Instituição de Execução do Projeto: **Universidade Federal da Integração Latino Americana – Instituto Latino Americano de Ciências da Vida e da Natureza.**

Instituições parceiras: **Associação Medicinal Canábica AME-C**

Proponente: **Profa. Dra. Aline Theodoro Toci (Coordenadora – Química – Profa. UNILA)**

Equipe: **Prof. Dr. Francisney Pinto do Nascimento (Farmacêutico - Prof. UNILA)**

Dra. Priscila Maria Manzini Ramos (Bióloga, UNILA)

Prof. Dr. Elton Gomes da Silva (Médico Neurologista – Prof. UNILA)

Área de conhecimento: **Ciências Exatas e da Terra, Ciências Biológicas e Ciências da Saúde**

Grupo de pesquisa: **Laboratório de Estudos Interdisciplinares do Meio Ambiente e Alimentos**

(http://dgp.cnpq.br/dgp/espelhogrupo/37608)

Edital de apoio às pesquisas avançadas no âmbito do Laboratório de Ideias - LABID, do Instituto Mercosul de Estudos Avançados, da Universidade Federal da Integração Latino-Americana

EDITAL IMEA Nº 03, DE 18 DE OUTUBRO DE 2021

Faixa de enquadramento de R$15.000 a 30.000

Dosagem de fitocanabinoides em extratos medicinais de *Cannabis* e no sangue de pacientes submetidos à terapia canábica.

Outubro 2021

RESUMO

Há milênios os extratos medicinais de espécies de *Cannabis* são utilizados no tratamento de diversas condições patológicas, principalmente pela cultura Chinesa. Diversos estudos demonstram que a *Cannabis* desempenha efeito anti-emético, estimulante do apetite, analgésico, euforizante, anti-inflamatório, anticonvulsivante, sedativo, redutor da ansiedade e estabilização dos níveis de humor, o que tem impulsionado na última década diversos estudos farmacológicos. Diversos compostos formados no metabolismo secundário desta planta são de interesse farmacológico, especialmente os canabinoides (terpenofenólicos). Dentre os fitocanabinoides, os mais estudados até o momento são o THC, como constituinte psicoativo presente majoritariamente na planta e o canabidiol (CBD). No Brasil, somente em 2014, é que o Conselho Federal de Medicina regularizou o uso de canabinoides, impulsionado pelos resultados clínicos no tratamento da epilepsia. Hoje, a ANVISA retirou o canabidiol de sua lista de substâncias proibidas e liberou a fabricação de extratos no Brasil. Com a recente liberação, outras necessidades mercadológicas fazem-se necessárias, principalmente no que se refere a regulamentação do uso de extratos medicinais de *Cannabis* e a necessidade de fiscalização e monitoramento com fins de saúde pública, justificando a padronização de métodos de controle de qualidade aplicáveis ao insumo farmacêutico ativo vegetal (IFAV) e aos extratos formulados em veículos oleosos. A maior parte dos medicamentos e outras substâncias químicas, quando administradas ao organismo, sofrem processos de absorção, distribuição, metabolização e eliminação. A distribuição se refere ao momento que os fármacos estão na cirulação sanguínea sistêmica e então são capazes de atingir os tecidos e células alvo, induzindo o efeito farmacológico pretendido. Ou seja, toda vez que um medicamento é ingerido, vários sistemas e órgãos são atingidos com o objetivo de receber o efeito farmacológico. Desta forma, saber de fato a concentração do fármaco me medicamento administrado e no sangue é essencial para prever os efeitos terapêuticos e adversos de qualquer droga. No caso dos fitocanabinoides, ainda são pouquíssimos os laboratórios no mundo que dominam a tecnologia e protocolo para esta dosagem. Pois, a matriz biológica sangue, que possui inúmeras substâncias como proteínas, enzimas e outros, é um fator complicador para a fácil leitura dos níveis de fármacos. Portanto, o conhecimento detalhado dos níveis e concentrações de fitocanabinoides na circulação sanguínea pode proporcionar um direcionamento específico para a prescrição, previsão de efeitos e cuidados que cada paciente que toma estes medicamentos necessita. Sendo assim, os objetivos do presente projeto são validar e implementar no laboratorio de cromatografia da UNILA as metodologias de análise de canabinoides em extratos de *Cannabis* e no sagune de pacientes em terapia canábica.

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

Sumário

RESUMO **2**
INTRODUÇÃO **4**
A Cannabis e os fitocanabinoides 4
Biodisponibilidade e farmacocinética dos canabinoides 6
O Sistema Encodocanabinoide 8
Autorização sanitária para fabricação e importação 9
Produção dos extratos 10
Controle de qualidade dos extratos 11
Métodos de dosagem dos canabinoides 12
Desafios científicos 13
JUSTIFICATIVA **14**
OBJETIVOS **15**
METODOLOGIA **15**
Amostras de extratos de Cannabis 15
Amostras de sangue 15
Análise de THC e CBD no extrato 16
Análise de THC, CBD e metabólitos no sangue 16
Validação dos métodos 17
Análise estatística 17
CRONOGRAMA **18**
REFERÊNCIAS **19**

INTRODUÇÃO

Há milênios (2700 a.C.) os extratos medicinais de espécies de Cannabis são utilizados no tratamento de diversas condições patológicas, principalmente pela cultura Chinesa (ZUARDI, 2006; MECHOULAM et al., 2014). No Brasil, somente em 2014, é que o Conselho Federal de Medicina regularizou o uso de canabinóides, impulsionado pelos resultados clínicos no tratamento da epilepsia. Com isso, em 2015, a ANVISA retirou o canabidiol de sua lista de substâncias proibidas e em 2019 liberou a fabricação de extratos no Brasil (ANVISA, 2019).

Com a recente liberação, outras necessidades mercadológicas fazem-se necessárias, principalmente no que se refere a regulamentação do uso de extratos medicinais de *Cannabis* e a necessidade de fiscalização e monitoramento com fins de saúde pública, justificando a padronização de métodos de controle de qualidade aplicáveis ao insumo farmacêutico ativo vegetal (IFAV) e aos extratos formulados em veículos oleosos.

A Cannabis e os fitocanabinoides

A planta *Cannabis sativa* (Cannabis), conhecida popularmente no Brasil como maconha, é a droga ilegal mais consumida no mundo ocidental (DI MARZO, 2004; MECHOULAM et al., 2014). O uso da Cannabis para fins medicinais foi datada pelos chineses em aproximadamente 2.700 a.C. e já fazia parte de sua farmacopeia, a mais antiga do mundo, há alguns séculos (ZUARDI, 2006; MECHOULAM et al., 2014). As indicações para o uso de Cannabis incluíam: dor reumática, constipação intestinal, distúrbios do sistema reprodutor feminino, malária e para anestesiar pacientes durante operações cirúrgicas (MECHOULAM, 1986; ZUARDI, 2006).

A *Cannabis sativa, Cannabis indica* e a *Cannabis ruderalis* são as três espécias mais estudadas, sendo que existem diversas subespécies e inúmeras variedades de planta para o cultivo (WORLD DRUG REPORT, 2009). Dentre as três espécies mais estudadas, a *Cannabis sativa* possui altos níveis de THC e baixos níveis de CBD e CBN, a *Cannabis indica* tem níveis médios de THC e níveis médios de CBD e CBN, já a *Cannabis ruderalis* tem baixos níveis de THC e altos níveis de CBD e CBN. Diversos compostos formados no metabolismo secundário desta planta são de interesse farmacológico, especialmente os canabinoides (terpenofenólicos). De acordo com uma recente revisão, mais de 545 constituintes metabolicos foram identificados na *Cannabis*, sendo 144 deles isolados e classificados como fitocanbinoides (HANUŠ et al., 2016). Os fitocanabinoides foram classificados em 11 subclasses de acordo com suas estruturas químicas: (1) canabigerol (CBG); (2) (-)-Δ^9-trans-tetra-hidrocanabinol

(THC); (3) canabidiol (CBD); (4) canabicromeno (CBC); (5) canabinol (CBN); (6) (-)-Δ^8-trans-tetra-hidrocanabinol (Δ^8-THC); (7) canabiciclol (CBL); (8) canabinodiol (CBND); (9) canabielsoína (CBE); (10) canabitriol (CBT); e (11) tipos diversos. (Figura 1).

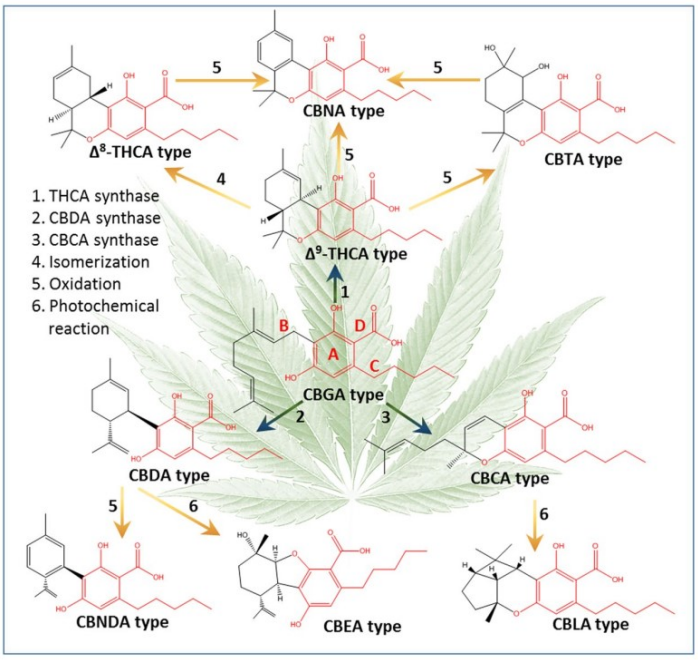

Figura 1 - Biossíntese de fitocanabinóides e rotas de degradação e produtos (Transcrito de Berman, 2018).

Dentre os fitocanabinoides, chamados aqui apenas de canabinoides, os mais estudados até o momento são o THC, como constituinte psicoativo presente majoritariamente na planta e o canabidiol (CBD) que não apresenta efeitos psicoativos significantes (MECHOULAM, 1986; RUSSO, 2004; PERTWEE, 2015). Atualmente, diversos estudos demonstram que a *Cannabis* desempenha efeito anti-emético, estimulante do apetite, analgésico, euforizante, anti-inflamatório, anticonvulsivante e sedativo (ZUARDI, 2006; DE PETROCELLIS, 2011). No entanto, suas aplicações clínicas permanecem circunscritas, em grande parte devido aos conhecidos efeitos psicoativos do THC (WILEY, 2018; ZUARDI, 2006; MECHOULAM et al., 2014).

O THC foi isolado e identificado pelos cientistas Gaoni e Mechoulam. A identificação e isolamento desta molécula em meados dos anos 60 seguramente foi o momento essencial para a criação e evolução de todo um campo da medicina que hoje chamamos de sistema endocanabinoide ou medicina canabinoide (MECHOULAM, 2000). Mechoulan e seu grupo perceberam que a molécula de THC isolada era capaz de mimetizar os principais efeitos agudos e temporários da *Cannabis*, hipotermia, analgesia, catalepsia e alteração cognitiva. Ou seja, o THC era o princípio ativo mais importante da Cannabis (MARTIN et al., 1999).

O canabidiol (CBD) embora tivesse tido sua estrutura identificada ainda no século XIX foi também isolado e melhor estudado de forma pioneira pelo grupo do professor Mechoulam. No entanto, diferentemente do THC, o CBD possui baixíssima atividade psicoativa e clinicamente esse efeito é praticamente desprezível. Além disso, o CBD possui outros efeitos mais proeminentes, como redutor da ansiedade e estabilização dos níveis de humor (MARTIN et al., 1999; PERTWEE, 2015; CRISTINO et al., 2020).

Biodisponibilidade e farmacocinética dos canabinoides

As duas formas de ingestão mais populares são por inalação (fumo) e por via oral (ingestão). Os canabinóides quando inalados são metabolizados nos pulmões, quando ingeridos são metabolizados no fígado, sendo que diferentes enzimas estão envolvidas e diferentes metabólitos são produzidos. Sabe-se que o THC pode se decompor quando exposto ao ar, calor ou luz e, também, a exposição a ácidos pode oxidar o composto em canabinol (CBN), um canabinóide muito menos potente (Figura 2) (HUESTIS, 2007). Nos pulmões a maioria dos metabolitos são hidroxilados na cadeia lateral produzindo o 11-nor-Δ^9-carboxi-tetrahidrocanabinol (THC-COOH) e o 11-hidroxitetrahidrocanabinol (11-OH-THC), já quando ingeridos produzem o canabinol (CBN) (Figura 2). A quantidade encontrada no sangue dependerá de como foi ingerido, podendo chegar a concentrações superiores a 150 ng mL^{-1} quando inalado (HUESTIS, 2007).

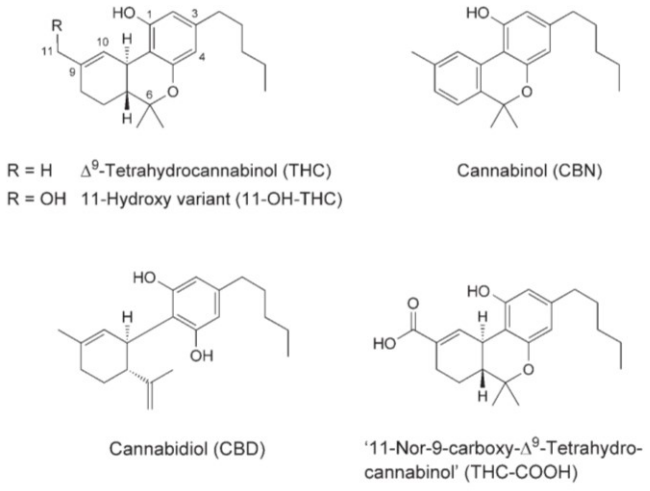

Figura 2 – Estruturas químicas do THC, CBN, CBN e THC-COOH.

O THC aparece no plasma imediatamente após a primeira inalação, sendo rapidamente metabolizado no ativo 11-OH-THC, com concentrações máximas de aproximadamente 13 minutos

após fumar e atingindo 10% das concentrações de THC (HUESTIS, 2005). O 11-OH-THC é ainda oxidado ao THC-COOH. As concentrações plasmáticas de THC-COOH aumentam lentamente ao longo da primeira hora após fumar e estabilizam após 2-4 h. Tanto o THC quanto seus metabólitos possuem alta lipofilicidade, podendo ser armazenados no tecido adiposo, sendo então liberados com o tempo (HUESTIS, HENNINGFIELD e CONE, 1982).

A biodisponibilidade após a inalação foi relatada na faixa de 2 a 56%, devido em parte à variabilidade intra e interindividual na dinâmica do fumo, que contribui para a incerteza na distribuição da dose (AGURELL e LEANDER, 1971; OHLSSON et al., 1982; OHLSSON et al., 1985; AGURELL et al., 1986). O número, duração e espaçamento das inalações, tempo de espera e volume de inalação, ou topografia do fumo, influenciam muito o grau de exposição ao medicamento (AZORLOSA et al., 1992; HEISHMAN, STITZER e YINGLING, 1989; PEREZ-REYES, 1990). A expectativa da recompensa do medicamento também pode afetar a dinâmica do fumo. Cami et al. (1991) observaram que os indivíduos foram capazes de mudar seu método de fumar cigarros de haxixe para obter maiores concentrações plasmáticas de THC. Concentrações de 7,0 ng mL^{-1} e 18,1 ng ml^{-1} foram relatadas após a primeira inalação de fumo de cigarro contendo 1,75% de THC (ca. 16 mg) e 3,55% de THC (ca . 34 mg), respectivamente (HUESTIS, HENNINGFIELD e CONE, 1992; HUESTIS et al., 1992), atingindo concentrações máximas de 150 ng ml^{-1} para o cigarro de 3,55% após cerca de 6 min.

Com relação as concentrações plasmáticas após ingestão oral, foram relatados níveis mais baixos em relação a inalação. Ohlsson et al. (1980) relatam concentrações máximas de THC de 4,4 a 11 ng mL^{-1}, ocorrendo de 1 a 5 horas após a ingestão de 20 mg de THC em um biscoito de chocolate, sendo a biodisponibilidade oral estimada em 6%. Vários fatores foram apontados por serem responsáveis por essa baixa biodisponibilidade oral (em comparação com a administração intravenosa do medicamento e oral), incluindo absorção variável, degradação do medicamento no estômago e conversão significativa para o metabólito 11-OH-THC no fígado. As concentrações plasmáticas de THC e seus metabólitos, 11-OH-THC e THC-COOH, também foram monitoradas em outro estudo com 17 voluntários após a ingestão de uma única cápsula de MarinolM (10 mg de THC). A concentração média de pico de 3,8 ng mL^{-1} de THC (intervalo 1,1 - 12,7 ng mL^{-1}), 3,4 ng mL^{-1}de 11-OH- THC (intervalo de 1,2 - 5,6 ng mL^{-1}) e 26 ng mL^{-1}de THC-COOH (intervalo de 14 - 46 ng mL^{-1}) foram encontrados 1-2 h após a ingestão (KIM e YOON, 1996).

Poucos estudos compararam diretamente a farmacocinética dos canabinoides em fumantes ocasionais e frequentes. Toennes et al. (2008) demonstraram que as concentrações máximas de THC e THC-COOH em 8 h foram significativamente maiores em fumantes frequentes em comparação com fumantes ocasionais; no entanto, após o ajuste das concentrações basais, o THC foi significativamente maior em fumantes frequentes, possivelmente devido à topografia de tabagismo alterada, o mesmo não

ocorreu com THC-COOH. Além disso, os padrões de distribuição e eliminação foram comparáveis entre os 2 grupos.

O Sistema Encodocanabinoide

Os canabinoides se ligam a entidades específicas nos organismos de mamíferos e outras espécies: os receptores canabinoides. Estes receptores foram identificados nos anos 90 do século passado. O primeiro a ser identificado foi o receptor canabinoide 1 (CB1), um receptor acoplado à proteína G (GPCR), que é distribuído de forma ampla, mas não exclusiva, no sistema nervoso central (MECHOULAM et al., 2014; CRISTINO et al., 2020). O receptor canabinóide 2 (CB2) também é um GPCR, é encontrado principalmente em órgãos do sistema imune (PERTWEE, 2015; CRISTINO et al., 2020). Os receptores canabinoides são acoplados à proteína G e estão localizados pré-sinapticamente na membrana plasmática das terminações nervosas e, quando ativados, podem inibir, por exemplo, a liberação de transmissores por essas terminações (PERTWEE, 2008; CRISTINO et al., 2020). Entretanto, os canabinoides também podem aumentar ou facilitar a atividade de algumas vias neuronais pela inibição de conexões inibitórias. Por este motivo, os endocanabinoides são chamados de neuromoduladores, ou seja, o resultado de suas ações podetanto estimular como inibir a atividade neuronal (SAITO et al, 2010; PERTWEE, 2015; CRISTINO et al., 2020).

Após a descoberta dos receptores canabinoides no cérebro de ratos em 1990, a localização desses receptores foi mapeada em outras espécies de mamíferos, incluindo seres humanos, e mostrou-se presente em todo o hipocampo, nos núcleos da base e no cerebelo. (MATSUDA et al., 1993; TURNER et al., 2017). Em 1992, o primeiro ligante endógeno para esses receptores, conhecido como endocanabinoide, foi isolado do cérebro de porco e denominado anandamida (araquidonoyletanolamida, AEA) (MARTIN et al., 1999; MECHOULAM, 2000). Três anos depois, verificou-se que o 2-araquidonoilglicerol (2-AG), um intermediário presente em várias vias de sinalização também interagia com receptores canabinóides e foi relatado como o segundo canabinóide endógeno (MARTIN et al., 1999; SUGIURA e WAKU, 2000; SUGIURA e WAKU, 2002). Logo foram descobertas várias enzimas que fazem parte deste sistema, com destaque para a FAAH (hidrolase amido-ácida gorduros), principal enzima degradadora da anandamida, e MAGL (lipase monoacilglicerol), responsável pela degradação do 2-AG (MARTIN et al., 1999; CRISTINO et al., 2020).

Assim, o sistema endocanabinoide é composto por receptores próprios, enzimas e neuromoduladores que são os canabinoides endógenos (MARTIN et al., 1999; MECHOULAM et al., 2014; CRISTINO et al., 2020). Estes neuromoduladores são liberados apenas sob demanda em

resposta à atividade sináptica excitatória, e são sintetizados em resposta ao aumento do cálcio intracelular no neurônio pós-sináptico, onde ocorre sua síntese e liberação (MARTIN et al., 1999; PERTWEE, 2015). Sua ação se dá através da liberação de neurotransmissores pela via final em terminais GABAérgicos, e em menor extensão, glutamatérgicos, atuando como modulador dos outros sistemas de neurotransmissão (PERTWEE, 2015, CRISTINO et al., 2020). Ao contrário dos sistemas de neurotransmissão clássicos, os endocanabinoides possuem ação pré-sináptica, isto é, atuam em receptores pré-sinápticos como mensageiros sinápticos retrógrados (MARTIN et al., 1999; HOWLETT et al., 2002; CRISTINO et al., 2020).

O THC, como mencionado anteriormente, é o fitocanabinoide responsável pelos efeitos psicoativos do uso da *Cannabis*, como sedação, prejuízo cognitivo e alterações perceptivas (LUCAS et al, 2018). Porém, há evidências que esteja envolvido em mecanismos sinápticos e neuroprotetores (MARTIN et al., 1999; GRUNDY, 2002; BILKEI-GORZO et al., 2017). Já o CBD está envolvido com mecanismos de modulação alostérica de receptores canabinoides, tendo por estes menor afinidade. No entanto, intracelularmente é capaz de aumentar os níveis de endocanabinoides, comoa anandamida, através da inibição da FAAH, (LAPRAIRIE et al., 2015), e parece amenizar os efeitos adversos do THC, como intoxicação, sedação e taquicardia (RUSSO e GUY, 2006). Essas substâncias também interagem de maneira independente de CB1 e CB2, através de outros GPCRs, canais iônicos e receptores de potencial transitório (MORALES et al., 2017).

Autorização sanitária para fabricação e importação

Os teores dos canabinoides THC e CBD são empregados para classificar a *Cannabis* como droga/maconha (*drug type*/*marijuana*) ou como fibra/cânhamo (*fyber type/hemp*). Em geral, variedades com teores de THC superiores ao de CBD são classificadas como maconha e sujeitas a maior controle devido à propriedades psicoativas do THC, enquanto variedades com teores de CBD superiores ao de THC (≤ 0,3%) são classificadas como *cânhamo* e permitidas na produção de fibras, suplementos alimentares e cosméticos (WORL DRUG REPORT, 2009).

No Brasil a importação e fabricação de extratos medicinais de *Cannabis* foi regulamentada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) através da RDC Nº 327/2019. Nesta regulamentação para fins da fabricação e comercialização de produto de *Cannabis*, a empresa deve importar o insumo farmacêutico nas formas de derivado vegetal, fitofármaco, a granel, ou produto industrializado. Não sendo permitida a importação da planta ou partes da planta de Cannabis spp. Porém, A RDC 66/2016 da ANVISA incluiu a autorização de importação para uso médico pessoal da planta *Cannabis sativa* L., partes da planta e de seus compostos, incluindo o THC. Desta forma, já

existem em território nacional muitas associações de pacientes com autorização para plantio pequeno da *Cannabis* e fabricação dos extratos.

Hoje também, existem medicamentos com registro em território brasileiro, como o medicamento Mevatyl®, indicado para controle da espasticidade na esclerose múltipla, constituído por extrato hidroalcoólico de *Cannabis sativa* L. contendo 27 mg mL^{-1} de THC e 25 mg mL^{-1} de CBD, além de outros canabinoides minoritários e terpenos. Devido ao teor mais alto de THC em relação ao CBD, este medicamento é contra-indicado para controle de convulsões e para pacientes menores de 18 anos.

Produção dos extratos

Os extratos medicinais de *Cannabis* são produzidos com as flores das espécimes pistiladas (fêmeas) (CARDOZO, 2019). Basicamente, a extração é classificada com extração sólido-líquido, pois as flores são a parte sólida e o extrato será constituído do solvente extrator.

Antes da extração, as amostras passam pelo processo de secagem, que pode ocorrer em estufas de circulação natural ou à vácuo e em liofizadores, que realizam o processo sem aquecimento. As amostras secas são então moídas e precede-se a extração.

Com relação a extração existem diversos métodos, uns clássicos, como hidrodestilação, extração por arraste de vapor, maceração, extração com gordura fria (enfleurage) e extração por Soxhlet, e outros mais modernos, como extração assistida por ultrassom, extração por fluído supercrítico, extração líquido pressurizada, extração assistida por microondas (NAHAR, 2021). A sofisticação dos métodos, acarreta em maiores aparatos, o que ocasiona também a elevação dos custos e, como vantagem, a maior eficiência de extração. Desta forma, a escolha de um método de extração deve ser uma decisão que leve em conta diversos fatores, como: quantidade do extrato a ser produzido, nível de pureza do extrato, estabilidade dos canabinoides durante a extração, custo e impacto ambiental. Dentre estes parâmetros de escolha, algumas variáveis são de grande relevância, pois influenciam mais de um desses fatores. Por exemplo, a temperatura de extração influencia tanto no custo da extração quanto na estabilidade das canabinoides, pois sabe-se que existem algumas interconversões causadas pela temperatura (HUESTIS, 2007). O tipo do solvente utilizado, também influenciará na eficiência de extração de determinados canabinoides, por afinidade química, quanto no impacto ambiental. O solvente mais comumente utilizado para extratos ricos em CBD é o etanol e as temperaturas de extração são abaixo de 100ºC. Rótulos dos produtos importados e de produtos de

produzidos por associações de pacientes, descrevem que o veículo mais empregado é o triglicerídeo de cadeia média (TCM), enquanto na preparação artesanal, a resina de *Cannabis* é geralmente dissolvida em óleos de oliva, de coco ou de girassol.

Controle de qualidade dos extratos

Qualquer controle de qualidade de extratos medicamentosos é realizado através de análises químicas dos seus constituintes e do veículo utilizado para o preparo. As análises englobam tanto a dosagem dos princípios ativos quanto a pureza do medicamento.

A RDC 327 diz que os extratos de *Cannabis* devem possuir qualidade farmacêutica para uso humano, e é a empresa que é responsável pela documentação técnica que comprove a qualidade do produto e também por ter condições operacionais para realizar as análises do controle de qualidade em território brasileiro, sendo que as mesmas podem ser terceirizadas.

Terceirizar o controle de qualidade é uma alternativa muito viável para médias e pequenas empresas, devido aos altos-custos dos equipamentos para dosagem. Além disso, para um laboratório analítico estar apto a realizar o controle, ele deve estar habilitado pela Rede Brasileira de Laboratórios Analíticos em Saúde (REBLAS), órgão controlado pela ANVISA. É um longo percurso para conseguir todos os critérios que são descritos na RDC Nº 390 (ANVISA, 2020) que trata da habilitação dos laboratórios, e são os seguintes: I - ser legalmente constituídos; II - possuir os equipamentos, infraestrutura, instalações e recursos humanos necessários para a realização dos ensaios analíticos do seu escopo de atuação; III - cumprir com as Boas Práticas para Laboratórios de Controle de Qualidade previstas na Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 11, de 16 de fevereiro de 2012, e nos regulamentos técnicos específicos de boas práticas de fabricação da categoria de produto analisado; IV - realizar autoavaliação anual para demonstrar o cumprimento dos requisitos técnicos estabelecidos na RDC nº 11, de 16 de fevereiro de 2012; V - possuir Responsável Técnico devidamente habilitado pelo Conselho de Classe Profissional; VI - possuir as licenças ambiental e do Corpo de Bombeiros e as demais licenças e autorizações exigidas pela legislação federal, distrital, estadual e municipal; e VII - possuir licença ou alvará sanitário vigente emitido por órgão da Vigilância Sanitária do Estado, Distrito Federal ou Município.

Pode-se perceber a dificuldade de pequenos e médios produtores, como as Associações de pacientes, para obter uma análise que certifique o controle de qualidade de seus produtos, e também dos laboratórios para serem credenciados. Devido as recentes regulamentações, datadas de 2019 (RDC

327) e 2020 (RDC 11), ainda são escassos os laboratórios credenciados que realizam análise de canabinoides em território brasileiro.

Métodos de dosagem dos canabinoides

Em geral, os métodos de dosagem envolvem dois procedimentos, o preparo da amostra e a dosagem em si (Skoog et al. 2009). O preparo de amostra diz respeito a abertura da amostra, ou seja, purificá-la ou transformá-la de modo que o analito de interesse torne-se dosável, sem que haja nenhuma impureza ou interferente que prejudique a dosagem. Já a dosagem é a técnica na qual será aplicada para ientificar e quantificar o analio. Esta última envolve os métodos analíticos instrumentais, e no caso de fármacos ou extratos medicinais, o método mais empregado é a cromatografia. Contudo, todo o procedimento, desde a abertura até a dosagem, deve ser validado para que os resultados sejam garantidos. O INMETRO é o órgão que publica as orientações a serem seguidas para a validação de um método análito (INMETRO, 2020), sendo que estas orientações seguem normas internacionais de análise. Assim, toda metodologia de dosagem implementada num laboratório, para que os resultados sejam garantidos, deve seguir previamente a validação com os seguintes parâmetros de desempenho: Seletividade, linearidade / faixa de trabalho / faixa linear de trabalho / sensibilidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), efeito de matriz, tendência/recuperação, precisão (repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade) e robustez.

No caso dos extratos de *Cannabis* temos dois tipos de amostras, a primeira com grau de pureza elevada, produzida por indústrias farmacêuticas, e amostras mais complexas ou impuras, produzidas pelas associações de pacientes de uma forma mais rudimentar. Ambas as amostras contém THC ou CBD na ordem de miligramas. Para que os canabinóides sejam dosados, devemos ter conhecimento do veículo utilizado, e proceder com a abertura da amostra, que no caso será uma diluiçao e filtração em filtros para cromatografia líquida de 22 µm. A técnica mais empregada na literatura para a dosagem de cannabinoides em extratos é a a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector diodarry (CLAE-DAD), pois muitos dos cannabinoides são termolábeis não podendo ser empregados na cromatografia em fase gasosa (NAHAR et al., 2019). Os métodos validados apresentam ótimos limites de detecção e quantificação, vairiando de 0,3 a 0,5 µg mL^{-1}, e de 1 a 10 µg mL^{-1}, respectivamente (HÄDENER et al., 2019).

Contudo, o desafio analítio aumenta quando se trata de amostras biológicas como o sangue, pois além de conter muitos compostos que podem interferir, a concentração sanguínea é muito menor que nos extratos, na ordem de nanogramas por mililitros. Nesta ordem de grandeza quantitativa os

canabinoides devem ser analisados por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas, técnica capaz de atingir dosagens em (partes por bilhão) e ppt (partes por trilhão). Todavia, a abertura da amostra além da etapa de purificação dos canabinoides do sangue (matriz complexa), deve-se transformá-los em moléculas voláteis para ser analisado por cromatografia em fase gasosa. Um método publicado recente, utilizou cartuchos de purificação do tipo PhreeTM phospholipid para a remoção dos fosfolipídeos do sangue, mas existem outros descritos na literatura (PALLAZOLI et al., 2018). A etapa de transformação dos canabinoides em moléculas voláteis, consiste em transformá-los em ésteres através da reação de derivatização em meio ácido ou básico (FOLTZ, MCGINNIS e CHINN, 1983; HUESTIS e HENNINGFIELD, 1992). Após estas etapas, as amostras são levadas para análise no cromatógrafo em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), detector este capaz de identificar moléculas.

Desafios científicos

O laboratório de cromatografia da UNILA é equipado, desde 2016, com 6 cromatógrafos, incluindo um CLAE-DAD e um CG-EM. Sendo assim, possui os requisitos mais custosos para a implementação das metodologias de análise em questão. Desta maneira, a criação de novos projetos para a utilização dos equipamentos e também a criação de novas linhas de pesquisa, como o projeto em questão, promovem a sustentabilidade científica, tecnológica e de inovação da unidade. Além disso, a equipe conta com profissionais de diversas áreas que possuem conhecimento especializado na temática.

Outra questão a ser considerada é que muitos métodos descritos na literatura, não são completos, faltam informações ou não são reprodutíveis, requerendo então pesquisas para a criação de adaptações, o que demanda tempo e recursos.

Ademais, o projeto em questão promoverá a criação de elos com empresas privadas, o que poderá garantir, através de recursos de prestação de serviços, a manutenção e bom funcionamento dos equipamentos de grande porte.

JUSTIFICATIVA

A maior parte dos medicamentos e outras substâncias químicas, quando administradas ao organismo, sofrem processos de absorção, distribuição, metabolização e eliminação (FAN e LANNOY, 2013; BUXTON, 2018). A distribuição se refere ao momento que os fármacos estão na cirulação sanguínea sistêmica e então são capazes de atingir os tecidos e células alvo, induzindo o efeito farmacológico pretendido. Ou seja, toda vez que um medicamento é ingerido, vários sistemas e órgãos são atingidos com o objetivo de receber o efeito farmacológico (FAN e LANNOY, 2013). Desta forma, saber de fato a concentração do fármaco me medicamento administrado e no sangue é essencial para prever os efeitos terapêuticos e adversos de qualquer droga. No caso dos fitocanabinoides, ainda são pouquíssimos os laboratórios no mundo que dominam a tecnologia e protocolo para esta dosagem. Pois, a matriz biológica sangue, que possui inúmeras substâncias como proteínas, enzimas e outros, é um fator complicador para a fácil leitura dos níveis de fármacos. Portanto, o conhecimento detalhado dos níveis e concentrações de fitocanabinoides na circulação sanguínea pode proporcionar um direcionamento específico para a prescrição, previsão de efeitos e cuidados que cada paciente que toma estes medicamentos necessita. Ademais, entender as possíveis associações destas concentrações com doses e eficácia de cada fitocanabinoide permitirá um tratamento especializado e individual a determinada população ou até mesmo adeterminados pacientes, isto é, otimizando a eficácia e reduzindo efeitos colaterais com o melhor custo-benefício clínico e econômico. Além disso, no que se refere à pesquisa acadêmica, a padronização destas dosagens eleva em muito a qualidade e o impacto de publicações científicas de nosso grupo de pesquisa da UNILA.

A cooperação da Associação Medicinal AME-C se dará através da doação de seus extratos, produzidos na própria empresa. Ressalta-se aqui que já existe uma parceria através de convênio entre a AME-C e a UNILA, para a dosagem de seus extratos. Sendo assim, ressalta a aplicação social prática do projeto.

Como pode ser compreendido através da revisão bibliográfica, o projeto caracteriza-se como interdisciplinar, pois requer a atuação das áreas de química, farmácia, medicina e biologia. A área da química, especificamente a química analítica, detém a expetise de dosagem e técnicas de análise. A farmácia possui todo o conhecimento farmacológico de medicamentos e a medicina a parte clínica. A biologia, por sua vez, com a identificação molecular de espécies e variabilidade genética interespecífica, permiti relacionar genótipo e ambiente para alcançar melhor produtividade ou as características medicinais desejadas.

O projeto em questão subsidiará a impletamentação dessas metodologias de dosagem

dos fitocabinóides na UNILA. A faixa etária escolhida leva em consideração tanto as diferentes áreas da equipe envolvida e também os altos custos dos insumos a serem utilizados.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Validar e implementar no laboratorio de cromatografia da UNILA as metodologias de análise de canabinoides em extratos de *Cannabis* e no sagune de pacientes em terapia canábica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Solicitar a autorização junto a ANVISA para estudos com *Cannabis*;
- Validar a metodologia de dosagem de canabinoides nos extratos de *Cannabis* por CLAE-DAD;
- Testar e comparar diferentes metodologias para análise de canabinoides no sangue por CG-EM;
- Validar a metodologia de dosagem de canabinoides no sangue por CG-EM;
- Criar protocólos de análises para a dosagem de canabinoides nos extratos de *Cannabis* e no sangue;

METODOLOGIA

Amostras de extratos de Cannabis

As amostras de extratos serão obitidas em Associações de pacientes e com pacientes que utilizam extratos industrializados, por meio de doações.

Amostras de sangue

As amostras de sangue serão coletadas externamente ao laboratório de Cromatografia da UNILA, em cooperação com outros de pesquisa, como o projeto "Investigação clínica com microdoses de canabinóides para tratamento da Doença de Alzheimer" (Aprovado pelo CEP UNIOESTE sob número CAAE: 09713219.9.0000.0107 e registrado na Unila sob numero:

PIB2229-2019). O descarte do material biológico após uso para análise será através de autoclavagem seguida de descarte junto ao material biológico descartado pelo procedimento operacional padrão do HMPGL de acordo com as normas da resolução CNS No 441/2011 item 2.IV. Todas estas informações também constam no TCLE com uma linguagem não técnica.

Análise de THC e CBD no extrato

As amostras de extratos ou óleo serão preparadas de acordo com Burnier et al. (2019). Resumidamente, para cada 100 mg do extrato, serão acrescentados 5,0 mL de etanol (P.A.) em um tubo cônico tipo Falcon de 15 mL. A mistura será submetida a 1 minuto em agitador tipo vortex, em seguida sonicada por 15 minutos e então, centrifugada por 1 minuto a 3000 rpm. O sobrenadante será filtrado em filtro PTFE hidrofílico 0,22 µm, e uma alíquota diluída a 1:5 em acetonitrila será analisado por cromatografia líquida de alta eficiente acoplado ao detector diod-array (CLAE-DAD) nas condições cromatográficas descritas por Burnier et al. (2019). Outras metodologias podem ser testadas, dependendo do bom desempenho (limite de quantificação e limite de detecção) do método.

Análise de THC, CBD e metabólitos no sangue

Duas metodologias serão inicialmente testadas e combinadas. A primeira consiste na metodologia de Foltz et al. (1983) que faz a derivatização, porém, não faz a purificação de fosfolipídeos. Em tubos de PTFE de 10 mL são adicionados 1 mL de sangue total e 100 µL de etanol. O tubo é agitado em vortex por 10 s e, em seguida, deixado equilibrar por 1h a 4 ºC. Ao tubo adiciona-se também 2 mL de acetonitrila e imediatamente procede-se com agitação em vórtex por 30 s. As fases sólida e líquida são separadas por centrifugação em 2.000 rpm e o sobrenadante é transferido para outro tubo. O volume do sobrenadante é reduzido para 1 mL, e adiciona-se 1 mL de NaOH 0,2 N e 2 mL de solução de hexano:acetato de etila (9:1 v / v). A mistura é agitada por 30 min em shaker. Após centrifugação por 5 min a fase orgânica, contendo compostos neutros e básicos, é transferida para um tubo de cultura e será utilizado para determinação de THC e 11-OH-THC. A fase aquosa básica contém os compostos ácidos e é usada para a dosagem do THC-COOH.

A fracção contendo compostos neutros e básico são adicionados 2 mL de HCl 0,1N. Depois o tubo é agitado por 15 min em shaker e as fases separadas por centrifugação. A fase orgânica é transferida para um tubo de evaporação cônico com rolha de vidro (12 ml). O extrato orgânico é evaporado até a secura.

A derivatização é realizada pela adição de 100 µL de clorofórmio e 100 µl de trifluoroacético anidro. O tubo é agitado em vortex por cerca de 10 s e, em seguida, aquecido a 70 ºC por 10 min. A mistura de reação é resfriada a menos de 50 °C e em seguida, evapora-se até a secura. O resíduo é reconstituído em 20 µL n-heptano e levada para o CG-EM.

À fração contendo o THC-COOH é acidificada com 1mL de HCl 1N e extraída por agitação com 2 ml de solução de hexano:acetato de etila (9:1v/v) por 30 min. O tubo é centrifugado, a fase orgânica é transferida para um tubo de evaporação cônico com rolha de vidro e o solvente é removido por evaporação. A derivatização é realizada por um processo de duas etapas. Após a adição de 200 µL de solução BF_3:metanol (14% p/v), o tubo é agitado em vórtex e aquecido a 70 ºC por 10 min. O tubo é então deixado resfriar por 5 minutos antes da adição de 1 mL de água ultrapura e 2 mL de hexano. O tubo é agitado por 15 min e centrifugado, e a fase orgânica é transferida para outro tubo, onde se procede a evaporação do solvente até secura. O resíduo é ressuspendido em 100 µL de clorofórmio e 100 µl de trifluoroacético anidro. O tubo é agitado em vórtex por 10s e aquecido a 70 ºC por 10 min. A mistura de reação é resfriada a menos de 50 ºC, evaporada até a secura. O resíduo é reconstituído em 20 µL n-heptano e levada para o CG-EM.

A segunda metodologia é a de Palazzoli et al. (2018) que não realiza a derivatização, pois analisa as amostras por CLAE-DAD. Resumidamente, uma 200 µL de sangue será transferido para tubos tipo Falcon de 1,5 mL, em seguida será adicionado 900 µL de solução 0,1% (v/v) de ácido fórmico em acetronitrila:metanol (70:30 v/v) e 20 µL de solução de padrão interno. Os tubos serão submetidos a 1,3 minutos em agitador tipo vortex, em seguida centrifugados por 7 min a 6000 rpm. O sobrenadante será coletado e aplicado em tubos tipo Phree™ para remoção de fosfolípidos. O extrato obtido será evaporado até secar sob nitrogênio a 55 ◦C. O resíduo será ressuspendido em 150 µL de solução 2,0 mM acetato de amônio aquoso: acetonitrila (70:30, v/v).

Outras metodologias poderão ser testadas, dependendo do desempenho da combinação das duas mencionadas.

Validação dos métodos

Toda a metodologia será validada seguindo as instruções do INMETRO (2020). Os seguintes parâmetros de desempenho serão realizados: Seletividade, linearidade / faixa de trabalho / faixa linear de trabalho / sensibilidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), efeito de matriz, tendência/recuperação, precisão (repetibilidade e reprodutibilidade) e robustez.

Análise estatística

Os dados resultantes da validação serão avaliados segundo os critérios do INMETRO (2020)

com os seguintes testes de comparação de resultados: Teste de normalidade, teste F de variância, teste t-Student. O software Action-Stat será utilizado (licença privada).

CRONOGRAMA

Primeiro ano												
Ano	2021/2022											
Atividades	Dezembro	Janeiro	Fevereiro	Março	Abril	Maio	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro
Aquisição dos insumos												
Validação do método de dosagem nos extratos												
Análise dos resultados												
Obtenção da autorização para estudos												
Revisão bibliográfica												
Segundo ano												
Ano	2022/2023 (2o ano)											
Atividades	Dezembro	Janeiro	Fevereiro	Março	Abril	Maio	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro
Revisão bibliográfica												
Aquisição dos insumos												
Validação do método de dosagem nos extratos												
Análise dos resultados												
Aplicação do método de dosagem em extratos reais												
Terceiro ano												
Ano	2023/2024											
Atividades	Dezembro	Janeiro	Fevereiro	Março	Abril	Maio	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro
Revisão bibliográfica												
Aplicação do método de dosagem em sangue												
Divulgação dos resultados (congresso)												
Elaboração de artigo científico												
Elaboração do relatório final e prestação de contas												

REFERÊNCIAS

Agurell S, Halldin M, Lindgren JE, Ohlsson A, Widman M, Gillespie H, Hollister L. Pharmacokinetics and metabolism of delta 1-tetrahydrocannabinol and other cannabinoids with emphasis on man. *Pharmacol. Rev*. 1986;38(1):21-43.

Agurell S, Leander K. Stability, transfer and absorption of cannabinoid constituents of cannabis (hashish) during smoking. *Acta Pharm Suec*. 1971 Sep;8(4):391-402.

ANVISA, Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº 11, de 16 de fevereiro de 2012. *Dispõe sobre o funcionamento de laboratórios analíticos que realizam análises em produtos sujeitos à Vigilância Sanitária e dá outras providências.*

ANVISA, Resolução de Diretoria Colegiada - RDC Nº 390, de 26 de maio de 2020. *Estabelece critérios, requisitos e procedimentospara o funcionamento, a habilitação na Reblas e o credenciamento de laboratórios analíticos que realizam análises em produtos sujeitos ao regime de vigilância sanitária e dá outras providências.*

ANVISA, Resolução de Diretoria Colegiada – RDC Nº º 237, de 9 de dezembro de 2019. *Dispõe sobre os procedimentos para a concessão da Autorização Sanitária para a fabricação e a a importação, bemcomo estabelece requisitos para a comercialização, prescrição, a dispensação, o monitoramento e a fiscalização de produtos de Cannabis para fins medicinais, e dá outras providências.*

Azorlosa L, Heishman SJ, Stitzer ML, Mahaffey JM. Marijuana smoking: effect of varying delta 9-tetrahydrocannabinol content and number of puffs. *J Pharmacol Exp Ther*. 1992;261(1):114-22.

Berman P, Futoran K, Lewitus GM, Mukha D, Benami M, Shlomi T, Meiri D. A new ESI-LC/MS approach for comprehensive metabolic profiling of phytocannabinoids in Cannabis *Scientific Reports*. 2018;8:14280.

Bilkei-Gorzo A, Albayram O, Draffehn A, Michel K, Piyanova A, Oppenheimer H, et al. A chronic low dose of Δ9-tetrahydrocannabinol (THC) restores cognitive function in old mice. *Nat Med*. 2017;23(6):782–7.

Burnier C, Esseiva P, Roussel C. Quantification of THC in Cannabis plants by fast-HPLC-DAD: A promising method for routine analyses. Talanta, 192 (2019) 135–141.

Buxton ILO. Pharmacokynetics: The dynamics of Drug Absorption, Distribution, Metabolism and Elimination. In Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics 13th Ed.2018 McGrawHill Education.

Cami J, Guerra D, Ugena B, Segura J, de La Torre R. Effect of subject expectancy on the THC intoxication and disposition from smoked hashish cigarettes. *Pharmacol Biochem Behav*. 1991

Sep;40(1):115-9.
Cardozo Junior EL. Tecnologias de extração, Fórum: canabidiol como medicamento ciência, tecnologia e regulamentação, 2019. (cienciasfarmaceuticas.org.br)
Cristino L, Bisogno T, Di Marzo V. Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. *Nat Rev Neurol*. 2020;16(1):9–29.
De Petrocellis L. *et al*. Effects Of cannabinoids and cannabinoid-enriched Cannabis extracts on TRP Channels and endocannabinoid metabolic enzymes. *Br J Pharmacol.* 2011;163(7):1479-94.
Di Marzo V, Bifulco M, De Petrocellis L. The Endocannabinoid System and Its Therapeutic Explotation. *Nat Rev Drug Discov*. 2004 Sep;3(9):771-84.
Fan J, Lannoy IAM. Pharmacokynetics. *Biochem Pharmacol.* 2014;87(1):93-120.
Foltz RL, McGinnis KM, Chinn, DM. Quantitative Measurement of A'-Tetrahydrocannabinol and Two Major Metabolites in Physiological Specimens Using Capillary Column Gas Chromatography Negative Ion Chemical Ionization Mass Spectrometry. Biomed Mass Spectrom. 1983;10(5):316-23.
Grundy RI. The therapeutic potential of the cannabinoids in neuroprotection. *Expert Opin Investig Drugs*. 2002;11(10):1365–74.
Hädener M, König S, Weinmann W. Quantitative determination of CBD and THC and their acid precursors in confiscated cannabis samples by HPLC-DAD. *Forensic Sci Int*. 2019; 299:142-150.
Hanuš, LO, Meyer SM, Muñoz E, Taglialatela-Scafati O, Appendino G. Phytocannabinoids: a unified critical inventory. *Nat.Prod. Rep.* 2016;33:1357–1392.
Heishman SJ, Stitzer ML, Yingling JE, Pharmacol. Effects of tetrahydrocannabinol content on marijuana smoking behavior, subjective reports, and performance. Pharmacol Biochem Behav. 1989 Sep;34(1):173-9.
Howlett AC. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of Cannabinoid Receptors. *Pharmacol Rev*. 2002 Jun 1;54(2):161–202.
Huestis MA, Henningfield JE, Cone EJ. Blood cannabinoids. I. Absorption of THC and formation of 11-OH-THC and THC-COOH during and after smoking marijuana. *J Anal Toxicol*. 1992;16:276–82.
Huestis MA. Human Cannabinoid Pharmacokinetics. In CHEMISTRY & BIODIVERSITY – Vol. 4 (2007), 1770-1804.
Huestis MA. Pharmacokinetics and metabolism of the plant cannabinoids, delta-9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and cannabinol. In: Pertwee RG, ed. Handbook of experimental pharmacology, vol. 168. New York: Springer; 2005:657–90.
INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia. Orientação sobre validação de métodos de ensaios

químicos. DOQ-CGCRE-008, revisão 08, 2020.

Kim KR, Yoon HR. Rapid screening for acidic non-steroidal anti-inflammatory drugs in urine by gas chromatography-mass spectrometry in the selected-ion monitoring mode. *J Chromatogr B Biomed Appl*. 1996;682(1):55-66.

Laprairie RB, Bagher AM, Kelly ME, Denovan-Wright, EM. Cannabidiol is a negative allosteric modulator of the cannabinoid CB1 receptor. *Br. J. Pharmacol*. 2015;172(20):4790-4805.

Lucas CJ, Galettis P, Schneider J. The phamarcokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids. *Br J Clin Pharmacol.* 2018;84(11):2477-2482.

Martin BR, Mechoulam R, Razdan RK. Discovery and characterization of endogenous cannabinoids. *Life Sci*. 1999;65(6–7):573–95.

Matsuda LA, Bonner TI, Lolait SJ. Localization of cannabinoid receptor mRNA in ratbrain. *J Comp Neurol.* 1993 Jan 22;327(4):535-50.

Mechoulam R, Hanus LA. A historical overview of chemical research on cannabinoids. *Chem Phys Lipids.* 2000;108(1-2):1-13.

Mechoulam R, Hanuš LO, Pertwee R, Howlett AC. Early phytocannabinoid chemistry to endocannabinoids and beyond. *Nat Rev Neurosci*. 2014;15(11):757–64.

Mechoulam R. The phamacohistory of Cannabis sativa 1986. Cannabinoids as TherapeuticAgents, Ed. Mechoulam, R. pp. 1-19. Boca Raton FL:CRC Press.

Morales P, Hurst DP, Reggio PH. Molecular targets of the Phytocannabinoids: AComplex Picture. *Prog Chem Org Nat Prod.* 2017;103:103-131.

Nahar L,; Uddin SJ Alam MA, Sarker SD. Ultrasound-Assisted Extraction of Cannabinoids from Cannabis Sativa L. Optimized by Response Surface Methodology. *Phytochem Anal*. 2021;32:228–241.

Ohlsson A, Agurell S, Londgren JE, Gillespie HK, Hollister LE. In Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Psychoactive DrugsJ, Eds. G. Barnett, C.N. Chiang, Mosby Yearbook, St. Louis, 1985, p. 75.

Ohlsson A, Lindgren JE, Wahlen A, Agurell S, Hollister LE, Gillespie HK. Single dose kinetics of deuterium labelled delta 1-tetrahydrocannabinol in heavy and light cannabis users. *Biomed Mass Spectrom*. 1982;9(1):6-10.

Ohlsson A, Lindgren JE, Wahlen A, Agurell S, Hollister LE, Gillespie HK. Plasma delta-9 tetrahydrocannabinol concentrations and clinical effects after oral and intravenous administration and smoking. *Clin Pharmacol Ther*. 1980;28(3):409-16.

Palazzoli F, Citti C, Licata M, Vilella A, Manca L, Zoli M, Vandelli MA, Forni F, Cannazza G.

Development of a simple and sensitive liquid chromatography triple quadrupole mass spectrometry (LC–MS/MS) method for the determination of cannabidiol (CBD), 9-tetrahydrocannabinol (THC) and its metabolites in rat whole blood after oral administration of a single high dose of CBD. *J Pharma Biomed*, 2018;150:25–32.

Perez-Reyes M. Marijuana smoking: factors that influence the bioavailability of tetrahydrocannabinol. NIDA Res. Monograph 1990;99:42-62.

Pertwee RG. Endocannabinoids and their pharmacological actions. *Handbook of Experimental Pharmacology* 2015 231:1-37. Springer.

Pertwee RG. Endocannabinoids. Pertwee RG, editor. Endocannabinoids. Cham: Springer International Publishing; 2015. 1–472 p. (Handbook of Experimental Pharmacology; vol. 231).

Pertwee RG. The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: Δ9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and Δ9-tetrahydrocannabivarin. *Br J Pharmacol*. 2008;153(2):199–215.

Russo E, Guy GW. A tale of two cannabinoids: The therapeutic rationale for combining tetrahydrocannabinol and cannabidiol. *Med Hypotheses.* 2006;66(2):234–46.

Russo EB. Clinical endocannabinoid deficiency (CECD): Can this concept explain therapeuthic benefits of Cannabis in migraine, fibromyalgia, irritabel bowel syndrome and other treatment-resistant conditions. *Neuroendocrinol Lett*. 2004;25(1):31–9.

Saito VM, Wotjak CT, Moreira FA. Exploração farmacológica do sistema endocanabinolde: Novas perspectivas para o tratamento de transtornos de ansiedade e depressão? *Rev Bras Psiquiatr*. 2010;32(SUPPL. 1):7–14.

Skoog DA, West DM, Holler FJ, Crouch SR. Fundamentos de Química Analítica. 8ª ed., 2009. Cengage Learning.

Sugiura T, Waku K. 2-Arachidonoylglycerol and the cannabinoid receptors. *Chem Phys Lipids*. 2000;108(1–2):89–106.

Sugiura T, Waku K. Cannabinoid Receptors and Their Endogenous Ligands. *J Biochem*. 2002 ;132(1):7–12.

Toennes SW, Ramaekers JG, Theunissen EL, Moeller MR, Kauert GF. Comparison of cannabinoid pharmacokinetic properties in occasional and heavy users smoking a marijuana or placebo joint. *J Anal Toxicol.* 2008;32:470–7.

Turner SE, Williams CM, Iversen L, Whalley BJ. Molecular Pharmacology of Phytocannabinoids. Vol. 103, Progress in the chemistry of organic natural products. 2017. 61–101 p.

Wiley JL, Owens RA, Lichtman AH. Discriminative Stimulus Properties of Phytocannabinoids, Endocannabinoids, and Synthetic Cannabinoids. *Curr Top Behav Neurosci.* 2018;39:153-173.

World Drug Report, United Nations Office on Drugs and Crimes. United Nations: New York, 2009.
Zuardi AW. History of cannabis as a medicine: A review. *Rev Bras Psiquiatr*. 2006;28(2):153–7.

PROPOSTA DE EXECUÇÃO FINANCEIRA (ANEXO IV)

EDITAL IMEA 03/2021

Nome do projeto de pesquisa/estudo:	Dosagem de fitocanabinoides em extratos medicinais de Cannabis e no sangue de pacient à terapia canábica.
Áreas de conhecimento envolvidas:	Ciências Exatas e da Terra, Ciências Biológicas e Ciências da Saúde

Categoria de Item Financiável		**Especificação/descrição do item financiável**	**Quantidade**	**Valor Unitário (R$)**
CUSTEIO				
I	Materiais de consumo.	Padrões analíticos de canabinoides	10	R$ 1.000,00
		Cartuchos para purificação de sangue	4	R$ 500,00
		Reagentes para derivativação	4	R$ 200,00
		Vials para injeção nos cromatógrafos	4	R$ 200,00
		Ácido trifluoroacético grau HPLC	1	R$ 4.000,00
		Cloroformio grau HPLC	4	R$ 500,00
		Filtros de purificação para HPLC	4	R$ 300,00
		Acetonitrila grau HPLC	8	R$ 300,00
		Acetato de metila grau HPLC	8	R$ 200,00
II	Pagamento de serviços de terceiros.			
	Serviços de tradução, revisão e taxa de	Tradução de artigo científico	1	R$ 2.200,00

III	publicação de artigos em periódicos indexados, com classificação Qualis igual ou superior a B1, produto de pesquisas e/ou estudos fomentados por este edital			
IV	Licença/taxa de acesso a publicações eletrônicas, consideradas como custeio, desde que não contemplados no portal de periódicos da CAPES ou base de dados na qual a UNILA tem acesso.	Licença junto a ANVISA para estudos com Cannabis	1	R$ 3.000,00
V	Material de consumo, componentes e/ou peças de reposição de equipamentos, classificados como material de consumo pela UNILA.			
VI	Despesas com passagens, deslocamento interurbano e auxílio de viagem para apresentação de trabalhos em eventos acadêmicos nacionais e internacionais do coordenador do projeto. Ou vinda de pesquisador para apoiar projeto.			
VII	Insumos para instalação, recuperação e manutenção de pequena ou grande monta em equipamentos;			

				TOTAL CUSTEIO:

:es submetidos

Valor Total (R$)
R$ 10.000,00
R$ 2.000,00
R$ 800,00
R$ 800,00
R$ 4.000,00
R$ 2.000,00
R$ 1.200,00
R$ 2.400,00
R$ 1.600,00
R$ 0,00
R$ 0,00
R$ 0,00
R$ 0,00
R$ 0,00
R$ 0,00
R$ 0,00
R$ 2.200,00
R$ 0,00

R$ 0,00
R$ 0,00
R$ 0,00
R$ 0,00
R$ 0,00
R$ 3.000,00
R$ 0,00
R$ 0,00
R$ 0,00
R$ 0,00
R$ 0,00
R$ 0,00
R$ 0,00
R$ 0,00
R$ 0,00
R$ 0,00
R$ 0,00
R$ 0,00
R$ 0,00
R$ 0,00
R$ 0,00
R$ 0,00
R$ 0,00
R$ 0,00
R$ 0,00
R$ 0,00
R$ 0,00
R$ 0,00
R$ 0,00
R$ 0,00
R$ 0,00
R$ 0,00

R$ 0,00
R$ 30.000,00