

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Câmpus de Araraquara

CAIO HUMBERTO PEREGO

**INFLUÊNCIA DE PARÂMETROS DE EXTRAÇÃO POR
HIDRODESTILAÇÃO NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E TOXICIDADE DO
ÓLEO ESSENCIAL DE *Cannabis sativa* L.**

ARARAQUARA

2026

CAIO HUMBERTO PEREGO

**INFLUÊNCIA DE PARÂMETROS DE EXTRAÇÃO POR
HIDRODESTILAÇÃO NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E TOXICIDADE DO
ÓLEO ESSENCIAL DE *Cannabis sativa* L.**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista
(UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas,
Araraquara, para obtenção do título de Grau acadêmico
Mestre em Alimentos, Nutrição e Engenharia de Alimentos
Área de Concentração: Alimentos e Nutrição

Orientador: Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos

Coorientador: Dr. Flávio Alexandre Carvalho

ARARAQUARA

2026

P435i	Perego, Caio Humberto INFLUÊNCIA DE PARÂMETROS DE EXTRAÇÃO POR HIDRODESTILAÇÃO NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E TOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE Cannabis sativa L. / Caio Humberto Perego. -- Araraquara, 2026 117 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara Orientador: Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos Coorientador: Dr. Flávio Alexandre Carvalho 1. Óleo Essencial de Cannabis sativa L.. 2. Parâmetros de extração de óleos essenciais por hidrodestilação. 3. Toxicidade de óleos essenciais de cannabis sativa. I. Título.
-------	---

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Influência de parâmetros de extração por hidrodestilação na composição química e toxicidade do óleo essencial de Cannabis sativa L.

AUTOR: CAIO HUMBERTO PEREGO

ORIENTADOR: ANDRÉ GONZAGA DOS SANTOS

COORIENTADOR: FLAVIO ALEXANDRE CARVALHO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Alimentos, Nutrição e Engenharia de Alimentos, área: Alimentos e Nutrição pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. ANDRÉ GONZAGA DOS SANTOS (Participação Presencial)

Departamento de Farmacos e Medicamentos / Faculdade de Ciencias Farmaceuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Prof. Dr. GUSTAVO HENRIQUE BIANCO DE SOUZA (Participação Virtual)

Departamento de Farmácia / Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP)

Prof. Dr. PAULO INACIO DA COSTA (Participação Presencial)

Departamento de Analises Clinicas / Faculdade de Ciencias Farmaceuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Araraquara, 04 de outubro de 2024.

Dedico essa dissertação ao “paciente zero” da Associação Terapêutica Cannabis Medicinal “Flor da Vida”, Eduardo, que junto com milhares de outros pacientes, sensibilizam toda a sociedade com o progresso no tratamento à base de maconha para questões graves, as quais não possuem resultados expressivos através de tratamentos convencionais conhecidos pela medicina até então. Pacientes como o Eduardo fazem despertar o olhar para o potencial terapêutico da maconha, rompendo com preconceitos e o conservadorismo proibicionista, abrindo caminhos para avançarmos enquanto sociedade e alcançar o futuro que queremos, com o fim do encarceramento em massa das populações negra e periférica, além de proporcionar reparações sociais em todas as áreas que foram afetadas pelo proibicionismo, o qual vigorou desde o início do século XX, adentrando no século XXI e ainda está em vigor para grupos marginalizados da nossa população.

Eduardo e tantos outros pacientes iniciaram um movimento em plena expansão, cujo alcance é grandioso e indeterminável, movimento esse que leva alívio a dor de milhares de pessoas através do acesso ao tratamento extremamente eficaz presente em uma planta proibida.

O benefício à ciência proporcionado pela parceria entre Associação “Flor da Vida” e FCF-UNESP é imenso ao mesmo tempo que é apenas um pequeno gesto dentro de todo o altruísmo e ações de solidariedade desempenhadas pelos seus colaboradores.

O “paciente zero” - Eduardo - começou uma verdadeira revolução, uma “corrente do bem”, que sensibilizou não só seus familiares e pessoas próximas, mas também autoridades da justiça, diversas entidades, instituições e instâncias, que tiveram que se dobrar perante o benefício nunca visto em outros medicamentos e tratamentos de questões raras. A produção do óleo medicinal de maconha da “Flor da Vida” foi obtida inicialmente através de procedimentos artesanais e tradicionais de preparo de medicamentos caseiros com plantas, pela associação entre cultivadores experientes e familiares de pacientes com essas condições, em uma busca desesperada por um remédio que fosse capaz de trazer algum benefício terapêutico. Essa luta pelo direito a qualidade de vida proporcionada pelo uso do óleo medicinal “Edward” inspira a cada dia os colaboradores da Associação “Flor da Vida” a expandir essa corrente cada vez mais, entregando tratamento de qualidade para quem necessita, se fortalecendo a cada dia como uma Organização da Sociedade Civil referência em filantropia, cujas ações causam verdadeiro fascínio, encantamento e comoção em todas as pessoas que passam a conhecer sua história, que começou com a história do Eduardo, e hoje é a história de dignidade sendo levada para quem vivia distante dela.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradeço profundamente às demais instituições e entidades que ajudaram a tornar possível a realização desse trabalho:

A Universidade Estadual Paulista - Unesp, a Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF – Unesp), A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), o Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGANEA), o Departamento de Fármacos e Medicamentos (DFM) a Seção Técnica de Pós-Graduação (STPG), A Fundação de Apoio à Faculdade de Ciências Farmacêuticas (Fundecif), o Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos (LAPDESF), o grupo empresarial A.F.A. Pharma, a Frente Parlamentar da Cannabis Medicinal e do Cânhamo Industrial (ALESP), a Frente Parlamentar Municipal da Cannabis Medicinal (Câmara dos Vereadores de Araraquara – SP) e a Vereadora Fabi Virgílio, assim como sua equipe e assessoras parlamentares.

Agradeço ao professor André Gonzaga dos Santos pela orientação, pela amizade e parceria que proporcionam um ambiente de trabalho agradável. Destaco aqui a coragem do professor André em trabalhar com a vanguarda da ciência ao pesquisar a maconha, buscando caminhos jurídicos e burocráticos a todo custo, mesmo com o proibicionismo em pleno vigor na nossa sociedade, enfrentando preconceitos e cumprindo sua dedicação em pesquisar plantas medicinais de interesse do Sistema Único de Saúde (SUS), visando contribuir para a garantia do acesso à saúde através das plantas medicinais de forma segura, eficaz e com qualidade à toda nossa população.

Agradeço ao doutor Flávio Alexandre de Carvalho pela coorientação, pelas contribuições detalhadas ao desenvolvimento do projeto e pela amizade.

Agradeço a todas as pessoas que fazem parte do Sindicato dos Trabalhadores da Unesp (Sintunesp) e servidores técnico-administrativos que participam das mobilizações em busca de uma universidade pública, gratuita e de excelência na qualidade, rompendo as com as injustiças institucionais ainda presentes na nossa instituição.

Agradeço a todo o corpo estudantil da graduação e pós-graduação, incluindo egressos, pela socialização de conhecimentos que nossos encontros proporcionam. Agradeço aos estudantes de pós-graduação do Programa de Pós-graduação em Alimentos, Nutrição e Eng. de Alimentos.

Agradeço ainda, a todo o quadro de trabalhadoras e trabalhadores contratados em regime de terceirização, pela contribuição fundamental ao funcionamento básico da nossa instituição.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço imensamente ao Farmacêutico André Faibicher (*in memorian*), pela amizade e por todas as colaborações no início do desenvolvimento desse projeto, nosso trabalho em conjunto e a nossa parceria está presente em cada experimento realizado para consolidação desse trabalho e registrada nesta dissertação. André será sempre lembrado com muitas saudades.

Agradeço a toda equipe do Laboratório de Farmacognosia (FCF-UNESP) pelo apoio, pelas amizades e pela leveza do dia a dia, que nos proporciona um ambiente de trabalho agradável.

Agradeço ainda a toda a equipe da Associação Terapêutica Cannabis Medicinal “Flor da Vida” pela parceria institucional, pelas amizades, e por oferecer condições materiais e segurança jurídica para que nossa equipe pudesse trabalhar atuando em pesquisa e desenvolvimento com a maconha, apesar do proibicionismo e das dificuldades impositivas que enfrentamos para poder realizar o estudo de uma planta. Agradeço ainda a cada paciente atendido pela Flor da Vida, por tornarem possível a ruptura com essas dificuldades no nosso país.

Após a sua prisão, e entre as suas primeiras declarações feitas à imprensa, Gilberto Gil declarou que: “Gostava da maconha e que seu uso não lhe fazia mal, e nem lhe levava a fazer o mal”.

Em juízo Gilberto Gil declarou que o uso da maconha: “o auxiliava sensivelmente na introspecção mística”. Assim, as palavras primeiras de Gilberto Gil podem ter a mesma ressonância rítmica e poética de “Refazenda”, “O abacateiro”, mas não encontram ressonância na ciência e experiência humana. Apesar disso, não se pode afirmar que Gilberto Gil, uma das mais lídimas expressões da música popular brasileira, incontestemente ídolo da juventude seja um apologista inconsciente do uso de drogas. Faço o exposto e o mais que dos Autos consta, julgo procedente a denúncia para determinar a internação do denunciado Gilberto Gil no instituto psiquiátrico São José por período suficiente para a sua recuperação.

Leitura de sentença realizada pelo delegado Elói Gonçalves de Azevedo no Julgamento de Gilberto Gil por porte de maconha em 1976, durante a turnê da banda Doces Bárbaros de passagem pela cidade de Florianópolis.

Transcrição de trecho do julgamento, presente no documentário “Os Doces Bárbaros” de 1976.

RESUMO

Cannabis sativa L. (Cannabaceae), conhecida como maconha, é uma planta medicinal, com uma longa história de uso. Domesticada há cerca de 12 mil anos, acredita-se que o primeiro contato com a espécie humana foi há 35 mil anos na Ásia. O primeiro registro conhecido da planta é na Farmacopeia chinesa do imperador Shen-Nung, em 2700 a.C., descrita para uma ampla gama de usos terapêuticos, incluindo constipação, cólicas menstruais, enxaquecas e reumatismo. A planta apresenta inflorescências femininas cobertas por tricomas secretores que produzem óleo-resina contendo terpenos e fitocanabinoides, além de outros compostos bioativos. A composição química da *C. sativa* é complexa, com as três principais classes de metabólitos secundários os canabinoides, flavonoides e terpenos. Os terpenos, como β -mirceno, D-limoneno e β -pineno estão presentes no óleo essencial, que pode ser obtido por hidrodestilação, e são responsáveis pelos aromas e sabores característicos da planta. Este estudo teve como objetivo avaliar o impacto do estado de fragmentação da droga vegetal (DV) e do tempo de hidrodestilação sobre o teor, a composição química e a toxicidade dos óleos essenciais (OE) das inflorescências de *C. sativa*, além da viabilidade de usos da biomassa residual na produção de extratos e obtenção de canabinoides. Para isso, foram realizados dois tratamentos de extração: um com DV rasurada e outro com DV pulverizada, em tempos de 2, 3 e 4 h. Os teores de OE foram medidos e as composições químicas foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD). Após a extração do OE, as biomassas residuais de DV foram submetidas à extração por sonicação com metanol: clorofórmio 9: 1 e analisadas por CLAE-UV para quantificação dos canabinoides. Os resultados mostraram que o tempo de extração não influenciou estatisticamente no teor de OE obtido, e os maiores teores (v/m, %) foram obtidos nas extrações de 3 e 4 h ($1,76 \pm 0,11$ %). A análise por CCD demonstrou o mesmo perfil cromatográfico em todos os experimentos e foi possível identificar os sesquiterpenos (*E*)-cariofileno e α -humuleno nos OE de todas as amostras testadas. A análise por CLAE-UV das biomassas residuais de DV indicou quantidades significativas de THC nesse material. O ensaio de toxicologia (HET-CAM) revelou que a concentração de $400 \mu\text{L. mL}^{-1}$ (aplicação de $300 \mu\text{L}$) apresentou irritação nos dois experimentos, sendo a pontuação de irritação do OE obtido com DV pulverizada significativamente maior ($17,67 \pm 0,73$) em comparação com o OE obtido com DV rasurada, que teve pontuação de $7,16 \pm 1,26$ ($p < 0,0001$).

Palavras-chave: maconha; tipo medicamento; óleo essencial; monoterpenos; sesquiterpenos; HET-CAM.

ABSTRACT

Cannabis sativa L. (Cannabaceae), known as marijuana, is a medicinal plant with a long history of use. Domesticated around 12,000 years ago, it is believed that the first human contact with the species was 35,000 years ago in Asia. The first known record of the plant appears in the Chinese Pharmacopoeia of Emperor Shen-Nung in 2700 B.C., which described for a wide range of therapeutic uses, including constipation, menstrual cramps, migraines, and rheumatism. The plant features female inflorescences covered with glandular trichomes that produce an oleoresin containing terpenes and phytocannabinoids, in addition to other bioactive compounds. The chemical composition of *C. sativa* is complex, with the three main classes of secondary metabolites being cannabinoids, flavonoids, and terpenes. Terpenes, such as β -myrcene, D-limonene, and β -pinene, are present in the essential oil, which can be obtained by hydrodistillation and are responsible for the characteristic aromas and flavors of the plant. This study aimed to evaluate the impact of the fragmentation state of the plant material (PM) and the hydrodistillation time on the yield, chemical composition, and toxicity of the essential oils (EO) from the inflorescences of *C. sativa*, in addition to the viability of using the residual biomass for the production of extracts and cannabinoids. For this, two extraction treatments were carried out: one with shredded PM and another with powdered PM, at times of 2, 3, and 4 h. The EO yields were measured, and the chemical compositions were analyzed by thin-layer chromatography (TLC). After EO extraction, the residual PM biomasses were subjected to extraction by sonication with methanol

9: 1 and analyzed by CLAE-UV for cannabinoid quantification. The results showed that extraction time did not statistically influence the obtained EO yield, and the highest yields (v/ m, %) were obtained in the 3 and 4 h extractions ($1.76 \pm 0.11\%$). TLC analysis demonstrated the same chromatographic profile in all experiments, and it was possible to identify the sesquiterpenes (E)-caryophyllene and α -humulene in the EO of all tested samples. CLAE-UV analysis of the residual PM biomasses indicated significant amounts of THC in this material. The toxicology assay (HET-CAM) revealed that the concentration of 400 μ L. mL⁻¹ (application of 300 μ L) caused irritation in both experiments, with the irritation score of the EO obtained with powdered PM being significantly higher (17.67 ± 0.73) compared to the EO obtained with shredded PM, which had a score of 7.16 ± 1.26 ($p < 0.0001$).

Keywords: marijuana; medicinal type; essential oil; monoterpenes; sesquiterpenes; HET-CAM.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Espécimen de <i>Cannabis sativa</i> L. cultivado na Associação Terapêutica Cannabis Medicinal Flor da Vida.	36
Figura 2 – Imagem da inflorescência feminina de <i>C. sativa</i> .	37
Figura 3 – Imagem de tricomas secretores em bráctea da inflorescência de <i>C. sativa</i> ampliada em 1000x.	38
Figura 4 – Principais fitocanabinoides (forma descarboxilada).	45
Figura 5 – Descarboxilação do THCA.	45
Figura 6 – Canflavinas identificadas em <i>C. sativa</i> .	47
Figura 7 – Estruturas moleculares da canabisativina e da anidrocanabisativina.	48
Figura 8 – Principais componentes do OE das inflorescências de <i>C. sativa</i> .	57
Figura 9 – Sistema micro-ondas Ethos X Milestone® acoplado ao sistema de hidrodestilação.	58
Figura 10 – Imagem ilustrativa de ovo de galinha embrionado utilizado no ensaio HET-CAM.	64
Figura 11 – Equações da reta e curvas analíticas para os canabinoides CBDA, CBG, CBD, CBN, THC e THCA.	76
Figura 12 – Distribuição granulométrica da DV pulverizada.	82
Figura 13 – Distribuição granulométrica média da DV pulverizada.	82
Figura 14 – Cromatoplasmas das amostras de OE e padrões de terpenos nas FM 1 e FM 2.	88
Figura 15 – Cromatogramas das análises por CLAE-UV das amostras de DV e biomassas residuais.	91
Figura 16 – Registro do estado dos vasos sanguíneos antes e após a aplicação dos compostos.	94
Figura 17 – Gráficos de Barras demonstrando a Pontuação de irritação observada na CAM..	96
Figura 18 – Porcentagem de sobrevivência dos embriões ao longo do tempo após tratamento com diferentes amostras	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição do OE (mg. g ⁻¹) das inflorescências de <i>C. sativa</i>	54
Tabela 2 – Desenvolvimento do método para FM 2	73
Tabela 3 – Ajuste das concentrações de acordo com a pureza dos padrões	75
Tabela 4 – Distribuição granulométrica da DV pulverizada	81
Tabela 5 – Volumes e teores de óleos essenciais (v/m, %) obtidos nas extrações por hidrodestilação com uso de xileno	83
Tabela 6 – Volumes e teores de óleos essenciais (v/m, %) obtidos nas extrações por hidrodestilação em diferentes condições	86
Tabela 7 – Identificação e Quantificação dos canabinoides	90
Tabela 8 – Tempo de hemorragia, lise, coagulação e pontuação de irritação dos controles e compostos testados	95
Tabela 9 – Pontuação HET-CAM dos controles e amostras OE4Hras e OE4Hm nas diferentes concentrações testadas	99

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-AG: 2-araquidonoilglicerol

AHP: American Herbal Pharmacopoeia

ANOVA: Análise de variância

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CAM – Membrana coriolantoide

CBC: canabicromeno

CBCA: ácido canabicromênico

CBD: canabidiol

CBDA: ácido canabidiólico

CBGA: ácido canabigerólico

CBL: canabíciclol

CBN: canabinol

CS: canabinoides sintéticos

DV: Droga Vegetal

EE: Extrato etanólico

FAD: Flavina adenina dinucleotídeo

FDA: Food and Drug Administration

FE: Fase Estacionária

FM: Fase Móvel

CG: Cromatógrafo gasoso (*Gas Chromatograph*)

CG-FID: Cromatógrafo gasoso acoplado a detecção de ionização de chamas (*Gas Chromatograph-Flame Ionization Detector*)

CG-MS: Cromatógrafo gasoso acoplado a espectrometria de massas (*Gas Chromatograph-Mass Spectrometry*)

GRAS: Geralmente reconhecidos como seguros

HET-CAM: *Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane*

CLAE: Cromatógrafo líquido de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatograph*)

IR: Índice de Retenção

MAHD: Hidrodestilação assistida por micro-ondas

MEP: Fosfato de metileritritol

MEV: Mevalonato

MIP: Manejo integrado de pragas

MIX: Solução estoque mista

ODS: Objetivos do desenvolvimento sustentável

OE: Óleo Essencial

ONU: Organização das Nações Unidas

PDC: Planta de dias curtos

SEC: Sistema endocanabinóide

STF: Supremo Tribunal Federal

THC: Δ^9 -tetrahydrocannabinol

THCA: ácido Δ^9 -tetrahydrocannabinólico-A

THCV: tetrahydrocannabivarina

UE: União Europeia

LISTA DE SÍMBOLOS

Δ^8 -THC: Δ^8 -tetrahydrocannabinol

Δ^9 -THC: Δ^9 -tetrahydrocannabinol

t_R : Tempo de retenção

W: Watts

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO DE LITERATURA	29
2.1 DESCRIÇÃO HISTÓRICA	29
2.2 DESCRIÇÃO BOTÂNICA	33
2.3 DEMAIS CLASSIFICAÇÕES	38
2.3.1 Classificação segundo o fotoperiodismo de <i>C. sativa</i>	38
2.3.2 Plantas cultivadas com sementes regulares e com sementes feminizadas	39
2.3.3 Classificação segundo a morfologia do caule e a composição química (quimiovariantes) de <i>C. sativa</i>	41
2.4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA	42
2.4.1 Canabinoides	43
2.4.2 Flavonoides	46
2.4.3 Alcaloides	47
2.4.4 Terpenos Voláteis	48
2.5 ÓLEOS ESSENCIAIS	49
2.5.1. Composição química dos óleos essenciais	49
2.5.2 Obtenção dos óleos essenciais	50
2.5.3 Composição química de óleos essenciais de <i>Cannabis sativa</i> L.	53
2.6 APLICAÇÕES DO EQUIPAMENTO DE MICRO-ONDAS NA CADEIA PRODUTIVA DA <i>Cannabis sativa</i> L. DO TIPO MEDICAMENTO	57
2.7 MÉTODOS DE ANÁLISE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	58
2.7.1 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS)	58
2.7.2 Cromatografia gasosa acoplada a detecção de ionização de chamas (CG-FID)	59

2.8 UTILIZAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE CANNABIS SATIVA L. PELA INDÚSTRIA	60
2.9 TOXICOLOGIA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>Cannabis sativa</i> L.	63
2.9.1 Exemplo de modelo alternativo de avaliação toxicológica de óleos essenciais de <i>Cannabis sativa</i> L.	63
3. OBJETIVOS	66
3.1 OBJETIVO GERAL	66
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	66
4. MATERIAIS E MÉTODOS	67
4.1 MATERIAL E EQUIPAMENTOS	67
4.2 OBTENÇÃO E PREPARO DO MATERIAL VEGETAL	68
4.2.1 Processamento do Material vegetal	69
4.2.1.1 <i>Determinação do teor de água residual</i>	69
4.2.1.2 <i>Fragmentação do material vegetal seco</i>	69
4.2.1.3 <i>Análise granulométrica da droga vegetal pulverizada</i>	69
4.3 EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	69
4.3.1 Determinação de óleos voláteis segundo a Farmacopeia Brasileira 6ª edição	69
4.3.2 Extração de óleos essenciais das inflorescências de <i>C. sativa</i>	71
4.4 EXTRAÇÃO DA BIOMASSA RESIDUAL DA DROGA VEGETAL APÓS HIDRODESTILAÇÃO	71
4.4.1 Preparo de amostra para análise em CLAE-UV com extração da biomassa residual das inflorescências de <i>C. sativa</i> após hidrodestilação	71
4.5 ANÁLISE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)	72
4.6 ANÁLISE POR CLAE-UV DOS EXTRATOS DA BIOMASSA RESIDUAL DAS INFLORESCÊNCIAS de <i>C. Sativa</i> APÓS HIDRODESTILAÇÃO	74

4.6.1 Curvas analíticas dos padrões canabinoides	74
4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	78
4.7.1 Análises estatísticas dos teores de OE obtidos	78
4.7.2 Análises estatísticas dos teores de canabinoides nos extratos da biomassa residual das inflorescências	78
4.8 ENSAIO DA MEMBRANA CORIOALANTÓICA DE OVOS DE GALINHA (HET-CAM)	78
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	80
5.1 ANÁLISES DA DROGA VEGETAL	80
5.1.1 Determinação do teor de água residual	80
5.1.2 Análise granulométrica da droga vegetal pulverizada	81
5.2 EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	83
5.2.1 Determinação de óleos voláteis na droga vegetal empregando xileno	83
5.2.2 Extração de óleos essenciais das inflorescências secas de <i>C. sativa</i>	85
5.3 ANÁLISE DOS OE POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)	87
5.4 EXTRAÇÃO DE BIOMASSA RESIDUAL DA DV APÓS HIDRODESTILAÇÃO	89
5.4.1 Análise por CLAE-UV dos extratos de inflorescências de <i>C. sativa</i> e dos extratos de biomassa residual após hidrodestilação	89
5.5 ENSAIO DA MEMBRANA CORIOALANTÓICA DE OVOS DE GALINHA (HET-CAM)	93
6. CONCLUSÕES	103
REFERÊNCIAS	104

1. INTRODUÇÃO

Cannabis sativa L., popularmente conhecida como maconha, tem sido domesticada para diversos usos e difundida por diferentes regiões do planeta no decorrer dos últimos 12 mil anos. O contato dos primeiros grupos humanos com a planta ocorreu há 35 mil anos, segundo apontam os estudos mais recentes, porém, ainda divergentes devido às migrações humanas desde a pré-história e, também, pela difusão de diferentes variedades da planta nas rotas comerciais da antiguidade. A sua domesticação ocorreu a partir do cultivo, dispersão e cruzamentos de três variedades selvagens conhecidas como “*sativa*”, “*indica*” e “*ruderalis*”, sendo todas elas classificadas como *C. sativa* (Rull, 2022).

A seleção artificial, ao longo dos últimos milênios, levou ao desenvolvimento de variedades e cultivares de *C. sativa*, possibilitando que uma grande quantidade de híbridos seja obtidos por cruzamentos, o que faz com que exista, na atualidade, uma imensa variedade de biotipos com diferentes perfis químicos e características morfológicas, refletindo, assim, na existência de diversos potenciais usos da planta. Dentre as principais utilizações, destacam-se a produção de remédios e medicamentos, o uso alimentício, a produção de fibras têxteis, a produção de bioenergia, a utilização na construção civil e o uso adulto, sendo, portanto, uma planta com grande potencial de exploração pela indústria dos mais diferentes segmentos e também por consumidores individuais. Muitos desses usos atendem aos princípios da economia verde e da bioeconomia na substituição de diversos componentes sintéticos e também pelas ações da planta no sequestro de carbono e na fitorremediação promovida por *C. sativa* através das raízes nos campos de cultivo. Elas são capazes de descontaminar solos que contêm resíduos de impurezas e metais pesados, minimizando impactos ambientais negativos e problemas de saúde, sendo, portanto, uma opção que dialoga com os princípios da sustentabilidade (Farinon *et al.*, 2020; Kraszkiewicz *et al.*, 2019; Rehman *et al.*, 2013; Jami *et al.*, 2022; Golia *et al.*, 2023; Karche *et al.*, 2019).

As variedades de maior interesse para a indústria farmacêutica (na produção de medicamentos) e para o consumo dos usuários adultos são as que produzem as substâncias de uso medicinal e/ou psicoativo, classificadas como plantas do *tipo medicamento*, categoria que pode ser subdividida em três subcategorias chamadas quimiovariantes, ou seja, de acordo com o perfil químico das inflorescências ou do produto analisado. Essa classificação é muito utilizada nos estudos de perícia criminal (química forense), como descreve Hazekamp (2012), para fins legislativos - não necessariamente correspondente com a classificação taxonômica e filogenética da planta, uma vez que essas classificações botânicas são ainda muito divergentes no meio científico e grande parte dos estudos das últimas décadas se concentrou em avaliar

teores de substâncias consideradas proscritas. Outro grupo de interesse é o das plantas classificadas como *tipo fibra* (*hemp* ou cânhamo), também conhecidas como cânhamo industrial, que foram selecionadas artificialmente para produção de fibras extraídas do caule e também de sementes (Younger, 2019).

As categorias de classificação baseadas nas três quimiovariantes propostas por Small e Beckstead (1973) para as plantas *tipo medicamento* consideram que duas substâncias majoritárias são os marcadores principais; a análise de seus teores define qual a quimiovariante, sendo elas: o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) e o canabidiol (CBD). A quimiovariante I compõe o grupo de plantas popularmente chamadas de sativa ou “tipo THC”, pois possuem maiores teores de THC, que é uma substância medicinal, mas também com efeito psicoativo. A quimiovariante II engloba as plantas que produzem teores similares de THC e CBD, são popularmente chamadas de “um pra um” devido às proporções semelhantes desses componentes majoritários na sua composição química. Em muitos países onde a legislação de *C. sativa* passou por flexibilizações nas últimas décadas, as plantas das quimiovariantes I e II são chamadas de “psicoativas” ou “narcóticas”, devido a presença do THC. Já as plantas da quimiovariante III, popularmente chamadas de indica ou “tipo CBD”, possuem maiores teores de CBD do que de THC. O CBD também é uma substância medicinal que vem ganhando destaque nas últimas décadas devido aos estudos pioneiros realizados por Cunha e Carlini (1980) em testes clínicos com pacientes que apresentam epilepsia refratária. Esses estudos fortaleceram movimentos políticos pela regulamentação do uso medicinal da *C. sativa* em diversos países e impulsionaram muitos estudos científicos recentes que mostram mais evidências do seu efeito terapêutico (Robinson, 1999; Russo *et al.*, 2005; Pisantini *et al.*, 2017).

Mesmo sendo ainda amplamente utilizada, a categorização através de quimiovariantes passou por adaptações que incluem utilização de estudos de metabolômica empregando técnicas hifenadas em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia gasosa (CG) e quimiometria, resultando em cinco quimiovariantes com perfil químico mais abrangente, identificadas através de 28 substâncias majoritárias (e não apenas o THC e o CBD), fornecendo uma “impressão digital cromatográfica”, característica de cada subclassificação. As três quimiovariantes consideradas pelos autores Small e Beckstead (1973) permanecem sendo amplamente utilizadas na literatura científica, mesmo sendo necessário um número maior de substâncias (com teores dentro de faixas específicas) para identificá-las, ou seja, ainda são consideradas as plantas ‘tipo THC’, tipo “um pra um” e “tipo CBD”; já as duas categorias que foram acrescentadas, baseiam-se em faixas de teores de 28 substâncias presentes na *C. sativa* e não possuem canabinoides majoritários como referência (Cerrato *et al.*, 2021).

Os fitocanabinoides THC e CBD, são metabólitos secundários majoritários que são produzidos em grandes concentrações pelas inflorescências das plantas femininas durante todo o período do estágio reprodutivo, e são acumulados nos tricomas secretores dessas inflorescências femininas. A produção de altas concentrações desses compostos é mantida apenas se não houver polinização, a qual leva à redução drástica da biossíntese e acúmulo desses compostos. Esses metabólitos secundários terpeno-fenólicos ou meroterpenos fazem parte da classe de substâncias conhecidas como canabinoides e, apesar de serem majoritários entre os fitocanabinoides presentes na *C. sativa*, não são os únicos produzidos, nem mesmo os únicos com efeitos medicinais, uma vez que, de acordo com Cerrato *et al.* (2021), já foram encontrados, além do THC e CBD, outros 133 canabinoides em concentrações menores, presentes em *C. sativa* das mais distintas variedades, sendo suas composições e teores variados. Essas variações na composição e teores também ocorrem nos diferentes estágios fenológicos do desenvolvimento da planta.

Outras três classes de metabólitos secundários bioativos também são encontradas em *C. sativa*: os flavonoides, os alcaloides e os terpenos, o que faz que ela seja uma planta muito rica em substâncias de interesse medicinal e da indústria em geral. Os tricomas secretores presentes nas inflorescências femininas são as estruturas responsáveis pela produção de um óleo-resina, uma secreção química complexa, cuja composição inclui majoritariamente terpenos e canabinoides, além de outras substâncias como ceras e lipídios em menor teor. Os terpenos, no caso os monoterpenos e sesquiterpenos, podem ser obtidos a partir do óleo essencial (OE), que é extraído por hidrodestilação das inflorescências, cuja composição e teores de mono e sesquiterpenos variam de acordo com as características ambientais, genéticas e de manejo, sendo responsáveis pelos aromas característicos de cada variedade ou cultivar (Blake *et al.*, 2019; Small, 2015).

O uso alimentício e a produção de fibras são explorados nas variedades de *C. sativa* chamada por Small e Beckstead (1973) de planta *tipo fibra*. As partes de interesse dessas plantas são as sementes e os caules. As sementes são utilizadas na alimentação humana e animal (Klir; Novoselec; Antunović, 2019); elas apresentam componentes nutricionais de alto valor apresentados na revisão de Farinon *et al.* (2020). As sementes de cânhamo são oleaginosas e ricas em triglicérides e não contém canabinoides. Os caules são beneficiados para obtenção das fibras, muito utilizadas na produção têxtil. As variedades de cânhamo apresentam teores muito baixos de canabinoides nas inflorescências. Ainda assim, os resíduos da colheita podem ser aproveitados pela indústria para extrações de CBD e do OE, mas representam uma biomassa

subutilizada devido à riqueza de suas potenciais aplicações (Benelli *et al.*, 2018; Visković *et al.*, 2023).

A extração convencional de OE é realizada através de um sistema de arraste a vapor d'água ou hidrodestilação (Simões *et al.*, 2016), processos que podem gerar artefatos após a extração devido à exposição prolongada ao vapor d'água ou ao contato do material com a água em ebulição. No caso do cultivo de cânhamo, o interesse comercial principal são as fibras e as sementes, e a extração de OE muitas vezes é realizada a partir dos resíduos da colheita e não necessariamente apenas das inflorescências. Dessa forma, os métodos de extração convencionais (arraste a vapor d'água e hidrodestilação) são bastante viáveis, pois o material vegetal pode ser utilizado para obtenção de CBD e do OE, que no caso dessa cultura (planta *tipo fibra*) são considerados subprodutos ou produtos “secundários” para exploração comercial, sendo inclusive uma alternativa vantajosa de aproveitamento dos resíduos, além de sustentável e economicamente viável (Benelli *et al.*, 2018).

Na cultura do cânhamo, a extração de OE está em expansão devido à valorização recente do OE pelo mercado global da cannabis, sendo que recentemente alguns cultivadores têm deixado as plantas alcançarem o estágio reprodutivo para realizar extrações de um material com maior padronização (Vuerich *et al.*, 2019; Pieracci *et al.*, 2021). Já no caso da produção das plantas do *tipo medicamento*, os produtos de principal interesse comercial são o extrato (também chamado de óleo *full spectrum*) e os canabinoides, isolados por técnicas cromatográficas ou outras a partir do extrato, cuja extração é realizada das inflorescências das plantas femininas, separada da extração do OE (mesmo os canabinoides estando na mesma estrutura da planta na composição do óleo-resina). A obtenção do extrato das inflorescências inviabiliza a utilização do material vegetal na extração convencional do OE, portanto, nas plantas da categoria *tipo medicamento*, a utilização dos métodos convencionais de obtenção do OE pode ser inviável, uma vez que o OE é um produto secundário, sendo o extrato e os canabinoides isolados os produtos primários - com valor comercial muito maior (Visković *et al.*, 2023).

A utilização de fornos de micro-ondas industriais na cadeia produtiva medicinal da *C. sativa* (plantas *tipo medicamento*) apresenta-se como uma inovação sofisticada, trazendo soluções em diversas etapas da cadeia produtiva. Além de permitir que a secagem e a descarboxilação (remoção do grupo carboxila dos fitocannabinoides ácidos através do aquecimento) do material vegetal sejam realizadas em tempo bastante reduzido em relação à secagem convencional (secagem em estufa com circulação de ar), a extração de OE também ocorre em tempo menor, gera maior rendimento de OE, diminui a formação de artefatos,

economiza energia, emite menor quantidade de gás carbônico e não utiliza solventes (assim como a hidrodestilação e arraste à vapor d'água) (Drinić *et al.*, 2019; Milestone, 2019; Périno-Issartier *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2013; Lucchesi *et al.*, 2004).

Este método, chamado de “hidrodestilação assistida por micro-ondas” (MAHD), foi desenvolvida por Craveiro *et al.* (1989). Nesse sistema extrator, o aquecimento é realizado pelo forno de micro-ondas e combinado com a hidrodestilação acoplando um aparelho tipo Clevenger, o mesmo aparato utilizado na extração convencional de OE (Brasil, 2019).

Por se tratar de uma inovação, o uso de fornos micro-ondas industriais na cadeia produtiva da *C. sativa* ainda possuem valor muito elevado de implantação e, mesmo sendo mais eficientes, permanece como uma exclusividade da indústria da cannabis (Drinić *et al.*, 2019). Outra dificuldade, mesmo para os laboratórios científicos que possuem acesso a essa tecnologia, são as políticas proibicionistas em torno da *C. sativa* em diversos países, principalmente das plantas do *tipo medicamento*, o que incide na rigorosa burocracia e segurança envolvidos na obtenção de licenças especiais concedidas pelo poder público para realização de pesquisas científicas com a planta. O caso da legislação vigente no Brasil é um exemplo em que *C. sativa* é classificada como planta proscrita e seus insumos para produção de medicamentos são permitidos apenas via importação, sendo proibida a produção nacional através do cultivo e extrações (Brasil, 1998; Brasil 2019).

Nos países onde a produção de cânhamo para obtenção de fibras e sementes é legalizada, a produção científica voltada para o estudo do OE e dos terpenos de *C. sativa*, disponível na literatura, é voltada para extrações, análises e/ou aplicações do OE extraído apenas das plantas do *tipo fibra*. Isso traz limitações para estabelecer comparações adequadas com extrações, análises e/ou aplicações do OE obtido das plantas do *tipo medicamento*, cuja produção científica ainda é muito restrita. A padronização do material utilizado nas extrações do OE fica muito limitada devido ao tipo de cultivo do cânhamo industrial, pois não há nenhum controle sobre o desenvolvimento das plantas no estágio reprodutivo e nem da polinização das inflorescências, sendo que, muitas vezes, os resíduos de colheita contendo fragmentos das partes aéreas da planta acabam sendo utilizados para essa extração. Portanto, mesmo em laboratórios com acesso à equipamentos sofisticados como o forno micro-ondas industrial e a metodologia MAHD, ainda existe dificuldade de acesso às plantas do *tipo medicamento*, principalmente para fins de obtenção do OE, dificultando a produção científica e, consequentemente, a revisão de publicações em que os OE sejam obtidos a partir das inflorescências femininas não polinizadas dessa categoria de plantas, em qualquer que seja a quimiovariante ou técnica de extração. Isso ocorre porque as pesquisas com plantas do *tipo medicamento* se concentram na extração, análise

e/ou aplicações do extrato e isolamento dos fitocanabinoides e a extração convencional de OE supostamente, degradaria o material vegetal (devido ao contato com vapor ou água em ebulição por 4 horas), inviabilizando a obtenção posterior desse extrato ou possivelmente alterando drasticamente sua composição devido a degradação dos fitocanabinoides e demais componentes.

Mais de 120 terpenos foram identificados em *C. sativa*, em sua maioria monoterpenos e sesquiterpenos, que são considerados a segunda classe de metabólitos secundários encontrados em maior quantidade no óleo-resina presente nos tricomas secretores das inflorescências femininas. Os constituintes majoritários identificados no OE são os terpenos: *D*-limoneno, β -mirceno, α -pineno, β -pineno, α -humuleno, α -guaiano, terpinoleno e (*E*)-cariofileno (Russo *et al.*, 2011; AHP, 2014; Namdar *et al.*, 2018; Mudge *et al.*, 2019; Radwan *et al.*, 2021; Duggan *et al.*, 2021; Lowe *et al.*, 2021).

Nas plantas do *tipo fibra*, os principais terpenos encontrados são (*E*)-cariofileno, α -pineno e β -mirceno. Eles são considerados aditivos “geralmente reconhecidos como seguros” (GRAS), aprovados pela Agência Federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos (Food and Drug Administration - FDA) em 2018, ano em que foi realizada a avaliação de três avisos GRAS para os ingredientes alimentares derivados do cânhamo (semente de cânhamo, pó de proteína de semente de cânhamo e óleo de cânhamo), mas o OE não foi incluso.

A adição de derivados de *C. sativa* (óleo de cannabis, canabinoides, OE, proteínas e óleo de sementes) em alimentos e suplementos alimentares também está relacionada a um mercado em expansão e muito promissor, sendo que, destes derivados, o OE e misturas de terpenos isolados já são encontrados em balas, pirulitos, caramelos, chocolates, bolos, sorvetes, salgados, bebidas como cervejas e licores, entre outros (Brutlag *et al.*, 2018).

O aroma das inflorescências de *C. sativa* fornecem características de sabor e qualidade únicas nos produtos de cannabis, assim como o lúpulo (*Humulus lupulus* L.), que é da mesma família botânica (Cannabaceae), confere aromas únicos à cerveja (Russo, 2011).

A utilização do OE como aromatizante de bebidas de matizes distintas (licor e cerveja) mostrou-se viável em um estudo com duas cultivares de *C. sativa* (Ascrizzi *et al.*, 2020). Mesmo fazendo parte de um mercado ainda restrito, diversos produtos têm sido lançados no Brasil, mas ainda utilizando misturas de terpenos obtidos de outras fontes, simulando a composição majoritária do OE de *C. sativa*, visto que os principais terpenos que compõem seu aroma são substâncias majoritárias no OE de outras plantas, cuja cadeia produtiva está estabelecida para isolamento desses compostos e estão disponíveis no mercado de forma mais acessível. Segundo

matéria da plataforma SECHAT (2023), produtores brasileiros de cerveja artesanal saborizadas com OE de *C. sativa* precisam realizar pausas na produção em períodos em que há dificuldade na obtenção de terpenos no mercado nacional.

Em países ou jurisdições onde a legislação também regulamenta o uso adulto da *C. sativa* e não apenas o uso medicinal como no caso do Brasil, já é comum produtos alimentícios que contenham, não apenas o OE da *C. sativa*, mas também extratos, havendo regulação quanto aos teores de CBD e THC. Essa composição mista dos produtos de cannabis costuma ser classificada como suplementos alimentares ou produtos de bem-estar e saúde nos EUA (FDA, 2023) e como “novo alimento” na UE (EFSA, 2022).

Os desafios tecnológicos na incorporação de OE de *C. sativa* e seus terpenos em produtos alimentícios e futuros ingredientes alimentares funcionais ainda são soluções potenciais e tendências futuras, havendo necessidade de mais pesquisas para essas aplicações, já que a incorporação de terpenos em alimentos e a preservação de terpenos durante o processamento ainda é um desafio. Mesmo assim, a pesquisa e o sucesso do uso de terpenos como ingredientes alimentares funcionais estão em um caminho muito promissor. Esforços precisam ser direcionados na busca de mais evidências dos benefícios para a saúde e segurança dos terpenos na indústria de alimentos, possibilitando regulações e criação de novas políticas de promoção do seu consumo. Pesquisas sobre como melhorar a solubilidade e biocompatibilidade com os demais componentes alimentares, aumentar a estabilidade, o prazo de validade e a bioacessibilidade dos terpenos para que a adição em vários produtos alimentícios seja bem-sucedida são mais do que necessárias (Chen; Pan, 2021). Vale destacar que são encontradas dificuldades na obtenção dos terpenos devido à sua natureza altamente volátil e termicamente instável, os terpenos tendem a evaporar e oxidar durante os processos de secagem, descarboxilação e extração, e podem sofrer perdas significativas (Hanuš; Ondřej; Hod, 2020).

Monoterpenos e sesquiterpenos são os principais compostos bioativos dos OE e possuem grande potencial de aplicação como conservantes naturais de alimentos, já que vários terpenos identificados em *C. sativa* demonstram efeitos antibacteriano e antifúngico (Rothschild *et al.*, 2005; Blake *et al.*, 2019). A tecnologia da nanoencapsulação foi utilizada em um estudo que verificou as características físico-químicas e a ação antioxidante das nanocápsulas de OE de *C. sativa* obtido de plantas do *tipo fibra*, com resultados bastante promissores para utilização deste produto como aditivos e conservantes alimentares (Hadidi; Rostamabadi; Moreno; Jafari, 2022).

Os extratos das inflorescências de *C. sativa* contêm quantidade significativa de clorofila, já que ela é eficientemente extraída pelo etanol; o chamado “gosto de plantas”, amargo e característico, conferido por essa substância, é um sabor que dificulta a utilização do extrato etanólico (EE) em alimentos como chocolates, por prejudicar a palatabilidade. Nessa situação, assim como em outros produtos, o uso dos terpenos é fundamental para atenuar esse gosto ou torná-lo quase imperceptível (Beal, 2019).

Diversos estudos apontam as propriedades inseticidas e repelentes do OE de *C. sativa*, com potencial aplicação na agricultura, o que está de acordo com o proposto por Potter (2009): a produção do óleo-resina de *C. sativa* está ligada evolutivamente a uma defesa natural contra insetos fitófagos. Uma das vantagens apresentadas pela sua utilização como biopesticida ecológico é a sua baixa toxicidade, tanto em organismos não-alvo, como a joaninha (Coccinellidae) que atua como inimigo natural (predador) de pragas, outros organismos benéficos ao sistema de cultivo (pequenos invertebrados que promovem a fertilidade do solo como a minhoca), quanto em humanos. Os biopesticidas fazem parte de ações do Manejo Integrado de Pragas (MIP) e dialogam com a agricultura sustentável e agroecológica, portanto, o desenvolvimento de novos produtos é fundamental para contribuir com a produção saudável de alimentos (Pavela; Benelli, 2016; Benelli *et al.*, 2018).

Mesmo os OE sendo a principal fonte de aromas pela indústria de cosméticos, derivados de *C. sativa*, como o OE, começaram a ser utilizados pela indústria de cosméticos recentemente. Eles são utilizados como fragrância e componentes ativos, já que apresentam uma ampla gama de aromas únicos e agradáveis de forma muito eficaz para incorporação em produtos cosméticos e ainda podem atuar como agentes bioativos (ex. antimicrobiano, proteção solar e clareador), o que os torna ingredientes de grande valor em produtos cosméticos e cosmeceúticos (Mnekin *et al.*, 2021; Sharmeen *et al.*, 2021).

A tendência recente de procura por produtos naturais ampliou o uso de extratos, OE e óleos fixos (triglicérides) em substituição aos derivados sintéticos, considerados perigosos para a saúde humana, sendo os OE muito procurados devido à crescente conscientização dos benefícios à saúde, já conhecidos pela ciência. Nesse sentido, o futuro da indústria de OE se mostra promissor, com caminhos lucrativos nas indústrias de cosméticos e perfumes (Sharmeen *et al.*, 2021).

Outra aplicação do OE de *C. sativa* é o mercado de tabacaria e a utilização em cigarros eletrônicos, vaporizadores ou “vapes”, em que uma mistura contendo o OE é adicionada pelos usuários no material vaporizado (geralmente misturas de canabinoides isolados), visando ter

uma experiência sensorial mais apurada ao realizar a vaporização/combustão de *C. sativa* ou outras misturas de plantas (Meehan-Atrash; Jiries; Rahman, 2021).

Todas essas características dos OE fazem com que o interesse pela sua utilização aconteça em diversos segmentos, como também nas indústrias de produtos domissanitários e de higiene pessoal, reforçando o grande potencial de áreas que podem explorar a utilização do OE de *C. sativa* (Milhem *et al.*, 2021).

A produção global de OE foi de 200 mil toneladas no ano de 2021, movimentando um valor estimado em oito bilhões de dólares, com previsão de crescimento para atingir a produção mundial de 275 mil toneladas no ano de 2026. Os países que figuram com as maiores participações no mercado global são a Índia, os EUA, a França, a China e o Brasil, que se destaca principalmente pela produção de OE de citrus. O mercado mundial inclui uma ampla gama de OE utilizados na indústria para produção de cosméticos, medicamentos, alimentos, bebidas e aromaterapia (Bizzo; Rezende, 2022).

Esses dados apontam como evidente a necessidade de inovação no setor. O aumento da demanda por OE destaca a importância de desenvolver novas técnicas de extração que não apenas melhorem a eficiência na obtenção dos OE, mas também contribuam para a gestão eficaz dos resíduos gerados. Os métodos convencionais de extração frequentemente resultam em resíduos significativos e processos ineficientes, principalmente pelo alto consumo de energia do sistema, o que representa um desafio ambiental e econômico. Portanto, novas pesquisas em técnicas de extração e o aproveitamento da biomassa residual são necessárias para melhorar a sustentabilidade e a viabilidade econômica da produção de óleos essenciais.

Com o crescimento exponencial do ramo medicinal de *C. sativa* na indústria farmacêutica em todo o mundo, técnicas de extração do OE em plantas do *tipo medicamento*, que permitam a posterior obtenção do extrato das suas inflorescências (ou seja, extrato sem terpenos), como é o caso da técnica MAHD (que não causa degradação por exposição intensiva do material vegetal ao calor), devem ser desenvolvidas para promover a máxima eficiência de utilização do material vegetal, aproveitando todos os produtos possíveis de se obter na cadeia produtiva de *C. sativa* (plantas do *tipo medicamento*). Dessa forma, é possível que maiores quantidades do OE estejam disponíveis no mercado e seus usos potenciais possam ser explorados, desenvolvidos e aperfeiçoados. A biomassa proveniente dos resíduos das inflorescências utilizadas para a obtenção do óleo essencial, após hidrodestilação, requer uma avaliação analítica do extrato obtido, com o objetivo de maximizar o aproveitamento desse subproduto, considerando a possibilidade de extração posterior de outras substâncias de interesse. Tal proposição está de acordo com os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável

(ODS) da Organização das Nações Unidas (ONU, 2023) e com princípios da Bioeconomia (European Commission, 2005).

Dessa maneira, este trabalho propôs investigar parâmetros de extração por hidrodestilação do OE de plantas *tipo medicamento* da quimiovariante I (alto teor de THC), avaliando o teor de OE obtido e avaliando sua composição química. As biomassas residuais das inflorescências secas utilizadas para obtenção do OE foram submetidas a extração e posterior análise por CLAE-UV para avaliação da composição do extrato e degradação das substâncias majoritárias (fitocanabinoides).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DESCRIÇÃO HISTÓRICA

Cannabis sativa L., que é popularmente chamada de maconha, e também conhecida pelos nomes de diamba, liamba, “pito do pango”, é uma planta que foi domesticada para uma grande diversidade de utilizações pelos seres humanos sendo difundida por muitas regiões do planeta durante os últimos 12 mil anos, passando por cruzamentos e seleção artificial que resultou nas variedades hoje existentes. O provável contato com a planta com grupos humanos se deu 35 mil anos atrás, segundo apontam estudos sobre a ocupação humana na região da Ásia onde estipula-se que ocorreu o surgimento da planta. Esses estudos ainda são divergentes devido às dificuldades de mapear sua historiografia por diversos fatores, dentre eles, as migrações humanas que ocorreram desde a pré-história, promovendo a difusão de sementes das variedades selvagens e pré-domesticadas da planta pelas áreas ocupadas por grupos humanos de diversos períodos. No período histórico da antiguidade, a difusão de variedades da planta ocorreu com maior intensidade devido às rotas comerciais que foram estabelecidas. A domesticação de *C. sativa* ocorreu a partir do cultivo, dispersão e cruzamentos de três grupos selvagens conhecidas como “*sativa*”, “*indica*” e “*ruderalis*”, sendo todas elas classificadas como *C. sativa* (Rull, 2022).

Através de técnicas de seleção artificial, os seres humanos transformaram a morfologia de *C. sativa* ao longo dos últimos milênios, o que levou ao desenvolvimento de diversas variedades e cultivares da planta. Com isso, foi possível a obtenção de uma grande quantidade de híbridos férteis, resultando em uma imensa variedade de biotipos com diferentes perfis morfológicos, fisiológicos e químicos que são utilizados nos dias atuais. Consequentemente, isso se reflete na variedade de potenciais usos de *C. sativa* (McPartland, Small; 2020; Rull, 2022).

Sua origem mais provável é o continente asiático, possivelmente da região do vale da cordilheira do Himalaia. Os registros mais antigos de seu uso remontam a milhares de anos e estão presentes nas culturas árabe, chinesa, egípcia, europeia, hindu, mesopotâmica e persa, tanto para a obtenção de fibras e utilização na produção têxtil, quanto para fins medicinais. Nesses registros históricos está descrita larga aplicação para os mais diversos tratamentos, caracterizando o seu uso como tradicional para constipação, cólica menstrual, enxaquecas, gota, inflamações, insônia, malária, neuralgias, reumatismo e outras patologias. A farmacopeia chinesa do imperador Shen-Nung, escrita no ano 2700 a.C. é a primeira referência documental sobre usos terapêuticos da *C. sativa*, citando diversos usos, dentre eles o preparo do “pó de

cânhamo", capaz de aumentar o foco. Na cultura árabe, há inúmeros registros documentais desde o séc. 9 d.C. e muitos apontam a utilização do óleo extraído das sementes de *C. sativa* como analgésico, antiepilético, antiemético, antitérmico, diurético, vermífugo e no tratamento de cólica uterina, de inflamações do ouvido e doenças de pele (hanseníase, pitíriase e vitiligo). As civilizações greco-romanas faziam ampla utilização das fibras obtidas dos caules de *C. sativa* na produção manufatureira de calçados, esteiras, tecidos e cordas, sendo a produção de fios resistentes sua principal característica. Na obra "De Materia Medica", escrita no século 1 D.C., o autor Dioscórides descreve fórmulas de preparo utilizando as sementes frescas e seu emprego em dores de ouvido (Riddle, 1985; Knorzer, 2000; Russo, Grotenhermen; 2014; Clarke, Merlin; 2016).

A difusão de *C. sativa* para o continente americano ocorreu durante o período da colonização europeia, visto que, o período histórico conhecido como "Grandes Navegações" foi quando a produção de cânhamo se intensificou e sua cadeia produtiva foi desenvolvida para produção de fibras, visando a obtenção de cordas, tecidos e também alimentação humana a partir das sementes. O desenvolvimento de técnicas de cultivo do cânhamo e a sofisticação do beneficiamento das fibras do caule foram patrocinadas pelas potências colonizadoras europeias com o intuito de produzir cordas e velas para as embarcações que se desenvolveram durante esse período (Rull, 2022).

Apesar dos usos de *C. sativa* fazerem parte da história humana nos últimos milênios, no início do século XX, políticas proibicionistas foram adotadas em diversos países ao redor do mundo pelas mais diversas razões, impossibilitando o uso adulto, medicinal, alimentar e até mesmo para produção de fibras, causando, assim, um enorme retrocesso na área da pesquisa científica. Diversas convenções internacionais foram realizadas como forma de campanha para a massificação das medidas proibicionistas, sendo os EUA os maiores fomentadores mundiais do proibicionismo (Carlini, 2006).

Diversos países do mundo passaram a aderir a essas políticas durante o século XX e os movimentos de Lei e de Ordem que embasaram a proibição da maconha nos EUA foram utilizados como referência para a aplicação dessas leis proibicionistas (Oliveira, 2014). Desta forma, ao se "abrir as portas da proibição", os prejuízos se estenderam ao cultivo, produção, exploração e uso em geral de *C. sativa*. Em meados do século XX, iniciou-se a organização de um sistema de cooperação internacional fechado e altamente proibicionista, que visava combater o tráfico e o comércio ilegal da maconha e também de outras drogas (Lunardon, 2012).

Somente nas últimas décadas, houve uma reabertura com políticas de descriminalização e também na regulamentação do uso medicinal e do uso adulto, que ainda está em curso, sendo poucos os países cuja utilização de *C. sativa* é completamente legalizada, já que, no contexto global, a maioria dos países flexibilizou apenas o uso medicinal. Essa flexibilização é feita através de legislações que variam em relação às permissões e proibições, de acordo com os tipos de planta, as substâncias majoritárias presentes, etc. Ainda existem diversos países em que está vigente a proibição total de *C. sativa* para qualquer que seja o uso (Barros, 2023).

Em 1963, o químico búlgaro Raphael Mechoulam (1930 - 2023) isolou e determinou a estrutura do CBD e no ano seguinte do THC. Devido a diversas outras contribuições científicas e 60 anos dedicados à pesquisa com *C. sativa*, ficou mundialmente conhecido como “pai da maconha medicinal”. Ele abriu caminho para a descoberta de novos canabinoides presentes na planta e estudos farmacológicos realizados nas décadas seguintes (Gaoni; Mechoulam, 1964; The scientist, 2015; Revista Fórum, 2023). A partir da década de 1980, um grande número de estudos científicos e relatos clínicos da classe médica foram impulsionados mutuamente e trouxeram muitas evidências de seus efeitos benéficos, com destaque para a substância CBD em diversos tratamentos, o que possibilitou a regulamentação do uso da *C. sativa* em diversos países, tanto para usos medicinais como para o uso adulto. O pesquisador brasileiro Prof. Dr. Elisaldo Luiz de Araújo Carlini (1930 - 2020) da UNIFESP (antiga Escola Paulista de Medicina), conduziu estudos pioneiros realizados através de testes clínicos com o CBD em pacientes com epilepsia refratária (Cunha e Carlini, 1980), contribuindo imensamente para o fortalecimento do movimento mundial pelo anti-proibicionismo (Robinson, 1999; Russo *et al.*, 2005; Pisantini *et al.*, 2017).

No final da década de 1980, foi descoberto que o organismo de camundongos possui o ligante natural para as substâncias canabinoides - receptor canabinoide, e em seguida, durante a década de 1990, foram encontradas substâncias endocanabinoides em cérebros de suínos, sendo a primeira a ser descoberta nomeada de anandamida. Esses estudos abriram caminhos para que nas décadas seguintes ocorresse a descoberta do sistema endocanabinoide (SEC) nos vertebrados, permitindo que o mecanismo de ação dessas substâncias pudesse ser alvo de pesquisas voltadas para aplicações médicas (Devane *et al.*, 1992).

No Brasil, o ativismo de pacientes e/ou familiares de pacientes que fazem uso medicinal de *C. sativa* levou ao surgimento, durante a década de 2010, de associações civis em prol da cannabis, à concessão de *habeas corpus* judiciais para pacientes que praticavam o autocultivo e a pedidos de importação de medicamentos à base de *C. sativa* para as autoridades sanitárias por meio de ações judiciais. Esse fenômeno recente, iniciado através da desobediência civil

pacífica e organizada, se fortaleceu através de decisões judiciais favoráveis nas três situações apresentadas. Essas decisões se basearam em teses que o estado brasileiro atua com inércia e não atende os princípios básicos e direitos fundamentais garantidos pela Constituição Federal com relação ao seu dever de garantir o acesso à saúde. No caso das associações canábicas, são organizações que, além de realizar o cultivo de *C. sativa* e produzir fitoterápicos de forma artesanal para dispensar aos associados, também atuam no acolhimento, apoio, informação, capacitação, segurança jurídica e facilitação do acesso a pacientes e familiares aos tratamentos à base de *C. sativa* (De Quadros; Silva, 2022; Rodrigues, 2022).

No ano de 2017, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) aprovou o registro do primeiro medicamento à base de *C. sativa*, o Mevatyl[®], na forma de spray oral. Naquele ano, o medicamento já era aprovado para uso em 28 países com o nome comercial Sativex[®]. Mevatyl[®] é indicado para o tratamento da espasticidade relacionada à esclerose múltipla em pacientes adultos refratários a outros tratamentos com medicamentos antiespasmódicos. A prescrição está sujeita à notificação de receita A e o medicamento foi classificado como medicamento específico, que se refere a produtos farmacêuticos não enquadrados nas categorias de medicamento novo, genérico, similar, biológico, fitoterápico ou notificado, cujas substâncias ativas não são passíveis de ensaio de bioequivalência (Brasil, 2018).

A norma brasileira vigente que regulamenta a fabricação, importação, comercialização, dispensação mediante prescrição médica, monitoramento e a fiscalização de produtos derivados de *C. sativa* para fins medicinais é a RDC ANVISA n. 327/2019. A utilização desses produtos e derivados é permitida, desde que sejam na maioria constituídos por CBD e no máximo 0,2 % de THC, com exceção dos pacientes cuja patologia não possui outras alternativas terapêuticas senão a utilização de medicamentos com maiores teores de THC. O cultivo da *C. sativa* permanece proibido no Brasil para qualquer que seja a finalidade, tanto para fins comerciais, pesquisa e produção de medicamentos como cultivos particulares. A RDC ANVISA n. 660/2020 “define os critérios e os procedimentos para a importação de produto derivado de cannabis, por pessoa física, para uso próprio, mediante prescrição de profissional legalmente habilitado, para tratamento de saúde” (BRASIL, 2022).

Na atualidade, podemos destacar como as principais utilizações da planta: a produção de remédios e medicamentos, o uso alimentício, a produção de fibras têxteis, a produção de bioenergia, a utilização na construção civil e o uso adulto, sendo, portanto, uma planta com grande potencial de ser explorado pela indústria dos mais diferentes segmentos e também por consumidores individuais. Diversas utilizações de *C. sativa* estão de acordo com os princípios da Economia Verde e da Bioeconomia (European Comissão, 2005) na substituição de

componentes sintéticos derivados de petróleo, ou ainda, pelas ações da planta no sequestro de carbono durante seu desenvolvimento, bem como na ação de fitorremediação promovida pelas raízes de *C. sativa* nos campos de cultivo pela sua capacidade de descontaminar solos com resíduos de impurezas e metais pesados. Todas essas ações citadas minimizam impactos ambientais negativos e problemas de saúde, sendo, portanto, uma opção que dialoga com os princípios da sustentabilidade (Rehman *et al.*, 2013; Karche, 2019; Kraszkiewicz *et al.*, 2019; Farinon *et al.*, 2020; Jami *et al.*, 2022; Golia *et al.*, 2023).

No ano de 2024 o Supremo Tribunal Federal (STF) finalizou um julgamento iniciado em 2009, e formou maioria contrária a tese de que portar *C. sativa* deve ser considerado crime, estabelecendo limites de quantidades para que a pessoa flagrada pelas autoridades policiais portando a planta ou cultivando seja considerada criminosa ou usuária (Recurso Extraordinário nº.635659 - STF, 2024).

2.2 DESCRIÇÃO BOTÂNICA

Cannabis sativa L. é uma planta pertencente à classe Magnoliopsida, subclasse Hamamelidae, ordem Urticales e família Cannabaceae (AHP, 2014).

A classificação para *C. sativa* mais aceita pelos botânicos, até o momento, é de que ela é uma planta monotípica, com apenas uma espécie que apresenta grande diversidade de biotipos, devido aos cruzamentos entre as variedades selvagens, as quais produzem descendentes híbridos férteis, proporcionando abundante variedade genotípica expressa em uma grande variedade de plantas distintas morfologicamente. Essa nova classificação visa romper com o modelo mais utilizado nas últimas décadas, que considerava três espécies distintas de *Cannabis* (Rull, 2022).

Devido ao longo tempo em que as três primeiras formas de classificar *C. sativa* foram mantidas como o cerne da argumentação sobre o gênero *Cannabis* ser monotípico ou politípico, assim como a discussão sobre a existência ou não de mais de uma espécie, sobre as possibilidades de cruzamentos e da produção de descendentes híbridos férteis e a consequente variedade de indivíduos morfologicamente distintos, até os dias atuais, ainda existe grande dificuldade em determinar sua classificação de forma precisa (McPartland, 2018; Rull, 2022).

Essas três classificações iniciais se confundem com espécies, subespécies e variedades, tanto na nomenclatura científica, como na popular, ocorrendo, inclusive, interferências das formas populares de classificação na nomenclatura botânica em diversos trabalhos científicos (Rull, 2022).

O autor Carl Linnè (1707 - 1778) foi o primeiro a classificar a planta como *Cannabis sativa* L. e descreveu suas características: ramificada, com folhas estreitas, utilizada principalmente para obtenção de fibras e produção de sementes; Jean-Baptiste de Lamarck (1744 - 1829) diferenciou como outra espécie a planta que chamou *Cannabis indica* Lam. e a descreveu como de menor altura, caule firme, densamente ramificada, folhas largas e características mais psicoativas; Dmitri Janischevski (1875 - 1944) também diferenciou a planta a qual deu a nomenclatura *Cannabis ruderalis* Janisch., a descrição morfológica que levou a nova classificação era: pequena, com poucas ramificações e menor ação psicoativa (McPartland, 2018).

Há, ainda, outra corrente de pensamento bastante presente na literatura sobre classificação de “gênero” para *C. sativa* e é considerada a mais aceita pelos pesquisadores na atualidade. Ela considera a existência de apenas uma espécie (*Cannabis sativa* L.) e aceita *Cannabis sativa* sub. *sativa* e *Cannabis sativa* sub. *indica* como subespécies que tiveram separação geográfica durante longos períodos, quando ocorreu a glaciação do planeta. Dessas subespécies, derivam todas as variedades e cultivares que existem atualmente e são utilizadas para cultivo e/ou, ainda, cruzamento para obtenção de novas variedades (McPartland; Small, 2020).

As variedades de *C. sativa* disponíveis atualmente para cultivo apresentam uma grande diversidade de biotipos e quimiotipos expressos. As características morfológicas e os perfis químicos observados nem sempre correspondem ao esperado, de acordo com as primeiras classificações estabelecidas, o que inviabiliza qualquer tentativa de definir subespécies ou variedades consideradas selvagens (var. *indica*, *sativa* e *ruderalis*) com base nesses critérios. Essa hipótese é reforçada por recentes estudos filogenéticos (mapeamento de acordo com o perfil evolutivo), estudos arqueológicos e palinológicos (estudo dos registros fósseis de grãos de pólen) que não fornecem subsídio para sustentação dos critérios de classificação em três espécies inicialmente adotados (Bonini *et al.*, 2018; McPartland; Small, 2020).

Os cruzamentos abundantes (produzindo descendentes híbridos férteis) que têm sido realizados nos últimos milênios, potencializados pela disseminação de *C. sativa* pelo mundo, são fatores que favoreceram a grande variabilidade genética e trouxeram dificuldades para sua classificação botânica (Rull, 2022). As décadas de políticas proibicionistas, adotadas em diversos países nos séculos XX e XXI, impediram que o desenvolvimento da ciência moderna e a aplicação de novas tecnologias fossem empregadas na sua classificação (Gray *et al.*, 2016).

C. sativa é uma planta cujo porte varia, podendo ser herbáceo ou arbustivo, e o seu ciclo é anual. A espécie recebe classificação dioica (inflorescências masculinas e femininas em

indivíduos diferentes), mas existem espécimens que podem expressar *hermafroditismo*, podendo essa característica ocorrer por expressão gênica ou devido ao indivíduo feminino sofrer estresse ambiental. Devido a essa característica, alguns autores têm adotado para classificação de termo *mono-específica*, referindo-se a essa especificidade de expressar ou não os diferentes órgãos reprodutores em seus espécimens (Şenkal *et al.* 2023; Malabadi *et al.*, 2023).

C. sativa (Figura 1) é ramificada, mede de 0,2 a 6 m de altura e sua raiz é pivotante. A morfologia da planta pode sofrer alterações fenotípicas ao longo dos estágios fenológicos de acordo com a forma de propagação; em geral, pode-se dizer que suas folhas são digitadas dispostas alternadas ao longo do caule quando a propagação é feita por clonagem ou dispostas opostas quando a propagação é feita por sementes (Hesami; Jones, 2023). Apresenta de 3 a 13 folíolos lanceolados, de margem serrilhada, 0,5 a 15 cm de comprimento, face adaxial verde escura com presença de tricomas não secretores e face abaxial de um verde esbranquiçado e raramente com presença de tricomas secretores, pecíolo de 2 a 7 cm verde ou arroxeado. A inflorescência masculina é verde-amarelada na forma de panícula, com pedicelo de 2 a 4 mm, sépalas imbricadas, de formato oval a lanceolado, ausência de pétalas, anteras oblongas, possuem tricomas pequenos e esparsos. Já a inflorescência feminina (Figura 2) é densamente pilosa e coberta por tricomas secretores (Figura 3), tem diversas possibilidades de cores como verde, roxa, vermelha, mosqueada e é formada por pseudoespículas entre brácteas em formato de folha, bractéolas com forma cônica que envolvem completamente o ovário e 2 pistilos lineares e longos, emergindo do ápice da bractéola. Possui aquênios (frutos) solitários marrom-esverdeados, brancos ou cinza, com endosperma carnosos e oleosos, comumente confundidos com a semente (AHP, 2014).

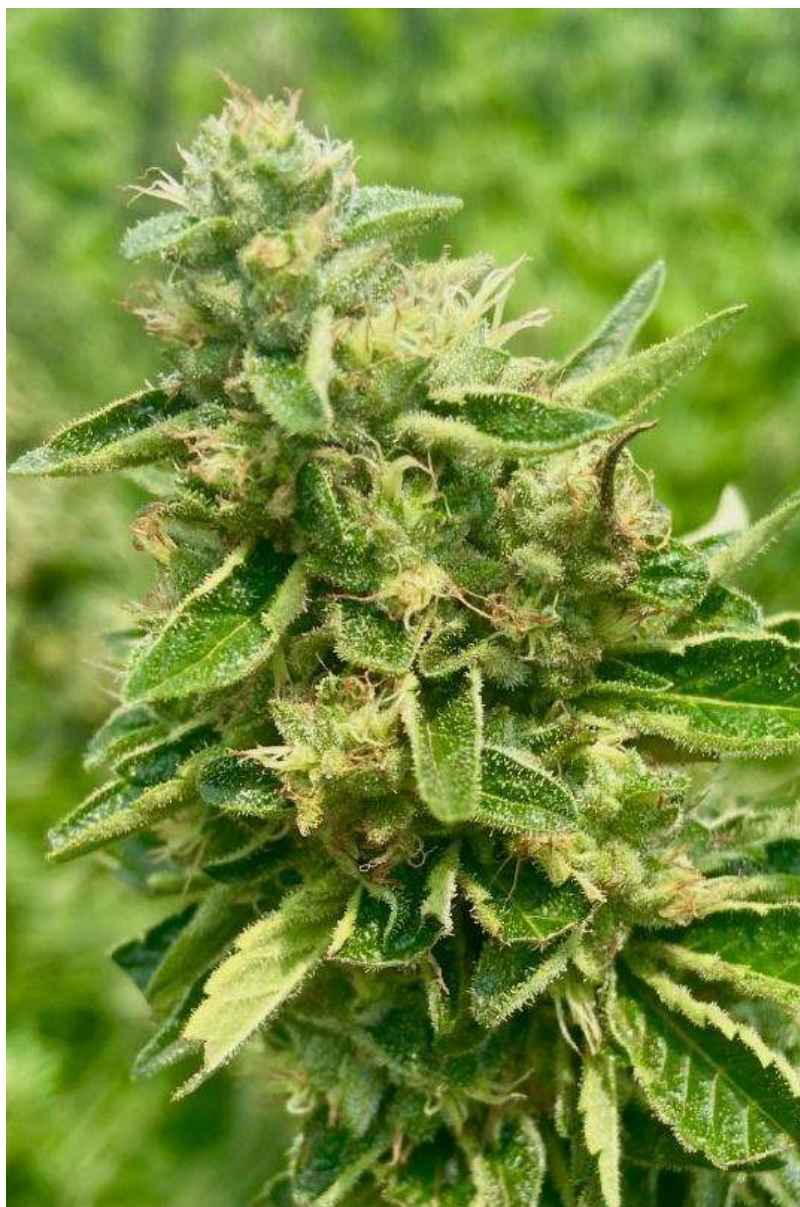
Figura 1 – Espécimen de *Cannabis sativa* L. cultivado na Associação Terapêutica Cannabis Medicinal Flor da Vida.



Fonte: Registrado por Bruno Morabati, 2023.

Legenda: Foto de uma planta destacada em um cultivo com diversas plantas

Figura 2 – Imagem da inflorescência feminina de *C. sativa*.



Fonte: Registrado por Bruno Morabati, 2023.

Legenda: Foto de uma inflorescência destacada em uma planta com visualização das brácteas, pistilos e tricomas

Figura 3 – Imagem de tricomas secretores em bráctea da inflorescência de *C. sativa* ampliada em 1000x.



Fonte: Registrado por Eduardo Pina, 2023.

Legenda: Foto de região do tecido das brácteas aproximada em mil vezes possibilitando a visualização da estrutura dos tricomas.

2.3 DEMAIS CLASSIFICAÇÕES

2.3.1 Classificação segundo o fotoperiodismo de *C. sativa*

C. sativa é uma planta de dias curtos (PDC), ou seja, dependente de fotoperíodo para iniciar o estágio reprodutivo (sofre influência do regime luminoso no seu desenvolvimento), permitindo que se classifique, portanto, as variedades cultivadas como *fotodependentes*. Existem variedades de *C. sativa* que se adaptaram a regiões do planeta próximas ao paralelo do Círculo Polar Ártico, onde a luminosidade chega a durar 24 horas por dia durante alguns meses do ano. Essa adaptação fez com que existam também variedades classificadas como *indiferentes ao fotoperíodo* (popularmente chamadas de *autoflorescentes* ou *automáticas*) (Toth *et al.*, 2022).

O cultivo de *C. sativa* pode ser realizado em casas de vegetação com iluminação artificial (*indoor*) ou em campo aberto (*outdoor*), o qual fica limitado a determinadas épocas do ano devido ao fotoperiodismo, visto que grandes cultivos utilizam a técnica de clonagem de plantas feminizadas do tipo *fotodependentes* (Zheng, 2019).

As plantas *fotodependentes* são as mais utilizadas no cultivo e na cadeia produtiva de *C. sativa*, para uso adulto e medicinal (plantas *tipo medicamento*). Durante seu período vegetativo,

podem ficar expostas a até 24 horas diárias de luz, porém, o regime de 18 horas de luz e 6 horas de escuro é o mais usual quando o cultivo é realizado em casas de vegetação. Ao atingir o chamado “pré-florescimento” (surgimento de estruturas reprodutivas em estágio inicial de desenvolvimento), o regime luminoso deve ser alternado para no máximo 12 horas de exposição à luz, fazendo com que a planta se desenvolva para o estágio reprodutivo, no qual o regime luminoso e o espectro de luz fornecido (no caso da iluminação artificial) são determinantes para o desenvolvimento das inflorescências e produção dos metabólitos secundários. Plantas em estágio reprodutivo não podem ser expostas a regimes luminosos superiores à 12 horas, pois o estresse ambiental causado pelo excesso de luminosidade pode provocar um retorno ao estágio vegetativo e interrupção do desenvolvimento das inflorescências - ou ainda, fazer com que plantas femininas tornem-se hermafroditas, passando a produzir, também, inflorescências masculinas (Dang *et al.*, 2022; Janatová *et al.*, 2018).

Já as plantas *indiferentes ao fotoperíodo*, possuem cruzamento com plantas da variedade *ruderalis*, as quais são adaptadas para suportar diferentes regimes de luminosidade em todos os estágios fenológicos, característica que é aproveitada nesse cruzamento para produção dessas sementes, conhecidas no mercado dos bancos de sementes de *C. sativa* como *automáticas*. A incapacidade de produzir clones por estaquia de plantas *indiferentes* é uma característica que a torna economicamente inviável para utilização na cadeia produtiva de *C. sativa*, sendo uma opção disponível no mercado apenas para cultivadores individuais (Toth *et al.*, 2022).

2.3.2 Plantas cultivadas com sementes regulares e com sementes feminizadas

A feminização de sementes de *C. sativa* é um método capaz de garantir que a maioria das plantas do cultivo se desenvolva apenas com as estruturas reprodutivas femininas, o que é de extrema importância no cultivo de *C. sativa* do *tipo medicamento*, uma vez que as inflorescências das plantas femininas contêm teores mais elevados de canabinoides, que são acumulados nos tricomas durante o desenvolvimento reprodutivo. Ao mudar de estágio fenológico para frutificação (ao ser polinizada), o metabolismo secundário é drasticamente alterado, reduzindo os teores de canabinoides. As inflorescências femininas não polinizadas são, portanto, o órgão de interesse das plantas *tipo medicamento* na cadeia produtiva de *C. sativa*, seja para uso adulto ou medicinal. Essas características permitem classificar as plantas como originadas por *sementes regulares* ou por *sementes feminizadas* (Boonsri *et al.*, 2023).

Nas sementes classificadas como *sementes regulares* o material genético determina se o desenvolvimento da planta irá produzir indivíduos masculinos, ou indivíduos femininos (espécie dioica). Há, também, sementes cujo material genético determina que no

desenvolvimento da planta serão produzidas tanto as inflorescências masculinas como também as inflorescências femininas durante o estágio reprodutivo. Ou seja, as *sementes regulares* podem se desenvolver e produzir indivíduos exclusivamente masculinos, exclusivamente femininos ou, ainda, hermafroditas (Yadav *et al.*, 2023; Boonsri *et al.*, 2023).

A exposição de indivíduos femininos ao estresse ambiental pode produzir uma resposta ao estímulo estressor, fazendo com que se a planta se torne hermafrodita. Dessa forma, um indivíduo cujo material genético determina que se desenvolva para produzir inflorescências femininas, pode vir a produzir, também, órgãos reprodutivos masculinos. Portanto, existem as possibilidades de que o *hermafroditismo* seja determinado pela genética de cada indivíduo ou provocado pelo estresse ambiental (Janatová *et al.*, 2018).

As sementes classificadas como *sementes feminizadas* podem ser obtidas de duas formas. Uma delas, é a partir do cruzamento de um indivíduo feminino que sofreu *hermafroditismo* causado pelo estresse ambiental, através da polinização de suas estruturas femininas utilizando o pólen das estruturas masculinas que foram desenvolvidas pela mesma planta. Ou, ainda, a partir do cruzamento utilizando esse pólen para polinizar outro indivíduo feminino que contenha apenas órgãos reprodutivos femininos, o que garante *feminização* de quase 100 % das sementes produzidas por essas plantas após o desenvolvimento dos frutos e sementes no estágio fenológico da frutificação, já que essas sementes foram originadas a partir do cruzamento realizado por uma única planta de genética feminina ou entre duas plantas femininas (Punja *et al.*, 2020). A outra forma de *feminização* de sementes conhecida é através do tratamento químico por pulverização foliar dos indivíduos femininos com soluções específicas contendo sais de prata, o que torna essas plantas hermafroditas, ou seja, leva ao surgimento de inflorescências masculinas. Essas plantas são utilizadas nos cruzamentos com outros indivíduos femininos e esse procedimento permite altas taxas de *feminização* (Flajšman *et al.*, 2021; Lubell *et al.*, 2018).

As *sementes feminizadas* são de extrema importância nos cultivos de plantas do *tipo medicamento*, sendo bastante valorizadas, além do que, sua produção é considerada um importante nicho de mercado para atender a cadeia produtiva de *C. sativa* para uso adulto e medicinal. Em uma etapa avançada do cultivo, quando as plantas finalizam o estágio vegetativo e iniciam o estágio reprodutivo, a utilização de *sementes feminizadas* permite a redução drástica do manejo de identificação e eliminação das plantas masculinas, poupando um processo extremamente trabalhoso e indesejado. Plantas masculinas presentes no cultivo podem comprometer toda a produção de inflorescências femininas no caso de polinização realizada pelo vento ou por insetos, o que faria com que as plantas avançassem para o estágio da

frutificação com consequente diminuição do teor de canabinoides e outros metabólitos secundários presentes em maiores teores nas inflorescências femininas não polinizadas (Malabadi *et al.*, 2023).

A *feminização* de sementes de *C. sativa* é uma técnica bastante eficaz, que permite que os produtores tenham maior controle sobre a distribuição de “gênero” das plantas em cada ciclo de cultivo, otimizando a produção de inflorescências de alta qualidade para a cadeia produtiva de *C. sativa* de uso adulto e medicinal (Malabadi *et al.*, 2023).

2.3.3 Classificação segundo a morfologia do caule e a composição química (quimiovariantes) de *C. sativa*

Visando atender demandas legislativas e de perícia criminal (química forense), foram criadas classificações de *C. sativa* que se popularizaram a partir da década de 1970 (Small, 1973) e costumam ser amplamente utilizadas, tanto no meio científico, como pelos grupos que exploram comercialmente a planta (uso adulto), dada a dificuldade que sempre existiu em classificar as plantas do *tipo medicamento* relacionando taxonomia, filogenética e produção de metabólitos secundários. A categoria plantas do *tipo medicamento* é subdividida em três subcategorias chamadas quimiovariantes, cujo perfil químico da parte da planta ou produto é analisado para determinar se deve ser considerado *psicoativo* ou *não psicoativo* (Hazekamp, 2012). Outro grupo de interesse é o das plantas classificadas como *tipo fibra* (*hemp*, cânhamo ou cânhamo industrial), que foram selecionadas artificialmente para produção de fibras e sementes (Younger, 2019).

As categorias de classificação baseadas nas três quimiovariantes, propostas por Small (1973) para as plantas *tipo medicamento*, consideram que duas substâncias majoritárias são os marcadores principais e a análise de seus teores define qual a quimiovariante, sendo elas o THC e CBD. A quimiovariante I compõe o grupo de plantas popularmente chamadas de *sativa* ou “tipo THC”, pois possuem maiores teores de THC, que é uma substância medicinal, mas também com efeito *psicoativo*. A quimiovariante II engloba as plantas que produzem teores similares de THC e CBD; elas são popularmente chamadas de “um para um”, devido às proporções semelhantes desses componentes majoritários na sua composição química. Já as plantas da quimiovariante III, popularmente chamadas de *indica* ou “tipo CBD”, possuem maiores teores de CBD do que de THC. As quimiovariantes I e II são consideradas *psicoativas* ou, ainda, *narcóticas*; a quimiovariante III, assim como as plantas do *tipo fibra*, são consideradas *não psicoativas*, ou, ainda, *não narcóticas*, sendo a presença do THC em teores maiores do que 1 - 3 % (de acordo com as legislações vigentes em cada país) o fator

determinante para essa categorização (Robinson, 1999; Russo *et al.*, 2005; Small, 2015; Pisantini *et al.*, 2017).

A forma de classificar as plantas do *tipo medicamento* em quimiovariantes continua em uso, tanto nos meios científicos, quanto no popular e comercial. Mas, recentemente, foi reavaliada e teve adaptações através da utilização de técnicas analíticas de instrumentação mais sofisticadas na análise metabolômica, empregando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa (CG) acopladas a técnicas espectrométricas (técnicas hífenadas) e análise de dados por modelos quimiométricos. Os resultados dessas reavaliações foram cinco quimiovariantes com perfil químico mais abrangente, identificadas através de 28 substâncias consideradas majoritárias para essa classificação (e não apenas o THC e o CBD), fornecendo uma “impressão digital cromatográfica” característica de cada uma das cinco quimiovariantes. As três quimiovariantes descritas por Small (1973) permanecem sendo classificadas da mesma forma, porém, sua impressão digital cromatográfica contém um número maior de substâncias (com teores dentro de faixas específicas) para identificá-las. Elas ainda são consideradas as plantas “tipo THC”, “tipo um pra um” e “tipo CBD”; já as duas categorias que foram acrescentadas baseiam-se em faixas de teores das 28 substâncias consideradas majoritárias e não possuem canabinoides majoritários como referência (Cerrato *et al.*, 2021).

2.4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA

C. sativa apresenta alta complexidade na sua composição química com diversas classes de metabólitos secundários, sendo as três classes principais: canabinoides, flavonoides e terpenos (monoterpenos e sesquiterpenos) que são responsáveis pelas características e propriedades da planta, com destaque para as aplicações medicinais e uso adulto. Outras partes da planta e também as inflorescências apresentam outras categorias de compostos em baixas concentrações, como os alcaloides, os diterpenos, os triterpenos e os estilbenos. A interação desses metabólitos presentes no chamado fitocomplexo é responsável pelo efeito *entourage*, também chamado efeito comitiva, que é a sinergia que ocorre quando múltiplos compostos extraídos de plantas atuam juntos no organismo em diferentes alvos, aumentando o potencial terapêutico (Anand *et al.*, 2021).

O conceito de efeito *entourage* sugere que os efeitos combinados de vários compostos vegetais são capazes de oferecer mais benefícios terapêuticos do que a utilização de medicamentos produzidos com compostos isolados. Dessa forma, o fitocomplexo de *C. sativa* demonstra um potencial terapêutico maior do que apenas os canabinoides isolados THC e CBD utilizados como fitofármacos em medicamentos. O conceito de efeito *entourage* compreende,

ainda, que a complexidade de substâncias em medicamentos ou remédios fitoterápicos provoca o aumento ou a modulação dos efeitos terapêuticos através da interação das substâncias presentes no extrato nos diferentes alvos de ação no organismo, mesmo sendo ainda um fenômeno não estável e não previsível. Devido a esses fatores, destaca-se a importância de que o perfil químico da planta inteira seja considerado, assim como as interações complexas dos seus constituintes ao explorar as aplicações e potenciais de *C. sativa* (Russo, 2019; Simeï *et al.*, 2023). Atualmente, há um crescente interesse em extratos chamados *full spectrum* de *C. sativa*, visando maximizar os benefícios dessa interação sinérgica e explorar o potencial terapêutico da planta (Maayah *et al.*, 2020; Gomes, 2021).

A fim de garantir uma maior reprodutibilidade dos perfis de metabólitos secundários, existe uma lacuna a ser preenchida na padronização do cultivo e do processamento pós-colheita de *C. sativa*, visando definir, através do manejo e das práticas de cultivo, a obtenção uniforme desses compostos. O processamento pós-colheita (secagem, armazenamento e extração), deve visar a conservação dos perfis de metabólitos secundários produzidos pela planta (Addo *et al.*, 2021; Lowe *et al.*, 2021).

2.4.1 Canabinoides

Os canabinoides são os compostos mais estudados em *C. sativa* e são os principais responsáveis pelos efeitos psicoativos e terapêuticos da planta. Foram descritos 135 canabinoides (Cerrato *et al.*, 2021) em *C. sativa*, sendo os mais conhecidos o THC e o CBD. Esses metabólitos interagem com o SEC no corpo dos vertebrados, um sistema de homeostase e modulação dos demais sistemas presentes no organismo, descoberto no início da década de 1990 (Devane *et al.*, 1992) e que tem sido objeto de extensa pesquisa, devido às suas potenciais aplicações médicas. Existem vários tipos de canabinoides, sendo os fitocanabinoides, obtidos exclusivamente de plantas; os canabinoides endógenos, produzidos pelo organismo dos mamíferos e os canabinoides sintéticos, sintetizados em laboratório (Marzo; Petrocellis, 2006).

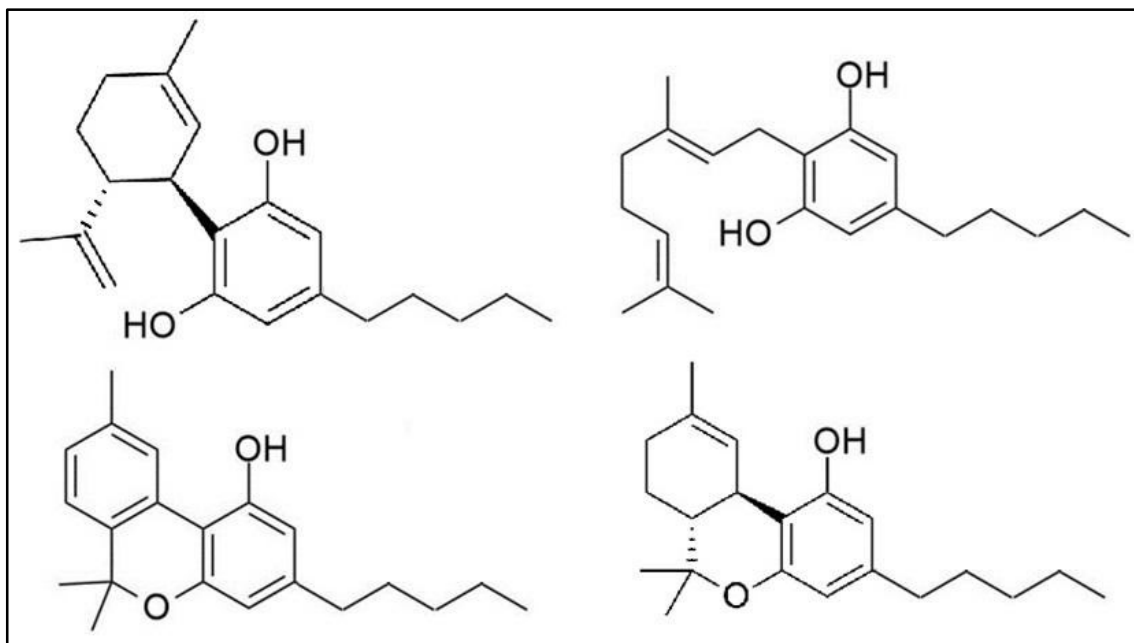
Os fitocanabinoides derivam de duas rotas biossintéticas, sendo uma via do metabolismo dos terpenos e outra via do metabolismo de compostos fenólicos e, por esse motivo, são chamados de compostos terpeno-fenólicos ou meroterpenos. A biossíntese de terpenos em plantas é realizada por meio de duas vias independentes: o mevalonato citosólico (MEV) e o fosfato de metileritritol plastidial (MEP). A primeira etapa de biossíntese dos fitocanabinoides envolve a formação de ácido olivetólico, através da via dos policetídeos. O ácido olivetólico e o geranyl difosfato (precursor dos monoterpenos, unidade C10) são combinados através da enzima prenilase, denominada geranyl difosfato: olivetolato

geraniltransferase, a qual resulta na produção de ácido canabigerólico (CBGA). Em seguida, o CBGA é transformado pelas enzimas oxidases dependentes de flavina adenina dinucleotídeo (FAD): a Δ^9 -ácido tetrahydrocanabinólico sintase, a ácido canabidiólico sintase e a ácido canabícromênico (CBCA) sintase, que levam à produção de ácido Δ^9 -tetrahydrocanabinólico, ácido canabidiólico e ácido canabícromênico (Kinghorn *et al.*, 2017; Govindarajan *et al.*, 2023; Innes e Vergara, 2023).

As maiores concentrações dessas substâncias estão nos tricomas secretores presentes nas inflorescências femininas (Rodziewicz *et al.*, 2019), mas também são encontrados em baixas concentrações em outras partes da planta (Lorensen *et al.*, 2023). Os fitocanabinoides presentes em *C. sativa* podem ser agrupados em 10 subclasses com os seguintes representantes: canabinodiol (CBND); canabigerol (CBG), canabidiol (CBD), canabinol (CBN), Δ^9 -*trans*-tetrahydrocanabinol (Δ^9 -THC), Δ^8 -*trans*-tetrahydrocanabinol (Δ^8 -THC), canabiciolol (CBL), canabitriol (CBT), canabielsoina (CBE) e canabícromeno (CBC). Além dessas, existe uma subclasse mista que agrupa canabinoides que não pertencem às 10 subclasses mencionadas. Esses compostos têm sido alvo de pesquisas sobre efeitos terapêuticos, sendo mais estudadas até o momento as formas descarboxiladas (especialmente THC, CBD, CBG, CBN e CBC), por possuírem maior número de estudos farmacológicos do que as formas ácidas (ex. CBDA, CBGA, THCA) e serem reconhecidas por sua alta afinidade com os receptores do SEC - CB1 e CB2 (Gul *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2018; Ahmed; Noshad; Li, 2021; Nixon *et al.*, 2021).

A descarboxilação do material vegetal é o processo realizado para obtenção de extratos de *C. sativa* concentrados em canabinoides na forma descarboxilada, etapa fundamental do processamento, podendo ser realizada tanto na matéria prima vegetal ou mesmo nos derivados vegetais. Trata-se de um processo de aquecimento prévio das inflorescências ou extratos, por temperaturas que variam de 115 a 150° C por determinados períodos de tempo, que variam de 30 a 120 minutos, de acordo com os canabinoides que se deseja descarboxilar com maior eficiência. Para obter extratos de uso medicinal concentrados em THC e CBD, a descarboxilação do derivado vegetal (inflorescências ou extratos) pode ser realizada à 115° C por 90 min (Ternelli *et al.*, 2020). Esse procedimento permite converter os canabinoides ácidos (grupo ácido carboxílico) em canabinoides descarboxilados (com alta afinidade pelos receptores canabinoides e com sua bioatividade mais caracterizada), através de um processo de degradação térmica das formas ácidas dos canabinoides, visto que os canabinoides estão presentes predominantemente nas formas ácidas em *C. sativa* (Lewis-Bakker *et al.*, 2019). As Figura 4 e 5 apresentam as estruturas químicas dos principais fitocanabinoides de *C. sativa* THC, CBD, CBG, CBN; e a descarboxilação do THCA, respectivamente.

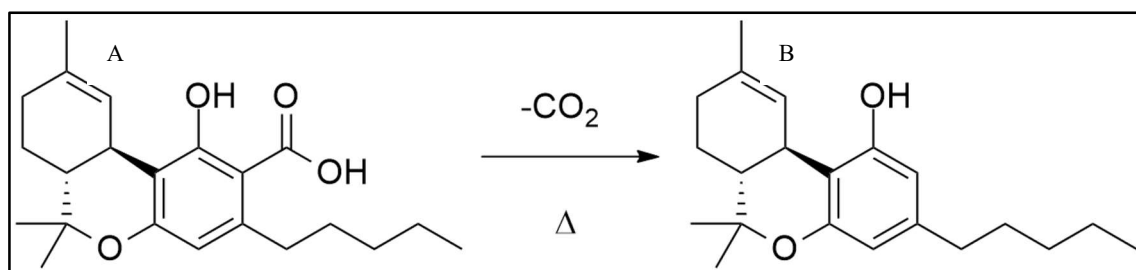
Figura 4 – Principais fitocanabinoides (forma descarboxilada). (A) CBD, (B) CBG, (C) CBN, (D) THC.



Fonte: Elaborado por Júlio Sanches, 2024.

Legenda: Imagens de representações de fórmulas estruturais planas das moléculas. Os símbolos indicam os átomos constituintes e os traços representam as ligações covalentes simples ou múltiplas dispostas no plano bidimensional.

Figura 5 - Descarboxilação do THCA. (A): THCA, (B): THC.



Fonte: Elaborado por Júlio Sanches, 2024.

Legenda: Esquema da degradação térmica molecular. À esquerda, a estrutura química inicial em geometria plana; ao centro, o símbolo delta indicando a exposição à fonte de calor; à direita, a nova estrutura química resultante. As imagens das estruturas são representações de fórmulas estruturais planas das moléculas. Os símbolos indicam os átomos constituintes e os traços representam as ligações covalentes simples ou múltiplas dispostas no plano bidimensional.

Além dos efeitos psicoativos e o interesse pelo uso adulto, os fitocanabinoides têm recebido evidência da comunidade médica e científica pelas suas aplicações terapêuticas em condições como dor crônica, epilepsia, ansiedade e muitas outras, o que possibilita, junto com as demais substâncias presentes na *C. sativa*, tratamentos a base da planta para 29 condições, além de doenças veterinárias, segundo mapeamento dos diferentes usos terapêuticos relatados

em diversos países, presente no “Cannabis and cannabis resin Critical Review Report”, CRR da OMS (OMS, 2018).

Os canabinoides endógenos, também conhecidos como endocanabinoides, são produzidos naturalmente pelo organismo dos vertebrados (Silver, 2019) e dois deles têm sido alvo de estudos recentes, são eles: a anandamida e o 2-araquidonoilglicerol (2-AG). A atuação dessas substâncias está relacionada à regulação de vários processos fisiológicos, entre eles, a percepção da dor, o humor e o apetite. No sistema nervoso os endocanabinoides são sintetizados de acordo com a necessidade da atuação, que é feita a partir de neurotransmissores retrógrados que modulam a liberação de outros neurotransmissores para atuar em diversas necessidades fisiológicas. O SEC está envolvido na manutenção da homeostase dos sistemas fisiológicos presentes no corpo dos vertebrados, e nos estudos com mamíferos podemos relacionar sua atuação modulando os sistemas cardíaco, circulatório, digestório, geniturinário, imunológico, muscoesquelético, nervoso e respiratório (Wu, 2019; OMS, 2018; Kilaru; Chapman, 2020).

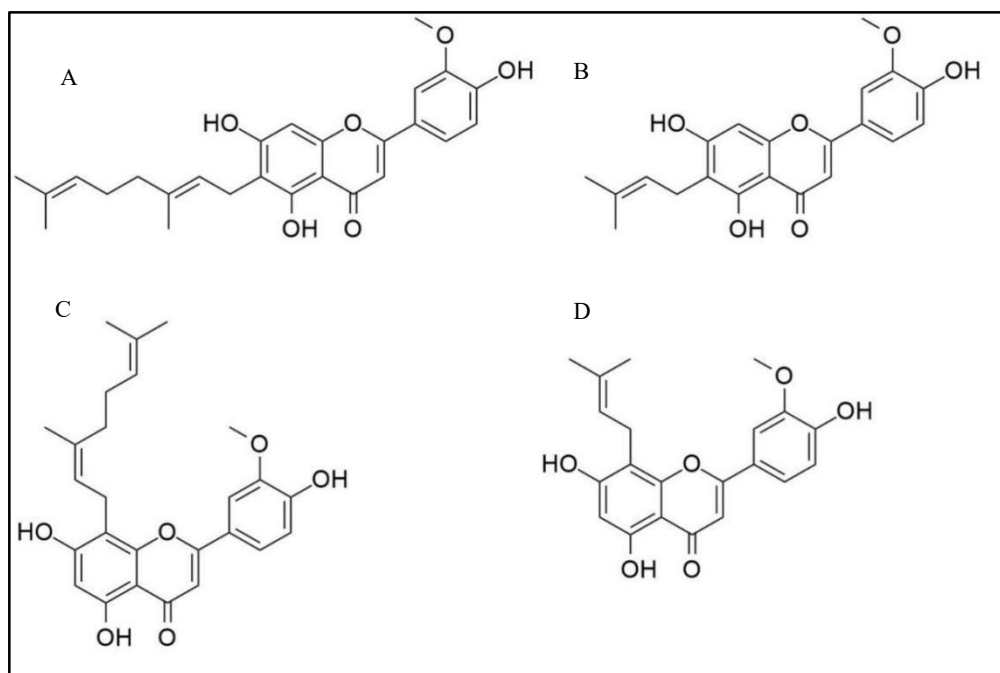
Os canabinoides sintéticos (CS) são substâncias produzidas artificialmente capazes de atuar nos receptores do SEC, assim como os endocanabinoides e os fitocanabinoides, com efeitos similares e, em alguns casos, potencializados. Esses compostos são sintetizados para fins de pesquisa ou como fármacos, como é o caso do dronabinol, molécula sintética idêntica ao fitofármaco THC. A variedade de estruturas químicas possíveis com a produção de CS é muito ampla e, muitas vezes, as substâncias produzidas podem gerar efeitos imprevisíveis e perigosos. Existem CS que têm provocado efeitos adversos à saúde e têm sido explorados pelo mercado ilegal, sendo vendidos como drogas sintéticas, como as conhecidas drogas K ou *spice* (K2 e K9). Apesar dos perigos da circulação ilegal dessas substâncias e seu uso abusivo, a pesquisa com esses compostos permite que o SEC possa ser estudado com maior profundidade (Young *et al.*, 2012; Fantegrossi *et al.*, 2014; Schlatter, 2014; Zawilska; Wojcieszak, 2014; Akram; Mokrysz; Curran, 2019; Langford; Bolton, 2018).

2.4.2 Flavonoides

Os flavonoides são outra classe de metabólitos secundários encontrada em *C. sativa*, que apresentam atividades antioxidante e anti-inflamatória e constituem parte do fitocomplexo da planta e seus benefícios para a saúde. Até o momento, 34 flavonoides foram encontrados em *C. sativa* com sete diferentes agliconas - orientina, vitexina, isovitexina, quercetina, luteolina, kaempferol e apigenina - que podem ser metiladas, preniladas, geraniladas ou conjugadas a unidades de monossacarídeos como *O*-glicosídeos ou *C*-glicosídeos (Jin *et al.*, 2020; Lowe *et al.*, 2021; Abdel-Kader *et al.*, 2023).

Flavonoides prenilados conhecidos como canflavinas foram identificados pela primeira vez em *C. sativa* e incluem a canflavina A, canflavina B, canflavina C e isocanflavina B (Figura 6). São flavonas preniladas (C5) ou geraniladas (C10) que têm recebido destaque por suas propriedades anti-inflamatória e analgésica, potencializando os efeitos medicinais da planta, mesmo estando presentes em *C. sativa* em pequenas quantidades (Erridge *et al.*, 2020; Abdel-Kader *et al.*, 2023).

Figura 6 – Canflavinas identificadas em *C. sativa*. (A) canflavina A, (B) canflavina B, (C) canflavina C, (D) isocanflavina B.



Fonte: Elaborado por Júlio Sanches, 2024.

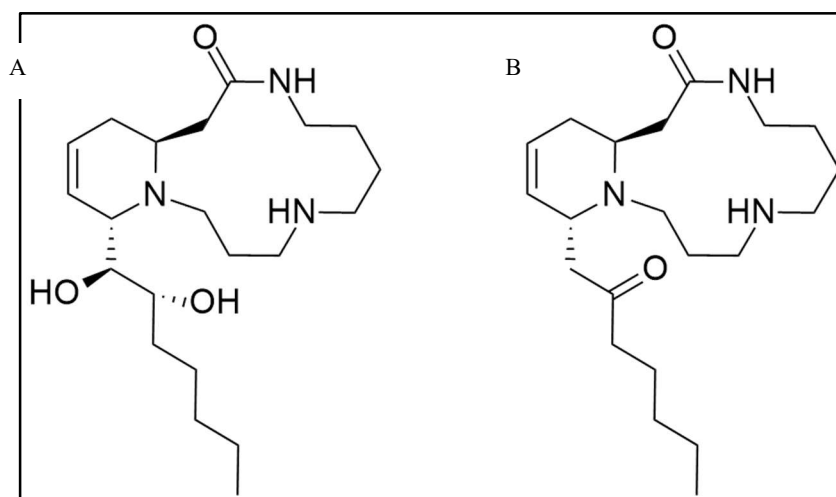
Legenda: Imagens de representações de fórmulas estruturais planas das moléculas. Os símbolos indicam os átomos constituintes e os traços representam as ligações covalentes simples ou múltiplas dispostas no plano bidimensional.

As canflavinas são eficazes na inibição da produção de moléculas pró-inflamatórias, como as prostaglandinas, através da sua interação com enzimas específicas. Sugere-se que as canflavinas também atuam na modulação do SEC, através da interação com receptores com ação na percepção da dor e na inflamação. É possível que essa interação esteja relacionada à regulação de diversos processos fisiológicos, tornando-as de grande interesse para potenciais aplicações terapêuticas (Bautista; Yu; Tian, 2021; Schanknecht *et al.*, 2023).

2.4.3 Alcaloides

Os alcaloides fazem parte de um grupo de metabólitos secundários encontrados em várias espécies de plantas, inclusive em *C. sativa* (Radwan *et al.*, 2021). Um número limitado de alcaloides foi isolado de *C. sativa*, dentre os quais se destacam: alcaloides espermidínicos, a canabisativina e a anidrocanabisativina (Figura 7), obtidas a partir das folhas e raízes da planta. Alcaloides indólicos, como a neoequinulina A e os dois estereoisômeros da dihidroxiisoequinulina A, também foram identificados em sementes de *C. sativa tipo fibra* (Duggan, 2021).

Figura 7 – Estruturas moleculares da canabisativina e da anidrocanabisativina. (A): canabisativina; (B): anidrocanabisativina.



Fonte: Elaborado por Júlio Sanches, 2024.

Legenda: Imagens de representações de fórmulas estruturais planas das moléculas. Os símbolos indicam os átomos constituintes e os traços representam as ligações covalentes simples ou múltiplas dispostas no plano bidimensional.

Os alcaloides de *C. sativa*, embora menos estudados em comparação com os canabinoides, destacam a complexidade da planta e o potencial para uma gama mais ampla de efeitos terapêuticos (Duggan, 2021; Arif *et al.*, 2023).

2.4.4 Terpenos Voláteis

Os terpenos são uma classe de metabólitos secundários que conferem à *C. sativa* seus aromas e sabores distintos, sendo obtidos a partir da extração do OE. Essas substâncias também podem ter propriedades terapêuticas e interagir com outros compostos presentes na planta. Os

terpenos mais comuns e mais estudados em diversas variedades de *C. sativa* são o β -mirceno, o limoneno, o α -pineno e o β -pineno (Masyita *et al.*, 2022).

2.5 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais (OE) são utilizados há séculos na medicina tradicional, na culinária, na perfumaria e na cosmética devido à particularidade de suas propriedades organolépticas (Ríos, 2016). São líquidos voláteis, de composição química complexa, obtidos através da hidrodestilação ou prensagem de uma planta aromática ou de suas partes específicas que contém as estruturas produtoras e armazenadoras de OE. No caso das frutas cítricas, a obtenção de OE se dá a partir das estruturas que estão presentes no seu epicarpo e é utilizado processo mecânico de prensagem a frio (temperatura ambiente). Na extração de OE por hidrodestilação, ao final do processo, a água em contato com a camada do OE é chamada de hidrolato, e costuma ser rica em componentes do OE dispersíveis em água (Aazza *et al.*, 2011; Conselho de Europa, 2010; ISO, 2013; Hamdi *et al.*, 2017; Tavares *et al.*, 2020).

Os metabólitos secundários que compõem o OE possuem as funções fisiológicas de resposta ao estresse ambiental, como defesa contra predação por herbívoros e patógenos, atração de polinizadores, entre outras (Roohinejad *et al.*, 2017).

2.5.1. Composição química dos óleos essenciais

Os OE são misturas complexas de compostos orgânicos voláteis, geralmente de baixo peso molecular. Ao se elevar a pressão de vapor suficientemente, porém mantendo a pressão atmosférica e a temperatura ambiente, os OE encontram-se no estado parcial de vapor, considerados portanto como “óleos voláteis” devido a essa característica. Os OE normalmente são compostos por 20 a 60 substâncias, eventualmente ultrapassando a quantidade de 100 componentes, com concentrações bastante distintas. Os marcadores químicos costumam ser geralmente duas ou três substâncias majoritárias e estão presentes em concentrações bastante elevadas que variam de 20 a 70 % da composição total, já os demais componentes costumam apresentar concentrações mais baixas (Bilia *et al.*, 2014; Dhifi *et al.*, 2016).

Os constituintes principais dos OE são monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanoides. Estes metabólitos secundários são classificados de acordo com a estrutura do esqueleto carbônico e via metabólica de origem. Os fenilpropanoides contém 9 átomos de carbono com núcleo básico fenilpropano (C₆C₃) e são originados pela via do chiquimato (Nieto, 2017; Jugreet *et al.*, 2020; Masyita *et al.*, 2022).

Os terpenos são biossintetizados por outras duas vias metabólicas - mevalonato ou metileritritol, sendo constituídos pela condensação de unidades isoprênicas (C5) - isopentenil difosfato e dimetilalil difosfato - e categorizados de acordo com o número dessas unidades. Os monoterpenos possuem duas unidades isoprênicas (C10) e os sesquiterpenos, três unidades isoprênicas (C15). Os diterpenos contêm 4 unidades isoprênicas (C20) e ocorrem raramente em OE (Dhifi *et al.*, 2016; Nieto, 2017; Jugreet *et al.*, 2020; Mabou; Yossa, 2021; Masyita *et al.*, 2022).

As propriedades organolépticas, consideradas únicas nas plantas aromáticas e também de cada variedade de *C. sativa*, possuem relação direta com a composição qualitativa e quantitativa de terpenos presentes nas estruturas secretoras, sendo assim, os principais responsáveis pelo aroma característico das plantas (Surendran *et al.*, 2021).

Os OE apresentam uma enorme variedade de compostos químicos, resultando em grande variedade de propriedades terapêuticas e usos distintos (Aumeeruddy-Elalfi *et al.*, 2018). Consequentemente, têm sido amplamente empregados por seus efeitos antimicrobianos, virucidas, inseticidas e antiparasitários, cosméticos, bem como para aplicações alimentícias. Muitos OE apresentam ações farmacológicas como antitumoral, antidiabética, antioxidante e no sistema cardiovascular (Bakkali; Averbeck; Averbeck; Idaomar, 2008).

2.5.2 Obtenção dos óleos essenciais

Para obtenção de OE, são empregados diferentes métodos de extração, de acordo com a característica dos componentes que serão obtidos, características da planta ou das partes da planta de onde o OE será extraído. Portanto, os diferentes sistemas extratores podem apresentar vantagens e desvantagens, de acordo com essas características (Simões *et al.*, 2016).

A preparação pós-colheita do material vegetal antecede a etapa de extração, sendo a secagem e a fragmentação processos comumente utilizados para a obtenção da droga vegetal (DV). A fragmentação pode ser realizada pulverizando ou rasurando a DV, visando aumentar a área de superfície de contato. Esse aumento favorece a eficiência na extração do óleo essencial (OE), ao facilitar o rompimento das estruturas secretoras onde o OE está contido, especialmente sob a ação do calor (Fiorini *et al.*, 2020).

A extração dos OE pode ser considerada uma prática fundamental na indústria de perfumaria e cosméticos, sendo empregada também na aromaterapia, produção de medicamentos, aromatização de alimentos, indústria domissanitária, dentre outras aplicações. Pode-se utilizar o OE ou os compostos voláteis e aromáticos no OE, que podem ser isolados em processos industriais mais sofisticados (Jugreet *et al.*, 2020).

Os dois métodos considerados mais tradicionais para extração de OE são a hidrodestilação e a destilação por arraste a vapor d'água. No primeiro, o material vegetal fica em contato com a água em ebulição; já no segundo, apenas o vapor d'água entra em contato com o material vegetal para extrair o OE. Em ambos os métodos, a destilação ocorre em um destilador próprio, conhecido como aparelho tipo Clevenger (Brasil, 2019), acoplado ao sistema extrator. Estes dois métodos são eficazes na obtenção de OE com alta qualidade, porém, é necessária uma grande quantidade de material vegetal, uma vez que o rendimento é baixo e o tempo de extração é prolongado, variando entre 180 e 240 min (Simões *et al.*, 2016; Ternelli *et al.*, 2020).

É possível realizar, também, a extração dos componentes do OE com solventes orgânicos, como *n*-hexano, éter etílico ou etanol. Neste caso, o produto obtido é um extrato contendo componentes do OE, além de outros metabólitos vegetais, e não o OE propriamente. Essa metodologia torna a extração eficiente na obtenção por esgotamento desses componentes, porém, os resíduos de solventes que podem ficar no produto final são considerados uma desvantagem. Sua utilização mais comum é em análises de laboratório, quando se deseja extrair a fração de terpenos voláteis de uma amostra vegetal ou derivado (Jiang; Kempinski; Chappell, 2016).

A extração de OE presente no epicarpo de frutos cítricos é realizada em um sistema de prensagem a frio, um método mecânico que não utiliza solventes nem aquecimento. Sua desvantagem é a obtenção de rendimentos menores em comparação com outros métodos (Di Giacomo; Di Giacomo 2002).

A indústria de extração de OE tem adotado a extração por CO₂ supercrítico, visto que essa metodologia é capaz de obter extratos de terpenos de alta pureza. Nesta técnica, o CO₂ é submetido a sistemas que envolvem pressões e temperaturas acima do ponto crítico, fazendo com que esse solvente fique no seu estado supercrítico, o qual é eficaz para as extrações seletivas de frações de terpenos presentes nos OE. É possível determinar parâmetros do CO₂ supercrítico para fracionar as categorias de substâncias presentes no extrato obtido, sendo uma técnica eficaz para obtenção e também na preservação dos terpenos presentes no OE e de suas propriedades. Essa técnica possui alto custo e necessita do equipamento específico (Pourmortazavi; Hajimirsadeghi, 2007; Yousefi *et al.*, 2019).

A extração de OE, através da técnica de hidrodestilação assistida por micro-ondas (MAHD), combina a hidrodestilação convencional e a aplicação de micro-ondas para acelerar o processo de extração dos compostos voláteis no material vegetal, sendo a técnica mais eficiente para extração de OE em larga escala (Micalizzi *et al.*, 2021). No sistema extrator

MAHD existem várias vantagens em relação à hidrodestilação convencional, sendo as principais: a redução do tempo de extração, o aumento na eficiência do processo, melhor qualidade do produto final obtido (devido a redução da formação de artefatos durante a extração) e o reaproveitamento do material vegetal para outras finalidades (extração de outras classes de metabólitos secundários), após a extração do OE (Drinić *et al.*, 2019; Radoiu *et al.*, 2020).

O sistema MAHD é configurado a partir de um equipamento de aquecimento de micro-ondas e um sistema de hidrodestilação tradicional ou aparelho tipo Clevenger (Brasil, 2019) acoplado na parte superior da câmara onde ocorre a irradiação das micro-ondas (detalhes da metodologia serão apresentados no item 2.6).

O material vegetal fragmentado é colocado em um balão de destilação de vidro borossilicato e completado com água até a metade de seu volume, então, é encaixado dentro da câmara interna do equipamento para que a água seja aquecida através da irradiação das micro-ondas. A água em ebulição é vaporizada, rompe as estruturas secretoras do material vegetal onde está o OE e promove o arraste dos compostos voláteis. Os vapores de água e do OE são conduzidos para um condensador que faz parte do aparelho tipo Clevenger (Brasil, 2019), onde ocorre o resfriamento e a condensação, retornando ao estado líquido (Lucchesi; Chemat; Smadja, 2004; Li; Fabiano-Tixier; Vian; Chemat, 2013).

No reservatório graduado onde os óleos essenciais condensam e onde é realizada a sua coleta, a separação ocorre por densidade, uma vez que os OE costumam ser menos densos que a água e, dessa maneira, permanecem como fase superior da camada aquosa, a qual é chamada de hidrolato, uma mistura de substâncias voláteis dispersas em água. Para coleta do OE no reservatório graduado, há uma torneira em “Y” ou “torneira de 3 vias”, onde é possível recolher OE separadamente do hidrolato, de forma cuidadosa (Kuzey, 2021).

O sistema MAHD evita, ao menos parcialmente, a degradação dos componentes voláteis e outros do material vegetal, devido ao menor tempo de exposição do material vegetal em contato com a água em ebulição, por se tratar de uma extração até 8 vezes mais rápida que a extração de OE por hidrodestilação convencional (Li; Fabiano-Tixier; Vian; Chemat, 2013).

As configurações dos parâmetros específicos para extração podem variar de acordo com o material vegetal, sua apresentação e, ainda, com os compostos de interesse, podendo ser otimizadas através de ajustes na potência do equipamento, quantidade de água, tempo de extração e temperatura do condensador. Pode, também, ser intensificada para cada tipo de aplicação, sendo comum a utilização de gradientes ou rampas de potência por períodos de tempo específicos (Fiorini *et al.*, 2020).

2.5.3 Composição química de óleos essenciais de *Cannabis sativa* L.

Na Tabela 1, são apresentados de forma comparativa os dados de todos os terpenos voláteis identificados em *C. sativa* em análises realizadas por quatro artigos. A identificação dos compostos foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-MS) e a quantificação, por cromatografia gasosa acoplada a detecção por ionização em chamas (CG-FID) nos OE extraídos de *C. sativa*. Infelizmente, houve grande dificuldade em obter dados de plantas do *tipo medicamento*, cuja extração do OE foi realizada por hidrodestilação. A Tabela 1 apresenta dados comparativos sobre composição do OE em *C. sativa*, e estudos com plantas do *tipo fibra*, assim como estudos com outros métodos de obtenção de componentes voláteis ou frações de terpenos do extrato, e não do material vegetal (utilizando extração por solventes seguida de separação líquido-líquido em funil de separação). Na coluna seis, estão presentes dados de terpenos voláteis identificados nas inflorescências de *C. sativa* do tipo fibra em OE obtido por MAHD, pelo autor Micalizzi *et al.* (2021). O autor Wanas *et al.* (2020) realizou as extrações por hidrodestilação em inflorescências secas das três quimiovariantes descritas por Small (1973): plantas “tipo CBD”, “tipo 1:1” e “tipo THC”. As diferenças na composição dos terpenos voláteis majoritários podem ser observadas visto que o metabolismo secundário das plantas é influenciado por fatores ambientais, genéticos e o manejo do cultivo, além do que, o processamento das plantas também pode influenciar na composição dessas substâncias no OE obtido (Montanari Jr *et al.*, 2016).

Tabela 1 - Composição do OE (%) das inflorescências de *C. sativa*. Os 3 componentes presentes em maiores quantidades em cada coluna foram grifados.

Componentes	Aizpurua-Olaizola, <i>et al.</i> (2016) ¹	Mansouri; Asrar (2012) ²	Wanas <i>et al.</i> (2020) - CBD	Wanas <i>et al.</i> (2020) - CBD : THC (1:1)	Wanas <i>et al.</i> (2020) - THC	Micalizzi <i>et al.</i> (2021) ³
<i>α</i> -pineno	0,0090 – 0,1900	0,0006	0,0400	0,0000	0,0600	0,0220
<i>α</i> -tujeno	-	-	0,0020	0,0020	0,0030	0,0240
canfeno	-	-	0,0010	0,0030	0,0020	0,0160
<i>β</i> -pineno	0,0140 - 0,1000	<u>0,0727</u>	0,0210	0,0750	0,0350	1,7020
<i>δ</i> -3-careno	-	-	-	-	0,0030	0,1040
<i>β</i> -mirceno	<u>0,0600 – 0,5500</u>	-	0,1710	<u>0,0980</u>	0,0690	1,6900
D-limoneno	<u>0,0330 – 0,3260</u>	0,0011	0,1700	<u>0,2710</u>	0,0190	1,1620
<i>β</i> -felandreno	-	-	0,0020	0,0020	0,0040	0,0640
(<i>Z</i>)- <i>β</i> -ocimeno	-	-	-	0,0010	-	0,3910
(<i>E</i>)- <i>β</i> -ocimeno	-	-	-	0,0070	0,0050	0,2460
<i>p</i> -cimeno	-	-	0,0060	0,0010	0,0060	0,3280
perileno	-	-	0,0200	-	-	-
<i>α,p</i> -dimetilestireno	-	-	0,0030	-	-	-
hidrato de <i>trans</i> -sabineno	-	-	0,0010	-	-	-
4,8-epoxiterpinoleno	-	-	0,0040	0,0010	-	-
linalol	0,0080 – 0,0360	-	0,0030	0,0090	0,0080	-
isociariofileno	0,0010	-	-	0,0020	-	-
(<i>E</i>)- <i>β</i> -bergamoteno	-	-	0,0090	0,0030	0,0070	-
<i>α</i> -guaieno	-	-	0,0230	0,0080	0,0370	0,0720
(<i>E</i>)-cariofileno	<u>0,1200 – 0,5600</u>	-	0,0620	<u>0,0900</u>	0,2700	23,6880
<i>α</i> -terpineol	-	-	0,0080	0,0090	0,0030	-
<i>trans-β</i> -bergamoteno	-	-	0,0090	0,0030	0,0070	-
<i>α</i> -guaieno	-	-	0,0230	0,0080	0,0370	0,0720
<i>γ</i> -elemeno	-	-	-	0,0010	0,0020	0,0630
aloaromadendreno	-	-	0,0020	-	-	-
(<i>Z</i>)- <i>β</i> -farneseno	-	-	0,0040	0,0040	0,0070	-
<i>trans</i> -pinocarveol	-	-	-	-	-	-
<i>δ</i> -guaieno (=α-bulneseno)	-	-	0,0460	0,0160	0,0820	0,1280
valenceno	-	-	-	0,0400	-	0,4980
<i>β</i> -bisboleno	-	-	0,0100	-	0,0700	-
isoeremopfileno	-	-	0,0040	0,0030	0,0080	-
carvone	-	-	-	0,0010	-	-
biciclogermacreno	-	-	-	0,0020	0,0020	-
(<i>E,E</i>)-α-farneseno	-	-	0,0030	-	0,0040	-
<i>δ</i> -cadineno	-	-	0,0010	0,0010	0,0020	0,1190
<i>γ</i> -cadineno	-	-	0,0010	-	0,0020	-
7- <i>epi-α</i> -Selineno	-	-	-	0,0020	-	-
(<i>E</i>)-α-bisboleno	-	-	0,0010	0,0030	0,0060	0,0000

Componentes	Aizpurua-Olaizola, <i>et al.</i> , 2016 ¹	Mansouri; Asrar, 2012 ²	Wanas <i>et al.</i> , 2020 - CBD	Wanas <i>et al.</i> , 2020 - CBD : THC (1:1)	Wanas <i>et al.</i> , 2020 - THC	Micalizzi <i>et al.</i> , 2021
mirtenol	-	-	-	0,0010	-	-
2,6-dimetil-3(E),5(E),7 octatrieno-2-ol	-	-	0,0020	0,0010	0,0020	-
trans-carveol	-	-	0,0010	0,0010	-	-
germacreno-B	-	-	0,0040	0,0050	0,0270	-
p-cimen-8-ol	-	-	0,0025	0,0020	0,0160	-
cis-carveol	-	-	0,0020	0,0010	-	-
óxido de isocariofileno	-	-	0,0180	0,0070	0,0050	-
selina-4,11-dieno	-	-	0,0020	0,0010	0,0030	0,1090
γ-muuroleno	-	-	-	0,0100	0,0400	0,0440
α-humuleno	0,0036 – 0,0190	<u>0,0025</u>	0,0290	0,0380	<u>0,0610</u>	<u>7,8880</u>
óxido de cariofileno	-	0,0001	<u>0,1030</u>	0,0500	0,0390	-
β-ocimeno	0,0090 – 0,0150	-	-	-	-	-
terpinoleno	0,0005 – 0,0150	-	0,0270	-	-	0,3290
aloaromandreno	0,0008	-	0,0010	-	-	-
β-selineno	0,0015 - 0,0021	0,0004	0,0150	0,0130	0,0200	<u>2,2040</u>
γ-selineno	0,0008 - 0,0051	-	-	-	-	-
α-bisaboleno	0,0015 - 0,0059	-	-	-	-	-
β-bisaboleno	0,0011 - 0,0031	<u>0,0025</u>	-	-	-	0,2520
β-curcumeno	0,0006 - 0,0028	-	-	-	-	-
β-sesquifelandreno	0,0008 - 0,0033	0,0006	-	-	-	0,0560
α-gurjuneno	0,0016 - 0,0040	-	-	-	-	0,0730
selina-3,7(11)dieno	0,0051 – 0,0120	-	<u>0,0370</u>	-	<u>0,1320</u>	1,4210
γ-elemeneno	0,0033 – 0,0124	-	0,0100	0,0100	0,0200	0,0630
guaiol	0,0012 – 0,0121	0,0014	-	-	0,0300	-
γ-eudesmol	0,0019 – 0,0103	-	-	-	-	-
β-eudesmol	0,0065 – 0,0101	0,0024	-	-	0,0300	-
α-selineno	0,0046 – 0,0136	-	0,0100	0,0070	0,0200	1,5550
bulnesol	0,0010 - 0,0016	<u>0,0040</u>	-	-	-	-
α-bisabolol	0,0006 - 0,0087	0,0002	<u>0,0350</u>	0,0600	<u>0,1600</u>	-
metil eugenol	-	-	0,0020	0,0020	0,0020	-
epóxido de humuleno-I	-	-	0,0020	0,0010	-	-
(E)-nerolidol	-	-	0,0070	0,0050	0,0030	-
epóxido de humuleno-II	-	-	0,0300	0,0160	0,0080	-
epóxido de humuleno-III	-	-	0,0190	0,0010	0,0020	-
porosadienol	-	-	0,0050	0,0040	0,0040	-
(=cariofiladienol II)	-	-	0,0020	0,0020	-	-
cariofila-2(12),6-dien-5α-ol (=Cariofilenol I)	-	-	-	0,0020	-	-
cariofila-2(12),6-dien-5β-ol (=cariofilenol II)	-	-	0,0040	0,0020	0,0020	-

Componentes	Aizpurua-Olaizola, <i>et al.</i> , 2016 ¹	Mansouri; Asrar, 2012 ²	Wanas <i>et al.</i> , 2020 - CBD	Wanas <i>et al.</i> , 2020 - CBD : THC (1:1)	Wanas <i>et al.</i> , 2020 - THC	Micalizzi <i>et al.</i> , 2021
hashisheno	-	-	-	-	-	0,2210
thuja-2,4(10)-dieno	-	-	-	-	-	7,3310
α -fencheno	-	-	-	-	-	0,2460
α -terpineno	-	-	-	-	-	0,0840
γ -terpineno	-	-	-	-	-	0,1060
<i>p</i> -cimeneno	-	-	-	-	-	0,1660
cogeiijereno	-	-	-	-	-	0,0170
α -ylangeno	-	-	-	-	-	0,2830
α -copaeno	-	-	-	-	-	0,0710
7-epi-sesquitujeno	-	-	-	-	-	0,0120
sativeno	-	-	-	-	-	0,0860
α -funebreno	-	-	-	-	-	0,0340
(<i>Z</i>)-cariofileno	-	-	-	-	-	0,5370
α -,(<i>Z</i>)-bergamoteno	-	-	-	-	-	0,2380
α -,(<i>E</i>)-bergamoteno	-	-	-	-	-	1,4020
guaia-6,9-dieno	-	-	-	-	-	0,2420
9-epi-(<i>E</i>)-cariofileno	-	-	-	-	-	1,0220
β -acoradieno	-	-	-	-	-	0,0310
drima-7,9(11)-dieno	-	-	-	-	-	0,0920
α -neocalitropseno	-	-	-	-	-	0,1510
γ -curcumeno	-	-	-	-	-	0,4960
eremofileno	-	-	-	-	-	0,8440
(<i>Z</i>)- γ -bisaboleno	-	-	-	-	-	0,1040
β -sesquipelandreno	-	-	-	-	-	0,0560
selina-4(15),7(11)-dieno	-	-	-	-	-	1,8090
(<i>E</i>)-, β -farneseno	-	-	-	-	-	0,9570
ϵ -amorfenno	-	-	-	-	-	0,0680

¹ Dados obtidos das análises das inflorescências colhidas aos 179 dias

² Dados obtidos de frações de terpenos e/ou componentes voláteis do extrato, e não por hidrodestilação do material vegetal.

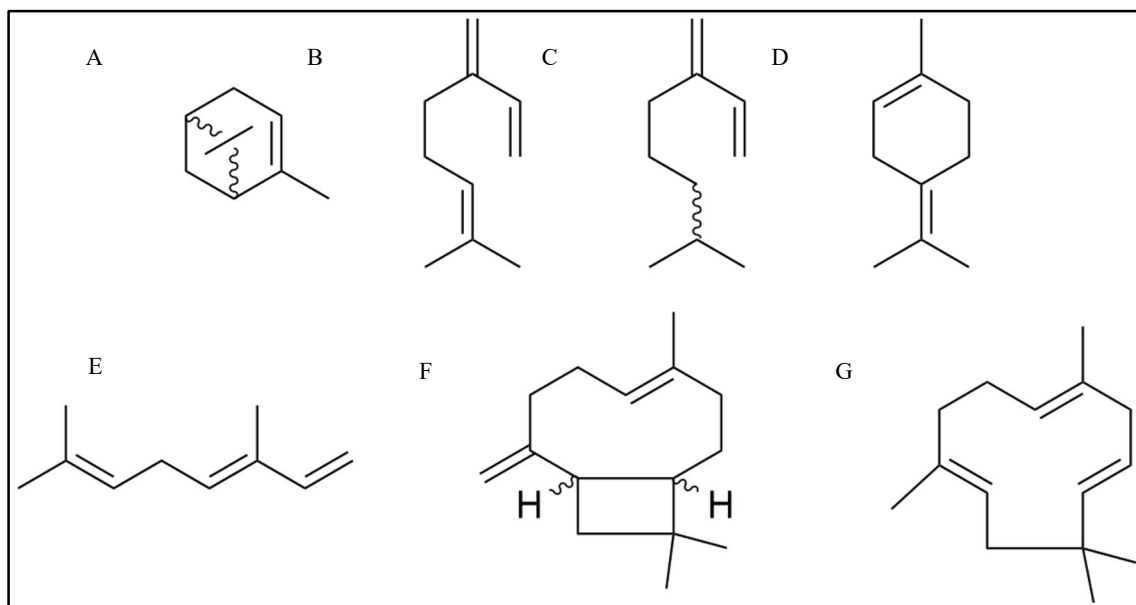
³ Dados obtidos de extração por MAHD de plantas do tipo fibra.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2024)

Os terpenos com valores mínimos de 0,0600 % identificados por Wanas *et al.* (2020), em amostras de OE obtidos por hidrodestilação de plantas da quimiovariante I (tipo THC) foram: β -mirceno (0,069 %); (*E*)-cariofileno (0,270 %); α -pineno (0,060 %); *trans*-pinocarveol (0,082 %); β -bisboleno (0,070 %); α -humuleno (0,061 %); selina-3,7(11)dieno (0,132 %); e α -bisabolol (0,160 %).

A Figura 8 apresenta os principais componentes do OE das inflorescências de *C. sativa* de acordo a literatura científica consultada (Mansouri; Asrar, 2012; AHP,2014; Sexton *et al.*, 2018; Aizpurua-Olaizola *et al.*, 2016; Ibrahim *et al.*, 2019; Mudge *et al.*, 2019;)

Figura 8 – Principais componentes do OE das inflorescências de *C. sativa*.(A) α -pineno, (B) β -mirceno, (C) D-limoneno, (D) terpinoleno, (E) *cis*-ocimeno, (F) (*E*)-cariofileno, (G) α -humuleno. Fonte: Adaptado de Ibrahim *et al.* (2019).



Fonte: Elaborado por Júlio Sanches, 2024.

Legenda: Imagens de representações de fórmulas estruturais planas das moléculas. Os símbolos indicam os átomos constituintes e os traços representam as ligações covalentes simples ou múltiplas dispostas no plano bidimensional.

2.6 APLICAÇÕES DO EQUIPAMENTO DE MICRO-ONDAS NA CADEIA PRODUTIVA DA *Cannabis sativa* L. DO TIPO MEDICAMENTO

A secagem, a descarboxilação e a extração do OE das inflorescências de *C. sativa* pela técnica de hidrodestilação assistida por micro-ondas (MAHD) apresentam-se como uma utilização eficiente da tecnologia do micro-ondas, tanto pela abordagem verde e dentro dos princípios da sustentabilidade, como também pela rapidez nos processos prévios às extrações (secagem e descarboxilação). A eficácia da tecnologia também é destaque na obtenção dos compostos aromáticos e dos óleos essenciais sem riscos de que o produto obtido contenha resíduos químicos de solventes orgânicos (Mazzara *et al.*, 2022; Binello *et al.*, 2023). A Figura 9 apresenta o equipamento de micro-ondas Ethos X da marca Milestone®.

Figura 9 – Sistema micro-ondas Ethos X Milestone® acoplado ao sistema de hidrodestilação.



Fonte: Milestone, 2023

Legenda: Foto equipamento de microondas com sistema de destilação acoplado. O recipiente interno está preenchido com material vegetal.

2.7 MÉTODOS DE ANÁLISE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Os métodos analíticos de CG-MS e CG-FID são as duas técnicas mais utilizadas na análise da composição química de OE. Através dessas técnicas, é possível realizar a identificação dos componentes dos OE e a determinação dos respectivos teores, sendo muito utilizadas em ensaios de controle de qualidade, desenvolvimento de produtos e estudos da composição química dos OE (Adams, 2017).

2.7.1 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS)

O CG-MS realiza a separação e a identificação de cada componente presente na mistura complexa de substâncias presentes no OE. Esta técnica de instrumentação analítica utiliza, de

forma combinada, os recursos de separação por cromatografia gasosa com os recursos da detecção e identificação da espectrometria de massas (Adams, 2017).

Por se tratar de uma mistura de substâncias de baixa polaridade, as amostras de OE são diluídas em *n*-hexano ou outro solvente apolar que seja compatível com a vaporização que ocorre para que a amostra seja introduzida na coluna do CG. A Farmacopeia Estadunidense (USP-NF, 2023) descreve as colunas de composição 95 % dimetil e 5 % difenil polissiloxano - fase USP G27 - para serem utilizadas para interação (retenção) com substâncias não polares, sendo as colunas mais indicadas para a análise de óleos essenciais.

Os componentes da mistura são separados com base em sua volatilidade e diferentes afinidades pela fase estacionária na coluna. Compostos com pontos de ebulição mais baixos percorrem a coluna mais rapidamente do que os compostos com pontos de ebulição mais altos. Os terpenos presentes nas amostras podem ser identificados a partir da comparação dos seus tempos de retenção (t_R), dos dados espectrais e de análises de padrões de referência. O uso de índices de retenção obtidos a partir da coinjeção do OE com padrões de hidrocarbonetos (ex. C10-C40) também é usual na identificação dos componentes do OE (Ibrahim *et al.*, 2019).

Após a eluição na coluna de CG, os componentes separados seguem para a detecção no espectrômetro de massas, que fragmenta e ioniza esses compostos, produzindo espectros de massa que atuam como uma “impressão digital”. Dessa forma, é possível realizar a identificação de cada um desses compostos com base nas relações massa-carga (m/z) e do padrão de fragmentação observados e através da avaliação da similaridade dos espectros de massa obtidos de cada componente separado da amostra com os dados presentes em bancos de dados que contém os espectros de massa de compostos conhecidos (Sadgrove; Padilla-González; Phumthum, 2022).

A quantificação dos componentes do OE por CG-MS deve ser realizada empregando padrões e obtendo curvas analíticas (métodos do padrão externo ou interno). No cromatograma gerado, pode-se medir as áreas dos picos e utilizá-las para calcular a concentração de cada composto no OE (Adams, 2017).

2.7.2 Cromatografia gasosa acoplada a detecção de ionização de chamas (CG-FID)

Outro detector amplamente utilizado na cromatografia gasosa é o FID, que é bastante eficiente para analisar hidrocarbonetos e compostos orgânicos voláteis. A detecção por FID é mais sensível, por isso mais confiável, e após a análise as amostras são destruídas. Após passar pela separação na coluna de CG, os compostos separados da amostra são introduzidos no detector de ionização de chamas - FID, onde são queimados em uma chama de hidrogênio-ar,

produzindo íons e elétrons. A detecção ocorre pela atração desses íons e elétrons que foram gerados para um detector, onde é produzida uma corrente elétrica. A medição da magnitude desta corrente é utilizada para calcular a concentração dos compostos na amostra, sendo a relação entre elas diretamente proporcional. A detecção por FID é altamente sensível para compostos que contêm átomos de carbono e hidrogênio, sendo, portanto, um método instrumental bastante adequado para detectar muitos compostos presentes nos OE (Micalizzi *et al.*, 2021).

Para análise de OE, considera-se CG-MS e CG-FID como ferramentas complementares, sendo o CG-MS excelente para identificação dos componentes individuais; já o CG-FID fornece dados quantitativos confiáveis com base no método de normalização de áreas, além do uso de padrões e curvas analíticas (Micalizzi *et al.*, 2021).

2.8 UTILIZAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Cannabis sativa* L. PELA INDÚSTRIA

Óleos essenciais e extratos vegetais têm sido continuamente utilizados como fonte de moléculas bioativas. O mercado consumidor tem aumentado a demanda por produtos naturais e mais seguros durante os últimos anos; as aplicações destes compostos derivados de plantas, atualmente, estão presentes em diversos setores econômicos: alimentar, agrícola, farmacêutico, cosmético, produtos de higiene, entre outros (Jugreet *et al.*, 2020). Dessa forma, as indústrias têm acompanhado essa demanda dos consumidores por produtos naturais e desenvolvido novas tecnologias que possibilitem melhor solubilidade e estabilidade desses compostos em diferentes aplicações industriais. Um campo de pesquisa recente é a incorporação de OE de *C. sativa* em tecnologias de nanoemulsões, que atendem a essas finalidades (Fei *et al.*, 2023).

Os derivados de *C. sativa* (óleo de cannabis, canabinoides, OE, proteínas e óleo de sementes) têm sido utilizados em alimentos e suplementos alimentares. Esses usos estão relacionados a um mercado em expansão e com potencial muito promissor a ser explorado, sendo que, desses derivados, o OE e misturas de terpenos isolados são encontrados atualmente em balas, pirulitos, caramelos, chocolates, sorvetes, salgados, bebidas como cervejas e licores, entre outros (Brutlag *et al.*, 2018). O portal online do editorial Folha de Pernambuco (2023) noticiou sobre cervejarias brasileiras que fazem a adição de misturas de terpenos obtidos de outras fontes vegetais que imitam algumas características dos aromas de *C. sativa*.

O aroma das inflorescências de *C. sativa* fornece características de sabor e qualidade únicas nos produtos, assim como o lúpulo (*Humulus lupulus* L.) que é da mesma família botânica (Cannabaceae) confere aromas únicos à cerveja (Russo, 2011).

O potencial do OE de *C. sativa* como aromatizante de bebidas apresentou potencial viabilidade em um estudo com duas cultivares de *C. sativa* (Ascrizzi *et al.*, 2020). O mercado que explora os aromas de *C. sativa* ainda é restrito; diversos produtos têm sido lançados no Brasil, porém, ainda utilizam misturas de terpenos de outras fontes, simulando o OE característico de *C. sativa*. Os terpenos majoritários que compõem o OE e o aroma de *C. sativa* também são substâncias majoritárias presentes no OE de outras plantas, as quais possuem cadeia produtiva de extração já estabelecida, contando, inclusive, com o isolamento desses compostos, que estão disponíveis no mercado de forma mais acessível do que os terpenos obtidos de *C. sativa*. Alguns produtores brasileiros de cerveja artesanal, que já praticam a saborização com OE de *C. sativa*, precisam realizar pausas na produção nos períodos sazonais em que há dificuldade na obtenção de terpenos no mercado nacional, segundo matéria da plataforma SECHAT (SCHAT, 2023).

Existem, também, produtos alimentícios em que os extratos (ou mesmo os canabinoides - THC e CBD) são adicionados, produzindo efeitos terapêuticos e/ou psicoativos. Para produzir esses produtos, é importante a utilização do OE ou misturas de terpenos para saborizar e amenizar o gosto amargo dos canabinoides e, em alguns casos, da clorofila. O EE, ou óleo *full spectrum*, costuma ter quantidades significativas de clorofila, já que ela é uma substância extraída de forma eficiente pelo etanol. O gosto amargo e característico conferido por essa substância dificulta a utilização do EE de *C. sativa* em alimentos como chocolates, por prejudicar a palatabilidade. Nessa situação, assim como em outros produtos, o uso dos terpenos é fundamental para atenuar esse gosto ou torná-lo quase imperceptível (Beal, 2019).

Essas misturas só são permitidas em países ou jurisdições onde a legislação contempla o uso adulto de *C. sativa* e não apenas o uso medicinal. Mesmo o uso alimentício dessas substâncias sendo permitido, existe regulação específica quanto aos teores de CBD e THC. Nos EUA, essa composição mista dos produtos de *C. sativa* é classificada como “suplementos alimentares” ou “produtos de bem-estar e saúde” (FDA, 2023) e na União Europeia recebem a classificação de “novo alimento” (EFSA, 2022).

Os desafios para o desenvolvimento da incorporação de derivados de *C. sativa* em alimentos carecem de pesquisas sobre como melhorar a solubilidade e biocompatibilidade com os demais componentes alimentares. A estabilidade e a bioacessibilidade dos terpenos nos diferentes produtos alimentícios ainda precisam ser objeto de novas pesquisas para que seja possível determinar a viabilidade do uso dos derivados de *C. sativa* como ingredientes funcionais dos alimentos industrializados. Essas condições vão permitir o aumento do prazo de

validade dos alimentos contendo terpenos, para que assim, sua adição em vários produtos alimentícios possa ser bem-sucedida (Hanuš; Hod, 2020; Chen; Pan, 2021).

Os efeitos antibacteriano e antifúngico que os terpenos presentes no OE de *C. sativa* apresentam, demonstram um grande potencial da sua aplicação como conservantes naturais em produtos alimentícios industrializados (Rothschild *et al.*, 2005; Blake *et al.*, 2019). Para este fim, foi testada a tecnologia da nanoencapsulação em um estudo que analisou as características físico-químicas e a ação antioxidante dessas nanocápsulas de OE de *C. sativa*, apresentando resultados para que este novo produto possa ser utilizado como aditivo e/ou conservante alimentar (Hadidi; Rostamabadi; Moreno; Jafari 2022).

A cadeia produtiva de extração de OE apresenta um cenário promissor, com possibilidades econômicas de expansão também nos setores da indústria de cosméticos e perfumes (Sharmeen *et al.*, 2021). Recentemente, observou-se o aumento pela procura por produtos naturais, devido a tendência do mercado consumidor em relação a preocupações com a saúde. Esse cenário ampliou o uso de extratos, OE e óleos fixos (triglicérides) em substituição aos derivados sintéticos que são considerados perigosos para a saúde humana. Nesse sentido, os OE têm sido procurados, uma vez que já são a principal fonte de aromas utilizada pela indústria de cosméticos. No entanto, derivados vegetais de *C. sativa*, como o OE, começaram a ser utilizados por esse segmento recentemente, acompanhando o crescimento da popularidade do uso de outros OE, que também são considerados menos empregados pela indústria de cosméticos. Eles são utilizados como fragrância e componentes ativos, já que apresentam uma ampla gama de aromas únicos e agradáveis de forma muito eficaz para incorporação em produtos cosméticos e ainda podem atuar como agentes bioativos (ex. efeitos antienvhecimento, antimicrobiano, protetor solar e clareador), o que os torna ingredientes de grande valor em produtos cosméticos (Mnekin *et al.*, 2021; Sharmeen *et al.*, 2021).

A produção do óleo-resina (contendo, principalmente, terpenos voláteis e canabinoides) por *C. sativa* está evolutivamente relacionada a um sistema de defesa natural contra insetos fitófagos, dentre outras funções ecológicas e fisiológicas. Esta função de defesa natural por repelência serviu como hipótese para diversos estudos que demonstraram essas propriedades inseticidas e repelentes do OE de *C. sativa* (Potter, 2009). O OE de *C. sativa* apresenta grande potencial de aplicação na agricultura como biopesticida ecológico e uma das principais vantagens é a sua baixa toxicidade para organismos não-alvo, como a joaninha (*Coccinellidae*) que atua como predador de pragas e também outros organismos benéficos ao sistema de cultivo, como pequenos invertebrados que promovem a fertilidade do solo como a minhoca (*Lumbricidae*), além da baixa toxicidade em humanos. Os biopesticidas fazem parte de ações

do Manejo Integrado de Pragas (MIP) e dialogam com a agricultura sustentável e agroecológica, portanto, o desenvolvimento de novos produtos é fundamental para contribuir com a produção saudável de alimentos (Pavela; Benelli, 2016; Benelli *et al.*, 2018).

No segmento de produtos para tabacaria e a crescente utilização de dispositivos conhecidos como “cigarros eletrônicos” e vaporizadores ou “vapes”, os derivados de *C. sativa*, incluindo o OE, são adicionados nesses dispositivos pelos usuários adultos, proporcionando uma experiência sensorial mais apurada durante a vaporização ou combustão de *C. sativa* ou outras misturas de plantas (Meehan-Atrash; Rahman, 2021).

Todas essas características dos OE fazem com que o interesse pela sua utilização aconteça em diversos segmentos, reforçando o grande potencial de áreas que podem explorar a utilização do OE de *C. sativa* (Milhem *et al.*, 2021).

2.9 TOXICOLOGIA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Cannabis sativa* L.

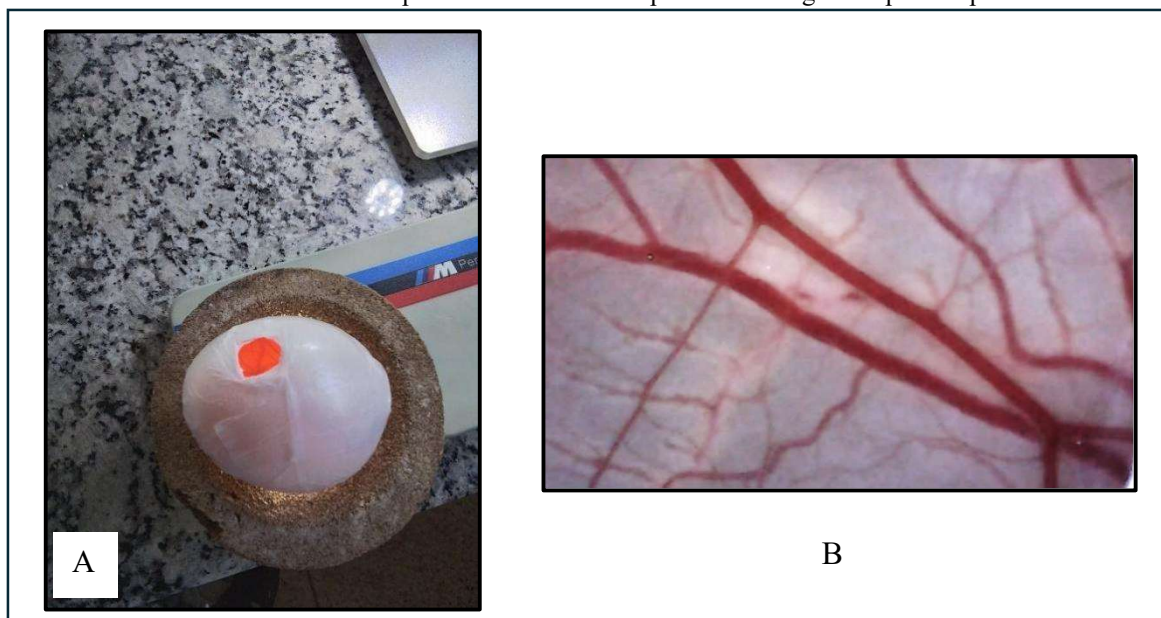
2.9.1 Exemplo de modelo alternativo de avaliação toxicológica de óleos essenciais de *Cannabis sativa* L.

O uso de modelos animais em ensaios farmacológicos ou toxicológicos têm recebido críticas devido à dor e sofrimento que costumam ser causados, apesar dos esforços em estabelecer protocolos de bem-estar animal que têm sido adotados nas últimas décadas. Ensaios alternativos como o “*Hen’s Egg Test – Chorioallantoic Membrane*” (HET-CAM) visam reduzir o número de animais utilizados nesses estudos, ou ainda, em alguns casos, fornecem dados suficientes para eliminar por completo a necessidade da execução desses estudos em modelos animais convencionais como camundongos, ratos e coelhos, seguindo o princípio dos 3 R’s (Redução, Substituição e Refinamento) (Löffler *et al.*, 2021). Esses testes oferecem, também, objetividade e padronização dos dados, levando em consideração os resultados subjetivos utilizando métodos que envolvem animais (Cazedey *et al.*, 2009).

O ensaio da membrana corioalantóica em ovos de galinha (*Gallus gallus domesticus*) - HET-CAM - é uma metodologia alternativa à utilização de modelos animais validados e que possibilita a avaliação do potencial de irritação causada por substâncias químicas. É um modelo biológico capaz de simular a fisiologia do olho humano, devido à grande vascularização do embrião no estágio de desenvolvimento utilizado no ensaio (9 dias após a fecundação), além de outras características (Vieira *et al.*, 2021). Este ensaio pode ser considerado um intermediário entre os testes *in vitro* e *in vivo*, já que se dá através da aplicação da amostra que será analisada em uma região vascularizada do ovo (Figura 10). Na imagem, podem ser avaliadas algumas

características da irritação como a hemorragia, a lise vascular e a coagulação (Samimi; Mahboobian; Mohammadi, 2021; Vinardell; Mitjans, 2006).

Figura 10 – Imagem ilustrativa de ovo de galinha embrionado utilizado no ensaio HET-CAM. (A) - Ovo de galinha com embrião no 9º dia do desenvolvimento. (B) – Detalhe da região vascularizada do ovo de galinha embrionado observada a partir de um estereoscópio. Fonte: Registrado por Felipe Haddad.



Fonte: Registrado por Felipe Haddad.

Legenda: À esquerda há uma foto de um ovo de galinha com um orifício aberto que permite visualização do embrião no seu interior, e à direita há uma foto aproximada do embrião onde é possível visualizar a vascularização.

A metodologia HET-CAM é uma alternativa ao “teste de Draize”, onde as amostras são aplicadas na pele e olhos de coelhos, sendo possível avaliar a irritação e, dessa forma, utilizar o estudo como potencial no desenvolvimento de medicamentos e produtos cosméticos (Vinardell; Mitjans, 2006).

Segmentos da indústria farmacêutica e estética já utilizam a metodologia HET-CAM em testes no desenvolvimento de produtos como shampoos e cremes faciais, testes de avaliação de atividade anti-inflamatória, antiangiogênica, antitumoral e efeitos teratogênicos nos estudos para descoberta de novos fármacos e medicamentos (Krenn; Paper, 2009; Derouiche; Abdennour, 2017; Öztür; Victorelli *et al.*, 2020; Mussagy *et al.*, 2023). Na indústria de alimentos, também há uma recente preocupação pela substituição gradativa dos testes em modelos animais por métodos alternativos para estudar efeitos de saúde adversos em humanos (Sandner *et al.*, 2021).

A substituição de modelos animais por modelos biológicos alternativos vai além das preocupações éticas, sua praticidade e eficiência apresentam-se como uma estratégia viável, já que existem muitas substâncias disponíveis, as quais precisam ser testadas como aditivos

alimentícios e/ou materiais de embalagens, para elaboração de novos produtos. Testes como ensaios em culturas de células 2D em combinação com modelagem *in silico* têm sido realizados para estudos iniciais de avaliação toxicológica, porém, esses modelos não são capazes de fornecer resultados das atividades metabólicas, já os métodos alternativos atuam de maneira intermediária entre os ensaios de cultura celular e ensaios pré-clínicos (Sandner *et al.*, 2021).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do estado de fragmentação da droga vegetal e do tempo de hidrodestilação no teor, na composição química e na toxicidade do OE das inflorescências de *C. sativa* (planta tipo medicamento, quimiovariante I). Avaliar ainda a viabilidade de utilização da biomassa residual das inflorescências (após extração do OE) para produção de extratos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Determinar o tempo de extração no sistema de hidrodestilação que proporciona maior rendimento de OE na variedade de *C. sativa* utilizada, empregando a droga vegetal rasurada;

b) Avaliar o teor de OE obtido nas extrações por hidrodestilação do material vegetal realizadas nas variações de parâmetros: fragmentação e tempo de extração; dos experimentos DV rasurada 2 h, DV rasurada 3 h, DV rasurada 4 h e DV moída 4 h;

c) Identificar os principais terpenos presentes nos OE obtidos nas extrações por hidrodestilação realizadas nas variações de parâmetros: fragmentação e tempo de extração; dos experimentos DV rasurada 2 h, DV rasurada 3 h, DV rasurada 4 h e DV moída 4 h;

d) Avaliar a toxicidade das amostras contendo OE na observação do desenvolvimento embrionário da linhagem de galinhas Leghorn (*Gallus gallus domesticus*) através da metodologia com modelos biológicos alternativos - ensaio da membrana corioalantóica em ovos de galinha – HETCAM, avaliando os OE obtidos nas extrações por hidrodestilação realizadas nas variações de parâmetros: fragmentação e tempo de extração; dos experimentos DV rasurada 2 h, DV rasurada 3 h, DV rasurada 4 h e DV moída 4 h;

e) Avaliar e comparar a composição química da DV e do extrato da biomassa residual das inflorescências utilizadas nos experimentos com as variações de parâmetros realizadas na extração do OE: fragmentação e tempo de extração; amostras DV rasurada 2 h, DV rasurada 3 h, DV rasurada 4 h e DV moída 4 h;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados na Associação Terapêutica Cannabis Medicinal Flor da Vida (Franca-SP, Brasil) com a qual a Unesp, por meio da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara, possui um Convênio de Cooperação Científica (n. 2100.0947 publicado em DOU Poder Executivo - Seção I sexta-feira, 17 de março de 2023) e Emenda Parlamentar nº 2024.272.56811 de apoio técnico aprovada pela Frente Parlamentar da Cannabis Medicinal e Cânhamo Industrial da Assembleia Legislativa de São Paulo em 2023. A ONG Flor da Vida desenvolve suas atividades sob autorização judicial e seu estatuto prevê a parceria com instituições de pesquisa para a realização de pesquisas, conforme preconiza o seu estatuto social em seu artigo 3º § IV - “Celebrar convênios e parcerias com entidades públicas e privadas, nacionais ou estrangeiras, visando o uso medicinal da cannabis; e XVIII - Desenvolver estudos e/ou pesquisas com a finalidade de por em prática os itens acima relacionados”.

4.1 MATERIAL E EQUIPAMENTOS

Aparelho tipo “Clevenger”: Clevenger Farmacopeico (Brasil, 2019)

Balança analítica: Marte®, modelo AY220 (Max 220 g. min 0,01 g; d = 0,0001 g). Marte®, modelo AUW220D (Max 220 g/ 82 g; d = 0,1 mg/ 0,01 mg).

Balança medidora de umidade por infravermelho: Analisador de umidade marca Gehaka, modelo IV 2500

Cartucho para EFS: Strata® C18-E (55 µm, 70 Å). 500 mg / 6 mL

Coluna cromatográfica para CLAE: NST® (C18, 250 x 4,6 mm, 5 µm)

Coluna de guarda cromatográfica para CLAE: Phenomex® KJ0-4282 44

Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência 2: Waters® CLAE 600 Controller; desgaseificador DG2, Controladora 600 Controller, controladora de temperatura e forno TCM, Detector UV 2487.

Cromatoplaca sílica gel: ALUGRAM® (Macherey-Nagel) XTRa SIL g/UV254 0,2 mm sílica gel 60

Estufa de secagem: Odontobras DG Line E1.1

Filtro para seringa: Exacta® nylon porosidade 0,22 µm diâmetro 13 mm

Liofilizador: Modelo Alpha 2-4 LD Plus, Marca Martin Christ

Manta de aquecimento para balão de 5L: Marca Fisatom, modelo 652, Potência – 600 W

Micropepitadores: 10-100 µL Agipette®, 100-1000 µL Agipette® 0,5-10 µL Rongtai®

Moinho analítico: IKA® A11 BasicS32

Tamis: Granutest ABNT 18 (1,00 mm)

Ultrassom: SolidSteel® SSBuc 10L 40 Khz; WLKS® WK-968 42 Khz

Solventes e reagentes:

Aditivos da fase móvel: ácido acético P.A Impex®

Água deionizada: GEHAKA®, obtida em sistema purificador de água, modelo DG 300.

Água ultrapura: Merck Millipore®, obtida em modelo Direct® – Q 3 UV.

Padrões analíticos: Cayman Chemical® ácido canabidiólico (CBDA), canabidiol (CBD), canabinol (CBN), Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC); Supelco® ácido Δ^9 -tetrahydrocannabinólico A (THCA-A); Agilent® canabigerol (CBG); Toronto Research Group® canflavina B

Reagentes: ácido sulfúrico Synth®, vanilina 99,5 % Vetec®

Solvente grau cromatográfico: acetonitrila, ácido fórmico Sigma-Aldrich®,

Solventes grau P.A.: etanol, hexano, metanol, Êxodo Científica®; heptano Dinâmica®; acetato de etila Proc9®, xileno Synth®

Tensoativo: Tween 80 Synth®

4.2 OBTENÇÃO E PREPARO DO MATERIAL VEGETAL

As inflorescências secas de *C. sativa* que foram utilizadas são da variedade comercial chamada “Blue Dream”, sementes obtidas da empresa britânica Seedsman, uma planta do *tipo medicamento*, da quimiovariante I (potencial de THC: 16 - 24 % e potencial de CBD < 1 %). O cultivo foi realizado a partir de clones obtidos pelo método de estaquia, com estacas retiradas de plantas matriz, pela Associação Terapêutica Cannabis Medicinal Flor da Vida (Franca-SP, Brasil), localizada nas coordenadas 20°29’38,3 S e 47°23’51,6 W, e a colheita foi realizada no dia 09 de fevereiro de 2024. As inflorescências foram “aparadas” (*trimming*) para remoção dos terços finais das brácteas (parte sem a presença de tricomas secretores) e secas ao ar livre em local coberto e sombreado e, em seguida, armazenadas embaladas em saco plástico em ambiente refrigerado à 17° C. A extração dos OE foi realizada com inflorescências secas rasuradas e o com inflorescências secas pulverizadas. As biomassas residuais das inflorescências foram recuperadas em todas as extrações após a coleta do OE, o excesso de água foi removido e em seguida essas amostras foram mantidas em ultrafreezer a -80° C e liofilizadas. Dessas amostras liofilizadas obteve-se um extrato que foi analisado por CLAE-UV.

4.2.1 Processamento do Material vegetal

4.2.1.1 Determinação do teor de água residual

Cerca de 1,0 g da DV pulverizada (triplicata) foi submetido a aquecimento (105° C) através de radiação infravermelha por 1 min, em balança analisadora de umidade por infravermelho pré-aquecida. Os resultados foram determinados através da relação entre massa inicial e final da DV, em % (m/m) (Brasil, 2019). O teor de água foi determinado em triplicata e os resultados comparados por análise estatística através da Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.2.1.2 Fragmentação do material vegetal seco

Após secagem do material vegetal e armazenamento em câmara refrigerada, a DV rasurada foi fragmentada manualmente com o auxílio de tesouras e a pulverização também foi realizada manualmente com auxílio de almofariz e pistilo, utilizando a técnica de moagem criogênica. Nessa técnica, as inflorescências são submetidas ao congelamento por nitrogênio líquido no momento da pulverização, visando reduzir a dificuldade do processamento, devido a viscosidade do óleo resina presente nas inflorescências, o que permite a obtenção de lotes de amostras com maior uniformidade.

4.2.1.3 Análise granulométrica da droga vegetal pulverizada

Em um equipamento tamizador vibratório, foi realizado, em triplicata, o processo de passagem forçada por vibração com 25 g da DV seca e moída, com o coletor e tamises montados nas aberturas de malhas correspondentes a 0,125; 0,180; 0,355; 0,710 e 1,70 mm, na escala 10 de vibração do aparelho, durante 30 min. As frações obtidas em cada malha do tamis e do coletor foram pesadas e calculadas, determinando o tamanho médio de partícula e classificando o pó, segundo a Farmacopeia Brasileira 6ª edição (Brasil, 2019).

4.3 EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Todas as extrações foram realizadas em triplicata pelo método convencional de hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger (Brasil, 2019) com 50 g de DV e 500 mL de água em balão de fundo redondo de 1 L. O tempo de extração foi uma das variáveis testadas entre os experimentos, sendo utilizados 2, 3 e 4 h.

4.3.1 Determinação de óleos voláteis segundo a Farmacopeia Brasileira 6ª edição

A determinação de substâncias voláteis, com utilização do solvente xileno, foi realizada de acordo com a metodologia descrita no item “5.4.1.6 Determinação de Óleos Voláteis” dos “Métodos de Farmacognosia” descritos no item 5.4 da Farmacopeia Brasileira 6ª edição Volume 1 (Brasil, 2019). Nesta metodologia, o solvente xileno é utilizado visando evitar a dispersão de componentes do OE na fase aquosa do tubo de aferição do aparelho clevenger, neste tubo o OE é depositado continuamente durante o processo de extração, junto com a água já condensada do vapor de arraste. O xileno retém as substâncias voláteis por ter maior afinidade e a água condensada segue para o tubo de retorno sem dispersar as substâncias que produzem o hidrolato que é um produto da extração quando não é empregado o xileno.

Esse ensaio foi realizado em triplicata com utilização de 30 g de DV. Antes do início do processo foi adicionado de 1 mL do solvente orgânico xileno diretamente no tubo de aferição do volume de OE extraído no aparelho tipo Clevenger, e a destilação com retorno ocorreu por 20 min sem adição da DV no balão, em seguida foi adicionada a DV e a hidrodestilação ocorreu pelo tempo de 4 h.(Brasil, 2019).

Os volumes de OE em mistura com o xileno obtido nas três extrações foram aferidos e o volume de xileno foi descontado para o cálculo do volume do OE. A mistura (solução) de xileno e OE e a biomassa residual de DV foram descartados após a medição.

4.3.2 Extração de óleos essenciais das inflorescências de *C. sativa*

No primeiro experimento, as extrações foram realizadas com DV rasurada em três tempos - 1, 2 e 3 h, a partir da ebulição. Ao término de cada extração, os OE foram em seguida, congelados em freezer. Após o congelamento da água residual (sólida), a separação dos OE foram realizadas com auxílio de pipeta de *Pasteur*, transferindo-os para frasco de vidro âmbar e armazenados sob refrigeração em freezer.

O volume de OE obtido foi medido nas escalas graduadas do próprio aparelho tipo Clevenger (Brasil, 2019) antes do procedimento de coleta. Em cada extração (triplicata), foram medidos os volumes de OE e calculados os teores em porcentagem (v/m, %) e em cada OE obtido foram realizadas análises dos componentes por CCD.

Para as extrações de OE do segundo experimento, em triplicata, com 50 g de DV pulverizada, foi escolhido o tempo de extração de 4 h, sendo medidos o teor de OE (v/m, %) e analisada a composição química do OE (CCD).

4.4 EXTRAÇÃO DA BIOMASSA RESIDUAL DA DROGA VEGETAL APÓS HIDRODESTILAÇÃO

4.4.1 Preparo de amostra para análise em CLAE-UV com extração da biomassa residual das inflorescências de *C. sativa* após hidrodestilação

Após a extração dos OE, a biomassa residual de cada extração foi recuperada em uma peneira culinária, o excesso de água foi removido e em seguida, esse material residual foi congelado em ultrafreezer a -80° C e depois liofilizado. A DV também foi liofilizada para ser extraída e analisada como comparativo com a biomassa residual. As amostras liofilizadas foram moídas em moinho analítico para obtenção de alíquotas homogêneas de 5,0 g cada. Visando separar as partículas maiores do pó obtido, foi utilizada uma peneira granulométrica de malha com abertura de 1,0 mm, e através da agitação manual realizada de maneira uniforme para passagem das amostras moídas, as partículas retidas na malha foram moídas novamente até que todo o material ficasse menor que 1,0 mm.

Após a homogeneização dos pós obtidos, foi realizada a extração de cada amostra por sonicação em banho de ultrassom, de acordo com a técnica descrita na AHP para análise de fitocanabinoides por CLAE (AHP, 2014), com algumas adaptações. Para extração foram pesados 200 mg de cada amostra (em triplicata) e submetidos a extração com 10 mL de metanol: clorofórmio (9: 1, v/v) em banho de ultrassom por 30 min. As soluções extrativas obtidas foram filtradas para balão volumétrico de 10 mL e o volume do balão foi completado até o menisco

com a solução metanol: clorofórmio (9: 1). Foram transferidas alíquotas de 5,0 mL da solução extrativa de cada balão volumétrico para um frasco de vidro e em seguida as misturas de solventes foram evaporadas em capela sob fluxo de ar. Os extratos secos foram mantidos em dessecador sob pressão reduzida e com sílica gel por 24 h, sendo em seguida armazenados sob refrigeração em freezer a -14 °C. Os extratos secos foram solubilizados em 1,0 mL da mistura metanol: água (98:02, v/v) e submetidas à extração em fase sólida (EFS), utilizando cartucho de sílica C18 (300 mg; 3,0 mL) previamente condicionado com a solução de metanol e água 98:02 (v/v). Na sequência, foi realizada a eluição da amostra no cartucho, com aplicação de mais 4,0 mL da mistura de solventes (metanol: água, 98:02, v/v). O eluato obtido foi recolhido em balão volumétrico de 5,0 mL e o volume completado com água até o menisco. Cerca de 1,5 mL de cada eluato foram filtrados em unidade filtrante PVDF hidrofílica (membrana de 0,22 mm) e transferidos para frasco tipo *vial*. Após análises por CLAE-UV, observou-se que as concentrações obtidas estavam acima da faixa de trabalho, então uma alíquota de 167 µL de cada amostra foi transferida para balão volumétrico de 10 mL e o volume completado até o menisco com acetonitrila. As amostras obtidas foram homogeneizadas e acondicionadas em frasco tipo *vial* para análise por CLAE-UV.

A modificação em relação ao método da AHP (2014) foi a utilização de capela sob fluxo de ar para secagem do material, sendo que a metodologia da AHP (2014) descreve a secagem em fluxo de nitrogênio. A diluição final na proporção 1: 60 (v/v) foi acrescentada, devido a concentração da amostra estar muito acima da faixa de trabalho da curva de calibração obtida através das análises dos padrões.

As soluções obtidas foram submetidas a análises por CLAE-UV (item 4.6) para identificação e quantificação dos canabinoides majoritários e avaliação da viabilidade de reutilização das inflorescências secas após processo de hidrodestilação para obtenção de extrato contendo canabinoides.

4.5 ANÁLISE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

A análise por CCD foi desenvolvida em cromatoplaça de alumínio (20 x 20 cm) cobertas com sílica gel 60 GF₂₅₄ (0,20 mm; 15 µm). Duas condições de fase móvel (FM) foram empregadas devido a característica apolar (hidrocarbonetos) de alguns terpenos majoritários presentes no OE de *C. sativa* (α -humuleno, (*E*)-cariofileno e β -mirceno), tendo sido utilizado como solvente na FM 1 o hexano. A FM 2 foi desenvolvida a partir de testes empregando as diferentes misturas de solventes visando separar os demais componentes que, na eluição com a

FM 1, ficam retidos no ponto de aplicação. Foram testados cinco métodos empregando diferente misturas de solventes. A condição inicial testada foi tolueno: acetato de etila 87: 13 (v/v). Em seguida, foram testadas duas condições, a primeira utilizando tolueno: acetato de etila: ácido acético glacial 90: 08: 02, e a segunda tolueno: acetato de etila: álcool isopropílico 93: 05: 02. Foi escolhida a condição que utilizou ácido acético para continuar os testes devido à observação de maior número de bandas, sendo avaliadas as condições 88: 10: 02 e 85: 13: 02. A Tabela 2 apresenta os métodos de condição de análise para obtenção da FM 2.

Tabela 2 - Desenvolvimento do método para FM 2

Métodos					
Solventes	Método 1	Método 2	Método 3	Método 4	Método 5
Tolueno	87 %	90 %	93 %	88 %	85 %
Acetato de etila	13 %	08 %	05 %	10 %	13 %
Ácido acético glacial	-	02 %	-	02 %	02 %
Alcool isopropílico	-	-	02 %	-	-
Proporção	87: 13 (v/v)	90: 08: 02 (v/v/v/)	93: 05: 02 (v/v/v)	88: 10: 02 (v/v/v/)	85: 13: 02 (v/v/v)

Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2024).

No método 5, a eluição apresentou a melhor resolução entre as bandas sendo, portanto, escolhida para compor a FM 2.

As amostras foram preparadas solubilizando os OE obtidos em cada experimento com hexano na concentração de 20 mg. mL⁻¹ e o volume de aplicação foi de 5,0 µL. Os padrões utilizados foram: (*E*)-cariofileno (4,0 mg. mL⁻¹), α -humuleno (12 mg. mL⁻¹), linalol (8,0 mg. mL⁻¹) e β -mirceno (28 mg. mL⁻¹), o volume de aplicação foi de 5,0 µL, e a distância de eluição foi de 20 cm.

O revelador utilizado foi a vanilina sulfúrica, aplicado em *spray* à distância de 40 centímetros e as placas foram reveladas em estufa à 110° C por 10 minutos.

4.6 ANÁLISE POR CLAE-UV DOS EXTRATOS DA BIOMASSA RESIDUAL DAS INFLORESCÊNCIAS DE *C. sativa* APÓS HIDRODESTILAÇÃO

O método de CLAE-UV utilizado, no modo gradiente, foi desenvolvido por Zalewsky (2024). As análises cromatográficas realizadas por CLAE-UV, utilizaram coluna de modo reverso NST C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m) e coluna de guarda Phenomex® (C18 4 x 3,0 mm, 5 μ m), sendo o volume de injeção de 20 μ L e a FM composta por: (A) água contendo 0,1 % de ácido fórmico e (B) acetonitrila: 0 min 70,0 % B, 15 min 90,0 % B, 30 min 90,0 % B, com vazão de 1,0 mL. min⁻¹. A detecção foi de 190 a 400 nm (monitorados em 210, 225 e 270 nm). O forno de coluna foi mantido a temperatura de 35° C.

4.6.1 Curvas analíticas dos padrões canabinoides

O preparo de solução dos padrões foi de acordo com a seguinte metodologia: padrões de CBDA (Cayman Chemical®, 99,36 $\pm$ 0,76 % de pureza), THCA-A (Supelco, 99,13 % de pureza), CBG (Agilent, pureza não informada), e CBN (Cayman Chemical®, 99,09 $\pm$ 0,52 % de pureza) estavam armazenados em frasco contendo 1,0 mL de solução, na concentração de 1,0 mg. mL⁻¹. Todo o conteúdo de cada frasco foi transferido para balão volumétrico de 5,0 mL, e os volumes foram ajustados utilizando acetonitrila grau CLAE. A concentração das soluções estoque obtidas foi de 200 μ g. mL⁻¹. O padrão de THC (Cayman Chemical®, 97,30 % de pureza) estava armazenado em frasco contendo 100 μ L de solução, na concentração de 0,5 mg. mL⁻¹. Todo o seu conteúdo foi transferido para balão volumétrico de 5,0 mL. O padrão de CBD (Cayman Chemical®, 99,75 $\pm$ 0,18 % de pureza) estava armazenado em frasco contendo 10 mg da substância sólida, e metade do seu conteúdo foi pesado em balança analítica (Marte®, modelo AUW220D) com exatidão, no valor de 5,0 mg, sendo transferido para balão volumétrico de 5,0 mL. Tanto o padrão de THC quanto o padrão de CBD tiveram o volume completado com acetonitrila grau CLAE, e a concentração das duas soluções estoque foi de 1,0 mg. mL⁻¹. Todas as soluções estoque tiveram as concentrações ajustadas de acordo com a pureza informada pelo fabricante, de acordo com a Tabela 3 (Zalewsky, 2024).

Tabela 3 - Ajuste das concentrações de acordo com a pureza dos padrões.

Canabinoide	Concentração da solução estoque sem ajuste ($\mu\text{g. mL}^{-1}$)	Concentração da solução estoque ajustada ($\mu\text{g. mL}^{-1}$)
CBDA	200	198,72
THCA-A	200	198,26
CBG	200	200,00
CBN	200	198,18
THC	1000	973,00
CBD	1000	997,50

Fonte: Adaptado de Zalevsky (2024)

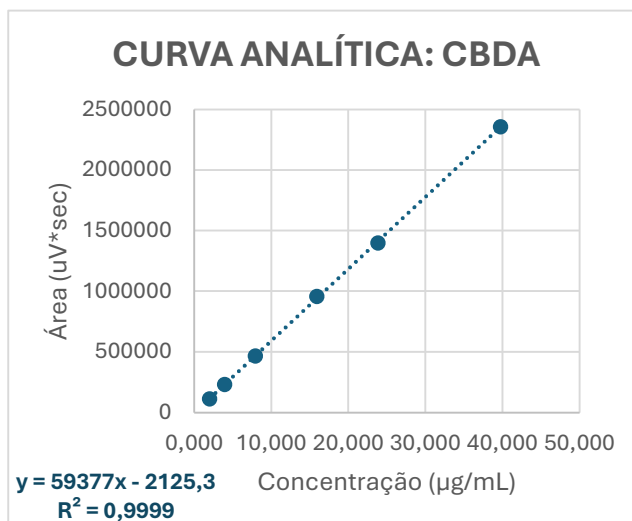
A partir das soluções estoque de todos os canabinoides, foi preparada uma solução estoque mista (MIX) com todos os compostos de interesse. Em balão volumétrico de 10 mL adicionou-se 2,0 mL das soluções estoque de CBDA, THCA, CBG e CBN e 400 μL das soluções de THC e CBD. O volume foi ajustado com acetonitrila grau CLAE e a concentração final do MIX para todos os compostos foi de 40 $\mu\text{g. mL}^{-1}$. O MIX foi utilizado para preparar dez diluições para as curvas analíticas, nas seguintes concentrações: 0,20; 0,40; 0,80; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16; 24 e 40 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ (Zalevsky, 2024).

O método desenvolvido passou por estudo de figuras de mérito para validação de acordo com a RDC ANVISA n. 166/2017 (Brasil, 2017) avaliando os seguintes parâmetros: Estabilidade e Precisão, Linearidade (Faixa de Trabalho, limite de detecção e limite de quantificação) e Seletividade, Efeito Matriz e Exatidão (Zalewski, 2024).

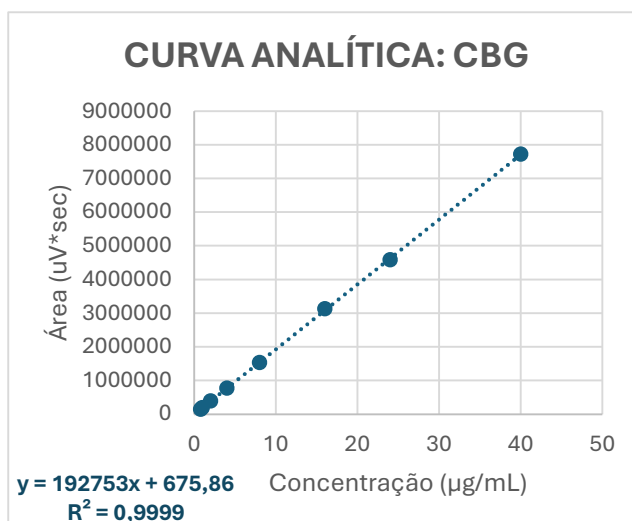
As equações da reta e suas respectivas curvas analíticas para cada canabinoide (ou curvas de calibração) obtidas por Zalevsky (2024), são apresentadas na Figura 11.

Figura 11 – Equações da reta e curvas analíticas para os canabinoides CBDA, CBG, CBD, CBN, THC e THCA.

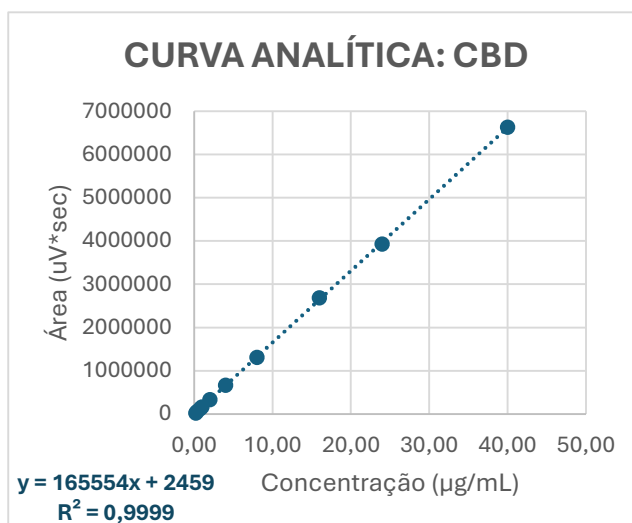
$$CBDA: x = \frac{(y+2125)}{59377}$$



$$CBG: x = \frac{(y - 675.86)}{192753}$$

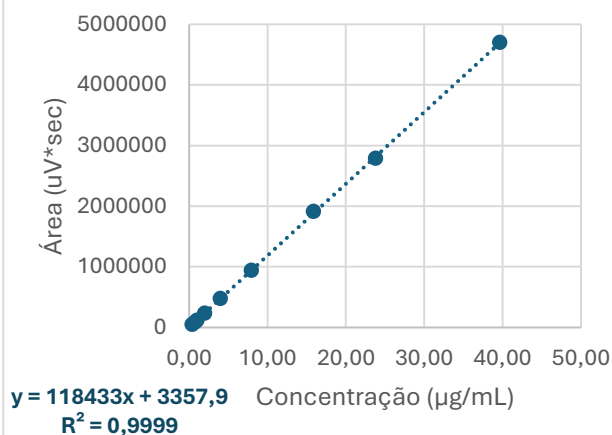


$$CBD: x = \frac{(y-2459)}{165554}$$



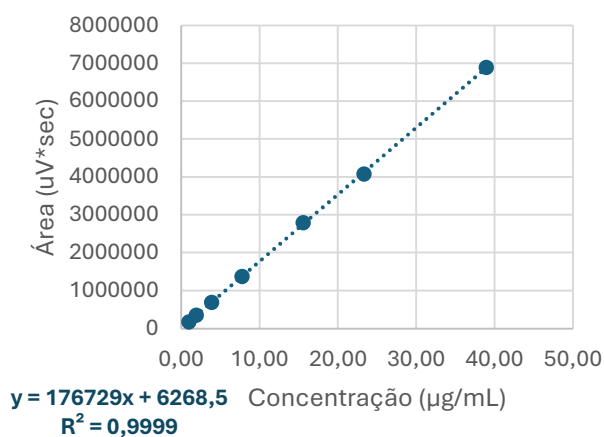
$$CBN: x = \frac{(y+3357.9)}{118433}$$

CURVA ANALÍTICA: CBN



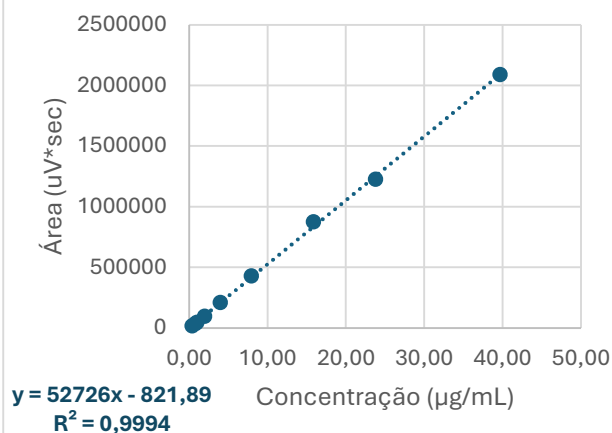
$$THC: x = \frac{(y-6268.5)}{176729}$$

CURVA ANALÍTICA: THC



$$THCA: x = \frac{(y+821.89)}{52726}$$

CURVA ANALÍTICA: THCA



Fonte: Adaptado de Zalewsky, 2024.

Legenda: São apresentadas seis curvas analíticas (à direita) e as respectivas equações da reta (à esquerda), para cada um dos seis compostos apresentados.

4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

4.7.1 Análises estatísticas dos teores de OE obtidos

Os teores dos OE obtidos foram submetidos à análise estatística da ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$) gerando dados que correspondem a diferentes experimentos variando parâmetros de fragmentação e tempo de extração de um mesmo lote de inflorescências secas.

4.7.2 Análises estatísticas dos teores de canabinoides nos extratos da biomassa residual das inflorescências

Os teores de canabinoides do extrato da DV e dos extratos da biomassa residual das inflorescências obtidos após a extração do OE foram submetidos à análise estatística da ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.8 ENSAIO DA MEMBRANA CORIOALANTÓICA DE OVOS DE GALINHA (HET-CAM)

Ovos férteis de galinhas da linhagem Leghorn (*Gallus gallus domesticus*) foram incubados horizontalmente em uma incubadora automática por seis dias, sob condições rigorosamente controladas de temperatura ($37,5 \pm 0,5$ °C) e umidade relativa (55 a 65 %). No terceiro dia, após a ovoscopia, foram descartados os ovos considerados inviáveis. No quarto dia, uma porção da casca foi removida, e as aberturas resultantes foram seladas com parafilm M[®], mantendo-se assim até o início dos ensaios.

Os ovos foram organizados em oito grupos experimentais: dois grupos controle (NaCl 0,9 % como controle negativo e NaOH 0,1 M como controle positivo) e dois grupos contendo 3 amostras: a) OE obtido por extração durante 4 horas, DV rasurada nas concentrações 100, 200 e 400 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ e b) OE obtido por extração durante 4 horas, DV moída, nas concentrações 100, 200 e 400 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$. As amostras foram preparadas utilizando Tween 80 a 8 % como veículo. No sexto dia, o parafilm M[®] foi removido, e os ovos foram preparados para o ensaio. Utilizando-se um estereoscópio, foram capturadas imagens dos vasos sanguíneos antes da aplicação dos compostos. Em seguida, 300 μL das amostras foram aplicados em cada ovo. O experimento foi conduzido em triplicata, com três ovos alocados para cada grupo.

Após a adição das amostras, os efeitos foram monitorados por 300 segundos, analisando-se um ovo por vez. Ao final desse período, uma nova imagem foi capturada para registrar o estado dos vasos sanguíneos. A pontuação de irritação foi determinada com base nos parâmetros de hemorragia, lise vascular e coagulação, sendo esses dados registrados em segundos e calculados de acordo com a fórmula proposta por Batista-Duharte *et al.* (2016) (Batista-Duharte *et al.*, 2016):

Onde:

H é o tempo inicial da hemorragia;

L é o tempo inicial da lise vascular;

C é o tempo inicial de coagulação.

A pontuação semiquantitativa HET-CAM foi determinada após a administração dos compostos, utilizando uma escala de zero a três, conforme descrito a seguir: zero (-) – nenhuma reação observada, sem sinais de hemorragia, lise vascular ou coagulação; um (+) – reação leve e isolada, com presença discreta de hemorragia, lise vascular e coagulação; dois (++) – reação moderada, caracterizada por hemorragia, lise e coagulação de intensidade moderada; e três (+++) – reação severa, evidenciada por hemorragia, lise e coagulação intensas (Steiling *et al.*, 1999). Além disso, foi monitorada a taxa de sobrevivência dos embriões durante 600 segundos após a administração dos compostos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISES DA DROGA VEGETAL

5.1.1 Determinação do teor de água residual

O teor médio de água residual aferido em balança analisadora de umidade por infravermelho (triplicata) foi de 12 ± 0.06 %, situando-se na faixa de 8 – 13 % para *C. sativa* “herbal” (UNODC 2022). O limite estabelecido pela American Herbal Pharmacopoeia é de 10 % (AHP, 2014) e mesmo que o valor obtido para a DV analisada seja um pouco superior, está abaixo do considerado máximo para drogas vegetais de forma geral - 14 % (Simões *et al.*, 2016).

5.1.2 Análise granulométrica da droga vegetal pulverizada

Os valores de massa e porcentagens de DV pulverizada que ficaram retidos nos tamises e no coletor respectivos às aberturas de malhas correspondentes a 0,125; 0,180; 0,355; 0,710 e 1,70 mm (Brasil, 2019) são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Distribuição granulométrica da DV pulverizada. Valores de massa e porcentagens (média) de DV pulverizada (DV-m) retida nas aberturas de malha dos tamises.

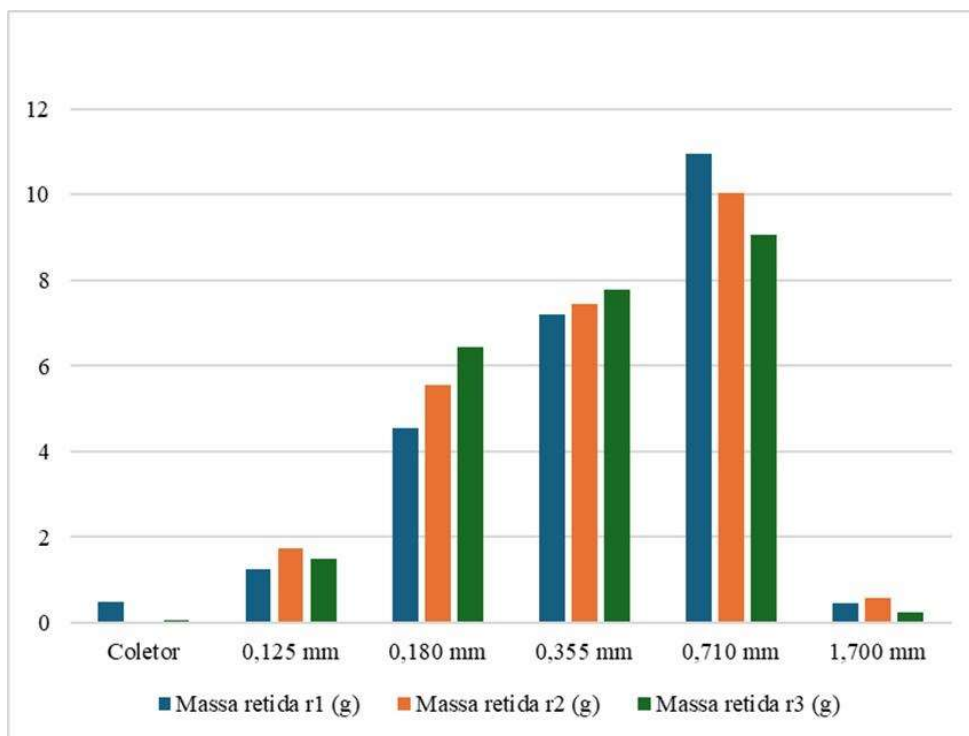
Abertura de malha (mm)	Massa retida			
	DVm-r1 (g)	DVm-r2 (g)	DVm-r3 (g)	%
-				
Massa de DV	24,9246	25,383 5	25,100	100,0 0
Coletor	0,4894	0,0436	0,0510	0,76
0,125	1,2434	1,7382	1,5079	5,93
0,180	4,5411	5,5392	6,4412	21,93
0,355	7,2140	7,4537	7,7732	29,78
0,710	10,9697	10,028 7	9,0727	39,89
1,70	0,4670	0,5801	0,2540	1,71

Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2024).

Para a classificação do pó segundo a Farmacopeia Brasileira 6ª edição (Brasil, 2019), é necessário que não fique retida nenhuma quantidade de pó na malha de 1,70 mm, portanto, a DV moída pela técnica da moagem criogênica não pôde ser classificada de acordo com a Farmacopeia Brasileira 6ª edição por apresentar fragmentos do caule maiores que a abertura de 1,70 mm.

Os gráficos de barras apresentam as quantidades de pó retidas em cada um dos tamises, nas três repetições da análise (Figura 12) e as médias das três repetições (Figura 13).

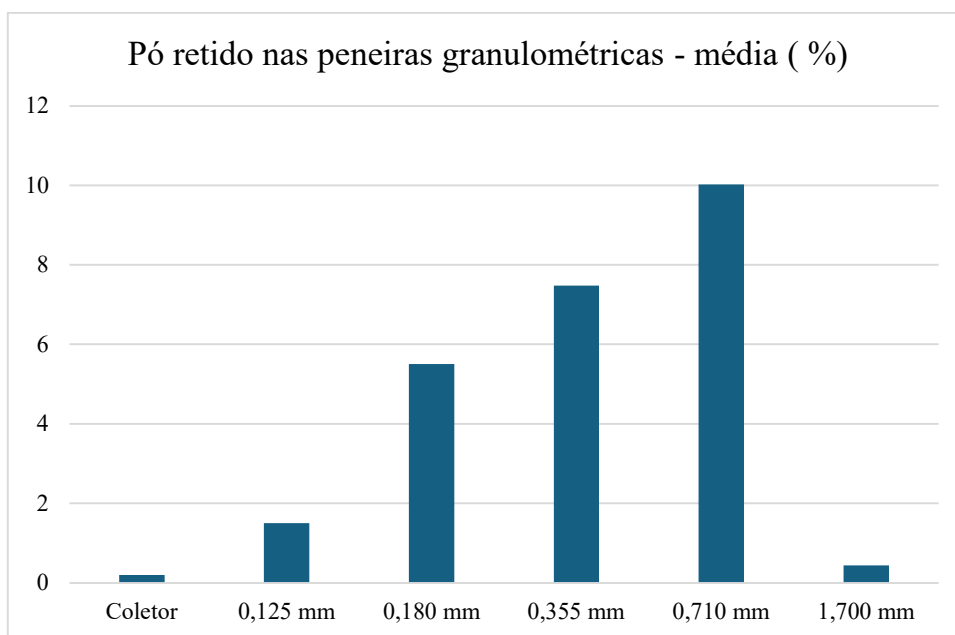
Figura 12 - Distribuição granulométrica da DV pulverizada. Quantidades de pó retido nos tamises das três repetições.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Legenda: Gráfico de barras representando as triplicatas das quantidades de pó retido em cada malha do tamis.

Figura 13 - Distribuição granulométrica média da DV pulverizada. Médias das três repetições das quantidades de pó retidas nas peneiras granulométricas.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Legenda: Gráfico de barras representando as médias das quantidades de pó retido em cada malha do tamis.

Desconsiderando os fragmentos de caule retidos na peneira granulométrica com abertura de malha 1,70 mm, a título de aproximação, o pó obtido pela técnica de moagem criogênica poderia ser classificado como “Pó grosso”, cuja classificação estipula valor máximo de 40% para a quantidade de pó retido na peneira com abertura de malha de 0,355 mm. O valor retido nesse tamis foi de 29,78%.

Pó grosso - aquele cujas partículas passam em sua totalidade pelo tamis com abertura nominal de malha de 1,70 mm e, no máximo, 40% pelo tamis com abertura nominal de malha de 355 μm . (Brasil, 2019).

5.2 EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

5.2.1 Determinação de óleos voláteis na droga vegetal empregando xileno

O método para determinação do teor de OE em DV (v/m) da Farmacopeia Brasileira 6ª edição (Brasil, 2019) preconiza o uso de xileno no aparelho tipo Clevenger, e o cálculo do volume de OE obtido é feito através da diferença entre o volume de OE + xileno e de xileno. Foram determinados os volumes de OE no processo de hidrodestilação com 30 g de DV rasurada, com duração de 4 h de extração. Os dados são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Volumes e teores de óleos essenciais (v/m, %) obtidos nas extrações por hidrodestilação com uso de xileno (Brasil, 2019).

Repetições	Volume de OE (mL)	Teor de OE (%)
DOV4H-r1	0,50	1,66
DOV4H-r2	0,60	2,00
DOV4H-r3	0,50	1,66
Média $\pm$ DP	0,53 $\pm$ 0,04	1,77 $\pm$ 0,15

Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2024).

O teor de OE nas inflorescências secas de *C. sativa* tipo fibra, relatado por Kwaśnica *et al.* (2020) variou entre 0,11 e 0,18 % (110 e 180 mg. 100g⁻¹) em métodos de secagem distintos. Na comparação entre a extração com plantas frescas e secas, o autor relata que há perda de quantidades de OE pelos processamentos de secagem, variando entre 14,29 e 47,62 %. Em

outro estudo, com folhas de cânhamo desidratadas em diferentes métodos (micro-ondas, convecção e métodos combinados), o teor de OE foi de 0,16 % (166 mg. 100g⁻¹), segundo Kwaśnica *et al.* (2023). Já nas plantas frescas do tipo medicamento, o teor de OE nas inflorescências (v/m) obtidos por arraste a vapor varia entre 0,05 e 0,29 % (AHP, 2014). Nas referências citadas não foram encontradas informações sobre o tempo de extração.

No processo de secagem para análise laboratorial descrito na AHP (2014), as inflorescências perdem 75 % do seu peso original, e segundo o manual “Métodos Recomendados para a IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DE CANNABIS E PRODUTOS DE CANNABIS” (UNODC, 2022), plantas frescas contêm 60 a 80 % de água em peso portanto, mesmo com perdas de frações voláteis durante o processo de secagem, a massa de planta desidratada pode representar até cinco vezes a massa da planta fresca, o que pode ser um dos fatores que explica a maior quantidade de OE obtida na extração de plantas desidratadas.

O teor médio de OE obtido nas inflorescências secas, no valor de 1,77 ($\pm 0,15$) %, apresentou-se acima do valor relatado na literatura científica, o que pode estar relacionado aos processos pós-colheita (secagem e armazenamento) da Associação Flor da Vida que podem preservar as substâncias voláteis presentes na DV. Além disso, o cultivo de variedades genéticas desenvolvidas em outras localidades pode expressar quimiotipos distintos do esperado, devido ao desenvolvimento da planta ser influenciado por fatores como tipo de clima, de solo, interação com outros organismos (que pode ocorrer na presença de grande biodiversidade), podendo alterar a produção de óleos essenciais e outros metabólitos secundários, como estratégia de proteção contra radiação ultravioleta, predadores e outros estresses ambientais (Roohinejad *et al.*, 2017). Além disso, Gobbo-Neto e Lopes (2007) descrevem que a produção de metabólitos secundários pode ser influenciada pela sazonalidade, o ritmo circadiano, o estágio de desenvolvimento e a idade da planta, a disponibilidade de água, a altitude, a composição atmosférica e o dano tecidual. Tanto o manejo do cultivo quanto o processamento pós-colheita afetam a conservação de substâncias voláteis, exigindo uma padronização rigorosa para assegurar a reprodutibilidade dos perfis de metabólitos secundários, como os terpenos presentes no OE (Lowe *et al.*, 2021). Esses apontamentos demonstram a importância de pesquisar a *C. sativa* cultivada em Franca-SP

No processamento pós-colheita realizado na Associação Flor da Vida (Franca-SP), as brácteas presentes nas inflorescências tem o terço final (sem a presença ou com baixa quantidade de tricomas) aparado no procedimento conhecido popularmente como “*trimming*” (item 4.2). Portanto, é possível que a redução da massa de DV (parte com baixa quantidade de tricomas) após o procedimento de aparar contribua para aumento do teor de OE na DV, o que

pode ser um fator determinante para o aumento do teor (m/m). Somente testes adicionais de extração da planta *in natura* e também sem a realização da apara nos terços finais das brácteas (planta *in natura* e DV) poderão confirmar se este é um fator relevante para o teor de OE acima do relatado na literatura científica.

Cabe também ressaltar que a carência de estudos e pesquisas com *C. sativa* cultivada em regiões de clima tropical dificulta a comparação dos dados obtidos com referências na literatura.

5.2.2 Extração de óleos essenciais das inflorescências secas de *C. sativa*

Os teores de OE extraídos por hidrodestilação de 50 g de DV fragmentada, foram obtidos para cada tipo de fragmentação (rasurada ou moída) e tempo de extração, de acordo com a Tabela 6:

Tabela 6 – Volumes e teores de óleos essenciais (v/m, %) obtidos nas extrações por hidrodestilação em diferentes condições. OE2H-r1, OE2H-r2, OE2H-r3: OE extraído da DV rasurada por hidrodestilação pelo tempo de 2 h; OE3H-r1, OE3H-r2, OE3H-r3: OE extraído da DV rasurada por hidrodestilação pelo tempo de 3 h; OE4H-r1, OE4H-r2, OE4H-r3: OE extraído da DV rasurada por hidrodestilação pelo tempo de 4 h; OEm4H-r1, OEm4H-r2, OEm4H-r3: OE extraído da DV moída por hidrodestilação pelo tempo de 4 h. r1: Repetição 1; r2: Repetição 2; r3: Repetição 3.

Estado de fragmentação	Tempo de Extração (h)	Amostra	Volume de OE (mL)	Teor de OE (%)
Rasurada	2	OE2H-r1	0,70	1,4
		OE2H-r2	0,70	1,4
		OE2H-r3	0,65	1,3
		Média ± DP	0,68 ± 0,23	1,36 ± 0,04
Rasurada	3	OE3H-r1	0,90	1,8
		OE3H-r2	0,80	1,6
		OE3H-r3	0,95	1,9
		Média ± DP	0,88 ± 0,11	1,76 ± 0,11
Rasurada	4	OE4H-r1	0,90	1,8
		OE4H-r2	0,95	1,9
		OE4H-r3	0,80	1,6
		Média ± DP	0,88 ± 0,11	1,76 ± 0,11
Moída	4	OEm4H-r1	0,95	1,9
		OEm4H-r2	0,80	1,6
		OEm4H-r3	0,70	1,4
		Média ± DP	0,81 ± 0,13	1,63 ± 0,27

Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2024).

Os teores de OE (mL) apresentados na Tabela 6 foram submetidos a análise de variância (ANOVA fator único), e o valor de F calculado (3,764705882) foi inferior ao valor de F crítico (4,066180551), sugerindo, portanto, que não há diferenças estatisticamente significativas ($p >$

0,05) entre as médias dos grupos comparados e dessa forma, não foi rejeitada a hipótese nula de que todas as médias dos grupos são iguais. De acordo com a análise estatística aplicada, não há evidências suficientes para sugerir que pelo menos um dos grupos é significativamente diferente dos outros. O teste de Tukey não foi necessário, porque ele é usado apenas para explorar diferenças significativas entre os grupos quando a ANOVA indica que há uma diferença global significativa.

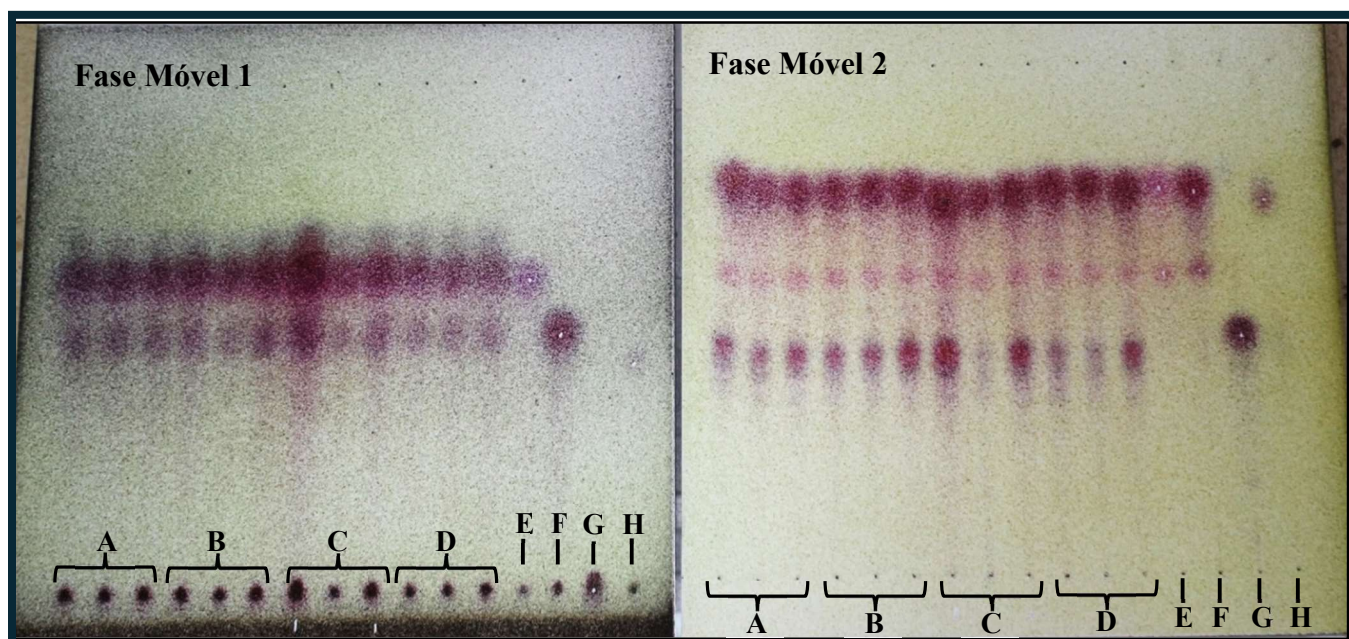
Analisando apenas o teor de OE obtido, os tempos de 3 h e 4 h (DV rasurada) apresentaram os mesmos valores médios ($1,76 \pm 0,11$ %), e também o maior valor, portanto, devido à alta demanda de energia do processo de hidrodestilação convencional, e pela praticidade de utilizar a DV rasurada, o método de extração sugerido é a hidrodestilação por 3 h com a DV no estado de fragmentação rasurada.

O teor de OE obtido na extração com duração de 3 h está muito próximo do valor obtido na Determinação de óleos voláteis na droga vegetal empregando xileno (Tabela 6), que é uma técnica farmacopeica (Brasil, 2019) utilizada como referência, o que reforça a sugestão da extração por 3 h, já que em ambas extrações o teor obtido foi acima dos valores encontrados na literatura científica (item 5.2.1).

5.3 ANÁLISE DOS OE POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

A FM 2 composta por tolueno: acetato de etila: ácido acético glacial 85: 13: 02 (método 5 da Tabela 2) apresentou maior número de bandas e foi utilizada na análise dos OE por CCD de forma complementar a FM 1 (hexano). As amostras analisadas por CCD foram todos os OE extraídos (tempos de 2, 3 e 4 h e repetições). Os padrões de terpenos utilizados são componentes típicos do OE de inflorescências de *C. sativa*: (*E*)-cariofileno, α -humuleno, linalol e β -mirceno (Figura 14).

Figura 14 - Cromatoplas das amostras de OE e padrões de terpenos nas FM 1 (hexano) e FM 2 (tolueno: acetato de etila: ácido acético glacial 85: 13: 02). FE: sílica gel 60 GF₂₅₄ (0,20 mm; 15 μ m); Amostras: solução dos OE obtidos nos experimentos, solubilizados em hexano na concentração de 20 mg. mL⁻¹; Volume de aplicação: 5,0 μ L. Padrões utilizados: (*E*)-cariofileno (4,0 mg. mL⁻¹), α -humuleno (12 mg. mL⁻¹), linalol (8,0 mg. mL⁻¹) e β -mirceno (28 mg. mL⁻¹); Volume de aplicação: 5,0 μ L. Distância total de eluição: 20 cm; Revelador: vanilina sulfúrica, aplicado em spray à distância de 40 centímetros; Revelação: estufa à 110° C por 10 min. (A): OE2H (r1, r2 e r3); (B): OE3H (r1, r2 e r3); (C): OE4H (r1, r2 e r3); (D): OEm4H (r1, r2 e r3); (E): (*E*)-cariofileno; (F): α -humuleno; (G): linalol; (H): β -mirceno.



Fonte: Registrado pelo próprio autor.

Legenda: Foto de cromatoplas após análise por Cromatografia em Camada Delgada de amostras de OE e padrões.

As análises por CCD demonstraram mesmo perfil cromatográfico qualitativo para todas amostras de OE. Na condição da FM 1 (hexano), os padrões (*E*)-cariofileno e α -humuleno foram identificados em todas as amostras de OE; o mirceno não foi identificado e o linalol não eluiu nesta condição. Na FM 2, que possui maior força de eluição, o perfil cromatográfico foi mais complexo apresentando as mesmas seis bandas para as amostras de OE. Nesta condição, (*E*)-cariofileno e α -humuleno coeluíram, daí a importância de usar duas condições de FM. O mirceno e o linalol não foram identificados nas amostras de OE empregando a FM 2.

Na FM 2 é possível observar bandas com mesmo R_f que correspondem a produtos de degradação dos padrões (*E*)-cariofileno e α -humuleno também nas amostras de OE, sugerindo que estas bandas nos OE podem ser de produtos de degradação (artefatos) gerados por estes sesquiterpenos hidrocarbonetos no processo de secagem e/ou hidrodestilação. Na FM 1 estas bandas de produtos de degradação do (*E*)-cariofileno e α -humuleno ficaram retidas no ponto de aplicação. Em um estudo da degradação de componentes do OE de *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae), Carvalho *et al.* (2021) demonstraram que a secagem do material vegetal e a

extração do OE por hidrodestilação promoveram a formação de artefatos que pode ser devido a diversas reações químicas, como redução de olefinas, oxidação, isomerização, polimerização, rearranjo, adição nucleofílica, ciclização e abertura de anéis (Ussai; Arras; Fronteddu, 1992; Touaibia; Boutekedjiret; Perino, 2019; Gopalakrishnan, 1994; Figueiredo; Barroso; Pedro; Scheffer, 2008). Esses processos também causam a volatilização de compostos, resultando em alterações na composição do OE devido à perda de determinados compostos. Através de análises por CG-MS, os autores demonstraram que, no processo de secagem da *C. sylvestris* o teor de hidrocarbonetos sesquiterpênicos diminuiu e o de sesquiterpenos oxigenados aumentou, exemplificando especificamente com o (*E*)-cariofileno que formou o óxido de cariofileno. Outro terpeno identificado pelos autores apenas nas amostras de OE das plantas secas foi o epóxido de humuleno II, indicando se tratar de um artefato do α -humuleno.

5.4 EXTRAÇÃO DE BIOMASSA RESIDUAL DA DV APÓS HIDRODESTILAÇÃO

5.4.1 Análise por CLAE-UV dos extratos de inflorescências de *C. sativa* e dos extratos de biomassa residual após hidrodestilação

Os extratos obtidos da DV e da biomassa residual das inflorescências rasuradas e moídas, submetidas a extração prévia por hidrodestilação em diferentes tempos (item 4.6), foram analisados por CLAE-UV para a determinação do teor de fitocanabinoides. Os diferentes tempos de extração e tipos de fragmentação que compõem os métodos e condições experimentais resultaram em amostras de biomassa residual de inflorescências com diferentes concentrações de canabinoides e diferentes composições, além do que, algumas amostras apresentaram produtos de degradação que podem ser visualizados nos cromatogramas gerados nas análises, porém esses compostos não foram identificados nem quantificados. Os teores médios dos canabinoides identificados e quantificados em cada grupo de amostras são apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7 - Identificação e Quantificação dos canabinoides.

Amostra	DV	OE2H	OE3H	OE4H	OE4H-m
Canabinoide	Teor %	Teor %	Teor %	Teor %	Teor %
CBDA	-	0,29	0,36	0,62	0,20
CBG	0,57	0,91	1,15	1,08	1,03
CBD	-	-	-	-	-
CBN	-	-	-	-	-
THC	6,54	17,65	20,44	17,60	17,19
THCA	18,47	-	-	0,31	0,30

Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2024).

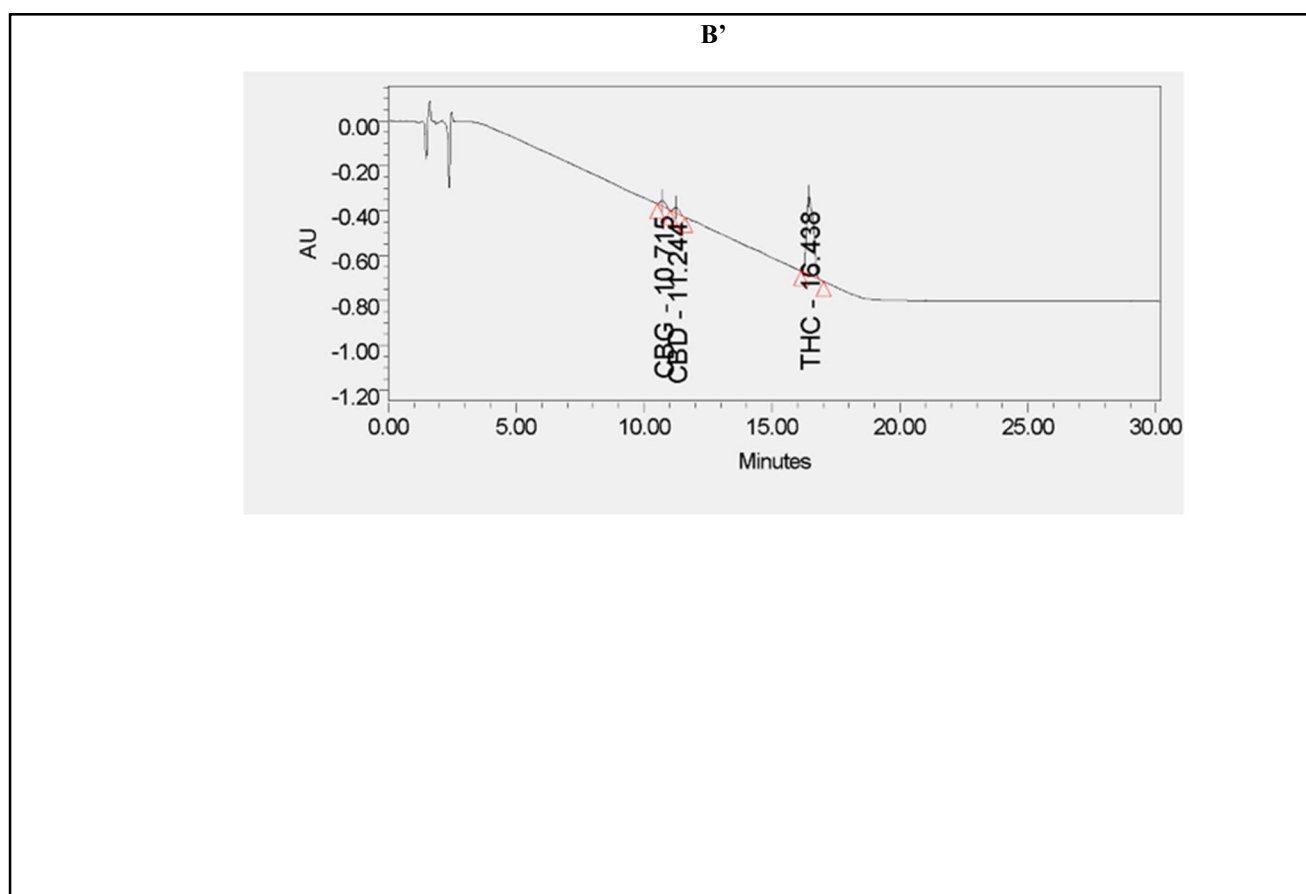
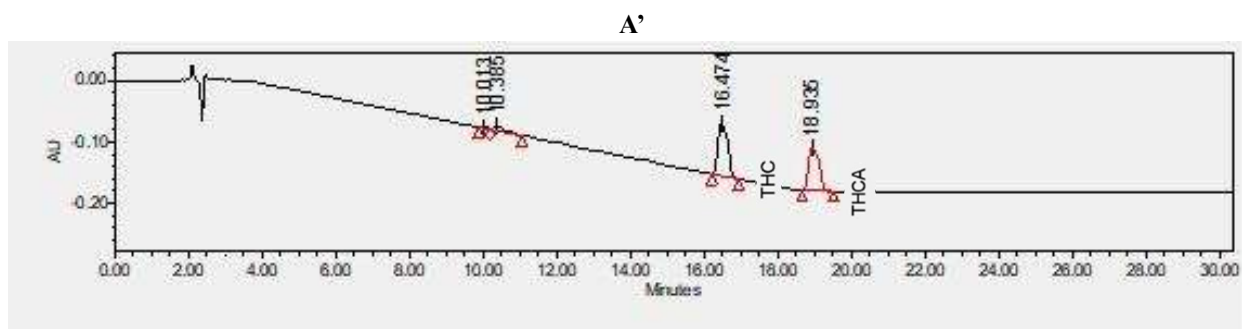
Ao aplicar o fator de conversão apresentado pela AHP (2014) para a descarboxilação de THCA em THC (1,000 g de THCA converte-se em 0,877 g de THC), os resultados obtidos nos experimentos indicam que o teor de THC na DV (THC: 6,54 %, THCA: 18,47 % – e soma dos valores de THC e THC convertido: 22,73 %) está dentro da faixa de limites do potencial de THC declarado pelo fabricante, que varia entre 16 e 24 % de THC. No entanto, ao analisar os teores de THC nas biomassas residuais após os processos de extração por hidrodestilação (OE2H: 17,65 %, OE3H: 20,44 %, OE4H: 17,60 % e OE4H-m: 17,19 %), observa-se que os teores de THC são consideravelmente altos, sugerindo que a biomassa residual ainda contém uma quantidade significativa de canabinoides, especialmente THC. Este dado é relevante, pois indica a possibilidade de reaproveitamento do material residual da extração de óleos essenciais de *C. sativa* (variedade comercial *Blue Dream*) como uma fonte viável de canabinoides, particularmente o THC observado nos resultados.

O reaproveitamento da biomassa residual pode ser útil tanto para a obtenção de THC utilizado como fitofármaco (apesar das restrições legais no Brasil), quanto para o uso como padrão cromatográfico em análises laboratoriais. Outro ponto importante observado foi a descarboxilação do THCA presente na droga vegetal, que se converteu em THC, indicando que o processo de extração promoveu uma conversão eficiente desse precursor. Além disso, a formação de CBN, um canabinoide resultante da degradação do THC, foi mínima, sugerindo que o THC permaneceu estável durante o processo. Embora o CBD não tenha sido identificado nas biomassas residuais, possivelmente devido aos baixos teores característicos da variedade estudada, os resultados sugerem que o THC pode ser aproveitado. Mais estudos são necessários para compreender o que ocorre com o CBD durante a hidrodestilação. A reutilização desse

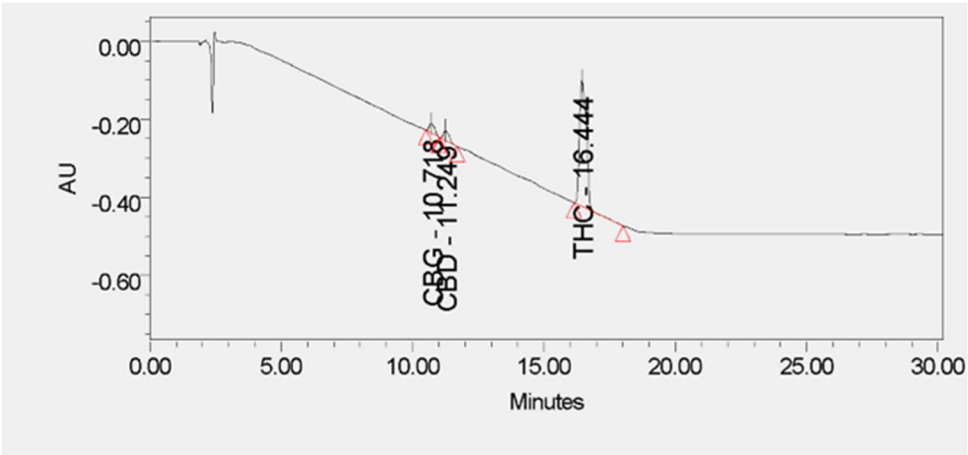
material residual abre caminhos para uma abordagem mais sustentável no aproveitamento de canabinoides na biomassa residual resultante da extração de OE por hidrodestilação.

Os cromatogramas apresentados na Figura 15 foram obtidos nas análises descritas no item 4.6.

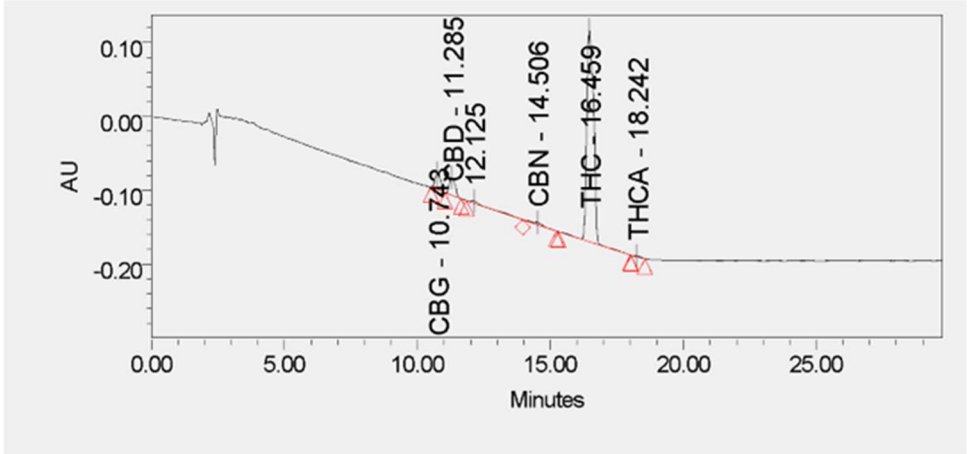
Figura 15 – Cromatogramas das análises por CLAE-UV das amostras de DV e biomassas residuais.



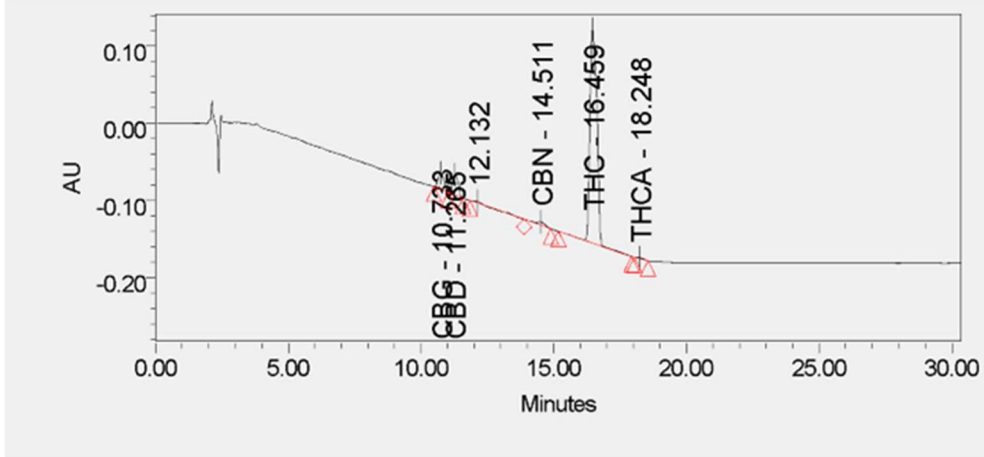
C



D



E



Fonte: Gerado pelo próprio autor a partir de dados obtidos pelas análises integradas pelo software Waters Empower™.

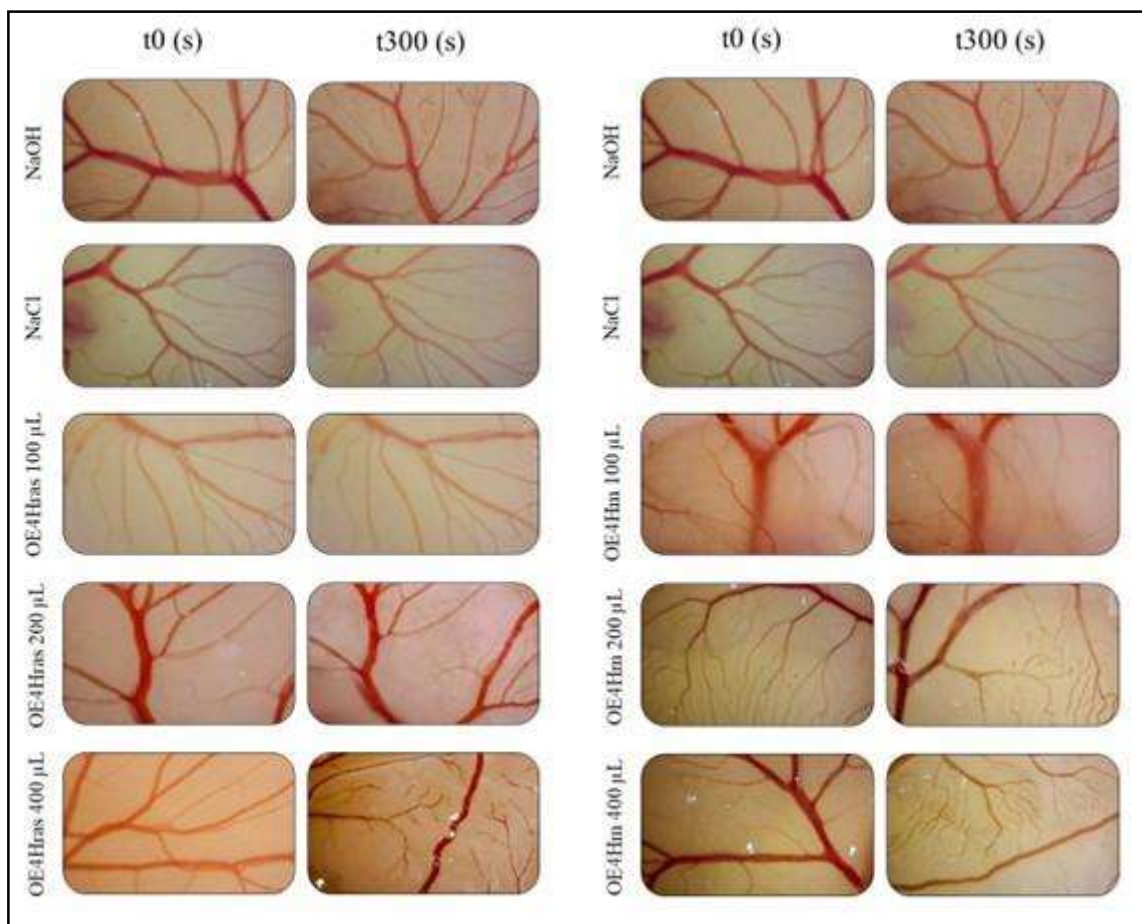
Legenda: Amostra de DV composta por inflorescências liofilizadas e moídas de *C. sativa* e amostras de biomassas residuais compostas pelos resíduos das extrações de cada experimento liofilizados e moídos. As condições cromatográficas foram: coluna de modo reverso NST C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m) e coluna de guarda Phenomex® (C18 4 x 3,0 mm, 5 μ m); FM composta por (A) água contendo 0,1 % de ácido fórmico e (B) acetonitrila; modo gradiente, aos 0 min 70,0 % B, aos 15 min 90,0 % B e aos 30 min 90,0 % B; volume de injeção de 20 μ L; vazão de 1,0 mL. min⁻¹; detecção foi de 190 a 400 nm (monitorados em 210, 225 e 270 nm); forno de coluna na temperatura de 35° C. (A') - Cromatograma de amostra de DV. (B') - Cromatograma de amostra de biomassa residual (DV rasurada) extraída por 2 h. (C) - Cromatograma de amostra de biomassa residual (DV rasurada) extraída por 3 h. (D) - Cromatograma de amostra de biomassa residual (DV rasurada) extraída por 4 h. (E) - Cromatograma de amostra de biomassa (DV moída) extraída por 4 h.

5.5 ENSAIO DA MEMBRANA CORIOALANTÓICA DE OVOS DE GALINHA (HET-CAM)

A administração de 300 μ L de NaOH 0,1 M na CAM resultou em hemorragia imediata e severa, seguida por lise e coagulação dos vasos sanguíneos.

As imagens dos vasos sanguíneos antes e após a aplicação dos compostos nos 8 grupos experimentais, registradas por estereoscópio, são apresentadas na Figura 16.

Figura 16 – Registro do estado dos vasos sanguíneos antes e após a aplicação dos compostos.



Fonte: Fotos registradas por Felipe Haddad, 2023

Legenda: t0: Registro de região vascularizada de ovos férteis antes da aplicação dos compostos; t300: Registro de região vascularizada de ovos férteis após a aplicação dos compostos; OE4Hras: amostras contendo OE obtido de DV rasurada (solução em tween 80 a 8%); OE4Hm: amostras contendo OE obtido de DV moída (solução em tween 80 a 8%); NaCl: controle positivo (solução de NaCl 0,9 %); NaOH controle negativo (solução contendo NaOH 0,1 M).

A pontuação média de irritação para o NaOH foi de $19,58 \pm 0,14$, confirmando sua natureza altamente irritante e prejudicial conforme dados apresentados na Tabela 8.

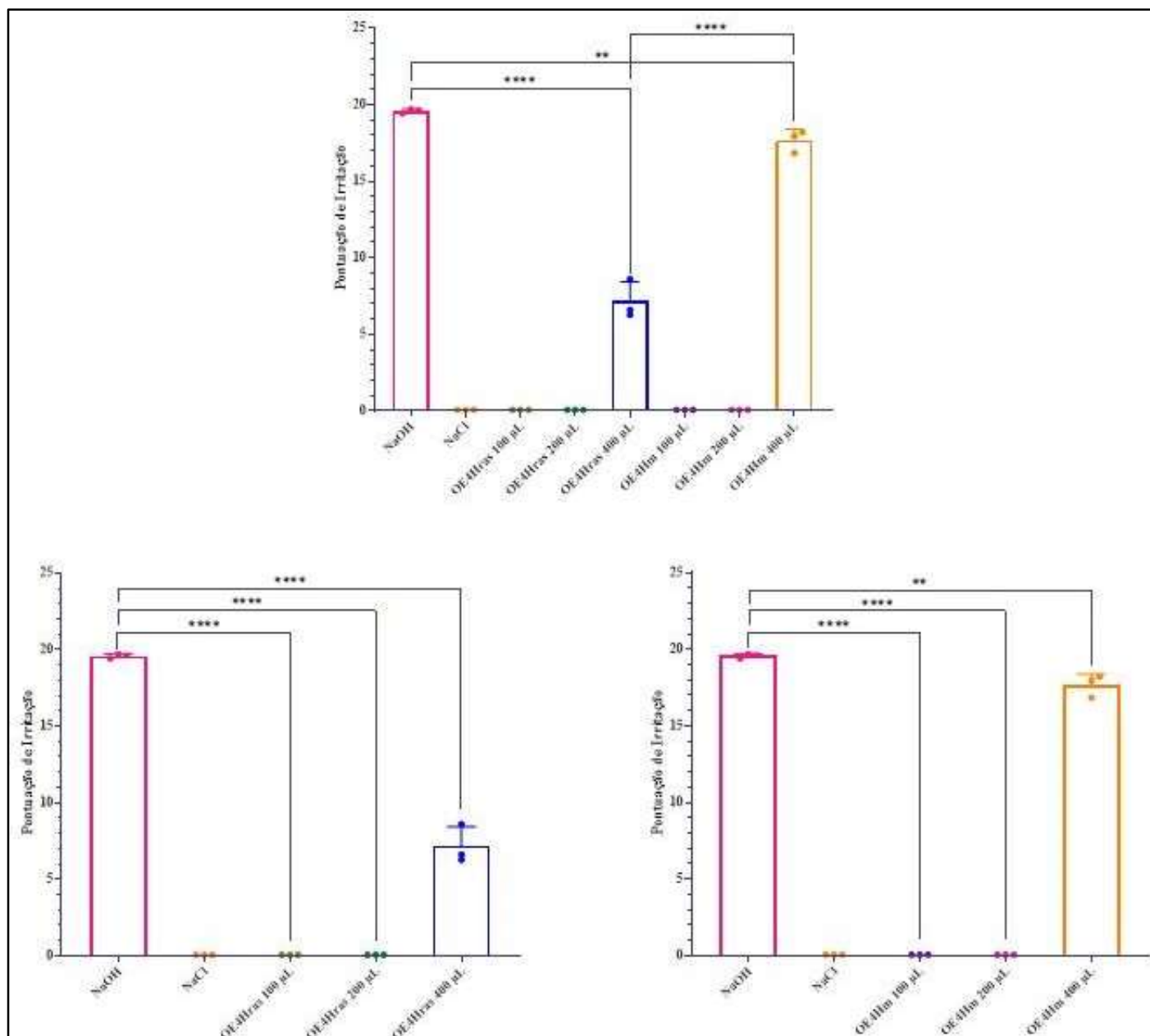
Tabela 8 - Tempo de hemorragia, lise, coagulação e pontuação de irritação dos controles e compostos testados.

Grupo/Embrião	Tempo Hemorragia (s)	Tempo Lise (s)	Tempo Coagulação (s)	Pontuação de Irritação
NaOH	17	7	31	19,69
NaOH	15	8	34	19,61
NaOH	24	16	29	19,43
Média ± DV	16,00 ± 1,41	7,50 ± 0,71	32,50 ± 2,12	19,58 ± 0,14
NaCl	300	300	300	0,07
NaCl	300	300	300	0,07
NaCl	300	300	300	0,07
Média ± DV	300	300	300	0,07
OE4Hras 100 µL	300	300	300	0,07
OE4Hras 100 µL	300	300	300	0,07
OE4Hras 100 µL	300	300	300	0,07
Média ± DV	300	300	300	0,07
OE4Hras 200 µL	300	300	300	0,07
OE4Hras 200 µL	300	300	300	0,07
OE4Hras 200 µL	300	300	300	0,07
Média ± DV	300	300	300	0,07
OE4Hras 400 µL	177	170	185	8,60
OE4Hras 400 µL	206	190	220	6,60
OE4Hras 400 µL	210	205	217	6,28
Média ± DV	197,67 ± 18,01	188,33 ± 17,56	207,33 ± 19,40	7,16 ± 1,26
OE4Hm 100 µL	300	300	300	0,07
OE4Hm 100 µL	300	300	300	0,07
OE4Hm 100 µL	300	300	300	0,07
Média ± DV	300	300	300	0,07 ± 0,00
OE4Hm 200 µL	300	300	300	0,07
OE4Hm 200 µL	300	300	300	0,07
OE4Hm 200 µL	300	300	300	0,07
Média ± DV	300	300	300	0,07 ± 0,00
OE4Hm 400 µL	40	30	50	18,20
OE4Hm 400 µL	45	37	50	17,96
OE4Hm 400 µL	60	55	65	16,84
Média ± DV	48,33 ± 10,41	40,67 ± 12,90	55,00 ± 8,66	17,67 ± 0,73

Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2024).

A análise estatística revelou que a irritação causada por NaOH foi significativamente maior ($p < 0,0001$) quando comparada aos outros grupos (Figura 17).

Figura 17 - Gráficos de Barras demonstrando a Pontuação de irritação observada na CAM.



**** p -valor < 0,0001;

** p -valor = 0,0063.

Fonte: Elaborado por Ana Luísa Gini e Caio Humberto Perego no software Excel (Microsoft 365).

Legenda: A observação da Pontuação de irritação se deu após 300 s da aplicação de diferentes concentrações de OE4Hras e OE4Hm e controles NaCl 0,9 %, e NaOH 0,1M.

Por outro lado, a aplicação de 300 μ L de solução de NaCl 0,9 % na CAM não induziu nenhuma resposta observável durante os 300 s de observação, resultando em uma pontuação de irritação média de 0,07, indicando a ausência de irritação. A diferença estatística entre o grupo NaCl e o grupo NaOH foi altamente significativa ($p < 0,0001$), confirmando a natureza não irritante do NaCl.

As amostras de OE extraído por hidrodestilação da DV rasurada (OE4Hras) e de OE extraído por hidrodestilação da DV moída (OE4Hm), testadas em concentrações de 100, 200 e 400 μL , mostraram diferentes níveis de irritação. Para as concentrações de 100 e 200 μL de ambas as amostras, não foi observada irritação significativa, com a pontuação de irritação média sendo de 0,07 em todos os casos, semelhante ao controle negativo, indicando que essas concentrações não induziram efeitos irritantes detectáveis (Tabela 8). A análise estatística não mostrou diferenças significativas entre essas amostras e o controle negativo (NaCl). Em relação ao controle positivo (NaOH), a diferença foi altamente significativa ($p < 0,0001$) (Figura 17).

No entanto, a concentração de 400 μL de OE4Hm resultou em uma pontuação de irritação de $17,67 \pm 0,73$, enquanto OE4Hras na mesma concentração apresentou uma pontuação de irritação de $7,16 \pm 1,26$. Estatisticamente, OE4Hm a 400 μL mostrou um efeito irritante significativamente maior em comparação com OE4Hras ($p < 0,0001$). Além disso, ao comparar OE4Hras com o controle positivo (NaOH), também houve uma diferença estatística significativa, confirmando que o NaOH é mais irritante que OE4Hras ($p < 0,0001$). Ao comparar NaOH com OE4Hm a 400 μL , a análise estatística também revelou uma diferença significativa, com um valor de $p = 0,0063$ (Tabela 8 e Figura 17).

Esses resultados sugerem que, enquanto o NaOH é um potente irritante, as concentrações mais baixas de OE4Hras e OE4Hm (100 e 200 μL) não provocaram irritação na CAM. Por outro lado, a concentração mais alta (400 μL) mostrou um efeito irritante significativo, com OE4Hm sendo mais irritante que OE4Hras.

Os resultados dos experimentos utilizando a pontuação HET-CAM demonstraram variações significativas na irritação causada pelos diferentes compostos aplicados nos vasos sanguíneos da CAM. A administração de 300 μL de solução de NaCl 0,9 % não causou nenhuma resposta observável durante os 300 s, resultando em uma pontuação HET-CAM de 0, indicando ausência total de irritação. Em contraste, a aplicação de 300 μL de NaOH 0,1 M provocou uma reação severa, caracterizada por hemorragia imediata, lise e coagulação, resultando em uma pontuação HET-CAM de 3. Isso confirma que o NaOH é um irritante potente e altamente prejudicial para os vasos sanguíneos da CAM (Tabela 8).

As amostras OE4Hras e OE4Hm também mostraram variações na irritação causada, dependendo da concentração aplicada. Em concentrações de 100 e 200 μL , tanto OE4Hras quanto OE4Hm não causaram nenhuma irritação significativa, com pontuações HET-CAM de 0, semelhantes ao controle negativo (NaCl). No entanto, na concentração de 400 μL , OE4Hras e OE4Hm resultaram em uma pontuação HET-CAM de 2, indicando uma irritação moderada. Esses resultados sugerem que, enquanto as concentrações mais baixas desses OE são não

irritantes, a concentração mais alta de 400 μL pode causar uma irritação moderada nos vasos sanguíneos da CAM (Tabela 8).

Dessa forma, enquanto o NaOH foi identificado como um potente irritante, as amostras OE4Hras e OE4Hm, em concentrações de 100 e 200 μL , foram consideradas seguras, sem provocar irritação significativa. Entretanto, a aplicação de 400 μL dessas amostras resultou em uma irritação moderada, destacando a importância da dosagem na avaliação de irritabilidade.

A Tabela 9 apresenta a pontuação HET-CAM dos controles e amostras OE extraídos durante 4 h para DV rasurada e DV moída nas diferentes concentrações testadas.

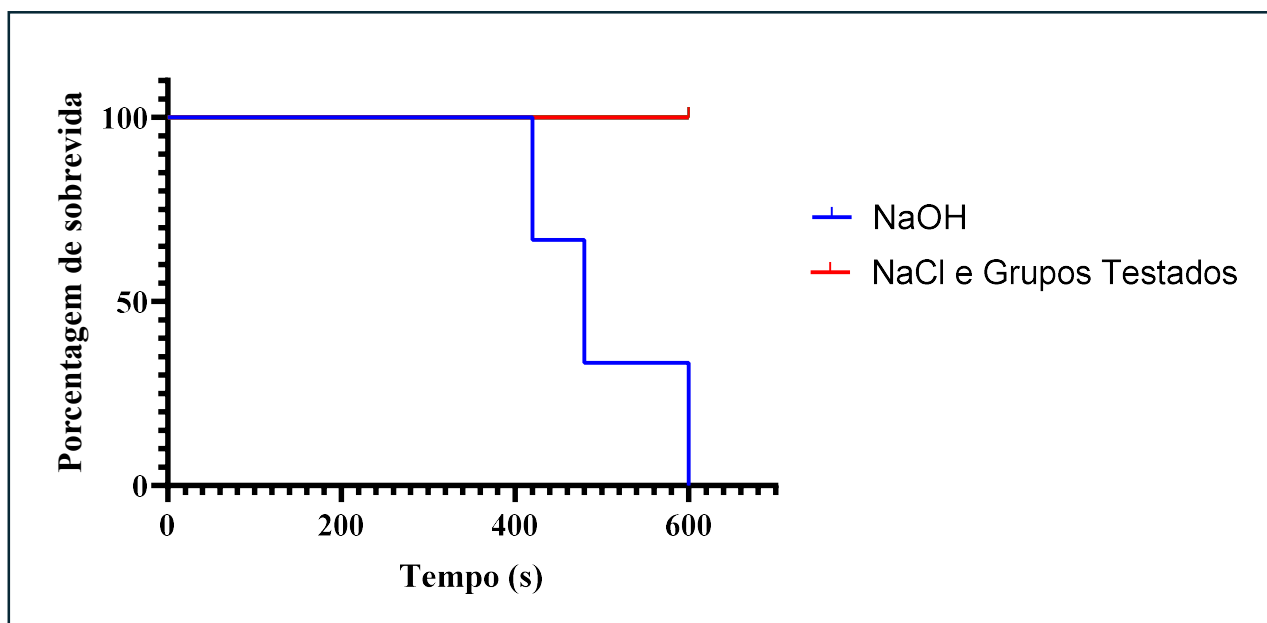
Tabela 9 - Pontuação HET-CAM dos controles e amostras OE4Hras e OE4Hm nas diferentes concentrações testadas.

Grupo	Pontuação HET-CAM	Média
NaOH	3	3
	3	
	3	
NaCl	0	-
	0	
	0	
OE4Hras 100 μL	0	-
	0	
	0	
OE4Hras 200 μL	0	-
	0	
	0	
OE4Hras 400 μL	2	2
	2	
	2	
OE4Hm 100 μL	0	-
	0	
	0	
OE4Hm 200 μL	0	-
	0	
	0	
OE4Hm 400 μL	2	2
	2	
	2	

Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2024).

Os dados de sobrevivência dos embriões tratados com diferentes compostos foram analisados ao longo de 600 s (10 min). Os embriões tratados com NaCl 0,9 % mantiveram uma taxa de sobrevivência de 100 % durante todo o experimento, indicando a segurança desse composto. Em contraste, os embriões tratados com NaOH 0,1 M apresentaram uma significativa redução na taxa de sobrevivência, com morte de todos os embriões antes dos 600 s, destacando a alta toxicidade desse composto (Figura 18).

Figura 18 - Porcentagem de sobrevivência dos embriões ao longo do tempo após tratamento **com** diferentes amostras



Fonte: Elaborado por Ana Luísa Gini e Caio Humberto Perego no software Excel (Microsoft 365).

Legenda: Gráfico de Linhas apresentando a sobrevivência dos grupos testados com as amostras, o controle positivo e o controle negativo.

Os extratos testados (OE4Hras e OE4Hm) em todas as concentrações (100, 200 e 400 μL) também mantiveram uma taxa de sobrevivência de 100 %, sugerindo que não apresentam toxicidade significativa dentro do período de observação, conforme evidenciado pelo gráfico. Esses resultados reforçam a segurança dos extratos em comparação ao NaOH, que demonstrou uma toxicidade acentuada (Figura 18).

A análise da irritabilidade e segurança de OE4Hras e OE4H, realizada neste estudo revela implicações significativas para suas potenciais aplicações farmacêuticas, cosméticas e alimentícias. Utilizando a CAM como modelo, foi possível investigar a resposta irritativa e a integridade vascular após a exposição a diferentes concentrações dos extratos.

Nas concentrações de 100 e 200 μL , tanto OE4Hras quanto OE4Hm demonstraram um perfil de segurança favorável, sem provocar irritação significativa. Isso foi evidenciado pelas pontuações de irritação e HET-CAM, indicando que os extratos, nessas doses, mantêm a integridade dos vasos sanguíneos da CAM. A ausência de irritação nestas concentrações sugere que esses extratos são promissores para uso em formulações que requerem alta segurança, como produtos tópicos destinados a peles sensíveis ou para aplicação prolongada.

Por outro lado, ao aumentar a concentração para 400 μ L, observou-se um aumento significativo na irritabilidade, especialmente para OE4Hm. A pontuação de irritação para OE4Hm a 400 μ L foi de $17,67 \pm 0,73$, consideravelmente maior que a de OE4Hras na mesma concentração, que foi de $7,16 \pm 1,26$. Essa diferença, estatisticamente significativa ($p < 0,0001$), indica que OE4Hm contém componentes com maior potencial irritante em doses mais elevadas. A pontuação HET-CAM de 2 para ambos os extratos nesta concentração sugere uma irritação moderada, destacando a importância da dosagem na resposta irritativa da CAM.

Dessa forma, torna-se evidente a necessidade de um controle rigoroso na dosagem de produtos contendo OE4Hras e OE4Hm. Embora as concentrações mais baixas tenham se mostrado seguras, a concentração de 400 μ L resultou em um nível de irritação que pode limitar a aplicabilidade desses extratos em formulações tópicas, a menos que medidas sejam tomadas para mitigar os efeitos adversos. A maior irritabilidade observada em OE4Hm, em comparação com OE4Hras, sugere uma diferença significativa na composição química dos OE, possivelmente devido à presença de componentes mais reativos ou em maior concentração em OE4Hm. Isso ressalta a necessidade de uma caracterização química detalhada para identificar os componentes responsáveis pela irritação e ajustar as formulações para melhorar a segurança.

A análise por CCD revelou que os perfis químicos de todos os OE obtidos são semelhantes. No entanto, apenas análises mais detalhadas por CG-MS e CG-FID podem fornecer informações precisas sobre possíveis variações na composição química e quantificação de cada composto identificado nos diferentes OE. Essas análises são fundamentais para dar continuidade aos estudos experimentais ou para consultas na literatura científica, a fim de identificar quais componentes presentes nos OE extraídos por 4 h de DV rasurada ou moída poderiam estar associados à irritação observada no modelo biológico testado.

Até o momento, não foi concedida a Autorização Especial Simplificada para Estabelecimentos de Ensino e Pesquisa (AEP), expedida pela ANVISA, e necessária para que a Associação Flor da Vida forneça derivados vegetais de *C. sativa* à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista (FCF-UNESP). A obtenção dessa autorização é crucial para garantir a segurança jurídica dos colaboradores dos projetos de pesquisa envolvendo *C. sativa* e permitir a realização das análises químicas dos OE por CG-MS e CG-FID, além de diversos outros experimentos com a planta.

Não foram encontrados dados na literatura científica sobre o teste HET-CAM com amostras de OE ou extratos de *C. sativa* ou outras plantas da família Cannabaceae. No entanto, a ação anti-inflamatória dos compostos (*E*)-cariofileno e α -humuleno, isolados quimicamente a partir de *Varronia curassavica* Jacq., foi observada por Fernandes *et al.* (2007). Isso motivou a

busca por estudos envolvendo o ensaio HET-CAM em outras plantas cujo OE contenha esses dois sesquiterpenos majoritários, a fim de comparar os resultados obtidos com *C. sativa*, onde (*E*)-cariofileno e α -humuleno também foram identificados entre os componentes majoritários do OE.

Foi encontrado um estudo com teste HET-CAM utilizando o OE da planta *Eugenia dysenterica* DC. conhecida como cagaita (Mazutti *et al.*, 2018), e as concentrações dos OE foram similares aos níveis de 100, 200 e 400 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ do OE de *C. sativa* testados no ensaio HET-CAM. O OE de *E. dysenterica* foi analisado por CG-MS por Mazutti *et al.*, (2018) que relatou altas concentrações de compostos sesquiterpênicos bioativos, como (*E*)-cariofileno e α -humuleno. O OE diluído em azeite de oliva (veículo) foi testado no ensaio HET-CAM nas concentrações 73, 146, 292, 584, e 1168 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ apresentando resultados ação angiogênica e anti-inflamatória nas amostras com concentrações 73, 146, 292 $\mu\text{g. mL}^{-1}$. Nas amostras com concentrações mais altas efeitos de irritação foram desencadeados, como danos vasculares leves (584 $\mu\text{g. mL}^{-1}$) e moderados (1168 $\mu\text{g. mL}^{-1}$).

6. CONCLUSÕES

Na determinação do teor de OE segundo a Farmacopeia Brasileira 6ª edição e nos experimentos com extrações por hidrodestilação variando os parâmetros estado de fragmentação e tempo de extração (para DV rasurada) não foram observadas diferenças significativas no teor de OE das inflorescências secas de *C. sativa*.

A análise por CCD demonstrou mesmo perfil cromatográfico para todos OE e permitiu a identificação dos sesquiterpenos (*E*)-cariofileno e α -humuleno como componentes químicos majoritários do OE de *C. sativa*.

A análise da DV por CLAE-UV demonstrou que a planta produziu THC potencial nas inflorescências dentro da faixa informada pelo fornecedor das sementes. A análise por CLAE-UV da biomassa residual recuperada após as extrações de OE por hidrodestilação, demonstrou que as amostras de todos os experimentos realizados contêm quantidades significativas de THC e níveis baixos ou não detectáveis de CBN, podendo ser reaproveitadas na cadeia produtiva do óleo essencial para obtenção dessa substância.

O teste HET-CAM das amostras contendo solução de OE extraído por hidrodestilação de DV rasurada e DV moída demonstrou que as concentrações mais baixas são seguras (100 e 200 μ L). A concentração de 400 μ L apresentou pontuação alta de irritação nos OE obtidos nos dois experimentos, o que sugere que a composição química dos óleos essenciais (OE) avaliados deve ser distinta, sendo essa diferença a provável causa das variações nas pontuações de irritação da CAM observadas para a concentração de 400 μ L. mL⁻¹ do OE extraído de DV rasurada e DV moída.

O desenvolvimento da metodologia proposta neste projeto de pesquisa demonstrou que a influência dos parâmetros de extração por hidrodestilação (tempo de extração e fragmentação do material), resultou em composições químicas distintas nos óleos essenciais obtidos do mesmo material, e consequentemente, interferiu na sua toxicidade avaliada no modelo HET-CAM.

REFERÊNCIAS

- AAZZA, Smail; LYOUSSE, Badiâ; MIGUEL, Maria G. Antioxidant activity of some Moroccan hydrosols. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 30, p. 6688-6696, 2011.
- ABDEL-KADER, Maged S. *et al.* Chemistry and Biological Activities of Cannflavins of the Cannabis Plant. **Cannabis and Cannabinoid Research**, 2023.
- ADAMS, Robert P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 5 online ed. Gruver, TX USA: **Texensis Publishing**, 2017.
- ADDU, Philip Wiredu *et al.* Cannabis chemistry, post-harvest processing methods and secondary metabolite profiling: A review. **Industrial Crops and Products**, v. 170, p. 113743, 2021.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Anvisa). **Registrado primeiro medicamento à base de *Cannabis sativa***. Brasília, DF: Anvisa, 2018. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2018/registrado-primeiro-medicamento-a-base-de-cannabis-sativa>. Acesso em: 3 nov. 2023.
- AHMED, Abdul Qudeer.; NOSHAD, David.; LI, Paul. CH. Quantification of cannabinoids in cultivars of Cannabis sp. by gas chromatography–mass spectrometry. **Chromatographia**, v. 84, n. 8, p. 711-717, 2021.
- AIZPURUA-OLAIZOLA, Oier. *et al.* Evolution of the cannabinoid and terpene content during the growth of Cannabis sativa plants from different chemotypes. **Journal of natural products**, v. 79, n. 2, p. 324-331, 2016.
- AKRAM, Hina; MOKRYSZ, Claire; CURRAN, H. Valerie. What are the psychological effects of using synthetic cannabinoids? A systematic review. **Journal of Psychopharmacology**, v. 33, n. 3, p. 271-283, 2019.
- ANAND, Uma. *et al.* Cannabis-based medicines and pain: A review of potential synergistic and entourage effects. **Pain management**, v. 11, n. 4, p. 395-403, 2021.
- ARIF, Muhammad *et al.* Cannabis sativa L.-An Important Medicinal Plant: A Review of its Phytochemistry, Pharmacological Activities and Applications in Sustainable Economy. **International Journal of Pharma Professional's Research (IJPPR)**, v. 14, n. 3, p. 43-59, 2023.
- ASCRIZZI, Roberta., IANNONE, M., CINQUE, G., MARIANELLI, A., PISTELLI, L., & FLAMINI, G. (2020). "Hemping" the drinks: Aromatizing alcoholic beverages with a blend of Cannabis sativa L. flowers. **Food chemistry**, 325, 126909.
- BAKKALI, Fadil *et al.* Biological effects of essential oils—a review. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BARROS, Jesse. Cannabis – Da proibição ao uso terapêutico e alternativa socioeconômica: uma revisão de literatura. **Revista Iberoamericana de Psicologia**, v. 1, n. 2, p. 63-81, 2023.

BATISTA-DUHARTE, A., *et al.* The Hen's Egg Test on Chorioallantoic Membrane. **International Journal of Toxicology**, (2016) 35(6), 627–633.
<https://doi.org/10.1177/1091581816672187>

BAUTISTA, Johanna L.; YU, Shu; TIAN, Li. Flavonoids in Cannabis sativa: Biosynthesis, bioactivities, and biotechnology. **ACS omega**, v. 6, n. 8, p. 5119-5123, 2021.

BEAL, Kerry. "Considerations in the addition of cannabis to chocolate." **Current Opinion in Food Science** 28 (2019): 14-17.

BENELLI, Giovanni *et al.* "The essential oil from industrial hemp (Cannabis sativa L.) by-products as an effective tool for insect pest management in organic crops." **Industrial crops and products** 122 (2018): 308-315.

BILIA, Anna Rita *et al.* Essential oils loaded in nanosystems: a developing strategy for a successful therapeutic approach. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 2014, 2014.

BINELLO, Arianna *et al.* A new prototype reactor for the fast microwave-assisted decarboxylation and extraction of cannabinoids in olive oil from Cannabis inflorescences. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 36, p. 101303, 2023.

BIZZO, Humberto R.; REZENDE, Claudia M. The market of essential oils in Brazil and in the world in the last decade. 2022.

BLAKE, A., ISTOK N. "The evolving landscape of cannabis edibles." **Current Opinion in Food Science** 28 (2019): 25-31.

BONINI, Sara Anna *et al.* *Cannabis sativa*: A comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 227, p. 300-315, 2018.

BOONSRI, Prachya; LIMPIYAKORN, Yachai. Semi-Automated Image Annotation for Cannabis Seed Gender Detection Model. In: **2023 IEEE 3rd International Conference on Software Engineering and Artificial Intelligence (SEAI)**. IEEE, 2023. p. 189-193.

BOOTH, Judith K.; PAGE, Jonathan E.; BOHLMANN, Jörg. Terpene synthases from *Cannabis sativa*. **Plos one**, v. 12, n. 3, p. e0173911, 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**. 6. ed. Brasília, DF: Anvisa, 2019. v. 1.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n. 141, p. 87, 25 jul. 2017. Disponível em:
https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401. Acesso em: 13 ago. 2024.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 325, de 3 de dezembro de 2019. Dispõe sobre a atualização do Anexo I (Listas de Substâncias Entorpecentes, Psicotrópicas, Precursoras e Outras sob Controle Especial) da Portaria SVS/MS nº 344, de 12 de maio de 1998. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n. 234, p. 192, 4 dez. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução – RDC Nº 660 de 30 de março de 2020. Define os critérios e os procedimentos para a importação de Produto derivado de Cannabis, por pessoa física, para uso próprio, mediante prescrição de profissional legalmente habilitado, para tratamento de saúde. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 31 de mar. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 344, de 12 de maio de 1998. Aprova o Regulamento Técnico sobre substâncias e medicamentos sujeitos a controle especial. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, ano 136, n. 91, p. 37-51, 15 maio 1998.

BRASIL. Supremo Tribunal Federal. Recurso Extraordinário nº 635.659/SP. Relator: Ministro Gilmar Mendes. Julgamento em: 26 jun. 2024. **Diário da Justiça Eletrônico**: n. 147, divulgado em: 25 jul. 2024, publicado em: 26 jul. 2024. Tema 506 de Repercussão Geral. Disponível em: <https://portal.stf.jus.br/jurisprudenciaRepercussao/verAndamentoProcesso.asp?incidente=4034145&numeroProcesso=635659&classeProcesso=RE&numeroTema=506>. Acesso em: 15 ago. 2024.

BRUTLAG, Ahna; HOMMERDING, Holly. Toxicology of marijuana, synthetic cannabinoids, and cannabidiol in dogs and cats. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 48, n. 6, p. 1087-1102, 2018.

CARLINI, Elisaldo Araújo. A história da maconha no Brasil. **Jornal brasileiro de psiquiatria**, v. 55, p. 314-317, 2006.

CARVALHO, Flávio A. *et al.* Casearia sylvestris essential oil degradation products generated by leaf processing. **Chemistry & Biodiversity**, v. 18, n. 6, p. e2000880, 2021.

CERRATO, Andrea *et al.* Phytocannabinomics: Untargeted metabolomics as a tool for cannabis chemovar differentiation. **Talanta**, [s. l.], v. 230, p. 122313, 2021.

CERVEJA brasileira tem aroma e sabor de maconha, mas sem barato; entenda. *In*: **Folha de Pernambuco**. Recife, 1 maio 2023. Disponível em: <https://www.folhape.com.br/noticias/cerveja-brasileira-tem-aroma-e-sabor-de-maconha-mas-sem-barato/268587/>. Acesso em: 29 out. 2023.

CHEN, Chang; PAN, Zhongli. Cannabidiol and terpenes from hemp—ingredients for future foods and processing technologies. **Journal of Future Foods**, v. 1, n. 2, p. 113-127, 2021.

COUNCIL OF EUROPE. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. **European Pharmacopoeia**. 7th ed. Strasbourg: Council of Europe, 2010.

COUNCIL OF EUROPE. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. **European Pharmacopoeia**. 7th ed. Strasbourg: Council of Europe, 2011. p. 673-677.

CRAVEIRO, A. A. *et al.* Microwave oven extraction of an essential oil. **Flavour and Fragrance Journal**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 43-44, 1989.

CUNHA, Jomar. M. *et al.* Chronic administration of cannabidiol to healthy volunteers and epileptic patients. **Pharmacology**, v. 21, n. 3, p. 175-185, 1980.

DANG, Michelle; ARACHCHIGE, Nishara Muthu; CAMPBELL, Lesley G. Optimizing photoperiod switch to maximize floral biomass and cannabinoid yield in *Cannabis sativa* L.: A meta-analytic quantile regression approach. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 797425, 2022.

DE QUADROS, Adriel José; SILVA, Maria Isabel Formoso Cardoso. Proibicionismo e (des) proteção social: reflexões sobre os paradoxos da relação entre estado e associações cannabicas. **O Social em Questão**, v. 1, n. 54, p. 329-350, 2022.

DELGADO, I. F. *et al.* Atlas do Método HET-CAM: protocolo ilustrado aplicado à avaliação de toxicidade ocular. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2023. Disponível em: <https://educare.fiocruz.br/>. Acesso em: 15 set. 2024.

DEVANE, William A. *et al.* Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. **Science**, v. 258, n. 5090, p. 1946-1949, 1992.

DHIFI, Wissal *et al.* Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: A critical review. **Medicines**, v. 3, n. 4, p. 25, 2016.

DI GIACOMO, Angelo; DI GIACOMO, Giovanni. Essential oil production. Citrus: The genus citrus, p. 114-147, 2002.

DRINIĆ, Zorica *et al.* Microwave-assisted extraction of cannabinoids and antioxidants from *Cannabis sativa* aerial parts and process modeling. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 95, n. 3, p. 831-839, 2020.

DUGGAN, Peter J. The chemistry of cannabis and cannabinoids. **Australian Journal of Chemistry**, v. 74, n. 6, p. 369-387, 2021.

ERRIDGE, Simon *et al.* Cannflavins—From plant to patient: A scoping review. **Fitoterapia**, v. 146, p. 104712, 2020.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Title of the scientific opinion/article. **EFSA Journal**, [s. l.], v. 20, n. 6, e07322, 2022. Disponível em: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.2903/j.efsa.2022.7322>. Acesso em: 26 abr. 2023.

EUROPEAN COMMISSION. **Conference: the knowledge-based bio-economy**. Brussels: EC, 2005. Disponível em: <https://cordis.europa.eu/event/id/24073-conference-the-knowledgebased-bioeconomy>. Acesso em: 29 out. 2023.

FANTEGROSSI, William E. *et al.* Distinct pharmacology and metabolism of K2 synthetic cannabinoids compared to Δ^9 -THC: mechanism underlying greater toxicity?. **Life sciences**, v. 97, n. 1, p. 45-54, 2014.

FARINON, Barbara *et al.* The seed of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.): Nutritional quality and potential functionality for human health and nutrition. **Nutrients**, [s. l.], v. 12, n. 7, p. 1935, 2020.

FEI, Tao. *et al.* Nanoemulsions of terpene by-products from cannabidiol production have promising insecticidal effect on *Callosobruchus maculatus*. **Heliyon**, v. 9, n. 4, 2023.

FERNANDES, Elizabeth S. *et al.* Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (–)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 569, n. 3, p. 228-236, 2007.

FERREIRA, Marcia Miguel Castro Quimiometria: conceitos, métodos e aplicações. Campinas: Editora da UNICAMP, 2015.

FIGUEIREDO, A. Cristina *et al.* Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance journal**, v. 23, n. 4, p. 213-226, 2008.

FIORINI, Dennis *et al.* Valorizing industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) by-products: Cannabidiol enrichment in the inflorescence essential oil optimizing sample pre-treatment prior to distillation. **Industrial Crops and Products**, v. 128, p. 581-589, 2019.

FIORINI, Dennis *et al.* Cannabidiol-enriched hemp essential oil obtained by an optimized microwave-assisted extraction using a central composite design. **Industrial Crops and Products**, v. 154, p. 112688, 2020.

FLAJŠMAN, Marko; SLAPNIK, Miha; MUROVEC, Jana. Production of feminized seeds of high CBD *Cannabis sativa* L. by manipulation of sex expression and its application to breeding. **Frontiers in plant science**, v. 12, p. 718092, 2021.

GAONI, Yehiel; MECHOULAM, Raphael. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. **Journal of the American Chemical Society**, [s. l.], v. 86, n. 8, p. 1646-1647, 1964.

GASTON, T. E. *et al.* “Natural” is not synonymous with “Safe”: Toxicity of natural products alone and in combination with pharmaceutical agents. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, [s. l.], v. 113, e104642, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2020.104642>. Acesso em: 15 set. 2024.

GOBBO-NETO, Leonardo; LOPES, Norberto P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química nova**, v. 30, p. 374-381, 2007.

GOLIA, Evangelia. E. *et al.* "Investigating the potential of heavy metal accumulation from hemp. The use of industrial hemp (*Cannabis Sativa* L.) for phytoremediation of heavily and moderated polluted soils." **Sustainable Chemistry and Pharmacy** 31 (2023): 100961.

GOMES, Ana Lúcia Pires. **Cannabis**: the new trendy ingredient in skincare. 2021. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2021.

GOPALAKRISHNAN, N. Studies on the storage quality of carbon dioxide-extracted cardamom and clove bud oils. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 42, n. 3, p. 796-798, 1994.

GOVINDARAJAN, Rasiravathanahalli Kaveriyappan *et al.* Biosynthesis of Phytocannabinoids and Structural Insights: A Review. **Metabolites**, v. 13, n. 3, p. 442, 2023.

GRAND VIEW RESEARCH (GVR). **Flavors and Fragrances Market Size, Share & Trends Analysis Report**: by product (aroma chemicals, natural), by application (flavors, fragrances), by region, and segment forecasts, 2024 - 2030. San Francisco: GVR, 2024. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/flavors-fragrances-market>. Acesso em: 1 ago. 2024.

GRAY, Dennis J.; CLARKE, Robert C.; TRIGIANO, Robert N. Introduction to the special issue on cannabis. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 35, n. 5-6, p. 289-292, 2016.

GUL, Waseem. *et al.* Determination of 11 cannabinoids in biomass and extracts of different varieties of Cannabis using high-performance liquid chromatography. **Journal of AOAC International**, v. 98, n. 6, p. 1523-1528, 2015.

HADIDI, M. *et al.* Nanoencapsulation of essential oils from industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) by-products into alfalfa protein nanoparticles. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 386, e132765, 2022.

HAMDI, Assia. *et al.* Phytotoxic activities of essential oils and hydrosols of *Haplophyllum tuberculatum*. **Industrial Crops and Products**, v. 97, p. 440-447, 2017.

HANUŠ, Lumír Ondřej; HOD, Yotam. Terpenes/terpenoids in cannabis: are they important?. **Medical Cannabis and Cannabinoids**, v. 3, n. 1, p. 25-60, 2020.

HESAMI, Mohsen; JONES, Andrew Maxwell Phineas. Potential roles of epigenetic memory on the quality of clonal cannabis plants: Content and profile of secondary metabolites. In: Medicinal Usage of Cannabis and Cannabinoids. **Academic Press**, 2023. p. 91-104.

IBRAHIM, Elsayed A. *et al.* Analysis of terpenes in *Cannabis sativa* L. using GC/MS: method development, validation, and application. **Planta medica**, v. 85, n. 05, p. 431-438, 2019.

INNES, Peter A.; VERGARA, Daniela. Genomic description of critical cannabinoid biosynthesis genes. **Botany**, 2023.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). **ISO 9235**: aromatic natural raw materials: vocabulary. Geneva: ISO, 2013.

JAMI, Tarun; KARADE, Sukhdeo R.; SINGH, Lok Pratap. Current Trends in Applications of Cannabis/Hemp in Construction. In: Cannabis/Hemp for Sustainable **Agriculture and Materials**. Singapore: Springer Singapore, 2022. p. 203-237.

- JANATOVÁ, Anežka. *et al.* Yield and cannabinoids contents in different cannabis (*Cannabis sativa* L.) genotypes for medical use. **Industrial crops and products**, v. 112, p. 363-367, 2018.
- JIANG, Zuodong; KEMPINSKI, Chase; CHAPPELL, Joe. Extraction and analysis of terpenes/terpenoids. **Current protocols in plant biology**, v. 1, n. 2, p. 345-358, 2016.
- JIN, Dan *et al.* Secondary metabolites profiled in cannabis inflorescences, leaves, stem barks, and roots for medicinal purposes. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 3309, 2020.
- JUGREET, B. Sharmeen *et al.* Chemistry, bioactivities, mode of action and industrial applications of essential oils. **Trends in Food Science & Technology**, v. 101, p. 89-105, 2020.
- KARCHE, Tahseen *et al.* The application of hemp (*Cannabis sativa* L.) for a green economy: A review. **Turkish Journal of Botany**, [s. l.], v. 43, n. 6, p. 710-723, 2019.
- KILARU, Aruna; CHAPMAN, Kent D. The endocannabinoid system. **Essays in Biochemistry**, v. 64, n. 3, p. 485-499, 2020.
- KINGHORN, A. Douglas. *et al.* Phytocannabinoids. Springer International Pu, 2017.
- KLIR, Željka; NOVOSELEC, Josip; ANTUNOVIĆ, Zvonko. An overview on the use of hemp (*Cannabis sativa* L.) in animal nutrition. **Poljoprivreda**, v. 25, n. 2, p. 52-61, 2019.
- KRASZKIEWICZ, Artur *et al.* Assessment of the possibility of using hemp biomass (*Cannabis sativa* L.) for energy purposes: a case study. **Applied Sciences**, [s. l.], v. 9, n. 20, p. 4437, 2019.
- KNÖRZER, Karl-Heinz. 3000 years of agriculture in a valley of the High Himalayas. **Vegetation history and archaeobotany**, v. 9, p. 219-222, 2000.
- KUZEY, Camila de Abreu. **Óleos essenciais: aspectos gerais e potencialidades**. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Farroupilha, Santo Ângelo, 2021. Disponível em: <https://arandu.iffarroupilha.edu.br/handle/itemid/157>. Acesso em: 15 set. 2024
- LANGFORD, Alan M.; BOLTON, Jennifer R. Synthetic cannabinoids: Variety is definitely not the spice of life. **Journal of forensic and legal medicine**, v. 59, p. 36-38, 2018.
- LI, Y. *et al.* Solvent-free microwave extraction of bioactive compounds provides a tool for green analytical chemistry. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 47, p. 1-11, 2013.
- LÖFFLER, Jessica. *et al.*, Comparison of Quantification of Target-Specific Accumulation of [¹⁸F]F-siPSMA-14 in the HET-CAM Model and in Mice Using PET/MRI. **Cancers**. v. 13. n. 16. 2021.

LORENSEN, Marcus Daniel Brandbjerg Bohn. *et al.* Leaves of *Cannabis sativa* and their trichomes studied by DESI and MALDI mass spectrometry imaging for their contents of cannabinoids and flavonoids. **Phytochemical Analysis**, v. 34, n. 3, p. 269-279, 2023.

LOWE, Henry. *et al.* Non-cannabinoid metabolites of *Cannabis sativa* L. with therapeutic potential. **Plants**, v. 10, n. 2, p. 400, 2021.

LUBELL, Jessica D.; BRAND, Mark H. Foliar sprays of silver thiosulfate produce male flowers on female hemp plants. **HortTechnology**, v. 28, n. 6, p. 743-747, 2018.

LUCCHESI, Marie E.; CHEMAT, Farid; SMADJA, Jacqueline. Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. **Journal of Chromatography A**, v. 1043, n. 2, p. 323-327, 2004.

LUNARDON, Jonas Araujo. Maconha, Capoeira e Samba: a construção do proibicionismo como uma política de criminalização social. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE CIÊNCIA POLÍTICA, 1., 2015, Porto Alegre. **Anais [...]**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2015.

MAAYAH, Zaid H. *et al.* The molecular mechanisms that underpin the biological benefits of full-spectrum cannabis extract in the treatment of neuropathic pain and inflammation. **Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis Of Disease**, v. 1866, n. 7, p. 165771, 2020.

MABOU, Florence Déclaire; YOSSA, Irma Belinda Nzeuwa. TERPENES: Structural classification and biological activities. **IOSR J. Pharm. Biol. Sci.** e-ISSN, v. 16, p. 2319-7676, 2021.

MALABADI, Ravindra B. *et al.* *Cannabis sativa*: Dioecious into Monoecious Plants influencing Sex Determination. **International Journal of Research and Innovations in Applied Science (IJRIAS)**, v. 8, n. 7, p. 82-91, 2023.

MANSOURI, H.; ASRAR, Z. Effects of abscisic acid on content and biosynthesis of terpenoids in *Cannabis sativa* at vegetative stage. **Biologia plantarum**, v. 56, n. 1, p. 153-156, 2012.

MARZO, Vincenzo Di; PETROCELLIS, Luciano De. Synthetic, and endogenous cannabinoids in medicine. **Annu. Rev. Med.**, v. 57, p. 553-574, 2006.

MASYITA, Ayu *et al.* Terpenes and terpenoids as main bioactive compounds of essential oils, their roles in human health and potential application as natural food preservatives. **Food chemistry: X**, v. 13, p. 100217, 2022.

MAZUTTI DA SILVA, Sandra Márcia *et al.* Wound healing effect of essential oil extracted from *Eugenia dysenterica* DC (Myrtaceae) leaves. **Molecules**, v. 24, n. 1, p. 2, 2018.

MAZZARA, Eugenia *et al.* Green extraction of hemp (*Cannabis sativa* L.) using microwave method for recovery of three valuable fractions (essential oil, phenolic compounds and cannabinoids): A central composite design optimization study. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 102, n. 14, p. 6220-6235, 2022.

MCPARTLAND, John M. Cannabis systematics at the levels of family, genus, and species. **Cannabis and cannabinoid research**, v. 3, n. 1, p. 203-212, 2018.

MCPARTLAND, John M.; SMALL, E. A classification of endangered high-THC cannabis (*Cannabis sativa* subsp. *indica*) domesticates and their wild relatives. **PhytoKeys**, v. 144, p. 81, 2020.

MEEHAN-ATRASH, Jiries; RAHMAN, Irfan. Cannabis vaping: existing and emerging modalities, chemistry, and pulmonary toxicology. **Chemical research in toxicology**, v. 34, n. 10, p. 2169-2179, 2021.

MICALIZZI, Giuseppe *et al.* Cannabis Sativa L.: A comprehensive review on the analytical methodologies for cannabinoids and terpenes characterization. **Journal of Chromatography A**, v. 1637, p. 461864, 2021.

MILESTONE. **Microwave Extraction for Natural Products**: ETHOS X microwave green extraction. [S. l.]: Milestone, c2026. Disponível em: <https://www.milestonesci.com/microwave-extraction-systems/ethos-x-microwave-extraction-for-natural-products/>. Acesso em: 10 nov. 2023.

MILHEM, S. Angulo *et al.* Indoor use of essential oil-based cleaning products: Emission rate and indoor air quality impact assessment based on a realistic application methodology. **Atmospheric Environment**, v. 246, p. 118060, 2021.

MONTANARI JR, Ilio *et al.* The pharmacological assay as a tool to medicinal plants domestication. **Julius-Kühn-Archiv**, n. 453, p. 59, 2016.

MORRE Raphael Mechoulam, sobrevivente do Holocausto, pai da maconha medicinal. In: **Revista Fórum**. [S. l.], 10 mar. 2023. Disponível em: <https://revistaforum.com.br/global/2023/3/10/morre-raphael-mechoulam-sobrevivente-do-holocausto-pai-da-maconha-medicinal-132601.html>. Acesso em: 3 nov. 2023.

NATURAL Product - an overview. In: **ScienceDirect Topics**. [S. l.]: Elsevier, 2024. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/topics/pharmacology-toxicology-and-pharmaceutical-science/natural-product>. Acesso em: 30 ago. 2024.

NIETO, Gema. Biological activities of three essential oils of the Lamiaceae family. **Medicines**, v. 4, n. 3, p. 63, 2017.

NIXON, Jessica. *et al.* Assessing the bioactivity of cannabis extracts in larval zebrafish. **Journal of Cannabis Research**, v. 3, p. 1-11, 2021.

OLIVEIRA, Lucas Lopes. Do preconceito à legalidade: confrontando a política proibicionista da cannabis sativa frente aos direitos humanos. 2014.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS (ONU). **Sustainable Development Goals**. New York: ONU, 2023. Disponível em: <https://www.un.org/sustainabledevelopment/>. Acesso em: 22 out. 2023.

PAVELA, Roman; BENELLI, Giovanni. Essential oils as ecofriendly biopesticides? Challenges and constraints. **Trends in plant science**, v. 21, n. 12, p. 1000-1007, 2016.

PÉRINO-ISSARTIER, S.; GINIES, C.; CRAVOTTO, G.; CHEMAT, F. A comparison of essential oils obtained from lavandin via different extraction processes: Ultrasound, microwave, turbohydrodistillation, steam and hydrodistillation. **Journal of Chromatography A**, v. 1305, p. 41-47, 2013.

PIERACCI, Ylenia. *et al.* Essential oil of *Cannabis sativa* L: Comparison of yield and chemical composition of 11 hemp genotypes. **Molecules**, v. 26, n. 13, p. 4080, 2021.

PISANTI, Simona. *et al.* Cannabidiol: State of the art and new challenges for therapeutic applications. **Pharmacology & therapeutics**, v. 175, p. 133-150, 2017.

POTTER, David. The propagation, characterisation and optimisation of *Cannabis sativa* L. as a phytopharmaceutical. 2009. Tese de Doutorado. King's College London.

POURMORTAZAVI, Seied Mahdi; HAJIMIRSADEGHI, Seiedeh Somayyeh. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. **Journal of chromatography A**, v. 1163, n. 1-2, p. 2-24, 2007.

PUNJA, Zamir K.; HOLMES, Janesse E. Hermaphroditism in marijuana (*Cannabis sativa* L.) inflorescences–impact on floral morphology, seed formation, progeny sex ratios, and genetic variation. **Frontiers in Plant Science**, p. 718, 2020.

RADOIU, Marilena *et al.* Microwave-assisted industrial scale cannabis extraction. **Technologies**, v. 8, n. 3, p. 45, 2020.

RADWAN, Mohamed M. *et al.* Cannabinoids, phenolics, terpenes and alkaloids of cannabis. **Molecules**, v. 26, n. 9, p. 2774, 2021.

REHMAN, Muhammad Saif Ur *et al.* Potential of bioenergy production from industrial hemp (*Cannabis sativa* L.): Pakistan perspective. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 18, p. 154-164, 2013.

Revista Fórum. Morre Raphael Mechoulam, sobrevivente do Holocausto, pai da maconha medicinal. 2023. Acesso em 3 de novembro de 2023. Disponível em: <https://revistaforum.com.br/global/2023/3/10/morre-raphael-mechoulam-sobrevivente-do-holocausto-pai-da-maconha-medicinal-132601.html>.

RIDDLE, John M. Dioscorides on pharmacy and medicine. **University of Texas Press**, 1985.

RÍOS, José-Luis. Essential oils: What they are and how the terms are used and defined. In: **Essential oils in food preservation, flavor and safety**. Academic Press, 2016. p. 3-10.

RIVERO, M. N. *et al.* Comparison between HET-CAM protocols and a product use clinical study for eye irritation evaluation of personal care products including cosmetics according to their surfactant composition. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 153, e112229, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112229>. Acesso em: 20 jan. 2024

ROBINSON, Rowan. O grande livro da Cannabis: guia completo de seu uso industrial, medicinal e ambiental. Rio de Janeiro: Jorge Zahar Ed., 1999.

RODRIGUES, Ana Paula Lopes da Silva. Sobre conhecimentos e ativismos: associações canábicas nas redes sociais digitais. 2022. 231 f. Tese (Doutorado em Extensão Rural) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2022.

RODZIEWICZ, Paweł *et al.* Cannabinoid synthases and osmoprotective metabolites accumulate in the exudates of *Cannabis sativa* L. glandular trichomes. **Plant Science**, v. 284, p. 108-116, 2019.

ROOHINEJAD, Shahn. *et al.* Extraction methods of essential oils from herbs and spices. **Essential oils in food processing: Chemistry, safety and applications**, v. 1, p. 21-55, 2017.

ROTHSCHILD, Miriam; BERGSTRÖM, Gunnar; WÄNGBERG, STEN-ÅKE. *Cannabis sativa*: volatile compounds from pollen and entire male and female plants of two variants, Northern Lights and Hawaiian Indica. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 147, n. 4, p. 387-397, 2005.

RULL, Valentí. Origin, early expansion, domestication and anthropogenic diffusion of Cannabis, with emphasis on Europe and the Iberian Peninsula. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 55, p. 125670, 2022.

RUSSO, Ethan B. *et al.* The hand book of cannabis therapeutics: from bench to bedside. New York - USA: Routledge Ed., 2005.

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

RUSSO, Ethan B. The case for the entourage effect and conventional breeding of clinical cannabis: no “strain,” no gain. **Frontiers in plant science**, v. 9, p. 1969, 2019.

SADGROVE, Nicholas J.; PADILLA-GONZÁLEZ, Guillermo F.; PHUMTHUM, Methee. Fundamental chemistry of essential oils and volatile organic compounds, methods of analysis and authentication. **Plants**, v. 11, n. 6, p. 789, 2022.

SCHANKNECHT, Ellen. *et al.* Phytochemical constituents and derivatives of Cannabis sativa; bridging the gap in melanoma treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 1, p. 859, 2023.

SCHLATTER, Joel. Synthetic cannabinoids: Synthesis and biological activities. **Studies in natural products chemistry**, v. 43, p. 291-311, 2014.

SECHAT. Cervejas feitas com cannabis no Canadá e no Brasil. Disponível em: <https://sechat.com.br/cervejas-feitas-com-cannabis-no-canada-e-no-brasil/>. Acesso em: 25 abr. 2023 às 11h15.

ŞENKAL, B. Coşge; USKUTOĞLU, Tansu. Current studies on the essential oil of cannabis (*Cannabis sativa* L.). *In*: INTERNATIONAL CONFERENCE ON [...], 2023, [S. l.]. **Conference Book [...]**. [S. l.]: [s. n.], 2023. p. 47.

- SHARMEEN, Jugreet B. *et al.* Essential oils as natural sources of fragrance compounds for cosmetics and cosmeceuticals. **Molecules**, v. 26, n. 3, p. 666, 2021.
- SILVER, Robert J. The endocannabinoid system of animals. **Animals**, v. 9, n. 9, p. 686, 2019.
- SIMEI, João Luís Q. *et al.* Does the “Entourage Effect” in Cannabinoids Exist? A Narrative Scoping Review. **Cannabis and cannabinoid research**, 2023.
- SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira *et al.* **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2016.
- SMALL, Ernest; BECKSTEAD, H. D. Cannabinoid phenotypes in *Cannabis sativa*. **Nature**, [s. l.], v. 245, n. 5421, p. 147-148, 1973a.
- SMALL, Ernest; BECKSTEAD, H. D. Common cannabinoid phenotypes in 350 stocks of *Cannabis*. **Lloydia**, [s. l.], v. 36, n. 2, p. 144-165, 1973b.
- SMALL, Ernest. Evolution and classification of *Cannabis sativa* (marijuana, hemp) in relation to human utilization. **The botanical review**, v. 81, p. 189-294, 2015.
- STEILING, W. *et al.* The HET-CAM, a Useful In Vitro Assay for Assessing the Eye Irritation Properties of Cosmetic Formulations and Ingredients. **Toxicology in Vitro**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 375–384, 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0887-2333\(98\)00091-5](https://doi.org/10.1016/s0887-2333(98)00091-5). Acesso em: 15 jan. 2024.
- SURENDRAN, Shelini *et al.* Myrcene—what are the potential health benefits of this flavouring and aroma agent?. **Frontiers in nutrition**, v. 8, p. 699666, 2021.
- TAVARES, Cláudia S. *et al.* Bioproducts from forest biomass: Essential oils and hydrolates from wastes of *Cupressus lusitanica* Mill. and *Cistus ladanifer* L. **Industrial crops and products**, v. 144, p. 112034, 2020.
- TERNELLI, Marco *et al.* Innovative methods for the preparation of medical *Cannabis* oils with a high content of both cannabinoids and terpenes. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 186, p. 113296, 2020.
- The scientist. Zach Klein. 2015. Vídeo digital. Youtube.
<https://www.youtube.com/watch?v=csbJnBKqwlw&t=1s>.
- The United States Pharmacopeia and National Formulary, November 2023 (USP-NF2023), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD, 2023.
- TOTH, Jacob A. *et al.* Identification and mapping of major-effect flowering time loci Autoflower1 and Early1 in *Cannabis sativa* L. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 991680, 2022.
- TOUAIBIA, Mohamed *et al.* Natural terpenes as building blocks for green chemistry. Plant Based “Green Chemistry 2.0” **Moving from Evolutionary to Revolutionary**, p. 171-195, 2019.

UNITED STATES. Food and Drug Administration (FDA). **FDA regulation of cannabis and cannabis-derived products, including cannabidiol (CBD)**. [S. l.]: FDA, 2023. Disponível em: <https://www.fda.gov/news-events/public-health-focus/fda-regulation-cannabis-and-cannabis-derived-products-including-cannabidiol-cbd>. Acesso em: 26 abr. 2023.

USAI, Marianna; ARRAS, Giovanni; FRONTEDDU, Franco. Effects of cold storage on essential oils of peel of Thompson navel oranges. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, n. 2, p. 271-275, 1992.

UZIEL, Almog *et al.* Solid-State Microwave Drying for Medical Cannabis Inflorescences: A Rapid and Controlled Alternative to Traditional Drying. **Cannabis and Cannabinoid Research**, 2022.

VAN DEN DOOL, H. A. N. D.; KRATZ, P. Dec. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of chromatography**, 1963.

VISKOVIĆ, Jelena *et al.* Industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) agronomy and utilization: a review. **Agronomy**, v. 13, n. 3, p. 931, 2023.

VOGL, Christian R. *et al.* Hemp (*Cannabis sativa* L.) as a Resource for Green Cosmetics. **Journal of Industrial Hemp**, v. 9, n. 1, p. 51-68, 2004.

VUERICH, Marco *et al.* Yield and quality of essential oils in hemp varieties in different environments. **Agronomy**, v. 9, n. 7, p. 356, 2019.

WANAS, Amira S. *et al.* Chemical Composition of Volatile Oils of Fresh and Air-Dried Buds of Cannabis chemovars, Their Insecticidal and Repellent Activities. **Natural Product Communications**, v. 15, n. 5, p. 1934578X20926729, 2020.

WANG, Yan-Hong *et al.* Quantitative determination of Δ^9 -THC, CBG, CBD, their acid precursors and five other neutral cannabinoids by UCLAE-UV-MS. **Planta Medica**, v. 84, n. 04, p. 260-266, 2018.

WeCann Academy. Quimiovariantes da Cannabis. Disponível em: <https://wecann.academy/quimiovariantes-da-cannabis/>. Acesso em: 27 de abril de 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Cannabis and cannabis resin: critical review report**. Geneva: WHO, 2018. Disponível em: https://www.who.int/docs/defaultsource/controlled-substances/whocbdreportmay2018-2.pdf?sfvrsn=f78db177_2&download=true. Acesso em: 11 set. 2023.

WU, Jie Cannabis, cannabinoid receptors, and endocannabinoid system: yesterday, today, and tomorrow. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 40, n. 3, p. 297-299, 2019.

YADAV, Shubh Pravat Singh; GHIMIRE, Netra Prasad; LAHUTIYA, Vivek. A comprehensive review of the production technology of *Cannabis sativa* L. with its current legal status and botanical features. **Fundamental and Applied Agriculture**, v. 8, n. 1 & 2, p. 458-474-458-474, 2023.

YOUNG, Amy C. *et al.* Cardiotoxicity associated with the synthetic cannabinoid, K9, with laboratory confirmation. **The American journal of emergency medicine**, v. 30, n. 7, p. 1320. e5-1320. e7, 2012.

YOUNGER, David S. **The science of medical cannabis**. New York: Nova Science Publishers, 2018. Disponível em: https://davidsyounger.com/sites/default/files/blog_pdf/MedicalCannabisDSY_0.pdf. Acesso em: 25 out. 2023.

YOUSEFI, Mohammad *et al.* Supercritical fluid extraction of essential oils. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 118, p. 182-193, 2019.

ZALEWSKY, S. Efeitos do processo de descarboxilação de canabinoides nas inflorescências de *Cannabis sativa* L. sobre flavonoides e terpenos voláteis. 2024. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2024.

ZAWILSKA, Jolanta B.; WOJCIESZAK, Jakub. Spice/K2 drugs—more than innocent substitutes for marijuana. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 17, n. 3, p. 509-525, 2014.

ZHENG, Y. Soilless production of drug-type *Cannabis sativa*. In: **III International Symposium on Growing Media, Composting and Substrate Analysis** 1305 . 2019. p. 375-382.