

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia e Análises Toxicológicas

DETERMINAÇÃO DOS TEORES
DE Δ^9 -TETRAIDROCANABINOL EM AMOSTRAS DE *Cannabis*
***sativa* L. POR MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA E**
CROMATOGRAFIA GASOSA/ESPECTROMETRIA DE MASSA

JADSON OLIVEIRA DA SILVA

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. OVANDIR ALVES SILVA

São Paulo
2003

À Deus,

Pelas inúmeras manifestações de seu amor e zelo de Pai Divino.

À minha mãe, D. Olga Pinheiro de Oliveira,
pelos ensinamentos, amor e dedicação
dispensados desde sempre e
que são alicerces fundamentais para minha vida.

Ao meu pai, **Carmélio Ferreira da Silva**,
e ao meu irmão, **Robson Oliveira da Silva**,
pela "torcida" e satisfação manifestados a cada conquista.

À minha irmã, **Normélia Oliveira da Silva**,
exemplo de superação, fé e tenacidade,
pelo amor, carinho e apoio sem os quais nada disto seria possível.

Ao meu irmão, Paulo Sérgio Oliveira da Silva, *in memoriam*,

que eu tenho certeza estar com aquele
seu inconfundível sorriso neste momento.

À uma verdadeira amiga e também,
pelos acasos do Universo, esposa, **Cláudia Maria de Barros**,
pela compreensão, colaboração e
apoio carinhosos e decisivos neste e em vários
outros passos de minha vida.

"Eu te amo!".

Aos meus filhos, **Pedro e Júlia**,
que com tão pouca idade entenderam a importância deste trabalho para mim,
contribuindo, cada um a seu modo, para a execução do mesmo.

"Meus filhos eu os amo muito!".

Ao Professor Dr. **Ovandır Alves Silva**,
pela orientação, ensinamentos transmitidos
do transcorrer deste convívio profissional.

AGRADECIMENTOS

Aos amigos e colegas do Programa de Pós Graduação em Toxicologia e Análises toxicológicas, apoios mútuos em muitos momentos.

Ao **Maurício Yonamine**, pelas valiosas orientações durante o desenvolvimento deste trabalho e pela serenidade com a qual conduz seus passos.

À Professora Dra. **Regina Lúcia de Moraes Moreau**, pelo apoio profissional e incentivo em cada passo conquistado durante este trabalho.

Aos funcionários e amigos do **Laboratório de Toxicologia (LAT)** da Universidade de São Paulo.

Aos funcionários e peritos do **Instituto de Criminalística** do Estado de São Paulo pelo importante apoio.

Ao Centro de Estudos, Análises e Pesquisas (CEAP), na figura de seu Diretor, o Dr. **Oswaldo Negrini**, pela parceria que possibilitou a realização deste trabalho.

À **Universidade Metodista de Piracicaba – UNIMEP**, pelo apoio formal através de seu Fundo de Apoio a Capacitação Docente.

Aos professores com os quais convivi e que muito contribuíram para o meu crescimento profissional e humanístico.

A todos aqueles que de maneira direta ou indireta contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

CONTEÚDO

1. INTRODUÇÃO	01
2. GENERALIDADES DA <i>Cannabis sativa</i> L.....	08
2.1 DENOMINAÇÕES ATRIBUÍDAS A CANNABIS.....	09
2.2 HISTÓRICO DE USOS MEDICINAIS.....	10
2.3 CANNABIS E CANABINÓIDES.....	11
2.4 TOXICODINÂMICA.....	21
2.4.1 Receptores canabinóides.....	27
2.5 TOXICOCINÉTICA.....	32
2.6 ASPECTOS ANALÍTICOS.....	35
2.6.1 Microextração em Fase Sólida (SPME).....	38
3. OBJETIVO E PLANO DE TRABALHO.....	41
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
4.1. MATERIAIS.....	42
4.1.1 Equipamentos e acessórios.....	42
4.1.2 Soluções e reagentes.....	43
4.1.3 Amostras de <i>Cannabis sativa</i> L. (maconha).....	43
4.2 MÉTODOS.....	44
4.2.1 Padronização do Método.....	44
4.2.1.1 Escolha da quantidade de amostra.....	44
4.2.1.2 Escolha da temperatura.....	45

4.2.1.3	Escolha do tempo de pré-tratamento.....	45
4.2.2	Validação do Método.....	46
4.2.2.1	Limite de detecção	46
4.2.2.2	Limite de quantificação.....	47
4.2.2.3	Avaliação linearidade do ensaio.....	47
4.2.2.4	Precisão intra-ensaio e interensaio	48
4.2.3	Extração, identificação e quantificação do Δ^9 -THC	50
4.2.4	Cromatografia em fase gasosa/Espectrometria de massa (GC/MS)...	50
4.2.5	Aplicação do método proposto em amostras de maconha.....	51
5.	RESULTADOS.....	52
5.1	PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO.....	52
5.1.1	Escolha da quantidade de amostra	52
5.1.2	Escolha da temperatura de extração.....	52
5.1.3	Escolha do tempo de aquecimento	53
5.2	VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	54
5.2.1	Avaliação do Limite de detecção	54
5.2.2	Avaliação do Limite de quantificação	54
5.2.3	Avaliação linearidade do ensaio.....	54
5.2.4	Avaliação da precisão Intra e interensaio.....	55
5.2.5	Quantificação do Δ^9 -THC nas amostras de maconha	56
6.	DISCUSSÃO.....	57
7.	CONCLUSÕES	65

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
9. ANEXOS	79

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Esquemas de nomenclaturas para os canabinóides	13
FIGURA 2	Apresentações do medicamento MARINOL®	24
FIGURA 3	Precursor canabinóide.....	30
FIGURA 4	Agonista Canabinóide.....	30
FIGURA 5	Antagonistas canabinóides.....	31
FIGURA 6	Biotransformação Δ^9 -THC.....	34
FIGURA 7	Esquema da microextração em fase sólida.....	40

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Propriedades físico-químicas do Δ^9 -Tetraidrocanabinol08
TABELA 2	Formas de apresentação dos produtos de <i>Cannabis</i> , teor aproximado de Δ^9 -THC e modo de uso da droga.....15
TABELA 3	Ações dos principais componentes da maconha e anandamida sobre receptores canabinóides tipo 1 (CB1) e receptores canabinóides tipo 2 (CB2)..... 29
TABELA 4	Teores de Δ^9 -Tetraidrocanabinol nas amostras analisadas (% de Δ^9 -THC)56

Resumo

Cannabis sativa, denominada também como “maconha”, é uma planta cultivada em vários países em torno do mundo, principalmente em regiões de clima tropical e temperado, incluindo o Brasil. Aproximadamente 60 canabinóides são encontrados nos produtos da *Cannabis*, sendo o Δ^9 -tetraidrocanabinol (Δ^9 -THC) o seu principal composto psicoativo. Trabalhos já realizados mostram grande variação nos conteúdos de Δ^9 -THC em amostras de *Cannabis sativa*. No presente estudo, foi desenvolvido um método para extração e quantificação de Δ^9 -tetraidrocanabinol em amostras de maconha por microextração em fase sólida (SPME) e cromatografia em fase gasosa/espectrometria de massa (CG/EM). Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram 0,05 e 0,15%, respectivamente. O método mostrou ser altamente preciso (coeficiente de variação < 8%) e linear para as faixas propostas (0,15 a 5,0%). O método foi aplicado em amostras de maconha apreendidas em São Paulo (n=28), que revelaram teores de Δ^9 -THC inferiores a 1.55%.

SUMMARY

Cannabis sativa, the source of marijuana, is cultivated in various countries all over the world, mainly in tropical and temperate regions including Brazil. Approximately 60 cannabinoids are found in *Cannabis* products, being the Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) the main psychoactive compound. In the scientific literature, reports show great variation among the Δ^9 -THC contents in marijuana. In the present work, a rapid and simple method was developed aiming at the extraction and determination of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) contents in marijuana samples by solid phase microextraction (SPME) and gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). The obtained limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) for THC content in marijuana samples were 0.05 and 0.15% respectively. The method showed to be highly precise (coefficient of variation < 8%) and linear for the proposed range (0.15 to 5%). Marijuana samples seized in São Paulo (n=28) were submitted to the method for the determination of their Δ^9 -THC contents. The contents of the analysed samples were under 1,55%.

1. INTRODUÇÃO

A *Cannabis sativa*, é uma planta arbustiva, com folhas caracteristicamente digitaliformes, dióica, de origem Asiática, da família das *Moraceae*, vulgarmente denominada “cânhamo”. Cresce a alturas de 1,5 a 6,0 metros. A variedade existente nas américas, *Cannabis sativa* L., parece ser produto de hibridização da variedade asiática, *Cannabis indica*, e de uma outra, de crescimento mais rápido, *Cannabis ruderalis*. Esta hibridação originou variantes mais potentes e de mais fácil adaptação climática que as outras que lhe deram origem. Outras duas variedades de *Cannabis* já descritas são a *mexicana* e a *americana* (Murad, 1996). A importância toxicológica desta planta se dá em função da presença neste vegetal de substâncias químicas, denominadas canabinóides, com ações psicoativas. A classificação *Cannabis sativa* foi feita por Linné em 1753.

As suas fibras e óleos foram amplamente utilizadas no século XVIII e início do século XIX. As suas fibras eram utilizadas para a fabricação de cordas, principalmente para navios, e o seu óleo utilizado na fabricação de tintas. Também partes desta planta foram utilizadas como ração animal.

A *Cannabis sativa* ao contrário de outros exemplos de vegetais de uso ilícito (coca e ópio, por exemplo), está difundida praticamente por todo o globo terrestre, como, por exemplo, nas regiões do Oriente Médio, da África e em países como Peru, Índia, China, EUA e Brasil, entre muitos outros, sendo o produto ilícito mais

cultivado e consumido no mundo. Esta realidade também se aplica ao Brasil e a todo o continente americano.

Na última década 120 países relataram o cultivo ilícito em seus territórios. A Interpol, através das apreensões realizadas em 1998, identifica 67 países como grande produtores de *Cannabis*, dos quais 13 estão nas américas. Esta planta teve excelente adaptação no continente americano, sobretudo nas regiões Central e Sul, onde vastas áreas de cultivo de *Cannabis* são encontradas. Estima-se que Colômbia e México cultivaram, respectivamente, 5.000 e 3.700 hectares de maconha somente no ano de 1999 (UNODCCP, 2000).

Em termos de apreensão mundial de drogas de abuso, os valores de maior expressão, tanto em termos de volume quanto em número de ocorrências são de *Cannabis* (UNODCCP, 2000).

Nos últimos anos aumentou significativamente o volume de apreensões no México, países da América Central, Brasil e Paraguai. No ano de 1999, por exemplo, aproximadamente 2.500 toneladas de maconha foram apreendidas em todo o mundo (UNODCCP, 2000).

No Brasil o cultivo, a comercialização e o uso desta planta, em qualquer de suas apresentações, são proibidos por lei e passíveis de punições, conforme portaria 344/98 da ANVISA e artigos da Constituição da República federativa do Brasil de 1988, além de Decretos-Lei, Portarias e Resoluções (SMA/GBP, 2000).

Sobre este conjunto de legislações não existe uma unanimidade nacional de opiniões, pois algumas pessoas defendem a descriminalização do uso da maconha, embora estas discussões sejam ainda localizadas e não tenham avançado em um contexto maior no país. Neste caso deve-se destacar também

que não há consenso entre os estudiosos do assunto sobre os benefícios à saúde e à segurança pública decorrentes desta ação.

Apesar das proibições legais, por todo o território brasileiro, de muito tempo já se conhece o hábito, presente em parte da população, do uso desta planta sob a forma de cigarros, denominados cigarros de maconha ou “baseados”. Também o cultivo ilícito desta planta, principalmente nas regiões norte e nordeste do país é, de muito tempo, reconhecido (Prado, 1959; Polícia Federal, 2003).

Os principais estados nestas regiões, produtores de *Cannabis*, são o Pará (Região norte), Bahia, Pernambuco e Maranhão (Região nordeste), onde foram destruídos somente no ano de 2000 o total de 3.140.309 (três milhões, cento e quarenta mil e trezentos e nove) pés de maconha em operações coordenadas pela Polícia Federal. Sendo 1.330.490 (Hum milhão, trezentos e trinta mil, quatrocentos e noventa) pés, no estado da Bahia, 936.031 (Novecentos e trinta e seis mil e trinta e um) pés, no estado do Maranhão e divisas como estado do Pará e 873.788 (Oitocentos e setenta e três mil, setecentos e oitenta e oito) pés no estado de Pernambuco (Polícia Federal, 2003).

A variedade da planta brasileira, provavelmente, origina-se do norte da África, e foi primeiramente trazida pelos escravos negros. No entanto, plantas e sementes provenientes de outras partes do continente americano certamente chegaram e chegam até o Brasil.

Aproximadamente 70% por cento da maconha apreendida no Brasil no ano de 2000 (em torno de 110 toneladas), era proveniente de contrabando internacional, oriundo do Paraguai e que entrou no Brasil através do estado do Mato Grosso do Sul. Este grande volume de *Cannabis* seria distribuído nos

estados de Goiás, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo, além do Distrito Federal (Polícia Federal, 2003). Neste mesmo período (ano 2000), foram retiradas de circulação 157,171 toneladas de maconha. Comparada com a apreensão de cocaína que totalizou 4,720 toneladas neste mesmo ano pode-se estimar a grandeza da circulação e consumo de *Cannabis* no Brasil.

Quanto ao consumo de *Cannabis*, dados da UNODCCP (United Nations Office for Drug Control and Crime Prevention), de Viena, mostram um aumento na década de noventa tanto na América do Sul como na América Central, como também foi observado aumento em vários países da África do Sul, África Central e África Setentrional. Também em vários países da Oceania e da Europa este aumento foi detectado (UNODCCP,2000).

O consumo visto no Brasil está, certamente, relacionado às ações psicoativas dos compostos, chamados canabinóides, encontrados nesta planta. No entanto, deve também sofrer forte influência de fatores sociais, econômicos e culturais, o que corroborariam para o consumo desta planta. Este consumo é encontrado em várias faixas etárias, econômicas e sociais no nosso país.

O *I Levantamento Domiciliar Sobre Uso de Drogas Psicotrópicas no Brasil*, um amplo estudo coordenado pelo Centro Brasileiro de Informações Sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID), relata que 60,9% da população nacional considera a maconha como a droga mais facilmente encontrada no Brasil. Encontrou também que excluindo-se o álcool e o tabaco (drogas lícitas), a maconha foi relatada como a principal entre aquelas experimentadas pelo menos uma vez na vida, com 6,9% da população em geral, o que corresponde a 3.249.000 (Três milhões, duzentos e quarenta e nove mil usuários). Um outro importante dado deste estudo refere-se a

dependência de maconha. Neste caso a taxa encontrada foi de 1,0% entre os pesquisados, com população estimada em 451.000 (Quatrocentos e cinquenta e uma mil) pessoas, onde a dependência é cinco vezes mais frequente nas pessoas de sexo masculino que nas de sexo feminino (Carlini, 2002). O que corrobora os números encontrados em relatórios internacionais e mostra, portanto, serem o uso e o cultivo da maconha fatores merecedores de atenção tanto no que diz respeito a questões relacionadas a saúde pública quanto a questões relacionadas a criminalidade em geral e ao tráfico de drogas.

Em nosso país, recentemente têm surgido alguns relatos isolados e não científicos assegurando a apreensão e o comércio ilegal de maconha com altos teores de canabinóides e, em especial, de Δ^9 -THC. Encontra-se também especulações sobre taxas de 12 a 13% deste psicoativo nestas amostras, sugerindo consumo de amostras com níveis de THC muitas vezes maiores que aquelas encontradas nas maconhas consumidas nas décadas de 60 e 70. (Ashton, 2001).

Segundo estas especulações, variedades genéticas especiais desta planta, cultivadas sob condições controladas estariam sendo utilizadas em nosso país. Estas formas são denominadas como “skunk” ou “skank”.

O skank, que já está bem descrito na literatura, é chamado também de “maconha de laboratório”. Isto se deve ao fato dele ser fruto de cultivo em condições bastante controladas de temperatura, umidade, nutrientes (geralmente em hidroponia) e, particularmente, luminosidade (intermitente, através de luz artificial). Todo este controle tem como finalidade obter plantas com concentrações

bem maiores de Δ^9 -THC que aquelas encontradas nas plantas naturalmente produzidas (plantações em áreas externas, tipo *out door*). Também chamada de "Super Maconha" este cultivo é normalmente do tipo "*in door*" (estufas ou jardins de interiores de residências).

No entanto, deve-se levar em consideração que a *Cannabis* é consumida no Brasil sob a forma que denominamos maconha, conforme citado anteriormente. Neste caso, esta forma é composta por várias partes da planta, como galhos, raiz, talos, sementes, além das folhas e flores, todas secas, previamente misturadas e trituradas juntas (Reinhardt, 1993). Também é provável que nestas amostras estejam presentes também outras plantas não *Cannabis* além dos mais variados materiais adulterantes. Isto se daria para aumentar o volume da amostra e também para disfarçar o odor forte e característico desta planta. Um importante impacto disto seria a diminuição percentual dos níveis de Δ^9 -THC em relação ao peso total da amostra (relação peso x peso) .

No Brasil a maior apreensão de skank foi realizada em 1996, quando foi apreendida pela Delegacia de Investigações Sobre Entorpecentes (DISE) de Campinas 40kg deste material. Outras apreensões de pequenas quantidades tem sido relatados nos meios de comunicação leiga (jornais, revistas e televisões) .

Existe, portanto, a suspeita de que maconha com altos teores de Δ^9 -THC estejam disponíveis aos usuários brasileiros.

No entanto, há ainda a necessidade de confirmação científica dos teores de sobre os teores Δ^9 -THC nas amostras apreendidas no Brasil. O que pode ser feito

através da determinação, através de metodologias adequadas, deste composto no material apreendido.

O propósito deste estudo é quantificar teores de Δ^9 -tetraidrocanabinol em amostras de maconha da região da Grande São Paulo.

2. GENERALIDADES DA *Cannabis sativa* L.

A tabela 1 mostra algumas propriedades físico-químicas do Δ^9 -tetraidrocanabinol.

Tabela 1 – Propriedades físico-químicas do Δ^9 -Tetraidrocanabinol (Merck Index, 1996)

Nome	Delta-9-tetraidrocanabinol
Nome químico	Tetraidro-6,6,9-trimetil-3-pentil-6H-dibenzo[b,d]Piran-1-ol
Fórmula química	C ₂₁ H ₃₀ O ₂
Peso molecular	314.47
Ponto de ebulição	200°C
DL₅₀ (via oral)	1270 mg/kg (rato - machos), 730 mg/kg (rato - fêmeas)
DL₅₀ (via inalatória)	42 mg/kg (ratos)

2.1 Denominações atribuídas a Cannabis

A Cannabis e seus produtos têm muitos sinônimos: *hemp*, *grass*, *dope*, *pot*, *weed* (EUA), *Ma-yo* (China) *kanaba*, *Kannapu*, *Qúnubu*, *Qúnabu* (Assíria), *bangh*, *B'hangá* (Índia), *ganja*, *dagga* (África), *haxixe*, *sinsemilla*, *cânhamo*, (Américas do Sul e Central) "tora", "baseado", "erva", "beise", "fumo", "bagulho", "fininho", *manjuana*, *fumo de Angola*, *maconha*, *erva do diabo*, "diamba", (Brasil). No Brasil a designação mais utilizada é *maconha*, que segundo alguns historiadores seria um anagrama da palavra *cânhamo* cunhada pelos escravos, ainda da época da colonização do Brasil. Conforme descrito abaixo:



Estas várias denominações dão uma idéia do largo uso que se faz de maconha em todo o mundo. Esta diversidade de nomes pode ser explicada por diversos motivos como: adaptação fonética ao idioma local, fatores culturais, expectativa de efeitos, disfarces de linguagem (gírias), etc.

2.2 Histórico de usos medicinais

Atribuições de efeitos medicinais são encontrados em relatos datados de mais de 4.000 anos. Na China registros apontam seu uso desde o século III a.C. Mais precisamente em torno do ano de 2727 a.C., onde são encontrados escritos do imperador Shen-Nung, quem mencionou suas propriedades contra malária e reumatismos, anestésicos em cirurgias, e outros (Mechoulan & Hanus, 2000).

Na Índia, referências datam de 2000 anos a.C., onde era utilizada em celebrações religiosas (Leza Cerro *et al*, 1998.).

Já foi indicado neste último país como espasmolítico e hipnótico. Por volta do ano de 1.500 da era Cristã o uso desta planta chegou também ao mundo Árabe, onde encontrou grande aceitação entre o povo muçulmano, talvez influenciada pela proibição do uso do álcool pelo Alcorão (Carlini *et al*, 1982).

Cannabis também foi indicada para tratamentos de impotência, para flatulência, desordens estomacais, dores de cabeça e como calmante. (Lorenzo *at al*, 1998).

2.3 *Cannabis* e canabinóides

Como foi citado anteriormente, os efeitos observados com o uso da maconha são decorrentes da presença de componentes com ações tanto sistêmicas como centrais, chamados canabinóides. Estas substâncias contêm 21 átomos de carbono e possuem relação estrutural próxima com o principal agente psicoativo, o Δ^9 -tetraidrocanabinol (Δ^9 -THC) (Moreau, 2003). Além do Δ^9 -THC existem, aproximadamente, outros 60 canabinóides nestas plantas. Além destes compostos já foram descritas mais de 400 outras substâncias diferentes presentes na planta (terpenos, álcoois, ácidos, esteróides, fenóis, açúcares, etc.), ou como produto da pirólise dos produtos da maconha (presentes na fumaça do cigarro, por exemplo). Neste último caso encontram-se várias substâncias, dentre elas, monóxido de carbono, acetaldeído, acroleína, tolueno, nitrosaminas, cloreto de vinila, fenol, cresol, naftaleno, além de outras substâncias consideradas cancerígenas para humanos, como o benzantraceno e o benzopireno (Nahas, 1986).

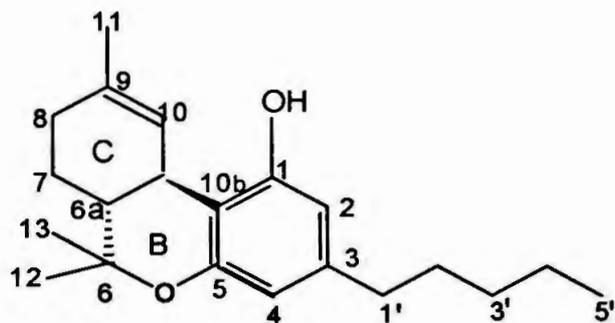
Estes canabinóides diferem em suas ações tanto por fatores intrínsecos a suas estruturas químicas (psicoatividade, biodisponibilidade, ligação a receptores endógenos, etc) como pelas concentrações existentes nas plantas.

O principal componente psicoativo presente na planta, o Δ^9 -tetraidrocanabinol, foi primeiramente isolado na década de 40 por Adams (Adams, 1941-1942). E, posteriormente melhor detalhado por Todd (1946). No entanto, o

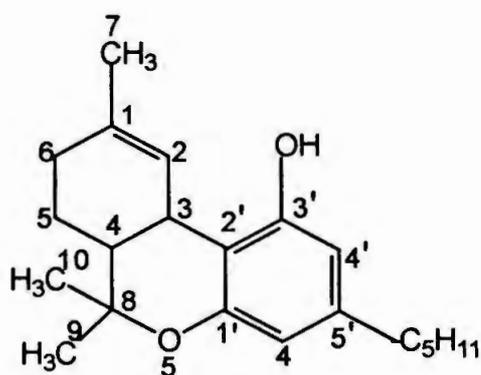
isolamento de sua forma pura e caracterização química foi realizada somente em 1964 por Gaoni & Mechoulam (Mechoulam & Hanus, 2000)

Existem dois sistemas numéricos para classificar os canabinóides. O sistema dibenzopirano, adotado pelo *Chemical Abstracts*, e que será adotado neste trabalho, e o sistema monoterpênico, mais relacionado com o precursor terpênico biogênico dos canabinóides. Portanto, Δ^9 -THC é a classificação pelo sistema dibenzopirano e, este mesmo composto, recebe o nome Δ^1 -THC quando classificado pelo sistema monoterpênico. O mesmo ocorre para o Δ^8 -THC em relação ao Δ^6 -THC. (Moreau, 2003)

A seguir (Figura 1) as estruturas e os esquemas de nomenclatura que podem ser utilizados



Δ^9 -Tetraidrocanabinol



Δ^1 -Tetraidrocanabinol

FIGURA 1. Esquemas de nomenclaturas para os canabinóides

A concentração deste principal composto psicoativo, o Δ^9 -THC, sofre influência de vários fatores e varia significativamente nas várias partes deste vegetal (folhas, inflorescências, caule, talos, resinas das folhas, raiz, sementes), sendo mais concentrado nas inflorescências e, em menor grau, nas folhas. As demais partes trazem somente traços dos compostos com psicoatividade (Moreau, 2003; Reinhardt, 1993). A concentração deste canabinóide dependerá também de outros fatores, como a região e a quantidade de luz disponível, onde a exposição a longos períodos de luminosidade aumentam esta concentração; o clima onde foram cultivados, adaptando-se muito bem a climas tropicais; a forma de cultivo, onde a hidroponia, por exemplo, possibilita também maiores teores de Δ^9 -THC (Reinhardt, 1993; Fetterman & Turner, 1972).

A linhagem genética destas plantas é hoje bastante reconhecida como um dos importantes fatores de influência para a composição química das mesmas.

Por conseguinte, a forma de apresentação dos produtos da *Cannabis* também influencia as concentrações de canabinóides conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2. Formas de apresentação dos produtos de *Cannabis*, teor aproximado de Δ^9 -THC e modo de uso da droga. (Adaptada de Moreau, 2003).

Produto	Composição	Teor de Δ^9-THC	Modo de Uso
Maconha (Brasil) Marijuana, grass(EUA) Dagga (África do Sul)	Folhas secas, contendo proporções variáveis de outras partes da planta.	Menos de 1 a 3%	Fumada na forma de cigarros
Hash Oil	Produto de extração mais elaborada (solventes orgânicos ou destilação)	Variando de 15 a 60%	Adicionado a alimentos, bebidas ou cigarros de maconha
Haxixe (Norte da África)	Resina das Inflorescências	1,4 a 18,8 %	Fumada em cachimbos
Sinsimilla (EUA)	Produto híbrido, cultivado à partir de mudas de plantas femininas(sem sementes)	Em torno de 5%	Fumada em cachimbos ou cigarros
Skunk (EUA, Canadá)	Plantas produzidas em condições controladas (in door)	5 – 10%	Fumada em cigarros
Ganja (Índia)	Resina de folhas e inflorescências	Em torno de 3%	Fumada ou adicionadas a bebidas e doces (balas)

Portanto, levando-se em conta somente os fatores relacionados às plantas (cultivo, linhagem, etc.) e as formas de apresentação dos produtos de *Cannabis* consumidos (maconha, skank, outros), pode-se constatar que são muitas as variantes que contribuem para os efeitos observados nos indivíduos que fazem uso da mesma, onde o teor do Δ^9 -THC é, sem dúvida nenhuma, um importante fator de determinação dos sintomas observados nestes usos.

O fato é que se observa diferentes reações entre os indivíduos que fazem uso da maconha.

Na busca de conhecer melhor os fatores que contribuem para o consumo de maconha e as variações de respostas individuais ao seu uso se torna imprescindível, entre outros estudos, conhecer os níveis de Δ^9 -THC presentes na plantas de *Cannabis* e nas amostras de maconha. Sobretudo, as concentrações encontradas naquelas amostras disponíveis aos usuários.

Neste sentido, vários estudos já foram realizados. Alguns buscavam somente estabelecer e respaldar uma determinada metodologia, enquanto buscavam mostrar a grande variação entre as amostras analisadas. Outros se utilizavam destas metodologias já padronizadas para a determinação quantitativa dos principais canabinóides.

Fairbairn & Liebmann (1974), analisando amostras de sementes ou mudas, oriundas de vários países, e diferentes entre si, pelas formas de cultivo ou linhagens das mesmas, encontraram grandes variações nos teores de Δ^9 -THC. Encontraram teores entre 1,86 a 7,12% de Δ^9 -THC para plantas originárias da África do Sul, de 0,28 a 2,43% em outras amostras originárias da

Tailândia, de 0.04 a 0.33% em outras oriundas da Turquia e de 1,21 a 1,51% em plantas vindas do México.

Em um outro estudo Marderosian & Murthy (1973) estudando amostras armazenadas por um longo período de tempo, encontraram níveis que variavam de 0,03 a 0,08% de Δ^9 -THC em suas análises. Embora o número das amostras mais antigas, analisadas neste estudo, tenha sido reduzido, é interessante perceber que na amostra analisada após pequeno período de colheita (amostras recentes), a concentração do Δ^9 -tetraidrocanabinóide foi de apenas 1,0%. Ainda neste trabalho, curiosamente, em uma resina antiga de haxixe não foi detectado Δ^9 -THC.

No período de 1975 a 1981 foram apreendidas e analisadas amostras recentes, ou seja, com menos de três meses da coleta, originárias do Líbano, Índia, Paquistão e do Marrocos, com índices de Δ^9 -THC de, aproximadamente, 4,0% (1976). Estas amostras com concentrações mais altas foram denominadas posteriormente de *sensemilla* (Pitts, J.E, 1990).

No ano de 1981, resinas à base de *Cannabis* com índices de, aproximadamente, 9,0% de Δ^9 -THC foram encontradas. (Pitts, J.E, 1990).

Também altas concentrações deste canabinóide foram encontradas em amostras originárias dos EUA, Índia, Jamaica, Paquistão e Líbano, no ano de 1984, com índices de Δ^9 -THC chegando a 17,8% (Pitts, J.E, 1990).

Amostras de maconha oriundas da Argentina variaram seus teores entre 0,1 e 8,3%, onde, no entanto, a grande maioria mostrou valores abaixo de 1,2%. (Chiesa *et al*, 1973).

Em análises realizadas por cromatografia gasosa na Universidade do Mississippi(EUA), de 12 amostras oriundas do Brasil, cedidas pelo Instituto Médico Legal do Estado de São Paulo, encontrou-se variações entre 0,9 e 6,85%. (Takahashi, 1977) .

Em um outro estudo com amostras provenientes do Brasil, realizado por Karniol & Carlini, em 1972, os valores de Δ^9 -THC ficaram entre 0,7 e 2,5% (Baker *at al*, 1980). Este mesmo estudo ainda avaliou amostras oriundas dos Estados Unidos, com índices entre 0,1 e 0,5%, Jamaica (0,04 a 7,9%), "hash oil" da Índia, onde foram encontrados altos valores de Δ^9 -THC (20-48%), e do Kenia (28-39%) (Baker, 1980).

Estudo mais recente, utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa por ionização de elétrons, realizados em duas regiões da Grécia, encontrou índices de Δ^9 -THC variando entre 0,24 e 4,41% para a região de Ipiros. Na região de Lakonia, entre as dezoito amostras analisadas os valores variaram entre 0,08 e 3,83%. Nesta última região, 50% das amostras mostraram valores inferiores a 1,0%. (Stefanidou *at all*,1998)

Em função destas variações nas concentrações deste composto químico as amostras de *Cannabis* podem ser diferenciadas e classificadas como amostras tipo-fibra e amostras tipo-droga (Avico, 1985), dependendo das concentrações destes compostos. A União Européia, por exemplo, classifica como planta tipo fibra aquelas que não ultrapassam 0,3% do Δ^9 -THC (Stefanidou *et al*, 1998).

A classificação para determinação do fenótipo da planta (tipo-fibra ou tipo-droga) pode ser utilizada conforme as seguintes regras:

- (I) – Quantificando-se o Δ^9 -Tetraidrocanabinol em inflorescências;

caso a concentração do Δ^9 -THC, nas inflorescências secas, seja inferior a 0,3% a planta é caracterizada como tipo-fibra. Caso contrário ela é classificada como tipo-droga (Meijer, 1992).

- (II) Utilizado-se a seguinte equação, definida por Fetterman (1971) e que utiliza as correlações percentuais de Δ^9 -THC, Canabinol (CBN) e Canabidiol (CBD), encontradas nas amostras analisadas.

$$\text{Índice de Fetterman} = \frac{\% \Delta^9\text{-THC} + \% \text{CBN}}{\% \text{CBD}},$$

se o índice obtido ultrapassar 1 (um) a planta é caracterizada como fenótipo tipo droga. Quando este valor é inferior a este valor, a planta é classificada como tipo fibra.

- III) Utilizando as equações abaixo:

$$\text{Índice} = \frac{\Delta^9\text{-THC}}{\text{CBD}} \quad \text{ou} \quad \text{Índice} = \frac{\text{CBN}}{\text{CBD}}$$

se o resultado de um dos dois índices abaixo for maior que 1 a planta é classificada como tipo-droga, caso os dois forem inferiores a este valor, a planta é classificada como tipo-fibra.

No entanto, vale ressaltar que estas regras, isoladamente, podem não ser tão confiáveis e que a aplicação conjunta das mesmas, onde nenhuma delas deve caracterizar a amostra como tipo-droga oferece mais segurança para a classificação de amostras de maconha (Stefanidou, M. et al, 1998).

2.4 TOXICODINÂMICA

São muitos e variados os efeitos observados após o uso de maconha. Alguns relacionados a suas ações no Sistema Nervoso Central e outras de ações periféricas ou localizadas.

Estas ações são, hoje em dia, atribuídas à ligação específica dos canabinóides a seus receptores endógenos, tipo CB₁, descobertos por Devane e colaboradores (1988) e tipo CB₂, identificado por Munro e colaboradores (1993)

Os efeitos da maconha têm sido relatados em várias espécies, como ataxia em cachorro, ptose palpebral em macacos e taquicardia em humanos e a relação com o aparecimento e a intensidade destes efeitos e o uso de *Cannabis* têm sido atribuído a possíveis mecanismos de dependência (Kaymakçalan, 1981).

No homem, os efeitos físicos agudos podem ser: hiperemia de conjuntivas, boca seca e o indivíduo pode apresentar taquicardia (de 60-80 batimentos por minuto pode chegar a 120-140 ou até mais) (Hollister, 1986), aumento da pressão arterial (particularmente a pressão sistólica) e da temperatura corpórea, (Kelly & Jones, 1992). Também pode causar a diminuição da pressão intra-ocular, redução do lacrimejamento, diminuição da reação a luz, levando a fotofobia (Razdan & Howes, 1983).

A longo prazo, a extensão dos efeitos nocivos bem caracterizados, se restringem ao sistema pulmonar e cardiovascular. Também há risco de desenvolver câncer de pulmão e diminuição das defesas, por sua ação no sistema imunológico, facilitando infecções. Esta ação no sistema de defesa do organismo se dá diminuindo tanto as respostas imunes humorais como as celulares. Também

são observados aumento nos episódios de dor de garganta e tosse crônica(Kaminski *et al*, 1992).

O uso frequente pode desenvolver ainda aumento dos riscos de isquemia cardíaca (Sarafin *at al*, 2001)

Também riscos de lesões pré-cancerosas, como edemas e inflamações, e cancerosas nos pulmões são potencializados pelo uso da maconha fumada. Estudos recentes têm a tentado avaliar os potenciais de citotoxicidade do Δ^9 -THC demonstrando mecanismos moleculares que influenciariam o risco de câncer em usuários de maconha como, por exemplo, a interação entre este composto os mecanismos reguladores de necrose e apoptose células pulmonares. Estes estudos discutem também o aumento nos níveis de compostos causadores de estresses oxidativos e, conseqüente, citotoxicidade, causado pela presença de produtos presentes na *Cannabis* (Sarafin *at all*, 2001).

A quantidade de benzopireno, agente cancerígeno, no fumo da maconha é maior do que no tabaco, além de existir também nos cigarros de maconha a presença de outros policíclicos aromáticos potencialmente cancerígenos. A droga pode diminuir o fluxo de ar através as vias aéreas respiratórias e aumento, nestas vias, da resistência a este fluxo (Moreau, 2002).

Na área sexual tem-se redução da produção de espermatozóides. Com aumento do número de espermatozóides anormais e com incapacidade fecundativa, levando a infertilidade destes gametas. Todavia com o abandono da droga a espermatogênese volta ao normal. Nos homens há também redução da

produção de testosterona e nas mulheres alterações na menstruação (Kumar et al, 2001).

Em comparação com mulheres não usuárias de maconha durante a gravidez, as usuárias podem ter filhos com diminuição de peso e altura.

No aparelho cardiovascular, pode haver aumento da pressão arterial e, portanto, nos hipertensos o uso da maconha é perigoso. Pode-se ver, igualmente, aumento da frequência do pulso (JULIEN, 1998).

Pela ação observada a nível central, a maconha é melhor classificada como droga de ação tipo *Cannabis*, pois apresenta um conjunto de respostas frente ao seu uso bastante peculiar. Tem a característica de produzir efeitos depressores (sonolência ou ausência momentânea), excitantes (estados de euforia em vários níveis) e alucinógenos no sistema nervoso central, dependendo da quantidade usada, do tempo de uso, do momento e circunstâncias de uso, da via de administração, da personalidade do indivíduo, etc. (Hollister, 1986; Pertwee, 1988).

A maconha pode produzir uma redução no desempenho das habilidades individuais, incluindo dirigir, tanto em rodovias como dentro de vias urbanas, dividir atenção entre mais de uma ação simultânea, diminuição de diálogo, apatia, indiferença, entre outras (Startk & Dewes, 1980).

Alguns efeitos terapêuticos podem ser objetivados em casos muito específicos, como em pacientes com câncer, por exemplo. Estes usos buscam ações antieméticas, analgésicas, antiespasmódicas, estimulantes de apetite e indutoras de sono (calmantes). Também pode ser indicada para pacientes com

glaucoma, que não respondem a terapêutica convencional, para a diminuição da pressão intraocular.

O Dronabinol (Marinol®), mostrado na Figura 2), que tem como princípio ativo o Δ^9 -THC sintético, é usado em alguns hospitais norte-americanos e em outros países, como antiemético em pacientes fazendo quimioterapia que não respondem a outras drogas convencionais. Este medicamento também é usado como estimulante do apetite em pacientes portadores do HIV, particularmente naqueles que desenvolvem a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA).



FIGURA 2 – Apresentações do medicamento MARINOL®.

No entanto, a necessidade do uso terapêutico deste medicamento não é uma unanimidade entre os profissionais de saúde. A contraposição principal é a existência de outras possibilidades terapêuticas com melhor eficácia e menos efeitos adversos. Como efeito adverso no caso do Dronabinol discute-se,

principalmente, a possibilidade do desenvolvimento de dependência química pelo tratamento. O uso deste medicamento, por exemplo, em portadores de câncer ou com AIDS, podem contribuir para um aumento do risco a estes pacientes pelo comprometimento do sistema imune causado pelo Δ^9 -THC.

Em todos os casos a avaliação da relação risco-benefício deverá ser extremamente criteriosa e a decisão final deverá levar em consideração o resultado desta avaliação.

O efeito analgésico já está bastante descrito, até em comparações com outros analgésicos clássicos como os opióides (codeína). No entanto, a sua ação específica sobre o controle da dor ainda não está totalmente esclarecido e é alvo para atuais e futuros estudos (Manzanares *et al*, 1999; Calignano *et al*, 1998).

Nos estudos publicados demonstrando sinais de dependência em animais de laboratório algumas divergências entre os modelos adotados para os estudos (animais ou humanos, Δ^9 -THC ou produtos da *Cannabis*, vias e tempo de administração, dentre outros) têm dificultado uma melhor clareza na interpretação dos mesmos. Divergências conceituais sobre o termo dependência contribuem ainda mais para as diferenças nas interpretações dos trabalhos realizados.

Em experimentos em macacos, os animais promoveram a auto-administração de Δ^9 -THC intravenosamente e por via inalatória, após tratamento e indução prévias ao uso deste canabinóide. Em ratos este mesmo efeito de auto-administração foi observado, no entanto, somente após o tratamento com altas doses intravenosas de Δ^9 -THC (0,3 mg/kg/injeção) durante quatro dias. Mesmo

com este esquema de dose somente em 40% dos animais foi observado a auto-administração (kaymakçalan-1981).

Com uma dose diária de 180mg Δ^9 -THC, por um período de 11 a 21 dias, Jones (1983) defende a observação de uma síndrome de abstinência bem definida em humanos. Entretanto, outros autores defendem que o uso crônico de *Cannabis* pode levar a dependência o que seria o responsável pelo crescimento no número de pessoas que procuram tratamento nos Estados Unidos, Reino Unido e Nova Zelândia (Ashton, 2001).

Tolerância ocorre e é uma resposta de adaptação cerebral a exposição continuada a *Cannabis*. Ela pode desenvolver-se rapidamente mas, em contrapartida, pode desaparecer também rapidamente (Drummer, 2001). Entretanto, o desenvolvimento da tolerância varia significativamente de um indivíduo para outro. Uma outra observação importante quanto aos mecanismos de tolerância, é que neste caso não são observados alterações da cinética da *Cannabis*, ou seja, com o uso crônico os resultados das concentrações sanguíneas são os mesmos. Estes achados corroboram o mecanismo da adaptação neurológica (Drummer, 2001; Julien, 1998).

Portanto, baseado nestes estudos que avaliam a possibilidade de dependência causada pela exposição a produtos da *Cannabis*, em altas doses ou cronicamente o seu uso, certamente, leva ao risco do desenvolvimento de dependência. Principalmente quando se leva em consideração o conceito de dependência preconizado pela Associação Americana de Psiquiatria, ou seja,

"O fator essencial para a dependência é o agrupamento de sintomas cognitivos, comportamentais e fisiológicos que indicam que a pessoa tenha prejuízo no controle do uso da substância psicoativa e continue usando apesar de consequências adversas " .

2.4.1 Receptores canabinóides

Receptores canabinóides cerebrais e periféricos já foram identificados e clonados e um composto endógeno, derivado do ácido aracdônico já foi identificado e denominado *anandamida*, ou aracdonil etanolamida (Devane *et al.*, 1988; Matsuda *et al.*, 1990; Devane *et al.*, 1992; Munro *et al.* 1993).

Embora a função fisiológica destes receptores ou do seu ligante endógeno ainda não tenham sido elucidadas, eles estão difundidos perifericamente, concentrando-se no tecido linfóide, e estão, também, amplamente dispersos com elevadas densidades no córtex cerebral, hipocampo, núcleo estriado e cerebelo (Herkenham *et al.*, 1990; Herkenham *et al.*, 1991b; Howlitt, 1995; Goodman & Gilman, 1996), o que pode explicar a sua ação sobre a memória, aprendizado e coordenação motora, dentre outras ações centrais observadas com o uso da maconha .

Estes receptores cerebrais são conhecidos como canabinóides do tipo 1 (CB₁) e os seus análogos periféricos são denominados receptores canabinóides tipo 2 (CB₂). Estes últimos mais envolvidos com a modulação do sistema imune e

respostas inflamatórias, são encontrados especialmente nos linfócitos B e Natural Killer (NK).

.As funções fisiológicas destes receptores são afetadas por outros sistemas neurológicos que sofrem ação de outras drogas de abuso. Como o sistema opióide (morfina), GABA (benzodiazepínicos), dopaminérgicos e serotoninérgicos (anfetaminas e cocaína) e receptores colinérgicos.

Estudos realizados nos últimos dez anos têm evidenciado que o Δ^9 -THC, liga-se a estes receptores canabinóides específicos e mimetiza as ações dos canabinóides endógenos. Neste sentido vários análogos sintéticos de agonistas e antagonistas destes compostos endógenos têm sido propostos, como o SR141716A, sintetizado pela Sanofi (Rinaldi-Carmona *et al*, 1994), que é um composto caracterizado como um antagonista puro, por ter alta potência e alta seletividade, em baixas concentrações, tanto para receptor CB₁ como para CB₂, bloqueando a ação de vários agonistas *in vivo*.

A Tabela 3 ilustra as respostas dos principais canabinóides encontrados na *Cannabis sativa L.* bem como do derivado endógeno frente aos receptores canabinóides.

Tabela 3 – Ações dos principais componentes da maconha e anandamida sobre receptores canabinóides tipo 1 (CB₁) e tipo 2 (CB₂).

CANABINÓIDES	CB₁	CB₂
Δ⁹-THC	Agonista	Antagonista fraco
ANANDAMIDA	Agonista	Agonista
CANABINOL (CBN)	Agonista fraco	Agonista (maior afinidade por CB ₂ que por CB ₁)
CANABIDIOL (CBD)	Não se liga a este receptor	Não se liga a este receptor

Abaixo seguem algumas estruturas, como a do composto precursor da anandamida (Figura 3), de compostos agonistas (Figura 4) e antagonistas (Figura 5):

2-Arachidonilglicero

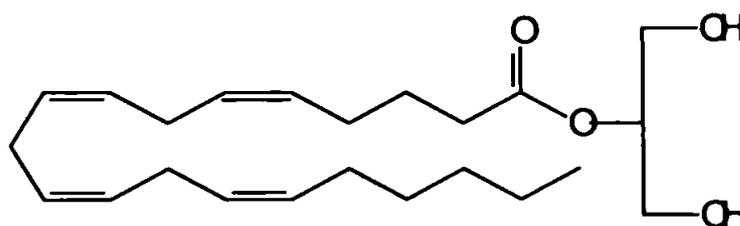


FIGURA 3 - Precursor canabinóide

Anandamida

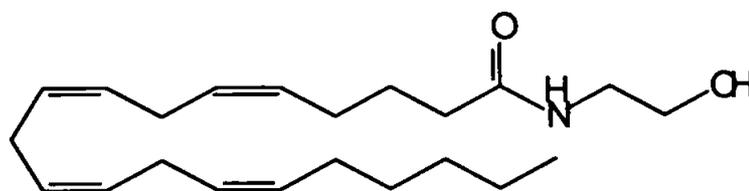
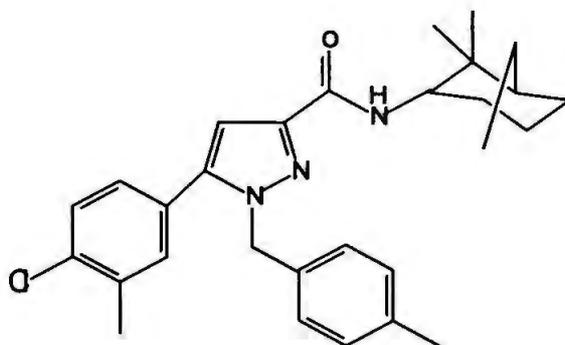
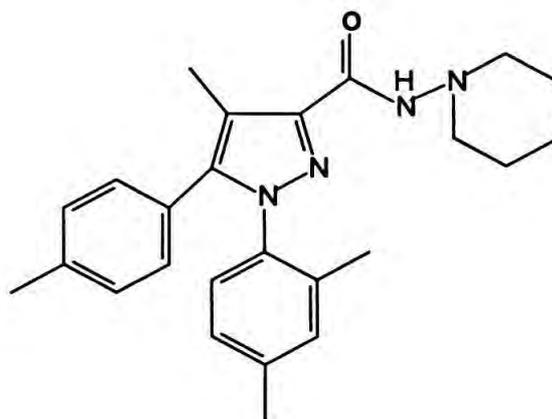


FIGURA 4 - Agonista Canabinóide

SR144528Antagonista CB₂**SR141716A**Antagonista CB₁**FIGURA 5** - Antagonistas Canabinóides

2.5 TOXICOCINÉTICA

Os canabinóides e os outros produtos da maconha podem ser absorvidos tanto pela via oral como pela via inalatória. No entanto, a absorção, via oral, é pouco eficiente e o pico plasmático ocorre entre 1 e 5 horas após a ingestão (Drummer, 2001; Kumar *et al.*, 2001). A biodisponibilidade oral é muito pequena com concentrações sanguíneas equivalentes a 25-30% da obtida por inalação, comparando-se a mesma dose, isto se deve, particularmente, ao mecanismo de primeira passagem no fígado (Leza Cerro, *et al.*; Moreau, 2003).

Após a inalação da fumaça de maconha, via mais comumente utilizada, o pico de concentração plasmática acontece em poucos minutos. A quantidade absorvida é também muito superior àquela obtida pela via digestiva.

Aproximadamente 50% do conteúdo de Δ^9 -THC da amostra fumada está presente na fumaça inalada. Praticamente todo esse Δ^9 -THC é absorvido pelos pulmões, rapidamente caem na corrente sanguínea, chegando ao cérebro em poucos minutos (Lorenzo *et al.*, 1998).

Após a absorção o Δ^9 -THC é rapidamente distribuído pelos tecidos. Devido a sua baixa hidrossolubilidade e alta afinidade por tecido adiposo, este composto distribui-se fortemente pelos tecidos gordurosos do corpo, o que resulta em uma rápida diminuição das concentrações plasmáticas. Este composto pode percorrer a circulação enterohepática, o que pode aumentar seu tempo de depuração, bem como a observação de seus efeitos (Ashton, 2001).

Os canabinóides são biotransformados no fígado, onde sofrem processos de hidroxilação, oxidação, epoxidação e conjugações com ácido glicurônico e

glutaciona. Sofrem biotransformação também por enzimas pulmonares e cerebrais. A biotransformação do Δ^9 -THC é complexa, com mais de 80 produtos identificados. Entre os quais os mais significantes são: 11-hidroxi, 9-carboxi e o glucoronato de 9-carboxi THC. Destes a forma 11-hidroxi é a mais abundante. Este composto hidroxi possui a mesma atividade do Δ^9 -THC (Lorenzo *et al.*, 1998; Moreau, 2003). Um esquema de biotransformação do Δ^9 -THC é mostrado na Figura 6.

O tempo de eliminação total do Δ^9 -THC plasmático é tido em 7 dias, como uma variação entre 3 e 13 dias, podendo chegar até a 30 dias após o consumo. Este tempo sofre influência de vários fatores, como forma de uso, frequência de uso, concentração na amostra utilizada, fatores de biotransformação e bioacumulação (em tecidos gordurosos) individuais, entre outros. (Ashton, 2001)

O Δ^9 -THC é, essencialmente, excretado nas formas polares hidroxi, carboxi e formas conjugadas. Aproximadamente 20% é excretado na urina e 40% excretado nas fezes. 9-carboxi-THC é o principal produto de biotransformação excretado. Apenas 2,0% é excretado na forma 11-hidroxi.

Detecção de carboxi-THC, medida por cromatografia gasosa acoplada a detector de massa, tem sido encontrada por até 12 dias após o uso de pequenas doses. Altas doses podem ser detectadas em até 25 dias após o uso (Ashton, 2001).

Em um outro estudo com pacientes com pelo menos 12 horas do último uso, canabinóides foram detectados através da técnica de imunofluorescência polarizada, por um período que variou entre 33 e 498 horas (Soubhia, 1999).

2.6 ASPECTOS ANALÍTICOS

De longa data pesquisadores vêm se empenhando para o estabelecimento de métodos que possibilitem a detecção de canabinóides em diferentes amostras, com o máximo de precisão e especificidade e que garantam, também, simplicidade e segurança a estes ensaios e aos profissionais que com eles trabalham (Turk *et al.*, 1969; Backer *et al.*, 1970; Fairlie & Lawrence Fox, 1976; Oroszlán & Verzár-Petri, 1987).

Muitas técnicas têm sido empregadas para a detecção e quantificação de canabinóides em várias matrizes, biológicas ou não. Todas estas técnicas buscam otimizar as condições de análises, tentando diminuir tempo, volume de reagentes e de amostras, melhorar sensibilidade e especificidade. Estas modificações se aplicam, principalmente, na fase de extração destes compostos das matrizes biológicas ou das amostras *in natura*. Melhoramentos nas fases de identificação e quantificação destes compostos também são alvos de estudos. Em um trabalho Poortman-van & Hizer, por exemplo, determinam a influência dos padrões internos para os modelos analíticos quantitativos por cromatografia gasosa com detector por ionização de chama e discute o quanto estes erros causam variações nos valores encontrados (Poortman-van & Huizer, 1999). Em outro trabalho pesquisadores buscam o desenvolvimento de um método analítico também quantitativo, simples, para determinar concentrações de Δ^9 -THC e ácido Δ^9 -tetraidrocanabinólico em alimentos contendo pequenas quantidades de *Cannabis*

utilizando cromatografia líquida de alta resolução (*HPLC*) e detecção por ultra violeta (*UV*) (Zoller *et al.*, 2000).

Neste sentido, autores vem trabalhando na intenção de conhecer as possibilidades de erros nos métodos de detecção de canabinóides, para otimizar cada vez mais os modelos analíticos utilizados para este fim (Wheals & Smith, 1975; Turk *et al.*, 1971; Rasmussen *et al.*, 1972; McAvoy *et al.*, 1999).

Outra questão a ser resolvida nestas técnicas é o uso de solventes orgânicos que invariavelmente levam a problemas com exposições dos profissionais e técnicos envolvidos na realização destas análises e também a problemas com o tratamento e destinação destes resíduos laboratoriais. Esta última questão tem obtido mais ênfase nas últimas duas décadas com a crescente e necessária preocupação ambiental (Lord & Pawliszyn, 2000; Yonamine *et al.*, 2003).

Buscando auxiliar as otimizações acima comentadas, um recente método de extração denominado por seus autores "microextração em fase sólida (*SPME*)", foi proposto por Pawlinszin (1990).

A *SPME*, é uma técnica simples, rápida e que elimina o uso de solventes orgânicos, além de não necessitar equipamentos analíticos sofisticados para esta fase de preparo da amostra. (Lord & Pawliszyn, 2000) .

Este método foi utilizado primeiramente para análises de praguicidas. Por ser um método bastante prático, rápido e simples, além de descartar o uso de solventes orgânicos, adaptações têm surgido buscando sua utilização na extração de vários compostos químicos, entre eles componentes de drogas de abuso, de matrizes biológicas. Estes estudos têm mostrado excelentes resultados para

análises toxicológicas quantitativas de drogas de abuso quando a microextração em fase sólida é associada a técnicas de cromatografia em fase gasosa e espectrometria de massa (Junting *et al.*, 1998; Snow, 2000; Yonamine *et al.*, 2003).

A espectrometria de massa é uma técnica com alta sensibilidade e alta especificidade, considerada de escolha para a confirmação de análises de drogas de abuso e recomendada por vários órgãos internacionais (Chasin & Lima., 1988; Maurer, 1992). A cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa é uma técnica complexa que requer experiência do analista no manuseio do equipamento, das amostras e na interpretação dos seus resultados.

No modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), o instrumento é selecionado para monitorar íons específicos da substância detectada, o que garante a especificidade da substância analisada. Quando o CG/MS é utilizado para quantificações, padrões internos deuterados são mais recomendados pois garantem melhores resultados (Maurer, 1992; Yonanime, M, 2000).

Frequentemente a Cromatografia Gasosa (CG) é a técnica instrumental empregada para as etapas de identificação e quantificação quando se utiliza microextração em fase sólida (SPME) .

2.6.1. Microextração em Fase Sólida (SPME)

A microextração em fase sólida (SPME) é uma microtécnica que pode ser definida como um processo de extração onde o volume da fase extratora é muito pequena em relação ao volume da amostra inicial e onde a extração dos analitos não é exaustiva, sendo uma técnica rápida, prática e de altas sensibilidade e especificidade.

O dispositivo básico de SPME é um bastão de fibra óptica, de sílica fundida, com 10mm de comprimento, e diâmetro de 110 a 169 μm , recoberto com filmes de até 100 μm de polímeros sorventes (polidimetilsiloxano – PDMS, poliacrilato – PA ou carbowax – CW) ou sólidos adsorventes (carvão microparticulado – Carboxen-CAR, divinilbenzeno-DVB) dispersos em polímeros misturas de CAR-PDMS, CW-DVB.

O princípio desta técnica baseia-se na sorção das espécies de interesse presentes na amostra, por um filme fino de sorvente depositado sobre a fibra de sílica fundida. Para a extração a parte com o material sorvente, exemplos citados acima, é colocada diretamente em contato com a amostra, como demonstrado na Figura 7.

Após a extração da amostra, a fibra é inserida diretamente no injetor do cromatógrafo a gás e os resultados analisados (Ulrich, 2000; Snow, 2000).

Esta técnica foi inicialmente desenhada para análises de solventes orgânicos voláteis em amostras ambientais. Variações desta técnica são aplicadas

para análises de praguicidas e amostras de ambiente e amostras biológicas após acidentes ou tentativas de suicídios (Junting *et al.*, 1998; Mills & Walker, 2000).

No entanto, uma grande variedade de aplicações têm sido dada a esta técnica, incluindo as análises das chamadas drogas de abuso, em várias matrizes, tais como água, urina, sangue cabelo, saliva, e outras (Snow, 2000; Mills, 2000; Yonamine *et al.*, 2003). Adequações da SPME para análises quantitativas de drogas de abuso em amostras *in natura*, como em maconha por exemplo, são necessárias e certamente promoverão uma grande e positiva mudança nas técnicas atualmente mais utilizadas.

A seguir esquema da utilização de SPME:

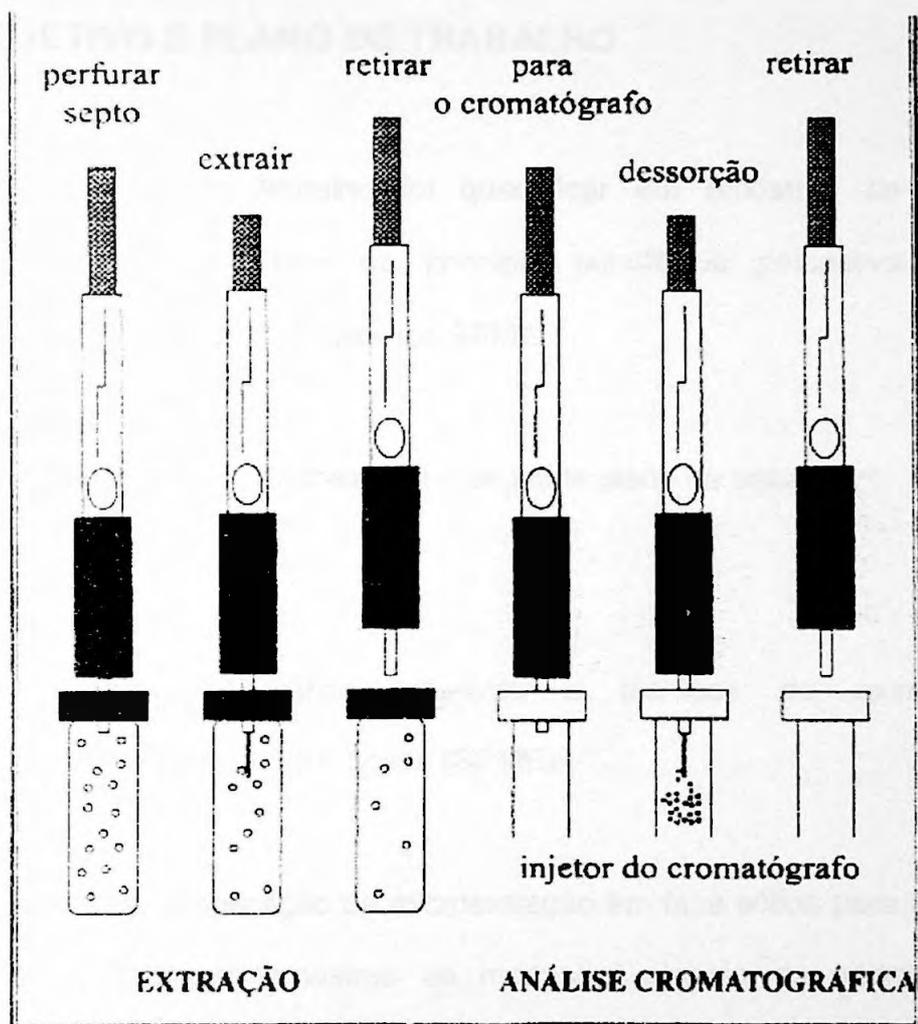


FIGURA 7 – Esquema da microextração em fase sólida.

3. OBJETIVO E PLANO DE TRABALHO

O objetivo deste trabalho foi quantificar em amostras de maconha (*Cannabis sativa L.*) o teor da principal substância psicoativa, o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), utilizando SPME.

Para tal objetivo foi estabelecido o seguinte plano de trabalho:

- Pesquisa bibliográfica referente a técnicas de extração por microextração em fase sólida (SPME);
- Investigar a aplicação da microextração em fase sólida para a extração de Δ^9 -THC em amostras de maconha, através da padronização e validação do método;
- Aplicação do método proposto para a detecção do Δ^9 -THC nas amostras fornecidas por autoridades da área de Segurança Pública da cidade de São Paulo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 *Materials*

4.1.1 Equipamentos e acessórios

- ◆ Sistema para Microextração em fase sólida (SPME) obtido da Supelco (Bellefonte, PA, USA), equipado com 100 μ m de polimetilsiloxane ligado a fibra de sílica

- ◆ Cromatógrafo em fase gasosa HP (Agilent) , modelo 6890, acoplado a detector seletivo de massa, modelo 5972 (Hewlett Packard, Little Falls, DF, USA).

- ◆ Coluna capilar de sílica fundida, marca HP, modelo HP5MS (30m x 0,25mm x 0,25 μ m).

- ◆ Gás carreador: Hélio.

4.1.2 Soluções e reagentes

- ◆ Reagentes comum em laboratórios foram utilizados para as fases analíticas e de pré-tratamento.
- ◆ Soluções de Δ^9 -THC e Δ^9 -THC-D3 (Padrão deuterado), 1mg/ml, foram obtidas da *Radian International* (Austin, TX, USA).
- ◆ Soluções de trabalho de Δ^9 -THC e Δ^9 -THC-D3 nas concentrações de 100, 10 e 1 μ g/ml foram preparadas em metanol.

4.1.3 Amostras de *Cannabis sativa* L. (maconha)

- ◆ Amostras de maconha foram fornecidas pelo Centro de Estudos, Análises e Pesquisas (CEAP), do Instituto de Criminalística (IC), vinculado a Secretaria de Segurança Pública do Estado de São Paulo (SSPSP). Após o recebimento as amostras foram acondicionadas ao abrigo da luz e colocadas em freezer até o momento da análise.
- ◆ Uma amostra de maconha apreendida no final do ano de 2002, após constatação da detecção de Δ^9 -THC, com uma área relativa (AR) apropriada foi utilizada como amostra de referência positiva.

- ◆ Amostras extremamente antigas foram utilizadas como referências negativas após constatação da não detecção de Δ^9 -THC.

4.2 Métodos

4.2.1 Padronização do Método

Para a padronização do método foram realizados os seguintes experimentos:

- ✓ Quantidade da amostra
- ✓ Temperatura de aquecimento
- ✓ Tempo de aquecimento

4.2.1.1 Escolha da quantidade de amostra

A proposta do método foi de utilizar uma quantidade mínima de amostra possível, garantindo representatividade da concentração do Δ^9 -tetraidrocanabinol da matriz analisada.

Para a escolha da quantidade de amostra foram analisados em sextuplicata, primeiramente, o total de 20mg e, posteriormente, o total de 50mg da amostra referência positiva e avaliados os resultados de suas áreas relativas - AR (área do amostra dividida pela área do padrão interno)

4.2.1.2 Escolha da temperatura

Foi adicionada 50 μ l do padrão de Δ^9 -THC (1 μ g/ μ l), em triplicata, a 5ml de NaOH 1M. Estes adicionados foram, posteriormente, submetidas a temperatura ambiente e a temperatura proposta de 70°C por vinte minutos.

4.2.1.3 Escolha da duração do pré-tratamento

Após a escolha da quantidade e da temperatura foram avaliados os tempos de 10, 20 e 30 minutos deste tratamento inicial, utilizando-se 50mg da amostra referência positiva, à temperatura de 70°C, conforme procedimento previsto em 4.2.5.

4.2.2 Validação do Método

Para a validação do método foram realizados os seguintes experimentos:

- ✓ Limite de Detecção
- ✓ Limite de Quantificação
- ✓ Linearidade (Coeficiente de correlação – r^2)
- ✓ Precisão Intra e Interensaio (Coeficiente de Variação)

4.2.2.1 Limite de detecção

O limite de detecção foi considerado como a menor concentração determinável com o coeficiente de variação menor ou igual a 20%, quando amostra de referência positiva foi avaliada, em sextuplicata, após diluições sucessivas desta amostra na amostra de referência negativa (denominada também de amostra matriz).

4.2.2.2 Limite de quantificação

O limite de quantificação foi considerado como a menor concentração determinável com o coeficiente de variação menor ou igual a 10%. Sua determinação foi realizada com quantificação da amostra referência positiva após diluições da mesma com a matriz utilizada para a padronização do método, testados em sextuplicata.

4.2.2.3 Avaliação linearidade do ensaio

Foi determinada uma curva com 6 (seis) pontos em triplicata, onde foram adicionados ao extrato da matriz utilizada para a padronização do método, após a diluição de 2.000 vezes prevista no método, objetivando as concentrações finais de Δ^9 -THC: 0,10; 0,50; 1,00 e 2,00; 4,00 e 5,00% de Δ^9 -THC, e determinados os valores médios das áreas relativas (AR) encontradas e o desvio padrão entre as mesmas. Este último não poderia ultrapassar limites aceitáveis de variação, mostrando assim uma variação do valores não superior a 10%. Foi determinado também o coeficiente de correlação (r^2) da curva obtida para a avaliação da linearidade do método.

4.2.2.4 Precisão intra-ensaio e interensaio

Para avaliação da precisão intra e interensaio, duas amostras de maconha estimadas em faixas diferentes de concentração, baixa e média, de Δ^9 -tetraidrocanabinol foram analisadas pelo método descrito em 4.2.5, em seis replicatas por 3 (três) dias consecutivos. As concentrações das amostras testadas foram 0,32 e 1,21% para a amostra baixa e média, respectivamente.

As precisões intra e interensaio foram expressas através do coeficiente de variação (CV)

Os coeficientes de variação para os ensaios acima, nas duas concentrações avaliadas, foram obtidos através da Análise de Variância (ANOVA, no programa Excel), que segue a seguinte equação:

$$\sigma = n \sigma_i^2 + \sigma_w^2 ,$$

onde,

σ : Variância total (variância intra + interensaio)

σi^2 : Variância interensaio

n : Número de replicatas

σw^2 : Variância intra-ensaio

$$CV_1 = \frac{\sqrt{\sigma i^2}}{\text{Média}} \quad \text{e} \quad CV_2 = \frac{\sqrt{\sigma w^2}}{\text{média}}$$

Onde:

CV1: Coeficiente de variação interensaio

σi^2 : Variância interensaio

Média: Média das médias

σw^2 : Variância intra-ensaio

4.2.3 Extração, identificação e quantificação do Δ^9 -THC

Para a fase de extração final do Δ^9 -THC foi utilizado o sistema de microextração em fase sólida (SPME), por 20 minutos e Cromatografia em fase Gasosa/Espectrometria de Massa.

4.2.4 Cromatografia em fase gasosa/Espectrometria de massa (GC/MS)

Foi utilizado um cromatógrafo gasoso, acoplado a um detector de massa e uma coluna capilar HP5MS, usando Hélio como gás de arraste a um fluxo constante de 0,6 ml/min. Foi utilizado um detector seletivo de massa por impacto eletrônico (70eV) em modo de monitoramento de íons seletivo (SIM). A temperatura de interface e do injetor foi de 280°C. A temperatura do forno foi mantida a 150°C por 2,0 (dois) minutos e programada para aumentar 15°C/minuto até a temperatura de 250°C e mantida nesta temperatura por mais 8 minutos. Os seguintes íons foram monitorados para análise(íons quantificadores estão sublinhados): THC: 231, 299, 314 e THC-D3: 302, 317.

4.2.5 Aplicação do método proposto em amostras de maconha

Amostras de maconha foram fragmentadas e homogeneizadas. A uma alíquota de 50mg de amostra foi adicionado 5,0ml de solução de NaOH 1M. Esta mistura foi mantida a 70°C por vinte minutos. Após este tempo, foi rapidamente resfriada. Após este procedimento de extração, uma solução, à partir do extrato inicial, foi preparada com uma diluição de 2.000 vezes em água destilada. Uma alíquota de 2,0ml, do extrato diluído, foi acidificada com 0,5ml de ácido acético glacial. A solução de Δ^9 -THC deuterado (Δ^9 -THC-D3), foi usado como padrão interno (50ng) e adicionado a solução diluída acidificada. Depois destes procedimentos, o sistema de microextração em fase sólida (SPME) foi introduzido no frasco com este último extrato, por 20 minutos sob agitação magnética. Após esta última fase de extração, o sistema SPME foi transferido para o CG/EM para análise, efetuada em um tempo total de 16 minutos, aproximadamente.

5. RESULTADOS

5.1 Padronização do Método

5.1.1 Escolha da quantidade de amostra

A menor quantidade que apresentou menores índices de coeficiente de variação (CV) encontrados foi de 50mg. Por isso foi a quantidade adotada para este estudo.

Com 20mg de amostra C.V. = 16,0% .

Com 50mg de amostra C.V. = 5,8%

5.1.2 Escolha da temperatura de extração

A temperatura com aquecimento (70°C) mostrou-se mais eficiente para a preparação do extrato bruto. Com maior média de Área relativa e CV adequado.

Temperatura ambiente:

Área relativa = 0,553

C.V. = 1,8%

Temperatura de aquecimento em 70°C:

Área relativa = 0,603

C.V. = 2,7%

5.1.3 Escolha do tempo de aquecimento

O menor tempo com melhores índices de preparação do extrato inicial e foi o tempo de vinte minutos. Sendo então adotado para este estudo. Este tempo apresentou a maior Área relativa e menor coeficiente de variação (CV).

Tempo de 10 minutos:

Média das áreas relativas = 0,212

Coeficiente de variação = 2,7%

Tempo de 20 minutos:

Média das áreas relativas = 0,282

Coeficiente de variação = 0,75%

Tempo de 30 minutos:

Média das áreas relativas = 0,259

Coeficiente de variação = 1,4%

5.2 Validação do Método

5.2.1 Avaliação do Limite de detecção

O limite de detecção para a técnica proposta foi de 0,05% de teor de Δ^9 -THC em amostras de maconha.

5.2.2 Avaliação do Limite de quantificação

O limite de quantificação para a técnica proposta foi de 0,15% de teor de Δ^9 -THC em amostras de maconha.

5.2.3 Avaliação linearidade do ensaio

A equação obtida ca concentração de Δ^9 -THC pela área relativa foi :

$$Y = 3,6527x - 0,0215$$

E o r^2 obtido foi de 0,9999.

5.2.4 Avaliação da precisão Intra e interensaio

Os coeficientes de variação (CV) intra e interensaio obtidos nas análises das amostras com níveis baixos (0,32%) e médios (1,21%) de Δ^9 -THC foram os seguintes:

Amostra com baixo teor:

C.V. intra ensaio = 7,9%

C.V. interensaio = 14,1%

Amostra com médio teor:

C.V. intra ensaio = 5,6%

C.V. interensaio = 9,3%

5.2.5 Quantificação do Δ^9 -THC nas amostras de maconha

Abaixo a Tabela 4 com os teores encontrados nas 28 amostras recebidas do Centro de Estudos, Análises e Pesquisas (CEAP) e quantificadas neste trabalho.

Tabela 4 – Teores de Δ^9 -THC nas amostras analisadas (% de Δ^9 -THC)

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO (% de Δ^9 -THC)
N ^o . 1	0,23
N ^o . 2	Abaixo do Limite de Quantificação
N ^o . 3	0,32
N ^o . 4	0,15
N ^o . 5	0,23
N ^o . 6	0,44
N ^o . 7	Abaixo do Limite de Quantificação
N ^o . 8	0,18
N ^o . 9	0,55
N ^o . 10	Abaixo do Limite de Quantificação
N ^o . 11	0,80
N ^o . 12	0,23
N ^o . 13	0,54
N ^o . 14	0,35
N ^o . 15	0,25
N ^o . 16	0,50
N ^o . 17	Abaixo do Limite de Quantificação
N ^o . 18	0,22
N ^o . 19	1,55
N ^o . 20	0,22
N ^o . 21	0,18
N ^o . 22	0,20
N ^o . 23	0,45
N ^o . 24	0,46
N ^o . 25	0,36
N ^o . 26	0,58
N ^o . 27	0,33
N ^o . 28	0,29

6. DISCUSSÃO

Atualmente há uma dúvida entre os estudiosos sobre drogas de abuso no Brasil. Esta dúvida se refere a qual os teores de Δ^9 -THC encontrados na maconha consumida neste país e, conseqüentemente, qual a impacto destes teores nos usuários deste droga. Especula-se, por exemplo, entre outras considerações, qual a influência destas concentrações no risco ao desenvolvimento da dependência e na manutenção do abuso a esta droga.

A hipótese, atualmente veiculada pelos meios de comunicação leiga, levanta a possibilidade da presença de amostras com elevados teores de Δ^9 -THC entre os usuários de maconha no Brasil. Esta realidade já foi observada em outros países e está presente em relatos nacionais e internacionais que buscam discutir o assunto dependência química (UNODCCP, 2000). No entanto não há indicação científica que esta mesma realidade se aplique aos produtos da *Cannabis* consumidos no Brasil.

Esta suposição, normalmente, se baseia em relatos informais da observação, em centros de recuperação e acompanhamento de usuários e dependentes de maconha, da diminuição de resposta ao tratamento por alguns destes dependentes e abusadores de maconha. Esta dificuldade no sucesso do tratamento, seria, portanto, fortemente influenciada pelo aumento no teor deste composto psicoativo. Outra especulação é sobre qual a influência destes teores sobre o número de usuários de maconha no Brasil. Neste caso, a relação entre o

possível aumento no número de usuários desta droga ilícita com os teores de Δ^9 -THC também não está perfeitamente esclarecida.

Estas hipóteses, comentadas acima, têm sido mais frequentemente relatadas no Brasil à partir da última década.

Estes níveis do principal composto psicoativo teriam, portanto, grande responsabilidade sobre o crescente número de indivíduos que buscam tratamento em função do descontrole na sua relação com esta droga de abuso. Consequentemente, seria esta lógica quantitativa dos teores de Δ^9 -THC nas amostras de maconha, um dos principais fatores responsáveis pela dependência e abuso da maconha. Todas estas hipóteses, portanto, levam em consideração a presença destes maiores índices nos cigarros de maconha consumidos no Brasil, ficando evidente a necessidade da comprovação científica deste importante dado, sobretudo, naquelas amostras que chegam até o usuário de *Cannabis*.

Com o objetivo de verificar quais os reais teores de Δ^9 -THC presentes em amostras de maconha revisou-se, em primeiro lugar, a literatura científica sobre análises quantitativas já realizadas. Os dados encontrados, no entanto, se referem, principalmente, a análises realizadas nas décadas de 70 e 80 (Backer *et al.*, 1970; Fetterman *et al.*, 1971; Ferteman & Tumer, 1972; Chiesa *et al.*, 1973; Fairbairn & Liebmann, 1974; Fairlie *et al.*, 1976; Baker, *et al.*, 1980; Avico *et al.*, 1985). E, não há dados recentes referentes a produtos de origem brasileira ou de países vizinhos. Os dados existentes sobre maconha apreendida no Brasil relatam achados da década de 70 (Takahashi *et al.*, 1977; Karniol & Carlini, 1972).

Neste trabalho, portanto, procurou-se, inicialmente, um modelo analítico que pudesse quantificar estes teores nas amostras de maconha *in natura*. Este método deveria garantir total confiabilidade analítica e, se possível, minimizar ou mesmo abolir o uso de solventes orgânicos. Esta última necessidade deu-se em função das atuais discussões sobre as exposições ocupacionais e questões ambientais que envolvem diretamente o uso destes solventes.

Neste momento alguns problemas foram encontrados. Por exemplo, a grande maioria dos métodos mais atuais é proposta para a determinação em amostras biológicas; praticamente a totalidade destes utiliza solventes orgânicos como líquidos extratores, gerando resíduos ambientais e exposição ocupacional. E a maioria dos métodos utilizava extração líquido-líquido (Stefanidou, *et al.*, 1998; Poortman-van & Hizer, 1999; Zoller *et al.*, 2000).

No entanto, na avaliação do método por microextração em fase sólida (SPME) e Cromatografia em Fase Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG/EM) este pareceu responder às necessidades e objetivos deste trabalho, o que de fato aconteceu, como pode ser confirmado com os resultados obtidos na sua validação.

A microextração em fase sólida, pela primeira vez aplicada para esta finalidade de quantificação de canabinóide, resolveu as questões referentes a extração sem o uso de solventes orgânicos, facilidade e agilidade do método. E a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa resolveu questões relacionadas a limites de detecção e quantificação, sensibilidade e especificidade do método proposto.

O método de extração por SPME apresentou excelentes índices para a avaliação quantitativa de Δ^9 -THC, onde os limites de detecção e quantificação foram muito baixos (0,05 e 0,15% respectivamente), suficientes para a distinção entre as drogas tipo-fibra daquelas com níveis de Δ^9 -tetrahidrocanabinol com potencial de psicoatividade importantes, chamadas *Cannabis* tipo-droga.

O método proposto pode ser, então, perfeitamente utilizado para a determinação quantitativa do Δ^9 -THC nas amostras identificadas como *Cannabis sativa L.* encaminhadas pelo Instituto de Criminalística de São Paulo.

Após a padronização e validação do método proposto, o próximo passo seria a análise de amostras de maconha.

A idéia inicial era a análise do maior número possível de amostras da região da Grande São Paulo e de outras apreendidas em alguma região do interior paulista.

Neste momento surgiu um outro problema a ser solucionado. A formalização, para a disponibilidade destas amostras para pesquisas, entre os órgãos oficiais responsáveis pela apreensão, análise e guarda destes compostos e as Universidades ou outros órgãos de pesquisa que queiram obter tais amostras ainda é um grande entrave para a realização destes estudos.

Esta dificuldade nesta relação entre Instituições de pesquisa e estes órgãos oficiais deverão ser repensadas para que o trabalho conjunto possibilite a melhor compreensão, baseada em dados científicos, de importantes questões relacionadas ao uso, abuso e tráfico de drogas no Brasil.

Em função destas dificuldades somente foi possível a obtenção das amostras de maconha apreendidas na região da Grande São Paulo, pela valiosa colaboração do Centro de Estudos, Análises e Pesquisas (CEAP), Unidade vinculada ao Instituto de Criminalística da Secretaria de Segurança Pública do Estado de São Paulo.

Após este acordo seriam analisadas amostras de maconha apreendidas na região da grande São Paulo.

Para este estudo foram disponibilizadas 28 amostras de maconha, que haviam sido apreendidas recentemente e encaminhadas para análise e emissão de laudo técnico de apreensão.

Levando-se em consideração o limite de diferenciação entre amostras com potencial de psicoatividade importante reconhecido pela União Européia (Fetterman et al., 1971; Avico et al, 1985), que é de 0,3%, o trabalho mostrou os seguintes dados:

- Do total de amostras, 50% apresentaram teores abaixo do limite de 0,3%;
- O maior teor de Δ^9 -THC, encontrado em apenas uma amostra foi de 1,55%, o que representou 3,57% do total de amostras analisadas.
- Em 96,43% do total de amostras analisadas o teor de Δ^9 -THC estava abaixo de 1,0%.

- Entre aquelas que apresentaram os teores mais baixos, 14,28% continham valores inferiores ao limite de quantificação do método (0,15%).
- Todas as amostras apresentaram valores significativamente inferiores àqueles especulados nos meios de comunicação leiga, ou seja, valores, no mínimo, superiores a 5,0%. Tampouco apresentaram valores próximos daqueles reconhecidos para amostras de “skank” ou, como são também denominadas estes produtos, de “super-maconha”

Estes resultados sugerem que os teores do principal componente psicoativo da maconha, fumada no Brasil atualmente, não sejam altos. Levando em consideração ainda, que somente 50% deste teor estará presente na fumaça do cigarro, provavelmente, o usuário destas amostras de maconha não esteja sendo submetido a níveis tão elevados de canabinóides quanto aqueles que sugerem as hipóteses levantadas no início desta discussão.

Os resultados obtidos confirmam afirmações isoladas e não oficiais, por parte de autoridades policiais e estudiosos sobre consumo de substâncias ilícitas que, provavelmente, a maconha mais amplamente consumida no Brasil possua baixos teores de Δ^9 -THC.

Isto se daria, principalmente, pelo fato da maconha, na forma como é encontrada no Brasil, ser um produto da mistura de várias partes da planta (conforme Tabela 1), manipulada e estocada sob condições que possibilitam a degradação do Δ^9 -THC e ainda, muito provavelmente, adulterada com a adição de vários outros produtos (Takahashi et al., 1977; Reinhardt, 1992).

É bastante considerável a possibilidade de a presença de outras variedades mais potentes, como o "skank", por exemplo, serem exceções minoritárias no conjunto do tráfico e consumo de produtos desta planta neste país.

No Brasil as amostras de *Cannabis*, são provenientes da produção interna desta planta (*Cannabis sativa L.*) somadas a outras oriundas do tráfico internacional e provenientes, principalmente das américas do Sul e Central (Polícia federal, 2003). Estas plantas, oriundas destas regiões, não parecem ainda ter sofrido modificações de cultivo e variedade genética, a ponto de terem determinado mudança significativa nos teores de canabinóides nelas presentes.

Esta realidade influencia fortemente a concentração do Δ^9 -THC nestas amostras, diminuindo a relação concentração do principal agente psicoativo pelo peso total do cigarro de maconha, por exemplo. Como citado anteriormente, todas estas influências tem que ser avaliadas para a determinação mais realista das concentrações deste canabinóide na maconha consumida no Brasil.

Há a necessidade de estudos mais abrangentes, que analisem amostras de diferentes áreas geográficas do Brasil, incluindo aí amostras de outros estados. E que analisem também um maior número de amostras para que se conheça, baseados em dados técnicos e científicos, os verdadeiros teores de Δ^9 -THC presentes nas amostras de maconha apreendidas no Brasil.

No entanto, não se deve perder de vista outras possibilidades que não aquela relacionadas à concentração de Δ^9 -THC que possam levar a melhor compreensão da realidade epidemiológica do consumo de *Cannabis* neste país. Fatores como condições sociais, econômicas, culturais, acessibilidade a esta droga, fidelidade dos dados disponíveis e/ou veiculados, demanda do tráfico, entre outras, têm sempre que estar presentes no contexto destas discussões.

Portanto, de acordo com a investigação realizada por este trabalho, ao contrário do propagado pelos meios de comunicação leiga, os teores de Δ^9 -THC da maconha consumida no Estado de São Paulo parecem ser baixos e, conseqüentemente, distantes dos teores, por vezes, veiculados pela mídia.

7. CONCLUSÕES

- A técnica de Micro Extração em Fase Sólida (SPME), forneceu extratos com adequado grau de pureza analítica além da eliminação de solventes orgânicos durante o processo de extração.
- O método proposto apresentou os seguintes limites de detecção e quantificação: 0,05% e 0,15%, respectivamente. Estes e os demais valores da validação mostraram que o método pode ser utilizado para a determinação quantitativa de Δ^9 -THC em amostras de maconha
- Os teores de Δ^9 -THC variaram de < 0,15% (limite de quantificação) a 1,55% .
- O método proposto poderá ser aplicado em novos estudos que possibilitem uma maior abrangência de área territorial e um maior número de amostras, que poderão oferecer maiores informações a respeito da maconha consumida no Brasil.
- Utilizando-se os limites preconizados pela União Européia, do total de amostras analisadas 50% apresentaram teor de Δ^9 -THC abaixo de 0,3%, e seriam classificados como produtos de plantas tipo-fibra.

- De acordo com os resultados obtidos, os teores de Δ^9 -THC nas amostras de maconha apreendidas na região da grande São Paulo são baixos. Pois 96,43% das amostras analisadas apresentaram teor de Δ^9 -THC abaixo de 1,0%, onde 14,28% do total das amostras analisadas estavam abaixo de 0.15% (LOQ)
 - O teor mais alto encontrado neste estudo (uma amostra com 1,55%) está ainda muito abaixo dos teores comentados através dos meios de comunicação leiga. E é pouco provável que esta amostra seja produto de variedades mais potentes de *Cannabis*, como o “skank” ou outro similar.
-

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOOD, M.E.; MARTIN, B.R. Neurobiology of marijuana abuse. *Trends Pharmacol. Sci.*, Oxford, v.13, p.201-206, 1992.

ANVISA. Legislação. Resolução. Disponível em:
http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/344_98.htm. Acesso em: 20 mai. 2003.

ARTHUR, C., PAWLISZYN, J. Solid microextraction with thermal desorption using silica optical fibers, *Anal. Chem.*, Washington, v.62, p.2145-2148, 1990.

ASHTON, C.H. Pharmacology and effects of *cannabis*: a brief review. *Br. J. Psychiatry*, London, v.178, p.101-106, 2001.

AVICO, U.; PACIFICI, R.; ZUCCARO, P. Variations of tetrahydrocannabinol content in cannabis plants to distinguish the fibre-type from drug-type plants, *Bull. Narc.*, New York, v.37, n.4, p.61-65, 1985.

BACKER, R.C.; JENSEN, M.S.; BECK, A.G.; BARNETT, M.S. A simple method for the infrared identification of cannabinoids of marijuana resolved by gas chromatography, *J. Forensic Sciences*, Philadelphia, v.15, n.2, p.287-291, 1970.

BAKER, P.B.; BAGON, K.R.; GOUGH, T.A. Variation in the THC content in illicitly imported Cannabis products, *Bull. Narc., New York*, v.32, n.4, p.47-52, 1980.

CALIGNANO, A.; La RANA, G.; GIUFFRIDA, A.; PIOMELLI, D. Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature*, London, v.394, n.690, p.277-281, 1998.

CARLINI, E.A. Maconha (*Cannabis sativa*): Mito e realidade, fatos e fantasias. *Med. Cult., São Paulo*, v.36, p.24-33, 1982.

CARLINI, E.A.; GALDURÓZ, J.C.F.; NOTO, A.R.; NAPPO, S.A. *I levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil: 2001*. São Paulo: SENAD/CEBRID, 2002. p.66-67.

CHASIN, A.A.M.; LIMA, I.V. Detecção de cocaína, cocaetileno e benzoecgonina em urina por técnicas cromatográficas (HPTLC, GC-FID e GC-MS). *Rev. Bras. Toxicol.*, São Paulo, v.11, n.2, p.45-49, 1998.

CHIESA, E.P.; RONDINA, R.V.D.; COUSSIO, J.D. Chemical composition and potential activity of Argentine marihuana. *J. Pharm. Pharmacol.*, London, v.25, p.953-956, 1973.

CHILDERS, S.R.; BREIVOGEL, C.S. *Cannabis* and endogenous cannabinoid systems. *Drug Alc. Dep.*, Shannon, v.51, p.173-187, 1998.

DENNIS, M.; TITUS, J.C.; DIAMOND, G.; DONALDSON, J.; GODLEY, S.; KAMINER, Y.; BABOR, T.; ROEBUCK, M.C.; GODLEY, M.D.; HAMILTON, I. The *Cannabis* Youth Treatment (CYT) experiment: rationale, study design and analysis plan. *Addiction*, Edinburgh, v.9, p.504-508, 2002.

DEVANE, W.A.; DYSARZ, F.A.I.; JOHNSON, M.R.; MELVIN, L.S.; HOWLWTT, A.C. Determination and characterization of a cannabionoid receptor in rat brain, *Mol. Pharmacol.*, Bethesda, v.34, p.605-613, 1988.

DEVANE, W.A.; HANUS, L.; BREUER, A.; PERTWEE, R.G.; STEVENSON, L.A.; GRIFFIN, G.; GIBSON, D.; MANDELBAUM, A.; ETINGER, A.; MECHOULAM, R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor, *Science*, Washington, v. 258, p. 1946-1949, 1992.

DRUMMER, O.H. *The forensic pharmacology of drugs of abuse*. New York: Oxford University Press, 2001. cap.4, p.177-212.

FAIRBAIRN, J.W.; LIEBMANN, J.A. The cannabinoid content of *Cannabis sativa* L grow in England, *J. Pharm. Pharmacol.*, London, v.26, p.413-419, 1974.

FAIRLIE, K.; LAWRENCE FOX, B. Rapid, quantitative determination of tetrahydrocannabinol in marihuana by gas chromatography, *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.14, p.334-335, 1976.

FETTERMAN, P.S.; KEITH, E.S.; WALLER, C.W.; GUERRERO, O.; DOORENBOS, N.J.; QUIMBY, M.W. Mississippi-grown *Cannabis sativa* L. preliminary observation on chemical definition of phenotype and variations in tetrahydrocannabinol content versus age, sex and plant parts, *J. Pharm. Sci.*, Washington, v.60, p.1246-1249, 1971.

FETTERMAN, P.S.; TURNER, C.E. Constituents of *Cannabis sativa* L. I. Propyl homologues of cannabinoids from a Indian variant, *J. Pharm sci*, Washington, v.61, n.9, p.1476-1477, 1972.

HARDMAN, J.G.; LIMBERD, L.E.; MOLINOFF, P.B.; RUDDON, R.W.; GILMAN, A.G., eds. *Goodman & Gilman as bases farmacológicas da terapêutica*. 9.ed. México: Macmillan Publishing, 1996. p.416-420.

HERKENHAM, M.; LYNN, A.B.; JOHNSON, M.R.; MELVIN, L.S.; de COSTA, B.R.; RICE, K.C. Characterization and localization of cannabinoids receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study, *J. Neurosci.*, Washington, v.11, p.563-583, 1991b.

HERKENHAM, M.; LYNN, A.B.; LITTLE, M.D.; JOHNSON, M.R.; MELVIN, L.S.; de COSTA, B.R.; RICE, K.C. Cannabinoid receptor localization in brain, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, New York, v.87, p.1932-1936, 1990.

HOLLISTER, L.E.; Health aspects of *cannabis*, *Pharmacol. Rev.*, Baltimore, v.38, p.1-20, 1986.

HOWLETT, A.C. Pharmacology of cannabinoid receptors, *Ann. Ver. Pharmacol. Toxicol.*, Palo Alto, v.35, p.607-634, 1995.

JULIEN, R.M. A concise, nontechnical guide to the actions, users and side effects of psychoactive drugs. In: _____. *A primer of drug action*. 8.ed. New York: Freeman and Company, 1998. cap.11, p.319-349.

JUNTING, L.; PENG, C.; SUZUKI, O.; Solid-phase microextraction (SPME) of drugs and poisons from biological samples, *Forensic Sci. Int.*, Lausanne, v.97, p.93-100, 1998.

KAWINSKI, N.E.; ABOOD, M.E.; KESSLER, F.K.; MARTIN, B.R.; SCHATZ, A.R. Identification of a functionally relevant cannabinoid receptor on mouse spleen cells that is involved in cannabinoid-mediated immune modulation, *Mol. Pharmacol.*, Bethesda, v.42, p.736-742, 1992.

KAYMAKÇALAN, S. The addictive potential of *cannabis*, *Bull Narc.*, New York, v.33, n.2, p.21-31, 1981.

KELLY, P.; JONES, R.T.; Metabolism of tetrahydrocannabinol in frequent and infrequent marijuana users, *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.16, n.4, p.228-235, 1992.

KUMAR, R.N.; CHAMBERS, W.A.; PERTWEE, R.G. Pharmacological actions and therapeutic uses of *cannabis* and cannabinoids, *Anaesthesia*, Oxford, v.56, p.1059-1068, 2001.

LEZA CERRO, J.C. Cannabis. In: LORENZO, P.; LADERO, J.M.; LEZA, J.C.; LIZASOAIN, I. *Drogodependências*. Madri: Médica Panamericana, 1999. cap.16-17, s.VI, p.191-199.

LORD, H.; PAWLISZYN, J. Microextraction of drugs: review. *J. Chromatogr., A*, Amsterdam, v.902, p.17-63, 2000.

MANZANARES, J.; CORCHERO, J.; ROMERO, J.; FERNANDEZ-RUIZ, J.J.; RAMOS, J.A.; FUENTES, J.A. Pharmacological and biochemical interactions between opioids and cannabinoids. *TIPS*, Oxford, v.20, p.287-293, 1998.

MARDEROSIAN, A.H.; MURTHY, S.N.S. Analysis of old samples of *Cannabis sativa L.*, *J. Forensic Sci.*, Philadelphia, v.19, n.3, p.670-675, 1974.

MATSUDA, L.A.; LOLAIT, S.J.; BROWNSTEIN, M.J.; YOUNG, A.C.; BONNER, T.I. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA, *Nature*, London, v.346, p.561-564, 1990.

MAURER, H.H. Systematic toxicologic analyses of drugs and their metabolites by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, Amsterdam, v.580, p.3-41, 1992.

McAVOY, Y.; BACKSTROM, B.; JANHUNEN, K.; STEWART, A.; COLE, M.D.; Supercritical fluid chromatography in forensic science: a critical appraisal, *Forensic Sci. Int.*, Lausanne, v.99, p.107-122, 1999.

MECHOULAM, R.; HANUS, L. A historical overview of chemical research on cannabinoids. *Chemistry Physics Lipids*, Cambridge, v.108, p.1-13, 2000.

MEIJER, E.P.M.; VAN DER KAMP, F.A.; VAN EEUWIJK, F.A. Characterization of cannabis accessions with regard to misused content in relation to other plant characteristics, *Euphytica*, Dordrecht, v.62, p.187-200, 1992.

MERCK Index. 12.ed. Withehouse Station, 1996. P.317-316.

MILLS, G.A.; WALKER, V. Headspace solid-phase microextraction procedures for gas chromatographic analysis of biological fluids and materials: review, *J. Chromatogr., A*, Amsterdam, v.902, p.267-287, 2000.

MOREAU, R.L.M. *Cannabis*. In: OGA, S. *Fundamentos de toxicologia*. São Paulo: Ed. Atheneu, 2003. cap.4.8, p.307-317.

MUNRO, S.; THOMAS, K.L.; ABU-SHAAR, M. Molecular characterization of peripheral receptor for cannabinoids, *Nature*, London, v.365, p.61-65, 1993.

MURAD, J.E.; Maconha: A toxicidade silenciosa, Belo Horizonte, Ed. O Lutador, 252p, 1996.

NAHAS, G.G. *Cannabis*: toxicological properties and epidemiological aspects, *The Medical Journal of Australia*, Kingstown, v.145, p.82-87, 1986.

OROSZLÁN, P., VERZÁR-PETRI, G., Separation, quantification and isolation of cannabinoids from *cannabis sativa L.* by overpressured layer chromatography, *J. chromatogr.*, Amsterdam, v.338, p.217-224, 1987.

PERTWEE, R.G. The central pharmacology of psychotropic cannabinoids, *Clin. Pharmacol. Ther.*, St Louis, v.36, p.189-261, 1988.

PITTS, J.E.; O'NEIL J.O.; LEGGO, K.P. Variation in the THC content of illicitly imported *Cannabis* Products – 1984 – 1989, *J. Pharm Pharmacol.*, London, v.42, p.817-820, 1990.

POLÍCIA FEDERAL. Ministério da Justiça. Departamento de polícia Federal. Estatísticas. Disponível em: <http://www.dpf.gov.br/estatisticadrogas.html>. Acesso em: 06 jun. 2003.

POORTMAN-VAN DER MEER, A.J.; HUIZER, H. A contribution to the improvement of accuracy in the quantitation of THC, *Forensic Sci. Int.*, Lausanne, v.101, p.1-8, 1999.

PRADO, A. B. Contribuição para o conhecimento da maconha brasileira, *An. Farm. Quim.*, São Paulo, v.10, n.11-12, p.172-176, 1959.

QUEIROZ, S.C.N.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica, *Quim. Nova*, São Paulo, v.24, n.1, p.68-76, 2001.

RASMUSSEN, K.E.; RASMUSSEN, S.; BAERHEIM SVENDSEN, A. Quantitative determination of cannabinoids in *cannabis* by means of gas-liquid chromatography and solid injection, *Acta Pharm. Suecica*, Estocolmo, v.9, p.457-462, 1972.

RAZDAN, R.K.; HOWES, J.F. Drugs related tetrahydrocannabinol, *Med. Res. Ver.*, Pittsburgh, v.3, p.119-146, 1983.

REINHARDT, V.E.D. *Aspectos da análise toxicológica forense para identificação de usuários de Cannabis*. São Paulo, 1992. 133p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

RINALDI-CARMONA, M.; BARTH, F.; HEAULME, M.; SHIRE, D.; CALANDRA, B.; CONGY, C.; MARTINEZ, S.; MARUANI, J.; NELIAT, G.; CAPUT, D.; FERRARA, P.; SOUBRIE, P.; BRELIERE, J.C.; LE FUR, G. SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor, *FEBS Lett*, Bruxelles, v.350, p.240-244, 1994.

SARAFIAN, T.A.; TASHKIN, D.P.; ROTH, M.D. Marijuana smoke and Δ^9 -tetrahydrocannabinol promote necrotic cell death but inhibit faz-mediated apoptosis, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, New York, v.174, p.264-272, 2001.

SILVA, B.O., *Cannabis sativa* and the tetrahydrocannabinols: a review. *Arch. Pharm. Chem., Sci. Ed.*, New York, v.13, p.87-97, 1985.

SNOW, N.H., Solid-phase micro-extraction of drugs from biological matrices. *J. Chromatogr., A*, Amsterdam, v.885, p.445-455, 2000. [Review].

SOUBHIA, P.C., *Período de detecção de canabinóides urinários por imunofluorescência polarizada em população usuária de Cannabis*. São paulo, 1999. 80p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

STARK, P.; DEWES, P.B. Cannabinoids I. Behavioral effects. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Baltimore, v.214, p.125-130, 1980.

STEFANIDOU, M.; DONA, A.; ATHANASELIS, S.; PAPOUTSIS, I.; KOUTSELINIS, A., The cannabinol content of marihuana samples seized in Greece and its forensic application, *Forensic Sci. Int.*, Lausanne, vol.95, p.153-162, 1998.

TAKAHASHI, R.N.; ZUARDI, A.W.; KARNIOL, I.G. Composição química e importância dos diversos constituintes na atividade farmacológica de amostras de *Cannabis sativa* brasileiras. *Rev. Bras. Pesq. Méd. e Biol.*, São Paulo, v.10, n.6, p.379-385, 1977.

TURK, R.F.; DHARIR, B.S.; FORNEY, B.R. A simple chemical method to identify marihuana, *J. forensic sciences*, Philadelphia, v.14, n.3, p.389-392, 1969.

TURK, R.F.; MANNO, J.E.; JAIN, N.C.; FORNEY, R.B. The identification, isolation, and preservation of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), *J. Pharm. Pharmacol.*, London, v.23, p.190-195, 1971.

ULRICH. S., Solid-phase microextracion in biomedical analysis. *J. Chromatogr., A*, Amsterdam, v.902, p.167-194, 2000. [Review].

UNITED NATIONS OFFICE FOR DRUG CONTROL AND CRIME PREVENTION.
World drug report 2000. Oxford: Oxford University Press, 2000.

WHEAS, B.B.; SMITH, R.N. A comparison of high-pressure liquid chromatography with other chromatographic techniques, *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.105, p.396-400, 1975.

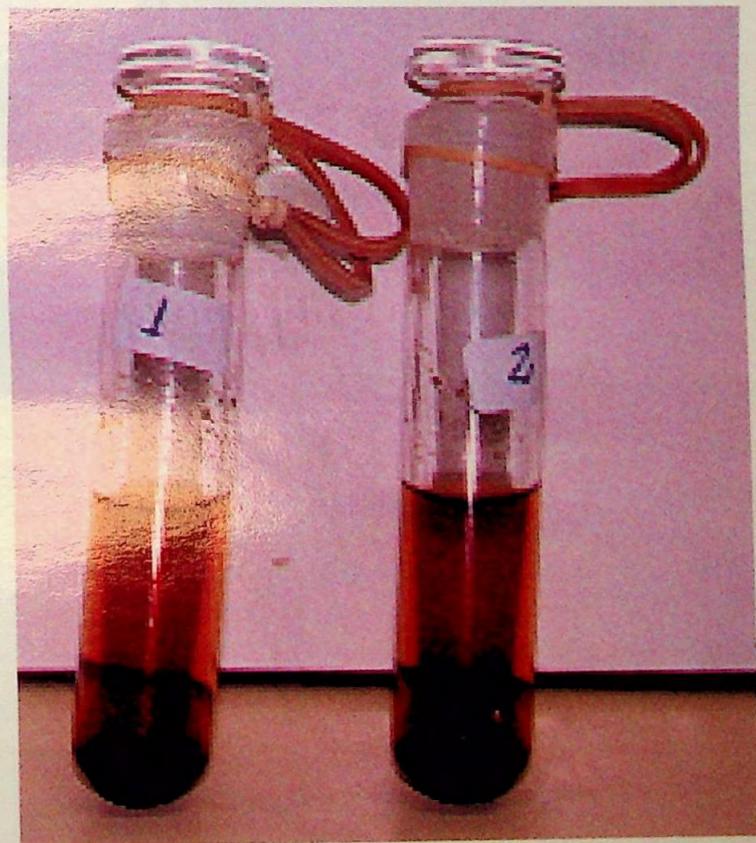
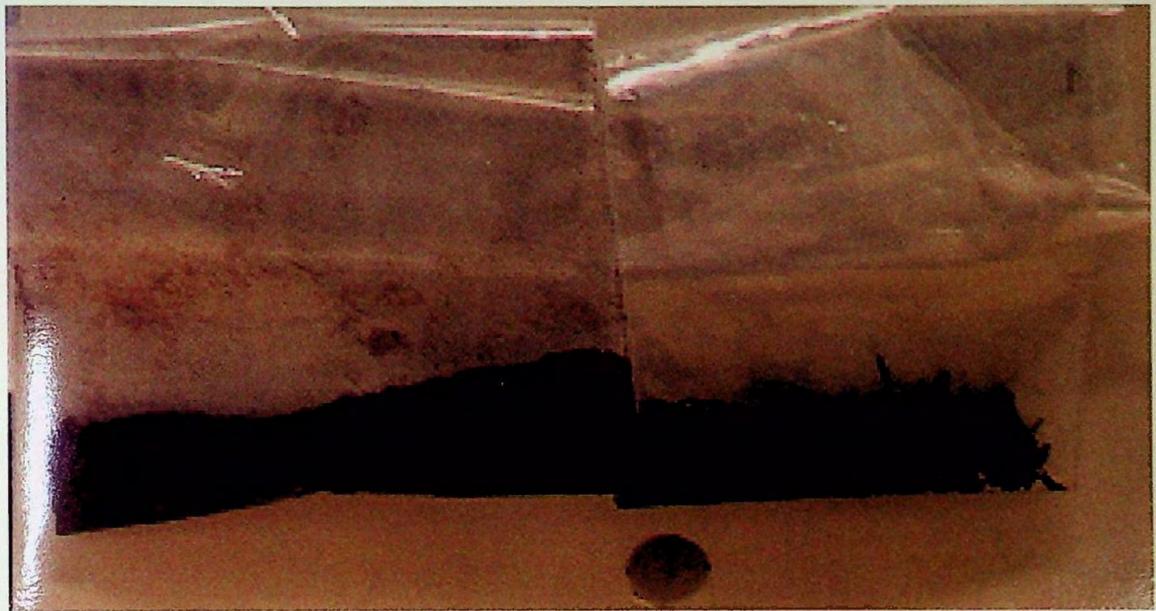
YONAMINE, M. *Derivação de benzoilecgonina urinária com diazometano para verificação da exposição à cocaína por técnicas cromatográficas*. São Paulo, 2000. 96p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

YONAMINE, M.; TAWIL, N.; MOREAU, R.L.M.; SILVA, O. A. Solid-phase micro-extraction-gas chromatography-mass spectrometry and headspace-gas chromatography of tetrahydrocannabinol, amphetamine, methamphetamine, cocaine and ethanol in saliva samples. *J. Chromatogr., B*, Amsterdam, v.789, p.73-78, 2003.

ZOLLER, O.; RHYN, P.; ZIMMERLI, B. High-performance liquid chromatographic determination of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and the corresponding acid in hemp containing foods with special regard to the fluorescence properties of Δ^9 -tetrahydrocannabinol, *J. Chromatogr., A*, Amsterdam, v.872, p.101-110, 2000.

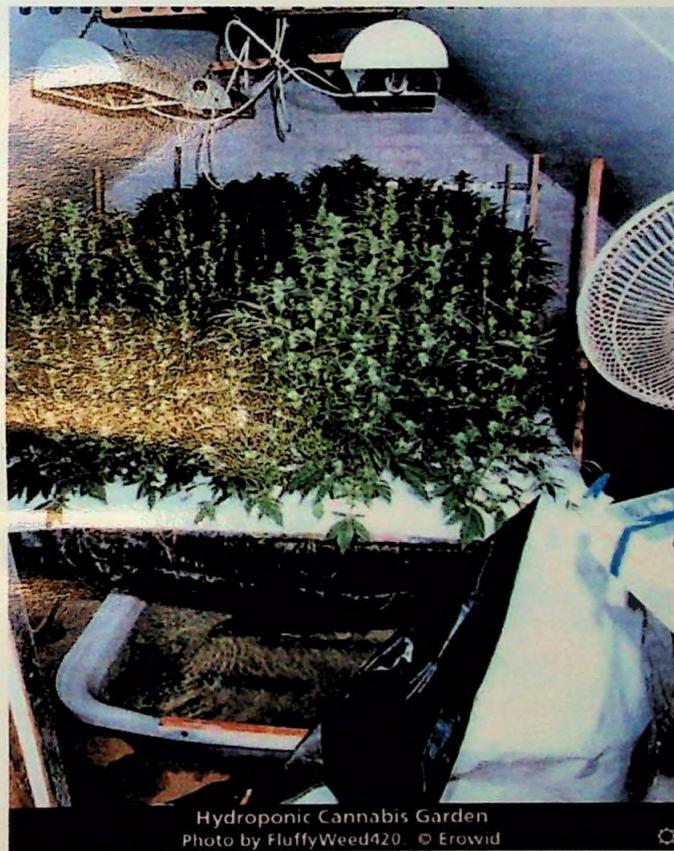
9. ANEXOS

Anexo 1 – Fotos ilustrativas do material de estudo (maconha) e de alguns materiais e métodos utilizados.

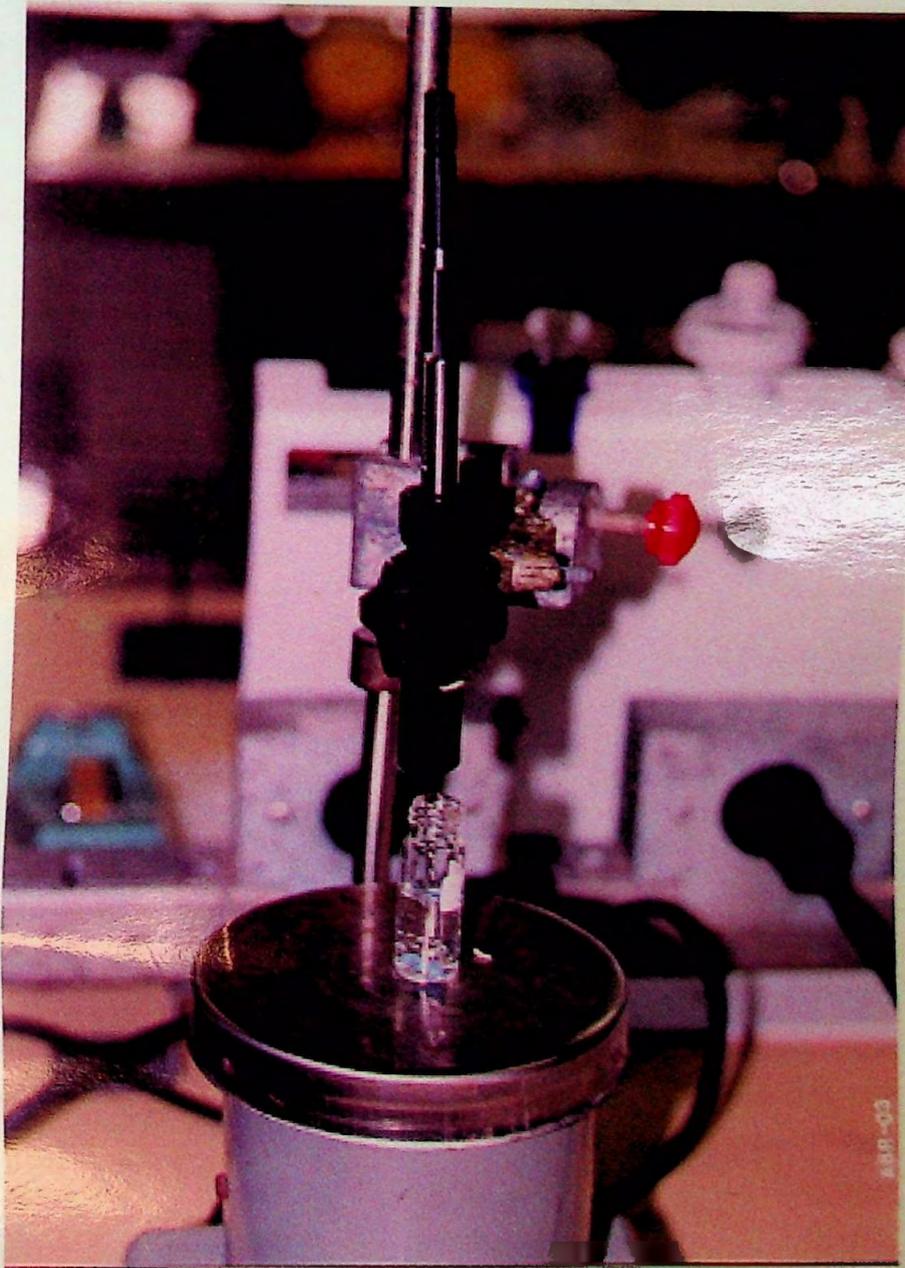




Seringas adaptadas para Microextração em Fase Sólida (SPME)



Planta com estruturas femininas em destaque (pistilos) – e cultura hidropônica



Sistema com seringa adaptada para microextração em fase sólida