

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para a  
determinação de canabidiol e tetraidrocanabinol em amostras  
de plasma por cromatografia em fase gasosa/espectrometria  
de massas**

Stefania Pimenta Serrambana Camargo

Ribeirão Preto

2008

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para a  
determinação de canabidiol e tetraidrocanabinol em amostras  
de plasma por cromatografia em fase gasosa/espectrometria  
de massas**

Dissertação de Mestrado apresentada  
ao Programa de Pós-Graduação em  
Toxicologia para obtenção do Título de  
Mestre em Toxicologia  
Área de Concentração: Toxicologia.

**Orientada: Stefania Pimenta Serrambana Camargo**  
**Orientador: Bruno Spinosa De Martinis**

Ribeirão Preto  
2008

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Serrambana Camargo, Stefania Pimenta

Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para a determinação de canabidiol e tetraidrocannabinol em amostras de plasma por cromatografia em fase gasosa/espectrometria de massas

57p. il. 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: De Martinis, Bruno Spinosa

1. Canabidiol. 2. Validação. 3. CG/EM

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Stefania Pimenta Serrambana Camargo

Título do trabalho: Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para a determinação de Canabidiol e Tetraidrocanabinol em amostras de plasma por cromatografia em fase gasosa/espectrometria de massas

Dissertação de Mestrado apresentada  
ao Programa de Pós-Graduação em  
Toxicologia para obtenção do Título de  
Mestre em Toxicologia  
Área de Concentração: Toxicologia  
Orientador : Bruno Spinosa De Martinis

Aprovado em:

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_  
Instituição: \_\_\_\_\_  
Assinatura: \_\_\_\_\_

---

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_  
Instituição: \_\_\_\_\_  
Assinatura: \_\_\_\_\_

---

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_  
Instituição: \_\_\_\_\_  
Assinatura: \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, João e Angela, meus amores; eternos incentivadores;

Ao Paulo Eduardo, meu amado; pelo carinho;

Ao Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis, meu mestre; por confiar e apoiar o meu trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por mais uma oportunidade de crescimento espiritual e profissional.

À Profa. Dra. Regina Helena Costa Queiroz, pela oportunidade, por me receber carinhosamente em seu laboratório e por tantos conhecimentos transmitidos.

Ao Prof. Dr. Bruno Spinosa de Martinis por me acolher gentilmente no Cemel, possibilitando o término do trabalho iniciado. Agradeço por cada palavra de incentivo nos momentos difíceis, sempre confiando em minha capacidade. Muito obrigada por compartilhar tantos conhecimentos e experiências de vida.

Ao Prof. Dr. Wilson Roberto Malfará pela grande colaboração em todas as etapas do trabalho, pelo incentivo nos momentos de desânimo e pelos muitos conhecimentos generosamente transmitidos.

Ao Prof. Dr. José Alexandre de Souza Crippa pela oportunidade de se trabalhar em conjunto, pelo apoio na seleção dos voluntários e pela paciência com demora da obtenção dos resultados

À Sonia Dreossi, mãe querida, pelos inúmeros conhecimentos, pela generosidade e o enorme carinho.

À Gilda Gatto e à Cidinha Buzetto pela atenção e carinho. Sempre me apoiando em todos os momentos.

À Sandra Bernardo pelo grande apoio nos experimentos com os voluntários, pela atenção, paciência e disposição em ajudar.

Ao Rodrigo Miotto e à Ângela Ruzene, queridos amigos do Cemel, por me apoiarem na realização desse trabalho.

Ao Thiago Gianetti e aos técnicos da VARIAN, Vanderlan, Rodrigo, Adailton, Cláudio e Fábio pelos auxílios e treinamentos para utilização dos equipamentos.

À querida amiga Marcella Daruge Grando, por compartilhar tantos momentos durante a realização desse trabalho, pela sua grande colaboração e amizade.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de aprendizado.

À FAPESP pelo auxílio financeiro ao projeto.

À CNPq pela bolsa de estudos.

## RESUMO

SERRAMBANA CAMARGO, S. P. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para a determinação de canabidiol e tetraidrocanabinol em amostras de plasma por cromatografia em fase gasosa/espectrometria de massas.** 2008  
Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008

O Canabidiol (CBD), que representa aproximadamente 40% dos canabinóides encontrados na planta *Cannabis sativa*, é desprovido dos efeitos psicológicos e cognitivos típicos do  $\Delta^9$ -Tetraidrocanabinol ( $\Delta^9$ THC). Estudos sugerem que o CBD apresenta propriedades ansiolíticas, porém esta substância nunca foi testada na ansiedade clínica. Do mesmo modo, não se sabe como estes possíveis efeitos seriam mediados centralmente em pacientes com transtorno de ansiedade social (TAS). Diante das evidências da existência de um sistema canabinóide em humanos e do crescente interesse terapêutico no uso do CBD, justifica-se um estudo para desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica para a determinação e quantificação de CBD e  $\Delta^9$ THC empregando a técnica de cromatografia em fase gasosa/espectrometria de massas. O método desenvolvido e validado se mostrou rápido, simples, de baixo custo com boa sensibilidade e apropriado para aplicação na área da toxicologia clínica. O método demonstrou ser linear no intervalo de concentração de 5 a 500 ng/0,5 mL de plasma para o CBD ( $r^2 = 0,99$ ) e de 5 a 300 ng/0,5 mL ( $r^2 = 0,98$ ) para o  $\Delta^9$ THC. Os limites de detecção e quantificação foram respectivamente 0,1 ng/0,5 mL e 0,5 ng/0,5 mL para o CBD e, 5 ng/0,5 mL e 10 ng/0,5 mL para o  $\Delta^9$ THC. Valores de precisão inter e intra ensaio estão respectivamente, na faixa de 5,5% a 12,7%, e de 2,1% a 8,1%. Valores de exatidão inter e intra ensaio estão respectivamente, na faixa de 1,2% a 12,0, e de 1,2 a 14,5 para CBD e  $\Delta^9$ THC. A eficiência da extração foi obtida na faixa de 54,6 a 93,2% de recuperação para os analitos. A metodologia validada foi empregada em um estudo clínico para correlacionar a dose após a administração controlada de CBD em pacientes com transtorno de ansiedade social.

**Palavras-chave:** Canabidiol,  $\Delta^9$ -Tetraidrocanabinol, Cromatografia em Fase Gasosa, Espectrometria de massas, Validação, Ansiedade

## ABSTRACT

SERRAMBANA CAMARGO, S. P. **Development and validation of an analytical methodology for determination of cannabidiol and tetrahydrocannabinol in plasma samples using gas phase chromatography /mass spectrometry.** 2008 Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

The Cannabidiol (CBD), that represents about 40% of the cannabinoids found in *Cannabis sativa* plant, is devoided of the typical psychological and cognitive effects of  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ THC). Researches suggest that CBD shows ansiolitic properties, but this substance was never tested on clinical anxiety. It is unknown how possible CBD effects could be centrally mediated in social anxiety disorder (SAD) patients. There are evidences about the existence of a cannabinoid system in humans and there is also increasing interest on therapeutic CBD application. The present study was conducted to develop and validate an analytical methodology for determination and quantification of CBD and  $\Delta^9$ THC, employing gas phase chromatography/mass spectrometry technique. The validated method was fast, easy, low cost, with a good sensibility and appropriate for clinical toxicology applications. The method was linear on the range of 5 to 500 ng/0,5 mL of plasma for CBD ( $r^2=0,99$ ) and 5 to 300 ng/0,5 mL ( $r^2=0,98$ ) for  $\Delta^9$ THC. The detection and quantification limits were 0,1 ng/0,5 mL and 0,5 ng/0,5 mL for CBD and 5ng/0,5 mL and 10 ng/0,5 mL for  $\Delta^9$ THC respectively. Inter and intraday reproducibility were between 5,5% to 12,7% and 2,1% to 8,1%, respectively. Inter and intraday accuracy was between 1,2% to 12% and 1,2% to 14,5% for CBD and  $\Delta^9$ THC respectively. The recovery of extraction was between 54, 6% to 93,2% of recovery for the analytes The validated methodology was applied in a clinical trial to correlate the doses after the controlled cannabidiol administration to patients with social anxiety disorders.

**Keywords:** Cannabidiol,  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol , Gas Chromatography, Mass Spectrometry, Validation, Anxiety



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Arbusto de <i>Cannabis sp.</i> ....	2
<b>Figura 2.</b> Estrutura do $\Delta^9$ -Tetraidrocanabinol.....	2
<b>Figura 3.</b> Estrutura da Anandamida.....	3
<b>Figura 4.</b> Estrutura do Canabidiol. ....	5
<b>Figura 5.</b> Procedimento de preparo de amostras de validação. ....	18
<b>Figura 6.</b> Procedimento de preparo de amostras de voluntários. ....	20
<b>Figura 7.</b> Cromatograma dos padrões de CBD (100 ng), $\Delta^9$ THC (100 ng) e $\Delta^9$ THCd3 (50 ng) secos e derivatizados analisados no modo <i>Full Scan</i> .....	29
<b>Figura 8.</b> Cromatograma do padrão e espectro de massas do CBD (100 ng) no modo <i>Full Scan</i> de detecção.....	30
<b>Figura 9.</b> Cromatograma do padrão e espectro de massas do $\Delta^9$ THC (100 ng) no modo <i>Full Scan</i> de detecção.....	31
<b>Figura 10.</b> Cromatograma dos padrões e espectro de massas do $\Delta^9$ THCd3 (50 ng) no modo <i>Full Scan</i> de detecção.....	32
<b>Figura 11.</b> Resultado cromatográfico da análise de uma amostra de plasma “branco” realizada no modo <i>S/S</i> de detecção.....	33
<b>Figura 12.</b> Cromatograma e espectros de massas do CBD, $\Delta^9$ THC e $\Delta^9$ THCd3 no modo <i>S/S</i> de detecção.....	34
<b>Figura 13.</b> Cromatograma da análise de uma amostra de plasma “branco” contaminado com 100 ng de CBD e $\Delta^9$ THC e 50 ng de $\Delta^9$ THCd3.....	35
<b>Figura 14.</b> Cromatograma e espectro de massas do CBD referente à análise de plasma de voluntário exposto ao CBD. ....	36
<b>Figura 15.</b> Curva de linearidade referente à metodologia de análise de CBD.....	37
<b>Figura 16.</b> Curva de linearidade referente à metodologia de análise de $\Delta^9$ THC.....	37
<b>Figura 17.</b> Curva de calibração para o CBD.....	38
<b>Figura 18.</b> Curva de calibração para o $\Delta^9$ THC.....	39
<b>Figura 19.</b> Cromatograma de plasma branco analisado após a análise do último ponto da curva: CBD (200 ng), $\Delta^9$ THC (200 ng) e $\Delta^9$ THCd3 (50 ng).....	45
<b>Figura 20.</b> Gráfico das concentrações obtidas e desvios padrões. ....	48

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Íons utilizados na identificação e quantificação dos analitos. ....	21
<b>Tabela 2.</b> Fluxograma dos procedimentos para coleta de dados.....	26
<b>Tabela 3.</b> Limites de detecção e quantificação do CBD e $\Delta^9$ THC.....	39
<b>Tabela 4.</b> Precisão inter ensaio e intra ensaio para os analitos CBD e $\Delta^9$ THC.....	40
<b>Tabela 5.</b> Exatidão inter ensaio e intra ensaio para os analitos CBD e $\Delta^9$ THC.....	40
<b>Tabela 6.</b> Recuperação dos analitos após a etapa de extração do plasma para os 3 níveis de concentração. ....	41
<b>Tabela 7.</b> Concentrações obtidas dos controles de qualidade de baixa concentração (15 ng/0,5 mL) na presença de alguns prováveis interferentes em altas concentrações (100 ng/0,5 mL).....	42
<b>Tabela 8.</b> Valores de $p$ obtidos após aplicação do Teste “t” nas amostras de CBD, $\Delta^9$ THC e $\Delta^9$ THCd3 submetidas aos ciclos de congelamento e descongelamento. ..	43
<b>Tabela 9.</b> Valores de $p$ obtidos após aplicação do Teste “t” nas amostras extraídas e derivatizadas de CBD, $\Delta^9$ THC e $\Delta^9$ THCd3 submetidas a temperatura ambiente por 4 e 18 horas. ....	44
<b>Tabela 10.</b> Concentrações plasmáticas de CBD obtidas após a coleta de sangue nos tempos pré-estabelecidos. ....	47

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>CG</b>	<b>Cromatografia Gasosa</b>
<b>EM</b>	<b>Espectrômetro de massas</b>
<b>MS</b>	<b>Mass Spectrometry</b>
<b>CBD</b>	<b>Canabidiol</b>
<b><math>\Delta^9</math>THC</b>	<b><math>\Delta^9</math>Tetraidrocanabinol</b>
<b>THCd3</b>	<b>Tetraidrocanabinol deuterado</b>
<b>BSTFA</b>	<b>NO-Bis-(trimetilsilil)fluoro acetamida</b>
<b>TMC</b>	<b>trimetilclorosilano</b>
<b>TAS</b>	<b>Transtorno de Ansiedade Social</b>
<b>CV</b>	<b>Coefficiente de variação</b>
<b>S</b>	<b>Desvio Padrão</b>
<b>K</b>	<b>Média dos valores obtidos</b>
<b>CB1</b>	<b>Receptor canabinóide do subtipo 1</b>
<b>CB2</b>	<b>Receptor canabinóide do subtipo 2</b>
<b>SPME</b>	<b>Microextração em fase sólida</b>
<b>SPE</b>	<b>Extração em fase sólida</b>
<b>LD</b>	<b>Limite de Detecção</b>
<b>LQ</b>	<b>Limite de Quantificação</b>
<b>EUA</b>	<b>Estados Unidos da América</b>
<b>RPM</b>	<b>Rotações por minuto</b>
<b>SIS</b>	<b><i>Single Ion Selected</i></b>
<b>HC-FMRP-USP</b>	<b>Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo</b>
<b>IMAO</b>	<b>Inibidores da monoaminoxidase</b>

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>vi</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>vii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>viii</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>lx</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	<b>x</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>2</b>
1.1. <i>Cannabis</i> e Canabinóides.....	2
1.2. Determinação de Canabinóides .....	6
1.2.1. Linearidade .....	9
1.2.2. Curva de calibração .....	9
1.2.3. Precisão e Exatidão .....	9
1.2.4. Recuperação.....	10
1.2.5. Limite de Quantificação .....	10
1.2.6. Limite de Detecção .....	10
1.2.7. Especificidade .....	11
1.2.8. Estabilidade .....	11
1.2.9. <i>Carry Over</i> .....	11
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>13</b>
<b>3. MÉTODOS E CASUÍSTICA</b> .....	<b>15</b>
3.1. Determinação do Canabidiol e Tetraidrocanabinol.....	15
3.1.1. Padrões, reagentes e fármacos .....	15
3.1.2. Equipamentos e Acessórios.....	15
3.1.3. Padronização do método de análise do Canabidiol e Tetraidrocanabinol por cromatografia gasosa em plasma humano.....	15
3.1.3.1. Preparo das soluções utilizadas na validação .....	16
3.1.3.1.1. Calibradores .....	16
3.1.3.1.2. Controles de Qualidade.....	16
3.1.3.1.3. Padrão Interno.....	16
3.1.3.2. Preparo das amostras de validação.....	16
3.1.3.3. Preparo das amostras de voluntários .....	19
3.1.3.4. Análise cromatográfica.....	21
3.1.4. Validação do método de análise do Canabidiol e Tetraidrocanabinol em plasma humano por cromatografia em fase gasosa .....	22
3.1.4.1. Linearidade .....	22

3.1.4.2. Curva de Calibração .....	22
3.1.4.3. Precisão e Exatidão .....	22
3.1.4.4. Recuperação.....	22
3.1.4.5. Limite de quantificação .....	23
3.1.4.6. Limite de detecção .....	23
3.1.4.7. Especificidade .....	23
3.1.4.8. Estabilidade.....	23
3.1.4.9. <i>Carry over</i> .....	24
3.2. Casuística .....	24
3.2.1. Pacientes .....	24
3.2.2. Procedimentos .....	25
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>29</b>
4.1. Avaliação da separação cromatográfica dos analitos, determinação de tempos de retenção e íons de identificação e quantificação .....	29
4.2. Parâmetros de validação .....	36
4.2.1. Linearidade .....	36
4.2.1.1. Critérios de aceitação da linearidade .....	36
4.2.2. Curva de Calibração .....	38
4.2.2.1. Critérios de aceitação da curva de calibração .....	38
4.2.3. Limites de detecção e quantificação .....	39
4.2.3.1. Critérios de aceitação dos limites de quantificação e detecção.....	39
4.2.4. Precisão e Exatidão .....	40
4.2.4.1. Critérios de aceitação da precisão e exatidão .....	40
4.2.4.2. Precisão (CV%) da metodologia de análise.....	40
4.2.4.3. Exatidão (%) da metodologia de análise.....	40
4.2.5. Recuperação.....	41
4.2.5.1. Critérios de aceitação da recuperação .....	41
4.2.6. Especificidade.....	41
4.2.6.1. Critérios de aceitação da especificidade.....	41
4.2.7. Estabilidade .....	42
4.2.7.1. Critérios de aceitação da estabilidade .....	42
4.2.8. <i>Carry Over</i> .....	44
4.3. Etapas de otimização do método .....	45
4.4. Aplicação da metodologia validade em pacientes após administração controlada do CBD .....	47
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>50</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>52</b>

# **Introdução**

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. *Cannabis* e Canabinóides

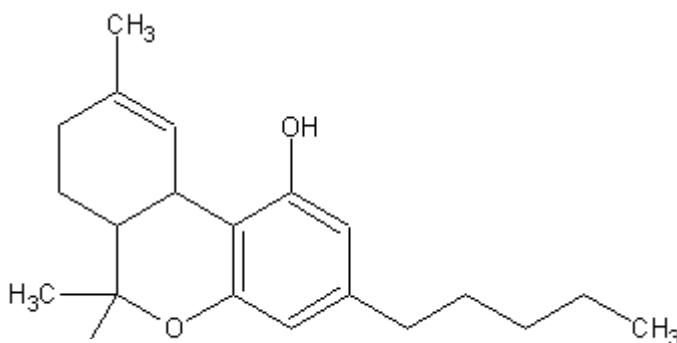
A planta *Cannabis sativa*, (**Figura 1**) popularmente conhecida como maconha é a droga ilícita mais consumida no mundo sendo que seu consumo é superado apenas pelo álcool e tabaco (WATSON *et al.*, 2000). A maconha é muito utilizada por jovens principalmente na Europa, nos Estados Unidos e na Austrália (HALL *et al.*, 2003).



**Figura 1**- Arbusto de *Cannabis sp.*

No Brasil, em apenas uma década, a prevalência de uso de maconha entre estudantes triplicou (GALDUROZ *et al.*, 2004). Em um levantamento domiciliar feito na cidade de São Paulo com uma população de indivíduos maiores de 12 anos de idade, a maconha foi a droga ilícita mais frequentemente utilizada, seguida de longe pelos solventes e a cocaína (CARLINI *et al.*, 2002).

A *Cannabis sativa* possui mais de 400 componentes, sendo que aproximadamente 60 destes são componentes canabinóides, e o principal constituinte psicoativo da *Cannabis* o  $\Delta^9$ -Tetraidrocanabinol ( $\Delta^9$ THC) (**Figura 2**).

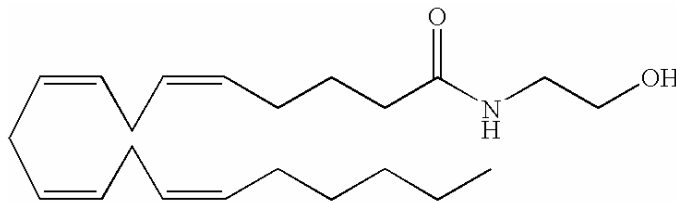


**Figura 2** - Estrutura do  $\Delta^9$ -Tetraidrocanabinol

A influência do  $\Delta^9$ -THC no cérebro é complexa, dose-dependente e parece mediar o fenômeno ansiogênico, o que é compatível com o efeito de induzir em camundongos e ratos maior aversão aos braços abertos no teste do labirinto em cruz elevado, similar ao produzido por agentes ansiogênicos (ONAIVI *et al.*, 1990).

Até o final da década de 1980, o mecanismo de ação dos canabinóides permaneceu bastante obscuro. Nesta época, um receptor específico para os canabinóides foi identificado no cérebro de mamíferos. Nos anos seguintes, foram identificados os ligantes endógenos para esse receptor, os endocanabinóides. Sendo os principais identificados, até então, o aracadonil-etanolamida, também denominado anandamida, e o 2-aracadonil-glicerol (MECHOULAM *et al.*, 1998).

**(Figura 3)**



**Figura 3** - Estrutura da Anandamida

Pela ordem de descoberta, esses receptores foram denominados receptores canabinóides, do subtipo 1 (CB1) e subtipo 2 (CB2) (HOWLETT *et al.*, 2002), sendo o primeiro responsável pelos efeitos centrais dos canabinóides, enquanto o segundo pelos efeitos periféricos. Ambos são receptores acoplados a proteína G, que ativada, inibe a adenilato ciclase, aumenta a atividade de canais de potássio e inibe canais de cálcio, modulando a liberação de outros neurotransmissores (FREUND *et al.*, 2003).

A *Cannabis* pode produzir vários efeitos subjetivos em humanos: euforia, disforia e sedação o que pode ser justificado pela presença abundante dos receptores canabinóides CB1 e CB2 em algumas áreas do cérebro, associadas ao comportamento, coerentemente relacionados com as alterações comportamentais produzidos pelos canabinóides. Devido a maioria dos receptores serem encontrados em células dos gânglios basais e cerebelo, envolvidas nos movimentos de coordenação do corpo, a hipotensão postural é comumente observada além de sintomas neurovegetativos como boca seca, taquicardia (HOLLISTER, 1986). Seu



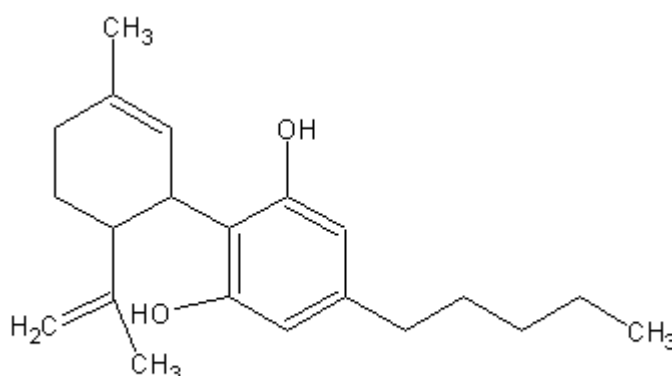
consumo agudo encontra-se associado com prejuízo em diversas funções cognitivas, incluindo memória e percepção do tempo, além de prejuízo no desempenho de tarefas envolvendo tempo de reação, aprendizado, controle motor e atenção devido ao fato dos receptores CB1 também estarem presentes abundantemente no hipocampo, responsável pela aprendizagem, memória e resposta ao stress e, no córtex cerebral, responsável pelas funções cognitivas. (MILLER E BRANCONNIER, 1983). No hipotálamo podem mediar algumas ações dos canabinóides como hipotermia e hiperfagia.

Ainda dentre os potenciais de risco associados à *Cannabis sativa* encontrados na literatura, diversos estudos relatam que esta substância pode provocar sintomas de ansiedade em sujeitos vulneráveis (THOMAS, 1993; HALL E SOLOWIJ, 1998). Ataques de pânico e fobia constituem os sintomas agudos mais freqüentemente associados com o uso da *Cannabis* (TUNVING, 1987; THOMAS, 1993; HALL E SOLOWIJ, 1998), sendo que, de 20 a 30% dos consumidores apresentam reações agudas e breves de ansiedade, após fumar a droga (HOLLISTER, 1986; THOMAS, 1996). Estes sintomas, entretanto, foram observados apenas após o consumo de altas doses e são mais comuns em sujeitos que utilizaram a droga pela primeira vez (MANZANARES *et al.*, 2004).

Outros trabalhos também sugerem que o uso da maconha pode estar associado com sintomatologia duradoura de ansiedade. Em pesquisa clínica, investigando o uso de *Cannabis* por pelo menos dez anos, verificou-se que 21 % dos sujeitos envolvidos apresentavam altos níveis de estado de ansiedade (REILLY *et al.*, 1998), diversos casos de agorafobia (MORAN, 1986) e de transtorno do pânico (DEAS *et al.*, 2000; LANGS *et al.*, 1997). Mais recentemente, Tournier *et al.* (2003) observaram que em estudantes universitários, o diagnóstico de agorafobia associou-se significativamente com maior predisposição ao uso de *Cannabis*, independentemente do estado de ansiedade ou de outros fatores. Além disso, estudos epidemiológicos também demonstraram que o uso crônico de *Cannabis* está associado com maior prevalência de comorbidade com transtornos de ansiedade (DEGENHARDT *et al.*, 2001; TROISI *et al.*, 1998). Apesar de estudos sugerirem que existe uma associação entre o uso de *Cannabis* e altos níveis de estado ou traço de ansiedade, eles não são informativos com respeito à direção desta associação (COMPTON *et al.*, 2000; MCGEE *et al.*, 2000; MUESER *et al.*, 1998).

De modo contrastante, alguns estudos mencionam redução de ansiedade e relaxamento como motivação para o uso desta droga (BOYS *et al.*, 1999). Dessa forma, alguns autores apóiam a hipótese de que a maioria dos sujeitos com altos níveis de ansiedade usam *Cannabis* como forma de “automedicação” (STEWART *et al.*, 1997). Isto foi parcialmente demonstrado em dois estudos nos quais foram avaliados os efeitos ansiolíticos do Nabilone®, que é um canabinóide sintético contendo  $\Delta^9$ THC e CBD, que é outro componente da *Cannabis sativa* representando, aproximadamente, 40% dos canabinóides encontrados na planta (GRLIE, 1976).

O CBD (**Figura 4**) que também apresenta atividade farmacológica é desprovido dos efeitos psicológicos típicos da *Cannabis* em humanos (ZUARDI *et al.*, 1982).



**Figura 4** - Estrutura do Canabidiol

Diversos estudos demonstram que quando o CBD é administrado concomitantemente com o  $\Delta^9$ THC, os efeitos deste último composto são antagonizados. Este antagonismo pode estar relacionado com as propriedades ansiolíticas do CBD (ZUARDI *et al.*, 1982; 1993a; KARNIOL e CARLINI, 1973; ONAIVI *et al.*, 1990; GUIMARÃES *et al.*, 1990). Assim, estes resultados apóiam amplamente a idéia de que os efeitos da *Cannabis* diferem dos efeitos do  $\Delta^9$ THC isoladamente, uma vez que a planta contém tanto  $\Delta^9$ THC como CBD.

Em um estudo duplo-cego, controlado por placebo, pacientes com transtornos de ansiedade demonstraram “dramática redução” dos sintomas, após tratamento

com Nabilone® por 28 dias (FABRE e MCLENDON, 1981). Resultados similares foram verificados por Ilaria *et al.* (1981) após a utilização da droga em 11 pacientes com ansiedade.

Em um estudo inicial conduzido por Zuardi *et al.* (1982) a administração concomitante de CBD (1 mg/Kg) com uma alta dose de  $\Delta^9$ THC (0,5 mg/Kg) em voluntários saudáveis, atenuou os sintomas ansiogênicos induzidos por este último composto, mas não inibiu o aumento da frequência cardíaca. Estudos posteriores com animais demonstraram que o CBD apresenta propriedades similares a drogas ansiolíticas (ZUARDI e KARNIOL, 1983).

Baseado em estudos pré-clínicos, Zuardi *et al.* (2006) testaram diretamente as propriedades ansiolíticas do CBD em voluntários saudáveis. Os autores compararam os efeitos ansiolíticos do CBD (300 mg) com os da ipsapirona (5 mg), que é um agonista parcial 5HT<sub>1A</sub> e com o diazepam (10 mg), um ansiolítico benzodiazepínico. Na dosagem empregada o CBD não induziu efeitos sedativos. Mais recentemente foi demonstrado que o CBD (400 mg) reduziu significativamente a ansiedade em voluntários saudáveis (CRIPPA *et al.*, 2004).

Estes efeitos ansiolíticos contrastam com os efeitos ansiogênicos de altas doses de  $\Delta^9$ -THC (ZUARDI *et al.*, 1982; MATHEW *et al.*, 1999) e podem ajudar a reconciliar os aparentes achados conflitantes obtidos com a *Cannabis sativa* em relação à ansiedade (JOHNS, 2001; TOURNIER *et al.*, 2003). Do mesmo modo, estas propriedades ansiolíticas do CBD também poderiam justificar o uso da *Cannabis* por pacientes com transtornos de ansiedade para a diminuição dos sintomas.

Portanto, os resultados destes estudos associados à observação de que o CBD não provoca dependência ou efeitos tóxicos com o uso crônico (CONSROE *et al.*, 1991), sugerem que o CBD pode ser usado no tratamento dos transtornos de ansiedade (ZUARDI *et al.*, 1993).

## **1.2. Determinação de Canabinóides**

O desenvolvimento de metodologias analíticas para a determinação qualitativa e quantitativa de CBD e de  $\Delta^9$ THC em amostras biológicas se revestem de grande importância na área clínica e no estudo e interpretação dos parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos dessas substâncias.

Vários trabalhos têm relatado a análise de canabinóides, em especial, o  $\Delta^9$ THC e o CBD, pela técnica de cromatografia em fase gasosa/espectrometria de massas em diferentes amostras.

Musshoff *et al.* (2002) determinaram canabinóides (Canabidiol, Tetraidrocanabinol e Canabinol) em amostras de cabelo por *headspace* utilizando a técnica de microextração em fase sólida (SPME). O método foi aplicado em 25 amostras de casos forenses.

Em 2003, utilizando a mesma técnica de extração (SPME), mas outra matriz biológica, Yonamine e colaboradores analisaram Tetraidrocanabinol na saliva de caminhoneiros.

Pellegrini *et al.* (2005) analisaram canabinóides em alimentos como pastilhas, óleo, cerveja, licores, utilizando um procedimento de extração líquido-líquido utilizando como solvente extrator uma mistura de hexano/isopropanol (9:1).

Nadulski *et al.* (2005), validaram uma metodologia utilizando extração em fase sólida (SPE) para analisar simultaneamente, Tetraidrocanabinol, 11-hidroxi-tetraidrocanabinol, Carboxi-tetraidrocanabinol, Canabidiol e Canabinol em plasma humano obtido de voluntários após a administração oral de baixas doses de  $\Delta^9$ THC e extrato de maconha.

Yang *et al.* (2006) utilizaram a microextração em fase sólida (SPME) para extrair canabinóides de várias matrizes biológicas como sangue, cérebro e urina adicionadas de Canabidiol e Tetraidrocanabinol.

Em 2007, Nadulski e Pragst publicaram outro estudo no qual analisaram Canabidiol, Tetraidrocanabinol e Canabinol em amostras de cabelo utilizando microextração em fase sólida (SPME).

Abraham e colaboradores, em 2007 também validaram uma metodologia para determinação de Tetraidrocanabinol e seus metabólitos em urina utilizando extração em fase sólida (SPE).

Como pode ser observado existem muitos artigos publicados demonstrando diversos métodos de determinação de canabinóides em matrizes biológicas alternativas e complexas, empregando quase sempre extrações em fase sólida, o que encarece e dificulta a aplicação da metodologia na maioria dos laboratórios.

Visando uma futura aplicação terapêutica do CBD é de grande importância o desenvolvimento e validação de métodos para análise de tal substância em plasma, devido à relevância dos dados de concentração plasmática. Utilizando - se um

procedimento de extração simples como o líquido – líquido, a metodologia torna-se facilmente aplicável, o custo baixo do material e o investimento pequeno em treinamentos para analistas compensam um uso de maior volume de solvente quando comparado com outras técnicas.

A metodologia validada por Nadulski em 2005 apresenta valores satisfatórios de linearidade. A recuperação do procedimento de extração utilizando a SPE foi de 50% para o  $\Delta^9$ THC e 90% para o CBD, somente para a concentração de 10 ng/mL. Assim como a recuperação, a precisão do método foi avaliada somente na concentração de 10 ng/ml e, determinada pelo desvio padrão das medidas de 40 amostras inter ensaio, com valores de 2,8% para o THC e 2,9% para o CBD. Foram obtidos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) bem baixos tanto para o  $\Delta^9$ THC quanto para o CBD. LD = 0,24 ng/mL e LQ = 0,80 ng/mL para o  $\Delta^9$ THC; LD = 0,29 ng/mL e LQ = 0,95 ng/mL para o CBD.

Dados de estabilidade dos analitos na matriz, um parâmetro muito importante nas análises toxicológicas, não foram apresentados por Nadulski. Em se tratando de canabinóides a estabilidade é um fator crucial, pois é sabido que adsorção em vidro e plástico é uma característica inerente a esse grupo de substâncias. O que pode comprovar alterações de concentração com relação ao tempo de armazenamento. (WONG *et al.*, 1982)

A validação de métodos analíticos constitui um procedimento fundamental para verificar se o método desenvolvido é adequado para o uso pretendido e para garantir a confiabilidade dos dados produzidos. A validação total deve ser realizada antes da implementação de uma metodologia bioanalítica para a quantificação de fármacos e metabólitos.

Quando ocorrerem pequenas modificações do método já validado como transferências entre laboratórios, substituição do sistema de detecção ou *softwares*, mudança de anticoagulante ou conservante na coleta da amostra, demonstração de seletividade do analito na presença de medicamentos concomitantes, mudança de matriz biológica, mudanças relevantes na faixa de concentração e mudanças no preparo de amostras devem ser realizadas validações parciais que consistem em determinações de precisão e exatidão até próximo de uma validação total.

No presente trabalho, além do desenvolvimento da metodologia, foi feita a validação completa do método. Foram considerados os parâmetros preconizados

pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) através da Norma Regulamentadora nº 899, de 29 de maio de 2003, como descrito a seguir:

### **1.2.1. Linearidade**

Para a maioria das técnicas analíticas cromatográficas, uma relação de primeira ordem, ou seja, linear, é observada entre a resposta do detector ( $y$ ) e a concentração ( $x$ ) da substância nas amostras, podendo ser descrita pela equação de regressão linear  $y = ax + b$ , onde  $a$  é a inclinação da reta e  $b$  a intersecção da curva no eixo  $y$  (PENG; CHIOU, 1990). A linearidade corresponde à capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância analisada dentro de uma determinada faixa (SWARTZ; KRULL, 1998). Valores de  $r^2$  (coeficientes de determinação) indicam a correlação entre os eixos de  $x$  e  $y$ , valores próximos a 1 indicam haver uma correlação entre os eixos, inferiores a 0,98 não são aceitos.

### **1.2.2. Curva de calibração**

A curva de calibração define a relação que existe entre as concentrações das amostras analisadas e a resposta obtida pelo equipamento. Para construirmos uma curva de calibração é necessária análise cromatográfica de 5 a 8 amostras submetidas à metodologia que está sendo proposta.

De acordo com a resolução da ANVISA a curva de calibração deve ser feita com no mínimo 6 pontos (concentrações) e com um "n" (número de replicatas) igual a 3.

As concentrações dos padrões devem ser escolhidas com base nas concentrações esperadas no estudo realizado. Em seguida, são calculadas as equações de regressão linear ( $y = ax + b$ ) e os coeficientes de determinação ( $r^2$ ). Coeficiente de correlação igual a 1 indica correlação perfeita entre  $x$  e  $y$ , enquanto coeficiente igual a 0 indica não haver correlação entre esses valores.

### **1.2.3. Precisão e Exatidão**

A precisão de um método analítico é a medida do erro randômico e é definida como a concordância entre o resultado das replicatas de uma amostra. É expressa em porcentagem do coeficiente de variação ou desvio padrão relativo das medidas das replicatas (CAUSON, 1997).

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados obtidos e um valor aceito como referência (SWARTZ; KRULL, 1998). A exatidão é melhor expressa como porcentagem de erro sistemático.

O valor numérico usado para quantificar a precisão é o coeficiente de variação (CV) ou desvio padrão relativo:

$$CV = (S/K) \times 100$$

S = desvio padrão

K = média dos valores obtidos

(altura padrão/altura padrão interno/concentração padrão)

A exatidão intra e inter-ensaio são avaliadas utilizando os resultados experimentais obtidos na precisão. A exatidão é expressa em porcentagem de erro sistemático:

$$\% \text{ de erro sistemático} = (\text{média valor obtido} / \text{valor real}) \times 100$$

O número de replicatas deve ser igual a 5.

#### **1.2.4. Recuperação**

A recuperação de um método analítico é melhor estabelecida pela comparação da resposta de uma amostra extraída, em concentrações altas, médias e baixas, com outras não extraídas representando 100% de recuperação (CAUSON, 1997).

Embora recuperações próximas a 100% sejam desejáveis, a extensão da recuperação de um analito pode ser aceita até na ordem de 50 – 60%, se a recuperação for precisa, exata e reprodutível (CHASIN *et al.*, 1998).

#### **1.2.5. Limite de Quantificação**

O limite de quantificação (LQ) representa a mais baixa concentração da substância analisada que pode ser quantificada com certo limite de confiabilidade (SWARTZ; KRULL, 1998). Para o LQ ser aceito, ele deve apresentar precisão e exatidão de até 20%, e deve ser pelo menos cinco vezes maior que algum interferente com o mesmo tempo de retenção presente na amostra branca.

#### **1.2.6. Limite de Detecção**

O limite de detecção (LD) pode ser definido como a menor concentração de um analito que o procedimento analítico consegue diferenciar confiavelmente do ruído de fundo, recomenda-se que seja de 2 a 3 vezes superior ao ruído da linha de base.

### **1.2.7. Especificidade**

A especificidade pode ser definida como a habilidade do método em distinguir o analito de todas as outras substâncias presentes na amostra, tais como interferentes inerentes da matriz e outros compostos exógenos. Isto pode ser estabelecido pela quantificação do analito de interesse numa baixa concentração, frente a um interferente em alta concentração.

### **1.2.8. Estabilidade**

Estabilidade é o parâmetro que visa determinar se um analito se mantém quimicamente inalterado numa dada matriz sob condições específicas e em determinados intervalos de tempo.

As condições de realização dos ensaios de estabilidade devem reproduzir as reais condições de manuseio e análise das amostras. Deve ser avaliada a estabilidade do analito de longa duração, após armazenagem (ciclos de congelamento/descongelamento) e também a de curta duração, após o processamento da amostra à temperatura ambiente.

### **1.2.9. Carry over**

O *carry over* pode ser definido como um aumento de concentração em uma amostra, proveniente de resquícios da amostra anterior, possivelmente existentes no injetor, *liner*, coluna e detector.

É avaliado com análises de amostras brancas após a análise de amostras de altas concentrações do analito.

O presente estudo propôs o desenvolvimento e validação de uma metodologia para a análise simultânea de  $\Delta^9$ THC e CBD em amostras de plasma humano utilizando um procedimento de extração líquido-líquido e cromatografia em fase gasosa/espectrometria de massas.

A proposta da utilização de um procedimento de extração convencional (extração líquido-líquido) representa uma etapa simples, rápida, de baixo custo e de aplicação direta na rotina dos estudos clínicos do CBD. Após a validação, o método foi utilizado para a determinação de CBD em plasma obtido de voluntários fóbicos após a administração controlada da droga.



# **Objetivos**

## 2. OBJETIVOS

- Desenvolver e validar metodologia analítica para quantificação do CBD e  $\Delta^9$ THC em plasma humano através das técnicas de extração líquido-líquido e cromatografia em fase gasosa/espectrometria de massas;
- Aplicar a metodologia em um estudo envolvendo pacientes com transtorno de ansiedade social após administração controlada por via oral de CBD.

# **Métodos e Casuística**

### 3. MÉTODOS E CASUÍSTICA

#### 3.1. Determinação do Canabidiol e Tetraidrocanabinol

##### 3.1.1. Padrões, reagentes e fármacos

Padrões de  $\Delta^9$ THC (1 mg/mL) e  $\Delta^9$ THC-d3 (1  $\mu$ g/mL) ambos diluídos em metanol foram adquiridos da empresa Cerilliant, EUA.

Padrão de CBD foi adquirido da empresa THC Pharm, Frankfurt, Alemanha.

O agente derivatizante NO-Bis-(trimetilsilil)fluoro acetamida (BSTFA) com 1% de trimetilclorosilano (TMC) foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich.

Metanol grau HPLC foi adquirido da empresa J.T. Baker®, EUA; hexano da Mallinckrodt, EUA; éter de petróleo e acetonitrila foram adquiridos da empresa Merck Darmstadt, Alemanha.

O plasma humano branco (colhido de indivíduos não expostos ao canabidiol e tetraidrocanabinol) utilizado na validação da metodologia foi doado pelo Banco de Sangue do Hospital São Francisco, Ribeirão Preto, São Paulo.

##### 3.1.2. Equipamentos e Acessórios

- Cromatógrafo em fase gasosa CP3800 acoplado a um espectrômetro de massas modelo Saturn 2000, ambos da empresa Varian, EUA.

- Amostrador automático CombiPal CTC, Suíça.

- Centrifuga Universal 32 Hettich, Alemanha

- Concentrador de Amostras Caliper LifeScience Turbo Vap LP, EUA

- Banho seco TE – 021, Tecnal, Brasil

- Agitador TE – 140, Tecnal, Brasil

##### 3.1.3. Padronização do método de análise do Canabidiol e Tetraidrocanabinol por cromatografia gasosa em plasma humano

A investigação do  $\Delta^9$ THC foi incluída na metodologia por duas razões:

1) Por se tratar o CBD de uma substância extraída diretamente da planta, a possibilidade, ainda que remota, da presença de resíduos de  $\Delta^9$ THC que poderiam potencialmente interferir nos resultados clínicos deve ser investigada.

2) Devido ao fato da maconha ser uma droga bastante difundida entre os jovens, em particular entre os universitários, ainda que tenha sido feitas as devidas recomendações aos voluntários para a não utilização da droga antes e durante os experimentos, caso este consumo ocorra, a presença do  $\Delta^9\text{THC}$  será detectada, o que contribuirá para a interpretação dos resultados clínicos.

### **3.1.3.1. Preparo das soluções utilizadas na validação**

#### **3.1.3.1.1. Calibradores**

Foram preparadas soluções padrões de  $\Delta^9\text{THC}$  a partir de uma ampola de 1 ml, que foi diluída em metanol originando as seguintes concentrações: 100, 200, 500, 1000, 2000, 2500, 3000, 4000, 5000, 6000, 8000 e 10000 ng/ml de metanol.

O CBD foi inicialmente pesado para o preparo de uma solução estoque de 1 mg/mL de metanol. Foram pesadas 10 mg do sal e estas diluídas em 10 mL de metanol, a partir dessa solução foram feitas soluções nas concentrações de 100, 200, 500, 1000, 2000, 2500, 3000, 4000, 5000, 6000, 8000 e 10000 ng/ml de metanol.

#### **3.1.3.1.2. Controles de Qualidade**

Foram preparadas também soluções para o controle de qualidade de níveis baixo, médio e alto, diluídas a partir das soluções de 10000 ng/mL de metanol, a concentrações de 300, 1400 e 3600 ng de CBD e  $\Delta^9\text{THC}$ /mL de metanol.

#### **3.1.3.1.3. Padrão Interno**

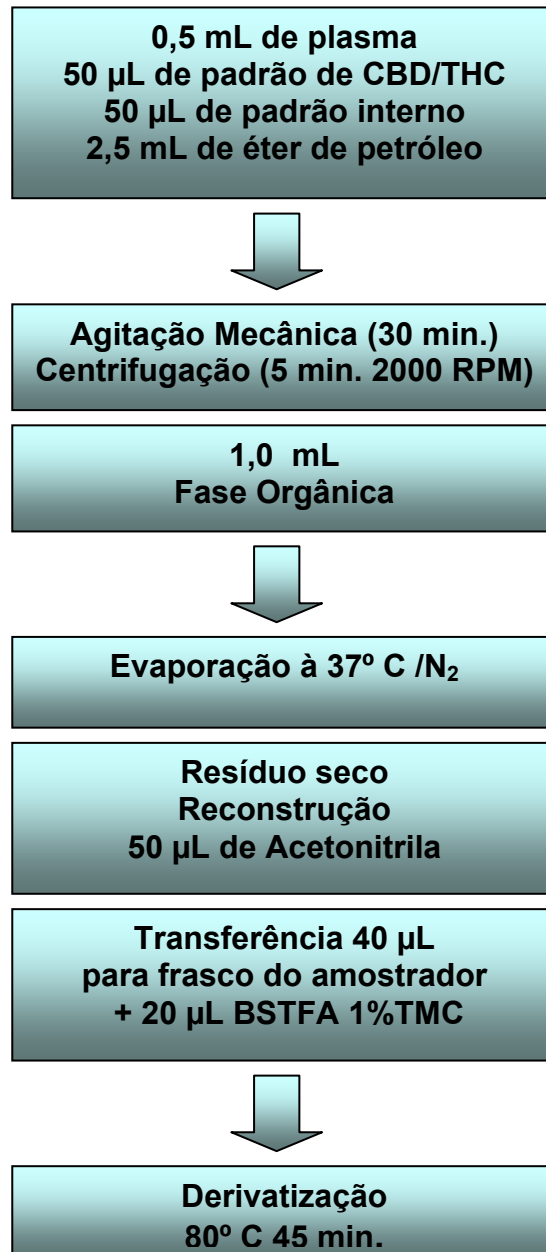
Para o padrão interno deuterado uma solução de 1000 ng de  $\Delta^9\text{THCd3}$ /mL de metanol foi preparada a partir de uma ampola de 1 mL ( $\Delta^9\text{THCd3}$  1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

Todas as soluções de trabalho, (calibradores, controle de qualidade e padrão interno) foram armazenadas a  $-10^\circ\text{C}$ , em tubos de vidro cobertos com papel alumínio com tampa de polietileno, previamente lavados com hexano.

### **3.1.3.2. Preparo das amostras de validação**

Em 0,5 mL de plasma humano branco foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  das soluções de CBD e de  $\Delta^9\text{THC}$  de cada concentração e também 50  $\mu\text{L}$  da solução de padrão interno,  $\Delta^9\text{THCd3}$ . Após adição dos padrões, as amostras foram homogeneizadas

por 30 segundos, em vortex. Para a extração foram acrescentados 2,5 mL de éter de petróleo e levados ao agitador mecânico por 30 minutos e posteriormente centrifugados a 2000 RPM por 5 minutos. Após centrifugação, foi retirado 1 mL do sobrenadante e evaporado em fluxo de ar a 37° C até a secura, no concentrador de amostras. O resíduo foi ressuscendido em 50 µL de acetonitrila, os tubos agitados em vortex por 30 segundos. Em seguida, 40 µL foram transferidos para o frasco de amostrador automático e 20 µL do agente derivatizante BSTFA foram adicionados para a derivatização a 80°C por 45 minutos. Depois de resfriados até a temperatura ambiente, os frascos foram levados ao cromatógrafo para a injeção de 1 µL. Procedimento demonstrado na Figura 5.

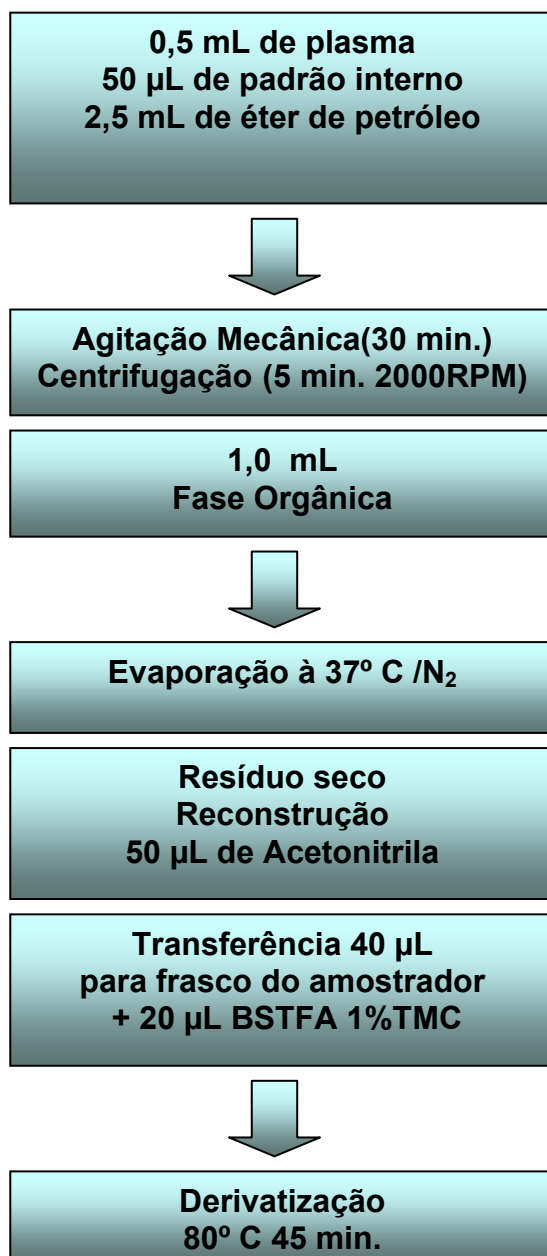


**Figura 5.** Procedimento de preparo de amostras de validação

### 3.1.3.3. Preparo das amostras de voluntários

As amostras que estavam congeladas à  $-20^{\circ}\text{C}$  dos seis voluntários expostos ao canabidiol foram preparadas adicionando-se somente  $50\ \mu\text{L}$  da solução do padrão interno  $\Delta^9\text{THCd}_3$ , agitadas em vórtex por 30 segundos. Foram acrescentados  $2,5\ \text{mL}$  de éter de petróleo em todos os tubos e agitados em agitador mecânico por 30 minutos, posteriormente centrifugados a 2000 RPM por 5 minutos. Em seguida,  $1\ \text{mL}$  foi retirado da fração orgânica e evaporado até a secura sob fluxo de ar a  $37^{\circ}\text{C}$ , em um concentrador de amostras. O resíduo obtido foi ressuspendido em  $50\ \mu\text{L}$  de acetonitrila agitados vigorosamente em vortex por 30 segundos,  $40\ \mu\text{L}$  foram transferidos para o frasco do amostrador automático onde foram acrescentados  $20\ \mu\text{L}$  de BSTFA para a derivatização que ocorre em 45 minutos a  $80^{\circ}\text{C}$ . **(Figura 6)**





**Figura 6.** Procedimento de preparo de amostras de voluntários

### 3.1.3.4. Análise cromatográfica

Para a determinação dos níveis plasmáticos do Canabidiol e  $\Delta^9$ THC foi utilizado um cromatógrafo em fase gasosa acoplado ao detector de massas. Os compostos foram separados utilizando uma Coluna capilar HP-5MS (5% Fenilmetilpolisiloxano - 30m x 0,25mm, filme 0,25 $\mu$ m), Agilent Technologies, EUA e Hélio como gás de arraste no fluxo de 1,0 mL/min.

A temperatura inicial da coluna foi de 80°C, mantida por 1 minuto, em seguida aquecida até 250°C na razão de 30°C/min. e ao chegar em 250°C, um aquecimento mais lento de 10°C/min. até 300°C. A temperatura do injetor ficou em 260°C As injeções das amostras foram feitas no modo *splitless*. Para a injeção das amostras foi utilizado um amostrador automático CombiPal CTC.

Inicialmente as análises foram feitas no modo *Full scan* de detecção, no qual um grande intervalo de íons é monitorado. Os padrões foram secos, derivatizados e injetados neste modo para que fosse obtido um espectro de massas de cada analito. Após a obtenção do espectro de massas de cada composto, foram selecionados os íons mais abundantes para a utilização do modo SIS (*Single Ion Selected*) de detecção.

No modo SIS os cromatogramas apresentam um menor ruído, o que aumenta a razão sinal/ruído, melhorando as análises quantitativas.

Para a identificação dos compostos derivatizados foram monitorados os íons apresentados na tabela abaixo.

**Tabela 1:** Íons utilizados na identificação e quantificação dos analitos.

	<b>CBD</b>	<b><math>\Delta^9</math>THC</b>	<b><math>\Delta^9</math>THCd3</b>
<i>Íons de Identificação</i>	375, 390, 391	371, 372, 386	374, 375, 389
<i>Íons de Quantificação</i>	<b>390</b>	<b>371</b>	<b>374</b>

### **3.1.4. Validação do método de análise do CBD e $\Delta^9$ THC em plasma humano por cromatografia em fase gasosa**

#### **3.1.4.1. Linearidade**

A linearidade do método foi estabelecida através da contaminação do plasma branco com 50  $\mu$ L de cada uma das soluções de trabalho para se obter concentrações de 50 ng de  $\Delta^9$ THC/0,5 mL de plasma; 5, 10, 25, 50, 100, 125, 150 e 200, 250, 300, 400 e 500 ng de CBD/0,5 mL de plasma e 5, 10, 25, 50, 100, 125, 150, 200, 250, 300, 400 e 500 ng de  $\Delta^9$ THC/0,5 mL de plasma em triplicata de cada concentração.

#### **3.1.4.2. Curva de Calibração**

Após a determinação da linearidade, foi estabelecido o intervalo da curva de calibração a qual foi preparada em triplicata adicionando-se ao plasma branco 50  $\mu$ L das soluções de trabalho para se obter concentrações de 10, 25, 50, 100, 150 e 200 ng de CBD/0,5 mL de plasma e 10, 25, 50, 100, 150, 200 ng de  $\Delta^9$ THC/0,5 mL de plasma.

#### **3.1.4.3. Precisão e Exatidão**

A precisão e exatidão inter e intra ensaio para o CBD e  $\Delta^9$ THC foram determinados com os controles de qualidade de 15, 70 e 180 ng/0,5 mL de plasma. A análise intra ensaio foi feita comparando-se valores dentro de uma corrida (n=5) e a inter ensaio foi determinada entre cinco corridas separadas (n=25).

A precisão é expressa em porcentagem e foi determinada pelo quociente do desvio padrão pela média da concentração determinada, multiplicado por 100 (CV%).

A exatidão expressa em porcentagem foi calculada pelo quociente da concentração média experimental pela concentração teórica, multiplicada por 100.

#### **3.1.4.4. Recuperação**

A recuperação ou eficiência de extração, expressa em porcentagem, para cada analito foi determinada nas concentrações de 15, 70, 180 ng/0,5 mL de plasma, a recuperação absoluta foi realizada adicionando-se 50  $\mu$ L das soluções de trabalho do padrão interno e dos analitos em 0,5 mL de éter de petróleo (solvente

extrator) estes foram secos, derivatizados e analisados. A eficiência da extração foi determinada comparando-se as áreas dos picos assim obtidos com as de plasma que passaram pelo procedimento de extração descrito no item **3.1.3.2**.

#### **3.1.4.5. Limite de quantificação**

Os limites de quantificação foram determinados analisando-se amostras contaminadas com concentrações finais de 5, 2,5, 1,0, 0,5, 0,1ng de CBD e  $\Delta^9$ THC/0,5 mL de plasma em triplicata. O limite de quantificação foi definido como a menor concentração que atende aos critérios de detecção e os analitos são quantificados com um desvio menor ou igual a 20% em relação a concentração nominal.

#### **3.1.4.6. Limite de detecção**

Os limites de detecção foram estabelecidos analisando amostras contaminadas com concentrações finais de 1,0, 0,5, e 0,1 ng de CBD e  $\Delta^9$ THC/0,5 mL de plasma em triplicata.

#### **3.1.4.7. Especificidade**

Para analisar a especificidade, amostras de plasma branco foram analisadas em cada corrida cromatográfica para verificar picos que possam interferir na detecção de analitos e padrão interno. Para verificar possíveis interferentes, o plasma branco foi contaminado com 50  $\mu$ L da solução 300 ng de CBD e  $\Delta^9$ THC/ mL de metanol, e 50  $\mu$ L das soluções de 2000 ng/mL de dipirona, norfluoxetina, alprazolam, sertralina, paroxetina, diazepam, citalopram, clomipramina, cafeína, clonazepam, lorazepam, fluoxetina, etinilestradiol, individualmente, obtendo-se uma concentração de 15 ng de CBD e  $\Delta^9$ THC /0,5 mL de plasma e 100 ng de interferentes/0,5 mL de plasma.

#### **3.1.4.8. Estabilidade**

Para a determinação da estabilidade dos analitos, amostras de plasma contaminadas, porém não extraídas foram submetidas a três ciclos de congelamento a  $-10^\circ$  C por 24 horas sendo posteriormente deixadas em temperatura ambiente por aproximadamente 3 horas e depois congeladas novamente.

As concentrações do CBD e  $\Delta^9$ THC nesse estudo foram calculadas e comparadas com amostras de controle de qualidade recém preparadas e analisadas. Juntamente com uma curva de calibração preparada no mesmo dia.

A estabilidade dos analitos após a derivatização também foi avaliada, amostras de 15, 70 e 180ng/0,5 mL de plasma, derivatizadas foram mantidas nos frascos de amostrador automático por 4 e 18 horas a temperatura ambiente, após a análise inicial. As concentrações dos analitos foram determinadas novamente após esses períodos e comparadas com as concentrações obtidas de amostras recém preparadas.

#### **3.1.4.9. Carry over**

Controles negativos, amostras de plasma branco, foram analisados após a análise do último ponto da curva de calibração para avaliar um possível *carry over* (influência da amostra anterior).

### **3.2. Casuística**

#### **3.2.1. Pacientes**

Esta etapa do projeto foi feita em parceria com o Laboratório de Psicofarmacologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, juntamente com outros estudos relacionados às propriedades terapêuticas do CBD, sob supervisão do Prof. Dr. Antonio Waldo Zuardi e Prof. Dr. José Alexandre Crippa.

Participaram do estudo 10 pacientes com diagnóstico de TAS em início de acompanhamento no HC-FMRP-USP. O diagnóstico e subtipo de TAS foram confirmados por meio do Módulo de Fobia Social da “Versão Clínica da Entrevista Clínica Estruturada para o DSM-IV” (SCID-IV-CV), traduzida e adaptada para o português (DEL-BEN *et al.*, 2001), por dois avaliadores familiarizados com o instrumento.

Para cada um dos pacientes foi preenchido um questionário com informações gerais (sexo, idade, medicações, história psiquiátrica, etc.). Os critérios de exclusão do estudo foram: a) presença de doença clínica; b) história de doença neurológica (incluindo TCE grave, excluindo cefaléia); c) uso de qualquer outra medicação concomitante; d) uso de antidepressivos ou estabilizadores do humor nos últimos

sete dias antes de serem selecionados (IMAO – duas semanas; fluoxetina cinco semanas); d) diagnóstico atual ou passado de dependência a drogas ou uso de droga nos últimos três meses (DSM-IV); e) história de alergia ou reações idiossincráticas a derivados da *Cannabis sativa*.

Os sujeitos foram selecionados quanto ao sexo, idade, nível socioeconômico (do sujeito e dos pais), escolaridade, tempo de doença, idade de início, subtipo de TAS (circunscrito ou generalizado), gravidade do transtorno, intensidade do medo de falar em público e traço de ansiedade. Apesar de serem incluídos sujeitos com os dois subtipos de TAS, todos os pacientes deverão apresentar medo de falar em público.

Foi feita uma tentativa de incluir pacientes com diagnóstico exclusivo de TAS. Entretanto, como sabidamente a comorbidade de TAS com outros transtornos psiquiátricos é muito alta, podendo chegar a 75% (GOISMAN *et al.*, 1995), neste caso só foram incluídos pacientes com comorbidade de transtorno depressivo passado. Assim, os grupos também foram selecionados quanto à frequência, tipo e gravidade de transtornos depressivos.

### **3.2.2. Procedimentos**

O CBD foi dissolvido em óleo de milho. As cápsulas placebo continham amido e foram acondicionadas em cápsulas de gelatina idênticas as do fármaco experimental.

A escolha da dose do CBD foi baseada em estudos anteriores que demonstraram efeitos ansiolíticos agudos deste fármaco em doses que variaram de 400 a 600 mg (ZUARDI *et al.*, 1993a; CRIPPA *et al.*, 2004). (DAVIDSON *et al.*, 1993; OTTO *et al.*, 2000).

Cada sujeito participou de somente uma sessão experimental. A sessão experimental foi conduzida em uma sala com atenuação sonora e temperatura controlada. Após um período de adaptação de 15 minutos, as medidas basais (B) foram realizadas seguidas pela ingestão de fármaco ou placebo. Após 1 h e 30 min as medidas pré-estresse (P) foram realizadas. Imediatamente após, os sujeitos em frente a uma televisão e assistiram a um *videotape* pré-gravado com instruções sobre a tarefa que ele/ela teria que desempenhar. Aos sujeitos foi dito que eles teriam dois minutos para preparar um discurso de quatro minutos sobre “o sistema de transporte de suas cidades”, que foi gravado e posteriormente analisado por um

psicólogo. Medidas de ansiedade antecipatória (A) foram tomadas antes dos sujeitos começarem a falar em frente a uma câmera acoplada a uma televisão enquanto vendo sua própria imagem na tela. O discurso foi interrompido no meio (após dois minutos) para que fossem aferidas medidas subjetivas de ansiedade de desempenho (S). Quinze minutos após o fim do discurso as primeiras medidas pós-estresse foram realizadas (F1) e 20 minutos depois as últimas medidas foram tomadas (F2). Foi coletado sangue para dosagem plasmática do fármaco experimental 1h:20min., 1h:55min., 2h:20min. e 2h:50min. após ingestão da mesma.

Cada sujeito realizou os testes sempre pela manhã, e foram avaliados conforme descrito na Tabela 2.

**Tabela 2.** Fluxograma dos procedimentos para coleta de dados.

Horário	Fase	Procedimento
- 2:00	Café da manhã	Ingestão de um copo de suco de laranja e um pão com manteiga
- 0:30	Adaptação	Chegada ao Laboratório; 1ª parte do Termo de Consentimento- Inserção da cânula – 1ª Coleta de Sangue
- 0:15	Pré-droga (B)	Aferições de parâmetros fisiológicos e subjetivos de ansiedade
0	Ingestão da droga	
+ 1:20	Pré-estresse (P)	Aferições de parâmetros fisiológicos e subjetivos de ansiedade - 2ª Coleta de Sangue
+ 1:30	Instrução na tela de <i>notebook</i>	Orientados a preparar discurso sobre sistema de transportes; 2ª parte do Termo de Consentimento
+ 1:32	Preparação do discurso	
+ 1:34	Ansiedade antecipatória (A)	Aferições de parâmetros fisiológicos e subjetivos de ansiedade
+ 1:45	Início do discurso	Sujeitos falam em frente à câmera, vendo-se na tela da televisão
+ 1:47	Ansiedade de performance (S)	Aferições de parâmetros fisiológicos e subjetivos de ansiedade
+ 1:53	Discurso continua	
+ 1:55	Término do discurso	3ª Coleta de Sangue
+ 2:10	Pós-estresse 1 (F1)	Aferições de parâmetros fisiológicos e subjetivos de ansiedade
+ 2:20	Dosagem plasmática 3	4ª Coleta de Sangue
+ 2:30	Pós-estresse 2 (F2)	Aferições de parâmetros fisiológicos e subjetivos de ansiedade
+ 2:50	Dosagem plasmática 4	5ª Coleta de Sangue

A escolha dos tempos nos determinados pontos de avaliação durante a sessão experimental foi baseada no fato de que o pico plasmático das drogas experimentais normalmente ocorrer entre uma e duas horas após a ingestão oral (DAVIDSON *et al.*, 1993; OTTO *et al.*, 2000; AGURELL *et al.*, 1981). Os investigadores também estavam cegos em relação ao conteúdo das cápsulas até o final da coleta de dados.

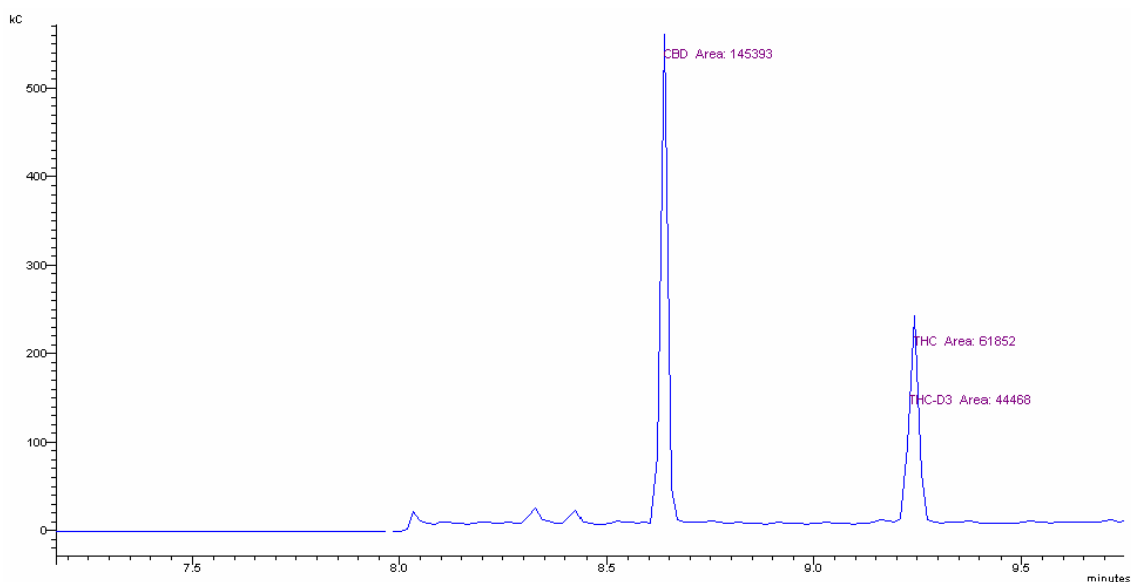


## **Resultados e Discussão**

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

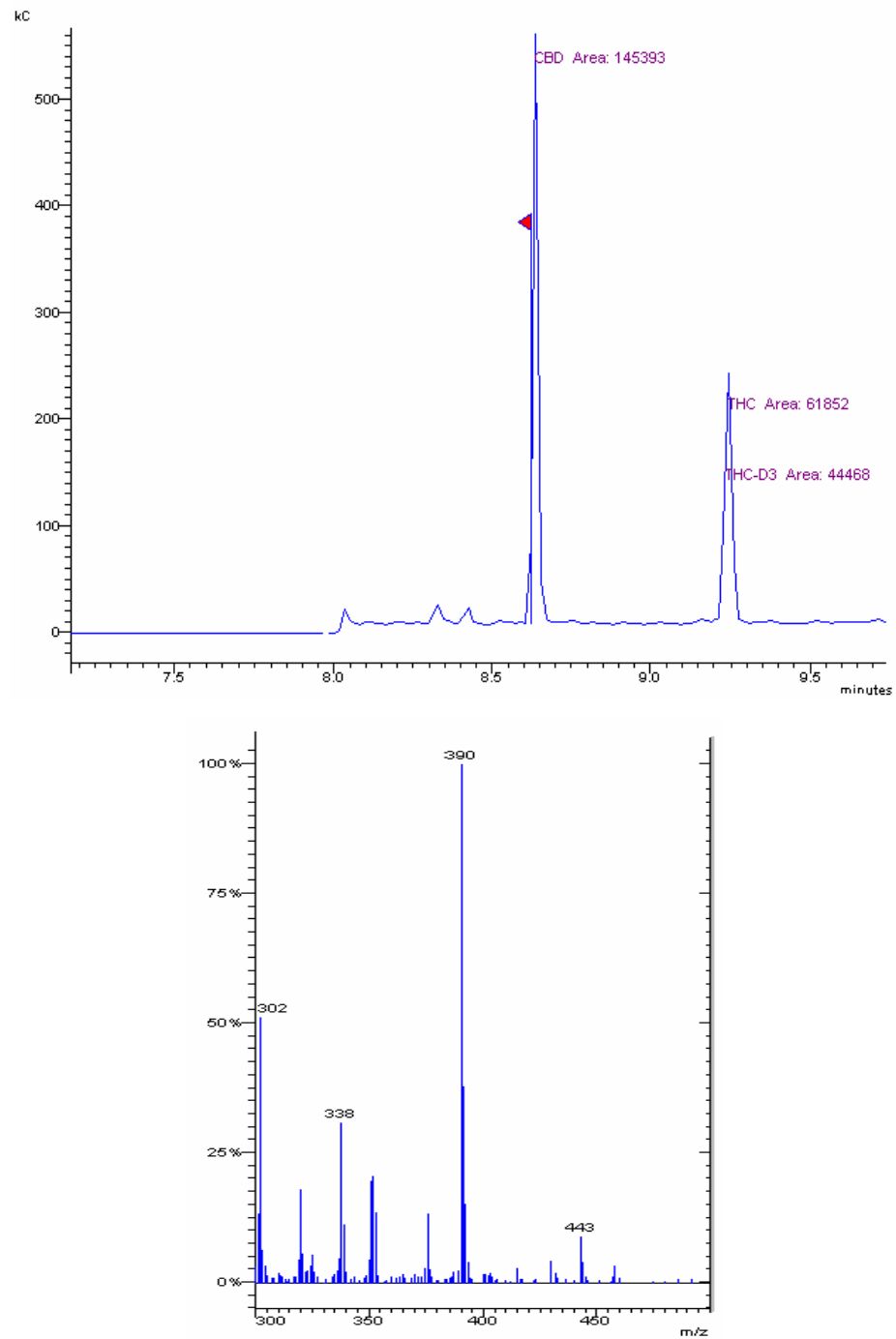
### 4.1. Avaliação da separação cromatográfica dos analitos, determinação de tempos de retenção e íons de identificação e quantificação

Com o objetivo de obter os tempos de retenção e os espectros de massas para a definição dos íons de identificação e quantificação dos analitos de interesse, uma mistura padrão contendo CBD,  $\Delta^9$ THC e  $\Delta^9$ THCd3 foi analisada no modo *Full Scan* de detecção. A Figura 7 apresenta o cromatograma da análise da mistura de padrões.

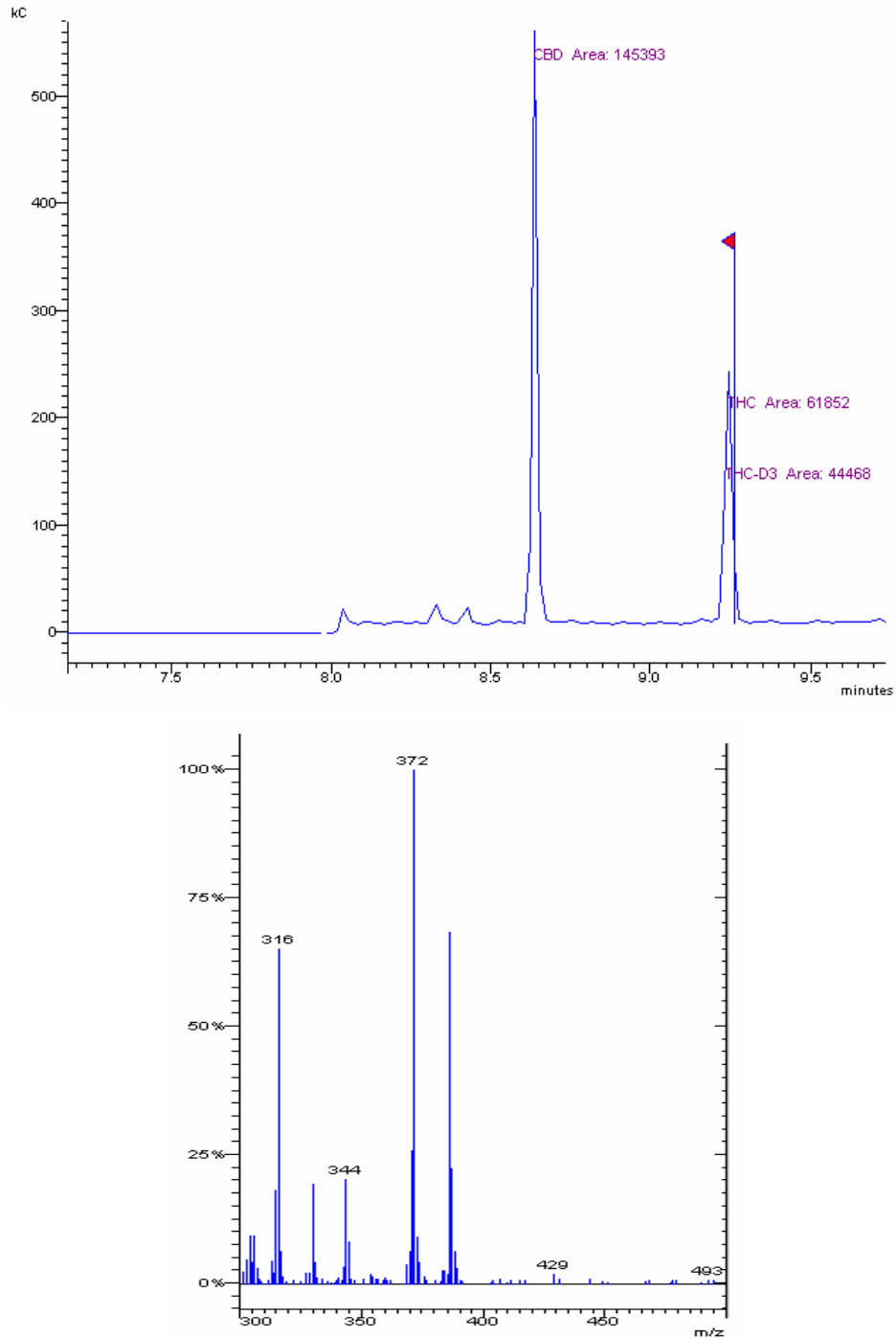


**Figura 7.** Cromatograma dos padrões de CBD (100 ng),  $\Delta^9$ THC (100 ng) e  $\Delta^9$ THCd3 (50 ng) secos e derivatizados analisados no modo *Full Scan*.

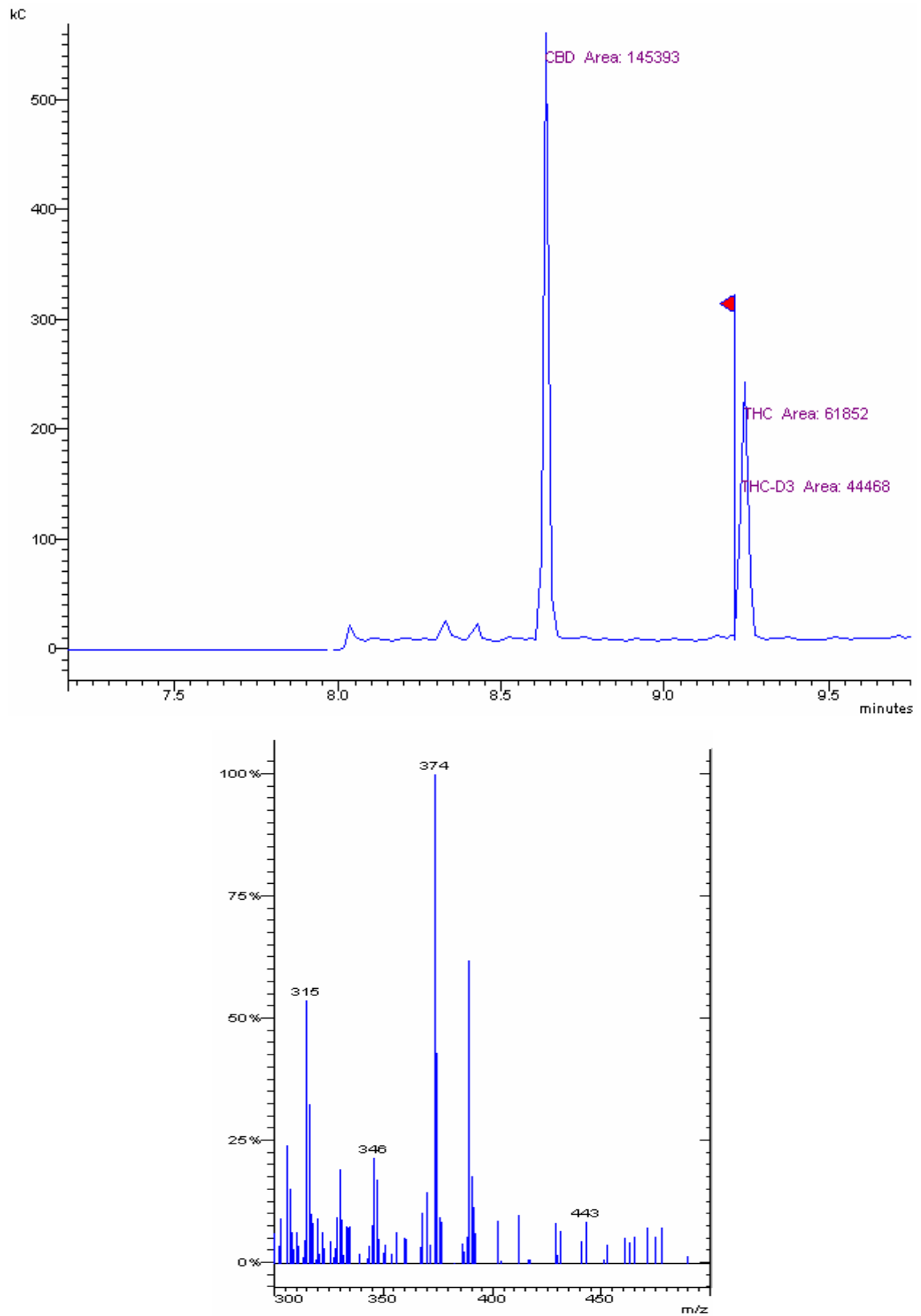
Pode ser observado que em um tempo curto de análise foi obtida uma ótima separação dos analitos, com picos bem resolvidos, simétricos e afilados. Os tempos de retenção obtidos foram CBD (8,65 min) e  $\Delta^9$ THC/ $\Delta^9$ THCd3 (9,25 min). As Figuras 8, 9, e 10 mostram os cromatogramas e os espectros de massas de cada analito, enquanto que a Tabela 1 apresenta os íons de identificação e quantificação característicos de cada analito após a fragmentação.



**Figura 8.** Cromatograma do padrão e espectro de massas do CBD (100 ng) no modo *Full Scan* de detecção.



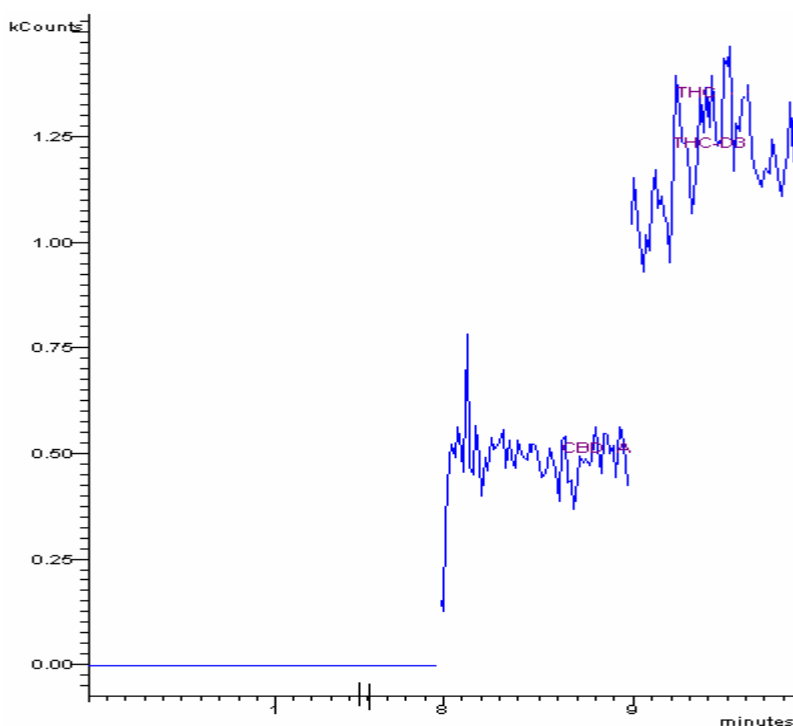
**Figura 9.** Cromatograma do padrão e espectro de massas do  $\Delta^9$ THC (100 ng) no modo *Full Scan* de detecção.



**Figura 10.** Cromatograma dos padrões e espectro de massas do  $\Delta^9\text{THCd3}$  (50 ng) no modo Full Scan de detecção.

Para a identificação e quantificação dos analitos CBD,  $\Delta^9$ THC e  $\Delta^9$ THCd3 foram utilizados os seguintes íons: CBD: 375, (390), 391;  $\Delta^9$ THC: (371), 372, 386;  $\Delta^9$ THCd3: (374), 375, 389, sendo que os íons entre parênteses foram utilizados como íons de quantificação.

Antes do início do desenvolvimento da metodologia de análise, uma alíquota do *pool* de plasma “branco” foi analisada para confirmar a ausência de quaisquer componentes endógenos ou exógenos que poderiam interferir nas análises, caso fossem eluídos nos mesmos tempos de retenção dos analitos. A Figura 11 mostra o resultado cromatográfico de uma análise de plasma “branco” realizada no modo *S/S* de detecção.

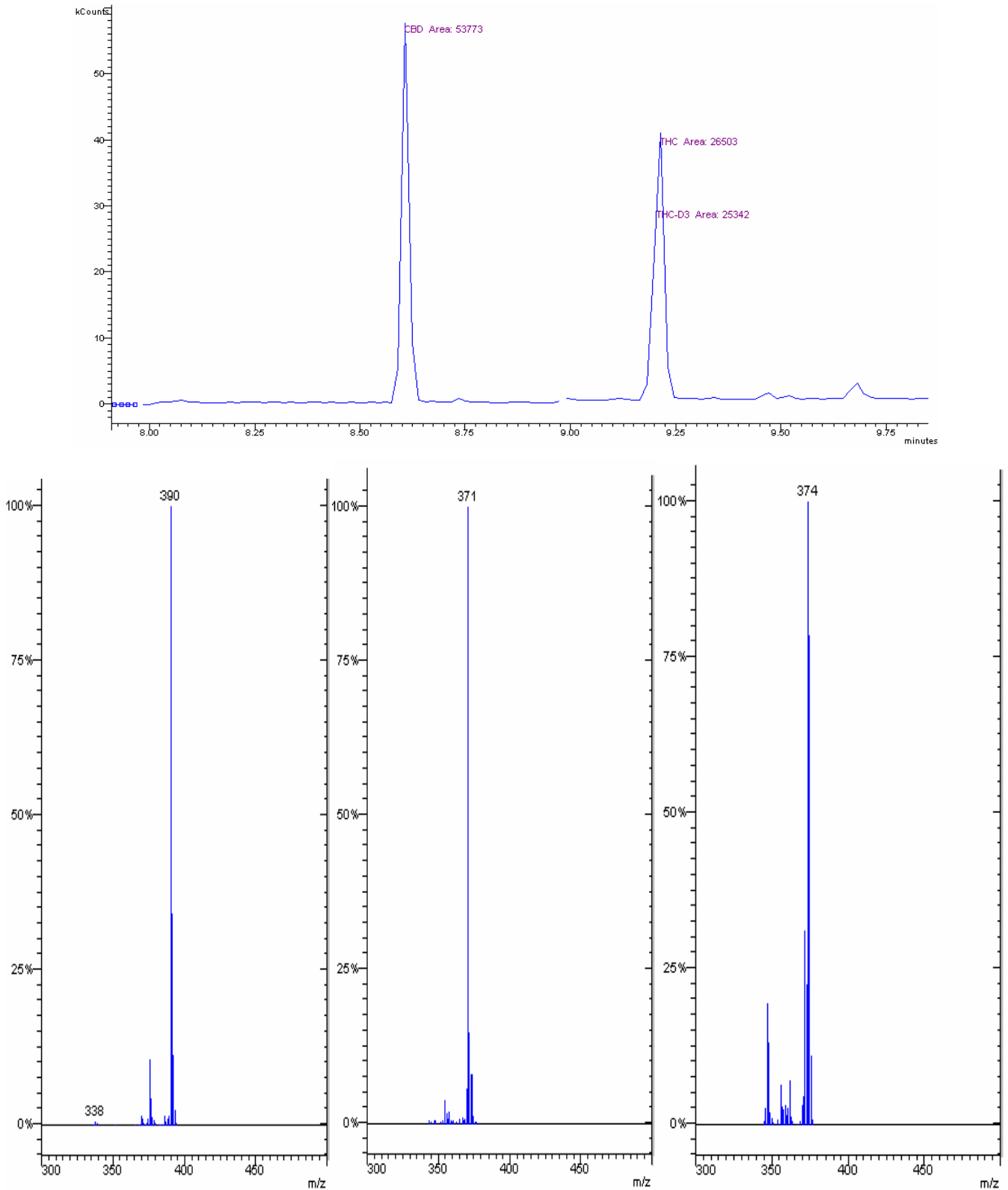


**Figura 11.** Resultado cromatográfico da análise de uma amostra de plasma “branco” realizada no modo *S/S* de detecção.

Pode ser observado que não há a presença de picos na região dos tempos de retenção dos analitos de interesse CBD,  $\Delta^9$ THC e  $\Delta^9$ THCd3, indicando que a matriz escolhida poderá ser utilizada para o desenvolvimento do método nas condições de análises determinadas.

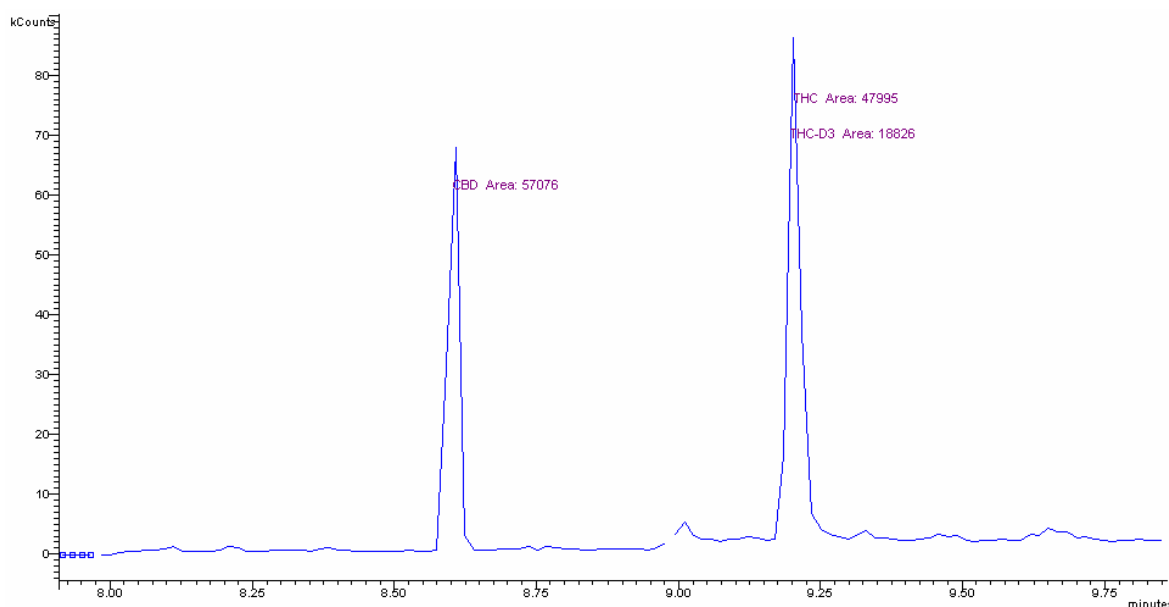
Para melhorar a detecção dos analitos presentes na amostra de plasma em concentrações baixas, as análises passaram então a serem feitas utilizando o modo *S/S* de detecção. Como pode ser observado na Figura 12, os ruídos são diminuídos,

aumentando a razão sinal ruído, sendo que os espectros de massas do CBD,  $\Delta^9$ THC e  $\Delta^9$ THCd3 apresentam somente os íons mais abundantes característicos da fragmentação da substância.



**Figura 12.** Cromatograma e espectros de massas do CBD,  $\Delta^9$ THC e  $\Delta^9$ THCd3 no modo S/S de detecção.

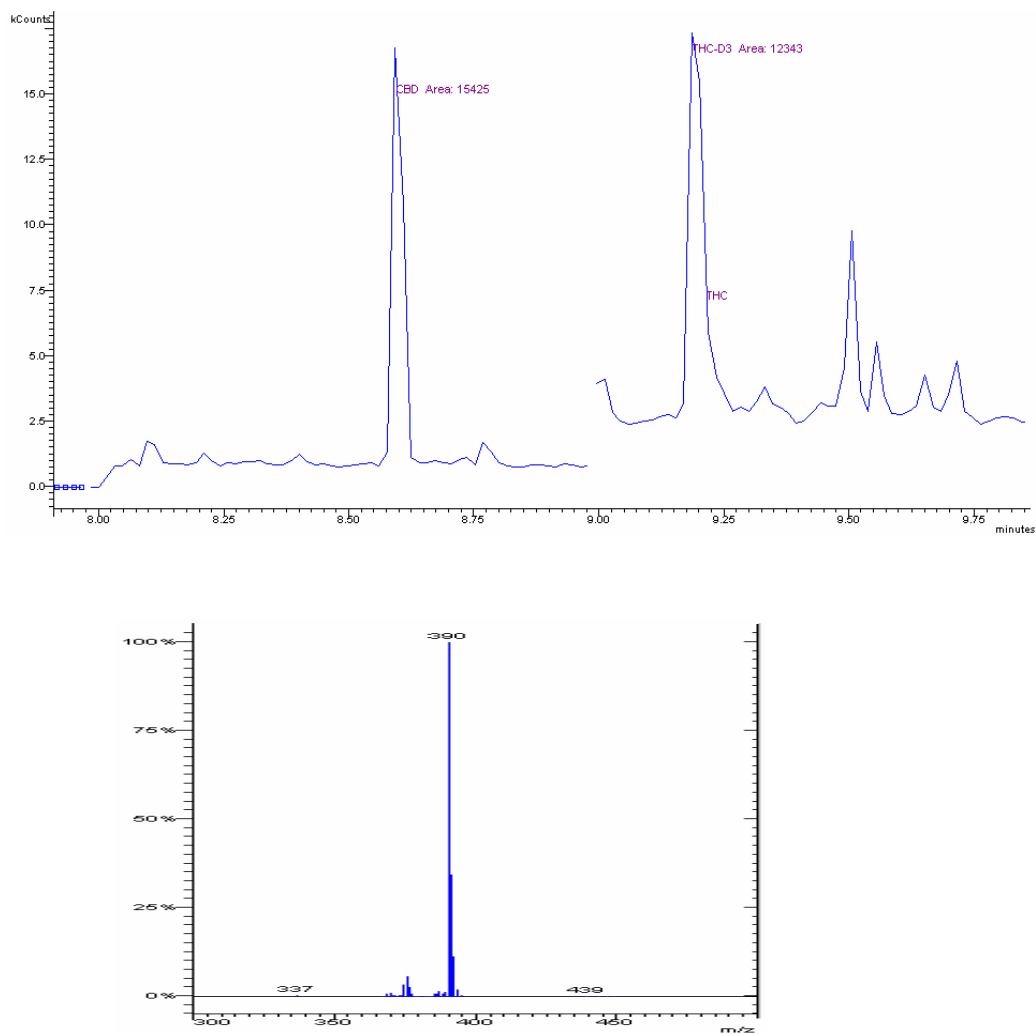
Para o desenvolvimento da metodologia, alíquotas de plasma “branco” foram contaminadas com a mistura de padrões e em seguida extraídos de acordo com a metodologia descrita no item 3.1.3.2. A Figura 13 mostra o cromatograma obtido da análise de uma amostra de plasma “branco” contaminado com a mistura de padrões.



**Figura 13.** Cromatograma da análise de uma amostra de plasma “branco” contaminado com 100 ng de CBD e  $\Delta^9$ THC e 50 ng de  $\Delta^9$ THCd3.

Após a validação da metodologia desenvolvida, amostras de plasma obtidas dos voluntários da pesquisa que receberam CBD por via oral foram analisadas. A Figura 14 mostra o resultado cromatográfico da análise de uma amostra de plasma coletada de um dos voluntários que participou da pesquisa.





**Figura 14.** Cromatograma e espectro de massas do CBD referente à análise de plasma de voluntário exposto ao CBD.

No cromatograma (Figura 14) pode ser observada a presença de dois picos referentes ao CBD e ao  $\Delta^9$ THCd3, utilizado como padrão interno para quantificação.

## 4.2. Parâmetros de validação

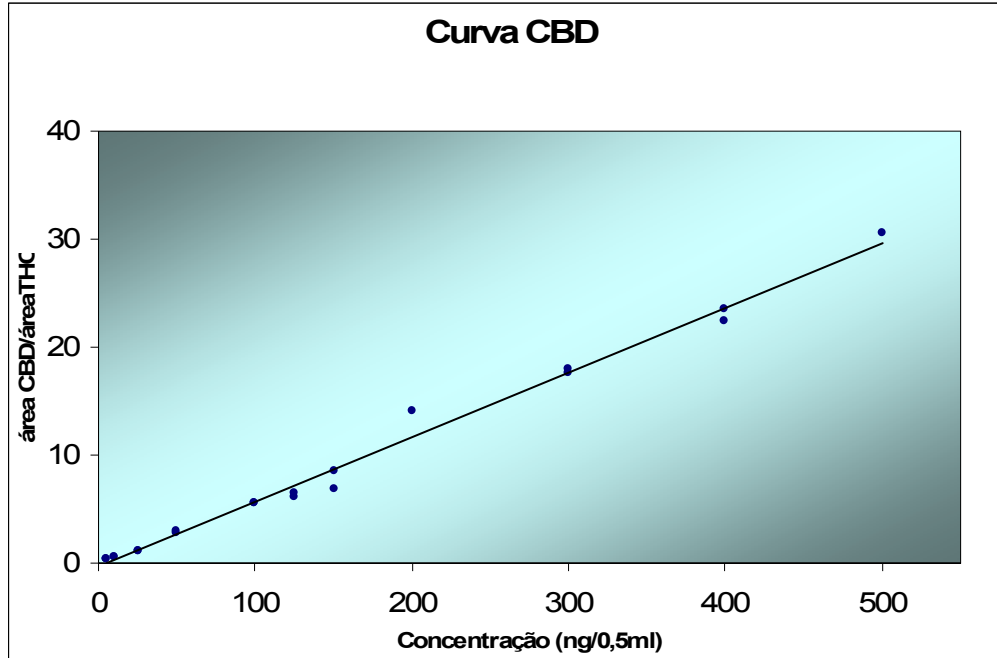
### 4.2.1. Linearidade

#### 4.2.1.1. Critérios de aceitação da linearidade

A linearidade é descrita pela equação de regressão linear  $y = ax + b$ , onde  $a$  é a inclinação da reta e  $b$  a intersecção da curva no eixo y.

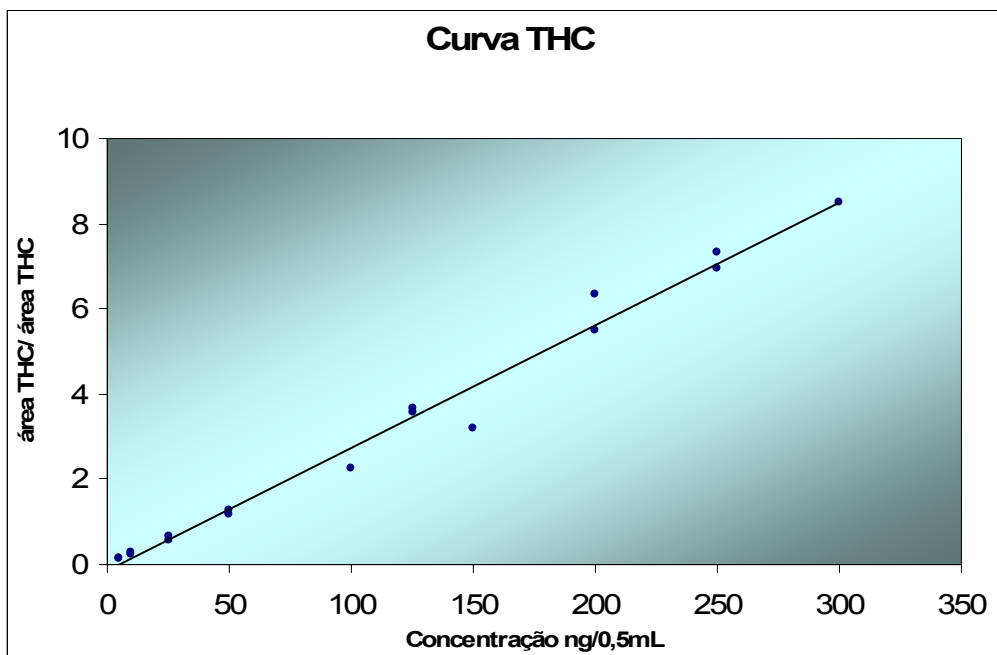
Para que um método seja considerado linear ele deve apresentar um coeficiente de determinação superior a 0,98.

A Figura 15 apresenta a curva analítica que indica o intervalo de linearidade do método para a determinação do CBD. Pode ser observado que o método é linear no intervalo de concentração de 5 a 500 ng/0,5 mL de plasma.



**Equação da reta:  $y=0,06X- 0,325$**   
**Coefficiente de Determinação ( $r^2$ ): 0,991**

**Figura 15.** Curva de linearidade referente à metodologia de análise de CBD.



**Equação da reta:  $y=0,0288X-0,129$**   
**Coefficiente de Determinação ( $r^2$ ): 0,985**

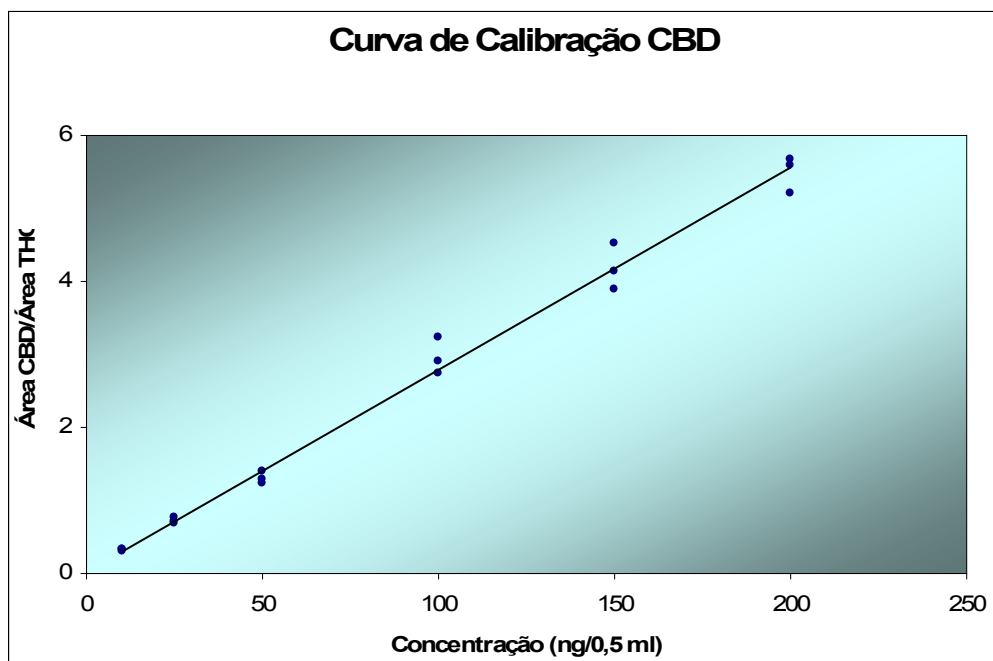
**Figura 16.** Curva de linearidade referente à metodologia de análise de  $\Delta^9$ THC.

A Figura 16 apresenta a curva analítica que indica o intervalo de linearidade do método para a determinação do  $\Delta^9$ THC, e que se mostrou linear no intervalo de concentração de 5 a 300 ng/0,5 mL de plasma.

#### 4.2.2. Curva de Calibração

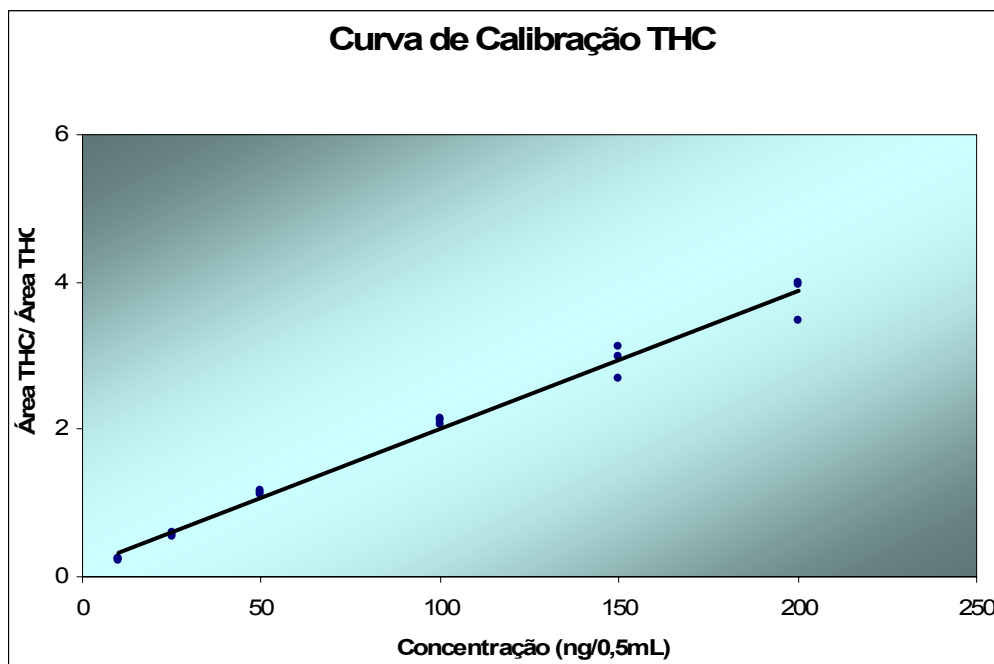
##### 4.2.2.1. Critérios de aceitação da curva de calibração

De acordo com a resolução da ANVISA a curva de calibração deve ser feita com no mínimo 6 pontos (concentrações) e com um “n” (número de replicatas) igual a 3. Deve apresentar, assim como na linearidade, um coeficiente de determinação igual ou superior a 0,98, e um coeficiente de variação (CV%) inferior à 15%. As Figuras 16 e 17 representam as curvas de calibração para o CBD e  $\Delta^9$ THC respectivamente. As curvas foram obtidas como preconizado pela ANVISA, na faixa de concentração de 5 a 500 ng/0,5 mL de plasma com coeficiente de determinação de 0,991 e de 5 a 300 ng/0,5 mL de plasma para o  $\Delta^9$ THC com coeficiente de determinação de 0,987 para o  $\Delta^9$ THC.



Equação da reta:  $y=0,0276X-0,0354$   
Coeficiente de Determinação ( $r^2$ ): 0,991 - CV %: 7,89

Figura 17. Curva de calibração para o CBD.



Equação da reta:  $y=0,0187X-0,1323$   
 Coeficiente de Determinação ( $r^2$ ): 0,987 - CV %: 9,23

**Figura 18.** Curva de calibração para o  $\Delta^9$ THC.

#### 4.2.3. Limites de detecção e quantificação

##### 4.2.3.1. Critérios de aceitação dos limites de quantificação e detecção

A sensibilidade do método foi avaliada através da determinação dos limites de detecção e quantificação realizados em duas análises cromatográficas em dias diferentes.

É aceito como limite de quantificação a menor concentração que pode ser quantificada com precisão, exatidão e com um desvio padrão inferior a 20% com relação a concentração nominal. A Tabela 3 apresenta os valores de limites de detecção e quantificação para os analitos CBD e  $\Delta^9$ THC.

**Tabela 3.** Limites de detecção e quantificação do CBD e  $\Delta^9$ THC.

	<b>CBD</b>	<b><math>\Delta^9</math>THC</b>
<b>Limite de Detecção</b>	0,1 ng/0,5 mL	5,0 ng/0,5 mL
<b>Limite de Quantificação</b>	0,5 ng/0,5 mL	10,0 ng/0,5 mL

#### 4.2.4. Precisão e Exatidão

##### 4.2.4.1. Critérios de aceitação da precisão e exatidão

Para que um método seja preciso e exato ele deve apresentar um coeficiente de variação (CV%) assim como um erro relativo (%) menores que 15%, para os controles de qualidade de níveis baixo, médio e alto. As Tabelas 4 e 5 apresentam respectivamente os resultados de precisão e exatidão inter e intra ensaio, para o CBD e  $\Delta^9$ THC.

##### 4.2.4.2. Precisão (CV%) da metodologia de análise

A Tabela 4 apresenta os valores de precisão inter e intra ensaio para o CBD e  $\Delta^9$ THC.

**Tabela 4.** Precisão inter ensaio e intra ensaio para os analitos CBD e  $\Delta^9$ THC. (valores médios n=5)

Analito Conc. (ng/0,5mL)	Inter-ensaio			Intra-ensaio		
	15	70	180	15	70	180
CBD	7,5 %	7,6 %	8,2 %	3,7 %	2,5 %	7,0 %
$\Delta^9$ THC	6,9 %	5,5 %	12,7 %	2,1 %	3,3 %	8,1 %

##### 4.2.4.3. Exatidão (%) da metodologia de análise

A Tabela 5 apresenta os valores de exatidão inter e intra ensaio para o CBD e  $\Delta^9$ THC.

**Tabela 5.** Exatidão inter ensaio e intra ensaio para os analitos CBD e  $\Delta^9$ THC. (valores médios n=5)

Analito Conc. (ng/0,5mL)	Inter-ensaio			Intra-ensaio		
	15	70	180	15	70	180
CBD	1,3 %	8,6 %	7,2 %	1,2 %	4,4 %	4,3 %
$\Delta^9$ THC	1,2 %	7,4 %	12,0 %	5,7 %	12,6 %	14,5 %

O método de análise do CBD se mostrou preciso e exato em cinco análises cromatográficas diferentes. A precisão inter ensaio está na faixa de 7,5% a 8,2% para o CBD, e de 5,5 a 12,7 para o  $\Delta^9$ THC, enquanto que a precisão intra ensaio

ficou na faixa de 2,5% a 7,0% para o CBD e de 2,1% a 8,1% para o  $\Delta^9$ THC para os 5 diferentes dias.

Os valores de exatidão inter ensaio ficaram entre 1,3% a 8,6% para o CBD e entre 1,2% a 12,0% para o  $\Delta^9$ THC, enquanto que os valores intra ensaios ficaram entre 1,2% a 4,4% para o CBD e entre 5,7% a 14,5% para o  $\Delta^9$ THC.

#### 4.2.5. Recuperação

##### 4.2.5.1. Critérios de aceitação da recuperação

Valores de recuperação próximos a 100% são desejáveis, mas valores acima de 60% são aceitáveis, desde que sejam precisos e exatos. A Tabela 6 apresenta os valores de recuperação para o CBD e  $\Delta^9$ THC, que indicam a eficiência da extração do método.

**Tabela 6.** Recuperação dos analitos após a etapa de extração do plasma para os 3 níveis de concentração.

Concentração (ng/0,5mL)	CBD (% recuperação)	$\Delta^9$ THC (% recuperação)
15	75,3	93,2
70	54,6	62,5
180	61,8	54,9

#### 4.2.6. Especificidade

##### 4.2.6.1. Critérios de aceitação da especificidade

O método é considerado específico quando, em presença de outras substâncias endógenas ou exógenas em altas concentrações, tem a capacidade de identificar e quantificar os analitos de interesse, presentes na matriz em baixas concentrações. A especificidade do método desenvolvido foi avaliada através da análise de amostras de plasma “branco” contaminadas com 13 potenciais interferentes na concentração de 100 ng/0,5 mL frente à concentração de CBD e  $\Delta^9$ THC de 15 ng/0,5 mL. A Tabela 13 apresenta as substâncias interferentes utilizadas, os resultados de quantificação de CBD e  $\Delta^9$ THC presentes na amostra em baixas concentrações e os desvios da medida esperada.

**Tabela 7.** Concentrações obtidas dos controles de qualidade de baixa concentração (15 ng/0,5 mL) na presença de alguns prováveis interferentes em altas concentrações (100 ng/0,5 mL).

Interferentes (100 ng/0,5 mL)	CBD (15 ng/0,5 mL) Conc. Obtidas	$\Delta^9$ THC (15 ng/0,5 mL) Conc. Obtidas
Alprazolam	11,4	12,5
Cafeína	11,5	11,9
Citalopram	15,0	12,2
Clomipramina	14,7	14,8
Clonazepam	13,2	14,0
Diazepam	13,1	15,2
Dipirona	12,5	14,5
Etinil Estradiol	15,7	14,0
Fluoxetina	12,6	14,0
Lorazepam	14,0	14,6
Paroxetina	13,2	13,3
Norfluoxetina	14,2	14,1
Sertralina	11,8	14,5

Os resultados obtidos indicam que das 13 substâncias testadas, 3 delas (Alprazolam, cafeína e sertralina), apresentaram resultados que correspondem a um desvio na concentração do analito maior que 20%. Todas as outras substâncias utilizadas como interferentes não prejudicaram a identificação ou quantificação do CBD e do  $\Delta^9$ THC, sendo que, em todos esses casos, o desvio dos resultados esperados foi menor que 20%.

#### 4.2.7. Estabilidade

##### 4.2.7.1. Critérios de aceitação da estabilidade

Testes de estabilidade foram realizados para garantir que os analitos de interesse eram estáveis durante a amostragem, processamento, preparação e armazenamento das amostras.

Para avaliar a estabilidade das amostras contaminadas com os padrões de CBD e  $\Delta^9$ THC, foi aplicado o Teste "t" de *Student*, com um intervalo de confiança de 5%.

Foram consideradas estáveis as amostras que apresentaram um valor de  $p$  maior que 0,05. A Tabela 8 apresenta os resultados da quantificação das amostras contaminadas após ciclos de congelamento/descongelamento para os analitos CBD e  $\Delta^9$ THC.

**Tabela 8.** Valores de  $p$  obtidos após aplicação do Teste “t” nas amostras de CBD,  $\Delta^9$ THC e  $\Delta^9$ THCd3 submetidas aos ciclos de congelamento e descongelamento.

<b>Ciclos de congelamento e descongelamento</b>	<b>Valores de <math>p</math></b>	<b>Ciclos de congelamento e descongelamento</b>	<b>Valores de <math>p</math></b>
<b><i>Tempo = 24 horas</i></b>		<b><i>Tempo = 24 horas</i></b>	
CBD 15 ng/0,5mL	0,4125	$\Delta^9$ THC 48 ng/0,5mL	0,7055
CBD 70 ng/0,5mL	0,4665	$\Delta^9$ THC 96 ng/0,5mL	0,9099
CBD 180 ng/0,5mL	0,3665	$\Delta^9$ THC 160 ng/0,5mL	0,0500
<b><i>Tempo = 48 horas</i></b>		<b><i>Tempo = 48 horas</i></b>	
CBD 15 ng/0,5mL	0,0510	$\Delta^9$ THC 48 ng/0,5mL	0,0001
CBD 70 ng/0,5mL	0,3482	$\Delta^9$ THC 96 ng/0,5mL	0,0231
CBD 180 ng/0,5mL	0,4845	$\Delta^9$ THC 160 ng/0,5mL	0,0231
<b><i>Tempo = 72 horas</i></b>		<b><i>Tempo = 72 horas</i></b>	
CBD 15 ng/0,5mL	0,1207	$\Delta^9$ THC 48 ng/0,5mL	0,0001
CBD 70 ng/0,5mL	0,0511	$\Delta^9$ THC 96 ng/0,5mL	0,0045
CBD 180 ng/0,5mL	0,0500	$\Delta^9$ THC160 ng/0,5mL	0,0200

O CBD apresentou-se estável após todos os ciclos de congelamento e descongelamento. O  $\Delta^9$ THC, após 48 horas de congelamento, o ponto de menor concentração não permaneceu estável, após 72 horas de congelamento as três concentrações avaliadas perderam a estabilidade.

A Tabela 9 apresenta os resultados da quantificação das amostras contaminadas após a etapa de processamento para os analitos CBD e  $\Delta^9$ THC.



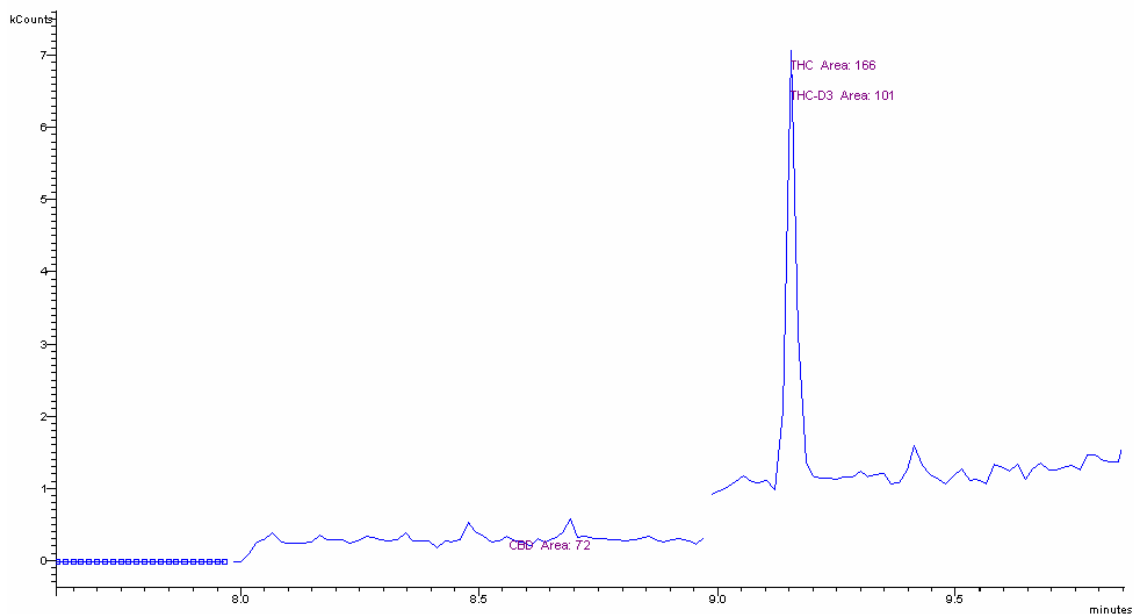
**Tabela 9.** Valores de  $p$  obtidos após aplicação do Teste “t” nas amostras extraídas e derivatizadas de CBD,  $\Delta^9$ THC e  $\Delta^9$ THCd3 submetidas a temperatura ambiente por 4 e 18 horas.

<b>Estabilidade pós-processamento da amostra (Rack)</b>	<b>Valores de <math>p</math></b>	<b>Estabilidade pós-processamento da amostra (Rack)</b>	<b>Valores de <math>p</math></b>
<b>Tempo = 4 horas</b>		<b>Tempo = 4 horas</b>	
CBD 15 ng/0,5mL	0,2643	$\Delta^9$ THC 48 ng/0,5mL	0,0052
CBD 70 ng/0,5mL	0,2130	$\Delta^9$ THC 96 ng/0,5mL	0,0433
CBD 180 ng/0,5mL	0,9422	$\Delta^9$ THC 160 ng/0,5mL	0,0004
<b>Tempo = 18 horas</b>		<b>Tempo = 18 horas</b>	
CBD 15 ng/0,5mL	0,0385	$\Delta^9$ THC 48 ng/0,5mL	0,0011
CBD 70 ng/0,5mL	0,0321	$\Delta^9$ THC 96 ng/0,5mL	0,0042
CBD 180 ng/0,5mL	0,5819	$\Delta^9$ THC 160 ng/0,5mL	0,0037

As amostras extraídas e derivatizadas de CBD permaneceram estáveis até 18 horas em temperatura ambiente nas três concentrações avaliadas. As amostras de THC não apresentaram estabilidade por mais de 4 horas.

#### **4.2.8. Carry Over**

Na avaliação do parâmetro *carry over*, não foi observado um aumento na concentração dos analitos CBD e  $\Delta^9$ THC em baixas concentrações quando analisadas logo após a análise de amostras contaminadas com concentrações altas de analitos. A Figura 19 mostra um cromatograma da análise de uma amostra contaminada com os analitos em baixa concentração após a análise de uma amostra contaminada com CBD (200 ng) e  $\Delta^9$ THC (200 ng).



**Figura 19.** Cromatograma de plasma branco analisado após a análise do último ponto da curva: CBD (200 ng),  $\Delta^9$ THC (200 ng) e  $\Delta^9$ THCd3 (50 ng).

Nenhum dos analitos foi quantificado no plasma “branco” após a análise de altas concentrações de CBD e  $\Delta^9$ THC, sendo que a concentração detectada está abaixo do limite de quantificação do método.

Após pesquisa bibliográfica no *PubMed*, foi observado que Nadulski *et al.* (2005) realizou estudo semelhante ao presente trabalho, tendo obtido os seguintes resultados para os parâmetros de validação do método: Linearidade CBD 0,997,  $\Delta^9$ THC 0,999; Precisão inter-ensaio CBD 2,9%,  $\Delta^9$ THC 2,8% Exatidão inter-ensaio CBD 2,9% e  $\Delta^9$ THC 3,9%. A recuperação obtida para o CBD foi de 90% e para o  $\Delta^9$ THC de 50%. Os LDs foram de 0,29 e 0,24 ng/mL de plasma para o CBD e  $\Delta^9$ THC respectivamente. Os LQs foram de 0,80 e 0,95 ng/mL de plasma para o CBD e  $\Delta^9$ THC respectivamente.

### 4.3. Etapas de otimização do método

O procedimento de extração foi a primeira etapa a ser otimizada, foram testadas extrações líquido-líquido que empregam solventes imiscíveis em água, sistema no qual a separação do analito do material biológico se dá pela partição do mesmo entre as fases aquosa e orgânica. É um procedimento eficaz, simples, rápido e de menor custo quando comparado com outras técnicas existentes atualmente. Vários solventes extratores foram testados como acetato de etila, hexano,

clorofórmio, éter diisopropílico e de petróleo e algumas misturas de solventes como hexano/acetato de etila (8:2), hexano/álcool isoamílico (9:1) e clorofórmio/álcool isoamílico (9:1) e hexano/isopropanol na proporção de 9:1. Diferentes volumes de solventes e/ou misturas foram testadas assim como diversos tempos de agitação para extração.

Foram testadas também diferentes metodologias empregando a técnica de extração em fase sólida (SPE), tais como a metodologia citada por Nadulski *et al.* (2005) que avaliou a recuperação de CBD em amostras de plasma, na qual foi utilizada coluna de sílica como fase sólida.

Apesar do grande volume de solvente orgânico utilizado nas extrações líquido-líquido (2,5 mL para cada amostra), os resultados obtidos com essa técnica, utilizando o éter de petróleo como solvente extrator, foram melhores quando comparadas com os procedimentos empregando a técnica de SPE.

Mesmo sendo o CBD e o  $\Delta^9$ THC compostos de caráter neutro foi feito um estudo de otimização de pH da extração, e foi observado que em pH plasmático a extração foi mais eficiente. Outro procedimento testado foi o *salting out*, adição de cloreto de sódio para saturação da fase aquosa, favorecendo a passagem do analito para a fase orgânica na tentativa de melhorar a recuperação do procedimento de extração porém, a adição de sais não promoveu uma melhora significativa na eficiência da extração.

Análises em cromatografia em fase gasosa requerem o uso de um padrão interno, que tem como função corrigir qualquer diferença de uma injeção para outra e minimizar falhas do procedimento de extração. Este deve possuir características químicas em comum ao analito.

Foram testadas várias substâncias tais como, ibuprofeno, a fenilbutazona, a cumarina, a benzocaína, a lidocaína e o  $\Delta^9$ THCd3, que apresentam propriedades comuns ao canabidiol, como afinidade pela coluna cromatográfica empregada, polaridade e pH. Como as análises estavam sendo feitas utilizando um detector de massas, que apresenta habilidade em distinguir diferentes grupamentos químicos formados pela fragmentação da molécula, e pela maior semelhança com os analitos estudados, optou-se por utilizar o  $\Delta^9$ THCd3 como padrão interno.

Com o intuito de melhorar a sensibilidade das análises, foi introduzido o procedimento de derivatização, o qual permite que os analitos se tornem menos polares e mais voláteis, melhorando o processo cromatográfico.

Existem vários procedimentos descritos na literatura sobre a etapa de derivatização do CBD e do  $\Delta^9$ THC. (NADULSKI e PRAGST 2007), (SAITO, *et al.*, 2004), (GUSTAFSON, *et al.*, 2003), (BAPTISTA, *et al.*, 2002), (MUSSHOFF, *et al.*, 2002).

Neste trabalho, diversos procedimentos foram adaptados e testados porém a derivatização proposta por Gustafson, *et al.* (2003), que realiza a derivatização diretamente no frasco de amostrador automático se mostrou mais apropriada pois resultou em maior eficiência e praticidade.

#### **4.4. Aplicação da metodologia validada em pacientes com transtorno de ansiedade social, submetidos ao teste de simulação de falar em público, após administração controlada do CBD**

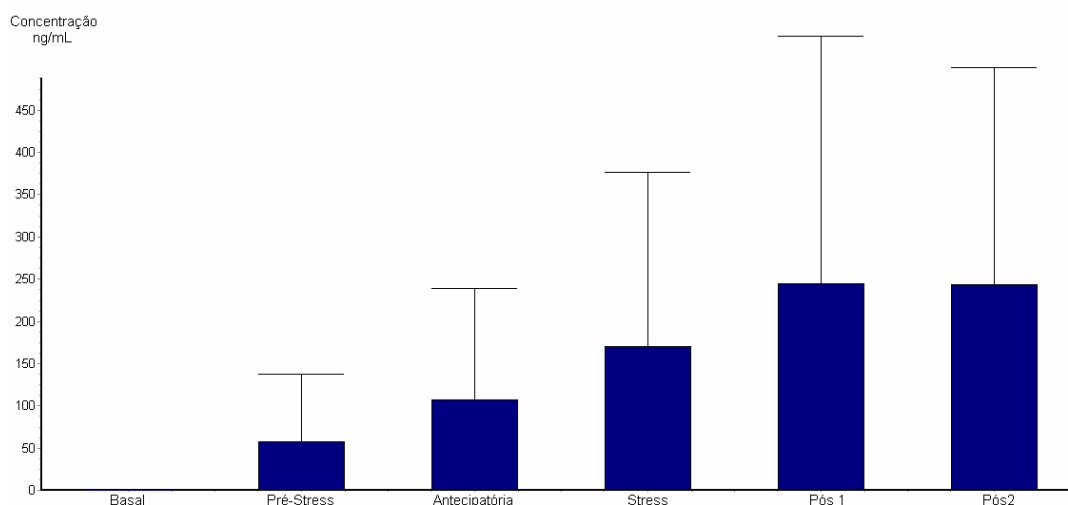
A metodologia desenvolvida foi aplicada na análise de amostras de plasma coletadas de seis pacientes com transtorno de ansiedade social, submetidos ao teste de simulação de falar em público, após administração controlada do CBD. A Tabela 10 apresenta os resultados das análises das amostras de plasma coletadas dos pacientes envolvidos no experimento.

**Tabela 10.** Concentrações plasmáticas de CBD obtidas após a coleta de sangue nos tempos pré-estabelecidos.

Etapas	Pac. 1 Conc. (ng/mL)	Pac. 2 Conc. (ng/mL)	Pac. 3 Conc. (ng/mL)	Pac. 4 Conc. (ng/mL)	Pac. 5 Conc. (ng/mL)	Pac. 6 Conc. (ng/mL)
Basal	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Pré-stress	16,4	84,0	2,2	208,0	1,0	33,5
Antecipatória	22,6	277,0	5,4	274,8	2,6	59,2
Stress	32,0	473,0	14,0	387,1	9,7	108,3
Pós 1	36,5	657,1	23,0	572,2	15,0	163,3
Pós 2	50,4	433,7	23,5	634,6	17,9	300,0

Pac. = paciente

A Figura 20 mostra grande desvio padrão entre as concentrações obtidas no mesmo tempo de coleta.



**Figura 20.** Gráfico das concentrações obtidas e desvios padrões.

Além da variabilidade inter-individual, o sexo, o peso e o índice de massa corpórea variaram entre os voluntários e não foram devidamente registrados, fatores que certamente afetariam a biodisponibilidade e a biotransformação de qualquer fármaco. A ausência destas informações dificulta a análise dos resultados, principalmente por não haver muitos dados referentes à farmacocinética do CBD.

O tempo de armazenamento da amostra também variou muito de um voluntário para o outro, segundo Wong *et al.* (1982) amostras de soro e plasma contaminadas com  $\Delta^9$ THC permaneceram inalteradas até a 13ª semana de armazenamento à 5° C, -5° C e -20° C, após a 15ª semana foram obtidos resultados menores e irregulares de recuperação, após a 19ª semana o valor da recuperação foi menor indicando uma perda de  $\Delta^9$ THC e após a 23ª semana o  $\Delta^9$ THC não foi mais detectado.

Diferentemente de Johnson *et al.* (1984) que avaliaram a estabilidade do THC e de seus metabólitos em sangue total e em plasma durante o período de 6 meses, a -10° C e a 4° C concluíram que o  $\Delta^9$ THC e seus metabólitos permaneceram estáveis em até 6 meses de armazenamento.

No presente estudo o tempo de armazenamento variou de 3 meses a 15 meses pois, as coletas foram iniciadas antes da conclusão da validação da metodologia.

Além de todos esses fatores, a dificuldade de se selecionar indivíduos com o transtorno de ansiedade social tendo como principal traço o medo de falar em público e não estar em tratamentos medicamentosos para tal fobia e outras comorbidades reduziu o número de voluntários, não permitindo uma análise estatisticamente significativa com relação às concentrações plasmáticas obtidas.

## **Conclusão**

## **5. CONCLUSÃO**

A metodologia analítica desenvolvida e completamente validada para a determinação de Canabidiol em amostras de plasma humano, se mostrou apropriada considerando os resultados obtidos para os parâmetros de validação. A sensibilidade e especificidade da metodologia possibilita sua aplicação em estudos clínicos, na análise quantitativa de Canabidiol em amostras de plasma coletadas de pacientes com transtornos de ansiedade social, após a administração controlada via oral do Canabidiol. A mesma metodologia permite também a determinação de Tetraidrocanabinol tanto em avaliações clínicas como em investigações forenses.

## **Referências Bibliográficas**



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGURELL, S.; CARLSSON, S.; LINDGREN J.E.; OHLSSON, A.; GILLESPIE, H.; HOLLISTER, L. Interactions of delta 1-tetrahydrocannabinol with cannabiniol and cannabidiol following oral administration in man. Assay of cannabiniol and cannabidiol by mass fragmentography. **Experientia** 37 (10): 1090-1092, 1981.

BAPTISTA, M, J.; MONSANTO, P, V.; MARQUES, E, G, P.; BERMEJO, A.; ÁVILA, S.; CASTANHEIRA, A, M.; MARGALHO, C.; BARROSO, M.; VIEIRA, N, D.; Hair analysis for  $\Delta^9$  - THC,  $\Delta^9$ -THC-COOH, CBN and CBD, by GC/MS-EI Comparison with GC/MS - NCI for  $\Delta^9$ -THC-COOH. **Forensic Sci. Int.** 128 (1-2): 66-78, 2002.

BOYS, A.; MARSDEN, J.; GRIFFITHS, P.; FOUNTAIN, J.; STILLWELL, G.; STRANG, J. Substance use among young people: the relationship between perceived functions and intentions. **Addiction.** 94 (7): 1043-1050, 1999.

CARLINI EA, Galduróz JC, Noto AR, Nappo SA. I Levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 107 maiores cidades do país. **CEBRID: UNIFESP**; 2002.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis. Viewpoint and discussion. **J. Chromatogr. B.** 689 (1): 175-180, 1997.

COMPTON, W.M.; COTTLER, L.B.; BEN ABDALLAH, A.; PHELPS, D.L.; SPITZNAGEL, E.L.; HORTON, J.C. Substance dependence and other psychiatric disorders among drug dependent subjects: race and gender correlates. **Am. J. Addict.** 9 (2): 113-125, 2000.

CONSROE, P.; LAGUNA, J.; ALLENDER, J.; SNIDER, S.; STERN, L.; SANDYK, R.; KENNEDY, K.; SCHRAM, K. Controlled clinical trial of cannabidiol in huntington's disease. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 40 (3): 701-708, 1991.

CRIPPA, J.A.; ZUARDI, A.W.; GARRIDO, G.E.; WICHERT-ANA, L.; GUARNIERI, R.; FERRARI, L.; AZEVEDO-MARQUES, P.M.; HALLAK, J.E.; MCGUIRE, P.K.; FILHO BUSATTO, G. Effects of cannabidiol (CBD) on regional cerebral blood flow. **Neuropsychopharmacology.** 29, 417-426, 2004.

DAVIDSON, JRT.; POTTS, N.; RICHICHI, E.; KRISHNAN, R.; FORD, S.M.; SMITH, R.; WILSON, W.H. Treatment of social phobia with clonazepam and placebo. **J. Clin. Psychopharmacol.** 13 (6): 423-428, 1993.

DEAS, D.; GERDING, L.; HAZY, J. Marijuana and panic disorder. **J. Am.Acad. Child Adolesc. Psychiatry.** 39 (12): 1467-1467, 2000.

DEGENHARDT, L.; HALL, W.; LYNSKEY, M. The relationship between cannabis use, depression and anxiety among Australian adults: findings from the National Survey of Mental Health and Well-Being. **Soc. Psychiatry. Psychiatr. Epidemiol.** 36 (5): 219-227, 2001.

FABRE, L.F.; MCLENDON, D. The efficacy and safety of nabilone (a synthetic cannabinoid) in the treatment of anxiety. **J. Clin. Pharmacol.** 21 (8-9): 377S-382S, 1981.

FREUND, T.F.; KATONA, I.; PIOMELLI, D. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. **Physiol. Rev.** 83 (3): 1017-66, 2003

GALDUROZ JC, Noto AR, Nappo SA, Carlini EA. Trends in drug use among students in Brazil: analysis of four surveys in 1987, 1989, 1993 and 1997. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 37(4):523-31, 2004.

GOISMAN, R.M.; GOLDENBERG, I.; VASILE, R.G.; KELLER, M.B. Comorbidity of anxiety disorders in a multicenter anxiety study. **Compr. Psychiatry.** 36 (4): 303-311, 1995.

GRLIC, L. A comparative study on some chemical and biological characteristics of various samples of cannabis resin. **Bull. Narcot.** 14 (3): 37-46, 1962.

GROTENHERMEN, F.; RUSSO, E. **Cannabis and Cannabinoids: pharmacology, toxicology and therapeutic potential.** Nova York: Howorth Integrative press, 67 – 87, 2002.

GUIMARAES, F.S.; CHIARETTI, T.M.; GRAEFF, F.G.; ZUARDI, A.W. Antianxiety effect of cannabidiol in the elevated plus-maze. **Psychopharmacology (Berl).** 100 (4): 558-559, 1990.

GUSTAFSON, R, A.; MOOLCHAN, E, T.; BARNES, A.; LEVINE, B.; HUESTIS, M, A. Validated method for the simultaneous determination of  $\Delta^9$ tetrahydrocannabinol (THC) , 11-hydroxy-THC- and 11-nor-9-carboxy-THC in human plasma using solid phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry with positive chemical ionization. **J. Chromatogr. B.** 798 (1): 145-154, 2003.

HALL, W.; SOLOWIJ, N. Adverse effects of cannabis. **Lancet**. 352 (9140): 1611-1616, 1998.

HALL, W.; PACULA, R.L. Cannabis use and dependence: public health and public policy. **Cambridge University Press**; 2003.

HOLLISTER, L.E. Health aspects of cannabis. **Pharmacol. Rev.** 38(1): 1-20, 1986.

HOWLETT, A.C. ; BARTH, F.; BONNER, T.I.; CABRAL, G.; CASELLAS, P.; DEVANE, W.A.; FELDER, C.C.; HERKENHAM, M.; MACKIE, K.; MECHOULAM, R.; PERTWEE, R.G. International Union of Pharmacology XXVII : Classification of Cannabinoids receptors. **Pharmacol. Rev.** 54 (2): 161-202, 2002.

ILARIA, R.L.; THORNBY, J.I.; FANN, W.E. Nabilone, a cannabinol derivative, in the treatment of anxiety neuroses. **Current Therapeutic Research**. 29 (6): 943-949, 1981.

JOHNS, A. Psychiatric effects of cannabis. **Br. J. Psychiatry**. 178:116-122, 2001.

JOHNSON, J. R.; JENNISON, T. A.; PEAT, M. A.; FOLTZ, R. L. Stability of Tetrahydrocannabinol (THC), 11-Hydroxy-THC, and 11-Nor-9-carboxy-THC in blood and plasma. **J. of Analytical Toxicology**. Vol. 8. 202-204, 1984.

KARNIOL, I.G.; CARLINI, E.A. Pharmacological interaction between cannabidiol and delta 9-tetrahydrocannabinol. **Psychopharmacologia (Berl)**. 33 (1): 53-70, 1973.

LACHENMEIER, D.W.; KROENER, L.; MUSSHOFF, F.; MADEA, B. Determination of cannabinoids in hemp food products by use headspace solid-phase microextraction and gas chromatograph-mass spectrometry. **Anal. Bioanal. Chem.** 378 (1): 183-189, 2004.

LANGS G, FABISH H, FABISH K, ZAPOTOCZKY HG. Can cannabis trigger recurrent panic attacks in susceptible patients? **Eur. Psychiatry**. 12 (8): 415-419, 1997.

MANZANARES J, URIGUEN L, RUBIO G, PALOMO T. Role of endocannabinoid system in mental diseases. **Neurotox. Res.** 6 (3): 213-224, 2004.

MATHEW RJ, WILSON WH, CHIU NY, TURKINGTON TG, DEGRADO TR, COLEMAN RE . Regional cerebral blood flow and depersonalization after tetrahydrocannabinol administration. **Acta Psychiatr. Scand.** 100 (1): 67-75, 1999.

MCGEE R, WILLIAMS S, POULTON R, MOFFITT T. A longitudinal study of cannabis use and mental health from adolescence to early adulthood. **Addiction.** 95 (4): 491-503, 2000.

MECHOULAM R, FRIDE E, DI MARZO V. Endocannabinoids. **Eur. J. Pharmacol.** 16; 359 (1): 1-18, 1998.

MORAN C. Depersonalization and agoraphobia associated with marijuana use. **Br. J. Med. Psychol.** 59:187-196, part 2, 1986.

MUESER KT, DRAKE RE, WALLACH MA. Dual diagnosis: a review of etiological theories. **Addict. Behav.** 23 (6): 717-734, 1998.

MUSSHOFF F, JUNKER HP, LACHENMEIER DW, KROENER L, MADEA B. Fully Automated Determination of Cannabinoids in Hair Samples using Headspace Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **J. Anall. Toxicol.** 26 (8): 554-560, 2002.

NADULSK, J.H. *et al.* Simultaneous and sensitive analysis of THC, 11-OH-THC, THC-COOH, CBD and CBN by GC-MS in plasma after oral application of small doses of THC and Cannabis extract. **J. of Analytical Toxicology.** 28 (8): 782-789, 2005.

NADULSKI, T.; PRAGST, F. Simple and sensitive determination of  $\Delta^9$  – tetrahydrocannabinol, canabidiol and cannabinol in hair by combined silylation, headspace solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. **J. Chromatogr. B.** 846 (1-2): 78-85, 2007.

ONAIWI ES, GREEN MR, MARTIN BR . Pharmacological characterization of cannabinoids in the elevated plus maze. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 253 (3): 1002-1009, 1990.

OTTO MW, POLLACK MH, GOULD RA, WORTHINGTON JJ 3RD, MCARDLE ET, ROSENBAUM JF. A comparison of the efficacy of clonazepam and cognitive-behavioral group therapy for the treatment of social phobia. **J. Anxiety Disord.** 14 (4): 345-58, 2000.

PELLEGRINI, M; et al. A rapid and simple procedure for the determination of cannabinoids in hemp food products by gas chromatography – mass spectrometry. **J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 36 (5): 939 – 946, 2005.

PENG, G, W.; CHIOU, W, L. Analysis of drugs and other toxic substances in biological samples for pharmacokinetics studies. **J. Chromatogr.**, 531:3 -50, 1990.

REILLY D, DIDCOTT P, SWIFT W, HALL W. Long-term cannabis use: characteristics of users in an Australian rural area. **Addiction**. 93 (6): 837-846, 1998.

SAITO, T.; WTSADIK, A.; SCHEIDWEILER, K, B.; FORTNER, N.; TAKEICHI, S.; HUESTIS, M. Validated gas chromatographic – negative ion chemical ionization mass spectrometric method for  $\Delta^9$  – tetrahydrocannabinol in sweat patches. **Clin. Chemistry** 50 (11): 2083 – 2090, 2004.

STAUB C. Chromatographic procedures for determination of cannabinoids in biological samples, with special attention to blood and alternative matrices like hair, saliva, sweat and meconium. **J.Chromat. B**. 377 (1-2): 119-126, 1999.

STEWART SH, KARP J, PIHL RO, PETERSON RA. Anxiety sensitivity and self-reported reasons for drug use. **J. Subst. Abuse**. 9:223-240, 1997.

STRANO-ROSSI S, CHIAROTTI M. Solid-Phase Microextraction for Cannabis Analysis in Hair and its Possible Application to Other Drugs. **J. Anal.Toxicol**. 23 (1): 7-10, 1999.

THOMAS H. A community survey of adverse effects of cannabis use. **Drug Alcohol Depend**. 42 (3): 201-207, 1996.

TOURNIER M, SORBARA F, GINDRE C, SWENDSEN JD, VERDOUX H. Cannabis use and anxiety in daily life: a naturalistic investigation in a non-clinical population. **Psychiatry Research** 118 (1): 1-8, 2003.

TROISI A, PASINI A, SARACCO M, SPALLETTA G. Psychiatric symptoms in male cannabis users not using other illicit drugs. **Addiction**. 93 (4): 487-492, 1998.

WATSON SJ, Benson JA, Joy JE. Marijuana and medicine: assessing the science base: a summary of the 1999 Institute of Medicine report. **Arch. Gen. Psychiatry.** 57(6):547-52, 2000.

WONG, A.S.; ORBANOSKY, M.W.; REEVE, V.C.; BEEDE, J.D. Stability of Delta-9-Tetrahydrocannabinol in stored blood and serum. **Reserch Monography. NIDA,** 1982.

YANG, RQ.; XIE, WL. Determination of cannabinoids in biological samples using a new solid phase micro-extraction membrane and liquid chromatography-mass spectrometry. **Forensic. Sci. Int.** 162 (1-3): 135-139, 2006.

ZUARDI AW, SHIRAKAWA I, FINKELFARB E, KARNIOL IG. Action of cannabidiol on the anxiety and other effects produced by delta 9-THC in normal subjects. **Psychopharmacology (Berl)** 76 (3): 245-250, 1982.

ZUARDI AW, KARNIOL IG. Changes in the conditioned emotional response of rats induced by  $\Delta$ 9THC, CBD and mixture of the two cannabinoids. **Arquiv. Biol. Tec.** 26 (3): 391-397, 1983

ZUARDI AW, GUIMARAES FS, MOREIRA AC. Effect of cannabidiol on plasma prolactin, growth hormone and cortisol in human volunteers. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 26 (2): 213-217, 1993b.

ZUARDI AW, GUIMARÃES FS, GUIMARÃES VMC, DEL BEL EA. Cannabidiol. In: Grotenhermen F (ed). **Cannabis and Cannabinoids.** Verlag Hans Huber: Bern., p.381-393, 2001.

ZUARDI AW.; CRIPPA, JAS.; HALLAK, JEC.; MOREIRA, FA.; GUIMARAES, FS. Cannabidiol, a *Cannabis sativa* constituent, as na antipsychotic drug. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 39 (4): 421-429, 2006