



**I NSTITUTO LATINO-AMERICANO
DE CIÊNCIAS DA VIDA E NATUREZA
(ILACVN)**

BIOTECNOLOGIA

**Estudo da estabilidade de fitocanabinoides em extratos medicinais de *Cannabis sativa L*,
em diferentes condições de armazenamento**

NÉDICE BORGES CARDOSO RASTELY

Foz do Iguaçu
2023

**Estudo da estabilidade dos fitocanabinoides em extratos medicinais de *Cannabis sativa*
L., em diferentes condições de armazenamento**

NÉDICE BORGES CARDOSO RASTELY

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza | ILACVN, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Aline Theodoro Toci

Foz do Iguaçu
2023

NEDICE BORGES CARDOSO RASTELY

Estudo da estabilidade dos fitocannabinoides em extratos medicinais de *Cannabis sativa* L, em diferentes condições de armazenamento

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza | ILACVN, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof. Dra. Aline Theodoro Toci
UNILA

Prof. Dra. Marcela Boroski
UNILA

Prof. Dr. Francisney Pinto do Nascimento
UNILA

Foz do Iguaçu, 26 de outubro de 2023.

TERMO DE SUBMISSÃO DE TRABALHOS ACADÊMICOS

Nome completo do autor(a): Nedice Borges Cardoso Rastely

Curso: Biotecnologia

	Tipo de Documento
(X) graduação	(.....) artigo
(.....) especialização	(X) trabalho de conclusão de curso
(.....) mestrado	(.....) monografia
(.....) doutorado	(.....) dissertação
	(.....) tese
	(.....) CD/DVD – obras audiovisuais
	(.....) _____

Título do trabalho acadêmico: Estudo da estabilidade dos fitocanabinoides em extratos medicinais de *Cannabis sativa L.*, em diferentes condições de armazenamento

Nome do orientador(a): Aline Theodoro Toci

Data da Defesa: 26/10/2023

Licença não-exclusiva de Distribuição

O referido autor(a):

a) Declara que o documento entregue é seu trabalho original, e que o detém o direito de conceder os direitos contidos nesta licença. Declara também que a entrega do documento não infringe, tanto quanto lhe é possível saber, os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade.

b) Se o documento entregue contém material do qual não detém os direitos de autor, declara que obteve autorização do detentor dos direitos de autor para conceder à UNILA – Universidade Federal da Integração LatinoAmericana os direitos requeridos por esta licença, e que esse material cujos direitos são de terceiros está claramente identificado e reconhecido no texto ou conteúdo do documento entregue.

Se o documento entregue é baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não a Universidade Federal da Integração Latino-Americana, declara que cumpriu quaisquer obrigações exigidas pelo respectivo contrato ou acordo.

Na qualidade de titular dos direitos do conteúdo supracitado, o autor autoriza a Biblioteca LatinoAmericana – BIUNILA a disponibilizar a obra, gratuitamente e de acordo com a licença pública Creative Commons Licença 3.0 Unported.

Foz do Iguaçu, _____ de _____ de _____.

Assinatura do Responsável

Dedico este trabalho a todos aqueles que estenderam sua mão amiga ao longo desta jornada. Aos que mantiveram fé em meu potencial, mesmo nos momentos em que minha confiança vacilou. Este trabalho atesta que é possível conquistar desafios com resoluta determinação.

AGRADECIMENTOS

Concluir uma graduação é uma longa jornada, uma verdadeira odisséia repleta de desafios, momentos de melancolia e incertezas que, embora possam perturbar, também proporcionam regozijos que aquecem a alma. São como obstáculos no caminho, mas que, entretanto, contribuem para nosso amadurecimento, tornando essa experiência algo verdadeiramente singular.

É com profunda gratidão que dedico este projeto a alguém inestimável, minha mãe, Jociene Rastely, cujo apoio, orações, sábios conselhos e lições moldaram minha personalidade, minhas atitudes e meu ser. A ela, sou devedor por suas palavras de incentivo e pelo amor que sempre me sustentaram ao longo desta jornada desafiadora. Não posso deixar de expressar minha sincera gratidão aos meus irmãos, Benjamin, Eloah e Poliana, cujos corações sempre estiveram repletos de amor e esperança, não apenas por minha própria conquista, mas também por estimularem suas próprias jornadas acadêmicas. Agradeço a Deus, que iluminou e confortou nossos passos durante toda essa trajetória, lançando Sua luz nos momentos mais sombrios e nos orientando quando a estrada se apresentava difusa.

Minha mais profunda gratidão se estende à minha orientadora, a Professora Doutora Aline Theodoro Toci, que sempre acreditou em meu potencial. Agradeço sua orientação exemplar, baseada em um elevado rigor científico, um comprometimento incansável, uma visão crítica perspicaz e um envolvimento enriquecedor e inigualável. Também sou grato a Wagner Ferreira, pelo apoio, auxílio e incentivo constantes ao longo da minha jornada acadêmica. Ambos foram anjos que Deus trouxe para minha vida nesta fase. Através deles, pude adquirir lições valiosas sobre solidariedade, compaixão e ajuda ao próximo.

Ao meu estimado grupo de pesquisa, LEIMAA, onde iniciei minha trajetória como pesquisador, agradeço pelo apoio no laboratório e pelos valiosos ensinamentos. Uma menção especial vai para minha fiel companheira de laboratório, Luana, que tornou meus momentos de pesquisa mais agradáveis e enriquecedores, proporcionando valiosos ensinamentos.

E aos meus amigos, Agatha, Susana, Andres, Luiz e Gustavo, quero expressar minha profunda apreciação por todas as histórias e experiências que compartilhamos ao longo de nossa jornada na universidade. As lembranças, confusões e dramas que vivenciamos juntos permanecerão gravados em minha memória de maneira indelével. Susana, em especial, é uma amiga leal e companheira que esteve ao meu lado nos momentos de ansiedade e tensão, assim como nas vitórias extraordinárias. Ela é como uma irmã para mim, e desejo levá-la em meu coração para toda a

eternidade. Agatha também merece todo meu reconhecimento por sempre estar ao meu lado, oferecendo ajuda e conselhos da melhor maneira possível. Com ela, vivi os melhores momentos destes cinco anos de graduação. Agradeço a Andres por todos os momentos de descontração e diversão.

Do fundo do meu coração a todos vocês eu digo...

... OBRI-GRACIAS!

*Todos veem o que você parece ser,
mas poucos sabem o que você realmente é.*

Niccolò Machiavelli

RESUMO

Atualmente, observamos uma demanda terapêutica crescente por produtos derivados da Cannabis. Portanto, a quantificação confiável e rápida dos extratos de *Cannabis sativa L*, bem como a compreensão dos fatores que influenciam a sua degradação, são etapas fundamentais para o controle de qualidade dos extratos. Este estudo teve como objetivo investigar a degradação dos fitocanabinoides Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC) e Canabidiol (CBD), juntamente com suas formas ácidas, ácido tetrahydrocannabinol (THCA) e ácido canabidiol (CBDA), em extratos medicinais submetendo-os a diversas condições de armazenamento ao longo do tempo. A metodologia de dosagem, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD), foi validada seguindo as diretrizes do INMETRO. O armazenamento foi realizado por 5 meses nas seguintes condições: temperatura a 5 °C e 25 °C, com e sem luz a LED. A validação da metodologia para dosagem dos fitocanabinóides THC, CBD e suas formas ácidas foi realizada com sucesso. O método apresentou efeito de matriz, portanto toda validação foi realizada diretamente nos extratos de cannabis, e boa linearidade com coeficiente de correlação superior a 0,99. A precisão intermediária e repetibilidade foram obtidas na faixa de trabalho utilizada, estimada pelo RSD inferior a 11%. Os limites de detecção e quantificação para o CBD-A, CBD, THC e THC-A, variaram de 0,57 a 16,73 e de 22,34 a 51,23 µg/mL respectivamente, para todos os quatro fitocanabinóides dosados. Os resultados indicam uma degradação gradual nos extratos, com algumas variações e influências das condições de armazenamento, chegando a perdas de 34 e 82% após cinco meses para o THC e CBD, respectivamente. As formas ácidas foram totalmente degradadas após três meses em todas as condições de armazenamento. As análises mostraram diferenças na degradação entre CBD e THC. A luz e a temperatura tiveram impacto na degradação, sendo o THC mais susceptível à luz e temperatura de 25 °C. Já o CBD foi mais susceptível na ausência de luz e temperatura de 25 °C. Dadas as diferenças nas variáveis que influenciam o THC e o CBD, recomenda-se que os extratos ricos em THC sejam armazenados a baixas temperaturas e protegidos da luz, enquanto os ricos em CBD devem ser armazenados a baixas temperaturas e com luz. Porém, fica evidente que em todos os extratos após 150 dias de armazenamento as concentrações, na melhor das hipóteses, caem abaixo de 50% da concentração, necessitando de ajustes na dosagem.

Palavras-chave: Cannabis, canabinoides, THC, dosagem, validação de método, CBD

RESUMEN

Actualmente observamos una creciente demanda terapéutica de productos derivados del Cannabis. Por lo tanto, la cuantificación confiable y rápida de los extractos de Cannabis sativa L, así como la comprensión de los factores que influyen en su degradación, son pasos fundamentales para el control de calidad de los extractos. Este estudio tuvo como objetivo investigar la degradación de los fitocannabinoides Δ^9 -Tetrahidrocannabinol (THC) y Cannabidiol (CBD), junto con sus formas ácidas, ácido tetrahidrocannabinol (THCA) y ácido cannabidiol (CBDA), en extractos medicinales sometidos a diferentes condiciones de almacenamiento a lo largo del tiempo. La metodología de dosificación, mediante cromatografía líquida de alta resolución con detector de matriz de diodos (HPLC-DAD), fue validada siguiendo las pautas del INMETRO. El almacenamiento se realizó durante 5 meses en las siguientes condiciones: temperatura a 5 °C y 25 °C, con y sin luz LED. Se realizó con éxito la validación de la metodología para medir los fitocannabinoides THC, CBD y sus formas ácidas. El método mostró un efecto matricial, por lo que toda la validación se realizó directamente en extractos de cannabis. Se obtuvo buena linealidad con un coeficiente de correlación superior a 0,99, precisión intermedia y repetibilidad en el rango de trabajo utilizado. Los límites de detección y cuantificación oscilaron entre 0,57 y 16,73 y entre 22,34 y 51,23 $\mu\text{g/mL}$, para los cuatro fitocannabinoides medidos. Los resultados indican una degradación gradual en los extractos, con algunas variaciones e influencias de las condiciones de almacenamiento, alcanzando pérdidas del 34 y 82% después de cinco meses para THC y CBD, respectivamente. Las formas ácidas se degradaron completamente después de tres meses en todas las condiciones de almacenamiento. Los análisis mostraron diferencias en la degradación entre CBD y THC. La luz y la temperatura tuvieron un impacto en la degradación, siendo el THC más susceptible a la luz y a una temperatura de 25 oC. El CBD fue más susceptible en ausencia de luz y una temperatura de 25 oC. Dadas las diferencias en las variables que influyen en el THC y el CBD, se recomienda almacenar los extractos ricos en THC a bajas temperaturas y protegidos de la luz, mientras que los ricos en CBD deben almacenarse a bajas temperaturas y con luz. Sin embargo, es evidente que en todos los extractos después de 150 días de almacenamiento, las concentraciones, en el mejor de los casos, caen por debajo del 50% de la concentración, lo que requiere ajustes de dosis.

Palabras clave: Cannabis, cannabinoides, THC, dosificación, validación de método, CBD

ABSTRACT

Currently, we observe a growing therapeutic demand for Cannabis-derived products. Therefore, reliable and rapid quantification of Cannabis sativa L extracts, as well as understanding the factors that influence their degradation, are fundamental steps for extract quality control. This study aimed to investigate the degradation of the phytocannabinoids Δ 9-Tetrahydrocannabinol (THC) and Cannabidiol (CBD), together with their acidic forms, tetrahydrocannabinol acid (THCA) and cannabidiol acid (CBDA), in medicinal extracts by subjecting them to different conditions of storage over time. The dosing methodology, using high-performance liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD), was validated following INMETRO guidelines. Storage was carried out for 5 months under the following conditions: temperature at 5 °C and 25 °C, with and without LED light. Validation of the methodology for measuring the phytocannabinoids THC, CBD and their acid forms was successfully carried out. The method showed a matrix effect, therefore all validation was carried out directly on cannabis extracts. Good linearity with a correlation coefficient greater than 0.99, intermediate precision and repeatability were obtained in the working range used. The limits of detection and quantification ranged from 0.57 to 16.73 and from 22.34 to 51.23 $\mu\text{g/mL}$, for all four phytocannabinoids measured. The results indicate a gradual degradation in the extracts, with some variations and influences of storage conditions, reaching losses of 34 and 82% after five months for THC and CBD, respectively. The acidic forms were completely degraded after three months under all storage conditions. Analyzes showed differences in degradation between CBD and THC. Light and temperature had an impact on degradation, with THC being more susceptible to light and a temperature of 25 oC. CBD was more susceptible in the absence of light and a temperature of 25 oC. Given the differences in the variables that influence THC and CBD, it is recommended that extracts rich in THC be stored at low temperatures and protected from light, while those rich in CBD should be stored at low temperatures and with light. However, it is evident that in all extracts after 150 days of storage, concentrations, at best, fall below 50% of the concentration, requiring dosage adjustments.

Keywords: Cannabis, cannabinoids, THC, dosage, method validation, CBD

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa de utilização da cannabis ao longo dos séculos.	25
Figura 2 - Identificação dos botões florais de cannabis machos e fêmeas.....	29
Figura 3 - Flor femea Cannabis sativa.L.....	30
Figura 4 - Tricomas da planta cannabis.	31
Figura 5 - Diferenças anatômicas entre as três principais variedades de cannabis.....	32
Figura 6 - Terpenos encontrados na planta cannabis	35
Figura 7 - Principais modificações químicas dos fitocanabinoides ocorridas na planta.....	36
Figura 8 - Transformações química dos canabinoides.....	37
Figura 9 - Amostras de extrato de Cannabis Sativa da ABRACE: A e AME-C: B, C e D.....	41
Figura 10 - Desenho Experimental – Representação das Condições de Armazenamento.....	42
Figura 11 - Caixa de madeirite para controle da temperatura ambiente a 25 °C com luz a LED branca.....	43
Figura 12 - Caixa de papelão para controle da temperatura a 5 °C. com luz a LED branca.....	44
Figura 13 - Desenho experimental - Intervalo entre as análises em dias.....	44
Figura 14 - curva analítica para o THC realizadas no solvente e na matriz.....	50
Figura 15 - Gráfico de resíduos do fitocanabinoide THC-A.....	52
Figura 16 - Perfil cromatográfico dos padrões de fitocanabinoides na concentração 20 µg/mL na matriz.	54
Figura 17 - Gráficos da variação dos teores de CBD e THC no extrato A ao longo do período de armazenamento em diversas condições.....	58
Figura 18 - Gráficos da variação dos teores de CBD-A e THC-A no extrato A ao longo do período de armazenamento em diversas condições.....	59
Figura 19 - Gráfico dos efeitos para as variáveis temperatura e luz do fitocanabinoides THC no extrato A.....	61
Figura 22 Gráfico dos efeitos para as variáveis temperatura e luz do fitocanabinoides THC-A.....	62
Figura 23 - Cromatograma apresentado por Zivovinovic.....	57
Figura 24 - Gráficos da variação dos teores de CBD e THC no extrato B ao longo do período de armazenamento em diversas condições.....	58
Figura 25 - Gráfico dos efeitos para as variáveis temperatura e luz do fitocanabinoides CBD no extrato B.....	60
Figura 26 - Gráficos da variação dos teores de CBD e THC no extrato C ao longo do período de armazenamento em diversas condições.....	61
Figura 27 - Gráfico dos efeitos para as variáveis temperatura e luz dos fitocanabinoides THC e CBD no extrato C.....	62

Figura 28 - Gráficos da variação dos teores de CBD e THC no extrato D ao longo do período de armazenamento em diversas condições	63
Figura 29 - Gráfico dos efeitos para as variáveis temperatura e luz dos fitocanabinoides CBD e THC	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Teores dos fitocanabinoides e excipiente dos extratos de <i>Cannabis Satiliva</i> L. estudados.	35
Tabela 2 - Teste F e t-Student para a verificação das inclinações das curvas analíticas no solvente na matriz	45
Tabela 3 - Parâmetros das curvas analíticas	46

Tabela 4 - Valores do desvio padrão relativo (%) na faixa de trabalho utilizada para cada fitocanabinoide	47
Tabela 5 - Valores do desvio padrão relativo (%) intra-dia nos níveis de concentração baixo, médio e alto da faixa de trabalho para cada fitocanabinoide.....	48
Tabela 6 - Teores dos fitocanabinoides durante o processo de armazenamento do extrato A	49
Tabela 7 - Valores de <i>p</i> obtidos na ANOVA para os fitocannabinoides do extrato A	54
Tabela 8 - Valores de <i>p</i> obtidos na ANOVA para os fitocannabinoides do extrato B	59
Tabela 9 - Valores de <i>p</i> obtidos na ANOVA para os fitocannabinoides do extrato C	61
Tabela 10 - Valores de <i>p</i> obtidos na ANOVA para os fitocannabinoides do extrato D	64
Tabela 11 - Valores da degradação no extrato B	74
Tabela 12 - Valores da degradação no extrato C	76
Tabela 13 - Valores da degradação no extrato D	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CBC	Canabicromeno
CBDA	Ácido Canabidiólico
CBDV	Canabidivarina
CBG	Canabigerol
CBGA	Ácido Canabigerólico
CBN	Canabinol
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
THC	Tetrahydrocannabinol
THCA	Ácido Tetrahydrocannabinólico
CBD	Canabidiol

SUMARIO

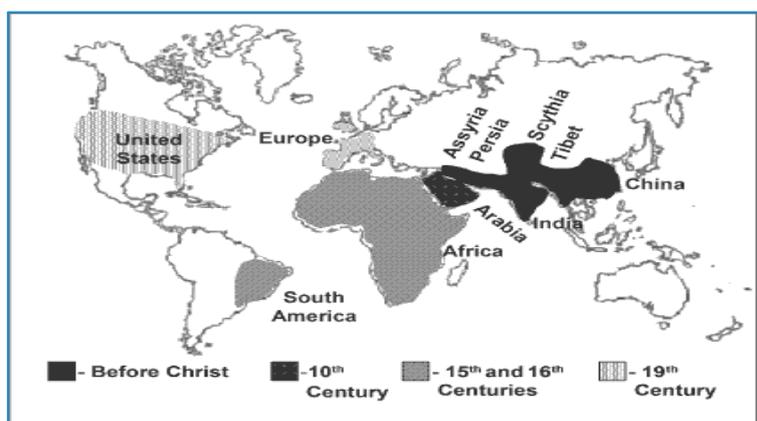
1. INTRODUÇÃO.....	25
1.1 HISTÓRICO TERAPÊUTICO.....	26
1.1.1 Regulamentação:	27
1.1.2 Associações brasileiras de cannabis medicinal:	27
1.1.3 Mercado da cannabis:.....	28
1.2 A PLANTA E SUA QUÍMICA:	29
1.2.1 Modificações dos fitocannabinoides na planta:	35
1.2.2 Modificações no extrato:	37
1.3 RELEVÂNCIA DO ESTUDO	38
2. OBJETIVO GERAL.....	39
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
3.1 REAGENTES.....	40
3.2 AMOSTRAS DE EXTRATOS MEDICINAIS DE CANNABIS	40
3.3 DESENHO EXPERIMENTAL:	42
3.4 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DOSAGEM DOS FITOCANABINOIDES	45
3.5 PREPARO DE AMOSTRAS.....	48
3.6 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA AO DETECTOR DIOD ARRAY (CLAE-DAD).....	48
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
4.1 VALIDAÇÃO.....	50
4.1.1 EFEITO MATRIZ	50
4.1.2 LINEARIDADE E HOMOSCEDASTICIDADE.....	51

4.1.3 LIMITES DE DETECÇÃO E DE QUANTIFICAÇÃO.....	52
4.1.4 PRECISÃO E REPETIBILIDADE	53
4.2 PERFIL CROMATOGRÁFICO E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS	54
4.3 COMPORTAMENTO DOS EXTRATOS	55
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
6. REFERÊNCIAS	74
7. APÊNDICE	80

1. INTRODUÇÃO

A cannabis é uma planta milenar que tem sido utilizada por diversas culturas em todo o mundo há milhares de anos devido seus efeitos terapêuticos e recreativos (Figura 1). Segundo registros históricos, a cannabis foi utilizada na China há cerca de 5.000 anos atrás para tratar diversas enfermidades, como febre, reumatismo e dores (LI, 1974). Na Índia, a planta era usada em práticas religiosas e medicinais há mais de 3.000 anos (CHOPRA *et al.*, 1957). Atualmente, a cannabis é utilizada no mundo inteiro, principalmente por suas propriedades medicinais.

Figura 1 - Mapa de utilização da cannabis ao longo dos séculos.



Fonte: Li, 1974.

Cannabis é um gênero de angiospermas que inclui três variedades diferentes, *Cannabis sativa*, *Cannabis indica* e *Cannabis ruderalis*, que apresentam diferentes efeitos psicotrópicos e terapêuticos (MEHMEDIC *et al.*, 2010). Todavia, é conhecida por uma variedade de termos de uso informal em diferentes contextos históricos e culturais, usualmente chamada de charro, chamon, liamba, erva, hax, haxixe ou cânhamo. Além de suas propriedades psicoativas e terapêuticas, a cannabis tem sido muito utilizada para a fabricação de fibras (cânhamo) (FREIRE, 2021).

Na Europa, o uso das fibras de cânhamo exerceu uma contribuição muito importante para equipar as caravelas no período das grandes navegações, possibilitando a confecção de velas e cordas resistentes para suportarem as condições drásticas encontradas ao cruzar os oceanos (FREIRE, 2021). No Brasil, o primeiro registro da presença do cânhamo foi descrito por Garcia Orta, que relatou o uso em rituais religiosos pelos povos escravizados do banguê, denominação que foi utilizada por esses povos (KING, 2019). Com o passar dos anos, o cânhamo começou a ser chamado de maconha,

inicialmente na forma de gíria, mas que atualmente é uma das denominações mais conhecidas da planta da cannabis. A palavra tem origem a partir de um anagrama da palavra cânhamo (ARAÚJO, 2017).

1.1 HISTÓRICO TERAPÊUTICO

O primeiro caso comprovado de isolamento, em forma pura, de um princípio ativo da cannabis, o Δ^9 -tetraidrocanabinol ou simplesmente Δ^9 -THC, foi reportado, em 1964 por Gaoni e Mechoulam em Israel, um marco para a pesquisa sobre a cannabis medicinal (CARNEIRO, 2019). No Brasil, o pesquisador Elisaldo Carlini e seu grupo conduziram mais de 30 estudos sobre o tema, incluindo um pioneiro em 1980 que investigou a administração de Canabidiol (CBD), um outro princípio ativo da cannabis, para controle de crises convulsivas em voluntários saudáveis e pacientes epiléticos (RABIPUR, 2022). Desde então, a identificação de canabinóides com efeito fisiológico têm levado muitos pacientes a buscar tratamentos com base em cannabis (RABIPUR, 2022). Embora a legislação brasileira avance lentamente em relação à aceitação da relevância da planta, algumas normativas já foram estabelecidas para permitir o uso medicinal em casos específicos.

No dia 2 de agosto de 1937 foi aprovada nos Estados Unidos a Lei de taxação da Marijuana (denominação informal da Cannabis naquele país), taxando as produções e venda dos produtos de cannabis. Tal medida fez com que os tratamentos e a produção ficassem inviabilizados. Não demorou muito para que os efeitos desse movimento chegassem ao Brasil. A proibição começou em 1938, quando o governo brasileiro aprovou a Lei de Drogas, que proibia o uso, a produção e a venda de cannabis e outras substâncias consideradas ilícitas (MARTINS, 2011). Desde então, a cannabis tem sido amplamente associada a problemas de saúde pública e segurança, o que tem levado à criminalização do seu uso e ao encarceramento de milhares de pessoas no país (CARNEIRO, 2019).

Em 2019, a ONU classificou a cannabis para a lista das plantas que têm propriedades medicinais reconhecidas, embora devam ser controladas. Então, isso é um avanço diante da proibição em nível internacional. As leis do Brasil ainda são conservadoras, mas o movimento das famílias, dos pacientes, das associações, inclusive das empresas que pretendem atuar nesse ramo, está em pleno

andamento (AGÊNCIA SENADO, 2023).

1.1.1 Regulamentação:

No Brasil, a legislação antidrogas é conhecida por ser uma das mais repressivas do mundo, o que tem gerado críticas de diversos setores da sociedade. Muitos apontam para o fracasso da política de proibição e defendem a adoção de políticas mais focadas na redução de danos (COTRIM, 2020). A criminalização da cannabis também é vista como um fator que contribui para a violência e a insegurança no país, alimentando o mercado ilícito de drogas e colocando em risco a vida dos usuários (COLLUCI, 2019).

Desde 2015, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) permite o uso de medicamentos à base de cannabis mediante prescrição médica. Para ter acesso a esses medicamentos, é necessário obter uma receita médica específica, que deve indicar o nome do medicamento, a posologia e a duração do tratamento, além de um laudo médico que comprove a necessidade do uso da cannabis para o tratamento de uma doença. A prescrição de medicamentos à base de cannabis é restrita a casos específicos e deve ser feita por médicos registrados no Conselho Regional de Medicina (CRM), de acordo com a Anvisa. Além disso, os medicamentos só podem ser prescritos para o tratamento de doenças que não respondem satisfatoriamente aos tratamentos convencionais (ANVISA, 2022).

No entanto, muitos pacientes enfrentam dificuldades para conseguir acesso aos medicamentos à base de cannabis devido ao alto custo dos produtos e à falta de disponibilidade no mercado brasileiro. De acordo com uma matéria publicada na Folha de São Paulo, "a escassez de produtos nacionais e a falta de importação de medicamentos prontos" são os principais obstáculos para os pacientes que precisam desses tratamentos (COLLUCI, 2019).

1.1.2 Associações brasileiras de cannabis medicinal:

As associações de pacientes são instituições formadas por indivíduos que buscam acesso aos tratamentos à base de cannabis para si ou para seus familiares. No Brasil, essas associações têm desempenhado um papel crucial na obtenção da autorização legal para o cultivo da cannabis e

produção de medicamentos derivados da planta (ANVISA, 2019). Em 2019, a Anvisa estabeleceu novas regras para o cultivo da cannabis com fins medicinais e científicos. De acordo com a nova regulamentação, empresas e associações de pacientes podem solicitar permissão para cultivar a planta, desde que cumpram uma série de requisitos e normas estabelecidos pela agência (ANVISA, 2019).

As associações de pacientes que buscam autorização para o cultivo da cannabis devem apresentar um projeto detalhado que descreve todas as etapas do processo de produção, desde a aquisição das sementes até a fabricação dos medicamentos. Além disso, é fundamental que a associação conte com uma equipe de profissionais qualificados para a produção dos medicamentos, incluindo médicos, farmacêuticos e agrônomos (ANVISA, 2019). Após a aprovação do projeto, a associação recebe uma licença para o cultivo da cannabis, que deve ser realizada em ambiente fechado e controlado, com medidas de segurança e monitoramento 24 horas por dia. A Anvisa também estabelece que a produção dos medicamentos à base de cannabis deve seguir as Boas Práticas de Fabricação (BPF), garantindo a qualidade e a segurança dos produtos (ANVISA, 2019).

1.1.3 Mercado da cannabis:

O óleo de CBD, obtido pela extração, é um dos produtos mais comumente usados. Ele vem em diferentes concentrações e é utilizado para tratar uma diversidade de condições médicas. Além do óleo de CBD, há muitos outros produtos à base de cannabis disponíveis no mercado atualmente. A concentração de CBD e THC varia em cada um desses produtos, dependendo de sua finalidade e das regulamentações locais (WARE *et al.*, 2005).

No Brasil a ANVISA estabelece que os medicamentos à base de cannabis comercializados devem conter no máximo 0,2% de THC, de acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 327/2019. Essa regulamentação garante que os produtos estejam em conformidade com os limites legais de teor de THC, visando assegurar a segurança e a qualidade dos medicamentos (ANVISA, 2019)

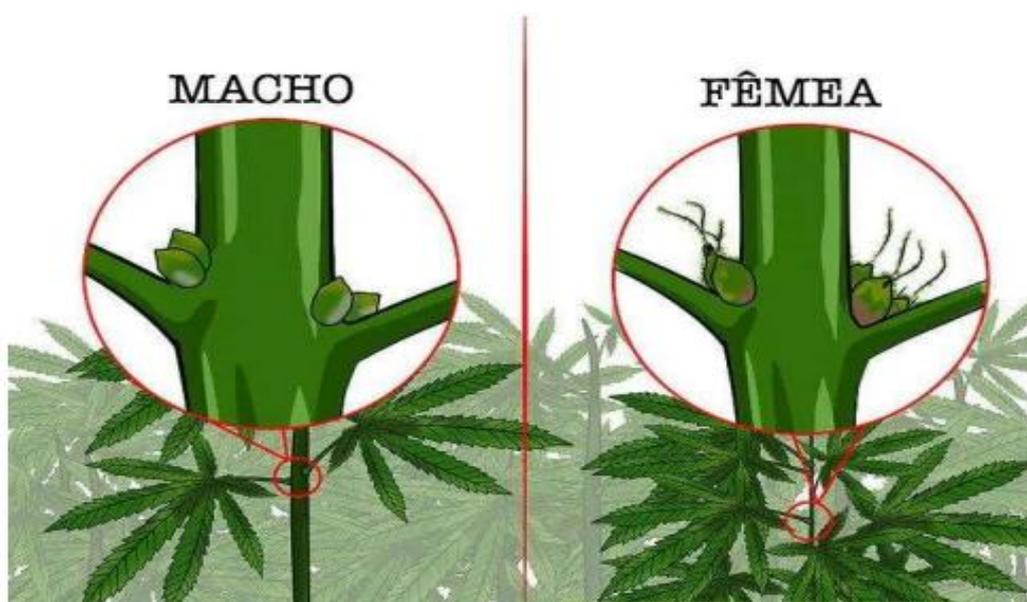
O mercado atual a nível internacional oferece diversos produtos à base de cannabis. Esses produtos compreendem várias combinações de componentes ativos presentes na planta, e vão desde alimentos e bebidas até cosméticos. No setor alimentício, é possível encontrar uma gama de produtos infundidos com cannabis, como chocolates, doces, bebidas e até mesmo alimentos salgados. Esses produtos mantem os benefícios terapêuticos da cannabis, proporcionando opções alternativas aos

consumidores. Além disso, a cannabis também tem sido incorporada em produtos cosméticos, como cremes, loções, óleos e até mesmo em produtos para cuidados com os cabelos (SOUZA & VASCONCELOS, 2022)

1.2 A PLANTA E SUA QUÍMICA:

Cannabis é uma planta anual, dicotiledônea, angiosperma, geralmente dioico, com flores macho e fêmea em plantas separadas, mas também pode ser monoico, compreendendo flores de ambos os sexos em uma única planta, normalmente tem flores imperfeitas, com estames "masculinos" e pistilos "femininos" que ocorrem em plantas separadas (Figura 2) (WARE *et al.*, 2005)

Figura 2 - Identificação dos botões florais de cannabis machos e fêmeas.



Fonte: Site Canalize, 2020.

A química da cannabis é complexa, com mais de 500 compostos identificados na planta, entre eles destacam-se os fitocanabinoides (ELSOHLY & SLADE, 2005). A distribuição dos

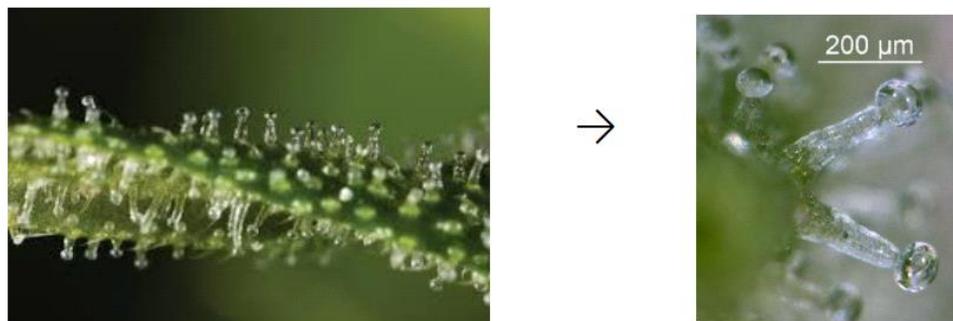
fitocanabinoides na planta não é uniforme, estando ausentes nas sementes e nas raízes e presentes em pequenas quantidades nos caules e nas folhas inferiores, com concentrações maiores nas folhas superiores, atingindo a maior concentração na flor da planta fêmea (Figura 3). Os fitocanabinoides são metabólitos secundários sintetizados em células secretórias chamadas de tricomas glandulares, que estão presentes em maiores concentrações nas flores fêmeas não fertilizadas, antes da senescência (Figura 4). Entretanto, o conteúdo canabinoide floral varia consideravelmente em uma única planta (ADDO *et al.*, 2021). Os fitocanabinoides desempenham um papel crucial na planta cannabis, incluindo a proteção contra patógenos, predadores e estresse ambiental, bem como a regulação do crescimento e desenvolvimento da planta.

Figura 3 - Flor fêmea *Cannabis sativa*.L



Fonte: Growthjane.com - acessado em 2023

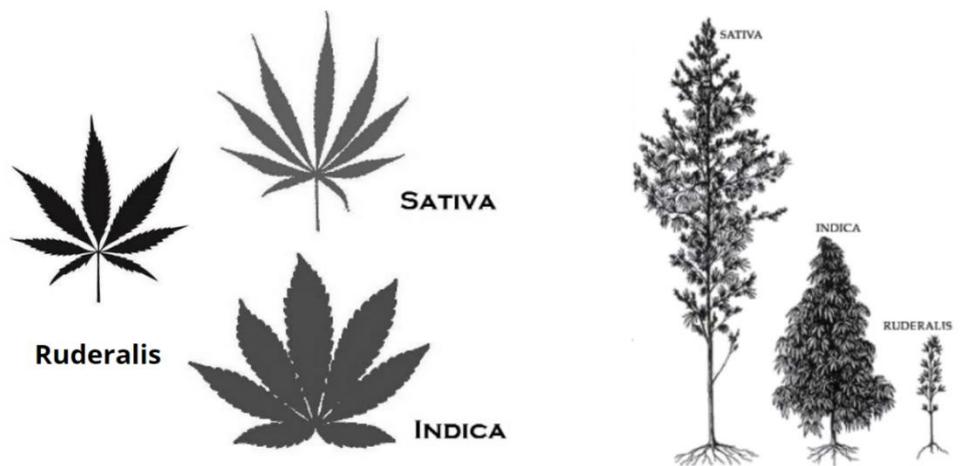
Figura 4 - Tricomas da planta cannabis.



Fonte: Russo, 2011

Até o momento, foram identificados mais de 120 fitocanabinoides diferentes nas plantas da família Cannabaceae, incluindo a *Cannabis sativa* e a *Cannabis indica* (Figura 5). A *Cannabis Ruderalis* é uma variedade de cannabis encontrada em regiões de clima frio, caracterizada por seu porte menor e baixos níveis de THC, geralmente abaixo de 5%, juntamente com quantidades moderadas de CBD, variando de 1% a 5%. Essa variedade não é considerada psicoativa e é menos comumente utilizada para fins recreativos. Por outro lado, a Cannabis Sativa é reconhecida por suas plantas altas, folhas finas e efeito estimulante. A variedade sativa pode apresentar teores de THC que variam em cerca de 10% a 30% ou mais, com níveis mais baixos de CBD, que normalmente variam de menos de 1% a cerca de 10% (FREIRE *et al.*, 2021).

Figura 5 - Diferenças anatômicas entre as três principais variedades de cannabis



Fonte: Jornal Marijuana, 2016.

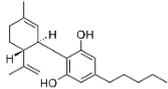
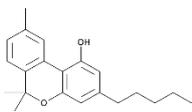
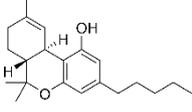
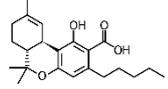
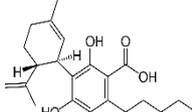
A *Cannabis Indica*, por sua vez, é conhecida por suas plantas de estatura mais baixa, folhas largas e efeito relaxante. As variedades de indica tendem a possuir níveis mais elevados de CBD em comparação com a sativa. O teor de THC nas variedades de indica pode variar de cerca de 10% a 25%, enquanto o CBD pode variar de menos de 1% a cerca de 15%. Essas características distintas das variedades de cannabis têm implicações importantes em relação aos efeitos esperados e aos usos terapêuticos associados a cada uma delas (FREIRE *et al.*, 2021).

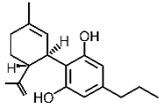
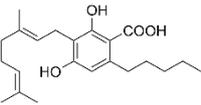
A molécula do THC desempenha um papel crucial nos efeitos psicoativos dos extratos de cannabis medicinal. Sua estrutura química inclui um anel ciclodecano fusionado com um anel benzeno, bem como uma cadeia lateral isoprenóide que contém um grupo hidroxila e uma dupla ligação (Quadro 1). Ao ser consumido, o THC se liga principalmente aos receptores canabinóides humanos CB1, que são encontrados em diversas regiões do cérebro. Esses receptores regulam processos fisiológicos essenciais, como metabolismo, dor, ansiedade, crescimento ósseo e função imunológica (TURNER *et al.*, 1973).

Diferentemente do THC, que causa efeitos psicoativos, o CBD só possui propriedades terapêuticas, sendo produzido a partir do ácido canabidiólico (CBDA) (TURNER *et al.*, 1973). A estrutura da molécula de CBD é semelhante à do THC, apresentando um anel ciclodecano fusionado com um anel benzeno, porém sem a cadeia lateral isoprenóide e com apenas uma ligação dupla (Quadro 1). O CBD é reconhecido por suas propriedades medicinais, com estudos apontando seu

potencial no tratamento da epilepsia, ansiedade e inflamações. Além disso, seus efeitos anti-inflamatórios e ansiolíticos têm sido investigados em diversas condições clínicas (AGGARWAL et al., 2009).

Quadro 1 - Principais fitocanabinoides - Estruturas, nome oficial e identificação molecular

Nome Completo	Nome Abreviado	Nomenclatura IUPAC	Fórmula Orgânica	Número CAS
Canabidiol	CBD	2-[(1R,6R)-3-Methyl-6-(1-methylethenyl)-2-cyclohexen-1-yl]-5-pentylbenzene-1,3-diol		13956-29-1
Canabinol	CBN	6,6,9-Trimethyl-3-pentil-6H-benzo[c]cromen-1-ol		521-35-7
Δ^9 -Tetrahydrocannabinol	THC	(-)-trans- Δ^9 -Tetrahydrocannabinol		1972-08-3
Δ^9 -Tetrahydrocannabinolic acid	THCA	(2E)-2-[(1R,6R)-3-Methyl-6-(1-methylethenyl)-2-cyclohexen-1-yl]-5-pentylbenzene-1,3-diol		23978-85-0
Ácido canabidiólico	CBDA	(2E)-2-[(1R,6R)-3-Methyl-6-(1-methylethenyl)-2-cyclohexen-1-yl]-5-pentylbenzene-1,3-diol		1249-94-9

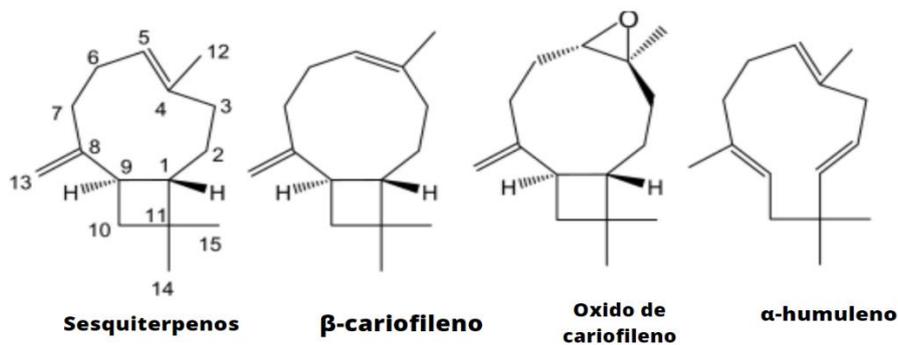
Cannabidivarin	CBDV	2-[(1R,6R)-3-Methyl-6-(1-methylethenyl)-2-cyclohexen-1-yl]-5-propylbenzene-1,3-diol		24274-48-4
Cannabigerol	CBG	2-[(1R,6R)-3-Methyl-6-(1-methylethenyl)-2-cyclohexen-1-yl]-5-pentylbenzene-1,3-diol		25654-31-3

Fonte: O autor

As formas ácidas dos fitocanabinoides, como o THCA e o CBDA, têm propriedades medicinais e terapêuticas importantes, mesmo não apresentando efeitos psicoativos significativos (Quadro 1). O THCA, por exemplo, demonstra potencial para tratamento de dor, inflamação e espasmos musculares, enquanto o CBDA tem sido estudado por seus efeitos anti-inflamatórios, anti-náusea e ansiolíticos (MORALES *et al.*, 2018). O uso dessas formas ácidas está se popularizando em produtos à base de cannabis e até mesmo na ingestão de flores cruas da planta, tendo em vista a preservação de suas propriedades medicinais (RUSSO, 2011) A maioria dos estudos se concentram nos fitocanabinoides mais abundantes e, assim, possuem fortes propriedades medicinais (Quadro 1) (PERTWEE, 2008).

A cannabis também possui uma variedade de terpenos e flavonóides como mostrado na (Figura 6). Os terpenos são responsáveis pelo aroma característico da planta e possuem propriedades terapêuticas próprias. Já os flavonoides são pigmentos que ajudam a proteger a planta contra a radiação UV e têm sido associados a efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes. O beta-cariofileno, por exemplo, é um terpeno que possui efeitos anti-inflamatórios, exerce ação bactericida e atua sobre o sistema endocanabinóide humano CB1 e CB2. A importância dos flavonoides na medicina e na farmacologia também tem sido destacada, devido aos seus efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios (GERTSCH *et al.*, 2008).

Figura 6 - Terpenos encontrados na planta cannabis



Fonte: Gertsch *et al.*, 2008

Assim como os fitocannabinoides, os terpenos são metabólitos secundários que, através do efeito entourage, podem produzir uma sinergia em relação ao tratamento da dor, processos inflamatórios, depressão, ansiedade, epilepsia, câncer, infecções fúngicas e bacterianas (RUSSO, 2011).

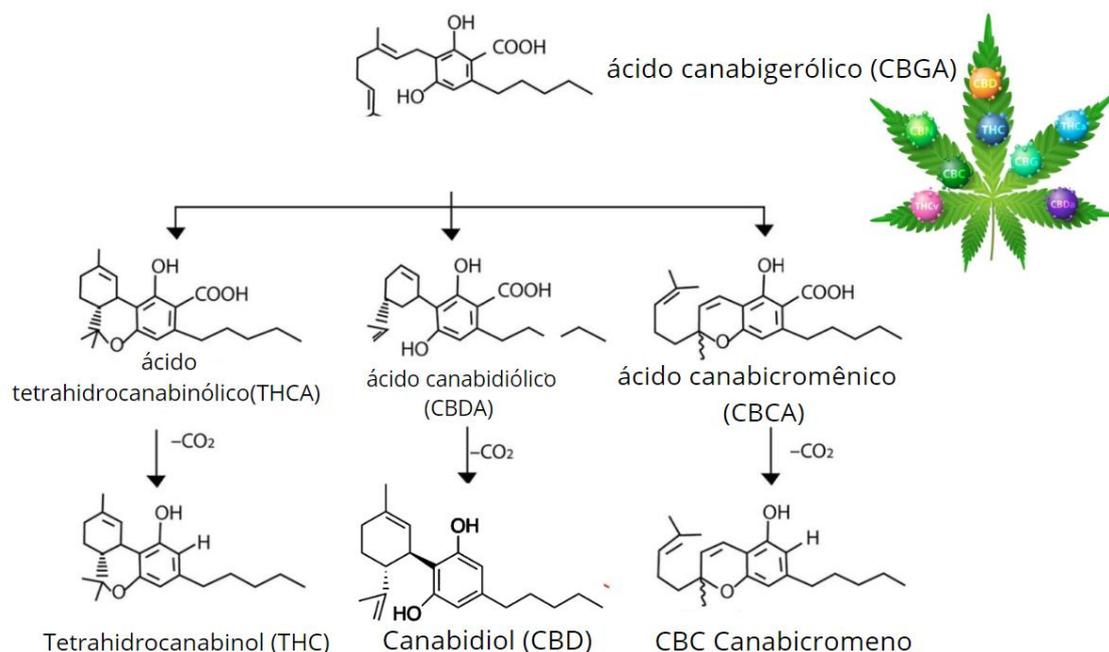
1.2.1 Modificações dos fitocannabinoides na planta:

A matéria-prima empregada na produção dos extratos medicinais de cannabis são as sumidades floridas de espécimes pistiladas (fêmeas) ricas em THCA e/ou CBDA (CARVALHO *et al.*, 2022). No processo de produção dos extratos, primeiramente a planta após a colheita é submetida ao aquecimento para descarboxilação dos canabinóides, produzindo então suas formas neutras, THC e CBD. Dependendo das condições de armazenamento, da temperatura e tempo, a matéria-prima pode

conter o produto de oxidação do THC, o canabinol (CBN) (Figura 7). Esses fitocanabinóides são os marcadores empregados no controle de qualidade desses extratos medicinais (CARVALHO *et al.*, 2022).

Os fitocanabinoides produzidos enzimaticamente podem sofrer diversas reações secundárias, sendo a principal a reação não enzimática de descarboxilação, que irá produzir os chamados fitocanabinoides neutros (ARAUJO, 2017). Na planta o principal precursor dos fitocanabinóides é o ácido canabigerólico (CBGA), que através de enzimas específicas produz os ácidos CBDA e THCA (Figura 7). Durante o ciclo de floração, o THCA se converte em THC, enquanto o CBDA se transforma em CBD. Após essa fase, a planta apresenta quantidades mínimas de CBGA, que podem ser convertidas em canabigerol (CBG). Como mencionado, este processo pode ser acelerado pelos produtores, para aumentar os níveis de THC e CBD na planta antes do processo de extração (BERMAN *et al.*, 2018).

Figura 7 - Principais modificações químicas dos fitocanabinoides ocorridas na planta.



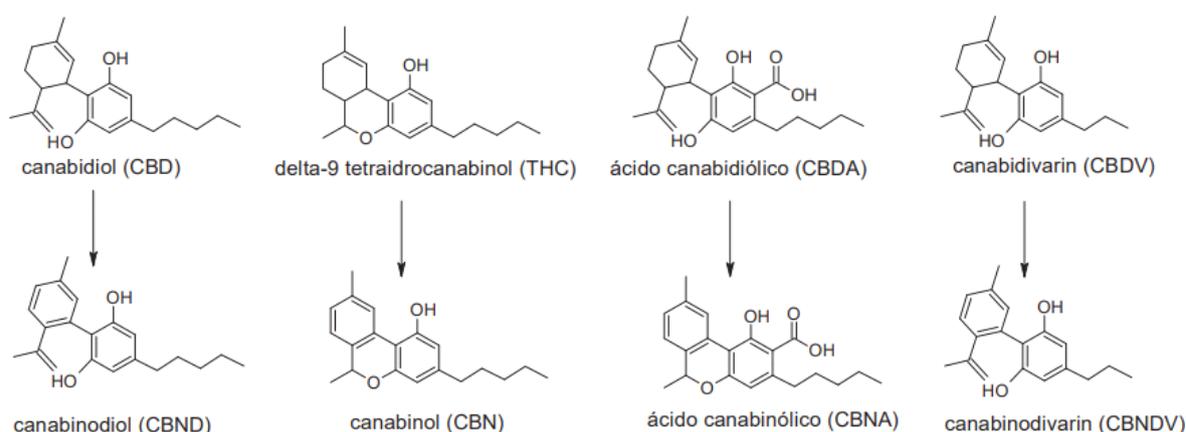
Fonte: Adaptado de Berman *et al.*, 2018.

1.2.2 Modificações no extrato:

Diversos estudos têm investigado as condições de armazenamento que impactam a estabilidade dos fitocannabinoides (THOMSON *et al.*, 2023). Fatores como temperatura, umidade e exposição ao ar têm sido identificados como cruciais nesse processo (JIKOMES & ZOOROB, 2018). Como mostrado na figura 8, o THC tem como produto de oxidação o canabinol (CBN), identificado quarenta anos depois do THC. O produto de oxidação do CBDA é o ácido canabinólico (CBNA), e o CBD origina o canabinodiol (CBND), isolado pela primeira vez em 1977 por Lousberg. De forma similar é encontrado os fitocannabinoides do tipo varin, como o canabinodivarina (CBNDV), produto de oxidação do CBDV que está visível na figura 9 (ADDO *et al.*, 2021)

A temperatura tem se demonstrado um fator crítico na estabilidade dos fitocannabinoides, já que compostos como o THC e o CBD são sensíveis ao calor, podendo se decompor ou se transformar em outros fitocannabinoides como o CBN ou CBNA com distintos efeitos medicinais (STRZELCZYK *et al.*, 2022).

Figura 8 - Transformações química dos cannabinoides



Fonte: Morales & Hurst, 2017.

Os cuidados com a preservação dos fitocannabinoides deve iniciar no processo de extração. Um estudo realizado em 2018 demonstrou que a utilização de solventes à base de CO₂ supercrítico

resultou em um extrato mais estável e com menor oxidação dos canabinóides quando comparado a outros métodos de extração, como o uso de solventes orgânicos, provavelmente por este método minimizar a exposição ao oxigênio e utilizar baixas temperaturas (HAZEKAMP & FISCHEDICK, 2012).

Uma vez no extrato, as variáveis luz e temperatura tornam-se prioridades, e diversos estudos têm verificado estas modificações. Com o objetivo de entender as variações dos fitocanabinoides em blocos de resinas apreendidas pela polícia ao longo do tempo, Grafström e colaboradores (2019) avaliaram variáveis como temperatura e luz ao longo de 4 anos. Nesse estudo, amostras de resina de cannabis foram armazenadas em sacos plásticos selados em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, no escuro e com luz artificial. No primeiro ano, não apresentaram sinais significativos de degradação nos níveis de THC, CBD e CBN, chegando a valores médios de 5,1% para ambos canabinoides. As amostras expostas à luz artificial mostraram níveis de degradação superior a 11,8% para o THC e de 8,3% para o CBD (GRAFSTRÖM *et al.*, 2019)

Em um outro estudo que perdurou por 4 anos, observou-se uma diminuição constante do THC em amostras apreendidas de extratos oleosos de cannabis, submetidas a diferentes condições de armazenamento (TROFIN, *et al.*, 2012). As amostras expostas à luz em temperatura ambiente ($22\text{ }^{\circ}\text{C}$) apresentaram uma diminuição maior de THC em comparação com as amostras armazenadas no escuro a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. No caso das amostras armazenadas no escuro a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, houve uma perda de 21,6% no primeiro ano de THC, chegando a 83,8% ao final de 4 anos. Já nas amostras armazenadas à luz em temperatura ambiente ($22\text{ }^{\circ}\text{C}$), houve uma perda de 23,2% de THC no primeiro ano, chegando a 89,9% no final do estudo. Em relação ao CBD, a variação observada no caso das amostras armazenadas no escuro a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, ocorreu uma perda de 11,03% de CBD no primeiro ano, com uma perda média de 2,76% a cada três meses. Para as amostras armazenadas na luz, a $22\text{ }^{\circ}\text{C}$, a perda de CBD no primeiro ano foi de 13,45%, com uma média de perda de 3,35% a cada três meses.

1.3 RELEVÂNCIA DO ESTUDO

A dosagem dos extratos de cannabis medicinal é crucial para assegurar a qualidade e efetividade dos mesmos, dado que diferentes espécies e métodos de extração podem produzir concentrações variáveis de fitocanabinoides nos extratos. A UNILA vem desenvolvendo diversos

estudos com aplicação terapêutica dos extratos de cannabis. Neste cenário, o laboratório de Cromatografia da UNILA possui os equipamentos e a expertise necessárias que podem auxiliar nestes estudos, dosando os extratos administrados e verificando sua estabilidade. Desta forma, é de grande importância a implementação de metodologia validada para dosagem dos canabinoides no laboratório, garantindo as dosagens e auxiliando nas pesquisas.

2. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho visa estudar a degradação dos principais fitocanabinoides, THC e CBD e suas formas ácidas, em extratos medicinais de *Cannabis sativa* com dois tipos de excipientes submetidos a diferentes condições de armazenamento ao longo do tempo, visando identificar as principais variáveis da degradação e com isso propor a melhor forma de armazenamento.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Validar a metodologia para análises dos fitocanabinoides THC, CBD, THCA e CBDA em extratos oleosos de *Cannabis sativa*, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos;
- Investigar as diferenças na estabilidade dos fitocanabinoides THC, CBD, THCA e CBDA em extratos de *Cannabis sativa* submetidos a diferentes condições de armazenamento (luz, temperatura e tempo);
- Identificar as variáveis ambientais de maior influência sobre a modificação dos fitocanabinoides;
- Verificar se há diferença nos excipientes utilizados nos extratos quanto a degradação dos fitocanabinoides;
- Comparar as taxas de degradação dos fitocanabinoides THC, CBD, THCA e CBDA em diferentes condições de armazenamento;
- Propor as condições ideais de armazenamento, visando a estabilidade dos fitocanabinoides.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 REAGENTES

Foi realizada a aquisição de materiais de referência certificados (MRC) contendo THC, CBD, THCA e CBD fornecidos pela empresa DR Ehrenstorfer® (Germany), com uma concentração de 1000 µg/mL em acetonitrila. Os MRC foram cuidadosamente armazenados a uma temperatura de -18 °C para garantir a estabilidade e a integridade dos compostos. Para as análises cromatográficas, foram usados solventes de alta pureza, incluindo metanol (for HPLC, gradiente grade, ≥ 99.9%, CAS: 74-82-8), acetonitrila (for HPLC, gradiente grade, ≥ 99.9%, CAS: 75-05-8) e acetato de etila (for HPLC, gradiente grade, ≥ 98.9%, CAS: 141-78-6), todos adquiridos pela Sigma-Aldrich® (EUA). A água ultrapura foi usada no preparo das soluções (Purelab® (UK) modelo Ultra-Q).

3.2 AMOSTRAS DE EXTRATOS MEDICINAIS DE CANNABIS

Foram estudadas quatro amostras de extratos, sendo três delas fornecidas pela Associação AME-C (Figura 9). As amostras fornecidas foram preparadas de plantas de *Cannabis sativa L.*, cultivadas em campos da região de Bertiooga-SP. As plantas foram selecionadas por sua alta produtividade e qualidade dos fitocanabinóides. O extrato foi processado em um laboratório da associação, utilizando um método de extração com solventes orgânicos. O excipiente utilizado foi azeite extravirgem de oliva com acidez inferior 0,5%, que foi adicionado em uma proporção de 50% do peso total do extrato. O azeite é um óleo vegetal rico em ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados. É um excipiente seguro e eficaz para extratos de cannabis.

A quarta amostra foi disponibilizada pela Abrace Esperança (Figura 9), uma associação sem fins lucrativos, que produz extratos de *Cannabis sativa L.*, a partir de plantas cultivadas em sua própria fazenda, localizada em João Pessoa, na Paraíba. As plantas são selecionadas por sua alta qualidade e concentração de fitocanabinóides. O método de extração utilizado pela Abrace é o de CO₂ supercrítico. Esse método é considerado um dos mais seguros e eficazes para a extração de

fitocannabinóides, pois não utiliza solventes químicos e preserva as características da amostra. O excipiente utilizado pela Abrace é o óleo MCT (triglicerídeos de cadeia média). O óleo MCT é um tipo de óleo de coco que é livre de ácidos graxos de cadeia longa. É um excipiente mais fino e de absorção mais rápida que o óleo de coco.

Figura 9 - Amostras de extrato de Cannabis Sativa da ABRACE: A e AME-C: B, C e D



Fonte: O autor

Os extratos foram escolhidos para representar uma variedade de concentrações de fitocannabinóides, dois excipientes e dois métodos de extração (tabela 1). No caso dos fitocannabinóides, o excipiente pode afetar a sua biodisponibilidade, ou seja, a quantidade de substância que é absorvida pelo organismo. Neste estudo, o excipiente foi escolhido pois pode afetar a degradação dos fitocannabinóides.

Tabela 1 – Teores dos fitocannabinóides (mg/L) e excipiente dos extratos de *Cannabis Sativa* L. estudados.

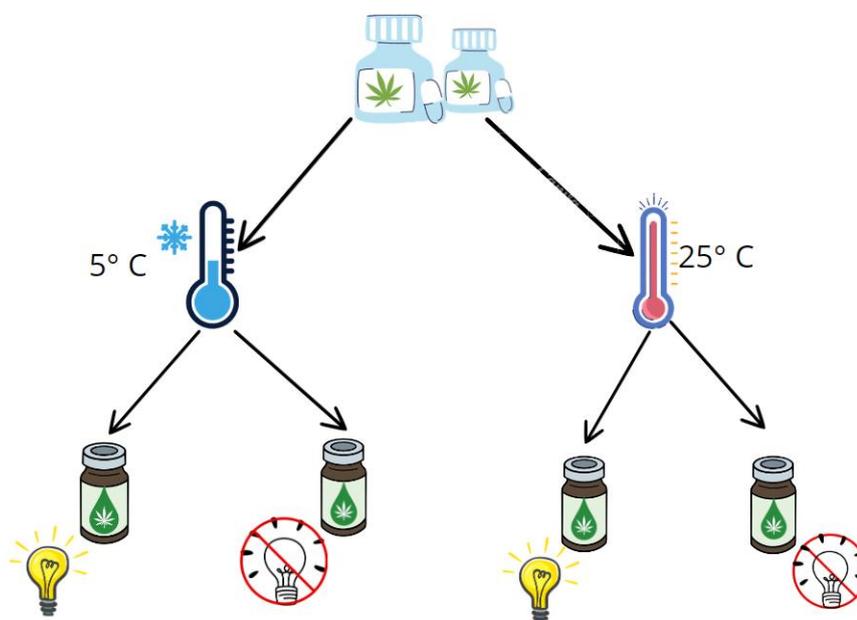
Amostra	Fornecedor	Excipiente	CBD-A	CBD	THC	THC-A
A	ABRACE	óleo MCT	0,23±0,08	10,19±1,19	8,19±2,04	0,45±0,23
B	AME-C	Azeite com acidez 0,5%	N.D.	31,53±1,16	2,72±0,09	N.D.
C	AME-C	Azeite com acidez 0,5%	N.D.	7,77±0,15	5,62±0,04	N.D.
D	AME-C	Azeite com acidez 0,5%	N.D.	3,02±2,10	59,24±1,40	N.D.

Fonte: O autor; *N.D.* = não detectado.

3.3 DESENHO EXPERIMENTAL:

Três variáveis foram empregadas na tentativa de simular possíveis condições de ambientes do paciente. A temperatura com dois níveis, 5°C e 25°C, na presença e ausência de luz, e tempo de estocagem de 5 meses (Figura 10). Um total de 16 vials foram obtidos considerando as 4 amostras e as duas variáveis com dois níveis. As amostras foram armazenadas em vials de 1,5 mL fechados com a tampa rosqueável.

Figura 10 - Desenho Experimental – Representação das Condições de Armazenamento.



Fonte: O autor

3.3.1 Temperatura:

Para a temperatura de 25°C foi utilizada uma pequena caixa em formato de baú confeccionada para o experimento (Figura 11). A caixa foi construída com chapa de madeirite de Pinus, com dimensões de 25 cm de comprimento e 15 cm altura. Essa pequena caixa foi cuidadosamente projetada para manter um ambiente controlado, garantindo a estabilidade térmica necessária para o estudo das amostras. A caixa foi mantida por todo o tempo do experimento numa

sala com temperatura mantida em torno a 25°C com ar-condicionado. Durante o experimento a temperatura foi controlada por termômetro, pequenas variações de ± 1 °C foram observadas.

Figura 11 - Caixa de madeirite para controle da temperatura ambiente a 25 °C com luz a LED branca



Fonte: O autor

Para a temperatura de 5 °C, optou-se por utilizar uma caixa confeccionada em papelão, com dimensões 17 cm de largura por 10 cm de altura. O papelão foi escolhido devido à sua menor capacidade isolante, o que permite uma troca de temperatura mais eficiente com o ambiente externo (Figura 12). A caixa foi mantida na geladeira Brastemp Frost Free Duplex 375 litros, com temperatura estabilizada a 5 °C. Durante o experimento a temperatura foi controlada por termômetro, pequenas variações de ± 1 °C foram observadas.

Figura 12 - Caixa de papelão para controle da temperatura a 5 °C. com luz a LED branca



Fonte: O Autor

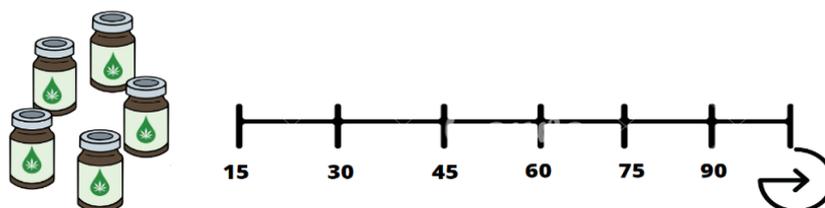
3.3.2 Luz:

Dentro das caixas foram instaladas fitas de LED (Light Emissor Diod, diodo emissor de luz) de 3 mm com dimensões de 17 cm de largura 10 cm de altura, totalizando 18 LEDs. Os LEDs possuíam comprimento de onda de emissão variando de 400 a 700 nanômetros, emitindo assim a luz branca. A escolha dos LEDs foi feita por serem às luzes mais utilizadas atualmente em residências e, também, por ser uma fonte de luz fria, não alterando significativamente a temperatura no decorrer do experimento.

3.3.3 Tempo:

As amostras foram armazenadas por 5 meses, com intervalos de análise de 15 dias (Figura 13). A coleta consistia na retirada de 50µl de amostra de cada vial.

Figura 13 - Desenho experimental - Intervalo entre as análises em dias.



Fonte: O Autor

3.4 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DOSAGEM DOS FITOCANABINOIDES

Com o objetivo de garantir a veracidade das dosagens efetuadas foram avaliados os seguintes parâmetros: faixa de trabalho, linearidade, homoscedasticidade, seletividade, precisão intermediária e repetibilidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ). Os resultados obtidos demonstraram que o método atende aos requisitos da ANVISA, RDC N° 166/2017 e da Instrução Normativa N° 4/2014 emitida pela ANVISA, que definem os critérios para registro de controle de qualidade de fitoterápicos.

Seletividade

Os componentes de uma matriz de amostra complexa podem interferir na mensuração de alguns de seus componentes, causando um aumento ou redução do sinal analítico. Essa interferência pode comprometer a exatidão e a precisão dos resultados. Portanto, como exigência nas normativas do INMETRO, o estudo de seletividade incluiu a avaliação do efeito de matriz. A seletividade de um método analítico é a sua capacidade de quantificar o analito de interesse na presença de outros analitos, matrizes ou materiais interferentes. De acordo com o INMETRO, isso poderia ser feito preparando duas curvas analíticas, cada uma com a mesma adição de analito para cada nível de concentração. Uma curva foi preparada com adição de analito na matriz da amostra, enquanto a outra curva foi preparada sem a matriz, contendo somente no solvente. Para cada nível de concentração, foram preparadas 5 replicatas. Como matriz, foi utilizado uma solução com 0,2% e azeite extravirgem de oliva diluído em acetato de etila e ACN 1:1, simulando a diluição que aproximadamente será feita na amostra. A solução 0,2% de azeite foi preparada com a adição de 20 µL azeite em um balão volumétrico de 20 mL.

Linearidade

A faixa de trabalho foi escolhida de forma a incluir os níveis de concentração esperados para esses compostos nas amostras diluídas. Portanto, a faixa de trabalho analítica incluiu valores entre 0,5; 1; 2; 5; 10; 15 e 20 µL/ mL. A construção da curva analítica foi empreendida a partir dessa faixa de trabalho predeterminada, onde foram implementados seis pontos, abarcando os quatro fitocannabinoides de interesse. O preparo da solução matriz (0,2% azeite) foi realizado a partir de uma solução contendo 0,2% de azeite puro de oliva comercial, que foi diluído em uma mistura de acetato de etila e acetonitrila na proporção 1:1. Para tal solução, 20 µL de azeite foram adicionados a

um béquer de 10 mL contendo 5 mL da solução solvente. Após uma completa dissolução do azeite na solução, o líquido resultante foi transferido para um balão volumétrico de 20 mL. Para realização de cada ponto da curva, o preparo das soluções estoque envolveu a diluição na matriz dos materiais certificados de referência para atingir as concentrações esperadas para todas as curvas.

A linearidade é a propriedade de uma relação entre duas variáveis ser representada por um modelo linear. Em um procedimento analítico, a linearidade é importante porque garante que a resposta do procedimento seja diretamente proporcional à concentração do analito. A homoscedasticidade é a propriedade de um conjunto de dados ter variância constante. Em um procedimento analítico, a homoscedasticidade é importante porque garante que a precisão do procedimento seja consistente para diferentes concentrações do analito.

Para verificar a linearidade do procedimento, foi realizado um gráfico de resposta. Nesse gráfico, a resposta do procedimento foi plotada em função da concentração do analito. A linearidade foi verificada pelo ajuste do modelo, obtido pelo valor do coeficiente de correlação linear (R). O valor de R deve ser igual ou superior a 0,99 para indicar que a relação entre as duas variáveis é linear.

Para verificar a homoscedasticidade dos dados, foi realizada uma regressão linear com o cálculo do coeficiente de correlação (R^2). A partir dos resíduos da regressão, foi construído um gráfico para avaliar a tendência. A distribuição aleatória dos resíduos ao redor do zero indica que a variância dos dados é constante.

Limite de detecção

O limite de detecção (LD) é definido como a menor concentração de uma espécie de interesse que pode ser detectada por um método analítico. Neste estudo optamos pela determinação do LD através do método proposto pelo INMETRO, onde pode ser estimado pela equação (1):

$$LD = 3,3 s / b \quad (1)$$

Onde:

s = desvio padrão da resposta do branco, quando o branco não gera sinal, pode-se adotar para o valor de “s” o desvio padrão do menor nível da curva analítica.

b = inclinação (coeficiente angular) da curva analítica.

Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração de um analito em uma amostra que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis. O limite de quantificação (LQ) pode ser estimado pela equação (2):

$$LQ = 10 s / b \quad (2)$$

Onde:

s: desvio padrão da resposta do branco, quando o branco não gera sinal, pode-se adotar para o valor de “s” o desvio padrão do menor nível da curva analítica.

b: inclinação (coeficiente angular) da curva analítica

Precisão - Repetibilidade

A repetibilidade é uma medida da variabilidade dos resultados obtidos em um laboratório, usando o mesmo procedimento de medição, pelo mesmo analista, no mesmo equipamento, no mesmo dia, no mesmo local e com a mesma amostra. Segundo o INMETRO, a repetibilidade deve ser avaliada realizando pelo menos três replicatas de uma análise. O mesmo estabelece os valores máximos de DPR de 11% para concentrações no nível de 1 ppm (mg/kg) e 7,3% para 10 ppm (mg/kg). O desvio padrão relativo (DPR) das replicatas é calculado e deve ser inferior a 20%. Normalmente, os critérios estão atrelados ao nível de concentração. No presente estudo, o tempo foi o parâmetro escolhido para avaliar a repetibilidade. Foram usados tempos diferentes para cada fitocannabinoide, analisando os pontos mínimos, médios e altos da curva. A concentração predita foi comparada com a concentração de referência, garantindo a repetibilidade.

Precisão intermediária

A precisão intermediária, de acordo com o VIM (2012), refere-se à precisão avaliada sob condições que compreendem o mesmo procedimento de medição, o mesmo local e medições repetidas no mesmo objeto ou em objetos similares, ao longo dum período extenso de tempo, mas pode incluir outras condições submetidas às mudanças. Nesse estudo, deve-se definir exatamente quais condições serão variadas (uma ou mais), tais como diferentes analistas, diferentes equipamentos ou diferentes tempos. Esta medida de precisão representa a variabilidade dos resultados em um laboratório.

3.5 PREPARO DE AMOSTRAS

A preparação das amostras foi realizada mediante diluições em solvente, acetato de etila: aceto nitrila. Este processo foi fundamental para assegurar que as concentrações dos fitocannabinoide presentes nos extratos se situassem dentro da faixa de trabalho estabelecida pela curva analítica. Dessa forma, as diluições foram realizadas em variações de 60 a 7200 vezes, sendo que a necessidade de empregar diluições distintas decorreu diretamente da variabilidade intrínseca das concentrações dos analitos ao longo do tempo.

3.6 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA AO DETECTOR DIOD ARRAY (CLAE-DAD)

As condições cromatográficas foram adaptadas de Zivovinic et. Al (2018). Foi utilizado o equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência acoplado ao detector de arranjo de diodos Ultimate 3000 (Thermo®, Germany), dotado de bomba quaternária 5600, autoamostrador Accela 5600 e detector Diodo Array (modelo PDA Accela de 20Hz, Thermo®, Germany). Os dados foram processados pelo software Chromeleon 7.3.2, da Thermo® Fisher Scientific. Foi utilizada a coluna cromatográfica C18, dimensões 250 x 4,6 mm e partículas de 5 µm (ACE HPLC Columns, EUA) em temperatura constante de 30°C. Os analitos foram eluidos no modo gradiente empregando como

solvente (A) água com 0,1% de ácido fórmico (B) acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico, na seguinte programação: 30% de A (2 min.); para 28,7% de A de 2 a 4,5 min.; para 5% de A de 4,5 a 6 min. (4 min.); para 30% A de 10 a 20 min. O fluxo foi de 0,8 mL/min e a injeção de 5 µL. A detecção foi realizada em comprimento de onda de 220 nm. Os fitocanabinóides foram identificados por seus espectros em comparação com os padrões de referência e pelos tempos de retenção.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A ANOVA foi realizada para verificação das variáveis de armazenamento significativas através do software Statistica 12.5 versão de 2020 (StatSoft, Oklahoma, Estados Unidos). Para comparação da inclinação das retas foi realizado o teste de *t Student* e o teste F. O nível de significância adotado para avaliar a diferença estatística significativa entre os grupos foi de 5%. Isso significa que, se o p-valor de um teste de hipótese for inferior a 0,05, a diferença será considerada estatisticamente significativa. Os resultados obtidos foram apresentados como médias \pm desvio padrão.

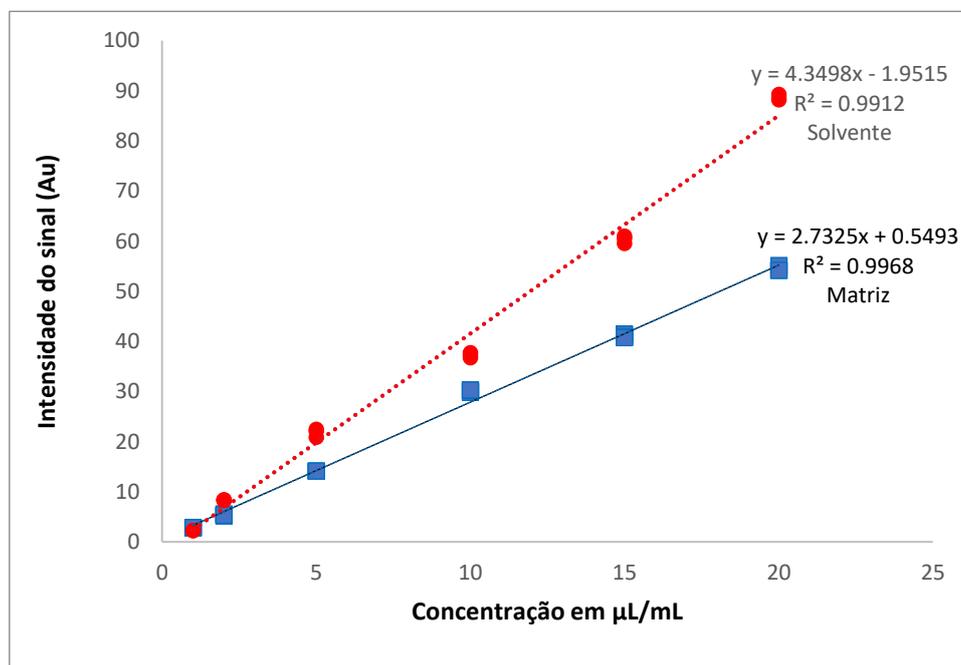
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 VALIDAÇÃO

4.1.1 Efeito matriz

Para verificação do efeito de matriz, realizou-se o teste *t* de Student pareado para comparação das inclinações das curvas realizada no solvente e na matriz (Figura 14). Pode-se observar que para o THC o sinal analítico produzido no solvente e na matriz são diferentes, indicando a supressão de sinal na matriz.

Figura 14 - Curva analítica para o THC realizadas no solvente acetato de etila e acetonitrila e na matriz



Fonte: O autor

Antes do teste comparativo *t* de Student, as variâncias dos coeficientes angulares das curvas foram comparadas através do teste F. O valor calculado de F foi de 7,13, maior que o valor crítico de 2,27, com 17 graus de liberdade (Tabela 2). Portanto, as variâncias são diferentes. O *t* calculado, considerando as variâncias diferentes, foi de 62,60 maior que o valor crítico de 2,11, para um nível

de significância de 95% (Tabela 2). Assim sendo, as inclinações das curvas são diferentes e conseqüentemente há efeito de matriz.

Tabela 2 – Teste F e t-Student para a verificação das inclinações das curvas analíticas no solvente na matriz

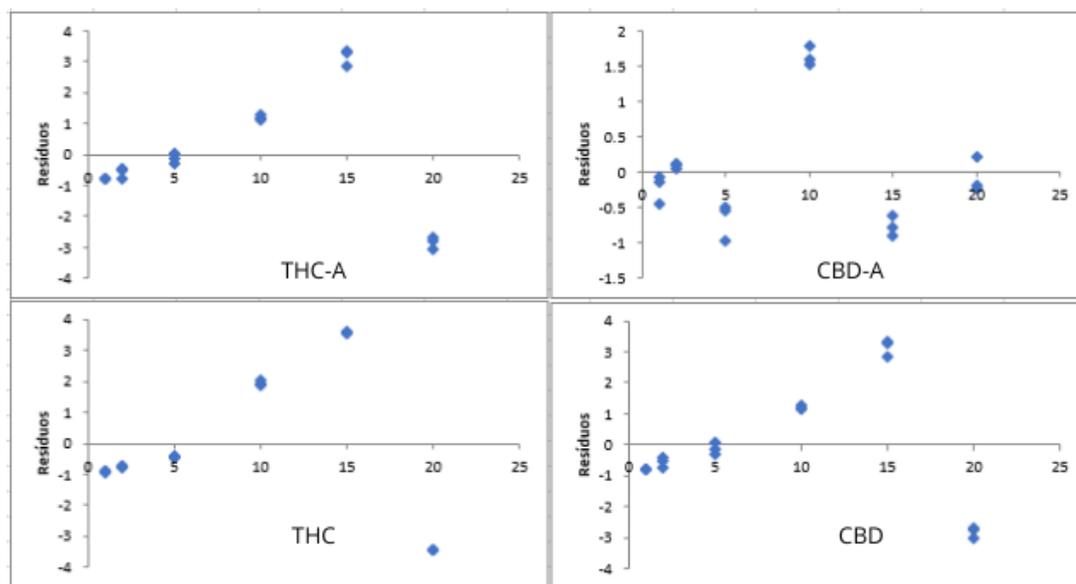
Parâmetros da curva analítica		
	Solvente	Matriz
Coeficiente angular da curva (x)	2,7325	4,3498
Desvio padrão do coeficiente angular (s)	0,0385	0,1026
F calculado		7,13
Resultado		Efeito Significativo
t calculado		62,60
Resultado		Efeito Significativo

Fonte: O autor

Em virtude dos resultados avaliados, é imperativo que todos os demais parâmetros de validação sejam analisados considerando o efeito de matriz.

4.1.2 Linearidade

De acordo com o gráfico de resíduos, observou-se uma distribuição aleatória para os quatro fitocanabinoides de interesse – CBD, CBDA, THC e THCA, caracterizando a homoscedasticidade (Figura 15). Isso significa que a variância dos resíduos é constante ao longo da regressão. Todas as curvas apresentaram boa linearidade, o que também pode ser avaliado pelo valor do coeficiente correlação (R), onde todas as curvas apresentaram valores superiores a 0,99 (Tabela 3).

Figura 15 - Gráfico de resíduos dos fitocannabinoides THC-A, CBD-A, THC e CBD

Fonte: O autor

Tabela 3 – Parâmetros das curvas analíticas para os fitocanabionoides.

Fitocannabinoides	Coefficiente angular	Coefficiente linear	coeficiente correlação(r)	LD (µL/mL)	LQ (µL/mL)
CBD-A	1,7243	-0,9823	0,9992	0,5674	2,2342
CBD	1,6462	-0,7463	0,9971	0,9853	34,3439
THC	1,7134	0,0724	0,9991	1,3454	24,2437
THC-A	1,4556	-0,4581	0,9961	1,6732	5,1233

Fonte: O autor

4.1.3 Limites de detecção e de quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para CBD-A, CBD, THC e THC-A variaram de 0,5674 a 34,3439 µg/mL. Esses valores são bem inferiores às concentrações dos extratos analisados, o que demonstra que o método foi adequado para a análise dessas amostras. Tzimas e colaboradores (2021) com a técnica desenvolvida em um (UPLC-DAD) encontraram valores menores nas análises de CBD, obtendo 0,07 para LD e 0,22 µg/mL para LQ, enquanto para CBDA os valores foram 0,04 e 0,12 µg/mL. Já no estudo de Zivovinovic e colaboradores (2018), utilizando (UPLC) o

LQ foi de 1,0 µg/mL tanto para o THC e THC-A. Embora nossos valores sejam maiores aos encontrados por esses dois trabalhos, ainda estamos na mesma faixa de grandeza observada por eles. No entanto, Carvalho et al. observaram valores que variaram entre 0,11 mg/mL e 66 mg/mL para os mesmos fitocannabinoides. Todos esses valores estão na faixa de mg/mL, o que sugere que o método analítico empregado em nosso estudo é capaz de detectar os analitos em concentrações consideravelmente mais baixas do que os usados por Carvalho et al, já que estamos trabalhando com µg/mL .

4.1.4 Repetibilidade e precisão intermediria

Os valores de DPR obtidos para THC-A, THC, CBD-A e CBD variaram de 0,15% a 1,68%, 0,12% a 2,45%, 0,40% a 4,21% e 0,61% a 4,34%, respectivamente (Tabela 4). O INMETRO estabelece os valores máximos de DPR de 11% para concentrações no nível de 1 ppm (mg/kg) e 7,3% para 10 ppm (mg/kg). Desta forma, o método apresentou boa repetibilidade em toda faixa de trabalho.

Tabela 4 – Valores do desvio padrão relativo (%) na faixa de trabalho utilizada para cada fitocanabinoide

THC-A µg/mL	DPR (%)	THC µg/mL	DPR (%)	CBD-A µg/mL	DPR (%)	CBD µg/mL	DPR (%)
1	0,15	1	2,45	1	4,21	1	4,34
2	0,29	2	0,73	2	0,40	2	2,56
5	0,11	5	0,65	5	1,69	5	0,92
10	0,65	10	0,62	10	1,05	10	0,61
15	1,68	15	1,23	15	0,49	15	1,56
20	0,95	20	0,76	20	0,42	20	1,34

Fonte: O autor

(1) Número total de replicatas para cada ponto da curva: 3

A precisão intermediária foi avaliada com a mesma metodologia em dias diferentes de análise. Através da Tabela 5, observamos que os valores de DPR também estão em conformidade com os critérios de aceitação do INMETRO, demonstrando que o método possui repetibilidade (Tabela 5).

Tabela 5 – Valores do desvio padrão relativo (%) intra-dia nos níveis de concentração baixo, médio e alto da faixa de trabalho para cada fitocanabinoide.

THC-A $\mu\text{g/mL}$	DPR (%)	THC $\mu\text{g/mL}$	DPR (%)	CBD-A $\mu\text{g/mL}$	DP R (%)	CBD $\mu\text{g/mL}$	DPR (%)
1	6,85	1	7,04	1	2,63	1	5,52
10	5,69	10	4,73	10	3,49	10	4,50
20	4,90	20	4,19	20	3,35	20	2,04

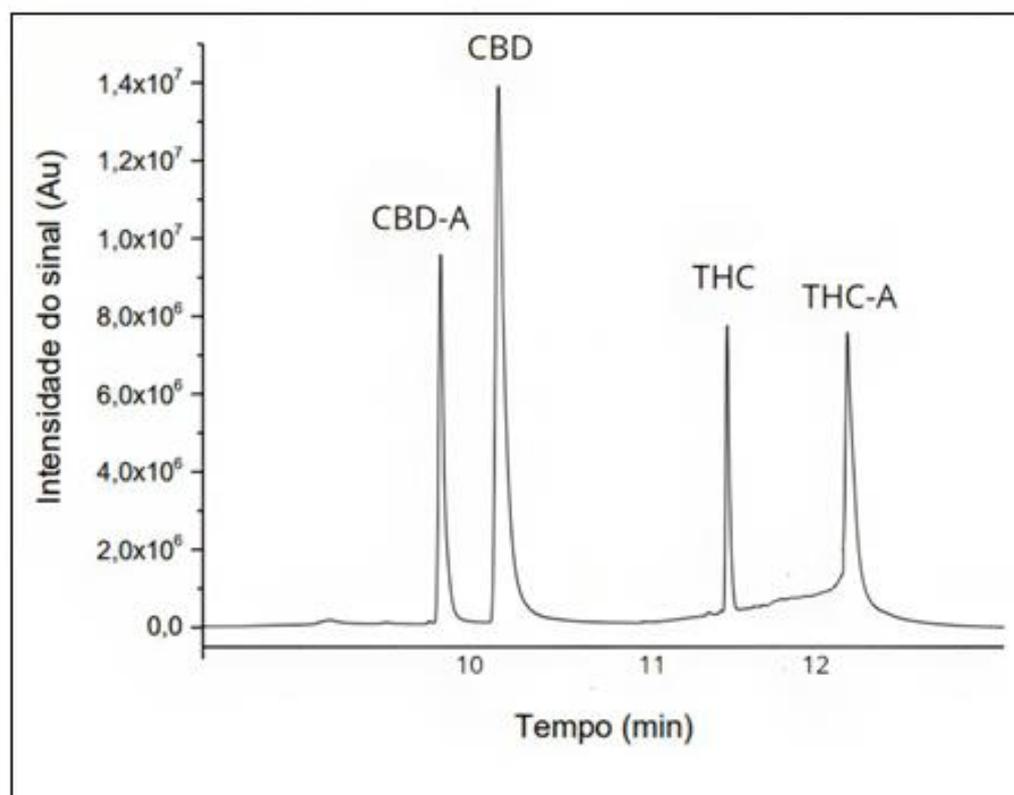
Fonte: O autor

(1) Número total de replicatas para cada ponto: 6

4.2 PERFIL CROMATOGRÁFICO E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS

O cromatograma da Figura 16 apresenta o perfil cromatográfico dos fitocanabinoides estudados.

Figura 16 - Perfil cromatográfico dos padrões de fitocanabinoides na concentração 20 $\mu\text{g/mL}$ na matriz.



Fonte: O autor

Pode-se observar que mesmo os analitos na matriz obtivemos bons picos cromatográficos, ou seja, picos finos e bem definidos. Outra vantagem do método é o curto tempo de análise, de apenas 20 minutos.

4.3 COMPORTAMENTO DOS EXTRATO

Devido aos diferentes teores e excipientes nos extratos, as amostras foram analisadas separadamente e, por fim, comparadas. Ressalta-se que nos extratos B, C e D estão ausentes as formas ácidas, demonstrando eficácia no processo de descarboxilação, Indicativo de que os fitocanabinóides presentes nos extratos estão na forma ativa, o que é necessário para que tenham os efeitos terapêuticos esperados. (DEVILLE *et al.*, 2020).

Para este estudo, optou-se por uma abordagem de estudo acelerado, seguindo as exigências do Guia de Estudo de Estabilidade nº28/2019, que regulamenta a realização de estudos de estabilidade. O guia fornece recomendações da ANVISA sobre a melhor maneira de cumprir a resolução, embora procedimentos diferentes dos descritos no guia possam ser aceitos e cumpridos com os requisitos da resolução. O estudo de estabilidade acelerado teve como objetivo selecionar formulações e embalagens adequadas a partir do ponto de vista da estabilidade do produto. Os dados obtidos, juntamente com os estudos de longa duração, ajudam a determinar a vida útil e as condições adequadas de armazenamento.

COMPORTAMENTO EXTRATO A

O extrato A se sobressai dentre os demais, uma vez que foi possível identificar os quatro principais fitocanabinóides. Contudo, a presença das formas ácidas nos extratos nos indica que o processo de descarboxilação não foi completo, como indicado por Carvalho e colaboradores (2022). A Tabela 6, apresenta todos os teores dos fitocanabinóides durante o armazenamento nas diferentes condições. Para melhor visualização da degradação foram plotados os gráficos das Figuras 17 e 18. Foram necessários dois gráficos devido à diferença substancial de concentração entre as formas ácidas e neutras.

Tabela 6 – Teores dos fitocanabinoides durante o processo de armazenamento do extrato A

Tempo em dias	CBDA mg/mL	CBD mg/mL	THC mg/mL	THCA mg/mL
5 °C				
Sob luz				
0	0,23 ± 0,01	10,19 ± 1,19	11,19 ± 2,04	0,45 ± 0,03
15	0,12 ± 0,03	10,24 ± 0,17	11,24 ± 1,33	0,11 ± 0,02
30	0,12 ± 0,05	7,61 ± 0,15	8,61 ± 1,26	0,12 ± 0,04
45	0,11 ± 0,05	4,93 ± 0,16	5,94 ± 0,48	0,12 ± 0,02
60	0,09 ± 0,01	6,47 ± 1,15	7,47 ± 0,38	0,09 ± 0,01
75	0,11 ± 0,03	5,63 ± 0,13	6,62 ± 0,30	0,08 ± 0,01
90	0,12 ± 0,03	5,39 ± 0,16	6,39 ± 0,20	0,07 ± 0,01
105	0,10 ± 0,02	4,64 ± 0,12	5,64 ± 1,12	0,06 ± 0,00
120	0,12 ± 0,05	4,00 ± 0,16	4,99 ± 0,20	0,06 ± 0,04
135	0,11 ± 0,03	4,09 ± 0,12	3,00 ± 1,12	0,05 ± 0,01
150	N.D	2,75 ± 0,23	3,75 ± 0,75	N.D
% de redução total	100	73,0	66,5	100
Ausência de luz				
0	0,23 ± 0,01	10,19 ± 1,19	11,19 ± 1,04	0,45 ± 0,03
15	0,13 ± 0,08	8,59 ± 1,21	9,59 ± 1,32	0,14 ± 0,08
30	0,13 ± 0,05	7,67 ± 0,19	8,67 ± 1,24	0,10 ± 0,07
45	0,15 ± 0,04	6,95 ± 1,15	7,65 ± 0,82	0,15 ± 0,03
60	0,09 ± 0,03	7,59 ± 0,13	8,49 ± 0,66	0,08 ± 0,05
75	0,07 ± 0,03	6,51 ± 0,12	7,51 ± 0,56	0,09 ± 0,01
90	0,08 ± 0,02	8,14 ± 0,10	9,04 ± 0,29	0,09 ± 0,01
105	0,08 ± 0,06	6,34 ± 0,09	7,30 ± 0,20	0,07 ± 0,01
120	0,09 ± 0,03	6,23 ± 0,98	7,14 ± 0,57	0,09 ± 0,01
135	0,06 ± 0,03	5,99 ± 1,15	7,00 ± 0,67	0,08 ± 0,01
150	N.D	6,42 ± 0,14	4,98 ± 0,87	N.D
% de redução total	100	36,9	55,5	100
25 °C				
luz				

0	0,23 ± 0,01	10,19± 1,19	11,19 ± 2,04	0,45 ± 0,03
15	0,14 ± 0,03	8,93 ± 2,02	9,93 ± 0,05	0,14 ± 0,05
30	0,10 ± 0,06	7,41 ± 0,01	8,01 ± 1,04	0,13 ± 0,08
45	0,15 ± 0,05	4,94 ± 0,01	5,64 ± 0,03	0,15 ± 0,01
60	0,08 ± 0,01	7,33 ± 1,01	8,32 ± 0,03	0,09 ± 0,06
75	0,09 ± 0,04	5,97 ± 0,01	6,23 ± 1,02	0,07 ± 0,01
90	0,09 ± 0,07	5,92 ± 0,01	6,92 ± 0,01	0,09 ± 0,06
105	0,08 ± 0,04	4,84 ± 1,01	5,56 ± 0,01	0,08 ± 0,01
120	0,09 ± 0,01	4,23 ± 1,00	5,44 ± 1,06	0,07 ± 0,06
135	0,08 ± 0,03	4,00 ± 0,70	5,15 ± 0,90	0,06 ± 0,05
150	N.D	6,12 ± 1,01	2,76 ± 0,03	N.D
% de redução				
total	100	39	75,3	100

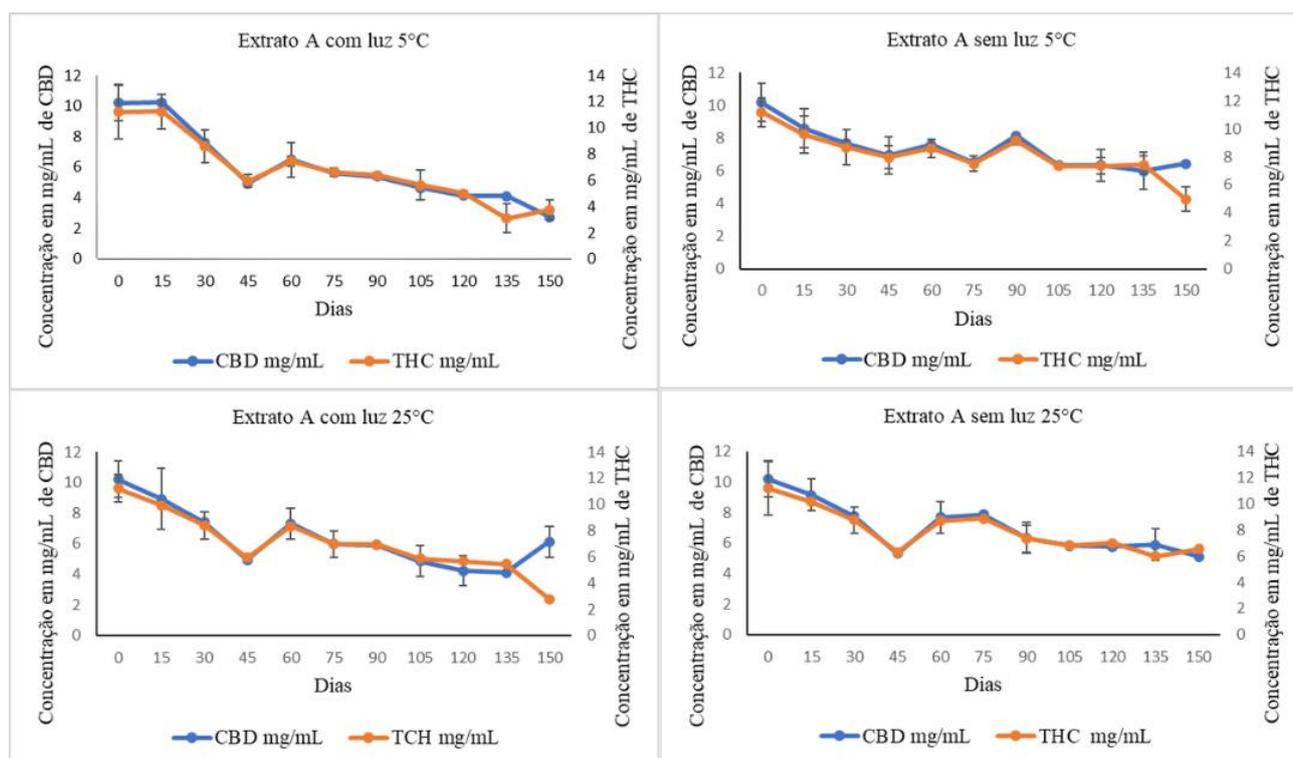
Sem Luz				
0	0,23 ± 0,08	10,19± 1,19	11,19 ± 2,04	0,45 ± 0,03
15	0,11 ± 0,02	9,16 ± 1,05	10,16 ± 0,03	0,12 ± 0,02
30	0,12 ± 0,02	7,76 ± 0,02	8,76 ± 1,02	0,12 ± 0,02
45	0,12 ± 0,03	5,30 ± 0,01	6,30 ± 0,03	0,11 ± 0,03
60	0,09 ± 0,02	7,68 ± 1,04	8,68 ± 0,03	0,09 ± 0,02
75	0,07 ± 0,01	7,86 ± 0,03	8,86 ± 0,02	0,11 ± 0,01
90	0,07 ± 0,02	6,33 ± 1,03	7,33 ± 1,02	0,11 ± 0,02
105	0,06 ± 0,01	5,81 ± 0,02	6,81 ± 0,01	0,10 ± 0,01
120	0,07 ± 0,01	5,76 ± 0,08	6,98 ± 0,03	0,11 ± 0,02
135	0,06 ± 0,02	6,00 ± 1,05	5,98 ± 0,04	0,10 ± 0,03
150	N.D	5,09 ± 0,05	6,54 ± 0,07	N.D
% de redução				
total	100	50,0	42,0	100

Fonte: O autor

Pode-se observar que o perfil de degradação do CBD e THC foram semelhantes ao longo de todo o período de armazenamento, independente das variáveis (Figura 18). A degradação apresentou-se gradual ao longo do tempo, com ligeiro aumento em 60 dias, o que coincide ligeiramente com a degradação das formas ácidos (Figura 17). À medida que os fitocannabinoides ácidos se

decarboxilam, eles se convertem em seus respectivos compostos neutros, um processo crítico que ocorre ao longo do tempo e tem um impacto significativo na potência e nas propriedades medicinais dessas substâncias (GOLOMBEK *et al.*, 2020).

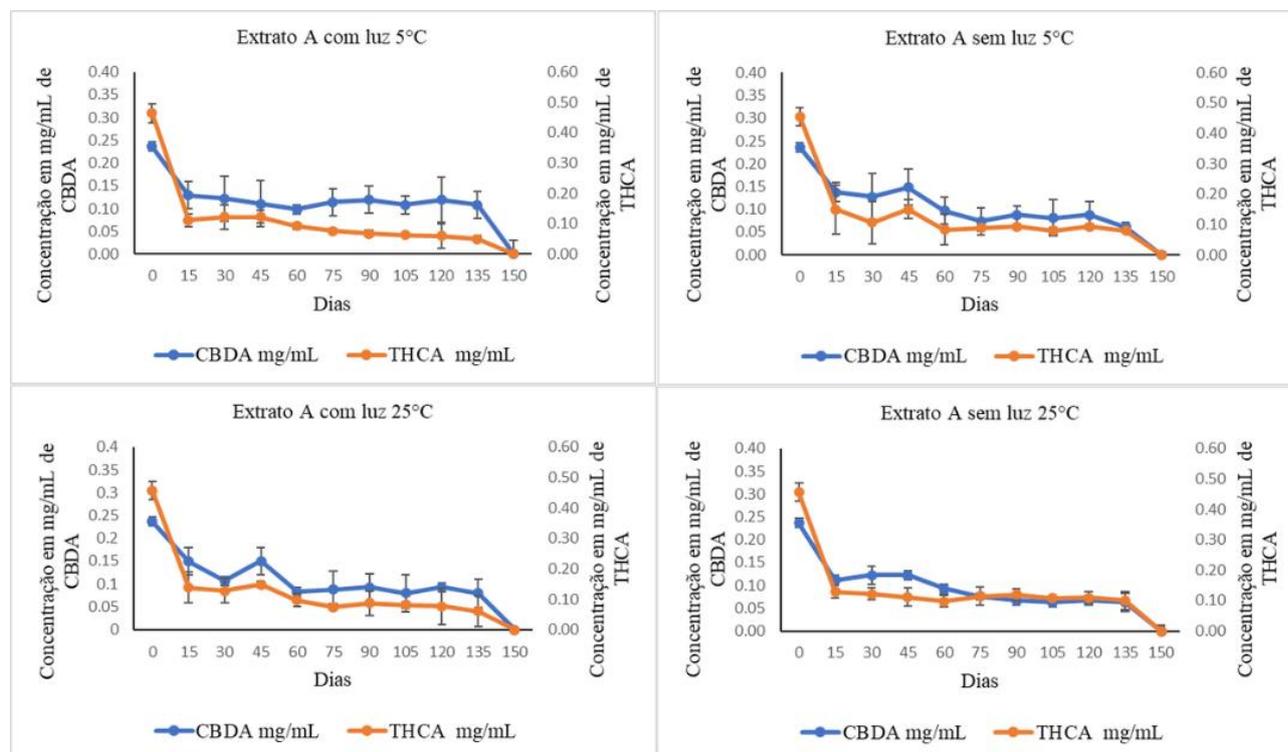
Figura 17 - Gráficos da variação dos teores de CBD e THC no extrato A ao longo do período de armazenamento em diversas condições



Fonte: O autor

Analisando a porcentagem de degradação do início ao final do armazenamento, foram observados valores variando de 37 a 73%, com o máximo em 5 °C e luz, para o CBD. Já o THC variou 41 a 75%, com o máximo em 25 °C com luz. Na condição de 25°C sob exposição à luz, a redução do CBD foi menor (39,9%) em relação ao THC (73,3%) (Tabela 6). Alguns estudos relatam resultados menores para a degradação de CBD, como o estudo realizado por Trofin *et al.* (2012) onde a porcentagem de degradação do CBD em 4 °C e luz foi de 40,3% após 4 anos de armazenamento. O que sugere que outras variáveis podem estar influenciando, como por exemplo o excipiente.

Figura 18 - Gráficos da variação dos teores de CBD-A e THC-A no extrato A ao longo do período de armazenamento em diversas condições



Fonte: O autor

Os perfis de degradação das formas ácidas em todas as condições de armazenamento foram semelhantes, com uma acentuada degradação nos primeiros e nos últimos 15 dias (5 meses) (Figura 18). No final do experimento, não foi mais possível observar nenhuma das formas ácidas. Certos períodos de degradação coincidem com períodos de aumento de concentração para suas respectivas formas neutras, como podemos notar em 60 dias após o início do experimento na condição com luz a 25 °C, onde ambas formas ácidas obtiveram um leve declino (Figura 18). No mesmo período de tempo, no gráfico das formas neutras podemos observar um leve aumento do THC e CBD na mesma condição de armazenamento, mas também nas outras (Figura 17).

A presença de um grupo carboxílico (COOH), na estrutura química das formas ácidas, facilita a processo oxidativo, gerando a descarboxilação (SANNIKOVA, 2020). Ao analisar os resultados em relação à degradação do THC-A, fica evidente que ele se degrada de forma mais rápida do que o CBD-A. Essa observação está alinhada com as conclusões de Shah *et al.*, (2023) que em seu estudo, explica que vários ácidos fitocanabinóides passam pelo processo de descarboxilação em ritmos variados, destacando que o THCA se descarboxila mais rapidamente do que o CBDA.

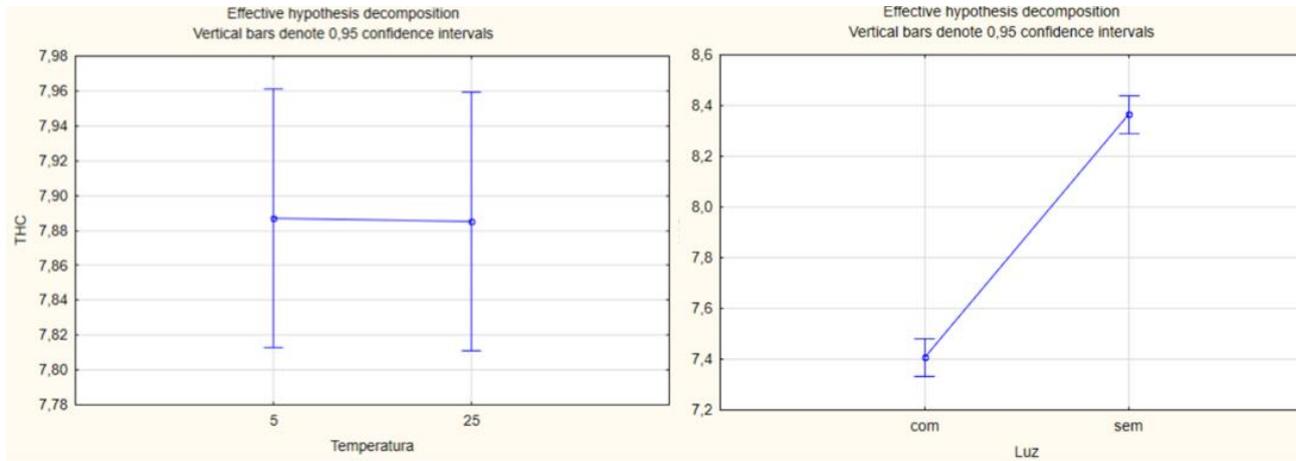
A ANOVA revelou que somente a temperatura não foi significativa para o THC (Tabela 7). Contudo, o valor de p (0,055765) para esta variável foi marginalmente não significativo, porém podemos verificar que sua interação com as outras variáveis foram significantes, portanto, possui importância para os processos degradativos do THC. O gráfico de efeitos mostra que analisando a variável luz isoladamente as maiores degradação foram na presença de luz e com relação a temperatura não houve diferença (Figura 19). Tais resultados são corroborados por outros estudos que apontam que a presença de luz e uma temperatura de 22 °C, viabilizam a degradação do THC, como mostrado por Fairbairn *et al.* (1976) que estudou a degradação dos fitocannabinoides sobre condições semelhantes por 2 anos de armazenados e com o estudo de Grafström e colaboradores (2019) que abordou o envelhecimento de blocos de resinas de cannabis, em diferentes condições de armazenamento.

Tabela 7 - Valores de p obtidos na ANOVA para os fitocannabinoides do extrato A

Valores de p para o extrato A				
Variáveis	CBD-A	CBD	THC	THC-A
Dia	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
Temperatura	0,000000	0,000000	0,055765	0,132676
Luz	0,000000	0,707204	0,000000	0,061450
Dia x Temperatura	0,000000	0,000000	0,000000	0,051951
Dia x Luz	0,000000	0,000000	0,000000	0,249223
Temperatura x Luz	0,000000	0,000000	0,000000	0,628990
Dia x Temperatura x Luz	0,000000	0,430354	0,000000	0,000353

Fonte: O autor

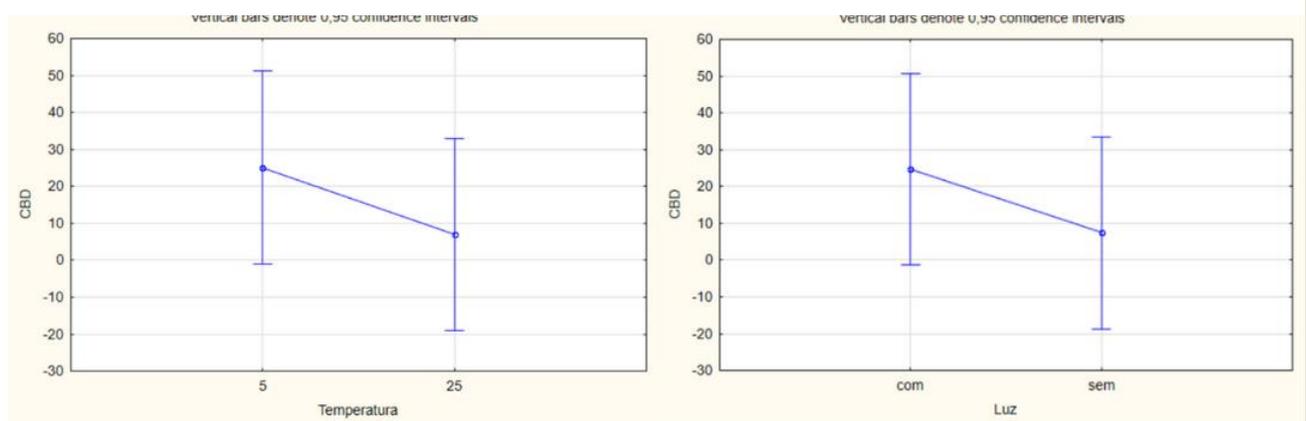
Figura 19 - Gráfico dos efeitos para as variáveis temperatura e luz do fitocanabinoides THC no extrato A



Fonte: O autor.

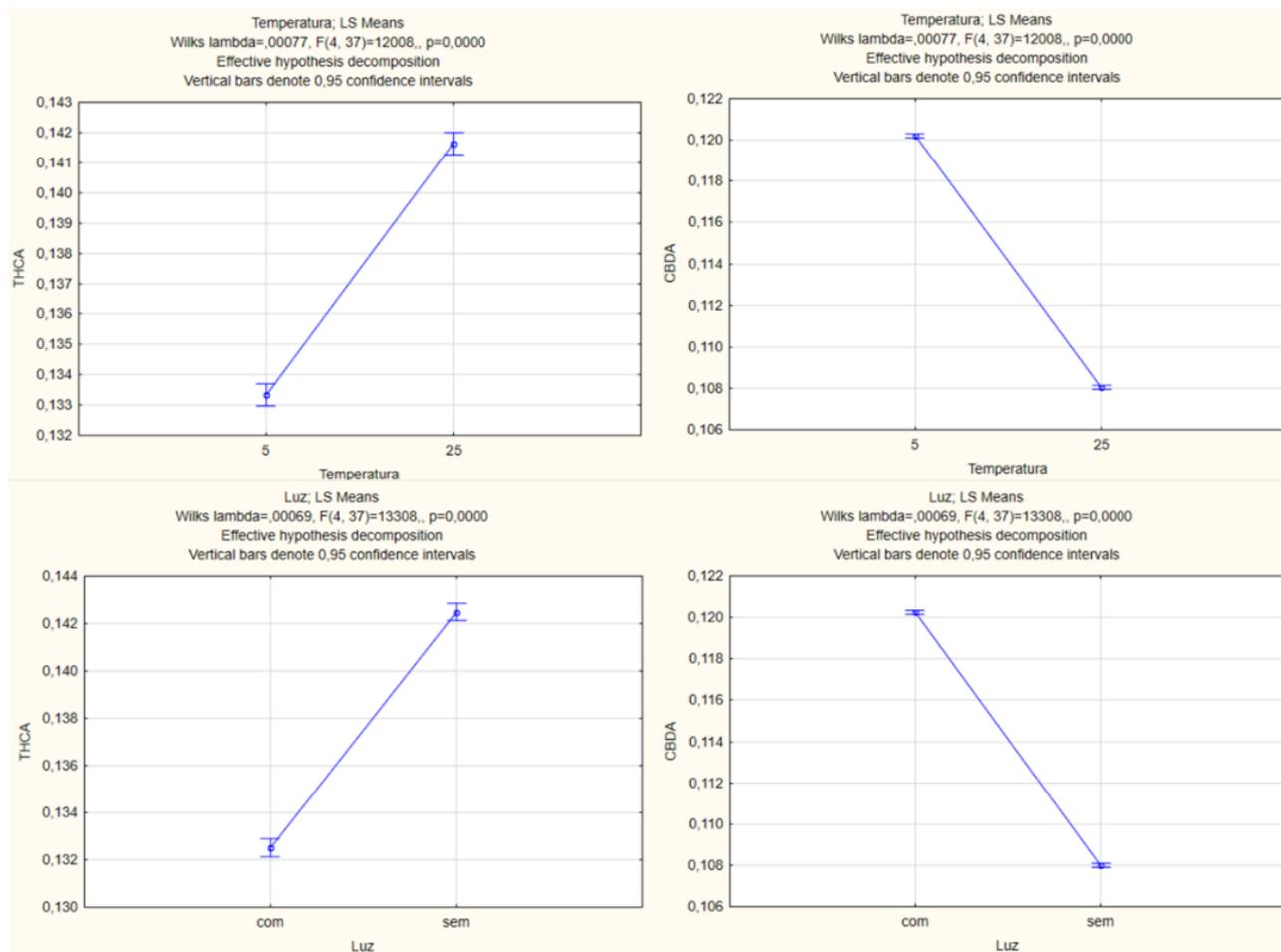
A ANOVA para o CBD revelou que apenas a luz e a interação das variáveis 'temperatura', 'luz' e 'tempo' não foram estatisticamente significativas (Tabela 7). No entanto, a interação da luz com outras variáveis demonstrou ser estatisticamente significativa, indicando sua importância nos processos de degradação do CBD. Já a temperatura, diferentemente do THC, foi significativa para o CBD. O gráfico dos efeitos mostra que as maiores degradações de CBD ocorrem a temperatura de 25 °C e na ausência de luz (Figura 20).

Figura 20 - Gráfico dos efeitos para as variáveis temperatura e luz do fitocanabinoide CBD no extrato A



Fonte: O autor.

Figura 21 - Gráfico dos efeitos para as variáveis temperatura e luz dos fitocanabinoides CBDA e THCA no extrato A



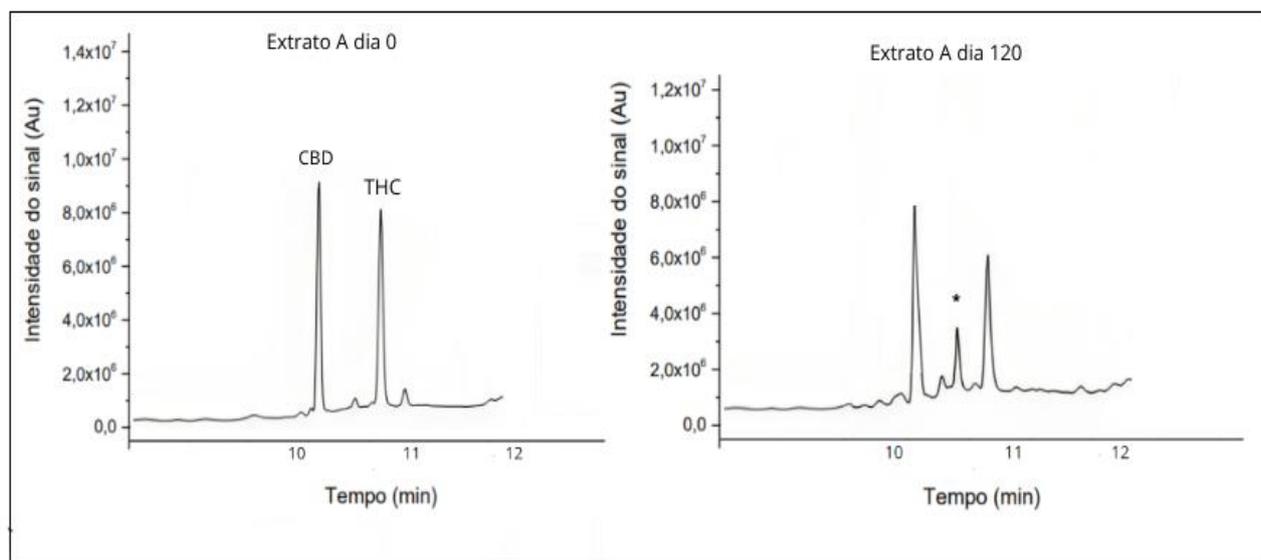
Fonte: O autor

Para o THCA-A a ANOVA revelou que somente o dia e a interação das 3 variáveis foram significativas (Tabela 7). Observamos também que a temperatura associada com o tempo apresentou-se marginalmente significativa (0,0519), o que pode indicar também a influência dessa variável. No caso do CBD-A, todas as variáveis e interações exerceram influências estatisticamente relevantes nas concentrações. O gráfico dos efeitos demonstra as maiores degradação a temperatura de 25 °C e com luz, para ambos os analitos.

Uma análise exploratória nos cromatogramas durante todo o período de armazenamento revelou o surgimento de um pico entre o CBD e o THC (Figura 22). O surgimento do pico aconteceu após 90 dias de armazenamento. O método cromatográfico foi baseado no artigo do Zivovinovic e

colaboradores (2018). Neste trabalho os autores também encontram o mesmo comportamento, e o pico foi identificado como CBN (Figura 23). O CBN é formado pela oxidação do THC, um processo que pode ocorrer por exposição à luz, calor ou oxigênio (ZIVOVINOVIC *et. al.*, 2018).

Figura 22 - Cromatograma extrato A após 120 dias



Fonte: O autor

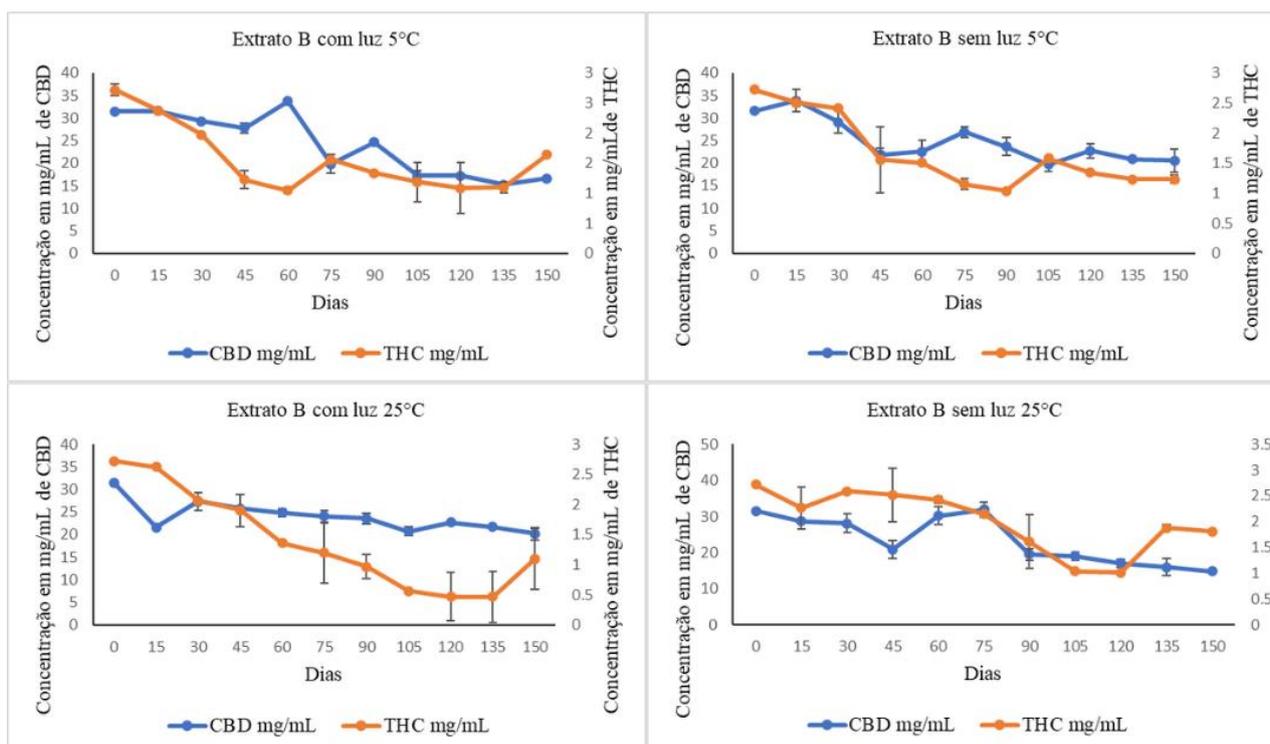
A identificação do CBN como um produto de degradação do THC é importante para a avaliação da qualidade dos produtos à base de cannabis. O CBN é um fitocannabinoide com propriedades farmacológicas distintas do THC, incluindo efeitos sedativos e analgésicos. Portanto, a presença de CBN em um produto à base de cannabis pode indicar que o produto foi exposto a condições que favoreceram a degradação do THC. Lerner (1969) estimou que a conversão para CBN, parece ocorrer tanto na resina armazenada no escuro quanto na luz. Onde relatou uma conversão significativa de THC em CBN em resina armazenada no escuro por 3 anos.

COMPORTAMENTO DO EXTRATO B

O extrato B é caracterizado pelos maiores teores de CBD em relação ao THC. A tabela completa com todos os teores está no APÊNDICE A. Podemos observar que os perfis de degradação

do CBD e THC foram diferentes ao longo de todo o período de armazenamento no extrato B, independente das variáveis (Figura 24).

Figura 24 - Gráficos da variação dos teores de CBD e THC no extrato B ao longo do período de armazenamento em diversas condições



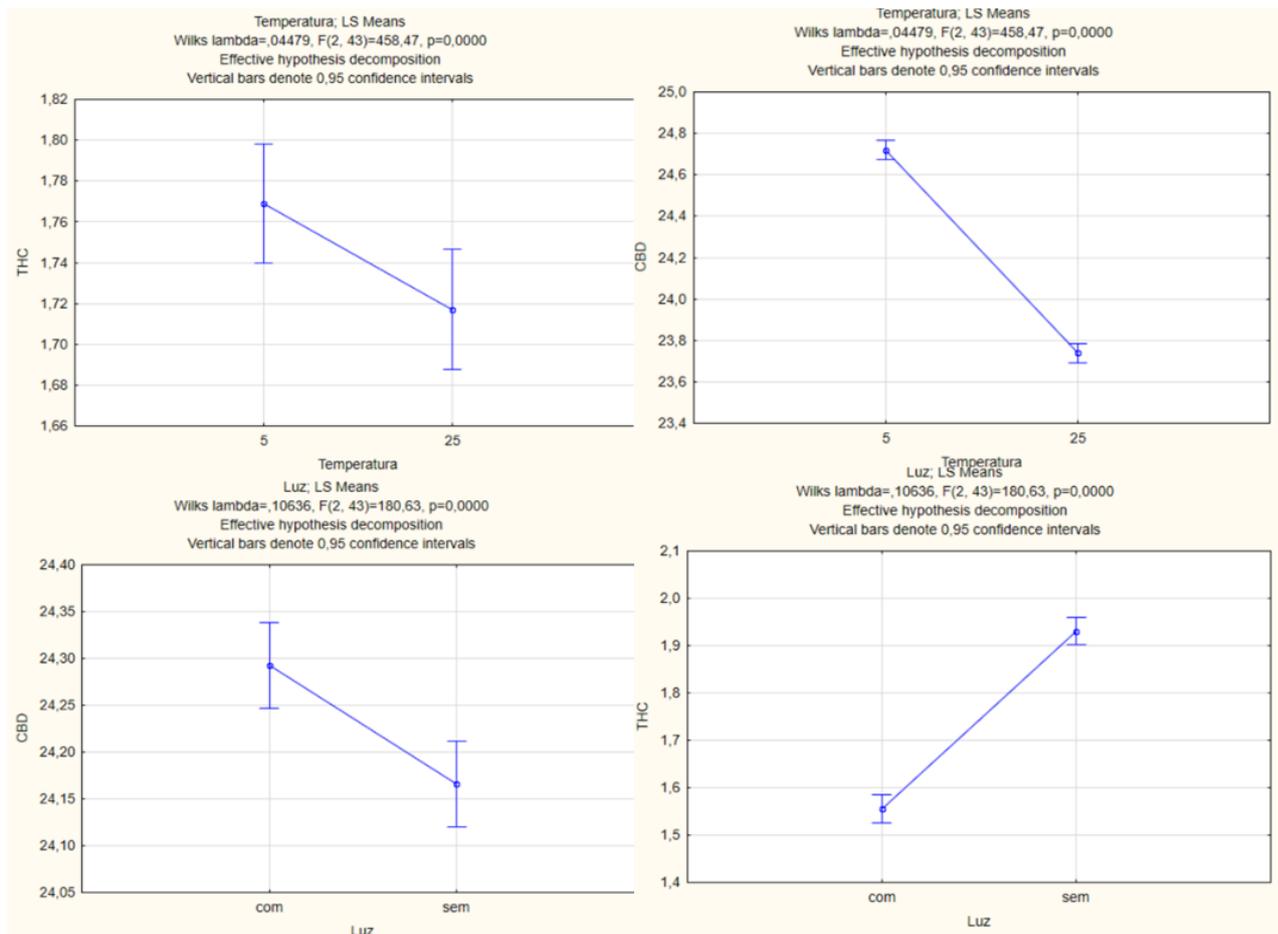
Fonte: O autor

Ao analisar a porcentagem de degradação ao longo de todo período, observamos variações de 33,5% a 59,9% para o THC, atingindo seu pico máximo a 25 °C sob luz. Quanto ao CBD, as variações ficaram entre 34,8% e 52,8%, com o valor mais alto ocorrendo a 25 °C sem luz. Os resultados da ANOVA (Tabela 8) revelou que todas as variáveis, assim como também as interações entre elas foram significantes. No gráfico da figura 24 observamos que para ambos os analitos as maiores degradações foram observadas a temperatura de 25 °C. Já quando a variável luz é vista de maneira unilateral observamos comportamento contrário para os analitos, sendo para o CBD as maiores degradação observadas na ausência de luz e o THC com luz (Figura 25).

Tabela 8 -Valores de p obtidos na ANOVA para os fitocannabinoides do extrato B

Valores de p para o extrato B		
Vaiáveis	CBD	THC
Dia	0,000000	0,000000
Temperatura	0,000000	0,015327
Luz	0,000282	0,000000
Dia x Temperatura	0,000000	0,000000
Dia x Luz	0,000000	0,000000
Temperatura x Luz	0,000000	0,000000
Dia x Temperatura x Luz	0,000000	0,000000

Fonte: O autor

Figura 25 - Gráfico dos efeitos para as variáveis temperatura e luz do fitocannabinoides CBD no extrato B

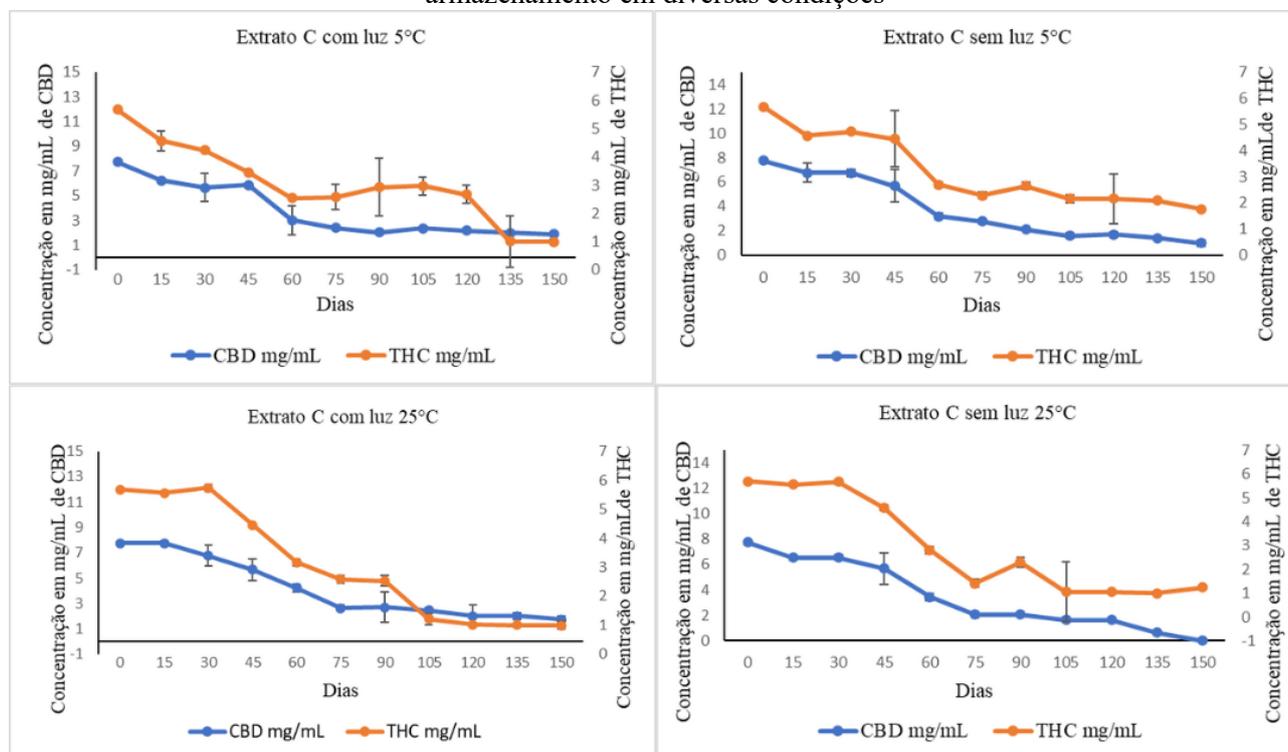
Fonte: O autor

COMPORTAMENTO DO EXTRATO C

No extrato C (Figura 26), no qual as concentrações de CBD e THC eram equilibradas, observaram-se reduções mais pronunciadas que os extratos anteriores. A tabela completa com todos os teores está no APÊNDICE A. A 5 °C, na ausência de luz, o THC apresentou uma degradação de 69%, enquanto o CBD sofreu 87,2%. A 25 °C, na condição sem luz, o CBD quase se degradou completamente (redução de quase 100%), e o THC demonstrou-se um pouco mais estável, com uma redução de 78%. Este resultado se assemelha com o encontrado por Trofin *et al.* (2012) e colaboradores, que indicam maior suscetibilidade do CBD em relação ao THC.

Observando os perfis de degradação na Figura 26, notamos um ligeiro aumento de CBD em 90 dias de armazenamento em todas as condições, exceto a 25 °C com luz. Na presença de luz, a degradação de THC foi tão acentuada que os teores de CBD e THC praticamente se igualaram.

Figura 26 - Gráficos da variação dos teores de CBD e THC no extrato C ao longo do período de armazenamento em diversas condições



Fonte: O autor

A ANOVA revelou que todas as variáveis foram significativas para o CBD. Contudo, para o THC apesar da luz e a temperatura não serem significativas isoladamente, suas interações foram significantes (Tabela 9).

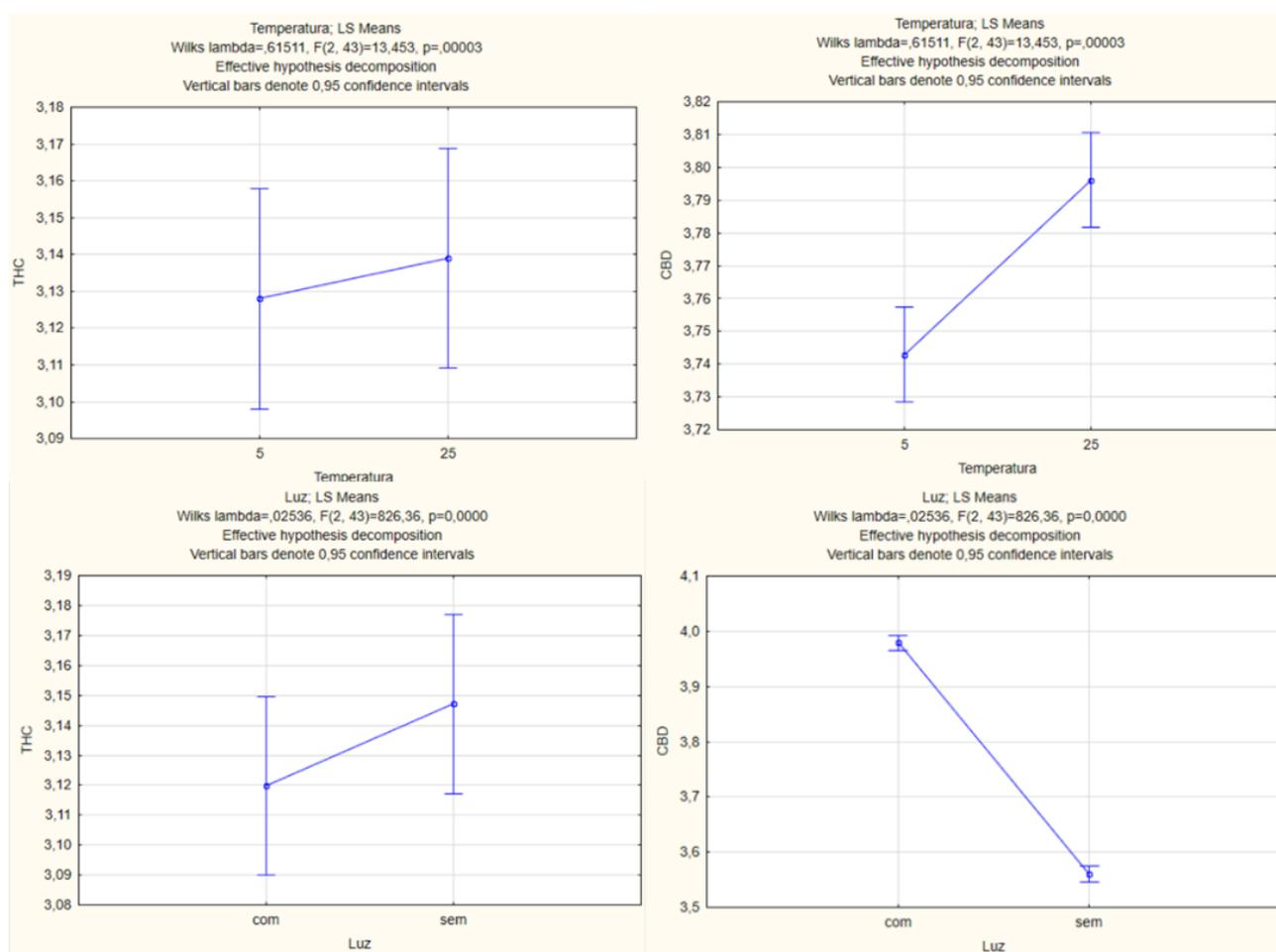
Neste extrato observamos uma coerência na degradação dos dois analitos. O THC obteve maiores percentuais de degradação nas condições de maior temperatura e presença de luz. Já no CBD foram observadas as maiores % nas condições de maior temperatura e sem luz (figura 27).

Tabela 9 -Valores de p obtidos na ANOVA para os fitocannabinoides do extrato C

Valores de p para o extrato C		
Vaiáveis	CBD	THC
Dia	0,000000	0,000000
Temperatura	0,000005	0,598563
Luz	0,000000	0,200167
Dia x Temperatura	0,000000	0,000000
Dia x Luz	0,000000	0,000000
Temperatura x Luz	0,000000	0,000002
Dia x Temperatura x Luz	0,000000	0,000000

Fonte: O autor

Figura 27 - Gráfico dos efeitos para as variáveis temperatura e luz dos fitocanabinoides THC e CBD no extrato C



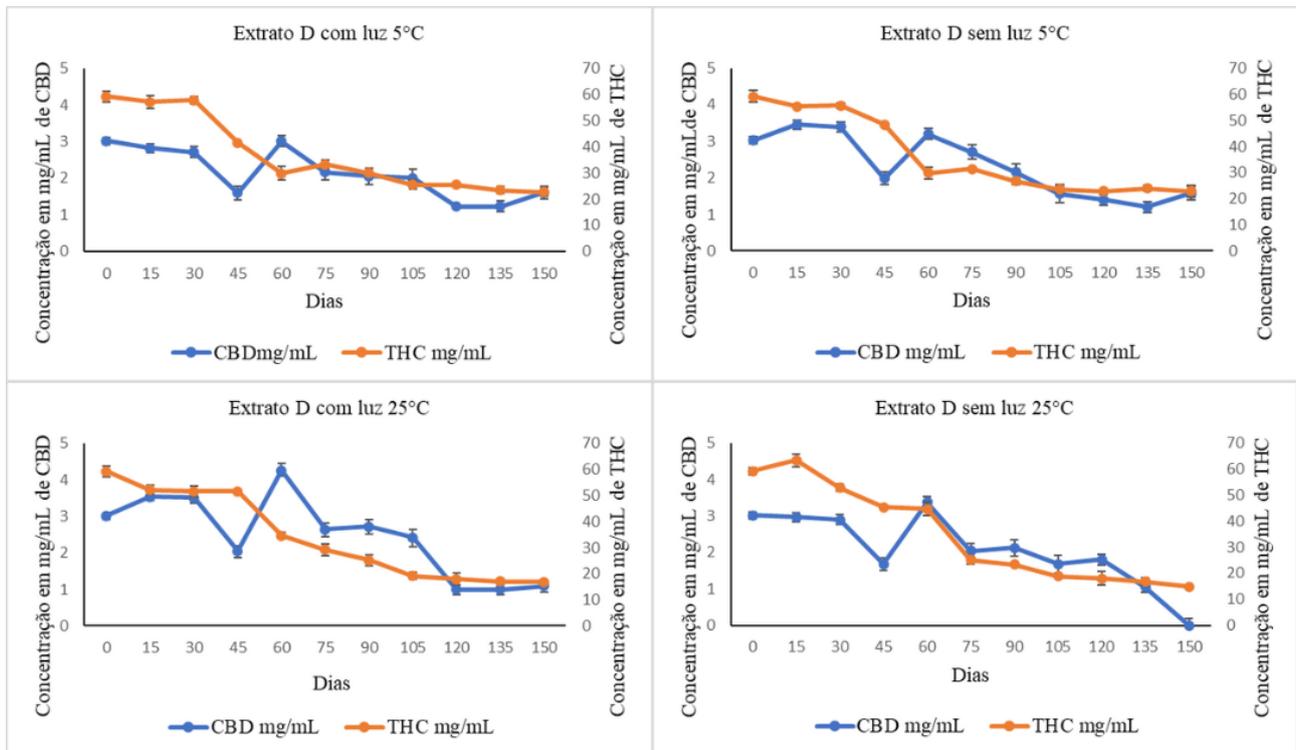
Fonte: O autor

COMPORTAMENTO DO EXTRATO D

O extrato D é caracterizado pelos maiores teores de THC. A tabela completa com todos os teores está no APÊNDICE A. Analisando a porcentagem de degradação do início ao final do armazenamento observamos valores variando de 61,4 a 74,9%, com o máximo em 25 °C sem luz, para o THC (Figura 28). Já o CBD variou de 47 a 67,5%, com o máximo em 25 °C sem luz.

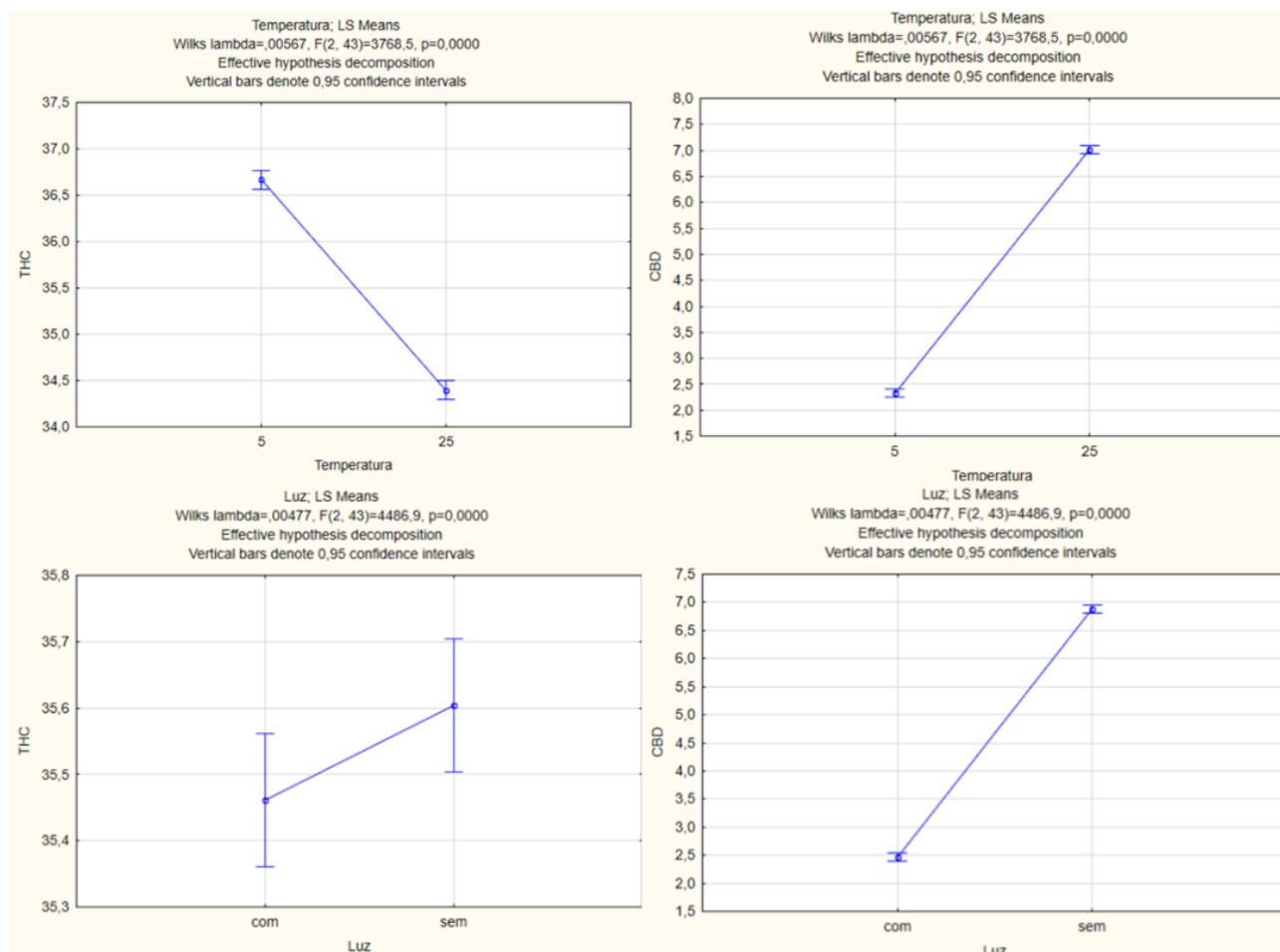
O perfil de degradação desse extrato foi gradual em todas as condições de armazenamento para o THC, apresentando uma ligeira estabilidade nos primeiros 30 dias (Figura 28). O CBD também apresentou certa estabilidade nos primeiros 30 dias, contudo, em todas as condições houve um decréscimo acentuado em 45 dias seguido de aumento aos 60 dias.

Figura 28 - Gráficos da variação dos teores de CBD e THC no extrato D ao longo do período de armazenamento em diversas condições



Fonte: O autor

Neste extrato, a ANOVA (Tabela 10) revelou significância para todas as variáveis e suas interações. O Gráfico de efeitos revela que os analitos tiveram comportamento diferenciado com relação a temperatura. Para o CBD a maior degradação ocorreu a 5 °C e a 25 °C para o THC. Já com relação a luz observamos, contudo, efeito semelhante, observando as maiores degradação na presença de luz (Figura 29).

Figura 29 - Gráfico dos efeitos para as variáveis temperatura e luz dos fitocanabinoides CBD e THC

Fonte: O autor

Tabela 10 - Valores de p obtidos na ANOVA para os fitocannabinoides do extrato D

Valores de p para o extrato D		
Vaiáveis	CBD	THC
Dia	0,000000	0,000000
Temperatura	0,000000	0,000000
Luz	0,000000	0,047335
Dia x Temperatura	0,000000	0,000000
Dia x Luz	0,000000	0,000000
Temperatura x Luz	0,000000	0,000000
Dia x Temperatura x Luz	0,000000	0,000000

Fonte: O autor

COMPARAÇÃO DOS EXTRATOS

As principais características e resultados dos extratos foram compilados num quadro para facilitar a comparação (Quadro 2). Nela observamos que para o THC, independente dos teores iniciais e excipiente os maiores percentuais de degradação ocorreram a 25 °C e na presença de luz, com percentuais variando de 59,9 a 82,6%. Os resultados deste estudo corroboram os achados de Trofin *et al.* (2012), que observaram que o conteúdo de THC em amostras de óleo de cannabis armazenadas na luz a 22 °C foi significativamente menor do que em amostras armazenadas no escuro a 4 °C, com degradações variando de 70% a 99,9% ao longo de quatro anos. Observa-se em nosso estudo que nem o excipiente nem as concentrações iniciais dos extratos, aparentemente, influenciaram na degradação. Contudo, destacamos que no extrato C foi observado o maior percentual de degradação para o THC (82,6%). Talvez isto seja um indício de que em extratos com concentrações semelhantes de THC e CBD, o THC se degrade mais acentuadamente em excipientes de azeite. Tanto o azeite quanto o MCT são compostos por ácidos graxos. Todavia, no MCT os ácidos graxos estão na forma de triacilgliceróis, que quando oxidados liberam os ácidos graxos livres. Desta forma, podemos supor que o MCT seja um excipiente mais protetivo em relação ao azeite, quando temos extratos com teores semelhantes de CBD e THC.

Quadro 2 - Comparação dos extratos com base nos seus parâmetros

	Extrato A	Extrato B	Extrato C	Extrato D
Teores de CBD e THC	Concentrações semelhantes de THC e CBD	Maior concentração de CBD	Concentrações semelhantes de THC e CBD	Maior concentração de THC
Excipiente	MCT	Azeite	Azeite	Azeite
Condições de maior degradação				
CBD	25 °C e Sem Luz	25 °C e Sem Luz	25 °C e Sem Luz	25 °C e Com Luz

THC	T indiferente e Com Luz	25 °C e Com Luz	25 °C e Com Luz	25 °C e Com Luz
% de degradação nas condições máximas após 150 dias				
CBD	52,0	52,8	99,9	67,5
THC	66,5 a 75,3	59,9	82,6	74,9

Fonte: o autor

Com relação ao CBD as maiores perdas foram observadas em temperaturas de 25 °C em todos os extratos. Contudo, com relação a luz, as maiores perdas foram observadas na sua ausência, exceto para o extrato D, rico em THC. Os percentuais de degradação variaram de 52,0 a 99,9%. Assim, como para o THC, o extrato C apresenta os maiores % de degradação para o CBD (99,9).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A validação da metodologia para dosagem dos fitocanabinoides THC, CBD e suas formas ácidas foi realizada com sucesso. O método apresentou efeito de matriz, sendo então toda a validação realizada na matriz. Foram obtidos boa linearidade, precisão e repetibilidade na faixa de trabalho empregada. Os limites de detecção e quantificação, variaram de 0,57 a 16,73 e de 22,34 a 51,23 ($\mu\text{g/mL}$), para todos os fitocannabinoides, sendo excelentes para a quantificação dos analitos em extratos de cannabis.

No estudo de degradação realizado por 5 meses, observou-se que a temperatura e luz influenciaram na degradação de todos os fitocanabinoides. Sendo a temperatura de 25°C promotora de maiores degradação para o THC, CBD e CBD-A. Já o THCA-A foi mais degradado a 5°C A presença de luz foi crucial para o THC e THC-A. E o CBD e CBD-A obtiveram maiores degradação na ausência de luz. Os resultados demonstram a complexidade nos processos degradativos envolvidos em diferentes extratos. Há indícios que o excipiente parece influenciar neste processo e os diferentes teores dos fitocanabinoides parecem não fazer diferença.

Considerando as diferenças das variáveis influenciadoras para o THC e CBD, recomenda-se que extratos ricos em THC seja armazenado em baixas temperaturas ao abrigo de luz, e aqueles ricos em CBD sejam armazenados a baixas temperaturas com luz. Todavia, é notório que em todos os extratos após 150 dias de armazenamento os teores, na melhor das hipóteses, caem para menos de 50% da concentração, requerendo o ajuste de dosagem da posologia.

Etapas futuras

O estudo levantou hipóteses interessantes e resultados contraditórios com alguns trabalhos publicados. Desta forma, faz-se necessário a ampliação do número de amostras com diferentes teores e excipientes para confirmação dos resultados.

6. REFERÊNCIAS

ABRASCO. **Cannabis e políticas de drogas: contribuições para o debate**. Disponível em: <http://www.abrasco.org.br/site/outras-publicacoes/>. Acesso em: 08/06/202.

ADDO, P. W.; BROUSSEAU, V. D.; MORELLO, V.; MacPHERSON, S.; PARIS, M.; LEFSRUD, M. Cannabis chemistry, post-harvest processing methods and secondary metabolite profiling: A review. **Industrial Crops and Products**, v. 170, 2021.

ANVISA. **Anvisa autoriza primeiro produto à base de Cannabis**. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2020/anvisa-autoriza-primeiro-produto-a-base-de-cannabis>. Acesso em: 28/08/2023.

ANVISA. **Guia de Estudos de Estabilidade. Versão 1**, de 11 de novembro de 2019. Disponível em: [https://pesquisa.anvisa.gov.br/upload/surveys/15455/files/Guia%20de%20Estudos%20de%20Estabilidade\(1\).PDF](https://pesquisa.anvisa.gov.br/upload/surveys/15455/files/Guia%20de%20Estudos%20de%20Estabilidade(1).PDF) Acesso em: 18/09/2023.

AGGARWAL, S. K., CARTER, G. T., SULLIVAN, M. D., ZUMBRUNNEN, C., MORRIL, R., MAYER, J. D. Medicinal use of cannabis in the United States: historical perspectives, current trends, and future directions. **Journal of opioid management**, v. 5, n. 3, p. 153-168, 2009.

ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 17, de 6 de maio de 2015**. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/55990624. Acesso em: 04/10/2023.

ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 327, de 3 de dezembro de 2019**. <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-rdc-n-327-de-3-de-dezembro-de-2019-231721223>. Acesso em: 03/10/2023.

ARAÚJO, T. **Guia sobre drogas para jornalistas**. 1ª ed. São Paulo: IBCCRIM-PBPD-Catalize-SSRC, 2017.

CAMPOS, J. A falência da política de drogas no Brasil e a necessidade da redução de danos. **Revista Brasileira de Ciências Criminais**, v. 27, n. 136, p. 187-208, 2019.

CARNEIRO, H. Proibição da maconha: racismo e violência no Brasil. **Cahiers des Amériques Latines**, p. 135-152, 2019.

CARVALHO, A. M.; SILVA, J. R.; SOUZA, J. P.; ALVES, M. S. Validação de um método para a determinação de canabinoides em extratos de cannabis por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 32, n. 2, p. 200-206, 2022.

CHOPRA, R. N.; CHOPRA, I. C.; CHOPRA, G. S. *Cannabis sativa* in relation to mental diseases and crime in Índia. **Indian Journal of Medical Research**, v. 45, n. 3, p. 277-281, 1957.

COLUCCI, D. A. Cannabis and Hearing Care: Hearing Loss and Tinnitus. **The Hearing Journal**, v. 72, n. 8, p. 43-46, 2019.

DEVILLE, M.; DUBOIS, N.; DENOOZ, R.; CHARLIER, C. Validation of an UHPLC/DAD method for the determination of cannabinoids in seized materials: Analysis of 213 samples sold in Belgian CBD shops. **Forensic Science International**, 2020.

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

FAIRBAIRN, J. W.; LIEBMANN, J. A.; ROWAN, M. G. The stability of cannabis and its preparations on storage. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 28, n. 1, 1976.

FREIRE, H. S. A.; COSTA, M. M da.; ROCHA, S.; SANTOS, G. A dos. Potencial de uso de cânhamo industrial (*Cannabis sativa* L.) para a produção de celulose fibra longa. **Boletim Técnico SIF**, v. 1, n. 3, 2021.

FUSTINONI, L. **Maconha no couro cabeludo: riscos e benefícios**. Disponível em: <https://drlucasfustinoni.com.br/maconha-no-couro-cabeludo-riscos-e-beneficios/> Acesso em: 28/10/2023.

GARRETT, E. R.; TSAU, J. Stability of Tetrahydrocannabinols I. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 63, n. 10, p. 1563-1574, 1974.

GERTSCH, J.; LEONTI, M.; RADUNER, S.; RACZ, I.; CHEN, J.-Z.; XIE, X.-Q.; ALTMAN, K.-H.; KARSAK, M.; ZIMMER, A. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 26, p. 9099-9104, J 2008.

GOLOMBEK, P.; MULLER, M.; BARTHLOTT, I.; SROLL, C.; LACHENMEIER, D. W. Conversion of cannabidiol (CBD) into psychotropic cannabinoids including tetrahydrocannabinol (THC): a controversy in the scientific literature. **Toxics**, v. 8, n. 2, 2020.

GRAFSTRÖM, K.; ANDERSSON, K.; PETTERSSON, N.; DALGAARD, J.; DUNNE, S. J. Effects of long-term storage on secondary metabolite profiles of cannabis resin. **Forensic Science International**, v. 301, p. 331-340, 2019.

HAZEKAMP, A.; FISCHEDICK, J. T. Cannabis-from cultivar to chemovar. **Drug Testing and Analysis**, v. 4, n. 7-8, p. 660-667, 2012.

HAZEKAMP, A.; GROTENHERMEN, F. Review on clinical studies with cannabis and cannabinoids

2005–2009. **Cannabionoids**, v.5, 2010.

HUESTIS, M. A. Human Cannabinoid Pharmacokinetics. **Chemistry & Biodiversity**, v. 4, n. 8, p. 1770-1804, 2007.

IZZO, A. A.; BORRELLI, F.; CAPASSO, R.; MARZO, V di.; MECHOULAM, R. Non-psychoactive plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 30, n. 10, p. 515-527, 2009.

JIKOMES, N.; ZOOROB, M. The cannabinoid content of legal cannabis in Washington State varies systematically across testing facilities and popular consumer products. **Scientific reports**, v. 8, n.1, 2018.

KING, J. W. The relationship between cannabis/hemp use in foods and processing. **Current Opinion in Food Science**, v. 28, p. 32–40, 2019.

LI, H.-L. An archaeological and historical account of cannabis in China. **Economic Botany**, v. 28, n. 4, p. 437-448, 1974.

MARCÃO, R. **Tóxicos: Lei. 11.343, de 23 de agosto de 2006 – Nova Lei de Drogas – Anotada e Interpretada**. 5 ed. São Paulo: Saraiva, 2008.

MARTINS, A. A história da maconha no Brasil. **Revista de História da Biblioteca Nacional**, v. 6, n. 72, p. 12-15, 2011.

MEHMEDIC, Z.; CHANDRA, S.; SLADE, D.; DENHAM, H.; FOSTER, S.; PATEL, A. S.; ROSS, S. A.; KHAN, I. A.; ELSOHLY, M. A. Potency trends of Δ^9 -THC and other cannabinoids in confiscated cannabis preparations from 1993 to 2008. **Journal of Forensic Sciences**, v. 55, n. 5, p. 1209-1217, 2010.

MORALES, P. et al. Cannabis and cannabinoids: Kinetics and interactions. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 75, n. 6, p. 372-381, 2018.

OLIVEIRA, N. **Cannabis medicinal: realidade à espera de regulamentação**. Disponível em: <https://www12.senado.leg.br/noticias/infomaterias/2021/07/cannabis-medicinal-realidade-a-espera-de-regulamentacao>. Acesso em: 20/10/2023.

PERTWEE, R. G. Emerging strategies to explore cannabinoid receptor agonists as medicines. **British Journal of Pharmacology**, v. 156, n. 3, p. 397-411, 2009.

PERTWEE, R. G. The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: Δ^9 -tetrahydrocannabinol, cannabidiol and Δ^9 -tetrahydrocannabivarin. **British Journal of**

Pharmacology, v. 153, n. 2, p. 199-215, 2008.

RABIPOUR, S. Cannabis medicinal no Brasil: Avanços e desafios. **Journal of the Brazilian Association of Health Informatics**, v. 2, n. 1, p. 32-42, 2022.

RUSSO, E. B. Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. **British Journal of Pharmacology**, v. 163, n. 7, p. 1344-1364, 2011.

SANNIKOVA, N. **The effects of storage conditions on cannabinoid stability**. Disponível em: <https://ascensionsciences.com/newsroom/technical-articles/effects-of-storage-conditions-on-cannabinoid-conditions/> . Acesso em: 15/10/2023.

SHAH, S.; WASTI, A.; ROGGEN, M. **Fast, easy and reliable monitoring of THCA and CBDA decarboxylation in cannabis flower and oil samples using infrared spectroscopy**. Disponível em: <https://www.agilent.com/cs/library/whitepaper/public/whitepaper-cannabis-cary-630-ir-5994-4167EN-agilent.pdf> . Acesso em: 10/10/2023.

STRZELCZYK, M.; LOCHYNSKA, M.; CHUDY, M. Systematics and Botanical Characteristics of Industrial Hemp *Cannabis Sativa* L. **Journal of Natural Fibers**, v. 19, n. 13, 2022.

SMITH, J.; JONES, M.; BROWN, D. Degradation of cannabinoids in cannabis: A review. **Journal of Cannabis Research**, v. 5, n. 1, 2023.

SOUZA, V. G. de L. X de.; VASCONCELOS, T. C. L de. A propriedade anti-inflamatória do Canabidiol (CBD) usado em cosméticos para o tratamento da acne causada por *Cutibacterium acnes* (*Propionibacterium acnes*). **Research, Society and Development**, v. 11, n. 15, 2022.

TIWARI, P.; KUMAR, B.; KAUR, M.; KAUR, G.; KAUR, H. Phytochemical screening and Extraction: A Review. **International Pharmaceutical Science**, v.1, n.1, p.98-106, 2011.

THOMSON, B. J. A.; HANNA, S.; SCHWARZENBERG, A.; KIANI, P.; BIZZOTTO, D.; KENNEPOHL, P.; DAVIES, A.; ROGGEN, M.; SAMMIS, G. M. CBD hydroxyquinone photoisomerizes into a highly reactive intermediate. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, 2023.

TROFIN, I. G.; DABIJA, G.; VAIREANU, D.-I.; FILIPESCU, L. The Influence of Long-term Storage Conditions on the Stability of Cannabinoids derived from Cannabis Resin. **Revista de Chimie**, v. 63, n. 4, p. 422-427, 2012.

TURNER, C. E.; HADLEY, K. W.; FETTERMAN, P. S.; DOORENBOS, N. J.; QUIMBY, M. W.; WALLER, C. Constituents of *Cannabis sativa* L. IV: stability of cannabinoids in store plant material. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 62, n. 10, p. 1601-1605, 1973.

TZIMAS, P. S.; PETRAKIS, E. A.; HALABALAKI, M.; SKALTSOUNIS, L. A. Effective determination of the principal non-psychoactive cannabinoids in fiber-type *Cannabis sativa* L. by

UPLC-PDA following a comprehensive design and optimization of extraction methodology. **Analytica Chimica Acta**, v. 413, n. 22, p. 6882-6893, 2021.

VERHOECKX, K. C. M.; KORTHOUT, H. A. A. J.; MEETEREN-KREIKAMP, A. P van.; EHLERT, K. A.; WANG, M.; GREEF, J van der.; RODENBURG, R. J. T.; WITKAMP, R. F. Unheated Cannabis sativa extracts and its major compound THC-acid have potential immuno-modulating properties not mediated by CB1 and CB2 receptor coupled pathways. **International immunopharmacology**, v. 6, n. 4, p. 656-665, 2006.

VICENTE, L. M. de L. **Design de uma formulação de creme contendo CBD para tratamento de psoríase vulgar**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) - Centro de Educação e Saúde, Universidade Federal de Campina Grande, Cuité – PB 2021.

ZIVOVINOVIC, S.; ALDER, R.; ALLENSPACH, M. D.; STEUER, C. Determination of cannabinoids in *Cannabis sativa* L. samples for recreational, medical, and forensic purposes by reversed-phase liquid chromatography-ultraviolet detection. **Journal of Analytical Science and Technology**, v. 9, n. 27, 2018.

WARE, M. A.; ADAMS, H.; GUY, G. W. The medicinal use of cannabis in the UK: results of a nationwide survey. **International journal of clinical practice**. V. 59, n. 3, p. 291-295, 2005.

APÊNDICE

APÊNDICE A - Valores da degradação nos extratos B, C e D, respetivamente.

Tabela 11 – Valores da degradação no extrato B

Tempo em dias	CBD mg/mL	THC mg/mL
5°C		
Luz		
0	31,53 ± 0,16	2,72 ± 0,09
15	31,63 ± 0,14	2,38 ± 1,02
30	29,30 ± 0,12	1,97 ± 0,03
45	27,82 ± 2,06	1,22 ± 0,65
60	25,82 ± 0,10	1,04 ± 1,04
75	19,77 ± 1,08	1,56 ± 0,00
90	19,68 ± 0,07	1,33 ± 0,03
105	17,23 ± 1,05	1,18 ± 0,83
120	17,23 ± 0,07	1,08 ± 0,93
135	15,23 ± 0,16	1,09 ± 0,09
150	16,65 ± 0,14	1,64 ± 1,02
% de redução total	47,9	39,7
Sem luz		
0	31,53 ± 0,16	2,72 ± 0,12
15	33,86 ± 2,51	2,51 ± 0,07
30	29,15 ± 2,41	2,41 ± 0,02
45	21,83 ± 1,56	1,52 ± 0,55
60	22,54 ± 2,50	2,51 ± 0,03
75	22,87 ± 1,15	1,15 ± 0,09
90	23,69 ± 2,04	2,04 ± 0,00
105	19,72 ± 1,57	1,58 ± 0,03
120	22,76 ± 1,57	1,34 ± 0,03
135	20,87 ± 0,16	1,00 ± 0,01
150	20,55 ± 2,51	1,23 ± 0,07
% de redução total	34,8	54,9
25°C		

luz		
0	31,53 ± 0,04	2,72 ± 0,02
15	21,65 ± 0,61	2,62 ± 0,04
30	27,37 ± 2,02	2,06 ± 0,02
45	25,79 ± 0,06	1,90 ± 0,27
60	24,88 ± 0,9	1,36 ± 0,04
75	24,07 ± 1,36	1,19 ± 0,45
90	23,57 ± 1,2	0,96 ± 0,92
105	20,74 ± 0,97	0,56 ± 0,02
120	22,74 ± 0,07	0,47 ± 0,42
135	21,74 ± 0,07	0,47 ± 0,42
150	20,23 ± 1,36	1,09 ± 0,45
% de redução		
total	35,8	59,9
Sem Luz		
0	31,53 ± 0,16	2,72 ± 0,12
15	28,70 ± 0,27	0,27 ± 0,81
30	28,04 ± 2,59	2,58 ± 0,02
45	20,83 ± 2,52	2,52 ± 0,52
60	20,22 ± 2,43	2,42 ± 0,06
75	21,91 ± 2,15	2,15 ± 0,02
90	19,47 ± 1,61	1,60 ± 0,52
105	18,99 ± 1,04	1,03 ± 0,02
120	17,00 ± 0,76	2,00 ± 0,15
135	16,00 ± 0,56	1,00 ± 0,87
150	14,87 ± 1,15	1,81 ± 0,54
% de redução		
total	52,8	33,5

Fonte: O autor

Tabela 12 – Valores da degradação no extrato C

Tempo em dias	CBD mg/mL	THC mg/mL
	5°C	
Luz		
0	7,74 ± 0,15	5,68 ± 0,04
15	6,24 ± 0,14	4,56 ± 1,34
30	5,64 ± 1,13	4,24 ± 0,02
45	5,88 ± 0,12	3,46 ± 0,08
60	3,01 ± 1,16	2,54 ± 0,02
75	2,41 ± 0,11	2,58 ± 0,45
90	2,05 ± 0,12	2,92 ± 1,02
105	2,37 ± 0,12	2,97 ± 0,32
120	2,17 ± 0,12	2,68 ± 0,32
135	2,01 ± 0,12	1,00 ± 0,92
150	1,89 ± 0,12	0,99 ± 0,08
% de redução total	75,6	82,3
Sem luz		
0	7,73 ± 0,15	5,68 ± 0,04
15	6,74 ± 0,30	4,57 ± 0,06
30	6,75 ± 0,78	4,73 ± 0,07
45	5,67 ± 1,35	4,45 ± 1,08
60	3,19 ± 0,25	2,71 ± 0,10
75	2,76 ± 0,20	2,28 ± 0,12
90	2,12 ± 0,18	2,64 ± 0,14
105	1,59 ± 0,22	2,15 ± 0,16
120	1,68 ± 0,13	2,15 ± 0,56
135	1,38 ± 0,16	2,09 ± 0,12
150	0,99 ± 0,11	1,76 ± 0,11
% de redução total	87,2	69,0
25 °C		
luz		
0	7,74 ± 0,15	5,68 ± 0,04
15	7,73 ± 0,18	5,57 ± 0,04

30	6,74 ± 0,82	6,73 ± 2,12
45	5,67 ± 0,85	4,45 ± 0,05
60	4,22 ± 0,30	3,16 ± 0,12
75	2,63 ± 0,25	2,58 ± 0,14
90	2,70 ± 1,20	2,53 ± 0,18
105	2,46 ± 0,22	1,21 ± 0,20
120	2,00 ± 0,85	1,01 ± 0,05
135	1,99 ± 0,25	1,00 ± 0,05
150	1,75 ± 0,25	0,99 ± 0,14
% de redução total	77,4	82,6

	Sem Luz	
0	7,73 ± 0,15	5,68 ± 0,04
15	6,54 ± 0,18	5,55 ± 0,08
30	6,54 ± 0,22	5,66 ± 0,10
45	5,68 ± 1,25	4,56 ± 0,12
60	3,44 ± 0,30	2,81 ± 0,15
75	2,06 ± 0,25	1,41 ± 0,18
90	2,09 ± 0,20	2,30 ± 0,20
105	1,64 ± 0,22	1,04 ± 0,25
120	1,64 ± 0,15	1,04 ± 0,03
135	0,64 ± 0,18	1,00 ± 0,08
150	0,34 ± 0,01	1,24 ± 0,03
% de redução total	99,9	78,2

Fonte: O autor

Tabela 13 – Valores da degradação no extrato D

Tempo em dias	CBD mg/mL	THC mg/mL
5°C		
Luz		
0	3,02 ± 0,10	59,24 ± 1,40
15	2,82 ± 0,12	57,24 ± 2,42
30	2,71 ± 0,14	57,86 ± 1,45
45	1,59 ± 0,18	41,62 ± 0,50
60	2,00 ± 0,15	29,84 ± 2,55
75	2,16 ± 0,20	33,23 ± 1,60
90	2,05 ± 0,22	29,96 ± 0,65
105	2,00 ± 0,25	25,41 ± 1,70
120	1,23 ± 0,70	25,41 ± 0,80
135	1,22 ± 0,14	23,42 ± 2,45
150	1,60 ± 0,18	22,76 ± 1,60
% de redução total	47,0	61,6
Sem luz		
0	3,02 ± 0,10	59,24 ± 1,40
15	3,45 ± 0,11	55,40 ± 0,42
30	3,39 ± 0,14	55,63 ± 0,45
45	1,98 ± 0,18	48,41 ± 0,80
60	1,19 ± 0,15	29,81 ± 2,55
75	2,70 ± 0,20	31,43 ± 1,83
90	2,15 ± 0,22	26,78 ± 0,65
105	1,56 ± 0,25	23,53 ± 0,70
120	1,40 ± 0,18	23,00 ± 1,60
135	1,20 ± 0,15	24,00 ± 0,55
150	1,58 ± 0,20	22,86 ± 0,60
% de redução total	47,7	61,4
25 °C		
luz		

0	3,02 ± 0,10	59,24 ± 1,40
15	3,54 ± 1,62	52,14 ± 1,92
30	3,50 ± 0,14	51,50 ± 0,45
45	2,04 ± 0,18	51,57 ± 0,60
60	2,25 ± 1,15	34,57 ± 0,55
75	2,64 ± 0,20	29,13 ± 1,60
90	2,72 ± 0,22	25,14 ± 0,65
105	2,42 ± 0,25	19,22 ± 0,70
120	1,00 ± 0,18	18,00 ± 1,60
135	1,00 ± 0,15	17,00 ± 0,55
150	1,09 ± 0,20	16,86 ± 0,60
% de redução		
total	63,9	71,5

Sem Luz

0	3,02 ± 0,10	59,24 ± 1,40
15	2,96 ± 1,12	63,45 ± 0,42
30	2,89 ± 0,14	52,79 ± 0,45
45	1,67 ± 0,18	45,35 ± 0,50
60	1,37 ± 0,15	44,65 ± 2,55
75	2,03 ± 0,20	25,02 ± 1,60
90	2,11 ± 0,22	23,29 ± 0,65
105	1,68 ± 0,25	18,78 ± 0,70
120	1,79 ± 0,15	18,00 ± 2,55
135	1,05 ± 0,14	16,78 ± 1,45
150	0,98 ± 0,18	14,86 ± 0,50
% de redução		
total	67,5	74,9

Fonte: O autor