and validation of analytical method for detection and quantification of cannabidiol, ?9-THC and metabolites in oral fluid by LC-MS/MS

**Palavras-chave em inglês:**

Cannabinoids

Liquid chromatography

Mass spectrometry

Oral fluid

Saliva

**Área de concentração:** Farmacologia

**Titulação:** Mestra em Farmacologia

**Banca examinadora:**

José Luiz da Costa [Orientador]

Andréia de Melo Porcari

João Ernesto de Carvalho

**Data de defesa:** 23-07-2024

**Programa de Pós-Graduação:** Farmacologia

**Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)**

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-6435-8496>

- Currículo Lattes do autor: <https://lattes.cnpq.br/9622998211542824>

# **COMISSÃO EXAMIDORA DA DEFESA DE MESTRADO**

**LÍLIAN DE ARAÚJO LIMA**

---

**ORIENTADOR: JOSÉ LUIZ DA COSTA**

---

## **MEMBROS TITULARES:**

- 1. PROF. DR. JOSÉ LUIZ DA COSTA**  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade Estadual de Campinas
  
- 2. PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup> ANDRÉIA DE MELO PORCARI**  
Universidade São Francisco – Bragança Paulista
  
- 3. PROF. DR. JOÃO ERNESTO DE CARVALHO**  
Faculdade De Ciências Farmacêuticas – Universidade Estadual de Campinas

---

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

---

**Data de Defesa: 23/07/2024**

---

## AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, processo 88887.711761/2022-00.

Em primeiro lugar, agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. José Luiz da Costa, por seu acolhimento, orientação, paciência e apoio ao longo deste processo. Sua experiência e conhecimento foram essenciais para a concretização deste trabalho. Agradeço também aos membros da banca examinadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Andréia De Melo Porcari e Prof. Dr. João Ernesto De Carvalho, pelas valiosas contribuições e sugestões.

A todos meus colegas do Laboratório de Toxicologia Analítica (LTA) e do Centro de Informação e Assistência Toxicológica de Campinas (CIATox-Campinas), Aline, Lohanna, Kauê, Isadora, Alexandre, Leonardo, Náthaly, Bruna, Marcela, Janaína, Natália que contribuíram imensamente na realização deste trabalho, especialmente a Rafael e Karla e a todos os demais, que me proporcionaram momentos de descontração e apoio emocional, mesmo nos momentos mais difíceis. Vocês foram essenciais para que eu pudesse continuar focada e motivada.

Um agradecimento especial à minha mãe, Waldineia pelo amor incondicional, compreensão e apoio em todos os momentos. Sua força e dedicação foram pilares fundamentais para que eu pudesse alcançar este objetivo. Agradeço também ao meu pai, Laerson, que mesmo morando fora do país, sempre esteve presente de coração, oferecendo palavras de incentivo e apoio fundamentais para que eu me permanecesse forte a todo tempo. Às minhas irmãs, Letícia e Ana Luisa meu sincero agradecimento pelo carinho, companheirismo e incentivo constante. Vocês foram uma fonte de motivação e alegria ao longo desta jornada.

Um agradecimento especial aos meus avôs, Edilson (em memória) e Waldir, que sempre me incentivaram a buscar a área dos meus sonhos. Suas inspirações e encorajamentos continuam a guiar meus passos e minhas escolhas.

Ao meu namorado, Gabriel, agradeço por seu amor, paciência e constante apoio. Sua presença e compreensão foram essenciais para que eu pudesse superar os desafios desta jornada.

A todos, meu mais sincero muito obrigado.

## RESUMO

Os derivados da *Cannabis* têm uma história de mais de 5.000 anos de consumo para fins medicinais, recreativos e espirituais em todo o mundo. Atualmente, distinguir entre diferentes padrões de utilização de canabinoides requer o uso de métodos analíticos específicos e sensíveis. A análise quantitativa destes compostos em fluido oral está emergindo como um campo de interesse crescente em toxicologia analítica. O fluido oral ganhou reconhecimento na última década como uma matriz biológica alternativa para detecção de drogas em ambientes forenses e clínicos. Sua coleta de amostras é simples, não invasiva e de fácil observação, além de oferecer resistência a adulterações. Esta matriz elimina a necessidade de instalações de recolha especializadas ou de coletores do mesmo sexo. Este trabalho tem o potencial de melhorar significativamente a avaliação clínica e forense, oferecendo uma ferramenta robusta para detectar e monitorar o consumo de canabinoides. O objetivo desta pesquisa foi desenvolver e validar um método analítico para detecção e quantificação de canabidiol (CBD),  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC), e seus respectivos produtos de biotransformação 7-hidroxicanabidiol (7-OH-CBD), 7-carboxi-canabidiol (7-COOH-CBD), 11-hidroxi- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (11-OH-THC), 11-nor-9-carboxi- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC-COOH) e canabinol (CBN) em fluido oral usando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS). A extração da amostra foi realizada de uma solução de 500  $\mu$ L de tampão de eluição de fluido oral-Quantisal<sup>®</sup> fortificado com 50  $\mu$ L da solução de trabalho contendo o padrão interno (CBD-d3 e THC-d3 a 500 ng/mL), juntamente com 500  $\mu$ L de solução saturada de tetraborato de sódio e 2 mL de éter metil terc-butílico. As amostras foram agitadas em vórtice por 30 s e depois centrifugadas a 4500 rpm por 5 min. Posteriormente, 1700  $\mu$ L do extrato foram transferidos para frascos e submetidos à secagem em TurboVap por aproximadamente 15 minutos. A ressuspensão foi realizada utilizando 100  $\mu$ L de acetonitrila. A separação cromatográfica ocorreu em coluna bifênol Raptor<sup>®</sup> (100  $\times$  2,1 mm, 2,7  $\mu$ m). O método apresentou linearidade na faixa de concentração de 0,5 a 200 ng/mL para todos os analitos, exceto para o CBN, que apresentou 0,5 a 100 ng/mL. A curva de calibração demonstrou linearidade robusta, com o coeficiente de variação para cada concentração não ultrapassando 10%. Os limites de detecção foram estabelecidos em 0,5 ng/mL para todos os analitos, valor sensível para detecção em amostras autênticas de fluido oral. Esta abordagem tem um potencial significativo para aplicações mais amplas em ciência analítica, apresentando notável eficiência em termos de baixo volume de amostra e limites de detecção.

**Palavras-chave:** Canabinoides, cromatografia líquida, espectrometria de massas, saliva.

## ABSTRACT

Cannabis derivatives have a history of more than 5,000 years of consumption for medicinal, recreational and spiritual purposes around the world. Currently, distinguishing between different patterns of cannabinoid utilization requires the use of specific and sensitive analytical methods. Quantitative analysis of these compounds in oral fluid is emerging as a growing field of interest in analytical toxicology. Oral fluid has gained recognition over the past decade as an alternative biological matrix for drug detection in forensic and clinical settings. Sample collection is simple, non-invasive and easy to observe, in addition to offering resistance to tampering. This matrix eliminates the need for specialized collection facilities or same-sex collectors. This work has the potential to significantly improve clinical and forensic assessment by offering a robust tool to detect and monitor cannabinoid consumption. The objective of this research was to develop and validate an analytical method for detection and quantification of cannabidiol (CBD),  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC), and their respective biotransformation products 7-hydroxycannabidiol (7-OH-CBD), 7-carboxycannabidiol (7-COOH-CBD), 11-hydroxy- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (11-OH-THC), 11-nor-9-carboxy- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC-COOH) and cannabinol (CBN) in oral fluid using liquid chromatography coupled to sequential mass spectrometry (LC-MS/MS). Sample extraction was performed from a solution of 500  $\mu\text{L}$  of oral fluid elution buffer-Quantisal<sup>TM</sup> fortified with 50  $\mu\text{L}$  of the working solution containing the internal standard (CBD-d3 and THC-d3 at 500 ng/mL), together with 500  $\mu\text{L}$  of saturated sodium tetraborate solution and 2 mL of methyl tert-butyl ether. Samples were vortexed for 30 s and then centrifuged at 4500 rpm for 5 min. Subsequently, 1700  $\mu\text{L}$  of the extract was transferred to vials and dried in a TurboVap for approximately 15 minutes. Resuspension was performed using 100  $\mu\text{L}$  of acetonitrile. Chromatographic separation occurred on a Raptor<sup>TM</sup> biphenyl column (100  $\times$  2.1 mm, 2.7  $\mu\text{m}$ ). The method showed linearity in the concentration range of 0.5 to 200 ng/mL for all analytes, except for CBN, which showed 0.5 to 100 ng/mL. The calibration curve demonstrated robust linearity, with the coefficient of variation for each concentration not exceeding 10%. Detection limits were set at 0.5 ng/mL for all analytes, a sensitive value for detection in authentic oral fluid samples. This approach has significant potential for broader applications in analytical science, featuring remarkable efficiency in terms of low sample volume and detection limits.

**Keywords:** Cannabinoids, Liquid Chromatography, Mass spectrometry, saliva.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**11-OH-THC** - 11-Hidroxi-Tetraidrocanabinol

**2-AG** - 2-Araquidonoilglicerol

**7-CBD-COOH** - 7-Carboxi-Cannabidiol

**7-OH-CBD** - 7-Hidroxi-Cannabidiol

**AEA** - Anandamida

**ANOVA** - Análise de Variância

**ANVISA**- Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**CAL** - Calibrador

**CB<sub>1</sub>** - Receptor Canabinoide Tipo 1

**CB<sub>2</sub>** - Receptor Canabinoide Tipo 2

**CBD** - Canabidiol

**CBDA** - Ácido Canabidiólico

**CBD-d<sub>3</sub>** - Canabidiol-d<sub>3</sub>

**CBN** - Canabinol

**CQA** - Controle de Qualidade de Alta Concentração

**CQB** - Controle de Qualidade de Baixa Concentração

**CQM** - Controle de Qualidade de Média Concentração

**CV** - Coeficiente de Variação

**ESI** - Ionização por *Eletrospray*

**GC** - Cromatografia Gasosa (do inglês, *Gas Chromatography*)

**GC-MS** - Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (do inglês, *Gas Chromatography Coupled to Mass Spectrometry*)

**HPLC** - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*)

**LC-MS** - Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (do inglês, *Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry*)

**LC-MS/MS** - Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas sequencial (do inglês, *Liquid Chromatography Coupled to Sequential Mass Spectrometry*)

**LD** - Limite de Detecção

**LIQ** - Limite Inferior de Quantificação

**LLE** - Extração Líquido-Líquido (do inglês, *Liquid-Liquid Extraction*)

**MRM** - Monitoramento de Reações Múltiplas

**MS** - Espectrometria de Massas

**MTBE** - Metil-terc-butil éter

**PI** - Padrão Interno

**RDC** - Resolução da Diretoria Colegiada

**SPE** - Extração em Fase Sólida (do inglês, *Solid Phase Extraction*)

**SPME** - Microextração em Fase Sólida (do inglês, *Solid Phase Microextraction*)

**TBS** – Solução saturada de tetraborato de sódio

**THC** -  $\Delta^9$ -Tetraidrocanabinol

**THCA** - Ácido Tetraidrocanabinólico

**THC-COOH** - Tetraidrocanabinol-9-Carboxílico

**THC-d<sub>3</sub>** - Tetraidrocanabinol-d<sub>3</sub>

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
1.1. CONTEXTUALIZAÇÃO HISTÓRICA E MUDANÇAS NAS POLÍTICAS DE USO .....	12
1.2. IMPORTÂNCIA DA ANÁLISE DE CANABINOIDES .....	15
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>17</b>
2.1. CARACTERÍSTICAS DA <i>CANNABIS</i> .....	17
2.1.1. <i>Δ9-tetrahydrocannabinol (THC)</i> .....	18
2.1.2. <i>Canabidiol (CBD)</i> .....	19
2.1.3. <i>Canabinol (CBN)</i> .....	19
2.2. SISTEMA ENDOCANABINOIDE .....	19
2.3. APLICAÇÕES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS DOS CANABINOIDES .....	21
2.4. MÉTODOS DE DETECÇÃO DE CANABINOIDES .....	24
2.4.1. <i>Matrizes Biológicas</i> .....	24
2.4.2. <i>Técnicas de extração</i> .....	25
2.4.3. <i>Técnicas analíticas</i> .....	27
<b>3. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>29</b>
<b>4. OBJETIVO.....</b>	<b>30</b>
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>30</b>
5.1. REAGENTES, SOLVENTES E MATERIAIS DE REFERÊNCIA .....	30
5.2. AMOSTRAS.....	32
5.2.1. <i>Coleta de amostras</i> .....	33
5.3. PREPARO DE CALIBRADORES E CONTROLES .....	34
5.4. PREPARO DE AMOSTRAS .....	34
5.5. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA .....	35
5.6. VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	35
5.6.1. <i>Crítérios de identificação, limite de detecção (LD) e limite inferior de quantificação (LIQ)</i> 36	
5.6.2. <i>Imprecisão e Inexatidão</i> .....	37
5.6.3. <i>Linearidade</i> .....	37
5.6.4. <i>Interferência de matriz e de padrão interno</i> .....	38

5.6.5. Efeito residual (carryover).....	38
5.6.6. Seletividade.....	38
5.6.7. Recuperação.....	39
5.6.8. Efeito matriz.....	39
5.6.9. Estabilidade pós-processamento.....	39
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>39</b>
6.1.1. Dispositivo <i>Quantisal</i> ®.....	39
6.2. OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO .....	40
6.3. ANÁLISES DE AMOSTRAS REAIS .....	50
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>57</b>
<b>8. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>58</b>
<b>9. ANEXOS .....</b>	<b>66</b>
9.1. CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITE DE ÉTICA.....	66

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Contextualização histórica e mudanças nas políticas de uso

A *Cannabis* é uma planta cuja utilização remonta a cerca de 4000 anos a.C., tendo sido originalmente cultivada na Ásia Central conforme indicado por achados arqueológicos que evidenciam sua utilização para a obtenção de fibras (1). Os primeiros registros de uso datam por volta de 2700 a.C., na China, onde foi reconhecida pelo imperador Shen Nung por suas propriedades medicinais (2). No contexto brasileiro, há registros históricos que apontam o uso da maconha desde a época das capitanias, no final do século XVII, inicialmente para a produção de fibras, e possivelmente para fins hipnóticos por parte da população escravizada (3).

Durante o século XIX, a *Cannabis* era amplamente utilizada no Brasil e em outros países ocidentais como parte de medicamentos farmacêuticos para tratar diversas doenças (4). No século XVIII, o cultivo da planta no Brasil contava com o apoio da coroa portuguesa, que visava estimular a produção de cordas para navios e impulsionar a balança comercial do país. A permissão concedida pelo Império português representou uma grande abertura para a entrada da maconha no Brasil, uma vez que a corte permitiu seu cultivo em regiões como Santa Catarina, Rio Grande de São Pedro, Rio de Janeiro, Curitiba e São Paulo (5).

Entretanto, o cenário político em relação à *Cannabis* sofreu mudanças significativas no século XX, especialmente durante a II Conferência Nacional sobre o Ópio, realizada em 1924. Essa conferência marcou um ponto de inflexão no entendimento e na abordagem do governo brasileiro em relação às drogas, pois representando o início de uma maior conscientização e regulação sobre seu uso (6). O Brasil também começou a abordar questões relacionadas ao uso de drogas, incluindo o debate sobre a maconha e suas implicações sociais e de saúde pública. A partir desse momento, o tema da maconha passou a ser mais frequentemente debatido em diversos fóruns, tanto governamentais quanto acadêmicos e sociais, sinalizando uma crescente preocupação com suas consequências e a necessidade de políticas mais eficazes para lidar com o fenômeno do consumo de drogas no país.

Influenciado por eventos internacionais como a implementação da Lei Fiscal da Marihuana nos Estados Unidos em 1937 (4), o Brasil promulgou, em 1976, a Lei de Tóxicos, também conhecida como Lei Antidrogas, que representou um marco na legislação brasileira relacionada ao controle e combate ao uso de substâncias ilícitas. Esta lei refletiu uma tendência internacional de endurecimento das políticas antidrogas. Assim, a partir da década de 1970, a proibição da maconha

no Brasil se intensificou, com a adoção de medidas legais mais restritivas e uma postura mais punitiva em relação ao seu cultivo, comércio e uso (7).

Nas últimas décadas, observa-se uma mudança gradual nas políticas relacionadas à *Cannabis*, impulsionada por novas pesquisas científicas que destacaram seus potenciais benefícios médicos. Estudos têm demonstrado a eficácia da planta no tratamento de condições como epilepsia refratária, esclerose múltipla, dor crônica e náuseas decorrentes da quimioterapia (8). Em resposta a esses avanços e à crescente conscientização sobre os potenciais terapêuticos, diversos países têm adotado políticas mais permissivas.

No Brasil, o processo político em torno da regulamentação da *Cannabis* é complexo e evoluiu significativamente ao longo dos anos. A evolução do cenário da *Cannabis* medicinal no Brasil iniciou-se com a Portaria nº 344, emitida em 1998 pelo Ministério da Saúde, que estabeleceu regras para o controle e fiscalização de substâncias sujeitas a controle especial, incluindo a *Cannabis* na Lista E, com severas restrições ao seu uso e prescrição (8). Em 2006, a Lei nº 11.343, conhecida como Lei de Drogas, foi promulgada. Esta lei endureceu as penalidades para o tráfico e o uso de drogas ilícitas, incluindo a *Cannabis*. Embora não tratasse especificamente da *Cannabis* medicinal, a legislação refletiu uma postura mais rígida do governo em relação ao controle de substâncias entorpecentes (9).

Um marco importante ocorreu em 2014, quando o Conselho Federal de Medicina emitiu a Resolução nº 2.113, autorizando médicos a prescreverem medicamentos à base de CBD, um dos componentes da *Cannabis*, para o tratamento de epilepsias refratárias. Esta resolução foi um passo significativo para o reconhecimento do potencial terapêutico da *Cannabis* (10). A partir de 2015, a Anvisa emitiu uma série de resoluções que flexibilizaram o acesso a medicamentos à base de *Cannabis* no Brasil. A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 3/2015 incluiu o canabidiol na lista de substâncias controladas da Portaria nº 344, permitindo sua prescrição e uso medicinal. A RDC nº 17/2015 permitiu autorizações excepcionais para a importação de produtos à base de CBD, facilitando o acesso dos pacientes a tratamentos inovadores (11,12).

Em 2019, a Anvisa publicou a RDC nº 327, estabelecendo regras para autorização sanitária para produção e comercialização de produtos derivados de *Cannabis* no Brasil. Esta resolução criou um arcabouço regulatório robusto para o mercado de *Cannabis* medicinal, definindo critérios de qualidade, segurança e eficácia que os produtos devem cumprir para serem comercializados no país ((13).

A RDC nº 335/2020 simplificou os critérios e a burocracia para a importação de produtos à base de *Cannabis*, facilitando o acesso dos pacientes aos tratamentos. Em 2021, a RDC nº 570 alterou artigos da RDC nº 335 e automatizou os processos de importação, tornando-os mais eficientes e menos onerosos para os pacientes. Em 2022, a Anvisa consolidou as RDCs nº 335 e nº 570 na RDC nº 660, harmonizando e simplificando ainda mais os procedimentos de importação. Além disso, a RDC nº 659 trouxe novos controles para a importação e exportação de substâncias e plantas sujeitas a controle especial, assegurando um sistema mais robusto de monitoramento e fiscalização (14–17).

Em 2023, ocorreram vários desenvolvimentos importantes no cenário da *Cannabis* no Brasil. O Supremo Tribunal Federal (STF) iniciou a votação sobre a descriminalização do porte de pequenas quantidades de maconha para uso pessoal, formando maioria a favor da medida, com a decisão finalizada em 25 de junho de 2024. O Supremo julgou a constitucionalidade do Artigo 28 da Lei de Drogas (Lei 11.343/2006), definindo 40 gramas de maconha ou seis plantas fêmeas como critério objetivo para diferenciar o usuário de maconha do traficante e confirmou que o plantio de maconha para extração de óleo medicinal não configura tráfico de drogas, desde que comprovada a necessidade de tratamento (9).

O governador de São Paulo sancionou a Lei 17.859, garantindo o fornecimento de *Cannabis* pelo Sistema Único de Saúde (SUS), estabelecendo um precedente para outros estados. A Anvisa também implementou regulamentações que facilitaram o acesso aos produtos de *Cannabis* medicinal, com mais de 25 produtos autorizados para venda em farmácias (18). Esta medida representou um avanço significativo na regulamentação da *Cannabis* medicinal no país, abrindo caminho para uma maior produção nacional de medicamentos à base de *Cannabis* e ampliando o acesso dos pacientes a esses tratamentos.

Apesar desses avanços, o uso recreativo da maconha permanece um tema polêmico tanto no Brasil quanto em várias partes do mundo. No Brasil, a legislação continua rígida, com a posse e o consumo sendo tratados como delitos menores, puníveis com advertências, prestação de serviços à comunidade ou participação em programas educativos. Contudo, há um movimento crescente de ativistas e alguns políticos que pressionam por uma descriminalização mais ampla e até mesmo pela legalização. O processo político e regulatório da *Cannabis* no Brasil exemplifica como a política pública pode evoluir para atender às demandas sociais e científicas. Desde a inclusão da *Cannabis* na lista de substâncias controladas pela Portaria nº 344 até a recente aprovação do cultivo controlado para fins medicinais, o Brasil tem avançado para uma abordagem mais equilibrada. A evolução

normativa reflete o compromisso do país em garantir a segurança pública, promover a saúde e responder aos avanços científicos no campo da *Cannabis* medicinal.

No cenário global, há uma tendência crescente de legalização e descriminalização, especialmente em países como o Canadá, Uruguai e vários estados dos Estados Unidos, onde a regulação e a comercialização da maconha são legalizadas para uso recreativo. Essas mudanças refletem uma mudança de paradigma, onde a abordagem tradicional de repressão ao uso de drogas está sendo substituída por políticas focadas em redução de danos e controle do mercado, com o intuito de diminuir a criminalidade e aumentar a arrecadação fiscal.

## **1.2. Importância da análise de canabinoides**

O uso da *Cannabis*, apesar de seus reconhecidos benefícios terapêuticos, carrega consigo uma série de riscos que demandam atenção. Destaca-se, primordialmente, o potencial desenvolvimento de dependência, com estudos indicando uma prevalência significativa, especialmente entre os usuários que iniciam o consumo durante a adolescência. Adicionalmente, a interrupção do uso pode desencadear sintomas de abstinência, como irritabilidade e insônia, contribuindo para a manutenção do hábito. Aspectos cognitivos também são afetados, com relatos consistentes de déficits em memória, atenção e função executiva, sendo os adolescentes particularmente suscetíveis a esses efeitos devido ao processo de desenvolvimento cerebral.

Além disso, há um risco aumentado de desencadear ou agravar sintomas de transtornos psiquiátricos, como ansiedade, paranoia e psicose, especialmente em indivíduos geneticamente predispostos. No âmbito cardiovascular, observa-se um aumento da frequência cardíaca e pressão arterial, o que pode predispor a eventos cardiovasculares adversos, notadamente em pessoas com condições cardíacas preexistentes. A variabilidade na composição dos produtos de *Cannabis* medicinal também é uma preocupação, dificultando a titulação precisa das doses e expondo os pacientes a riscos de sub ou super tratamento. Estes achados ressaltam a importância de uma abordagem cautelosa e informada ao considerar o uso para fins terapêuticos (19–22).

Por isso, é de fundamental importância a existência de métodos que apresentem sensibilidade na detecção e precisão e exatidão na quantificação de fitocanabinoides da *Cannabis*, levando ao uso mais seguro e controlado. A precisão na detecção e quantificação desses compostos é crucial em várias áreas.

Na medicina e tratamento adequado de pacientes, a dosagem precisa do CBD é fundamental no tratamento de condições como a epilepsia, uma vez que a administração incorreta pode levar a efeitos adversos severos. O THC, por sua vez, deve ser quantificado corretamente para evitar efeitos psicoativos indesejados e assegurar o controle terapêutico de condições como dor crônica e esclerose múltipla. Estudos demonstram que a dosagem precisa desses compostos é essencial para garantir a eficácia do tratamento e minimizar os riscos para os pacientes (23).

As implicações legais e regulatórias são igualmente significativas. Nos Estados Unidos, por exemplo, a concentração de THC em produtos de *Cannabis* medicinal é estritamente regulada, com produtos que excedem o limite legal de 0,3% em peso seco sendo classificados como maconha e sujeitos a regulamentações mais rígidas, conforme estabelecido pelo Farm Bill de 2018 (24). No Brasil, a Anvisa estabelece requisitos rigorosos para o registro de produtos de *Cannabis* para fins medicinais, incluindo a comprovação da concentração exata de canabinoides, como definido na Resolução RDC N° 327 de 2019 (13). De acordo com o Art. 4° deste Resolução, os produtos de *Cannabis* contendo como ativos exclusivamente derivados vegetais ou fitofármacos da *Cannabis sativa*, devem possuir predominantemente, CBD e não mais que 0,2% de THC. A exceção à esta regra é apresentada no Parágrafo Único do artigo, onde é dito que “*os produtos de Cannabis poderão conter teor de THC acima de 0,2%, desde que sejam destinados a cuidados paliativos exclusivamente para pacientes sem outras alternativas terapêuticas e em situações clínicas irreversíveis ou terminais*” (13).

A demanda por métodos sensíveis e seletivos é crescente na pesquisa científica e na indústria de produtos à base de *Cannabis*. Métodos analíticos altamente sensíveis e seletivos, como a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS do inglês, *liquid chromatography-tandem mass spectrometry*) e a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS do inglês, *gas chromatography-mass spectrometry*), são essenciais para garantir a qualidade e segurança dos produtos. Essas técnicas permitem a quantificação precisa de compostos em níveis muito baixos, assegurando que os produtos estejam dentro dos padrões de segurança e qualidade estabelecidos. Estudos mostram que essas metodologias avançadas são capazes de detectar contaminantes em concentrações mínimas, garantindo a segurança dos consumidores (25).

Em resumo, a precisão na detecção e quantificação de canabinoides é essencial para a eficácia dos tratamentos médicos, o cumprimento das regulamentações legais e a segurança dos pacientes. Este campo está em constante evolução, apresentando desafios e oportunidades para a

pesquisa e a indústria. A adoção de métodos analíticos avançados e a contínua inovação são fundamentais para garantir que a segurança dos pacientes que consomem os produtos à base de *Cannabis*.

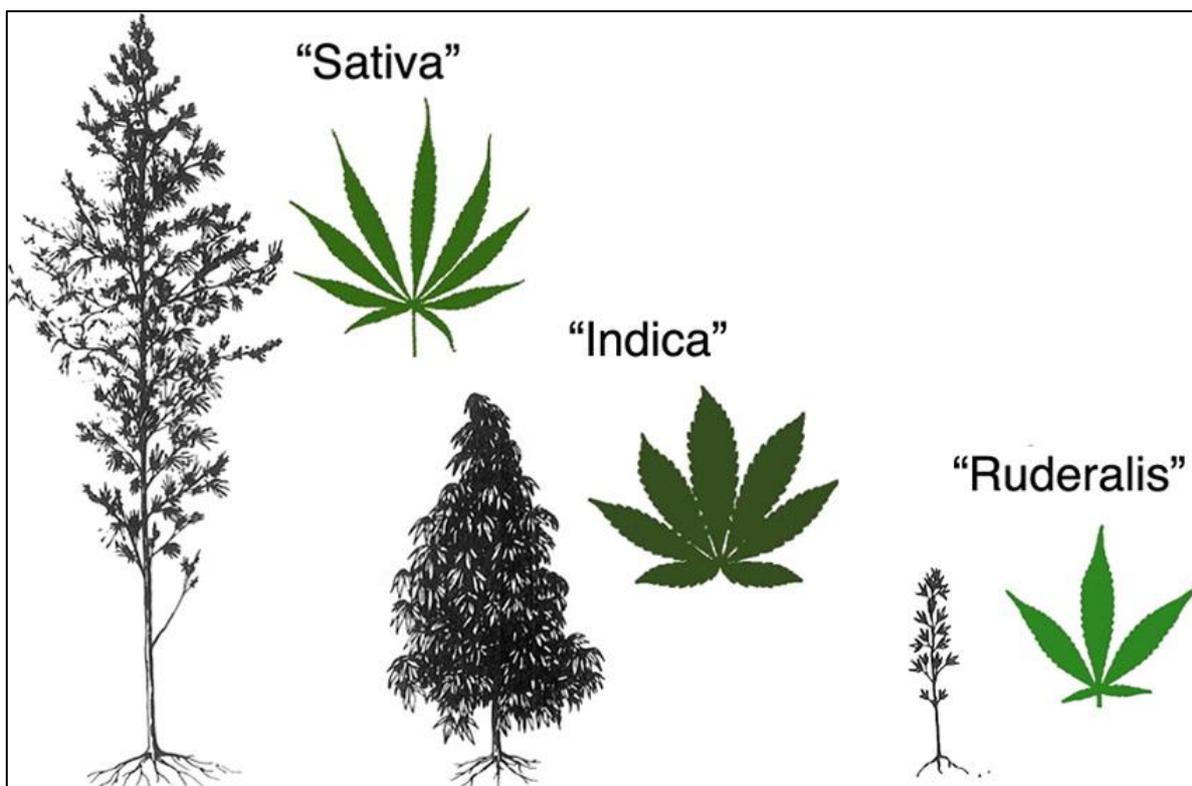
## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Características da *Cannabis*

*Cannabis sp* é pertencente da família Canabaceae e pertence ao gênero *Cannabis* onde existem diferentes variações dessa planta, sendo: *C. sativa*, *C. indica* e *C. ruderalis*. Suas especificações estão descritas na Tabela 1 e exemplificado na Figura 1. A espécie *C. sativa* é a mais conhecida, sua composição é notoriamente complexa, abrangendo diversas classes químicas, incluindo terpenos, carboidratos, ácidos graxos e seus ésteres, amidas, aminas, fitoesteróis, compostos fenólicos e canabinoides (26). A concentração de cada ingrediente farmacologicamente ativo em uma amostra é influenciada por fatores como a subespécie da planta, o método de secagem das folhas, o momento da colheita, a idade da planta, entre outros fatores (27).

**Tabela 1.** Análise comparativa entre as espécies *C. sativa*, *C. indica* e *C. ruderalis*.

<b>Espécie</b>	<b><i>Canabis sativa</i></b>	<b><i>Canabis indica</i></b>	<b><i>Canabis ruderalis</i></b>
<b>Descrição</b>	Arbusto frondoso, cheio de galhos com folhas serrilhadas	Plantas largas e baixas com forma de cone	Folhagem densa, estreita e longa
<b>Local</b>	África, América Central, sudeste Asiático e Ásia Ocidental	Afganistão, Índia, Paquistão e Turquia	Europa Oriental, Himalaia, Sibéria e Rússia
<b>Clima</b>	Quente e úmido	Quente e seco	Ambientes extremos
<b>Teor de canabinoides</b>	Níveis baixos de CBD e altos de THC	Níveis altos de CBD e baixos de THC	Níveis altos de CBD e baixos de THC



**Figura 1** Comparação morfológica entre as subespécies de *Cannabis*: (da esquerda para a direita) *Cannabis sativa*, descrita por sua altura elevada e folhas finas; *Cannabis indica*, de porte mais baixo e folhas largas; *Cannabis ruderalis*, a menor das subespécies com folhas e estrutura compacta (28).

Os canabinoides são sintetizados nos tricomas glandulares da planta, localizados nas inflorescências femininas, e são terpenofenólicos  $C_{21}$  ou  $C_{22}$  (29). Na maioria das variedades de *Cannabis*, os canabinoides mais abundantes são os precursores ácidos, ou seja, carboxílicos, de  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol e CBD, que são convertidos em THC e CBD por secagem ou aquecimento. A *Cannabis* contém mais de 110 fitocannabinoides, THC, CBD, CBN, canabigerol (CBG) e seus análogos são altamente abundantes outros também foram identificados, mas suas propriedades farmacológicas ainda aguardam esclarecimento (22).

### 2.1.1. $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC)

O THC, é considerado o principal componente responsável pelos efeitos farmacológicos psicoativos da *Cannabis*. Sendo lipofílico e insolúvel em água (Log P 7,6), este composto está sujeito a processos de degradação térmica e fotolítica (30). Sua absorção varia conforme a via de administração, incluindo inalação, ingestão oral, administração oftálmica, retal, sublingual e dérmica. Além de seus efeitos psicoativos, o THC também possui potencial terapêutico, como analgesia,

relaxamento muscular, sedação e estímulo do apetite. No entanto, é importante destacar que seu uso regular pode resultar em dependência e em síndrome de abstinência leve (31–33).

O THC atua como um agonista parcial dos receptores canabinoides CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>. Mudanças comportamentais, modulação da dor e sensibilidade térmica, regulação do humor, apetite e atividade sexual, bem como propriedades terapêuticas, derivam, em grande parte, da interação do THC com esses receptores (34).

### **2.1.2. Canabidiol (CBD)**

O CBD é um fitocanabinoide não psicoativo que vem sendo amplamente estudado devido às suas diversas propriedades terapêuticas. Este composto apresenta efeitos neuroprotetores, antiepilépticos, ansiolíticos, antipsicóticos, anti-inflamatórios, analgésicos e anticancerígenos. O CBD atua em vários receptores, incluindo CB<sub>1</sub>, CB<sub>2</sub>, GPR55, TRPV e PPAR $\gamma$ , modulando suas atividades, embora tenha baixa afinidade pelos sítios de ligação do THC em CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> (21).

Aprovado para o tratamento de epilepsias raras e apresentando efeitos adversos mínimos em comparação com tratamentos tradicionais, estudos clínicos demonstram os benefícios do CBD para distúrbios psicóticos, ansiedade, epilepsia, sono, doenças cardiovasculares, diabetes, manejo da dor e tratamento do câncer (21). No entanto, é crucial considerar os efeitos adversos e possíveis interações medicamentosas, uma vez que, é metabolizado no fígado e no intestino por enzimas do citocromo P450 e UGT, podendo inibir ou induzir o metabolismo de outros medicamentos, o que explica a interação farmacocinética entre o THC e o CBD (20).

### **2.1.3. Canabinol (CBN)**

No contexto de sua interação com o sistema endocanabinoide, o CBN atua como um agonista parcial dos receptores canabinoides CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>. Essa interação desencadeia uma série de efeitos fisiológicos, como percepção da dor, inflamação, resposta imune e neuroproteção. O CBN também demonstra capacidade de reduzir o estresse oxidativo e inibir mediadores inflamatórios, contribuindo para seus efeitos neuroprotetores. Além disso, seu potencial antimicrobiano é evidenciado pela capacidade de combater bactérias, fungos e cepas resistentes de *Staphylococcus aureus*. A compreensão dessas interações e efeitos biológicos do CBN destaca sua importância como um alvo promissor para o desenvolvimento de terapias futuras (35)

## **2.2. Sistema endocanabinoide**

O sistema endocanabinoide (SEC) é um complexo sistema neuromodulador envolvido em diversos processos cognitivos e fisiológicos. O SEC é composto por endocanabinoides, enzimas responsáveis pela síntese e degradação desses endocanabinoides e receptores canabinoides. Ele desempenha um papel central no desenvolvimento do sistema nervoso, modulando a atividade neuronal e a função da rede no sistema nervoso maduro. Os receptores canabinoides são os principais alvos do THC. A importância do SEC na saúde é destacada pela sua influência em processos neurológicos e fisiológicos críticos, tornando-se essencial para a manutenção do equilíbrio corporal e a modulação de várias funções biológicas (22,36).

Os endocanabinoides são moléculas lipídicas endógenas que atuam como neurotransmissores. Os dois principais endocanabinoides são a anandamida (AEA) e o 2-araquidonoilglicerol (2-AG) (37).

A AEA é um endocanabinoide derivado de lipídios de membrana que contém ácido araquidônico e possui diversas funções biológicas. Seus efeitos são mediados principalmente pelos receptores canabinoides CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>, e pelo receptor de potencial transitório vaniloide tipo 1 (TRPV1). A anandamida está envolvida em padrões de sono e alimentação, além de aumentar o prazer e aliviar a dor. Sua biossíntese envolve a ligação do ácido araquidônico previamente ligado à membrana e uma fosfatidiletanolamina formando N-arachadonoil fosfatidiletanolamina (NArPE), liberada posteriormente por uma série de fosfolipases. A manipulação da anandamida é realizada por enzimas como a FAAH-1, que hidrolisa amidas de ácidos graxos em ácido araquidônico e etanolamina (38)

O 2-AG é um lipídio sinalizador endógeno que desempenha um papel crucial na regulação da liberação de neurotransmissores no sistema nervoso central, principalmente através da ativação dos receptores CB<sub>1</sub>. Estudos indicam que o 2-AG está intimamente envolvido em uma variedade de processos fisiológicos e patológicos, incluindo a modulação da emoção, cognição, equilíbrio energético, percepção da dor e respostas neuroinflamatórias (39)

As enzimas que regulam a síntese e degradação dos endocanabinoides são cruciais para manter o equilíbrio do SEC. As principais enzimas envolvidas incluem a NAPE-PLD, responsável pela síntese da anandamida; a DAG-lipase (DAGL), envolvida na produção de 2-AG; a hidrolase de amidas de ácidos graxos (FAAH), que degrada a anandamida; e a lipase de monoacilglicerol (MAGL), que degrada o 2-AG (40). Essas enzimas garantem que os endocanabinoides sejam sintetizados e degradados conforme necessário, permitindo uma regulação precisa da sinalização canabinoide (36).

Os receptores canabinoides são proteínas presentes na superfície das células que mediam os efeitos dos endocanabinoides. Existem dois tipos principais de receptores canabinoides: CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>. Os receptores CB<sub>1</sub> são predominantemente encontrados no sistema nervoso central, incluindo o cérebro e a medula espinhal, e estão associados à modulação da dor, controle motor, memória e funções cognitivas (41). Eles são altamente expressos em áreas como o hipocampo, córtex cerebral e gânglios da base. Já os receptores CB<sub>2</sub> estão principalmente presentes no sistema imunológico e em tecidos periféricos, regulando a resposta imune e a inflamação. Esses receptores são encontrados em células imunológicas como macrófagos, células T e células B (42)

O SEC desempenha funções vitais em várias áreas biológicas. No desenvolvimento do sistema nervoso, ele influencia a neurogênese, migração neuronal e a formação de sinapses, além de regular a plasticidade sináptica, que é essencial para o aprendizado e a memória (22). Durante o desenvolvimento embrionário, regulam a proliferação e diferenciação de células neurais e guiam o crescimento axonal. No sistema nervoso maduro, modula a liberação de neurotransmissores, como GABA e glutamato, através da ativação dos receptores CB<sub>1</sub>, mantendo a homeostase sináptica e prevenindo a excitotoxicidade que pode levar à neurodegeneração (41)

A importância do SEC na saúde é destacada por sua influência em processos neurológicos e fisiológicos críticos. Ele participa na modulação do humor, apetite, dor, inflamação, memória e resposta ao estresse. Alterações na sinalização endocanabinoide têm sido associadas a diversas condições patológicas, incluindo distúrbios neuropsiquiátricos, doenças neurodegenerativas, obesidade e desordens metabólicas (22,43)

### **2.3. Aplicações clínicas e toxicológicas dos canabinoides**

Os canabinoides têm ganhado destaque no campo da medicina, principalmente no manejo da dor crônica. A aplicação mais notável é atribuída ao THC, que atua como analgésico potente ao interagir com os receptores canabinoides no sistema nervoso central. Estudos, como o realizado por Abrams em 2011 com pacientes com doença falciforme, demonstraram que a *Cannabis* vaporizada contendo THC e CBD reduziu significativamente a dor, com eficácia aumentada com o uso prolongado, embora os efeitos a longo prazo ainda necessitem de maior compreensão (44).

Além disso, o CBD apresenta eficácia em várias funções farmacológicas, destacando-se no tratamento de epilepsia refratária, como nas síndromes de Dravet e Lennox-Gastaut, onde pode reduzir tanto a frequência quanto a intensidade das crises convulsivas com poucos efeitos. Também

possui propriedades neuroprotetoras e anti-inflamatórias, úteis em condições como hipóxia-isquemia neonatal e outras doenças neurodegenerativas (45)

Em adição, os extratos de *Cannabis* que combinam THC e CBD têm se mostrado eficazes no tratamento de espasmos musculares associados à esclerose múltipla, melhorando tanto a mobilidade quanto a qualidade de vida dos pacientes afetados (46). No contexto gastrointestinal, os canabinoides têm potencial terapêutico significativo, especialmente no tratamento de náuseas induzidas por quimioterapia, doenças inflamatórias intestinais e sintomas associados a distúrbios motores complexos em pacientes pediátricos (19,47).

Em contrapartida aos benefícios terapêuticos, é essencial considerar os potenciais riscos associados ao uso de canabinoides. Embora estudos sugiram eficácia em várias condições médicas, os eventos adversos e a qualidade das evidências variam significativamente entre os diferentes tipos de canabinoides estudados. Essa dualidade apresenta a necessidade contínua de pesquisa para avaliar não apenas os benefícios, mas também os potenciais efeitos adversos dos tratamentos baseados em *Cannabis*, garantindo assim decisões clínicas fundamentadas e seguras em diferentes contextos clínicos.

Embora esses usos terapêuticos sejam assegurados por uma grande quantidade de pesquisas científicas, ainda há necessidade de mais estudos para ampliar e solidificar o perfil terapêutico da *Cannabis* medicinal. Estudos são necessários para entender melhor os mecanismos de ação dos fitocannabinoides, determinar doses ideais e avaliar a segurança a longo prazo do uso de *Cannabis* em diferentes populações de pacientes. Ainda que ofereça benefícios terapêuticos importantes, o uso da *Cannabis* está associado a diversos riscos que devem ser considerados ((20,23).

No curto prazo, observa-se comprometimento da memória de curto prazo, diminuição da coordenação motora, alteração no julgamento e, em doses elevadas, potencial para desenvolver paranoia e psicose. Por outro lado, o uso prolongado ou pesado está associado ao risco de vício, alterações no desenvolvimento cerebral, piora no desempenho educacional, prejuízo cognitivo, redução da satisfação de vida, sintomas de bronquite crônica e aumento da propensão a distúrbios psicóticos crônicos. Sobretudo, evidencia-se a vulnerabilidade do cérebro adolescente aos efeitos adversos do THC, reforçando a importância de considerar cuidadosamente os riscos potenciais associados ao consumo de *Cannabis*, especialmente entre os jovens (33).

Destaca-se ainda que cerca de 9% dos usuários podem desenvolver dependência, com essa porcentagem aumentando para cerca de 17% entre aqueles que começam a usar durante a

adolescência. Ao interromper o uso os pacientes apresentam sintomas de abstinência, como irritabilidade, insônia e perda de apetite, o que pode dificultar a interrupção do tratamento (48). Estudo realizado na Nova Zelândia sobre os efeitos do uso persistente de *Cannabis* na função neuropsicológica mostraram que usuários persistentes da droga apresentaram declínio em múltiplos domínios neuropsicológicos. Esse prejuízo foi mais pronunciado entre indivíduos que iniciaram o uso na adolescência, associando-se a um maior declínio conforme o uso se tornava mais prolongado. Os achados indicam um efeito neurotóxico da *Cannabis* no cérebro adolescente. Além disso, observou-se que a cessação do uso não resultou em uma completa recuperação da função neuropsicológica desses adolescentes (49). Outro risco importante é a possibilidade de induzir ou aumentar sintomas de ansiedade, paranoia e psicose. Indivíduos com predisposição genética para transtornos psicóticos, como a esquizofrenia, estão particularmente em risco. A exposição ao THC pode precipitar episódios psicóticos em pessoas vulneráveis e está associada a um aumento no risco de desenvolver esquizofrenia (50).

Além desses riscos, a variabilidade na composição dos produtos de *Cannabis* medicinal pode resultar em efeitos imprevisíveis, uma vez que a planta é constituída por mais de 60 canabinoides diferentes, essa diversidade química pode levar a uma grande variabilidade na composição dos produtos derivados da planta alterando também as concentrações entre diferentes produtos, o que dificulta a dosagem precisa e consistente. Essa variabilidade pode levar a casos de sub tratamento ou super tratamento dos sintomas, comprometendo a eficácia e segurança do tratamento (51).

Diante desses riscos, é fundamental que o uso de *Cannabis* medicinal seja acompanhado por profissionais de saúde, que possam monitorar os efeitos terapêuticos e adversos, ajustar as doses conforme necessário e educar os pacientes sobre os potenciais riscos associados ao tratamento. A regulamentação rigorosa e a pesquisa contínua são essenciais para garantir a segurança e eficácia da *Cannabis* medicinal, maximizando seus benefícios enquanto minimizam os riscos. A análise de fitocanabinoides em fluidos biológicos, permite o monitoramento da exposição e a avaliação da eficácia e segurança dos tratamentos à base de *Cannabis* fornecendo dados críticos sobre a quantificação precisa desses compostos, podendo ser realizada em diversas matrizes biológicas como em sangue, urina, saliva permitindo o monitoramento dos níveis terapêuticos e a identificação de possíveis concentrações tóxicas (52). Além disso, esses dados são fundamentais para entender a variabilidade interindividual na resposta à *Cannabis*, possibilitando a personalização dos tratamentos e a otimização das doses para maximizar os benefícios e minimizar os riscos (51,52). A compreensão aprofundada dos efeitos da *Cannabis* e a capacidade de monitorar seus componentes ativos em

matrizes biológicas são fundamentais para maximizar os benefícios e amenizar os riscos associados ao seu uso. Portanto, a pesquisa contínua e o desenvolvimento de métodos analíticos avançados são essenciais para apoiar tanto o uso medicinal seguro quanto a regulamentação informada da *Cannabis*.

## **2.4. Métodos de detecção de canabinoides**

### **2.4.1. Matrizes Biológicas**

As amostras biológicas são materiais coletados do corpo humano ou animal para análise laboratorial que são essenciais para avaliar a presença e concentração de substâncias. A escolha da amostra biológica adequada é crucial para obter resultados precisos e confiáveis na detecção de canabinoides.

A urina é amplamente utilizada devido à sua facilidade de coleta e custo-benefício, sendo uma opção confiável para testes de drogas devido à sua janela de detecção prolongada, permitindo a identificação de metabólitos de canabinoides por até 95 dias após o uso. Além disso, proporciona informações cruciais sobre a exposição recente a substâncias psicoativas. No entanto, existem desafios significativos a serem considerados. A urina não é ideal para detectar o uso recente de *Cannabis* devido a fatores como a frequência de uso da substância, o momento da coleta da amostra, a quantidade de gordura corporal e a diluição da urina, o que pode comprometer a precisão dos resultados (52,53).

Além disso, há sempre o risco de adulteração ou substituição da amostra em ambientes não controlados, o que pode afetar a confiabilidade dos testes. Outra questão é a invasão de privacidade que pode ocorrer durante a coleta, especialmente em contextos em que o procedimento não é realizado com o devido cuidado (52,53).

A análise de sangue é reconhecida por fornecer informações precisas sobre o uso recente de drogas, possibilitando avaliar com exatidão o nível de influência das substâncias no organismo. Além disso, permite estabelecer correlações entre os níveis de drogas detectados e os sintomas observados ou o grau de comprometimento do indivíduo. No entanto, existem desafios significativos. A coleta de amostras de sangue é um procedimento invasivo que requer pessoal especializado para sua realização, o que pode representar uma limitação em alguns contextos. (52–55).

A detecção de canabinoides por meio do fluido oral é uma abordagem que apresenta tanto vantagens quanto desvantagens significativas nos testes de drogas. Entre as principais vantagens, destaca-se a coleta sempre observada, o que dificulta qualquer tentativa de adulteração dos resultados.

A facilidade de coleta é outro ponto positivo, já que não são necessárias instalações especiais, como banheiros, para a realização do teste. Isso simplifica o processo e pode reduzir custos operacionais quando a coleta é feita pelo empregador. A capacidade de detectar drogas rapidamente após sua absorção pelo corpo é uma vantagem crucial, proporcionando resultados praticamente em tempo real. Isso é particularmente útil em contextos em que a detecção imediata é necessária. Por outro lado, algumas limitações precisam ser consideradas. (54,56)

O termo fluido oral não é sinônimo de saliva. A saliva é produzida pelas glândulas salivares, como as glândulas parótidas, sendo uma secreção aquosa rica em enzimas. Ela contém enzimas digestivas, como a amilase salivar, que iniciam a digestão de carboidratos. Além disso, auxilia na lubrificação da boca e na manutenção da saúde dos tecidos orais. Já o fluido oral engloba todas as secreções presentes na cavidade oral, incluindo a saliva e outras como o fluido gengival. Sua composição pode variar conforme a glândula secretora e o contexto fisiológico.

O fluido oral geralmente possui uma janela de detecção mais curta em comparação com a urina, o que significa que algumas drogas podem ser detectadas por um período mais limitado de tempo (54,56). Em geral, o tetrahydrocannabinol (THC), o principal composto psicoativo da cannabis, pode ser detectado no fluido oral por até 24 horas após o uso único. No caso de usuários frequentes, essa janela pode se estender para até 72 horas (57). Quanto às concentrações, os níveis de THC no fluido oral geralmente variam de 1 a 50 ng/mL logo após o uso. No entanto, esses níveis podem diminuir rapidamente com o tempo além disso, as metodologias de análise, especialmente a cromatografia gasosa, podem enfrentar dificuldades na identificação e quantificação de canabinoides ácidos devido a interferências da matriz biológica.

#### **2.4.2. Técnicas de extração**

A preparação da amostra é importante para o método geral no que diz respeito ao aumento da sensibilidade e à redução de possíveis interferências da matriz da amostra (58). A extração em fase sólida (SPE) e a microextração em fase sólida (SPME) são os métodos mais utilizados para a análise de canabinoides em matrizes biológicas, devido à sua eficiência e capacidade de proporcionar amostras de alta qualidade para análise. No entanto, a técnica de extração líquido-líquido (LLE), também oferece vantagens significativas, como a simplicidade do procedimento e a possibilidade de adaptação a diferentes tipos de amostras.

A SPE é uma técnica que oferece alta reprodutibilidade e facilidade de automação. Uma de suas principais vantagens é a capacidade de reduzir significativamente a quantidade de solvente utilizada em comparação com a LLE. Este método é particularmente adequado para amostras líquidas com baixas concentrações de compostos-alvo, tornando-o ideal para a análise de canabinoides e seus metabólitos. A SPE envolve a passagem da amostra líquida através de um material adsorvente sólido que retém os compostos de interesse. Posteriormente, esses compostos são eluídos do material adsorvente utilizando um solvente adequado, permitindo sua concentração e purificação antes da análise. Quando a amostra é de urina ou soro, a SPE pode ser aplicado diretamente na amostra sem etapa prévia de extração (58).

A SPME é uma técnica que não requer o uso de solventes e funciona como um método de concentração, podendo ser integrada diretamente ao cromatógrafo a gás. Esta técnica tem sido utilizada para a análise de canabinoides em várias matrizes biológicas, como cabelo e saliva. Na SPME, uma fibra revestida com um adsorvente é exposta à amostra ou ao seu vapor, onde os compostos de interesse são adsorvidos na fibra. Posteriormente, a fibra é inserida no injetor do GC, onde os compostos são desorvidos termicamente e analisados ((58).

A extração líquido-líquido envolve a distribuição dos componentes da amostra entre duas fases líquidas imiscíveis, buscando alta seletividade na partição do analito em relação aos interferentes. Seus objetivos principais incluem a limpeza das amostras e a pré-concentração dos componentes analíticos. Esta técnica oferece capacidades significativas de amostra linear e permite que o extrato orgânico seja diretamente submetido a etapas analíticas quantitativas, como cromatografia a gás ou líquida. Apesar de apresentar desafios clássicos, como a formação de emulsões e a geração de resíduos de solvente orgânico, a LLE continua sendo amplamente utilizada devido às suas vantagens estabelecidas e ao desenvolvimento contínuo de métodos alternativos que melhoram sua eficiência e aplicabilidade (59).

Embora técnicas como a extração em fase sólida sejam amplamente utilizadas na extração de canabinoides de matrizes biológicas devido à sua alta seletividade e sensibilidade, a escolha pela extração líquido-líquido neste estudo foi baseada em vários fatores. A LLE é uma técnica menos dispendiosa e mais simples de implementar, especialmente em laboratórios com recursos limitados. Além disso, permite o processamento de grandes volumes de amostra de forma relativamente rápida, o que é benéfico quando se trabalha com fluidos biológicos como o fluido oral, que pode estar disponível em quantidades limitadas.

A extração líquido-líquido é amplamente reconhecida e utilizada como um método eficaz para a extração de canabinoides de diversas matrizes biológicas, incluindo sangue humano, além de alimentos, bebidas e águas residuais. Esta técnica é frequentemente escolhida devido à sua alta eficácia na separação de compostos em matrizes complexas, permitindo a obtenção de analitos de interesse com alta pureza e eficiência. A extração líquido-líquido é particularmente valiosa em contextos em que as amostras contêm uma variedade de componentes interferentes, pois ela permite uma separação eficiente baseada nas diferenças de solubilidade entre as fases aquosa e orgânica (60).

No campo da detecção de canabinoides, como o THC e o CBD, a hidrólise desempenha um papel crucial ao converter os ácidos canabinoides, como o THCA e o CBDA, em suas formas neutras (THC e CBD). Este processo é fundamental, pois os ácidos canabinoides possuem menor volatilidade e são mais difíceis de detectar diretamente. A hidrólise pode ser realizada por dois métodos principais: a hidrólise ácida, que utiliza ácidos fortes como o ácido clorídrico para promover a conversão dos ácidos em suas formas neutras, oferecendo um processo rápido e eficiente, porém com a necessidade de cuidados especiais devido ao uso de reagentes corrosivos; e a hidrólise enzimática, que faz uso de enzimas específicas para catalisar a conversão de maneira mais suave e com menor risco de degradação dos compostos. A hidrólise proporciona vantagens significativas, como maior sensibilidade na detecção, uma vez que os canabinoides neutros são mais facilmente identificáveis por técnicas analíticas como HPLC e GC, além de melhorar a precisão e a exatidão das medições, resultando em dados mais confiáveis. Adicionalmente, a hidrólise é compatível com uma variedade de métodos analíticos, permitindo sua aplicação em diversas amostras e configurações laboratoriais. No entanto, esse processo também apresenta desvantagens, incluindo a complexidade adicional no processo de extração, o risco de degradação dos canabinoides se não for bem conduzida, e a necessidade de reagentes químicos que podem exigir precauções de segurança, especialmente no caso da hidrólise ácida(61,62).

### **2.4.3. Técnicas analíticas**

Historicamente, as técnicas mais utilizadas para a análise de canabinoides incluem cromatografia líquida (LC) e gasosa (GC), muitas vezes acopladas a espectrometria de massas (MS), proporcionando separação e identificação robustas. A LC é frequentemente preferida devido à sua capacidade de lidar com amostras complexas e à sua sensibilidade na detecção de compostos polares como o CBD. Por outro lado, a GC-MS é altamente eficiente na análise de compostos voláteis, como o THC.

A cromatografia gasosa (GC) é uma técnica analítica de grande importância, especialmente valorizada na análise de canabinoides devido à sua eficiência e precisão na separação e determinação de compostos voláteis e/ou volatilizáveis. Inicialmente, a amostra é introduzida em um injetor aquecido utilizando uma micro-seringa, onde é vaporizada e transportada pelo gás de arraste até a coluna cromatográfica, localizada dentro de um forno pré-aquecido. Os componentes da amostra são eluídos e direcionados ao detector conectado à saída da coluna. O detector gera um sinal elétrico que é registrado graficamente na forma de picos (63). Na análise de canabinoides, a GC desempenha um papel crucial na distinção entre diferentes compostos. A derivatização pode ser necessária para melhorar a volatilidade e a separação de certos analitos, garantindo uma análise mais precisa e eficiente.

A cromatografia líquida (LC) é uma técnica analítica de grande relevância e versatilidade, amplamente empregada na separação de componentes em misturas complexas. Utilizando uma fase líquida como meio estacionário, a LC permite a separação eficiente e a determinação qualitativa e quantitativa de compostos presentes em produtos naturais. Na análise de canabinoides, a LC é particularmente valorizada devido à sua capacidade de separar e quantificar esses compostos com precisão. O processo envolve a aplicação de alta pressão para forçar a amostra através de uma coluna estreita e em alguns casos, longa. A separação dos componentes ocorre com base na interação destes com a fase estacionária, resultando em uma análise detalhada e precisa dos compostos presentes na amostra (64).

A MS é uma técnica analítica que envolve várias etapas cruciais para a identificação e quantificação de compostos químicos. O processo começa com a ionização, onde a amostra é convertida em íons carregados, geralmente por técnicas como ionização por electrospray (ESI) ou ionização a laser assistida por matriz (MALDI). Esses íons são então direcionados para o analisador de massas, que separa os íons com base na sua razão massa/carga ( $m/z$ ). Existem diferentes tipos de analisadores, como quadrupolos, tempo de voo (TOF) e orbitraps, cada um com suas especificidades e aplicações. Após a separação, os íons são detectados e convertidos em um sinal elétrico que é processado e exibido como um espectro de massas. Este espectro fornece informações detalhadas sobre a composição molecular da amostra. No contexto da detecção de canabinoides em matrizes biológicas, a MS é extremamente eficaz, permitindo a identificação precisa de compostos como THC e CBD, mesmo em concentrações muito baixas (65,66).

Na análise de CBD, THC e seus produtos de biotransformação, a LC-MS/MS destaca-se como uma metodologia eficaz. Esta técnica combina a separação cromatográfica com a detecção por espectrometria de massas, permitindo a identificação e quantificação de múltiplos analitos em matrizes complexas, como o fluido oral.

Durante a fase de separação cromatográfica, a LC possibilita a separação dos analitos com base em suas propriedades físico-químicas, tais como polaridade e tamanho molecular, eliminando interferentes. Após a separação cromatográfica, os analitos são direcionados ao espectrômetro de massas, onde ocorre a detecção e quantificação. Esta etapa baseia-se na comparação das características de massa e fragmentação dos analitos com padrões de referência previamente caracterizados, permitindo a identificação dos compostos de interesse e a determinação de suas concentrações em amostras desconhecidas, com base na intensidade dos sinais de íons específicos (64)

Em síntese, a combinação da LC com a MS/MS oferece um método analítico robusto e confiável para a detecção e quantificação de CBD, THC e seus metabólitos. Esta abordagem atende às exigências de monitoramento desses compostos em diversas áreas, incluindo saúde pública, segurança do paciente e aplicações forenses (64)

### 3. JUSTIFICATIVA

A análise precisa de canabinoides, como o CBD e o THC, e seus metabólitos em fluido oral é importante para várias áreas da ciência e da saúde pública. A *Cannabis* tem uma longa história de uso, tanto medicinal quanto recreativo, e, nos últimos anos, houve um crescente interesse em suas propriedades terapêuticas. No entanto, o seu uso, está associado a uma série de desafios e riscos que demandam uma abordagem científica rigorosa para a detecção e quantificação dos compostos ativos presentes na planta.

A implementação de um método analítico como a LC-MS/MS é essencial para garantir a precisão e a confiabilidade na detecção e quantificação de canabinoides em fluido oral. Este tipo de análise é importante para diversas aplicações, incluindo estudos de farmacocinética, monitoramento de terapias, pesquisas sobre os efeitos do uso de *Cannabis* no organismo humano e programas de prevenção de uso indevido de substâncias.

Na medicina, a detecção precisa de canabinoides auxilia no ajuste de tratamentos e minimizar riscos. Além disso, no contexto legal, métodos confiáveis de detecção são indispensáveis

para a aplicação de leis relacionadas ao uso de substâncias psicoativas, como a *Cannabis*, permitindo uma fiscalização eficaz e justa.

A escolha do fluido oral como matriz biológica para análise é particularmente relevante devido à facilidade da coleta de amostras, não sendo invasiva, tornando-a uma opção preferível para monitoramento em diversas situações, como no trânsito, no ambiente de trabalho, em festas e em contextos clínicos. Além disso, a pesquisa contínua e a inovação em métodos analíticos contribuem para um melhor entendimento dos efeitos da *Cannabis* no organismo humano, informando políticas públicas e práticas clínicas baseadas em evidências. A precisão na detecção de canabinoides também permite a realização de estudos epidemiológicos que podem guiar estratégias de saúde pública para lidar com os desafios e impactos do uso de *Cannabis* na sociedade.

#### **4. OBJETIVO**

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver e validar um método analítico sensível, preciso e exato para a detecção e quantificação de CBD, THC e seus produtos de biotransformação em fluido oral utilizando LC-MS/MS.

O método desenvolvido foi aplicado para determinação da concentração de canabinoides em fluido oral de participantes de festas e festivais de música.

#### **5. MATERIAIS E MÉTODOS**

##### **5.1. Reagentes, solventes e materiais de referência**

Os reagentes utilizados nas análises cromatográficas e no preparo de amostras [metanol, acetonitrila, éter butílico terciário metílico (MTBE), ácido fórmico, acetato de amônio, tetraborato de sódio (TBS) e formiato de amônio] foram adquiridos da empresa Merck (Darmstadt, Alemanha) ou Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). A água ultrapura foi obtida por sistema Milli-Q RG da Millipore (Billerica, MA, EUA).

Materiais certificados de referência de canabidiol (CBD),  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC) e seus respectivos produtos de biotransformação 7-hidroxicanabidiol (7-OH-CBD), 7-carboxicanabidiol (7-COOH-CBD), 11-hidroxi- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (11-OH-THC) e canabinol (CBN) foram obtidos através da Cerilliant (Texas, EUA), o 11-nor-9-carboxi- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC-COOH) foi adquirido da Lipomed (Arlesheim, Suíça). Os análogos isotopicamente marcados CBD- $d_3$  e THC- $d_3$  (utilizados como padrões internos) foram adquiridos da Cerilliant (Texas, EUA) e

Supelco (Darmstadt, Alemanha), respectivamente. Os dispositivos de coleta de fluido oral Quantisal<sup>®</sup> e o tampão de eluição foram adquiridos da Immunalysis (Pomona, CA, EUA).

Os dispositivos de fluido oral Quantisal<sup>®</sup> (Figura 2) foram usados para todas as coletas de amostras autênticas e para os experimentos de desenvolvimento e validação do método foi utilizado o tampão de eluição Quantisal<sup>®</sup> adicionado ao fluido oral na proporção de 3:1 respectivamente.



**Figura 2.** Imagem do dispositivo de coleta de fluido oral Quantisal<sup>®</sup>

### 5.1. Soluções estoque, soluções de trabalho e solução de padrão interno

As soluções de estoque dos analitos foram preparadas a partir de diluições dos materiais de referência certificados, utilizando metanol grau HPLC como diluente. Essas soluções em estoque foram então utilizadas para preparar as soluções de trabalho dos calibradores e dos controles de qualidade, também preparadas em metanol. Todas as soluções foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar, fechados por tampa rosqueável de polipropileno e septo de silicone, e armazenadas em freezer a -20 °C. Nas Tabelas 2 e 3 são apresentadas as identificações das soluções e respectivas concentrações de cada calibrador e controle de qualidade nas soluções de trabalho.

**Tabela 2** Concentração das soluções de calibradores e controles de qualidade do para todos os analitos exceto 7-OH-CBD.

Identificação	Concentração da solução de trabalho (ng/mL)
CAL 1	5
CAL 2	10
CAL 3	250
CAL 4	500
CAL 5	1000
CAL 6	5000
CAL 7	10000
CQB	15
CQM	400
CQA	750

*CAL: calibrador; CQB: controle de qualidade de baixa concentração; CQM: controle de qualidade de média concentração; CQA: controle de qualidade de alta concentração.*

A solução de padrão interno foi preparada partir da diluição de materiais certificados de referência dos compostos isotopicamente marcados THC-d<sub>3</sub> e CBD-d<sub>3</sub>, ambos concentração final de 100 ng/mL, utilizando metanol grau HPLC como diluente. Esta solução foi acondicionada em frasco de vidro âmbar, fechado por tampa rosqueável de polipropileno e septo de silicone, e armazenada em freezer a -20 °C.

**Tabela 3** Concentração das soluções de calibradores e controles de qualidade do para 7-OH-CBD.

Identificação	Concentração da solução de trabalho (ng/mL)
CAL 1	5
CAL 2	10
CAL 3	250
CAL 4	500
CAL 5	1000
CAL 6	5000
CQB	15
CQM	250
CQA	400

*CAL: calibrador; CQB: controle de qualidade de baixa concentração; CQM: controle de qualidade de média concentração; CQA: controle de qualidade de alta concentração.*

## 5.2. Amostras

### 5.2.1. Coleta de amostras

Os brancos de amostras de fluido oral, utilizados no desenvolvimento e validação do método, foram obtidos de indivíduos que não fazem uso de nenhuma substância incluída no método desenvolvido. As amostras foram coletadas por expectoração em frascos de polipropileno com capacidade de 50 mL e fundo cônico, sem a utilização de preservantes ou estimulantes para salivação. As amostras de branco de saliva foram armazenadas em freezer a -20 °C.

As amostras reais utilizadas neste estudo fazem parte do projeto intitulado “Toxicologia e Análises Toxicológicas como Fonte de Informação para Políticas Públicas sobre Drogas (Projeto BACO)”. Trata-se de um convênio de pesquisa firmado entre o Laboratório de Toxicologia Analítica do Centro de Informação e Assistência Toxicológica de Campinas/Universidade Estadual de Campinas e a Secretaria Nacional de Política sobre Drogas e Gestão de Ativos do Ministério da Justiça (SENAD/MJSP). O principal objetivo é criar um sistema de informação sobre intoxicações causadas por drogas de abuso, a partir de dados confirmados por análises toxicológicas em amostras biológicas. Esta iniciativa visa fortalecer o Sistema Brasileiro de Políticas Públicas sobre Drogas, fornecendo dados precisos e relevantes que possam embasar a formulação e implementação de políticas eficazes nessa área. Este projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) sob o CAAE: 88770318.0.0000.5404.

Para a coleta de amostras, foi realizada uma abordagem ativa dos frequentadores da festa por profissionais da área da saúde vinculados ao CIATox-Campinas. Os participantes da pesquisa receberam explicações detalhadas sobre o projeto e seus objetivos e, ao aceitarem participar, foram convidados a responder um breve questionário contendo informações sobre idade, sexo, uso de substâncias psicoativas durante o evento, identificação da substância utilizada e estimativa do intervalo de tempo de uso. Em seguida, forneceram uma amostra de fluido oral.

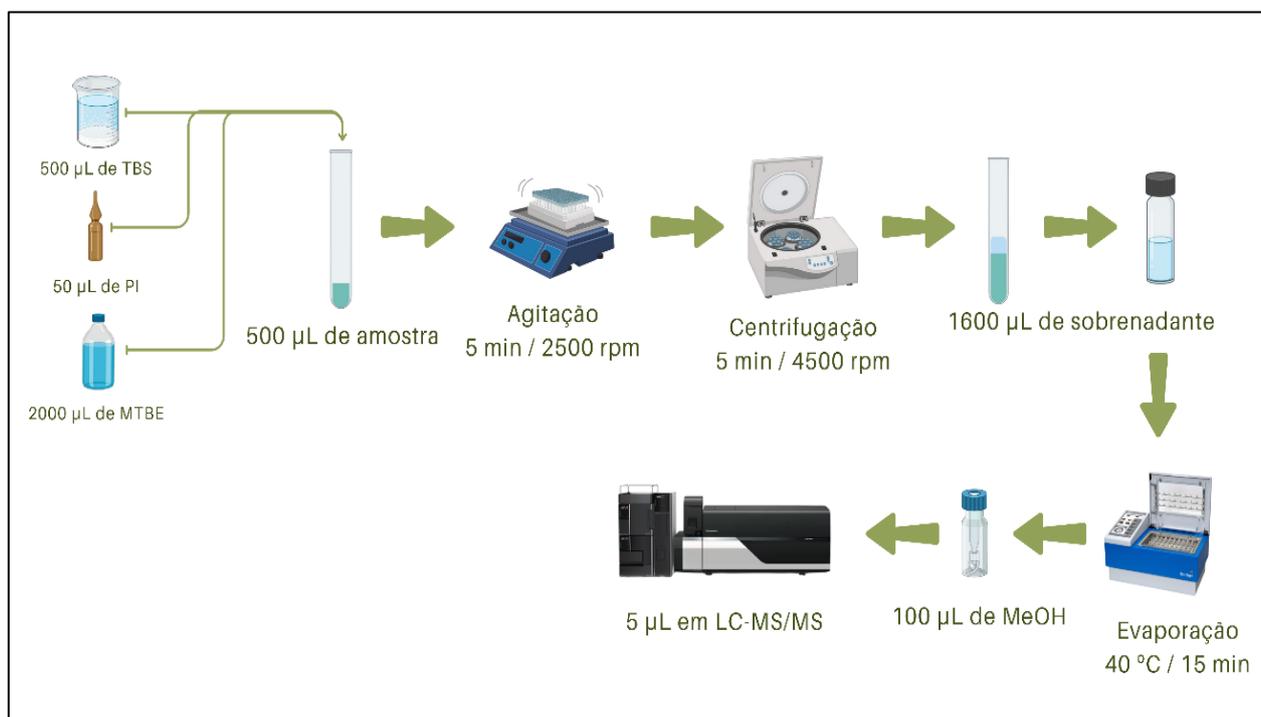
A coleta das amostras de fluido oral foi realizada conforme as recomendações do fabricante do dispositivo de coleta (Immunoanalysis, Pomona, CA, EUA). As amostras foram identificadas apenas pelo número do doador, armazenadas em caixa térmica com gelo reciclável durante o período de coleta em campo e transporte, e mantidas a -20°C no laboratório até o momento da análise, que ocorreu em até quinze dias após a coleta.

Os participantes da pesquisa receberam, como contrapartida, os resultados das análises toxicológicas realizadas nas amostras fornecidas. Cada participante recebeu um código exclusivo que permitiu o acesso, via internet, ao resultado da análise de sua amostra, através de um sistema de

informática desenvolvido exclusivamente para essa finalidade. Foi fornecido também o número de telefone do Laboratório de Toxicologia Analítica do Centro de Informação e Assistência Toxicológica de Campinas, onde o projeto foi desenvolvido, para esclarecimento de eventuais dúvidas. Esses dados foram utilizados exclusivamente para fins estatísticos e não permitiram a identificação dos voluntários.

### 5.3. Preparo de calibradores e controles

Para preparar as amostras adicionadas, 50  $\mu\text{L}$  da solução de trabalho (calibradores e controles de qualidade) foram adicionados em 375  $\mu\text{L}$  de tampão Quantisal<sup>®</sup> e 75  $\mu\text{L}$  de fluido oral branco. Feito isso, a mistura foi homogeneizada e submetida ao processo de extração descrito abaixo e ilustrado na Figura 3.



**Figura 3.** Esquema ilustrativo do processo de extração líquido-líquido para a análise de canabinoides em amostra de fluido oral por LC-MS/MS.

### 5.4. Preparo de amostras

O preparo de amostras foi realizado por extração líquido-líquido, onde 500  $\mu\text{L}$  de amostra (fluido oral + tampão de eluição Quantisal<sup>®</sup>) e 50  $\mu\text{L}$  de PI foram transferidos para em tubo de ensaio de vidro com capacidade para 15 mL. A mistura foi agitada em vórtex, seguida de adição de 500  $\mu\text{L}$

de solução aquosa saturada de TBS e 2 mL de MTBE. O tubo foi fechado e agitado em vórtex multi-tubos por 5 minutos a 2.500 rpm, em seguida foi centrifugado por 5 minutos a 4.500 rpm. Uma alíquota de 1,6 mL do sobrenadante foi transferida para *vial* de vidro, e este conteúdo foi evaporado até *secura* sob fluxo de nitrogênio a 40 °C. O resíduo foi ressuspenso com 100 µL de metanol, transferido para *insert* de vidro, e finalmente 5 µL foram injetados no LC-MS/MS.

### 5.5. Análise cromatográfica

A análise foi realizada em um sistema cromatográfico líquido de ultra eficiência acoplado à espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo LCMS8060 (Shimadzu, Kyoto, Japão). A separação cromatográfica foi realizada em coluna Raptor<sup>®</sup> bifenil (100 × 2,1 mm, 2,7 µm; Restek, Bellefonte, PA, EUA), mantida a 40°C. A fase móvel foi composta por água ultrapura (A) contendo 2 mmol/L de formiato de amônio e 0,1% de ácido fórmico (v/v), e acetonitrila (B) contendo apenas ácido fórmico 0,1% (v/v). A vazão da fase móvel foi de 0,30 mL/min, com o gradiente de eluição inicializado em 45% B, seguido por um aumento linear para 100% B ao longo de 4 min, mantido em 100% B por 1 min, retornando às condições iniciais ao longo de 0,1 min e mantido a 45% de B durante 1,5 min para reequilíbrio da coluna. O tempo total da corrida cromatográfica foi de 7 min.

O espectrômetro de massa foi equipado com uma fonte de ionização por *electrospray*, operada em modo íon positivo. Os parâmetros de fonte otimizados foram temperatura de interface à 400 °C; temperatura da linha de dessolvatação 650°C; fluxo de gás de secagem (N<sub>2</sub>) 10 L/min e fluxo de gás de aquecimento (Ar) 4 L/min; Vazão do gás de nebulização (N<sub>2</sub>) 2,5 L/min. As análises foram realizadas no modo monitoramento de reações múltiplas (MRM). Para cada composto, duas transições MRM foram selecionadas para identificação, sendo uma quantificadora e outra qualificadora. Os dados foram adquiridos e processados com o software LabSolutions (Shimadzu, Kyoto, Japão).

### 5.6. Validação do método

O método foi validado seguindo os parâmetros recomendados pelo guia ANSI/ASB *Standard 036 Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology*, de 2019 e ANSI/ASB *Standard 098 Standard for Mass Spectral Analysis in Forensic Toxicology*, de 2023(67,68).

Os parâmetros de validação avaliados foram: linearidade, limite de detecção (LD), limite inferior de quantificação (LIQ), inexatidão, imprecisão inter-corridas e intra-corridas, efeito residual

(*carryover*), recuperação, efeito matriz, seletividade, interferência de padrão interno, interferência de matriz e estabilidade.

### 5.6.1. Critérios de identificação, limite de detecção (LD) e limite inferior de quantificação (LIQ)

Os critérios de identificação considerados neste método foram presença de pico cromatográfico simétrico com tempo de retenção dentro de  $\pm 2\%$  do tempo médio de retenção dos calibradores, relação sinal/ruído superior a dez para as transições qualificadoras e quantificadoras e as razões entre as duas transições dentro de uma variação máxima de  $\pm 50\%$  dos valores estabelecidos para os calibradores. A tabela 4 apresenta as razões entre os MRM e a variação máxima aceita para diferentes substâncias, conforme estabelecido pelo ANSI/ASB Standard 098(67).

**Tabela 4.** Razões entre os MRM e variações máximas aceitas para substâncias em análise toxicológica forense conforme estabelecido pelo ANSI/ASB Standard 098 para análises por espectrometria de massas toxicologia forense ((67)).

Analito	Transições MRM	Razão entre os MRM	Variação máxima aceita (%)
7-CBD-COOH	345>193	58,2	$\pm 20\%$
	345>299		
7-OH-CBD	331>313	13,0	$\pm 30\%$
	331>193		
11-OH-THC	331>193	51,6	$\pm 20\%$
	331>201		
THC-COOH	345>299	53,9	$\pm 20\%$
	345>193		
CBD	315>193	83,9	$\pm 20\%$
	315>123		
THC	315>193	96,7	$\pm 20\%$
	315>123		
CBN	311>223	23,4	$\pm 25\%$
	311>195		
THC-d3	318>123	79,5	$\pm 20\%$
	318>196		

CBD-d3	318>196	76,1	± 20%
	318>123		

---

O LD é definido como a menor quantidade do analito que pode ser detectada pelo método, mas não necessariamente quantificada. Já o LIQ é a menor quantidade do analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis, ou seja, variações menores que ± 20% da concentração nominal. A avaliação do LD/LIQ foi realizada a partir de uma matriz em branco fortificada com o analito na concentração do ponto de decisão, testada em triplicata durante três dias distintos, atendendo aos critérios de identificação. O LD foi definido como a mesma concentração do LIQ.

### 5.6.2. Imprecisão e Inexatidão

A imprecisão de uma medida está relacionada com a dispersão dos valores obtidos, refletindo a variação nos resultados quando o mesmo analito é medido repetidamente sob condições iguais ou diferentes. Essa avaliação foi realizada através do cálculo do desvio padrão relativo (%CV) dentro de análises triplicadas em um dia e em cinco execuções para cada concentração. As amostras de matriz foram fortificadas em três concentrações diferentes (CQB, CQM e CQA) e a imprecisão entre corridas foi calculada com ANOVA de uma via ( $p < 0,05$ ).

Por sua vez, a inexatidão refere-se ao grau de desvio dos resultados obtidos em relação ao valor verdadeiro ou aceito como referência. A avaliação da inexatidão envolveu a análise em triplicata de amostras de matriz fortificadas em três concentrações diferentes (CQB, CQM e CQA), durante cinco execuções. O critério de aceitação estabelecido foi de variações menores que ± 20% da concentração nominal.

$$\text{Imprecisão entre corridas (\%)} = \frac{\text{Desvio padrão de todas execuções}}{\text{Média de todas as execuções}} \times 100$$

$$\text{Imprecisão intra – corridas (\%)} = \frac{\text{Desvio padrão de uma execução}}{\text{Média de todas as execuções}} \times 100$$

$$\text{Inexatidão (\%)} = \frac{(\text{Média de todas as execuções} - \text{valor real})}{\text{valor real}} \times 100$$

### 5.6.3. Linearidade

A linearidade do método foi avaliada para verificar se a resposta do método é proporcional à concentração do analito dentro de uma faixa específica. A análise da curva de calibração foi realizada por regressão linear ponderada ( $1/C^2$ ), contendo pelo menos seis níveis de concentração e sendo executada em pelo menos cinco execuções diferentes. O critério de aceitação estabelecido foi de inexatidão menor do que  $\pm 20\%$  para todos os calibradores e um coeficiente de determinação ( $r^2$ ) igual ou superior a 0,98.

#### **5.6.4. Interferência de matriz e de padrão interno**

Os interferentes de matriz são substâncias presentes na amostra que podem afetar a precisão e a exatidão das análises. A avaliação foi realizada com dez amostras brancas de diferentes fontes, extraídas e analisadas, com o critério de aceitação de que nenhum pico presente deveria satisfazer os critérios do LD.

A interferência de padrão interno foi avaliada através da análise em triplicata de amostras brancas fortificadas com a concentração mais alta da curva de calibração, sem a adição dos padrões internos. O critério de aceitação foi a ausência de sinal analítico na janela de detecção de cada padrão interno.

#### **5.6.5. Efeito residual (*carryover*)**

A avaliação do efeito residual visou identificar e quantificar a contaminação cruzada entre amostras consecutivas no sistema cromatográfico. Para isso, foi realizada a análise em triplicata de amostras brancas previamente extraídas imediatamente após a análise da concentração mais alta da curva de calibração (limite superior de quantificação).

#### **5.6.6. Seletividade**

A seletividade do método, ou sua capacidade de distinguir o analito de outros componentes na amostra, foi avaliada através da análise de amostras brancas fortificadas com fármacos na concentração de 500 ng/mL. Como critério de aceitação, considerou-se ausência de sinal analítico na janela de detecção de cada analito que atendessem aos critérios estabelecidos para LD/LIQ. Foram analisadas as seguintes substâncias: haloperidol, risperidona, quetiapina, hidroclorotiazida, clortalidona, furosemida, atenolol, propranolol, diltiazem, captopril, fenitoína, carbamazepina, ácido valpróico, ondansetrona, ranitidina, metoclopramida, domperidona, salbutamol, nafazolina,

glibenclamida, atorvastatina, desloratadina, loratadina, hidroxizina, prometazina, paracetamol, meloxicam, prednisolona, celecoxibe, betametasona e dexametasona.

### 5.6.7. Recuperação

A recuperação do método foi avaliada comparando as áreas absolutas dos picos cromatográficos dos analitos em dois diferentes grupos. O grupo 1 consistiu em seis amostras de matriz "branco" fortificadas com os padrões puros dos analitos nas concentrações do CQB e CQA, enquanto o grupo 2 consistiu em dez amostras de matriz "branco" que, após a extração, foram fortificadas com os padrões puros dos analitos nas mesmas concentrações.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Média da área das amostras pré extração}}{\text{Média da área das amostras fortificadasd pós extração}} \times 100$$

### 5.6.8. Efeito matriz

O efeito matriz, definido como a interferência ou alteração na resposta analítica causada pela presença de componentes da matriz da amostra, foi avaliado comparando as áreas absolutas dos picos cromatográficos dos analitos em dois grupos. O grupo A consistiu em dez amostras de matriz branco fortificadas após a extração com os padrões puros dos analitos nas concentrações do CQB e CQA. O grupo B consistiu em seis amostras de água ultrapura fortificadas com padrões puros nas mesmas concentrações, injetadas para estabelecer a área média de pico do analito.

$$\text{Efeito matriz (\%)} = \left( \frac{\text{Média da área das amostras pré extração}}{\text{Média da área do padrão puro}} - 1 \right) \times 100$$

### 5.6.9. Estabilidade pós-processamento

Avaliação da estabilidade pós-processamento, nas condições de armazenamento em amostrador automático, foi avaliada para garantir que o analito não se degrade ou altere durante o tempo de análise. Foram analisadas amostras nas concentrações de CQB e CQA, em triplicata, armazenadas no amostrador automático do LC-MS/MS a 8 °C e reinjetadas após 24 horas.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1.1. Dispositivo Quantisal®

Inicialmente, é importante destacar o dispositivo escolhido para a coleta das amostras reais, o Quantisal®, um coletor de saliva amplamente utilizado devido à sua eficácia e praticidade. A

escolha desse dispositivo proporcionou uma coleta eficiente e não invasiva das amostras de FO, garantindo a integridade dos analitos.

O Quantisal<sup>®</sup>, é um dispositivo é composto por uma almofada de celulose acoplada a uma haste de polipropileno, que é movida pelas bochechas internas da boca para coletar o fluido oral necessário. O processo de coleta é facilitado pelo design da almofada coletora, que possui um corante indicador na haste. Esse corante muda de cor para azul quando aproximadamente 1 mL ( $\pm 10\%$ ) de fluido oral é coletado, sinalizando que o volume necessário foi alcançado. Após a coleta, a almofada é removida da boca e inserida em um tubo plástico contendo uma solução tampão de 3 mL, com pH entre 6 e 7, que preserva a amostra para análise posterior (69).

O processo de coleta de fluido oral com o dispositivo Quantisal<sup>®</sup> envolve várias etapas. Com a ponta do dispositivo apontada para baixo, o doador coloca o dispositivo sob a língua e fecha a boca, mantendo a cabeça inclinada para baixo para ajudar na coleta de saliva. O doador não deve mastigar a almofada, falar ou remover o coletor da boca até que o indicador fique azul ou até que 10 minutos tenham passado, indicando que a quantidade adequada de saliva foi coletada. Em seguida, o doador insere o dispositivo de coleta no tubo de transporte e fecha a tampa firmemente. O centro do selo da amostra é colocado em cima do tubo e pressionado para baixo em ambos os lados. A amostra é então enviada ao laboratório para análise (70).

Estudos indicam que o Quantisal<sup>®</sup> possui uma boa taxa de recuperação para canabinoides, o que é essencial para garantir a precisão dos resultados confirmatórios. Portanto, a escolha do Quantisal<sup>®</sup> para a coleta de amostras é crucial para a obtenção de resultados confiáveis e precisos em testes de canabinoides (71). A estabilidade dos canabinoides em fluidos orais é um tópico importante para a toxicologia forense. Um estudo de estabilidade realizado pelo fabricante indicou que todas as drogas, incluindo o THC, são estáveis por pelo menos 30 dias em condições refrigeradas e durante o transporte usando métodos de envio padrão, sem necessidade de embalagens refrigeradas adicionais (72). Utilizar o Quantisal<sup>®</sup> neste trabalho justifica-se pela sua capacidade de oferecer uma coleta fácil, eficiente e precisa de fluido oral, garantindo a qualidade e a confiabilidade dos dados obtidos para análise toxicológica.

## **6.2. Otimização do método**

Para o desenvolvimento do método foram selecionadas as transições que apresentavam melhores sensibilidades e posteriormente otimizadas a energias de colisão. Para essa seleção foi

utilizado a resolução *unit* do quadrupolo do espectrômetro de massas definido como *unit* (0,7). No entanto, para alguns analitos houve a necessidade de realizar alterações para melhorar a sensibilidade das análises, especialmente devido às diferentes respostas de ionização dos analitos em função da técnica de *electrospray*.

Assim, para os analitos 7-CBD-COOH, 7-OH-CBD e 11-OH-THC, que apresentavam baixa sensibilidade à ionização, a resolução foi ajustada para "*low*" (1,1), garantindo assim uma melhor detecção sem comprometer a qualidade do sinal. Entre as vantagens dessa otimização, destaca-se o aumento significativo da sensibilidade, pois a resolução baixa permite a passagem de uma gama mais ampla de íons, resultando em sinais mais intensos e melhor detecção dos analitos, mesmo em baixas concentrações. Além disso, a menor necessidade de discriminação precisa entre íons de massas próximas reduz o tempo total de aquisição de dados, permitindo um processamento mais rápido e eficiente das amostras. Outro ponto positivo é a eficiência de separação obtida com a combinação de LC e a resolução baixa do MS, que assegura uma separação eficaz dos compostos antes da análise espectrométrica, minimizando interferências e melhorando a qualidade dos dados(73).

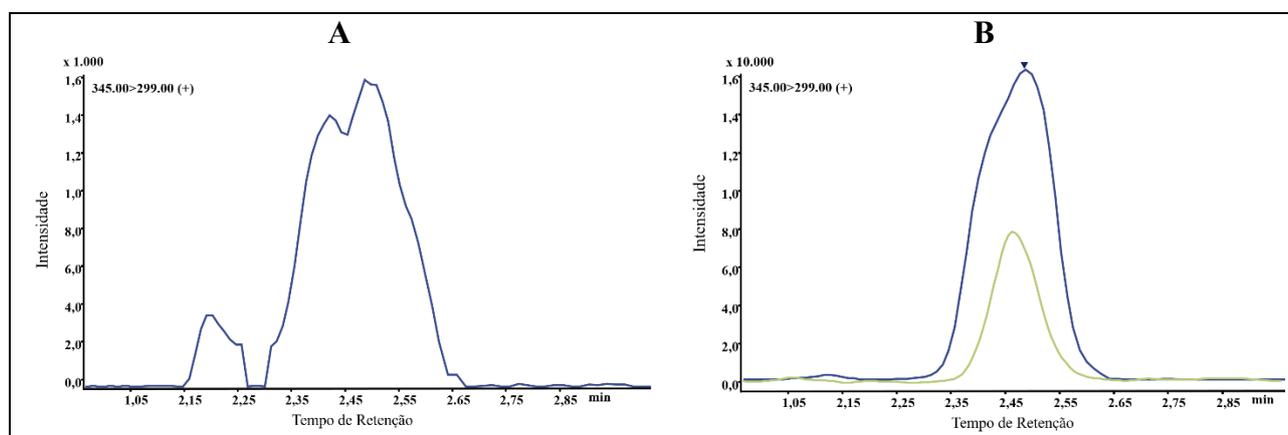
Entretanto, algumas desvantagens acompanham essa configuração. A capacidade de discriminar entre íons de massas muito próximas é reduzida, o que pode resultar em sobreposição de picos e menor resolução espectral. Além disso, a precisão na determinação da massa molecular do 7-OH-CBD pode ser ligeiramente comprometida, dificultando a identificação em amostras complexas. Há também uma maior probabilidade de interferências de íons indesejados, embora este impacto tenha sido mitigado pelo uso de LC (74). Em resumo, a escolha pela resolução "*low*" no quadrupolo foi justificada pelo aumento da sensibilidade e pela rapidez na análise, essenciais para a detecção eficiente os analitos 7-CBD-COOH, 7-OH-CBD e 11-OH-THC.

Outro parâmetro que foi otimizado foi o volume de injeção, com o objetivo de melhorar a sensibilidade, aumentar a reprodutibilidade, maximizar a eficiência de separação, reduzir o ruído de fundo, preservar a integridade da coluna e ajustar à capacidade do sistema. Para isso, quatro volumes de injeção (2  $\mu$ L, 5  $\mu$ L, 10  $\mu$ L e 20  $\mu$ L) foram testados em triplicata para todos os analitos presentes no método.

A escolha final recaiu sobre o volume de 5  $\mu$ L, este volume demonstrou ser o mais adequado, proporcionando uma boa repetibilidade e precisão nas medições sem comprometer a integridade dos analitos ou a performance do equipamento. Além disso, o volume de 5  $\mu$ L mostrou-

se eficaz na minimização do ruído de fundo e na proteção da coluna cromatográfica, garantindo assim a longevidade do sistema e a qualidade das análises ao longo do tempo.

Outra otimização avaliada foi na extração da amostra. No que diz respeito ao solvente extrator, foram testados N-hexano:acetato de etila (9:1, v/v) e MTBE. O solvente N-hexano:acetato de etila apresentou uma melhor resposta para os analitos THC, 11-OH-THC e 11-THC-COOH sendo eficaz na extração destes compostos. No entanto, esse solvente não foi eficiente na extração do composto 7-CBD-COOH como apresentado na figura 4. Já o MTBE se mostrou um solvente eficiente para essa classe de compostos.



**Figura 4.** Comparação de Métodos de Extração: A figura A mostra extração de 7-CBD-COOH em solvente N-hexano:acetato de etila (9:1), sem identificação do analito. Já a imagem B, utilizando MTBE, revela pico identificado do 7-CBD-COOH. Análise realizada em fluido oral branco fortificado com 10 ng/mL de padrão analítico.

O MTBE é um solvente apolar com baixa miscibilidade em água ( $\log P$  2,54), apresenta capacidade de solubilização para compostos lipofílicos como os canabinoides diminuindo a coextração de componentes hidrofílicos indesejados que podem estar presentes no fluido oral. Um dos principais benefícios do uso do MTBE na extração líquido-líquido é o seu ponto de ebulição relativamente baixo ( $55,2^{\circ}\text{C}$ ), promovendo uma evaporação rápida do solvente após a extração (75).

A fim de obter o maior volume de sobrenadante no processo de extração da amostra para secagem e ressuspensão, foi avaliado o congelamento das amostras centrifugadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos. No entanto, essa técnica resultou em uma variação considerável no volume de sobrenadante obtido entre as amostras, consequentemente na concentração das replicatas analisadas gerando uma maior inexatidão impedindo assim seu uso. Dessa forma, optou-se por padronizar um volume definido do sobrenadante (1,6 mL). Após as otimizações mencionadas acima, os outros parâmetros da

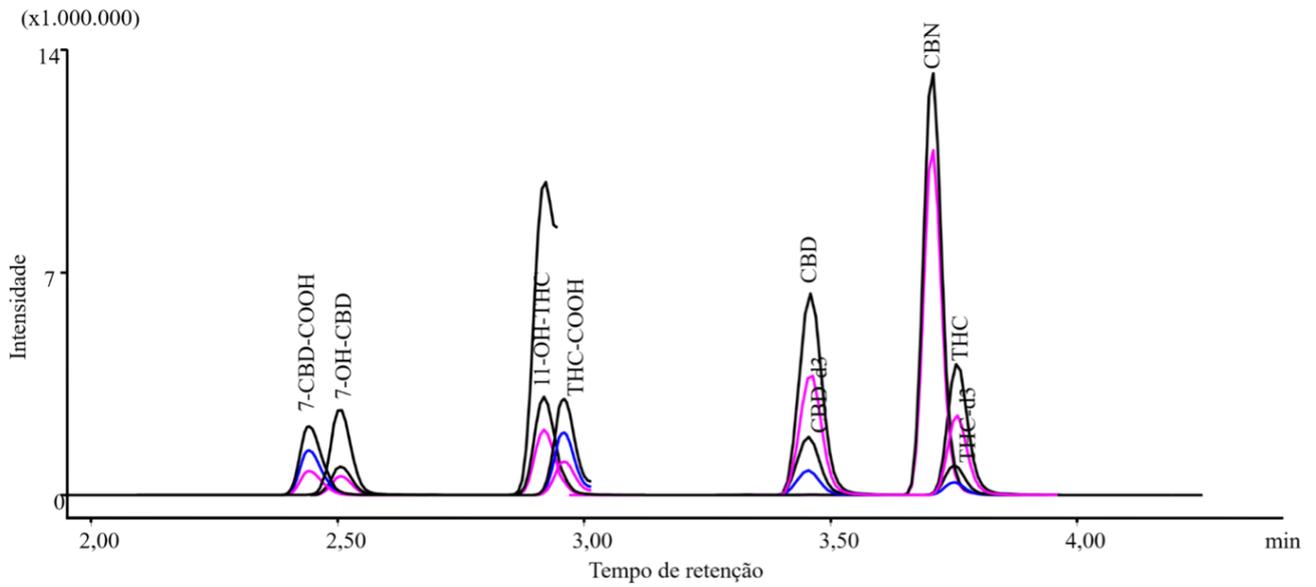
espectrometria de massas, assim como o tempo de retenção cromatográfico de todos os analitos estão descritos na Tabela 5.

**Tabela 5.** Parâmetros de espectrometria de massas e tempo de retenção de todos os analitos do método.

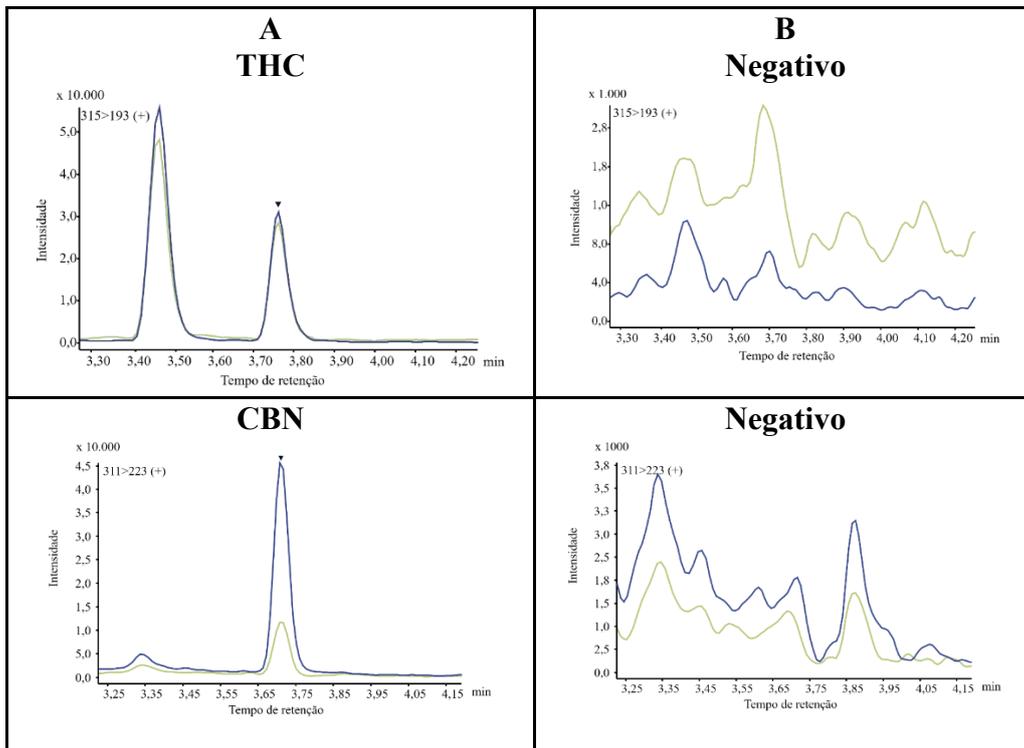
Analito	Tempo de retenção (min)	Transições MRM	Dwell Time (ms)	Q1 pre bias (V)	EC (V)	Q3 pre bias (V)
7-CBD-COOH	2,46	345>193	50	-17	-30	-20
		345>299	50	-13	-19	-19
7-OH-CBD	2,50	331>313	50	-17	-23	-30
		331>193	50	-10	-38	-23
11-OH-THC	2,93	331>193	50	-12	-26	-19
		331>201	50	-13	-31	-18
THC-COOH	2,73	345>299	50	-12	-29	-12
		345>193	50	-13	-21	-20
CBD	3,46	315>193	50	-16	-24	-19
		315>123	50	-11	-34	-21
THC	3,76	315>193	50	-11	-31	-20
		315>123	50	-12	-20	-17
CBN	3,71	311>223	50	-12	-21	-14
		311>195	50	-12	-28	-12
THC-d3	3,75	318>123	50	-12	-37	-11
		318>196	50	-16	-26	-20
CBD-d3	3,46	318>196	50	-16	-24	-12
		318>123	50	-16	-34	-25

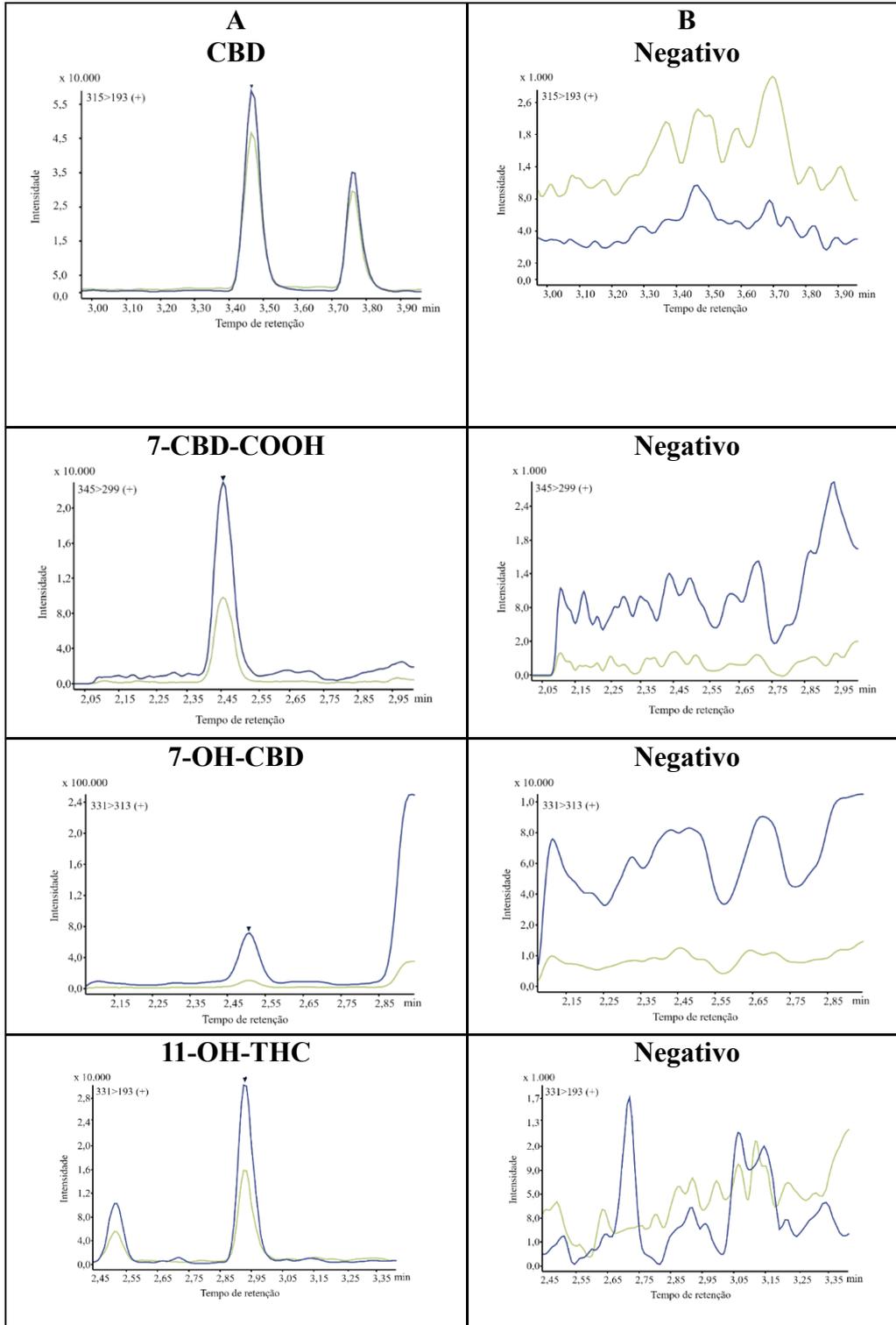
*EC: energia de colisão.*

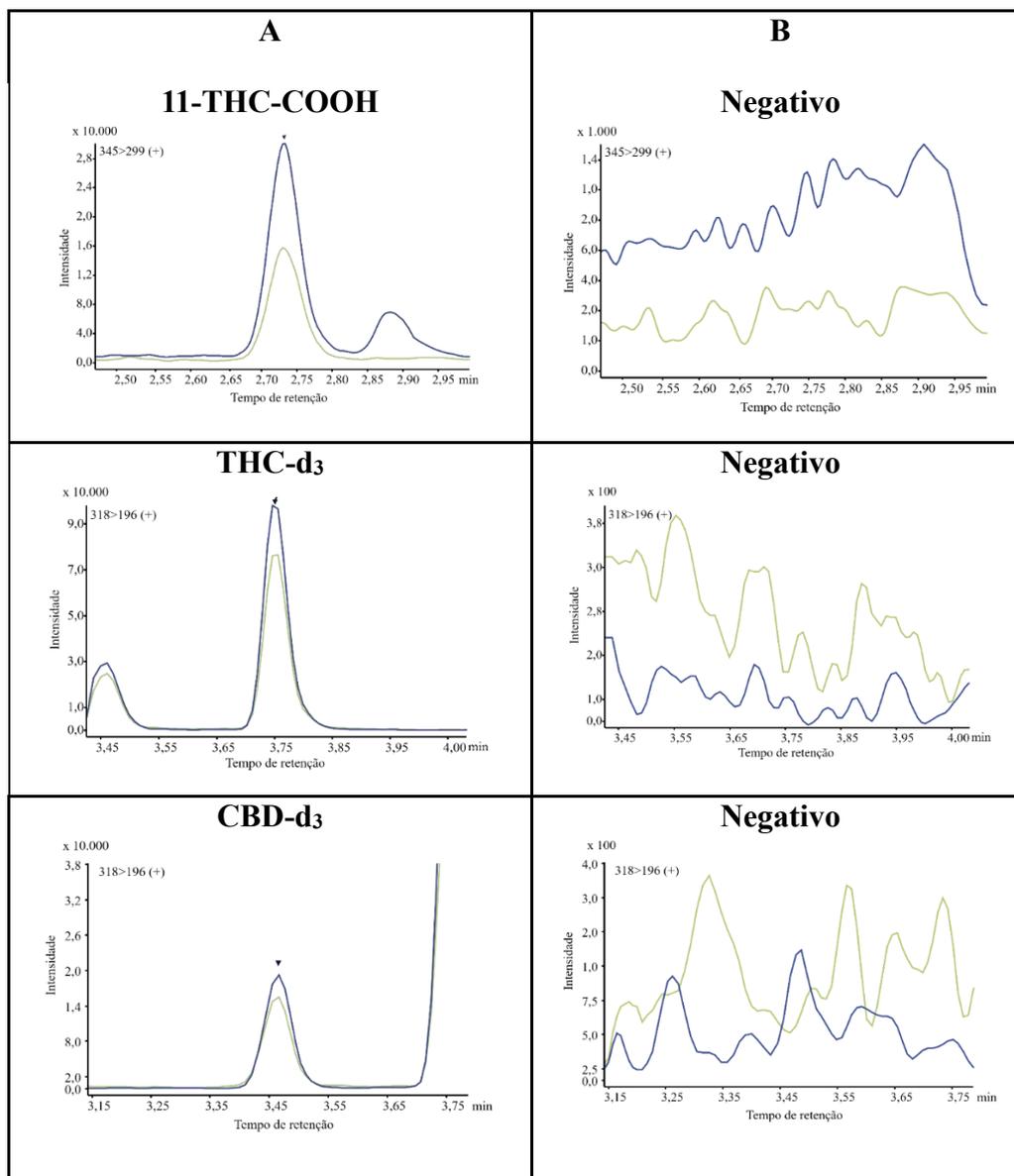
Na Figura 5 é possível observar a separação de todos os analitos através do cromatograma completo extraído a partir de uma amostra de fluido oral branco adicionada com calibrador de concentração 100 ng/mL. Na Figura 5 é possível visualizar os cromatogramas de íons extraídos contendo todos os analitos na concentração do LIQ/LD definida (0,5 ng/mL).



**Figura 5.** Cromatogramas de íons extraídos das substâncias detectadas no em fluido oral branco fortificado com calibrador 05 (100 ng/mL).







**Figura 6.** (A) Cromatogramas de íons extraídos de amostra de fluido oral fortificado no limite inferior de quantificação do método e (B) cromatogramas de amostra de fluido oral negativo para as substâncias do método.

Durante a validação, todos os analitos apresentaram linearidade com  $r > 0,99$  cumprindo os parâmetros de identificação. A linearidade menor observada para o analito 7-OH-CBD apresentada na Tabela 3 é atribuída à saturação do pico nas concentrações mais altas. Quando um pico está saturado, significa que o detector atingiu seu limite de resposta máximo, não sendo capaz de distinguir diferenças significativas nas concentrações além desse ponto. Isso resulta em uma resposta do detector que deixa de aumentar de forma proporcional com o aumento da concentração do analito,

afetando a capacidade de se obter uma relação linear entre a concentração e a resposta do detector, impedindo a quantificação a partir de certo nível.

Não foi observada interferência entre as 10 diferentes fontes de fluido oral brancos testados e, além disso, não foram verificados interferentes de padrão interno e de outros fármacos comumente encontradas no laboratório, apresentando, então, ser um método seletivo.

Na Tabela 6 é possível visualizar os resultados da imprecisão, inexatidão. Ao avaliar a imprecisão intra-corrída, os resultados foram melhores do que 11,34%(CQM do CBD-COOH) e, ao avaliar a imprecisão intercorrídas, os resultados foram melhores do que 19,15%, (CQM do CBD-COOH).

**Tabela 6.** Resultados de imprecisão e inexatidão dos canabinoides em fluido oral por LC-MS/MS.

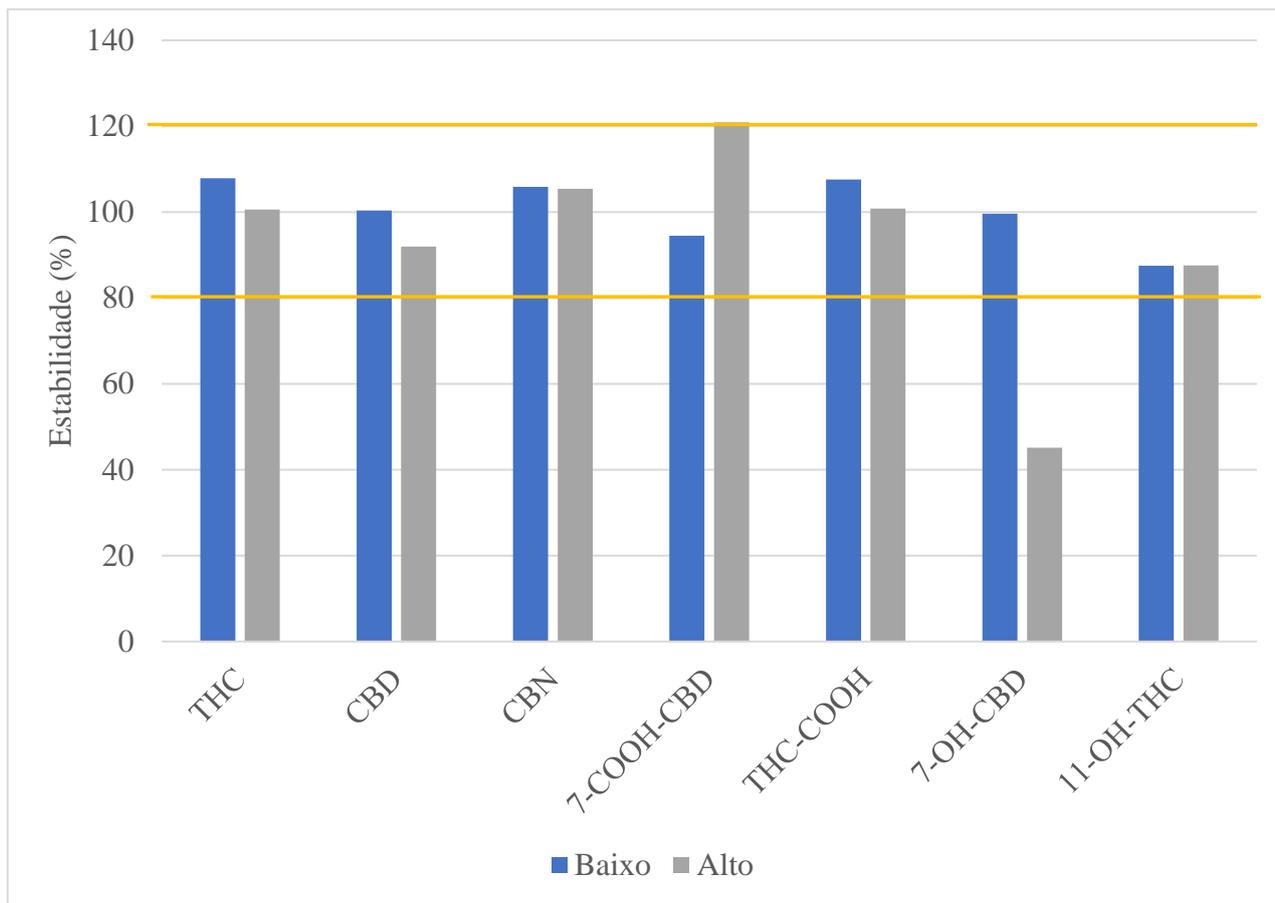
Analitos	Imprecisão intra-dia (%)			Imprecisão inter-dia (%)		
	Baixo	Médio	Alto	Baixo	Médio	Alto
THC	2,2	2,6	2,5	9,3	6,4	5,6
CBD	4,0	3,5	3,5	6,6	7,2	14,8
CBN	2,9	7,9	5,3	10,4	16,4	16,6
7-CBD-COOH	7,5	11,3	3,5	12,5	19,1	17,1
THC-COOH	5,9	2,9	4,4	11,4	9,6	17,4
7-OH-CBD	5,4	3,6	4,5	14,4	15,0	9,9
11-OH-THC	3,5	7,4	7,3	10,3	10,6	11,7

A inexatidão (Tabela 7) apresentou resultado melhor que 18,4% (CQM do 7-OH-CBD) e os valores de efeito matriz foram melhores que 140,4% mostrando que, apesar de uma boa recuperação apresentada pela extração, seria necessária uma etapa de limpeza eficiente, para reduzir os efeitos de matriz (76). Os valores de recuperação da validação foram melhores que 60,9%, dados representados na Tabela 5.

**Tabela 7.** Resultados de inexatidão, efeito matriz e recuperação dos canabinoides em fluido oral por LC-MS/MS. Valores de efeito matriz negativos apresentam supressão da ionização enquanto valores positivos apresentam aumento na ionização dos analitos.

Analitos	Inexatidão (%)			Efeito matriz (%)		Recuperação (%)	
	Baixo	Médio	Alto	Baixo	Alto	Baixo	Alto
THC	-7,2	6,9	17,3	-16,8	-8,8	60,9	61,5
CBD	-12,1	6,9	9,2	-47,3	-65,9	96,1	113,6
CBN	-8,5	6,0	-4,0	-13,3	-13,9	99,0	118,5
CBD-COOH	-9,5	1,3	-8,0	90,3	-50,7	86,2	93,2
THC-COOH	-7,7	0,4	4,9	90,8	140,3	84,9	93,1
7-OH-CBD	-9,1	18,3	8,2	49,6	48,8	87,0	99,5
11-OH-THC	-17,1	-4,6	6,1	37,4	65,3	96,2	93,5

Por fim, a estabilidade do amostrador automático foi avaliada e mostrou que os analitos investigados nesse método permaneceram estáveis por 24 horas a 8 °C, como mostra a Figura 6. A estabilidade de amostras é um aspecto crítico em estudos analíticos, pois garante que as concentrações não variem significativamente durante o armazenamento e processamento, afetando a confiabilidade dos resultados. No estudo realizado, os analitos 7-OH-CBD e 7-COOH-CBD apresentaram resultados fora dos 20% estabelecidos como aceitáveis para estabilidade no amostrador automático.



**Figura 7.** Resultado do estudo de estabilidade pós-processamento de amostras de fluido oral branco fortificadas dos analitos de interesse, submetidas ao método analítico desenvolvido e armazenadas em amostrador automático a 8 °C por 24 horas.

Em humanos, o 7-OH-CBD é o principal produto de biotransformação farmacologicamente ativo do CBD e é posteriormente convertido no produto de biotransformação inativo 7-COOH-CBD. Este processo de conversão é largamente dependente de  $\text{NAD}^+$  (dinucleotídeo de nicotinamida adenina) e é catalisado pela enzima citosólica aldeído desidrogenase, conforme descrito por Beers e colaboradores (77). Embora esses fatores sejam bem conhecidos no metabolismo humano, a justificativa para que esse comportamento tenha ocorrido dentro do amostrador automático ainda é desconhecida e precisa ser estudada. No entanto, alguns fatores podem ter contribuído para a oxidação observada no experimento. A presença de oxigênio molecular dissolvido no metanol e a estrutura química dos canabinoides, que é suscetível à auto-oxidação podem ter facilitado a formação do 7-COOH-CBD a partir do 7-OH-CBD. A combinação desses fatores cria um ambiente propício para a oxidação, semelhante às condições enzimáticas no corpo humano, mas em um contexto experimental controlado.

Apesar de os analitos 7-OH-CBD e 7-COOH-CBD terem apresentado resultados fora dos 20% estipulados como aceitáveis para estabilidade no amostrador automático, os outros cinco analitos testados mostraram resultados dentro dos limites esperados. Isso indica que, embora haja uma preocupação específica com a estabilidade dos metabólitos do CBD mencionados, o sistema de amostragem automática demonstrou desempenho adequado para a maioria dos compostos analisados.

### **6.3. Análises de amostras reais**

Para avaliar a aplicabilidade do método, este foi testado em casos de amostras reais provenientes do projeto BACO, que realizou coletas de fluido oral em nove eventos no período de setembro de 2023 a abril de 2024, resultando em 1090 amostras.

Dentre estas amostras, 142 apresentaram resultados positivos para pelo menos uma das substâncias investigadas no presente método durante a etapa de triagem. Estas 142 amostras foram então submetidas à análise no método quantitativo desenvolvido e validado nesta dissertação, tendo sido confirmado resultado positivo em 125 amostras (88,6%). A combinação de THC, CBD e CBN foi encontrada em maior quantidade, 42 amostras (44,6%), seguindo da identificação de amostras contendo apenas THC em 18 amostras (19,6%) e da combinação de CBD e CBN em 17 amostras (18,5%). Na Tabela 8 a seguir, é possível visualizar as substâncias que foram identificadas e quantificadas e seus respectivos valores de concentração.

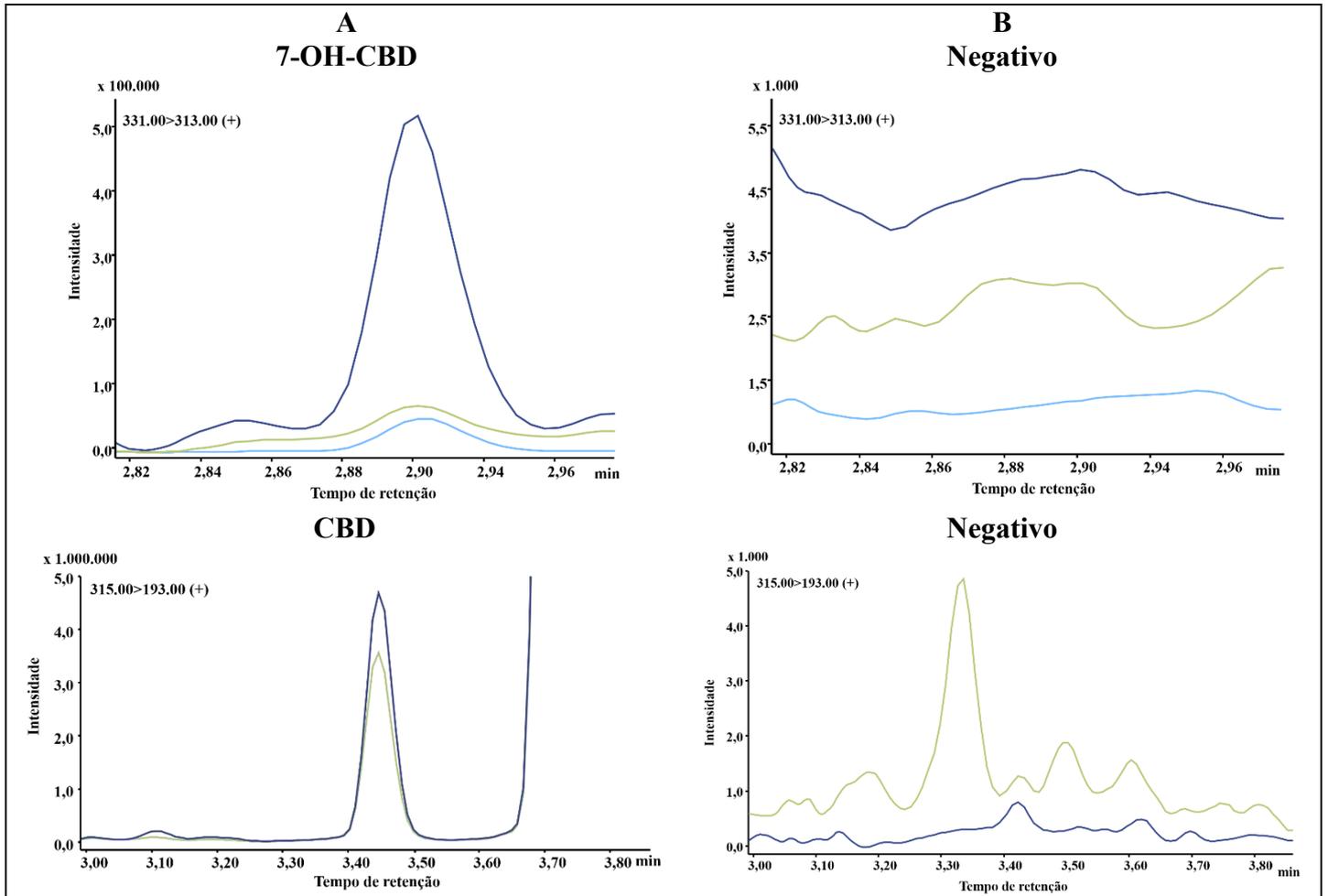
A discrepância entre o número de substâncias esperadas e as encontradas nas amostras reais pode ser atribuída a diversos fatores. Embora o método tenha sido inicialmente concebido para analisar sete substâncias específicas, a natureza das amostras coletadas pode variar significativamente, influenciando diretamente os resultados obtidos. Fatores como o tempo de coleta das amostras, suas condições de armazenamento e a sensibilidade do equipamento analítico utilizado são cruciais para a detecção precisa das substâncias alvo. Dessa forma, é comum que a análise real revele um número diferente de substâncias, refletindo a complexidade e as variáveis envolvidas no processo analítico.

**Tabela 8.** Resultados da análise de 142 amostras de fluido oral positivas para CBD. Concentrações em ng/mL.

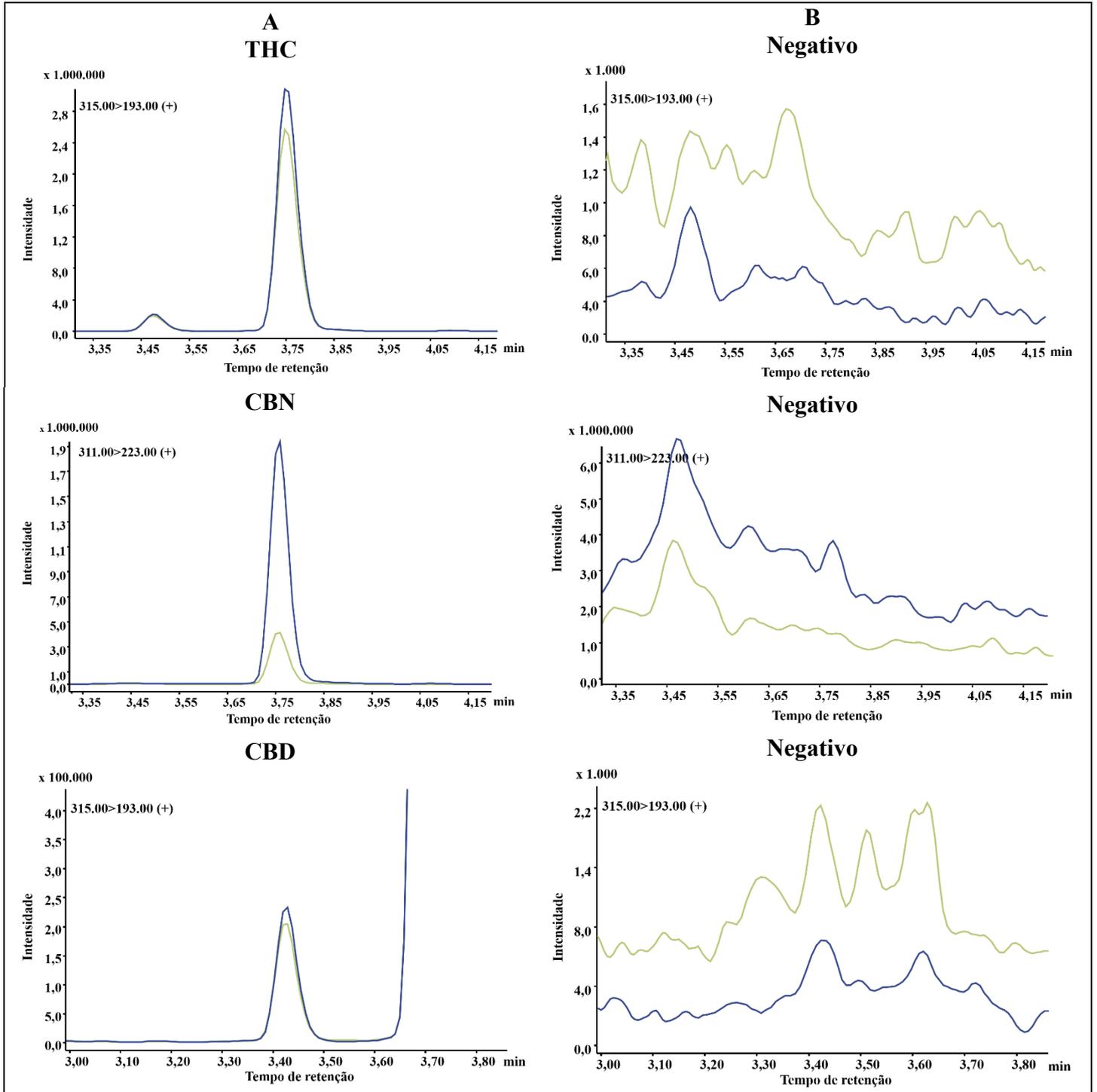
AMOSTRAS	THC	CBN	CBD	7-OH-CBD	AMOSTRAS	THC	CBN	CBD	7-OH-CBD	AMOSTRAS	THC	CBN	CBD	7-OH-CBD	AMOSTRAS	THC	CBN	CBD	7-OH-CBD
1	ND	ND	ND	ND	38	37,7	7,2	1,9	ND	75	< LIQ	ND	ND	ND	112	17,3	1,1	15	ND
2	> LSQ	15,8	3,9	ND	39	16,8	1,1	ND	ND	76	0,7	ND	ND	ND	113	1,6	< LIQ	< LIQ	ND
3	ND	ND	ND	ND	40	57,3	2,4	ND	ND	77	5,5	< LIQ	ND	ND	114	14,5	2,7	1,0	ND
4	ND	ND	ND	ND	41	ND	ND	ND	ND	78	16,8	1,9	1,8	ND	115	> LSQ	ND	39,6	2,2
5	4,6	< LIQ	ND	ND	42	2,9	< LIQ	ND	ND	79	4,4	0,5	ND	ND	116	32,2	1,8	< LIQ	ND
6	ND	ND	ND	ND	43	54,2	2,3	ND	ND	80	3,4	1,2	< LIQ	ND	117	18,5	2,9	0,5	ND
7	1,1	< LIQ	ND	ND	44	1,9	0,9	< LIQ	ND	81	< LIQ	ND	ND	ND	118	17,3	1,8	0,9	ND
8	ND	ND	ND	ND	45	ND	ND	7,5	ND	82	ND	ND	1,7	ND	119	6,0	6,1	< LIQ	ND
9	> LSQ	4,7	ND	ND	46	16,2	0,8	6,8	ND	83	41,3	4,0	ND	ND	120	< LIQ	< LIQ	ND	ND
10	> LSQ	16,5	1,3	ND	47	ND	ND	7,1	< LIQ	84	ND	ND	ND	ND	121	> LSQ	ND	> LSQ	2,2
11	26,3	1,5	0,6	ND	48	> LSQ	34,4	0,9	ND	85	< LIQ	< LIQ	1,8	ND	122	56,1	3,3	1,3	ND
12	> LSQ	25,7	8,5	ND	49	> LSQ	12,4	ND	ND	86	96,2	22,4	2,4	ND	123	2,6	12,5	ND	ND
13	< LIQ	ND	ND	ND	50	> LSQ	9,0	0,9	ND	87	> LSQ	24,4	> LSQ	ND	124	4,5	2,0	< LIQ	ND
14	39,4	1,7	0,8	ND	51	ND	ND	ND	ND	88	1,1	< LIQ	< LIQ	ND	125	17,1	1,5	< LIQ	ND
15	10,7	0,5	ND	ND	52	> LSQ	19,2	1,9	< LIQ	89	89	5,3	88	ND	126	17,9	0,6	9,3	ND
16	31,2	1,9	2,8	ND	53	21,9	3,8	ND	ND	90	11,8	< LIQ	< LIQ	ND	127	53,1	3,0	1,6	ND
17	8,0	1,8	1,9	ND	54	> LSQ	24,4	1,0	ND	91	ND	< LIQ	0,6	ND	128	2,1	< LIQ	< LIQ	ND
18	> LSQ	26,6	6,2	ND	55	> LSQ	73,4	ND	ND	92	99,7	18,6	7,4	ND	129	6,3	0,5	0,7	ND
19	> LSQ	49,0	8,7	< LIQ	56	1,4	< LIQ	ND	ND	93	4,5	< LIQ	< LIQ	ND	130	7,3	1,0	ND	ND
20	81,5	12,1	0,8	ND	57	42,8	6,1	1,0	ND	94	> LSQ	19,9	1,9	ND	131	1,6	< LIQ	ND	ND
21	> LSQ	10,6	1,5	ND	58	> LSQ	79,5	76,5	ND	95	ND	ND	ND	ND	132	ND	ND	ND	ND
22	0,5	< LIQ	0,9	ND	59	21,3	5,4	2,4	ND	96	1,6	0,6	< LIQ	ND	133	> LSQ	38,9	7,9	ND
23	6,1	< LIQ	61,3	ND	60	0,7	0,7	< LIQ	ND	97	> LSQ	22,9	6,3	ND	134	23,6	1,0	4,6	ND
24	91,1	22,5	1,2	ND	61	12,8	1,3	< LIQ	ND	98	> LSQ	5,4	> LSQ	ND	135	ND	ND	ND	ND
25	31,7	2,4	1,2	ND	62	2,4	0,7	2,0	ND	99	46,7	10,6	2,9	ND	136	22,2	1,3	2,4	ND
26	ND	ND	ND	ND	63	21,7	5,0	0,9	ND	100	59,5	16,1	5,6	ND	137	ND	ND	ND	ND
27	58,6	5,5	1,8	ND	64	0,5	ND	ND	ND	101	72,5	21,4	6,0	ND	138	7,1	< LIQ	ND	ND
28	< LIQ	ND	ND	ND	65	6,8	0,5	1,6	ND	102	15	1,0	< LIQ	ND	139	94,7	18,5	2,2	< LIQ
29	ND	ND	ND	ND	66	52,6	4,9	62	ND	103	< LIQ	ND	< LIQ	ND	140	32,5	4,5	1,9	ND
30	8,8	0,9	ND	ND	67	13,7	1,8	0,5	ND	104	9,1	2,0	0,9	ND	141	25,6	1,5	1,2	ND
31	ND	ND	ND	ND	68	ND	< LIQ	ND	ND	105	90,4	8,9	< LIQ	ND	142	1,9	< LIQ	2,1	ND
32	45,5	3,0	0,5	ND	69	3,0	0,8	< LIQ	ND	106	60,3	4,3	2,5	ND					
33	ND	ND	ND	ND	70	> LSQ	16,4	1,1	ND	107	73,9	3,4	1,0	ND					
34	66,5	5,8	ND	ND	71	9,8	< LIQ	ND	ND	108	1,3	2,2	ND	ND					
35	7,3	< LIQ	< LIQ	ND	72	< LIQ	ND	ND	ND	109	27,9	1,3	0,6	ND					
36	< LIQ	ND	ND	ND	73	13,1	0,6	ND	ND	110	ND	ND	1,0	ND					
37	2,2	ND	ND	ND	74	1,2	< LIQ	ND	ND	111	< LIQ	< LIQ	< LIQ	ND					

ND: Não detectado; LIQ: Limite inferior de quantificação; LSQ: Limite superior de quantificação.

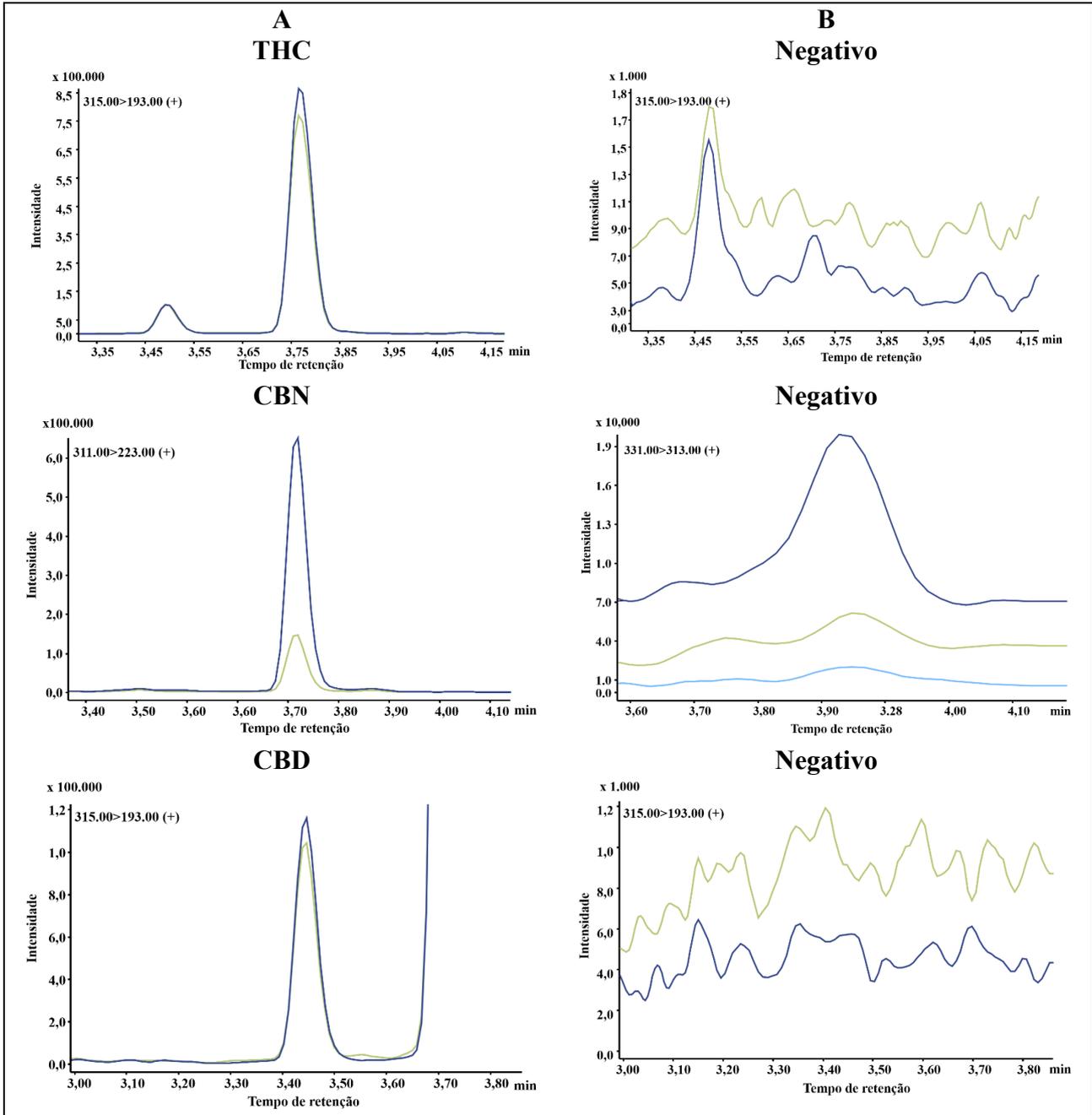
Nas Figuras 8, 9 e 10 a seguir, a título de exemplificação, resultados de três amostras reais foram demonstrados com os respectivos cromatogramas das substâncias detectadas e o negativo.



**Figura 8.** (A) Cromatogramas de íons extraídos das substâncias detectadas na amostra de fluido oral 115 (positiva para 7-OH-CBD e CBD) e (B) cromatograma de amostra de fluido oral negativo.



**Figura 9.** (A) Cromatogramas de íons extraídos das substâncias detectadas na amostra de fluido oral 38 (positiva para THC, CBN e CBD) e (B) cromatograma de amostra de fluido oral negativo.



**Figura 10.** (A) Cromatogramas de íons extraídos das substâncias detectadas na amostra de fluido oral 104 (positiva para THC, CBN e CBD) e (B) cromatograma de amostra de fluido oral negativo.

O 11-OH-THC é um produto de biotransformação ativo do THC, a ausência de detecção de 11-OH-THC nas amostras de fluido oral pode ser explicada pelo estudo controlado realizado em 2017 por Swortwood et al., onde foram analisados os fluidos orais de fumantes frequentes e

ocasionais de *Cannabis*. Os participantes foram submetidos a sessões de dosagem, incluindo ingestão de brownie ativo, cigarro ativo e dose de *Cannabis* vaporizada, o que demonstrou a presença limitada e transitória de 11-OH-THC no fluido oral. Em alguns casos, o analito apareceu rapidamente (0,17 h) após a administração, sugerindo possível metabolismo do THC na mucosa oral. A presença de enzimas do citocromo P450 em células do tecido oral humano pode influenciar a presença de metabólitos na saliva(78).

Além disso, o estudo menciona que o 11-OH-THC foi detectado com maior frequência após a administração por fumo, devido aos limites de quantificação (LOQ) mais baixos utilizados (0,2 vs. 0,5 µg/L), o que aumentou a sensibilidade da detecção. A maioria das concentrações observadas de 11-OH-THC poderia não ter sido detectada com métodos analíticos menos sensíveis utilizados anteriormente. Portanto, a ausência de detecção de 11-OH-THC nas amostras analisadas pode ser explicada pela sua rápida metabolização e baixa concentração no fluido oral, assim como pela limitação dos métodos analíticos anteriores em detectar níveis tão baixos deste metabólito.

A sensibilidade analítica do THC-COOH representa um desafio significativo para a realização de testes de fluido oral, devido às concentrações extremamente baixas, tipicamente na ordem de picogramas por mililitro. Estudos realizados por Lee (2012) e Scheidweiler (2013) demonstram que as concentrações medianas de THCCOOH em fluido oral são inferiores a 100 pg/mL uma hora após o uso de um cigarro contendo THC com 6,8% de concentração(79,80). Além disso, o comportamento ácido do THC-COOH influencia sua disponibilidade no fluido oral, visto que canabinoides ácidos exibem comportamentos específicos que são influenciados por suas propriedades químicas e pelo ambiente bucal.

O pH do fluido oral, que varia entre 6,2 e 7,4, faz com que essas substâncias tendam a permanecer em sua forma não ionizada, aumentando assim sua permeabilidade através das membranas celulares. Entretanto, a absorção pode ser limitada devido ao curto tempo de permanência na boca. A ligação a proteínas presentes no fluido oral, como a albumina, também pode influenciar a biodisponibilidade do THC-COOH. Além disso, a presença de enzimas capazes de metabolizar esses analitos, juntamente com interações com alimentos e bebidas que alteram o pH, desempenham um papel crucial na sua disponibilidade. A produção de saliva, por sua vez, pode diluir a concentração dos canabinoides e afetar sua absorção (72,81).

Adicionalmente, a detecção precisa desse metabólito requer técnicas analíticas altamente sensíveis e específicas, frequentemente envolvendo procedimentos complexos de preparação de

amostras, como a hidrólise básica mencionada por Moore (2011) (82). Caso esse processo não tenha sido realizado no estudo em questão, é esperado que a detecção de THC-COOH seja limitada ou mesmo inexistente, mesmo que o THC ativo esteja presente na amostra. Os resultados da análise dos produtos de biotransformação do CBD em fluido oral revelaram uma detecção desafiadora e uma baixa frequência de ocorrência.

Dos produtos estudados, apenas o 7-OH-CBD foi detectado, em concentrações muito baixas (de 2,26 a 2,28 ng/mL) em 1% das amostras analisadas, ainda não há relatos de estudos que obtiveram sucesso na detecção de 7-OH-CBD em fluido oral. Portanto, é impossível comparar os resultados encontrados no método com os resultados presentes na literatura.

Uma particularidade observada foi a rápida metabolização do 11-OH-THC na cavidade oral, o que pode acontecer de forma semelhante nos metabólitos do CBD, porém é importante ressaltar que, até o momento, não foram encontrados estudos que identificassem os metabólitos do CBD em fluido oral, o que limita a capacidade de correlacionar os dados obtidos com outras informações disponíveis na literatura. Essas descobertas destacam a necessidade de investigações mais detalhadas e estudos complementares que possam elucidar os padrões de metabolização do CBD em fluido oral.

Diante desses desafios, recomenda-se que futuras pesquisas explorem diferentes estratégias analíticas, incluindo a otimização de métodos de extração e a aplicação de técnicas mais sensíveis para a detecção de metabólitos do CBD em fluido oral. A colaboração interdisciplinar entre toxicologistas, químicos analíticos e especialistas em farmacologia será essencial para avançarmos na compreensão dos processos metabólicos do CBD e seus impactos na saúde humana.

Portanto, este estudo não apenas contribui apenas com uma metodologia inicial para a detecção de 7-OH-CBD e 7-COOH-CBD em fluido oral, mas também identifica lacunas críticas de conhecimento que devem ser abordadas em futuras investigações científicas neste campo promissor da *Cannabis* medicinal. Ainda, a ausência de detecção tanto de 11-OH-THC quanto de THC-COOH nas amostras analisadas pode ser atribuída a baixas concentrações no fluido oral e à sensibilidade limitada dos métodos analíticos utilizados.

## 7. CONCLUSÃO

No presente estudo, foi desenvolvido e validado um método para a detecção CBD, THC, seus respectivos produtos de biotransformação e o CBN em fluido oral. As análises revelaram desafios substanciais na detecção dos metabólitos dos canabinoides, devido à rápida metabolização e às concentrações extremamente baixas encontradas nas amostras. Este aspecto reforça a importância de investir em técnicas analíticas mais avançadas e sensíveis para a detecção de metabólitos de canabinoides em amostras biológicas. Apesar dessas dificuldades, o estudo identificou a presença do 7-OH-CBD em uma fração das amostras, destacando a necessidade de aprimoramentos metodológicos para aumentar a sensibilidade e a precisão das detecções.

## 8. REFERÊNCIAS

1. Baron Ep. Comprehensive Review Of Medicinal Marijuana, Cannabinoids, And Therapeutic Implications In Medicine And Headache: What A Long Strange Trip It's Been .... Headache: The Journal Of Head And Face Pain. 2015 Jun 25;55(6):885–916.
2. Crandall R. Cannabis. In: Drugs And Thugs. Yale University Press; 2020. P. 66–77.
3. Carlini Ea. A História Da Maconha No Brasil. J Bras Psiquiatr [Internet]. 2006 [Cited 2024 May 20];55(4):314–7. Available From: [Http://Www.Scielo.Br/Scielo.Php?Script=Sci\\_Arttext&Pid=S0047-20852006000400008&Lng=Pt&Tlng=Pt](http://Www.Scielo.Br/Scielo.Php?Script=Sci_Arttext&Pid=S0047-20852006000400008&Lng=Pt&Tlng=Pt)
4. Zuardi Aw. History Of Cannabis As A Medicine: A Review. Revista Brasileira De Psiquiatria [Internet]. 2006 Jun [Cited 2024 May 20];28(2):153–7. Available From: [Http://Www.Scielo.Br/Scielo.Php?Script=Sci\\_Arttext&Pid=S1516-44462006000200015&Lng=En&Tlng=En](http://Www.Scielo.Br/Scielo.Php?Script=Sci_Arttext&Pid=S1516-44462006000200015&Lng=En&Tlng=En)
5. Da Rosa L. Cultivo Do Cânhamo No Brasil [Internet]. 2018. Available From: [Https://Www.Researchgate.Net/Publication/330880922](https://Www.Researchgate.Net/Publication/330880922)
6. Donnelly J, Young M, Marshall B, Hecht MI, Saldutti E. Public Health Implications Of Cannabis Legalization: An Exploration Of Adolescent Use And Evidence-Based Interventions. Int J Environ Res Public Health. 2022 Mar 11;19(6):3336.
7. Fonseca Md, Van Wingerden Sgc. From Prohibition To Harm Reduction? An Analysis Of The Adoption Of The Dutch Harm Reduction Approach In Brazilian Drug Laws And Practice. International Journal Of Drug Policy. 2020 Sep;83:102842.
8. Ministério Da Saúde. Portaria No 344. Secretaria De Vigilância Em Saúde; May 12, 1998.
9. Subchefia Para Assuntos Jurídicos. Lei De Drogas. Presidência Da República - Secretaria-Geral; Aug 23, 2006.
10. Conselho Federal De Medicina. Uso Compassivo Do Canabidiol . 2014.
11. Ministério Da Saúde. Rdc N° 03. Agência Nacional De Vigilância Sanitária; Jan 26, 2015.
12. Ministério Da Saúde. Rdc N° 17. Agência Nacional De Vigilância Sanitária; May 6, 2015.
13. Anvisa. Resolução Da Diretoria Colegiada - Rdc No 327. Agência Nacional De Vigilância Sanitária; Dec 9, 2019.

14. Agência Nacional De Vigilância Sanitária – Anvisa. Rdc No 335. Ministério Da Saúde - Ms; Jan 24, 2020.
15. Agência Nacional De Vigilância Sanitária – Anvisa. Rdc No 659. Ministério Da Saúde - Ms; Mar 30, 2022.
16. Agência Nacional De Vigilância Sanitária – Anvisa. Rdc No 660. Ministério Da Saúde - Ms; Mar 30, 2022.
17. Agência Nacional De Vigilância Sanitária – Anvisa. Rdc No 570. Ministério Da Saúde - Ms; Oct 6, 2021.
18. Governo Do Estado De São Paulo. Lei N° 17.618. Jan 31, 2023.
19. Sunil M, Karimi P, Leong R, Zuniga-Villanueva G, Ratcliffe Em. Therapeutic Effects Of Medicinal Cannabinoids On The Gastrointestinal System In Pediatric Patients: A Systematic Review. *Cannabis Cannabinoid Res.* 2022 Dec 1;7(6):769–76.
20. Huestis Ma, Solimini R, Pichini S, Pacifici R, Carlier J, Busardò Fp. Cannabidiol Adverse Effects And Toxicity. *Curr Neuropharmacol.* 2019 Jun 3;17(10):974–89.
21. Peng J, Fan M, An C, Ni F, Huang W, Luo J. A Narrative Review Of Molecular Mechanism And Therapeutic Effect Of Cannabidiol (Cbd). *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2022 Apr 6;130(4):439–56.
22. Maccarrone M, Di Marzo V, Gertsch J, Grether U, Howlett Ac, Hua T, Et Al. Goods And Bads Of The Endocannabinoid System As A Therapeutic Target: Lessons Learned After 30 Years. *Pharmacol Rev.* 2023 Sep;75(5):885–958.
23. Devinsky O, Cilio Mr, Cross H, Fernandez-Ruiz J, French J, Hill C, Et Al. Cannabidiol: Pharmacology And Potential Therapeutic Role In Epilepsy And Other Neuropsychiatric Disorders. *Epilepsia.* 2014 Jun;55(6):791–802.
24. Senate And House Of Representatives Of The United States Of America. Hemp Farming Act Of 2018. United States Of America: Department Of Agriculture ;
25. Palazzoli F, Citti C, Licata M, Vilella A, Manca L, Zoli M, Et Al. Development Of A Simple And Sensitive Liquid Chromatography Triple Quadrupole Mass Spectrometry (Lc–Ms/Ms) Method For The Determination Of Cannabidiol (Cbd),  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol (Thc) And

- Its Metabolites In Rat Whole Blood After Oral Administration Of A Single High Dose Of Cbd. *J Pharm Biomed Anal.* 2018 Feb;150:25–32.
26. Pellati F, Brighenti V, Sperlea J, Marchetti L, Bertelli D, Benvenuti S. New Methods For The Comprehensive Analysis Of Bioactive Compounds In Cannabis Sativa L. (Hemp). *Molecules.* 2018 Oct 14;23(10):2639.
  27. Hassan Fu, Liu C, Mehboob M, Bilal Rm, Arain Ma, Siddique F, Et Al. Potential Of Dietary Hemp And Cannabinoids To Modulate Immune Response To Enhance Health And Performance In Animals: Opportunities And Challenges. *Front Immunol.* 2023;14:1285052.
  28. Mcpartland Jm. *Cannabis* Systematics At The Levels Of Family, Genus, And Species. *Cannabis Cannabinoid Res.* 2018 Oct;3(1):203–12.
  29. Kanabus J, Bryła M, Roszko M. The Development, Validation, And Application Of A Uhlplc-Hesi-MS Method For The Determination Of 17 Cannabinoids In Cannabis Sativa L. Var. Sativa Plant Material. *Molecules.* 2023 Dec 8;28(24):8008.
  30. Jannetto Pj. Clinical Toxicology Testing. In: *Clinical Toxicology Testing*. 2nd Ed. College Of American Pathologists; 2002. P. 205–13.
  31. Pigliasco F, Malaca S, Lo Faro Af, Tini A, Cangemi G, Cafaro A, Et Al. Cannabidiol,  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol, And Metabolites In Human Blood By Volumetric Absorptive Microsampling And Lc-MS/MS Following Controlled Administration In Epilepsy Patients. *Front Pharmacol.* 2022 Oct 24;13.
  32. Banister Sd, Arnold Jc, Connor M, Glass M, Mcgregor Is. Dark Classics In Chemical Neuroscience:  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol. *Acs Chem Neurosci.* 2019 May 15;10(5):2160–75.
  33. Volkow Nd, Baler Rd, Compton Wm, Weiss Srb. Adverse Health Effects Of Marijuana Use. *N Engl J Med.* 2014 Jun 5;370(23):2219–27.
  34. Grotenhermen F. Pharmacokinetics And Pharmacodynamics Of Cannabinoids. *Clin Pharmacokinet* [Internet]. 2003;42(4):327–60. Available From: <http://link.springer.com/10.2165/00003088-200342040-00003>
  35. Khouchlaa A, Khouri S, Hajib A, Zeouk I, Amalich S, Msairi S, Et Al. Health Benefits, Pharmacological Properties, And Metabolism Of Cannabinol: A Comprehensive Review. Vol. 213, *Industrial Crops And Products*. Elsevier B.V.; 2024.

36. Lu Hc, Mackie K. Review Of The Endocannabinoid System. *Biol Psychiatry Cogn Neurosci Neuroimaging*. 2021 Jun;6(6):607–15.
37. Aydin E, Cebo M, Mielnik J, Richter H, Schüle R, Sievers-Engler A, Et Al. Uhlplc-Esi-Ms/Ms Assay For Quantification Of Endocannabinoids In Cerebrospinal Fluid Using Surrogate Calibrant And Surrogate Matrix Approaches. *J Pharm Biomed Anal*. 2023 Jan;222:115090.
38. Biringer Rg. The Rise And Fall Of Anandamide: Processes That Control Synthesis, Degradation, And Storage. *Mol Cell Biochem*. 2021 Jul 13;476(7):2753–75.
39. Baggelaar Mp, Maccarrone M, Van Der Stelt M. 2-Arachidonoylglycerol: A Signaling Lipid With Manifold Actions In The Brain. Vol. 71, *Progress In Lipid Research*. Elsevier Ltd; 2018. P. 1–17.
40. Biernacki M, Skrzydlewska E. Metabolizm Endokannabinoidów Metabolism Of Endocannabinoids [Internet]. 2016. Available From: [Http://Www.Phmd.Pl/Fulltxt.Php?Icid=1213898](http://www.phmd.pl/fulltxt.php?icid=1213898)
41. Mechoulam R, Spatz M, Shohami E. Endocannabinoids And Neuroprotection. *Science's Stke*. 2002 Apr 23;2002(129).
42. Piomelli D. The Molecular Logic Of Endocannabinoid Signalling. *Nat Rev Neurosci*. 2003 Nov;4(11):873–84.
43. Pagotto U, Marsicano G, Cota D, Lutz B, Pasquali R. The Emerging Role Of The Endocannabinoid System In Endocrine Regulation And Energy Balance. *Endocr Rev*. 2006 Feb 1;27(1):73–100.
44. Abrams Di, Couey P, Shade Sb, Kelly Me, Benowitz Nl. Cannabinoid–Opioid Interaction In Chronic Pain. *Clin Pharmacol Ther*. 2011 Dec 2;90(6):844–51.
45. Huestis Ma. Pharmacokinetics And Metabolism Of The Plant Cannabinoids,  $\Delta$  9-Tetrahydrocannabinol, Cannabidiol And Cannabinol. In 2005. P. 657–90.
46. Rog Dj, Nurmikko Tj, Friede T, Young Ca. Randomized, Controlled Trial Of Cannabis-Based Medicine In Central Pain In Multiple Sclerosis. *Neurology*. 2005 Sep 27;65(6):812–9.
47. Bilbao A, Spanagel R. Medical Cannabinoids: A Pharmacology-Based Systematic Review And Meta-Analysis For All Relevant Medical Indications. *Bmc Med*. 2022 Aug 19;20(1):259.

48. Budney Aj, Roffman R, Stephens Rs, Walker D. Marijuana Dependence And Its Treatment. *Addiction Science & Clinical Practice*. 2007 Dec;4(1):4–16.
49. Meier Mh, Caspi A, Ambler A, Harrington H, Houts R, Keefe Rse, Et Al. Persistent Cannabis Users Show Neuropsychological Decline From Childhood To Midlife. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*. 2012 Oct 2;109(40).
50. Di Forti M, Quattrone D, Freeman Tp, Tripoli G, Gayer-Anderson C, Quigley H, Et Al. The Contribution Of Cannabis Use To Variation In The Incidence Of Psychotic Disorder Across Europe (Eu-Gei): A Multicentre Case-Control Study. *Lancet Psychiatry*. 2019 May;6(5):427–36.
51. Huestis Ma. Human Cannabinoid Pharmacokinetics. *Chem Biodivers*. 2007 Aug;4(8):1770–804.
52. Musshoff F, Madea B. Review Of Biologic Matrices (Urine, Blood, Hair) As Indicators Of Recent Or Ongoing Cannabis Use. *Ther Drug Monit*. 2006 Apr;28(2):155–63.
53. Antunes M, Barroso M, Gallardo E. Analysis Of Cannabinoids In Biological Specimens: An Update. *Int J Environ Res Public Health*. 2023 Jan 28;20(3):2312.
54. Gjerde H, Mordal J, Christophersen As, Bramness Jg, Morland J. Comparison Of Drug Concentrations In Blood And Oral Fluid Collected With The Intercept(R) Sampling Device. *J Anal Toxicol*. 2010 May 1;34(4):204–9.
55. Lee D, Huestis Ma. Current Knowledge On Cannabinoids In Oral Fluid. *Drug Test Anal*. 2014 Jan 25;6(1–2):88–111.
56. Trif C, Harpaz D, Eltzov E, Parcharoen Y, Pechyen C, Marks Rs. Detection Of Cannabinoids In Oral Fluid Specimens As The Preferred Biological Matrix For A Point-Of-Care Biosensor Diagnostic Device. *Biosensors (Basel)*. 2024 Feb 27;14(3):126.
57. Castaneto Ms, Wohlfarth A, Desrosiers Na, Hartman Rl, Gorelick Da, Huestis Ma. Synthetic Cannabinoids Pharmacokinetics And Detection Methods In Biological Matrices. *Drug Metab Rev*. 2015 Apr 3;47(2):124–74.
58. Raharjo Tj, Verpoorte R. Methods For The Analysis Of Cannabinoids In Biological Materials: A Review. *Phytochemical Analysis*. 2004 Mar 22;15(2):79–94.
59. Cantwell Ff, Losier M. Chapter 11 Liquid—Liquid Extraction. In 2002. P. 297–340.

60. Nahar L, Uddin Sj, Alam Ma, Sarker Sd. Extraction Of Naturally Occurring Cannabinoids: An Update. Vol. 32, *Phytochemical Analysis*. John Wiley And Sons Ltd; 2021. P. 228–41.
61. Carvalho V, Aguiar A, Baratto L, Souza F, Rocha E. Quantificação De Canabinoides Em Extratos Medicinais De Cannabis Por Cromatografia Líquida De Alta Eficiência. *Quim Nova*. 2020;
62. Dantas A, De Souza M, De Lima P, Lima M, Santana D, Maranhão R, Et Al. Desenvolvimento De Metodologia Para Determinação De Canabinoides Em Produtos À Base De Cannabis Para Fins Medicinais. *Quim Nova*. 2023;
63. Penteadó Jcp, Magalhães D, Masini Jc. Experimento Didático Sobre Cromatografia Gasosa: Uma Abordagem Analítica E Ambiental. *Quim Nova*. 2008;31(8):2190–3.
64. Nahar L, Onder A, Sarker Sd. A Review On The Recent Advances In Hplc, Uhpplc And Uplc Analyses Of Naturally Occurring Cannabinoids (2010–2019). *Phytochemical Analysis*. 2020 Jul 17;31(4):413–57.
65. Fonseca Aa. Espectrômetro De Massa: Um Novo Instrumento Analítico Para O Laboratório Clínico. *J Bras Patol Med Lab*. 2006 Dec;42(6).
66. Allochio Filho Jf, Pires B, Santos N, Dionísio Sj, Conceição N, Feu A, Et Al. Aplicação Da Espectrometria De Massas Com Ionização Por Paper Spray E Técnicas Relacionadas Na Análise Direta De Matrizes Biológicas Para Detecção De Drogas - Uma Revisão. *Quim Nova*. 2023;
67. Ansi/Asb. Standard For Mass Spectral Analysis In Forensic Toxicology [Internet]. Vol. 1, Standard 098. 2023. Available From: [Www.Aafs.Org/Academy-Standards-](http://www.aafs.org/academy-standards)
68. Ansi/Asb. Standard Practices For Method Validation In Forensic Toxicology [Internet]. Vol. 1, Standard 036. 2019. Available From: [Www.Asbstandardsboard.Org](http://www.asbstandardsboard.org).
69. Da Cunha Kf, Oliveira Kd, Huestis Ma, Costa Jl. Screening Of 104 New Psychoactive Substances (Nps) And Other Drugs Of Abuse In Oral Fluid By Lc–Ms–Ms. *J Anal Toxicol*. 2020 Oct 12;44(7):697–707.
70. Immunalysis Corporation. Comprehensive Drug Testing Solutions [Internet]. 2024 [Cited 2024 Jun 13]. Available From: [Https://Immunalysis.Com/Products/Oral-Fluid/Quantisal/](https://immunalysis.com/products/oral-fluid/quantisal/)

71. Scherer Jn, Vasconcelos M, Dalanhol Cs, Govoni B, Dos Santos Bp, Borges Gr, Et Al. Reliability Of Roadside Oral Fluid Testing Devices For  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -Thc) Detection. *Drug Test Anal.* 2024 Mar 5;
72. Immalysis Corporation. Oral Fluid Storage And Transportation [Internet]. 2017 [Cited 2024 Jun 13]. Available From: <https://Immalysis.Com/Products/Oral-Fluid/Quantisal/>
73. Kaiser Re, Graham Cooks R, Stafford Gc, Syka Jep, Hemberger Ph. Operation Of A Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometer To Achieve High Mass/Charge Ratios. *Int J Mass Spectrom Ion Process.* 1991 May;106:79–115.
74. Cox Ka, Cleven Cd, Cooks Rg. Mass Shifts And Local Space Charge Effects Observed In The Quadrupole Ion Trap At Higher Resolution. *Int J Mass Spectrom Ion Process.* 1995 May;144(1–2):47–65.
75. Scott Phillips Rbpab. Epidemiology, Toxicokinetics, And Health Effects Of Methyl Tert-Butyl Ether (Mtbe). *Toxicology Reviews.* 2008;4(2):115–26.
76. Desrosiers Na, Scheidweiler Kb, Huestis Ma. Quantification Of Six Cannabinoids And Metabolites In Oral Fluid By Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Drug Test Anal.* 2015 Aug 26;7(8):684–94.
77. Beers Jl, Authement A, Isoherranen N, Jackson Kd. Formation Of The Major Circulating Metabolite Of Cannabidiol By Non-P450, Cytosolic Enzymes. *The Faseb Journal.* 2022 May 13;36(S1).
78. Swortwood Mj, Newmeyer Mn, Andersson M, Abulseoud Oa, Scheidweiler Kb, Huestis Ma. Cannabinoid Disposition In Oral Fluid After Controlled Smoked, Vaporized, And Oral Cannabis Administration. *Drug Test Anal.* 2017 Jun 13;9(6):905–15.
79. Lee D, Schwoppe Dm, Milman G, Barnes Aj, Gorelick Da, Huestis Ma. Cannabinoid Disposition In Oral Fluid After Controlled Smoked Cannabis. *Clin Chem.* 2012 Apr;58(4):748–56.
80. Scheidweiler Kb, Himes Sk, Chen X, Liu Hf, Huestis Ma. 11-Nor-9-Carboxy- $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol Quantification In Human Oral Fluid By Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. In: *Analytical And Bioanalytical Chemistry.* 2013. P. 6019–27.

81. Bosker Wm, Huestis Ma. Oral Fluid Testing For Drugs Of Abuse. *Clin Chem*. 2009 Nov 1;55(11):1910–31.
82. Moore C, Coulter C, Uges D, Tuyay J, Van Der Linde S, Van Leeuwen A, Et Al. Cannabinoids In Oral Fluid Following Passive Exposure To Marijuana Smoke. *Forensic Sci Int*. 2011 Oct;212(1–3):227–30.

## 9. ANEXOS

### 9.1. Certificado de aprovação do Comitê de Ética

<p>UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP/CAMPUS CAMPINAS</p> 
<b>PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP</b>
<b>DADOS DA EMENDA</b>
<b>Título da Pesquisa:</b> PROJETO BACO - A Toxicologia & as Análises Toxicológicas como fontes de informação para políticas públicas sobre drogas
<b>Pesquisador:</b> Jose Luiz da Costa
<b>Área Temática:</b>
<b>Versão:</b> 12
<b>CAAE:</b> 88770318.0.0000.5404
<b>Instituição Proponente:</b> Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP
<b>Patrocinador Principal:</b> Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP
<b>DADOS DO PARECER</b>
<b>Número do Parecer:</b> 6.817.828
<b>Apresentação do Projeto:</b>
Esta versão trata-se de uma emenda que visa inserir um novo membro na equipe de pesquisa.
<b>Objetivo da Pesquisa:</b>
Mantidos em relação ao projeto original.
<b>Avaliação dos Riscos e Benefícios:</b>
Mantidos em relação ao projeto original.
<b>Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:</b>
De acordo com os comentários do pesquisador responsável contemplados no documento anexado "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_2336736_E7.pdf 03/05/2024 11:07:45":
"Solicita-se a inclusão uma nova pesquisadora ao projeto: Lilian de Araújo Lima, CPF 109.960.114-20, aluna de mestrado do PPG-Farmacologia FCM-UNICAMP, que realizará exames quantitativos para determinação da concentração de canabinoides em amostras de fluido oral."
<b>Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:</b>
Vide campo abaixo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações"
<b>Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:</b>
Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do CEP, de acordo com as atribuições
<p><b>Endereço:</b> Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, 1º andar do Prédio I da Faculdade de Ciências Médicas  <b>Bairro:</b> Barão Geraldo <b>CEP:</b> 13.083-887  <b>UF:</b> SP <b>Município:</b> CAMPINAS  <b>Telefone:</b> (19)3521-8936 <b>Fax:</b> (19)3521-7187 <b>E-mail:</b> cep@unicamp.br</p>