

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO EM TECNOLOGIAS LABORATORIAIS EM CIÊNCIAS FORENSES

AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA E CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS DE *CANNABIS SATIVA*: ESTUDO COM DADOS REAIS E ESTUDO PILOTO LABORATORIAL

Trabalho submetido por
Joana Beatriz Ruas Nora
para a obtenção do grau de Mestre em Tecnologias Laboratoriais em
Ciências Forenses

novembro de 2025

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO EM TECNOLOGIAS LABORATORIAIS EM CIÊNCIAS FORENSES

AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA E CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS DE CANNABIS SATIVA: ESTUDO DE CASO COM DADOS REAIS E ESTUDO PILOTO LABORATORIAL

Trabalho submetido por
Joana Beatriz Ruas Nora
para a obtenção do grau de **Mestre** em Tecnologias Laboratoriais em
Ciências Forenses

Trabalho orientado por
Prof. Doutora Helena Barroso

e coorientado por
Dr. Fernando Águas

novembro de 2025

Agradecimentos

Gostava de começar por agradecer á Prof. Doutora Helena Barroso por ter aceitado orientar a minha tese, mesmo depois de ter mudado completamente o tema da mesma, e por ter sido sempre prestável e rápida a responder a qualquer questão, ainda que no meio de imensas teses para orientar. Um grande obrigada.

Ao Dr. Fernando Águas por aceitar coorientar a minha tese e me por me ceder os dados da empresa Cannprisma Pharma para realizar este projeto.

Ao Prof. Doutor Alexandre Quintas por me ter cedido as amostras utilizadas na parte prática.

Ao Prof. Doutor Carlos Família por ter sido incansável em ajudar-me, mesmo não sendo meu coorientador, fez papel como se fosse. Um enorme obrigada!

À Egas Moniz School of Health and Science por ter permitido o uso dos laboratórios de investigação, e dos materiais necessários à realização da parte prática deste projeto.

À Ana Rafael por ter perdido imensas horas de sono a ajudar-me. Dos cálculos à revisão de teoria, passando pelo planeamento do meu trabalho prático, um obrigado não chega.

Às minhas melhores amigas, Daniela, Andreia e Rita que, embora não estejam diariamente comigo, sempre estiveram lá em todas as etapas, quer deste projeto quer da minha vida. Vocês são especiais.

Ao meu namorado, Afonso, por me ter ouvido nos dias em que eu pensava que ia desistir, e me ter sempre ajudado a levantar quando achava que já não havia solução. Por ter festejado comigo todos os passos que dei neste capítulo da minha vida, por mais pequenos que fossem.

Aos meus tios e ao meu primo por me terem acolhido na sua casa durante o ano que fui para a Almada. Obrigada por me terem feito sentir em casa.

Ao meu Coco, por ser sempre o meu refúgio quando tudo parece correr mal.

E por fim, os mais importantes. Um enorme obrigado aos meus pais por me apoiarem a 100% em tudo o que faço, sem nunca questionar. Sem vocês nada era possível. Espero um dia conseguir retribuir tudo o que fizeram, fazem e continuam a fazer por mim.

Amo-vos com tudo o que tenho

Declaração de Honra

Código | IMP-EM-EI-111_01

Declaro, por minha honra, que o presente trabalho académico é original e foi elaborado por mim próprio (a), não se tendo recorrido a quaisquer outras fontes, para além das indicadas, usadas, adotadas literalmente ou adaptados a partir dos seus originais (em fontes impressas, não impressas ou na internet) e encontram-se adequados, identificados e citados, com observância das convenções do trabalho académico em vigor.

Mais declaro que esta Dissertação (Avaliação Microbiológica e Caracterização de Amostras de *Cannabis sativa*: Estudo de Caso com Dados Reais e Estudo Piloto Laboratorial) não foi apresentada, para efeitos de avaliação, a qualquer outra entidade ou instituição, para além da(s) diretamente envolvida(s) na sua elaboração, e que os conteúdos das versões impressa e eletrónica são inteiramente coincidentes.

Declaro, igualmente, encontrar-me ciente de que a inclusão, neste texto, de qualquer falsa declaração terá consequências legais.

Data: __/__/__

Declaração Conflito de Interesses (DCI)

Código | IMP-EM-EI-110_01

Eu Joana Beatriz Ruas Nora, referente a Dissertação Avaliação Microbiológica e Caracterização de Amostras de Cannabis sativa: Estudo de Caso com Dados Reais e Estudo Piloto Laboratorial declaro que não possuo conflitos de interesse de ordem pessoal, comercial, académica, político ou financeiro.

*caso exista conflito de interesse deve o autor sob compromisso de honra, declarar existir conflito (s) de interesse na sua participação do referido trabalho.

Data: __/__/__

Declaração de Financiamento

Código | IMP-EM-EI-113_01

Eu Joana Beatriz Ruas Nora, referente a Dissertação Avaliação Microbiológica e Caracterização de Amostras de *Cannabis sativa*: Estudo de Caso com Dados Reais e Estudo Piloto Laboratorial, declaro que o meu trabalho não se encontra financiado.

Data: __/__/__

Resumo

A *Cannabis sativa* é uma planta de uso ancestral, conhecida principalmente por aplicações medicinais, recreativas, industriais e religiosas (1–5). Evidências arqueológicas indicam que a sua utilização ocorria majoritariamente na Ásia Central(1,4,5). Com o tempo, o uso da *Cannabis* espalhou-se para outras regiões do mundo, adquirindo diferentes conotações consoante o contexto cultural e político(6–8).

Embora a produção e comercialização de produtos à base de *Cannabis* tenha aumentado substancialmente com a legalização do seu uso medicinal em vários países (2), a produção e o comércio fora de circuitos autorizados persistem, levantando preocupações quanto à qualidade microbiológica, segurança do consumidor e rastreabilidade das amostras (9).

Um dos principais objetivos deste trabalho é desenvolver e aplicar um protocolo de análises microbiológicas adaptado à análise de quantidades muito reduzidas de *Cannabis sativa* (aproximadamente 0,025g), com vista a aplicação em amostras de origem ilícita. Os resultados obtidos serão comparados com os limites estabelecidos pela Farmacopeia Europeia, permitindo avaliar a conformidade das amostras e os potenciais riscos sanitários associados ao seu consumo.

Paralelamente, foi realizada uma análise retrospectiva de dados laboratoriais da empresa Cannprisma Pharma., relativos a amostras legais processadas de fevereiro de 2024 a junho de 2025. Esta análise considerou a origem geográfica e os perfis microbianos, possibilitando a construção de um mapa de prevalência microbiana por região, permitindo identificar padrões regionais de contaminação e contribuir para a rastreabilidade e controlo de qualidade da produção.

Este estudo tem particular relevância para o setor forense e laboratorial, ao propor o desenvolvimento de um protocolo microbiológico adaptado à análise de amostras de *Cannabis sativa* em quantidades muito reduzidas, que é uma realidade comum em contextos de apreensão criminal. Além disso, a elaboração de um mapa de prevalência constitui uma ferramenta de elevada relevância para o controlo de qualidade e a rastreabilidade da produção de *Cannabis sativa*.

Ao associar perfis de contaminação microbiana a países de origem específicos, este mapa poderá apoiar a identificação de padrões regionais de risco, e contribuir não só para o controlo de qualidade de empresas de produção legal de *Cannabis*, mas também para a

investigação forense, ao fornecer um referencial comparativo para a caracterização de amostras de origem desconhecida, facilitando a sua possível localização geográfica.

Deste modo, esta componente do trabalho reforça a sua aplicabilidade prática e interdisciplinar, unindo microbiologia, controlo de qualidade e investigação criminal.

Palavras-chave: *Cannabis sativa*; Contaminação Microbiológica; Farmacopeia Europeia; *Staphylococcus aureus*; *Cannabis medicinal*; Análise Microbiológica; Risco Sanitário; Rastreabilidade; Avaliação Forense; Validação Metodológica.

Abstract

Cannabis sativa is an ancient plant, historically known for its medicinal, recreational, industrial, and religious applications (1–5). Archaeological evidence indicates that its use was mainly concentrated in Central Asia. Over time, the use of *Cannabis* spread to other regions of the world, acquiring different meanings depending on the cultural and political context.

Although the production and commercialization of *Cannabis*-based products have increased substantially (2), following the legalization of its medicinal use in several countries, the production and trade outside authorized circuits persist, raising concerns regarding microbiological quality, consumer safety, and sample traceability (9).

One of the main objectives of this study is to develop and apply a microbiological analysis protocol adapted to the evaluation of small quantities of *Cannabis sativa* (approximately 0.025 g), aiming at its application to illicit samples. The results obtained will be compared with the limits established by the European Pharmacopoeia, allowing the assessment of sample compliance and the potential health risks associated with their consumption.

In parallel, a retrospective analysis of laboratory data from Cannprisma Pharma., was carried out, referring to legal *Cannabis sativa* samples processed between February 2024 and June 2025, considering their geographical origin and microbial profiles. Based on this analysis, a microbial prevalence map by country of origin was constructed, enabling the identification of regional contamination patterns and contributing to the traceability and quality control of production.

This study has particular relevance for the forensic and laboratory sectors, as it proposes the development of a microbiological protocol adapted to the analysis of *Cannabis sativa* samples in very small quantities — a common reality in criminal seizure contexts. Furthermore, the construction of a prevalence map represents a highly relevant tool for the quality control and traceability of *Cannabis sativa* production.

By associating microbial contamination profiles with specific countries of origin, this map may support the identification of regional risk patterns and contribute not only to the quality control of legal *Cannabis* production but also to forensic investigation, by providing a comparative reference for the characterization of samples of unknown origin and their possible geographical localization.

Thus, this component of the work reinforces its practical and interdisciplinary applicability, combining microbiology, quality control, and criminal investigation.

Keywords: *Cannabis sativa*; Microbiological Contamination; European Pharmacopoeia; *Staphylococcus aureus*; Medicinal *Cannabis*; Microbiological Analysis; Health Risk; Traceability; Forensic Assessment; Methodological Validation

Índice Geral

Resumo	1
Abstract.....	3
Índice Geral	5
Índice de Figuras	9
Índice de Tabelas	11
Lista de Abreviaturas, Acrónimos e Siglas	13
Glossário	15
Capítulo 1: Introdução	17
1. Breve História sobre a <i>Cannabis sativa</i>	17
1.1. Uso Medicinal	19
1.2. Uso Sociocultural	20
2. Normas de Qualidade e Segurança	21
2.1. Legislação e Regulamentação	22
2.2. Boas Práticas de Fabrico e Cultivo.....	23
2.3. Critérios Microbiológicos.....	23
2.4. Sistemas de Rastreabilidade e Controlo de Qualidade	23
3. Contaminação Microbiológica em produtos à base de <i>Cannabis</i>	24
3.1. Microrganismos Totais	24
3.2. Enterobactérias (bactérias Gram-negativo tolerantes à bÍlis).....	25
3.3. <i>Salmonella spp.</i>	26
3.4. <i>Escherichia coli</i>	26
3.5. <i>Staphylococcus aureus</i>	26
3.6. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27
4. <i>Cannabis</i> Legal vs. Ilegal: Qualidade e Riscos Associados.....	27
4.1. <i>Cannabis</i> Legal	27
4.2. <i>Cannabis</i> Ilegal	27
4.3. Métodos de Avaliação Microbiológica	28
5. Mapeamentos Microbiológicos e Perspetivas Forenses	28
5.1. Aplicações no Controlo de Qualidade e Segurança de Produtos.....	28
5.2. Aplicações Forenses e Rastreabilidade de Origem.....	29
5.3. Considerações Finais	30
6. Objetivos.....	31
Capítulo 2: Metodologia.....	33
1. Desenvolvimento e aplicação de um protocolo aplicado a baixas quantidades .	33
1.1. Procedimento 1	34

1.2.	Procedimento 2	37
1.3.	Controlo de Qualidade dos Meios de Cultura	39
2.	Recolha e análise de dados laboratoriais	40
3.	Análise Estatística dos Dados.....	41
3.1.	Estatística Descritiva	41
3.2.	Testes de Comparação	42
3.3.	Análise de Conformidade	42
3.4.	Análise de Frequência	42
3.5.	Correlação entre parâmetros.....	42
3.6.	Tratamento de Dados.....	42
4.	Síntese Metodológica	44
5.	Análise Geográfica e Construção de um Mapa	45
Capítulo 3: Resultados.....		47
1.	Caracterização Microbiológico das Amostras Legais	47
1.1.	Matéria-Prima.....	47
1.2.	Produto Acabado	49
1.3.	Efeito do Processamento: Comparação entre Matéria-Prima e Produto Acabado	50
2.	Caracterização Microbiológica de Amostras de Origem Ilícita	52
2.1.	Procedimento 1: Volumes Standard	52
2.2.	Procedimento 2: Volumes Reduzidos.....	54
2.3.	Comparação entre Procedimentos: P1 vs. P2	56
3.	Comparação entre Amostras Legais e Ilegais.....	56
3.1.	Microrganismos Aeróbios Totais: TAMCs	57
3.2.	Bolores e Leveduras: TYMCs	58
3.3.	Enterobactérias e outras Bactérias Gram-negativo.....	59
4.	Análise de Conformidade com a Farmacopeia Europeia	60
4.1.	Amostra Legais.....	60
4.2.	Amostras Ilegais	63
5.	Microrganismos Patogénicos: Análise de Frequência.....	64
6.	Distribuição Geográfica da Contaminação Microbiológica	66
6.1.	Caracterização por País	70
6.2.	Análise Estatística por País.....	74
6.3.	Ausência Universal de Patogénicos.....	75
Capítulo 4: Discussão		77
1.	Qualidade Microbiológica da Produção Legal de <i>Cannabis</i>	77
1.1.	Variabilidade Natural da Matéria-Prima	77

1.2.	Eficácia do Processamento Industrial.....	78
1.3.	Ausência de Agentes Patogénicos Específicos.....	78
2.	Amostras Ilegais: Qualidade e Riscos Associados	79
2.1.	Contagens Microbianas Totais	79
2.2.	Presença de <i>Staphylococcus aureus</i>	79
2.3.	Implicações para a Saúde Pública	80
3.	Validação do Protocolo adaptado a Pequenas Quantidades	80
4.	Conformidade com <i>Standard</i> Internacionais	81
5.	Variabilidade Geográfica na Qualidade Microbiológica.....	81
5.1.	Fatores Potencialmente Explicativos.....	82
5.2.	Importância da Ausência Universal de Patogénicos	82
6.	Contexto Internacional e Comparação com a Literatura	83
7.	Limitações do Estudo	83
7.1.	Tamanho Amostral da <i>Cannabis</i> Ilegal	83
7.2.	Diferenças Metodológicas	84
7.3.	Origem Única das Amostras Legais	84
7.4.	Ausência de Identificação a Nível de Espécies	84
7.5.	Variáveis Não Controladas	84
8.	Aplicabilidade Forense	84
9.	Perspetivas Futuras	85
Capítulo 5: Conclusões.....		87
1.	Principais Conclusões.....	87
1.1.	Qualidade Microbiológica da Produção Legal	87
1.2.	Diferenças entre <i>Cannabis</i> Legal e Ilegal.....	87
1.3.	Validação Metodológica.....	88
1.4.	Adequação dos <i>Standards</i> Internacionais.....	88
1.5.	Variabilidade Geográfica.....	88
2.	Contributos do Estudo	88
2.1.	Indústria de <i>Cannabis</i> medicinal	89
2.2.	Autoridades Reguladoras.....	89
2.3.	Ciências Forenses	89
2.4.	Saúde Pública	89
3.	Implicações Práticas	90
4.	Limitações e Recomendações.....	90
5.	Perspetivas Futuras	91
6.	Reflexão Final	91
Referências Bibliográficas.....		93

Índice de Figuras

Figura 1 - <i>Cannabis sativa</i> . a) Plantas de <i>Cannabis sativa</i> . b) Flor de <i>Cannabis sativa</i>	17
Figura 2 - Estufa de produção legal e regulamentada de <i>Cannabis</i> para uso medicinal.	21
Figura 3 - Presença e ausência de enterobactérias nas amostras ilegais, Procedimento 1 (P1) e Procedimento 2 (P2).	60
Figura 4 - Resultados de TAMCs por país de origem. Mapa Mundo.	66
Figura 5 - Resultados de TAMCs por país de origem. Aproximação ao sul de África.	66
Figura 6 - Resultados de TAMCs por país de origem. Aproximação ao Médio Oriente.	67
Figura 7 - Resultados de TYMCs por país de origem. Mapa Mundo.	67
Figura 8 - Resultados de TYMCs por país de origem. Aproximação ao sul de África.	68
Figura 9 - Resultados de TYMCs por país de origem. Aproximação ao Médio Oriente.	68
Figura 10 - Resultados de enterobactérias por país de origem. Mapa Mundo.	69
Figura 11 - Resultados de enterobactérias por país de origem. Aproximação ao sul de África.	69
Figura 12 - Resultados de enterobactérias por país de origem. Aproximação ao Médio Oriente.	70

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Estatística descritiva às variáveis TAMCs, TYMCs e enterobactérias das amostras legais de matéria-prima (MP), em UFC/g.....	47
Tabela 2 - Frequência dos microrganismos patogénicos em amostras legais de matéria-prima (MP).	48
Tabela 3 - Estatística descritiva às variáveis TAMCs, TYMCs e enterobactérias das amostras legais de produto acabado (PA), em UFC/g.....	49
Tabela 4 - Frequência dos microrganismos patogénicos em amostras legais de produto acabado (PA).	50
Tabela 5 – Teste W de Wilcoxon para comparação das diferentes análises entre os dois grupos de amostras legais, Matéria-prima (MP) e Produto Acabado (PA).	51
Tabela 6 - Teste de Shapiro-Wilk para verificação da normalidade.	51
Tabela 7 - Teste de Kruskal-Wallis para comparação de TAMCs, TYMCs e enterobactérias das amostras legais.	52
Tabela 8 - Estatística descritiva às variáveis TAMCs e TYMCs das amostras ilícitas analisadas através do Procedimento 1 (P1), em UFC/g.....	52
Tabela 9 - Frequência dos microrganismos patogénicos das amostras ilícitas analisadas através do Procedimento 1 (P1).....	53
Tabela 10 - Frequência de <i>Staphylococcus aureus</i> das amostras ilícitas analisadas através do Procedimento 1.....	53
Tabela 11 - Estatística descritiva às variáveis TAMCs e TYMCs das amostras ilícitas analisadas através do Procedimento 2 (P2), em UFC/g.....	54
Tabela 12 - Frequência de <i>Staphylococcus aureus</i> das amostras ilícitas analisadas através do Procedimento 2 (P2).....	55
Tabela 13 - Frequência de Enterobactérias das amostras ilícitas analisadas através do Procedimento 2 (P2).	55
Tabela 14 - Frequência de microrganismos patogénicos das amostras ilícitas analisadas através do Procedimento 2 (P2).....	55
Tabela 15 - Teste W de Wilcoxon para comparação das diferentes análises entre os dois grupos de amostras ilícitas, as do Procedimento 1 (P1) e do Procedimento 2 (P2).	56
Tabela 16 - Teste de Kruskal-Wallis para comparação de TAMCs e TYMCs entre amostras legais e ilegais.	57

Tabela 17 - Comparações múltiplas Dwass-Steel-Critchlow-Fligner para TAMCs entre amostras legais, matéria-prima (MP) e produto acabado (PA), e ilegais, Procedimento 1 (P1) e Procedimento 2 (P2).	58
Tabela 18 - Comparações múltiplas Dwass-Steel-Critchlow-Fligner para TYMCs entre amostras legais e ilegais.	59
Tabela 19 - Comparações múltiplas Dwass-Steel-Critchlow-Fligner para enterobactérias entre amostras legais.	59
Tabela 20 - Avaliação de conformidade de TAMCs para amostras legais de matéria-prima (MP).	61
Tabela 21 - Avaliação de conformidade de TYMCs para amostras legais de matéria-prima (MP).	61
Tabela 22 - Teste qui-quadrado para TYMCs do produto acabado (PA).	62
Tabela 23 - Teste qui-quadrado para enterobactérias do produto acabado (PA).	62
Tabela 24 - Teste qui-quadrado para TAMCs do produto acabado (PA).	63
Tabela 25 - Frequência de <i>Staphylococcus aureus</i> nas amostras ilegais do Protocolo 1 (P1).	65
Tabela 26 - Frequência de <i>Staphylococcus aureus</i> nas amostras ilegais do Protocolo 2 (P2).	65
Tabela 27 - Teste de qui-quadrado de <i>Staphylococcus aureus</i> para amostras ilegais. ...	65
Tabela 28 - Estatística descritiva de TYMCs, TAMCs e enterobactérias por país de origem.	70
Tabela 29 - Tabela de contingência de TAMCs e TYMCs para a Europa Central.	72
Tabela 30 - Tabela de contingência de TAMCs e TYMCs para o norte da América.	73
Tabela 31 - Tabela de contingência de TAMCs e TYMCs para o sul da Europa.	73
Tabela 32 - Tabela de contingência de TAMCs e TYMCs para o sul da África.	74
Tabela 33 - Teste de Kruskal-Wallis para TAMCs e TYMCs.	74
Tabela 34 - Teste qui-quadrado para TYMCs	75
Tabela 35 - Avaliação dos controlos positivos e negativos dos meios de cultura.	1

Lista de Abreviaturas, Acrónimos e Siglas

Δ^9 -THC - Δ^9 -tetrahydrocannabinol

CBD – Canabidiol

DSCF – Dwass-Steel-Critchlow-Fligner

GACP – Good Agricultural and Collection Practices

GMP – Good Manufacturing Practices

MP – Matéria-Prima

ONU – Organização das Nações Unidas

P1 – Procedimento 1

P2 – Procedimento 2

PA – Produto Acabado

SDA – Sabouraud Dextrose Agar

THC – Tetrahydrocannabinol

TSA – Tryptic Soy Agar

TSB – Tryptic Soy Broth

UFC – Unidades Formadoras de Colónias

VRBGA – Violet-Red Bile Glucose Agar

XLD – Xilose Lisina Desoxicolato

Glossário

Cetrimida – Meio seletivo para *Pseudomonas aeruginosa*, que inibe bactérias Gram-positivo e favorece o crescimento de *P. aeruginosa*.

MacConkey Broth – Caldo seletivo para bactérias Gram-negativo entéricas, que contém sais biliares e cristal violeta para inibir bactérias Gram-positivo, e lactose para detectar fermentação.

MacConkey Agar – Meio seletivo e diferencial para bactérias Gram-negativas, que permite distinguir entre bactérias fermentadoras de lactose (colônias rosas) e não fermentadoras (colônias amarelas).

Manitol Sal Agar – Meio seletivo para *Staphylococcus spp.* e diferencial para *S. aureus*, que fermenta manitol e muda a cor do meio para amarelo.

Mossel – Meio seletivo para *Enterobacteriaceae*, especialmente *Enterobacter* e *Escherichia coli*. Contém bÍlis e verde brilhante para inibir bactérias Gram-positivas.

Rappaport-Vassiliadis – Caldo seletivo para enriquecimento de *Salmonella spp.*, que contém magnésio, Verde de malaquite e cloreto de sódio para favorecer o crescimento de *Salmonella* em detrimento de outras.

SDA (Sabouraud Dextrose Agar) – Meio rico em dextrose e com pH ácido, ideal para o crescimento de fungos e leveduras, e que inibe o crescimento de bactérias.

TSA (Tryptic Soy Agar) – Meio não seletivo, usado para crescimento geral de bactérias, que suporta crescimento de uma ampla gama de microrganismos.

TSB (Tryptic Soy Broth) – Meio equivalente a TSA líquido, que é usado para crescimento bacteriano em suspensão, testes de turbidez e preparação de inóculos.

XLD (Xilose Lisina Desoxicolato) – Meio seletivo e diferencial para *Salmonella* e *Shigella*. *Salmonella* produz colônias vermelhas com centro preto; *Shigella*, colônias vermelhas.

Capítulo 1: Introdução

1. Breve História sobre a *Cannabis sativa*

Cannabis é o nome dado a um dos géneros pertencente à família *Cannabaceae*, à qual pertencem mais 11 géneros e cerca de 170 espécies. (10–13).

O género *Cannabis* inclui 3 espécies, *Cannabis sativa*, *Cannabis ruderalis* e *Cannabis indica* mas, devido ao cruzamento de todas as espécies, e de não existir grande barreira que as separe, alguns autores sugerem apenas o reconhecimento de uma delas, *Cannabis sativa* (6,7,10).

A *Cannabis sativa* (Figura 1) é uma herbácea anual, cuja história se encontra enraizada na Ásia Central, onde foi das primeiras espécies a ser cultivada pelo homem (1,14), com registos de uso que remontam a mais de 4000 anos (4,5).

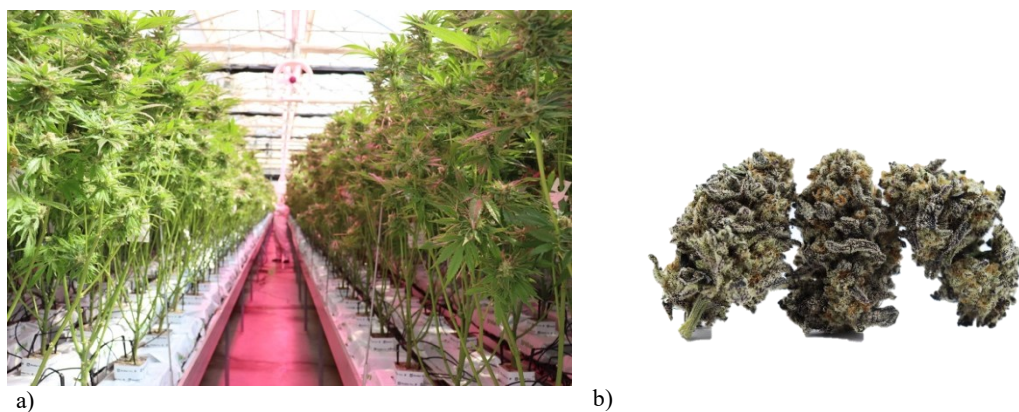


Figura 1 - *Cannabis sativa*. **a)** Plantas de *Cannabis sativa*. **b)** Flor de *Cannabis sativa*.

Durante milhares de anos, a utilização desta planta fez parte, não só da medicina tradicional, mas também de práticas culturais e religiosas, sobretudo no continente asiático, e da indústria têxtil, na Ásia e Europa (6,7,14–17), o que demonstrava a sua multifuncionalidade social (4).

Na indústria têxtil, esta planta era utilizada pelas suas fibras, para a produção, sobretudo, de cordas, cabos, papel e tecidos (1,5,6,15,17).

Com o passar dos séculos, a utilização da *Cannabis* foi-se espalhando, progressivamente, para o resto do mundo (6–8), incluindo para a Europa onde, além de ser usada como material industrial, também foi introduzida nas farmacopeias ocidentais, no século XIX, com preparações medicinais (1). No entanto, no século XX, devido à intensificação das políticas de controlo internacional de drogas, a *Cannabis* foi sendo progressivamente

proibida. Em 1961, a Organização das Nações Unidas (ONU) promoveu a Convenção Única sobre Estupefacientes, onde esta foi classificada como uma substância sem valor terapêutico reconhecido e, à qual, foram impostas fortes restrições de cultivo e consumo (17,18).

Já nas últimas décadas tem-se assistido a uma revalorização científica e social da *Cannabis*, com estudos a demonstrarem a eficácia terapêutica em condições como dor crónica, espasticidade em esclerose múltipla e náuseas induzidas por quimioterapia (19,20). Alguns países como o Canadá e o Uruguai legalizaram o consumo criativo, enquanto outros países europeus e estados norte-americanos regulamentaram o seu uso medicinal (21,22).

Ao redor desta planta, gira todo um misto de representações que se foram alterando juntamente com a civilização humana (6).

A *Cannabis* continua a ser, na Europa, a substância ilícita mais consumida, no entanto, a regulamentação do seu uso medicinal tornou-se uma realidade em diversos integrantes da União Europeia (UE). O *European Drug Report 2024* descreve tanto o aumento do mercado regulado de *Cannabis* medicinal como a necessidade de harmonização das políticas entre os diversos países (22).

Portugal sofreu uma transformação marcante relativamente à política das drogas. Em 2001 houve uma descriminalização do consumo de todas as substâncias, e as sanções foram substituídas por medidas de dissuasão (23,24).

Mais recentemente, o país legalizou o uso da planta para fins medicinais desde que prescrito por um médico, e regulamentada pelo INFARMED, permitindo ainda a produção nacional para exportação (25,26).

Apesar deste progresso, persistem ainda desafios relacionados com a qualidade microbiológica e a segurança da *Cannabis*, tanto em amostras legais como ilegais. Estudos demonstraram contaminação frequente por agentes patogénicos e fungos produtores de micotoxinas, sobretudo em produtos de origem ilegal (27,28). Assim, a avaliação microbiológica da *Cannabis sativa* torna-se essencial, não só para garantir a segurança do consumidor, mas também para apoiar uma rastreabilidade e diferenciação entre amostras legais e ilegais, com aplicações relevantes para a indústria farmacêutica e para a investigação forense.

1.1. Uso Medicinal

A história da *Cannabis* na medicina é tão antiga quanto o seu cultivo. Na medicina tradicional chinesa, a planta encontrava-se descrita na farmacopeia mais antiga do mundo *Pen-ts'ao ching*, sendo utilizada para tratar dor reumática, obstipação, distúrbios do sistema reprodutor feminino, malária, entre outras doenças (1,29). Na Índia, a *Cannabis* era usada como analgésico, anticonvulsionante, hipnótico, tranquilizante, anti-inflamatório, antibiótico, antiparasitário, antipasmódico, digestivo, estimulante de apetite, diurético, afrodisíaco, antitússico e expetorante (1). No início da Era cristã, *Hua T'o*, fundador da medicina Chinesa, utilizava preparações de *Cannabis* e vinho como anestesia durante operações cirúrgicas (1,5).

Os chineses utilizavam, sobretudo, as sementes da planta, e acredita-se que as propriedades medicinais descritas na literatura antiga se referem a esta parte da planta (1). Até aos dias de hoje, as sementes são empregues como laxante na medicina tradicional chinesa (1,29). Embora as sementes sejam pobres em $\Delta 9$ -tetrahidrocannabinol ($\Delta 9$ -THC), são ricas em ácidos gordos e proteínas que, atualmente, se acredita ter efeitos terapêuticos para o tratamento de eczema e psoríase, em uso tópico, e aterosclerose, osteoporose, artrite reumatoide e outras doenças inflamatórias, em uso oral (1).

Na medicina moderna, os principais compostos ativos da *Cannabis* sativa são o THC (tetrahidrocannabinol) e o CBD (canabidiol), mas outros canabinóides, como o CBG, têm demonstrado propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias (3,30,31). As formas farmacêuticas mais comuns incluem flores secas para inalação, extratos padronizados em óleos ou tinturas, cápsulas e produtos orais (5,15). A Farmacopeia Europeia estabelece critérios de qualidade para a *Cannabis* destinada ao uso medicinal, incluindo os métodos para avaliação de produtos administrados por inalação (Capítulo 5.1.4) e por via oral (Capítulo 5.1.8.c), garantindo a segurança, eficácia e consistência do produto final (32).

As indicações terapêuticas mais documentadas incluem controlo da dor crónica, redução da espasticidade em pacientes com esclerose múltipla e mitigação de náuseas e vômitos provocados por quimioterapia (1,15,19). Estudos recentes destacam a ainda propriedades antimicrobianas de certos canabinóides, capazes de atuar contra bactérias Gram-positivo e fungos, assim como inibir a formação de biofilmes, o que desperta interesse na sua aplicação farmacológica (3,30,31). No entanto, estes efeitos não substituem a necessidade

de uma avaliação microbiológica rigorosa da matéria-prima, sobretudo em plantas cultivadas em condições pouco controladas (2,33).

1.2. Uso Sociocultural

O uso da *Cannabis* sativa transcende o campo medicinal, tendo também uma longa história de utilização sociocultural e ritualística. Em várias regiões da Ásia a planta esteve presente em cerimónias religiosas e práticas espirituais, sendo considerada um elemento de ligação entre o mundo físico e o mundo espiritual. Na Índia, por exemplo, a *Cannabis* era integrada em rituais religiosos, festas e celebrações, sendo mencionada em textos antigos como o *Atharva Veda*, onde era descrita como uma das cinco plantas sagradas, com um papel protetor e purificador (6,29).

Além do contexto religioso, a *Cannabis* desempenhou um papel social e recreativo em diversas culturas. No Médio Oriente, na China e na África, a planta foi utilizada em festividades e celebrações comunitárias, e muitas vezes associada a práticas de relaxamento, meditação e coesão social (1,4,29).

Estes usos históricos demonstram que a *Cannabis* não era apenas um recurso medicinal e industrial, mas também um elemento de integração cultural, refletindo valores e crenças das sociedades que as cultivavam.

Na Europa, o conhecimento sobre a planta foi inicialmente transmitido através de textos científicos, mas rapidamente se difundiu em contextos sociais e recreativos durante os séculos XVII e XVIII. Durante este período, a planta começou a ser associada, não apenas à medicina, mas também a usos recreativos e artesanais, criando um dualismo entre o seu valor económico e cultural (4,6,15). Este legado sociocultural é particularmente relevante atualmente, à medida que as políticas de legalização da *Cannabis* em diversos países ocidentais não só reconhecem os benefícios medicinais da planta, mas também os seus usos culturais e sociais, como na educação sobre consumo responsável, produção artesanal e eventos comunitários (21,22).

Contudo, o uso sociocultural da *Cannabis* esteve sempre condicionado por fatores como as políticas legais, a perceção social da planta e, também, o conhecimento tradicional sobre os seus usos (17,18). Apenas recentemente, com a legalização do consumo medicinal e com a discriminação em alguns países, a *Cannabis* começou a ser

revalorizada, permitindo um regresso controlado aos seus usos culturais, recreativos e terapêuticos, em paralelo com um reforço das normas de segurança e qualidade (22,26).

2. Normas de Qualidade e Segurança

A produção de *Cannabis sativa* para uso medicinal (Figura 2) está sujeita a normas rigorosas de qualidade e segurança, estabelecidas para garantir que os produtos finais sejam seguros para o consumidor e consistentes em termos de conteúdo de princípios ativos e contaminação microbiológica (31,33,34).



Figura 2 - Estufa de produção legal e regulamentada de *Cannabis* para uso medicinal.

Estas normas incluem critérios de boas práticas de cultivo (GACP – Good Agricultural and Collection Practices) e boas práticas de fabrico (GMP – Good Manufacturing Practices) e requisitos específicos de armazenamento e transporte, de forma a minimizar a contaminação por microrganismos, pesticidas e metais pesados (32,33,35).

A Farmacopeia Europeia Estabelece limites microbiológicos máximos para produtos de *Cannabis* destinados a uso medicinal, incluindo parâmetros como microrganismos totais, leveduras e bolores, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* e *Pseudomonas aeruginosa* (32,34). Estes critérios são particularmente importantes para

produtos inaláveis ou administrados oralmente, dado o risco acrescido para indivíduos imunocomprometidos.

Além disso, as regulamentações internacionais recomendam a realização de testes de rastreabilidade e documentação detalhada em todas as etapas da cadeia de produção, desde o cultivo até ao processamento, armazenamento e distribuição (33,35). O cumprimento destas normas garante não só a segurança do consumidor, mas também a conformidade legal para comercialização nacional e exportação.

O controlo microbiológico rigoroso é complementado por monitorização de compostos químicos (como solventes residuais, pesticidas e canabinóides), garantindo que os produtos medicinais sejam seguros, eficazes e consistentes com o declarado no rótulo (32,35,36). Embora alguns compostos presentes na *Cannabis sativa*, como os canabinóides CBD e CBG, tenham demonstrado propriedades antimicrobianas contra bactérias Gram-positivo e fungos e na inibição da formação de biofilmes (3,30,31), e estes efeitos possam contribuir para reduzir a contaminação, não são suficientes para garantir a segurança microbiológica da planta, sendo imprescindível a aplicação de métodos de avaliação rigorosos (37).

2.1. Legislação e Regulamentação

A regulamentação da *Cannabis* medicinal em países da União Europeia estabelece requisitos específicos para cultivo, colheita, armazenamento, transporte e distribuição, de modo a garantir produtos consistentes, seguros e eficazes. Em Portugal, o INFARMED supervisiona a produção e distribuição, exigindo cumprimento de normas de qualidade microbiológica, química e farmacológica (25,26,32).

Além disso, a legislação internacional, incluindo a Convenção Única sobre Estupefacientes da ONU (1961), define limites para o cultivo e utilização da *Cannabis*, enquanto políticas mais recentes em países como Canadá, Uruguai e Estados Unidos harmonizam a produção medicinal com normas de segurança e rastreabilidade (18,21,22).

2.2. Boas Práticas de Fabrico e Cultivo

As GACP recomendam condições controladas de solo, água, iluminação e ventilação, minimizando o risco de contaminação por microrganismos ambientais ou patogénicos (33,36,38).

Durante o processamento, a aplicação das GMP assegura a limpeza de equipamentos, higienização dos manipuladores, monitorização de temperatura e humidade, e verificação regular de microrganismos críticos, incluindo *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (32,34,39,40).

2.3. Critérios Microbiológicos

A Farmacopeia Europeia estabelece limites para microrganismos em produtos de *Cannabis* medicinal, diferenciando entre preparação para uso por inalação (Capítulo 5.1.4) e para uso oral (Capítulo 5.1.8.c) (32).

Estes critérios incluem:

Microrganismos Totais: carga máxima permitida, monitorizando a contaminação geral (36,38).

Bactérias patogénicas: presença de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* deve ser ausente (27,34,41,42).

Fungos: devem ser monitorizados de modo a evitar riscos para a saúde (36,38), especialmente os produtores de micotoxinas.

Salmonella spp.: Teste de deteção com ausência obrigatória devido ao elevado risco zoonótico (39).

2.4. Sistemas de Rastreabilidade e Controlo de Qualidade

A implementação de sistemas de rastreabilidade desde o cultivo até ao consumidor final é fundamental para prevenir desvios de qualidade e para permitir ações corretivas rápidas em caso de contaminação. Estes sistemas incluem registo de dados ambientais, monitorização microbiológica e química, e certificações periódicas por organismos reguladores (32,33,38).

Além da conformidade legal, a avaliação da qualidade microbiológica contribui para a diferenciação entre produtos legais e ilegais, fornecendo informação forense e proteção da saúde pública (27,28,38).

3. Contaminação Microbiológica em produtos à base de *Cannabis*

Os produtos à base de *Cannabis sativa*, incluindo flores secas, extratos e cápsulas, apresentam elevado risco de contaminação microbiológica devido à natureza da planta e às condições de cultivo, colheita, secagem e armazenamento. A presença de microrganismos patogénicos como bactérias, leveduras e bolores, pode comprometer a segurança do consumidor, sobretudo em inaláveis ou produtos destinados a uso medicinal (27,36,43).

A avaliação microbiológica destes produtos é essencial não só para determinar a carga microbiana total, mas também para identificar contaminantes específicos que possam representar riscos sanitários ou legais. Estudos demonstram que a contaminação varia consoante o genótipo da planta, o ambiente de cultivo, a humidade, as técnicas de colheita e as práticas de armazenamento (38,44).

Alguns compostos presentes na planta, incluindo canabinóides, têm demonstrado atividade antimicrobiana contra certas bactérias, o que poderá modular, mas não eliminar completamente, o risco de contaminação microbiana (35).

Neste contexto, os parâmetros de referência para avaliação microbiológica incluem microrganismos totais, bactérias específicas como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, fungos produtores de micotoxinas, e patógenos críticos como *Salmonella spp.* e *Pseudomonas aeruginosa* (27,33,34).

A deteção rigorosa destes microrganismos é crucial para garantir a conformidade com normas internacionais, incluindo os critérios estabelecidos pela Farmacopeia Europeia para produtos de *Cannabis* medicinal (3,34).

3.1. Microrganismos Totais

A avaliação de microrganismos totais presentes em produtos à base de *Cannabis sativa* permite estimar a carga microbiana geral e o potencial risco sanitário associado ao consumo. Estudos recentes demonstram que a carga total de microrganismos pode variar

significativamente em função do tipo de cultivo, do processamento e das condições de armazenamento (36,38). A monitorização de microrganismos totais é um passo crítico para assegurar a qualidade de amostras, especialmente considerando a suscetibilidade de flores e extratos a contaminação bacteriana e fúngica durante o cultivo e manipulação (36).

3.1.1. Bactérias

As bactérias são frequentemente os principais microrganismos presentes em produtos de *Cannabis*, podendo incluir espécies Gram-positivo como *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*, e Gram-negativos como *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (34,43). A presença destas bactérias depende de fatores ambientais e práticas de higiene no cultivo e armazenamento. Certas espécies Gram-positivo são mais sensíveis a extratos de *Cannabis*, enquanto Gram-negativos como *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa* mostram resistência natural aos compostos antimicrobianos presentes na planta (4,9).

3.1.2. Bolores e Leveduras

Bolores e leveduras são contaminantes comuns em flores secas e extratos de *cannabis*, com destaque para espécies dos géneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (36,38). Estas espécies podem produzir micotoxinas, representando um risco significativo para a saúde do consumidor, principalmente em populações imunocomprometidas. A sua presença está fortemente ligada a fatores como humidade, ventilação e armazenamento inadequado, sendo a monitorização microbiológica essencial para garantir a qualidade do produto final.

3.2. Enterobactérias (bactérias Gram-negativo tolerantes à bÍlis)

As Enterobactérias Gram-negativas tolerantes à bÍlis são indicadores clássicos de contaminação fecal ou ambiental (38). Estas bactérias podem persistir durante o cultivo e processamento, tornando a sua deteção um parâmetro crítico para avaliar práticas de higiene e possíveis fontes de contaminação em produtos de *Cannabis*.

3.3. *Salmonella* spp.

Salmonella é uma enterobactéria (bactéria gram-negativo anaeróbia facultativa), que causa uma infecção zoonótica, uma vez que é uma infecção de animais que pode ser transmitida a humanos (39) e, portanto, é um patógeno cuja presença em produtos à base de *Cannabis*, apesar de rara, é altamente relevante para a saúde pública (38). A contaminação pode ocorrer através de água ou solos contaminados, equipamentos inadequados ou manipulação incorreta, e pode causar febre entérica, enterocolite e bacteriemia, sendo um dos principais grupos de risco indivíduos imunodeprimidos (39). Protocolos de higienização, secagem eficiente e testes microbiológicos regulares são essenciais para prevenir surtos associados a produtos de *Cannabis*.

3.4. *Escherichia coli*

Escherichia coli, tal como todas as enterobactérias, é um indicador de contaminação fecal e ambiental (44). Certas estirpes podem persistir em flores secas ou extratos, particularmente quando o processamento e armazenamento não seguem boas práticas de higiene. A sua deteção é usada como parâmetro de segurança microbiológica, e níveis elevados indicam risco potencial ao consumidor, exigindo investigação e ações corretivas. A infecção por este microrganismo pode causar sintomas de gastroenterite, febre e lesões no intestino (40).

3.5. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é uma bactéria Gram-positivo comumente encontrada em manipulados executados manualmente ou armazenados de forma inadequada (34,41,44). A sua presença pode levar à produção de enterotoxinas e representar risco de intoxicação (41), especialmente em produtos para uso medicinal ou inalável. Os sintomas causados pela infecção são náuseas e vômitos, muitas vezes acompanhados por diarreia e dores abdominais (41). A sua monitorização é essencial para garantir a sua conformidade com requisitos de segurança.

3.6. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria Gram-negativo ambiental, encontrada normalmente em água ou solo (42), resistente a múltiplos antimicrobianos naturais da planta ou ambientais, e a sua presença indica possível contaminação ambiental ou higienização insuficiente durante o cultivo ou processamento (36,38). É especialmente relevante em produtos inaláveis e extratos destinados a indivíduos imunocomprometidos pois, a infecção por este microrganismo pode causar infecções no sangue, nos pulmões, como pneumonia, e no trato urinário. Além dos indivíduos imunocomprometidos, têm um maior risco pessoas com ventiladores, cateteres ou com feridas causadas por cirurgias ou queimaduras (42).

4. *Cannabis* Legal vs. Ilegal: Qualidade e Riscos Associados

Atualmente, a *Cannabis* permanece a substância ilícita mais cultivada e traficada mundialmente (6). A diferença entre *Cannabis* legal e ilegal não se limita ao teor de canabinóides, mas também à qualidade microbiológica (38), reforçando a necessidade de avaliar os riscos associados a cada tipo de amostra, especialmente no que diz respeito à contaminação microbiológica.

4.1. *Cannabis* Legal

Amostras legais são produzidas em condições controladas, com monitorização rigorosa em todas as etapas de cultivo, colheita e processamento. Estas plantas, sujeitas a testes laboratoriais obrigatórios, apresentam geralmente contagens microbianas dentro dos limites permitidos (38), conforme estipulado pela Farmacopeia Europeia, incluído critérios específicos para uso inalável (Capítulo 5.1.4) e uso oral (Capítulo 5.1.8.c) (32).

4.2. *Cannabis* Ilegal

Por outro lado, a *Cannabis* do mercado ilegal excede, frequentemente, os limites microbiológicos permitidos, apresentando contaminações potencialmente perigosas (28). Estas amostras são cultivadas em condições pouco controladas, sem monitorização laboratorial, o que aumenta a probabilidade de presença de microrganismos patogénicos,

incluindo *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (27,37,38).

O consumo de produtos ilegais representa, por isso, um risco significativo, particularmente para pacientes imunocomprometidos, devido à presença de bactérias, leveduras, bolores e fungos produtores de micotoxinas (27,37,38).

4.3. Métodos de Avaliação Microbiológica

A avaliação microbiológica da qualidade da *Cannabis*, tanto legal como ilegal, é essencial para garantir a segurança do consumidor. Os métodos clássicos baseiam-se em técnicas de inoculação em meios seletivos e diferenciais, permitindo a identificação de microrganismos específicos e a quantificação de leveduras, bolores e bactérias (33,38,45).

Apesar de serem procedimentos mais demorados, são reconhecidos pelas entidades reguladoras e descritos em normas oficiais como a Farmacopeia Europeia, e continuam a ser fundamentais para o controlo de qualidade da matéria-prima vegetal. A entrada da *Cannabis* no mercado farmacêutico está sujeita a regulamentações rigorosas, exigindo métodos validados e ambientes controlados, garantindo a conformidade microbiológica para diferentes vias de administração (32,37,38).

5. Mapeamentos Microbiológicos e Perspetivas Forenses

A caracterização microbiológica de produtos derivados de *Cannabis sativa* têm vindo a ganhar crescente relevância, não apenas no contexto do controlo de qualidade, mas também no domínio da investigação forense (1,2). O perfil microbiano presente em diferentes lotes de *Cannabis* pode refletir as condições ambientais e geográficas do cultivo, bem como as práticas de manuseamento e armazenamento, funcionando como um marcador indireto da sua origem e qualidade (27,38).

5.1. Aplicações no Controlo de Qualidade e Segurança de Produtos

Em amostras de *Cannabis* de origem legal, produzidas em conformidade com as normas da Farmacopeia Europeia, o perfil microbiológico é monitorizado de forma rigorosa para assegurar a ausência de microrganismos patogénicos, como *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (39–42).

A implementação de sistemas de controlo microbiológico baseados em métodos clássicos permite quantificar a carga microbiana total e identificar contaminantes específicos, garantindo que o produto final cumpre os limites definidos nos capítulos 5.1.4.c e 5.1.8 da Farmacopeia Europeia (32).

Estudos recentes demonstram que a contaminação microbiana pode afetar não apenas a segurança do consumidor, mas também a estabilidade química dos canabinóides, uma vez que fungos e bactérias podem degradar compostos ativos e alterar o perfil farmacológico do produto (3,44). A análise comparativa entre amostras legais e ilegais mostra que estas últimas tendem a exceder os limites microbiológicos permitidos, refletindo práticas de cultivo menos controladas, ausência de esterilização e condições inadequadas de secagem e armazenamento (28,43).

Além disso, a construção de bases de dados com informação microbiológica proveniente de diferentes regiões de cultivo pode auxiliar empresas farmacêuticas na padronização de processos e na rastreabilidade de lotes, permitindo identificar falhas de controlo e implementar medidas corretivas em tempo útil (27,33,36). Este tipo de abordagem tem sido aplicado com sucesso em setores como o alimentar e o fitoterapêutico, e começa agora a ganhar espaço no setor da *Cannabis* medicinal (46).

5.2. Aplicações Forenses e Rastreabilidade de Origem

No contexto forense, a análise microbiológica da *Cannabis* sativa representa uma ferramenta inovadora e complementar às técnicas químicas tradicionais, como a cromatografia e a espectrometria de massa (2,43). O perfil microbiano, quando associado a dados genéticos e químicos, pode ajudar a identificar a origem geográfica de uma amostra, distinguindo material cultivado em ambiente controlado de material proveniente de cultivos ilícitos (36,38).

A assinatura microbiológica — composta por microrganismos específicos associados a determinadas regiões, substratos ou práticas agrícolas — tem o potencial de funcionar como um “indicador biogeográfico” (13). Tal abordagem tem sido explorada em estudos internacionais, nos quais se demonstrou que padrões microbianos específicos estão correlacionados com variáveis ambientais locais, como tipo de solo, altitude e humidade (38,47).

Esta vertente forense apresenta grande relevância para as autoridades policiais e laboratoriais, nomeadamente para a Polícia Judiciária, permitindo o desenvolvimento de ferramentas de rastreabilidade microbiana que possam auxiliar na identificação da origem de produtos de *Cannabis* apreendidos (46,48). Com o avanço das técnicas moleculares, é possível gerar perfis genómicos completos da microbiota associada às amostras, tornando viável a criação de mapas microbiológicos que funcionam como uma “impressão digital biológica” da origem da planta (10).

Além do seu valor em investigações criminais, o mapeamento microbiológico pode também contribuir para diferenciar cadeias de produção legal e ilegal, reforçando a confiança do consumidor e a integridade do mercado farmacêutico (36). A aplicação desta metodologia, integrada com dados físico-químicos (como o perfil de canabinóides e terpenos), tem o potencial de formar bases de dados forenses robustas que podem servir como referência em casos de tráfico, contrafação ou contaminação intencional (49).

5.3. Considerações Finais

O mapeamento microbiológico de amostras de *Cannabis sativa* constitui uma abordagem multidimensional com relevância tanto industrial como forense (1,27).

No setor farmacêutico, permite o controlo de qualidade, a rastreabilidade de lotes e a garantia da segurança do consumidor (50). No âmbito forense, possibilita a criação de perfis microbiológicos e biogeográficos que podem ser usados como evidência em investigações criminais (8).

A combinação entre técnicas clássicas e moleculares, associada à análise estatística de grandes conjuntos de dados, oferece novas perspetivas para a identificação da origem das amostras e para o fortalecimento das normas de segurança e rastreabilidade no mercado da canábis medicinal (46).

Esta integração entre ciência, regulação e justiça reflete o potencial transformador da microbiologia aplicada à *Cannabis sativa*, posicionando-a como uma ferramenta de valor crescente tanto na investigação científica como na aplicação forense (33,47).

6. Objetivos

Esta dissertação de mestrado apresenta dois objetivos principais.

O primeiro consiste em desenvolver e aplicar um protocolo de análises microbiológicas, adaptado a análise de pequenas quantidades de *Cannabis sativa* ($\pm 0,025\text{g}$; 25mg), com vista à sua aplicação em amostras de origem ilícita. Os resultados obtidos serão posteriormente comparados com os limites estabelecidos pela Farmacopeia Europeia nos capítulos 5.1.8 – Uso oral, 5.1.4.b – Inaláveis antes da embalagem, e 5.1.4.c – inaláveis prontos a usar, permitindo assim avaliar a conformidades destas amostras com os critérios regulamentares e discutir o potencial risco sanitário associado.

Paralelamente, será realizada uma análise retrospectiva de dados laboratoriais, previamente recolhidos em parceria com a empresa Cannprisma Pharma., referentes a amostras legais de *Cannabis sativa*, processadas nos últimos 6 meses. Com base na origem geográfica e no perfil microbiológico destas amostras, pretende-se construir um mapa de prevalência microbiana por país de origem, contribuindo para uma melhor compreensão das variações microbianas associadas à produção e processamento da planta em diferentes regiões.

Capítulo 2: Metodologia

Este projeto foi composto por uma vertente laboratorial, onde foi desenvolvido e aplicado um protocolo para a realização de análises microbiológicas adaptadas a pequenas quantidades, e por um estudo retrospectivo de dados laboratoriais de análises microbiológicas e análises químicas, complementares, realizadas na empresa Cannprisma Pharma.

Esta abordagem combinada permite não só verificar a aplicabilidade de metodologias microbiológicas em pequena escala mas, também, contextualizar os resultados obtidos em amostras ilegais face aos padrões de qualidade e segurança estabelecidos para amostras de origem controlada e certificada.

1. Desenvolvimento e aplicação de um protocolo aplicado a baixas quantidades

O protocolo desenvolvido tem como principais objetivos: quantificar microrganismos totais – bactérias aeróbias mesófilas, bolores e leveduras -, e detetar microrganismos específicos com relevância para a saúde pública – *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, e Enterobactérias e outras bactérias Gram-negativo tolerantes à bilis.

O desenvolvimento deste protocolo, baseou-se no protocolo utilizado na empresa Cannprisma Pharma e a farmacopeia Europeia, e as quantidades foram adaptadas para a utilização de uma amostra com $\pm 0,025\text{g}$ (25mg).

Para avaliar a aplicabilidade do protocolo da Cannprisma Pharma a pequenas quantidades de amostra, foram criados dois procedimentos experimentais.

No primeiro procedimento (P1) a quantidade de amostra foi $\pm 0,025\text{g}$ (25mg), mantendo as quantidades de reagentes (soluções e meios de cultura) iguais ao protocolo da Cannprisma.

No segundo procedimento (P2), utilizou-se $\pm 0,025\text{g}$ (25mg) de amostra, mas adaptou-se as quantidade de reagentes (soluções e meios de cultura) para que fossem 10x menores do que no primeiro procedimento.

Assim, foi possível avaliar a viabilidade da metodologia em condições de menor escala e verificar se a redução de reagentes influencia a detecção e quantificação microbiana.

Os ensaios para ambos os protocolos incluíram a análise de Enterobactérias e outras bactérias Gram-negativo tolerantes à biliar, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella spp.* e Microrganismos Totais (TYMCs e TAMCs), seguindo os procedimentos descrito abaixo, nas subseções 1.1 e 1.2.

As amostras utilizadas foram fornecidas pelo Laboratório de Toxicologia Forense do Instituto Universitário Egas Moniz.

1.1. Procedimento 1

Nota: Para a realização das diferentes análises foi usada a mesma solução inicial (Solução 1 – S1). Para as análises de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* foi usada a Solução 2 (S2), que consiste em 10mL de S1 + 90mL de TSB.

Para fazer a solução inicial (Solução 1): pesou-se $\pm 0,025\text{g}$ (25mg) de amostra, adicionou-se a 90mL de TSB (Tryptic Soy Broth) e homogeneizou-se por meio de uma placa de agitação.

1.1.1. Enterobactérias e outras bactérias Gram-negativo tolerantes à biliar

Dia 1

Retirou-se 10mL de Solução 1 para um tubo de falcon e incubou-se 2 horas a 25 °C.

Ao final das 2 horas, transferiu-se os 10mL de Solução 1 para 100mL de meio Mossel e incubou-se 48 horas a 30 °C.

Dia 3

Retirou-se o meio Mossel da estufa e inoculou-se, por método de riscado, uma placa de VRBGA (Violet-Red Bile Glucose Agar) e incubou-se 24 horas a 30 °C.

Dia 4

Retiraram-se as placas de VRBGA da estufa e foram registados os resultados.

1.1.2. *Escherichia coli*

Dia 1

Retirou-se 10mL de solução 1 e adicionou-se a 90mL de TSB, criando assim a Solução 2 (TSB + Solução 1). Colocou-se a incubar 24 horas a 30 °C.

Dia 2

Retirou-se a Solução 2 da estufa, transferiu-se 1mL para 100mL de meio MacConkey Broth e incubou-se 48 horas a 44 °C.

Dia 4

Retirou-se o meio MacConkey Broth da estufa e inoculou-se, por método de riscado, uma placa de MacConkey Agar. Incubou-se 72 horas a 30 °C.

Dia 7

Retirou-se as placas de MacConkey Agar da estufa e foram registados os resultados.

1.1.3. *Staphylococcus aureus*

Dia 1

Retirou-se 10mL de solução 1 e adicionou-se a 90mL de TSB, criando assim a Solução 2 (TSB + Solução 1). Colocou-se a incubar 24 horas a 30 °C.

Dia 2

Retirou-se a Solução 2 da estufa, inoculou-se, por método de riscado, placas de Manitol Sal Agar (MSA) e colocou-se a incubar 72 horas a 30 °C.

Dia 5

Retirou-se as placas de MSA da estufa e foram registados os resultados.

1.1.4. *Pseudomonas aeruginosa*

Dia 1

Retirou-se 10mL de solução 1 e adicionou-se a 90mL de TSB, criando assim a Solução 2 (TSB + Solução 1). Colocou-se a incubar 24 horas a 30 °C.

Dia 2

Retirou-se a Solução 2 da estufa, inoculou-se, por método de riscado, placas de Cetrimida e colocou-se a incubar 72 horas a 30 °C.

Dia 5

Retirou-se as placas de Cetrimida da estufa e foram registados os resultados.

1.1.5. *Salmonella spp.*

Dia 1

Preparou-se a Solução 1 e colocou-se a incubar 24 horas a 30 °C.

Dia 2

Retirou-se a solução 1 da estufa e transferiu-se 100µL desta para 10mL de Rappaport-Vassiliadis. Incubou-se 24 horas a 30 °C.

Dia 3

Retirou-se o Meio Rappaport-Vassiliadis da estufa e inoculou-se, por método de riscado, placas de XLD (Xilose Lisina Desoxicolato). Colocou-se a incubar 48 horas a 30 °C.

Dia 5

Retirou-se as placas de XLD da estufa e foram registados os resultados.

1.1.6. Microrganismos totais

Dia 1

A partir da Solução 1, inoculou-se, por espalhamento, placas de TSA (Tryptic Soy Agar) e SDA (Sabouraud Dextrose Agar), em duplicado, com 1mL de solução em cada placa. Colocou-se a incubar: o TSA durante 5 dias a 30 °C e o SDA durante 7 dias a 25 °C.

Dia 5

Retirou-se as placas de TSA da estufa e foram registados os resultados.

Dia 7

Retirou-se as placas de SDA da estufa e foram registados os resultados.

1.2. Procedimento 2

Nota: Para a realização das diferentes análises foi usada a mesma solução inicial (S1). Para as análises de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* foi usada a S2, que consiste em 10mL de S1 + 90mL de TSB.

Para fazer a solução inicial (Solução 1): pesou-se $\pm 0,025\text{g}$ (25mg) de amostra, adicionou-se a 9mL de TSB e homogeneizou-se por meio de vórtex.

1.2.1. Enterobactérias e outras bactérias Gram-negativo tolerantes à bilis

Dia 1

Retirou-se 1mL de Solução 1 para um tubo eppendorf e incubou-se 2 horas a 25°C.

Ao final das 2 horas, transferiu-se o 1mL de Solução 1 para 10mL de meio Mossel e incubou-se 48 horas a 30 °C.

Dia 3

Retirou-se o meio Mossel da estufa e inoculou-se, por método de riscado, uma placa de VRBGA (Violet-Red Bile Glucose Agar) e incubou-se 24 horas a 30 °C.

Dia 4

Retiraram-se as placas de VRBGA da estufa e foram registados os resultados.

1.2.2. *Escherichia coli*

Dia 1

Retirou-se 1mL de solução 1 e adicionou-se a 9mL de TSB, criando assim a Solução 2 (TSB + Solução 1). Colocou-se a incubar 24 horas a 30 °C.

Dia 2

Retirou-se a Solução 2 da estufa, transferiu-se 100μL desta para 10mL de meio MacConkey Broth e incubou-se 48 horas a 44 °C.

Dia 4

Retirou-se o meio MacConkey Broth da estufa e inoculou-se, por método de riscado, uma placa de MacConkey Agar. Incubou-se 72 horas a 30 °C.

Dia 7

Retirou-se as placas de MacConkey Agar da estufa e foram registados os resultados.

1.2.3. *Staphylococcus aureus*

Dia 1

Retirou-se 1mL de solução 1 e adicionou-se a 9mL de TSB, criando assim a Solução 2 (TSB + Solução 1). Colocou-se a incubar 24 horas a 30 °C.

Dia 2

Retirou-se a Solução 2 da estufa, inoculou-se, por método de riscado, placas de MSA e colocou-se a incubar 72 horas a 30 °C.

Dia 5

Retirou-se as placas de MSA da estufa e foram registados os resultados.

1.2.4. *Pseudomonas aeruginosa*

Dia 1

Retirou-se 1mL de solução 1 e adicionou-se a 9mL de TSB, criando assim a Solução 2 (TSB + Solução 1). Colocou-se a incubar 24 horas a 30 °C.

Dia 2

Retirou-se a Solução 2 da estufa, inoculou-se, por método de riscado, placas de Cetrimida e colocou-se a incubar 72 horas a 30 °C.

Dia 5

Retirou-se as placas de Cetrimida da estufa e foram registados os resultados.

1.2.5. *Salmonella* spp.

Dia 1

Preparou-se a Solução 1 e colocou-se a incubar 24 horas a 30 °C.

Dia 2

Retirou-se a solução 1 da estufa e transferiu-se 10µL desta para 1mL de Rappaport-Vassiliadis. Incubou-se 24 horas a 30 °C.

Dia 3

Retirou-se o Meio Rappaport-Vassiliadis da estufa e inoculou-se, por método de riscado, placas de XLD (Xilose Lisina Desoxicolato). Colocou-se a incubar 48 horas a 30 °C.

Dia 5

Retirou-se as placas de XLD da estufa e foram registados os resultados.

1.2.6. Microrganismos Totais

Dia 1

A partir da Solução 1, inoculou-se, por espalhamento, placas de TSA (Tryptic Soy Agar) e SDA (Sabouraud Dextrose Agar), em duplicado, com 100µL de solução em cada placa. Colocou-se a incubar: o TSA durante 5 dias a 30 °C e o SDA durante 7 dias a 25 °C.

Dia 5

Retirou-se as placas de TSA da estufa e foram registados os resultados.

Dia 7

Retirou-se as placas de SDA da estufa e foram registados os resultados.

1.3. Controlo de Qualidade dos Meios de Cultura

Para a validação da funcionalidade e esterilidade dos meios utilizados, de modo a garantir validade analítica dos resultados, foram realizados controlos positivos e negativos para cada meio. Os controlos positivos foram inoculados com estirpes de referência.

Para os meios TSB, MacConkey Broth, MacConkey Agar, VRBGA e Mossel utilizou-se *Escherichia coli*. Para o meio MSA utilizou-se *Staphylococcus aureus*. Para o meio

Cetrimida utilizou-se *Pseudomonas spp.*. Para os meios Rappaport-Vassiliadis e XLD utilizou-se *Salmonella spp.*

Os controlos negativos consistiram em placas e frascos dos meios utilizados, que foram incubados sem inoculação.

Todos os controlos positivos apresentaram crescimento com as características esperadas para cada meio, enquanto todos os controlos negativos permaneceram sem crescimento. Estes resultados confirmam que os meios estavam estéreis e funcionais antes da sua utilização nas amostras experimentais, suportando assim a validade analítica dos resultados obtidos nas amostras.

2. Recolha e análise de dados laboratoriais

A vertente retrospectiva do estudo baseou-se em dados laboratoriais provenientes da empresa Cannprisma Pharma, empresa licenciada para o cultivo, processamento, transformação e análise da planta para fins medicinais.

Neste estudo foram incluídos 211 produtos acabados (PA) e 167 matérias-primas (MP), totalizando 378 amostras analisadas entre fevereiro de 2024 e junho de 2025.

Os dados foram exportados a partir do sistema interno da empresa e organizados num ficheiro digital de Microsoft Excel, estruturado em diferentes folhas de acordo com a natureza das amostras e dos parâmetros avaliados.

Para permitir a correspondência entre produtos acabados e as respetivas matérias-primas foi criada uma coluna designada “ID Lote” que associa os dois tipos de amostras, o que permitiu emparelhá-las e comparar os parâmetros microbiológicos e físico-químicos, diretamente.

Cada registo incluiu:

- Informação Geral: Data de análise, país de origem e ID de lote
- Avaliação visual e física: Presença de matéria estranha, observações macroscópicas e microscópicas e teor de humidade.
- Parâmetros microbiológicos: Contagem de microrganismos totais (microrganismos aeróbios – TAMCs – em TSA e fungos e leveduras – TYMCs – em SDA), deteção de

enterobactérias e outras bactérias gram-negativo tolerantes á bÍlis, *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, e *Salmonella spp.*

- Parâmetros físico-químicos complementares: Teor de canabinóides (THC, THCA, CBD, CBDA e CBN), pesticidas, metais pesados, (Cd, Pb, Hg, As, Ni e Zn) e micotoxinas (aflatoxina B1, B2, G1, G2 e Ocratoxina A), determinadas por métodos experimentais, nomeadamente HPLC.

Os dados foram posteriormente normalizados, verificados quanto à duplicação e erros de inserção, e agrupados segundo o tipo de amostra – MP (Matéria-Prima), PA (Produto Acabado), Ilegais P1 e Ilegais P2.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Jamovi (51), uma plataforma de análises estatísticas de código aberto baseada no ambiente R.

Este software foi selecionado pela sua interface semelhante ao SPSS mas mais intuitiva, e pela implementação rigorosa de testes não-paramétricos adequados a dados microbiológicos.

Foram ainda construídos mapas de prevalência microbiana por país de origem, utilizando a plataforma Datawrapper (52). Esta ferramenta permite a visualização de dados e a criação de mapas geográficos interativos a partir de dados em tabelas.

3. Análise Estatística dos Dados

As análises foram planeadas com o objetivo de descrever, comparar e correlacionar os resultados microbiológicos e físico-químicos entre os diferentes grupos de amostras.

3.1. Estatística Descritiva

Para cada parâmetro microbiológico foram calculadas as seguintes métricas:

- Número de amostras (n)
- Média $\pm$ desvio padrão
- Mediana
- Mínimo e Máximo
- Percentis (P25 e P75)
- Taxa de conformidade (% dentro dos limites definidos pela Farmacopeia Europeia)

3.2. Testes de Comparação

- Matéria-prima vs. produto acabado e Legais vs. Ilegais: Teste de Wilcoxon para amostras emparelhadas avaliando o efeito do processamento.
- Teste de Normalidades: Shapiro-Wilk, para determinar o uso de métodos paramétricos e não paramétricos

3.3. Análise de Conformidade

Esta análise serve para comparar os resultados com os limites microbiológicos definidos pela Farmacopeia Europeia, distinguindo entre amostras legais e ilegais. Foram calculadas a proporção de amostras não-conformes para cada parâmetro e grupo, aplicando o teste do qui-quadrado (X^2) para comparação de proporções.

3.4. Análise de Frequência

Para os microrganismos patogénicos de presença e ausência – *Salmonella spp.*, *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*, será determinada a frequência de deteção (%) e comparada entre grupos através do teste exato de Fisher.

3.5. Correlação entre parâmetros

Será aplicado o coeficiente de correlação de Spearman para identificar possíveis relações entre as diferentes variáveis microbiológicas e entre variáveis microbiológicas e físico-químicas.

3.6. Tratamento de Dados

Durante a análise dos dados laboratoriais, foi necessário proceder ao tratamento de valores que se encontravam fora dos limites de deteção dos métodos analíticos utilizados. Este tratamento foi essencial para permitir a análise estatística adequada dos dados recolhidos.

3.6.1. Valores Abaixo do Limite de Detecção do Método

Diversos resultados microbiológicos e físico-químicos foram reportados com valores inferiores ao limite de detecção do método (por exemplo: <10, <100, <1000 UFC/g para contagens microbianas; <0,05%, <0,2% para canabinóides; <0,005, <0,020 mg/kg para metais pesados; <0,025 µg/kg para micotoxinas).

Para estes valores, foi aplicada a metodologia recomendada por Horgun & Reed (53) e Helsel (54), que consiste na substituição pelo valor correspondente a metade do limite de quantificação. Esta abordagem é amplamente utilizada na análise de dados à esquerda em estudos ambientais e toxicológicos, permitindo a inclusão dos dados nas análises estatísticas sem sobrestimar as concentrações reais.

Alguns exemplos da conversão aplicada são:

- <100 UUFC/g → 50 UFC/g
- <0,2% → 0,1%
- <0,005 mg/kg → 0,0025 mg/kg

3.6.2. Valores Acima do Limite de Detecção do Método

Alguns resultados apresentaram-se acima do limite superior de quantificação do método (por exemplo: $>3,00 \times 10^5$ UFC/g). Nestes casos, os valores foram mantidos no limite máximo de quantificação, representando uma abordagem conservadora que não sobrestima os valores reais. Esta estratégia segue as recomendações da norma ISO 7218:2013 (55) para análises microbiológicas.

3.6.3. Valores expressos em Intervalos de Ordem de Grandeza

Nos dados recolhidos da empresa Cannprisma Pharma, os valores de enterobactérias e outras bactérias gram-negativo, foram frequentemente reportados em intervalos de ordem de grandeza (por exemplo: $>10 < 10^2$, $>10^2 < 10^3$, $>10^3 < 10^4$). Para estes casos, calculou-se o ponto médio geométrico de cada intervalo, uma vez que esta metodologia é a mais apropriada para dados microbiológicos que apresentam distribuição logarítmica (56).

O cálculo do ponto médio geométrico foi realizado através da fórmula:

$$PMG = \sqrt{(\limite inferior \times \limite superior)}$$

Exemplos das conversões aplicadas são:

- $10 < 10^2$ (10-100 UFC/g) $\rightarrow \sqrt{(10 \times 100)} = 31,6$ UFC/g
- $10^2 < 10^3$ (100-1000 UFC/g) $\rightarrow \sqrt{(100 \times 1000)} = 316$ UFC/g
- $10^3 < 10^4$ (1000-10000 UFC/g) $\rightarrow \sqrt{(1000 \times 10000)} = 3162$ UFC/g

Esta abordagem preserva a natureza logarítmica dos dados microbiológicos e é superior ao cálculo do ponto médio aritmético, que tende a sobrestimar os valores centrais dos intervalos(57).

3.6.4. Fundamentação Estatística

O tratamento adequado de dados é fundamental para garantir a validade das análises estatísticas. A eliminação simples destes valores ou a sua substituição por zero introduziria um desvio significativo nos resultados e reduziria o poder estatístico das comparações realizadas (58).

As metodologias aplicadas neste estudo representam o compromisso adequado e rigor estatístico e conservadorismo analítico, sendo consistentes com as recomendações da *Environmental Protection Agency* (59), e amplamente aplicadas em estudos de contaminação ambiental e avaliação de risco.

4. Síntese Metodológica

A combinação das duas abordagens visa, então, permitir uma análise comparativa abrangente entre amostras de *Cannabis sativa* de origens legal e ilegal, de modo a avaliar a qualidade microbiológica e a conformidade com as normas da Farmacopeia Europeia.

Este desenho metodológico permite também inferir sobre o impacto do processamento industrial e da regulamentação na redução da carga microbiana e na segurança do produto final.

5. Análise Geográfica e Construção de um Mapa

Para complementar a análise microbiológica, foi efetuada uma análise geográfica das amostras de origem legal, utilizando os dados do região de origem e o ID de lote, com o objetivo de identificar padrões de contaminação microbiana em função da localização geográfica.

Os dados foram ser processados no Microsoft Excel, e cada amostra foi mapeada de acordo com os microrganismos detetados e os níveis de contagem microbiana.

Este mapa vai permitir identificar áreas de maior risco de contaminação microbiana, comparar padrões de contaminação em diferentes regiões e fornecer um suporte visual para futuras análises forenses e decisões regulatórias.

A construção do mapa seguiu princípios de confidencialidade, garantindo que nenhuma informação sensível de fornecedores será identificável.

Capítulo 3: Resultados

Neste capítulo apresentam-se os resultados obtidos tanto na análise retrospectiva de dados da empresa Cannprisma Pharma como no estudo laboratorial realizado com amostras de *Cannabis sativa* de origem ilícita. A análise estatística foi efetuada utilizando o software Jamovi (versão 2.3) para todos os testes estatísticos, e os mapas geográficos foram construídos através da plataforma Datawrapper.

1. Caracterização Microbiológico das Amostras Legais

1.1. Matéria-Prima

Foram analisadas 167 amostras de matéria-prima de *Cannabis sativa* provenientes de produção legal e regulamentada. Os resultados revelaram grande variabilidade nas contagens microbianas, que é uma característica típica de produtos de origem vegetal não processados (Tabela 1).

Tabela 1 - Estatística descritiva às variáveis TAMCs, TYMCs e enterobactérias das amostras legais de matéria-prima (MP), em UFC/g.

Estatística Descritiva				
Parâmetro	Grupo	TAMCs	TYMCs	Gram
N	Legal_MP	167	167	167
Média		5,64x10 ⁴	8,37 x10 ⁴	1,31 x10 ³
Mediana		5,00 x10 ²	5,00 x10 ²	5,00 x10 ²
Desvio-padrão		2,63x10 ⁵	3,62 x10 ⁵	2,91 x10 ³
Mínimo		50	5	5
Máximo		3,00 x10 ⁶	3,00 x10 ⁶	1,00 x10 ⁴
25º percentil		50	50	5
75º percentil		4,65 x10 ³	6,35 x10 ³	3,16 x10 ²

As contagens de microrganismos aeróbios mesófilos (TAMCs) apresentam valores muitos dispersos, com uma mediana de 5,00x10² UFC/g mas com alguns valores

extremamente elevados, atingindo um máximo de $3,00 \times 10^6$ UFC/g. Esta amplitude é refletida no desvio-padrão de $2,63 \times 10^5$ UFC/g, indicando que, embora a maioria das amostras apresente um carga microbiana baixa, existem algumas amostras com contaminação consideravelmente superior.

Para os bolores e leveduras (TYMCs), observou-se um padrão semelhante. A mediana é de $5,00 \times 10^2$ UFC/G e um máximo de $3,00 \times 10^6$ UFC/g e contém um desvio-padrão particularmente elevado de $3,62 \times 10^5$ UFC/g, o que demonstra a elevada variabilidade na carga fúngica presente na matéria-prima.

As enterobactérias mantiveram-se em níveis baixos na maioria das amostras, com mediana de 5 UFC/g. Os percentis de 25 e 75 encontram-se entre os 5 e os $3,16 \times 10^2$ UFC/g, o que indica que a grande maioria das amostras apresenta contagens reduzidas deste grupo microbiano, apesar de algumas amostras terem atingido um valor máximo de $1,00 \times 10^4$ UFC/g.

Relativamente aos microrganismos patogénicos pesquisados, os resultados foram bastante positivos. Não foi detetada a presença de *Escherichia coli* em nenhuma das 167 amostras testadas (Tabela 2), apresentando 100% de conformidade de acordo com os critérios da Farmacopeia Europeia. Da mesma forma, não foi encontrada *Salmonella spp.* em nenhuma amostra (n=167, 100% ausência) (Tabela 2). Para a *Pseudomonas aeruginosa* e o *Staphylococcus aureus*, que foram pesquisados em 52 amostras, também se observou ausência total, e por conseguinte, 100% de conformidade (Tabela 2).

Tabela 2 - Frequência dos microrganismos patogénicos em amostras legais de matéria-prima (MP).

Frequências de Microrganismos Patogénicos

Legal_MP	Microrganismo	Contadores	% do Total
Ausente	<i>Escherichia coli</i>	167	100.0%
	<i>Salmonella</i>	167	100.0%
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	52	100.0%
	<i>Staphylococcus aureus</i>	52	100.0%

1.2. Produto Acabado

As 211 amostras de produto acabado apresentaram perfil microbiológico substancialmente melhor do que o observado na matéria-prima, evidenciando o efeito benéfico do processamento industrial (Tabela 3).

Tabela 3 - Estatística descritiva às variáveis TAMCs, TYMCs e enterobactérias das amostras legais de produto acabado (PA), em UFC/g.

Estatística Descritiva				
	Grupo	TAMCs	TYMCs	Gram
N	Legal_PA	211	211	210
Média		$2,59 \times 10^3$	$2,69 \times 10^3$	$3,82 \times 10^2$
Mediana		50	50	5
Desvio-padrão		$8,45 \times 10^3$	$7,42 \times 10^3$	$9,81 \times 10^2$
Mínimo		5	5	5
Máximo		$6,70 \times 10^4$	$4,70 \times 10^4$	$3,16 \times 10^3$
25º percentil		50	50	5
75º percentil		$8,50 \times 10^2$	$1,15 \times 10^3$	31,6

A mediana dos TAMCs reduziu para 50 UFC/g (dez vezes inferior à matéria-prima), variando entre um mínimo de 5 UFC/g e um máximo de $6,70 \times 10^5$ UFC/g. Esta redução tanto da mediana como do valor máximo demonstra a eficácia do processamento na redução da carga microbiana aeróbia.

Os TYMCs apresentaram uma mediana igual aos TAMCs, de 50 UFC/g, com valores entre 5 e $4,70 \times 10^4$ UFC/g. Comparando com a matéria-prima, verifica-se não só uma redução na mediana mas também uma diminuição considerável do valor máximo, sugerindo controlo eficaz da contaminação fúngica durante o processamento.

As enterobactérias mantiveram a mediana em 5 UFC/g, mas com valor máximo reduzido para $3,16 \times 10^3$ UFC/g (comparado com $1,00 \times 10^5$ UFC/g na matéria-prima), o que indica que o processamento foi particularmente eficaz na redução deste grupo microbiano.

Tal como na matéria-prima, não foi detetada presença de *E. coli*, *Salmonella spp.*, *P. aeruginosa* ou *S. aureus* em nenhuma das amostras de produto acabado. Existiu, no entanto, uma amostra em que, em vez de se quantificar as enterobactérias, fez-se apenas deteção (Ausente/Presente) e esta também foi ausente, mantendo-se assim os 100% de conformidade para todos os microrganismos patogénicos pesquisados (Tabela 4).

Tabela 4 - Frequência dos microrganismos patogénicos em amostras legais de produto acabado (PA).

Frequências de Microrganismos Patogénicos			
Legal_PA	Microrganismo	Contadores	% do Total
Ausente	Gram	1	100.0%
	<i>Escherichia coli</i>	211	100.0%
	<i>Salmonella</i>	211	100.0%
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	104	100.0%
	<i>Staphylococcus aureus</i>	104	100.0%

1.3.Efeito do Processamento: Comparação entre Matéria-Prima e Produto Acabado

Para avaliar o impacto do processamento industrial na carga microbiana, realizou-se análise estatística de amostras emparelhadas (n=167 pares) utilizando o teste de Wilcoxon, apropriado para dados não-normais emparelhados (Tabela 5). A normalidade foi verificada pelo teste Shapiro-Wilk (Tabela 6).

Os resultados demonstraram diferenças altamente significativas para todos os parâmetros quantitativos. As contagens de TAMCs foram significativamente inferiores no produto acabado (W=7542, $p<0,001$), confirmando que o processamento reduz eficazmente a carga aeróbia total. Os TYMCs apresentaram igualmente redução significativa (W=9240, $p<0,001$), demonstrando controlo eficaz da contaminação fúngica.

Resultados

Tabela 5 – Teste W de Wilcoxon para comparação das diferentes análises entre os dois grupos de amostras legais, Matéria-prima (MP) e Produto Acabado (PA).

Teste t para amostras emparelhadas

			Estatística	p
TAMCs_MP	TAMCs_PA	W de Wilcoxon	7542 ^a	<.001
TYMCs_MP	TYMCs_PA	W de Wilcoxon	9240 ^b	<.001
Gram-_MP	Gram-_PA	W de Wilcoxon	2405 ^d	<.001

Nota. H_a $\mu_{Medida\ 1} - Medida\ 2 \neq 0$

^a 27 par(es) de valores empatados

^b 13 par(es) de valores empatados

^d 86 par(es) de valores empatados

Tabela 6 - Teste de Shapiro-Wilk para verificação da normalidade.

Nota: Se $p > 0,05$ a distribuição apresenta-se normal; Se $p < 0,05$ a distribuição apresenta-se não normal.

Estatística Descritiva

	TAMCs_MP	TAMCs_PA	TYMCs_MP	TYMCs_PA	Gram_MP	Gram_PA
N	167	167	167	167	167	167
W de Shapiro-Wilk	0.212	0.397	0.238	0.436	0.489	0.447
p Shapiro-Wilk	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001

As enterobactérias, apesar de já apresentarem valores baixos na matéria-prima, reduziram ainda mais significativamente no produto acabado ($W=2405$, $p<0,001$), reforçando a eficácia do processamento na eliminação deste grupo microbiano indicador.

O teste de Kruskal-Wallis (Tabela 7), utilizado para comparar os diferentes grupos de amostras, confirmou estas diferenças significativas: TAMCs ($\chi^2=77,6$, $gl=3$, $p<0,001$), TYMCs ($\chi^2=46,4$, $gl=3$, $p<0,001$) e enterobactérias ($\chi^2=8,32$, $gl=1$, $p=0,004$).

Tabela 7 - Teste de Kruskal-Wallis para comparação de TAMCs, TYMCs e enterobactérias das amostras legais.

Kruskal-Wallis MP vs. PA			
	χ^2	gl	p
TAMCs	77.6	3	<.001
TYMCs	46.4	3	<.001
Gram negativo	8.32	1	0.004

2. Caracterização Microbiológica de Amostras de Origem Ilícita

2.1. Procedimento 1: Volumes Standard

As 18 amostras de *Cannabis* de origem ilegal analisadas através do Procedimento 1 apresentaram contagens microbianas consideravelmente elevadas comparativamente ao produto acabado legal, mas com valores ainda dentro dos limites permitidos pela Farmacopeia Europeia para TAMCs e TYMCs (Tabela 8).

Tabela 8 - Estatística descritiva às variáveis TAMCs e TYMCs das amostras ilícitas analisadas através do Procedimento 1 (P1), em UFC/g.

Estatística Descritiva			
	Grupo	TAMCs	TYMCs
N	Ilegais_P1	18	18
Média		1,24x10 ⁴	2,00x10 ³
Mediana		3,60x10 ³	1,80x10 ³
Desvio-padrão		1,76x10 ⁴	5,82x10 ²
Mínimo		1,80x10 ³	1,80x10 ³
Máximo		6,12x10 ⁴	3,60x10 ³
25º percentil		1,80x10 ³	1,80x10 ³
75º percentil		1,26x10 ⁴	1,80x10 ³

Resultados

A mediana de TAMCs foi de 3.600 UFC/g, cerca de 72 vezes superior à do produto acabado legal. Os valores variaram entre 1.800 e 61.200 UFC/g, demonstrando alguma heterogeneidade entre as amostras ilegais analisadas.

Para TYMCs, observou-se mediana de 1.800 UFC/g (36 vezes superior ao produto acabado legal), com valores entre 1.800 e 3.600 UFC/g. A menor amplitude de variação neste parâmetro, comparativamente aos TAMCs, sugere que a carga fúngica é mais homogênea entre as diferentes amostras ilegais.

Relativamente aos microrganismos patogênicos pesquisados, não foi detetada presença de enterobactérias e outras bactérias gram-negativo, *Salmonella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa* ou *E. coli* em nenhuma das 18 amostras (100% ausência) (Tabela 9).

Contudo, *Staphylococcus aureus* foi detetado em 4 das 18 amostras analisadas, correspondendo a uma taxa de detecção de 22,2% (Tabela 10). Este resultado contrasta fortemente com a ausência total deste patogênico nas amostras legais e representa o achado mais relevante do ponto de vista de saúde pública, uma vez que *S. aureus* pode produzir enterotoxinas e causar intoxicação alimentar.

Tabela 9 - Frequência dos microrganismos patogênicos das amostras ilícitas analisadas através do Procedimento 1 (P1).

Frequências de Microrganismos Patogênicos

Ilegais_P1	Microrganismo	Contadores	% do Total
Ausente	Gram negativo	18	100.0%
	<i>Escherichia coli</i>	18	100.0%
	<i>Salmonella</i>	18	100.0%
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18	100.0%

Tabela 10- Frequência de *Staphylococcus aureus* das amostras ilícitas analisadas através do Procedimento 1.

Frequências de *Staphylococcus aureus*

Ilegais_P1	Grupo	Contadores	% do Total	% acumulada
Ausente	<i>Staphylococcus aureus</i>	14	77.8%	77.8%

Frequências de *Staphylococcus aureus*

Ilegais_P1	Grupo	Contadores	% do Total	% acumulada
Presente		4	22.2%	100.0%

2.2. Procedimento 2: Volumes Reduzidos

As mesmas 18 amostras, quando analisadas pelo Procedimento 2 (com redução de 10× nos volumes de reagentes), apresentaram resultados similares aos obtidos em P1 (Tabela 11).

Tabela 11 - Estatística descritiva às variáveis TAMCs e TYMCs das amostras ilícitas analisadas através do Procedimento 2 (P2), em UFC/g.

Estatística Descritiva

	Grupo	TAMCs	TYMCs
N	Ilegais_P2	18	18
Média		1,37x10 ⁴	2,50x10 ³
Mediana		2,70x10 ³	1,80x10 ³
Desvio-padrão		2,05x10 ⁴	2,97x10 ³
Mínimo		1,80x10 ³	1,80x10 ³
Máximo		7,92x10 ⁴	1,44x10 ⁴
25º percentil		1,80x10 ³	1,80x10 ³
75º percentil		1,98x10 ⁴	1,80x10 ³

A mediana de TAMCs foi de 2,70x10³ UFC/g, ligeiramente inferior à de P1 mas sem diferença estatisticamente significativa. O valor máximo foi superior – 7,92 x10⁴ UFC/g -, indicando que em algumas amostras com carga elevada, o protocolo reduzido conseguiu detetar contaminação semelhante ao protocolo *standard*.

Para TYMCs, a mediana manteve-se em 1,80 x10³ UFC/g, igual ao P1, com máximo de 1,44 x10⁴ UFC/g. Esta consistência de resultados entre os dois procedimentos sugere que a redução de volumes não comprometeu a capacidade de quantificação fúngica.

Resultados

Staphylococcus aureus foi detetado em apenas 2 das 18 amostras (11,1%), representando metade da frequência observada em P1 (Tabela 12). Esta redução pode indicar um efeito de diluição ligeiramente superior no P2, embora a diferença não seja estatisticamente significativa.

Tabela 12 - Frequência de *Staphylococcus aureus* das amostras ilícitas analisadas através do Procedimento 2 (P2).

Frequência de *Staphylococcus aureus*

<i>Staphylococcus aureus</i>	Grupo	Contadores	% do Total
Ausente	Ilegais_P2	16	88.9%
Presente		2	11.1%

Uma amostra apresentou resultado positivo para enterobactérias (5,6%) (Tabela 13), enquanto *E. coli*, *Salmonella spp.* e *P. aeruginosa* permaneceram ausentes em todas as amostras (Tabela 14).

Tabela 13 - Frequência de Enterobactérias das amostras ilícitas analisadas através do Procedimento 2 (P2).

Frequência de Gram negativo

Gram	Grupo	Contadores	% do Total	% acumulada
Ausente	Ilegais_P2	17	94.4%	94.4%
Presente		1	5.6%	100.0%

Tabela 14 - Frequência de microrganismos patogénicos das amostras ilícitas analisadas através do Procedimento 2 (P2).

Frequências de Microrganismos Patogénicos

Ilegais_P2	Microrganismos	Contadores	% do Total
Ausente	<i>Escherichia coli</i>	18	100.0%
	<i>Salmonella</i>	18	100.0%
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18	100.0%

2.3. Comparação entre Procedimentos: P1 vs. P2

Para avaliar se a redução de volumes de reagentes comprometeu a capacidade de detecção e quantificação microbiológica, realizou-se análise estatística de amostras emparelhadas utilizando o teste de Wilcoxon (Tabela 15).

Tabela 15 - Teste W de Wilcoxon para comparação das diferentes análises entre os dois grupos de amostras ilícitas, as do Procedimento 1 (P1) e do Procedimento 2 (P2).

Teste t para amostras emparelhadas

			Estatística	p
TAMCs_P1	TAMCs_P2	W de Wilcoxon	34.50 ^a	0.753
TYMCs_P1	TYMCs_P2	W de Wilcoxon	3.00 ^b	1.000

Nota. $H_a: \mu_{\text{Medida 1}} - \mu_{\text{Medida 2}} \neq 0$

^a 6 par(es) de valores empatados

^b 15 par(es) de valores empatados

Os resultados demonstraram ausência de diferenças significativas entre os dois procedimentos para TAMCs ($W=34,50$, $p=0,753$) e para TYMCs ($W=3,00$, $p=1,000$). Estes dados validam a aplicabilidade do protocolo adaptado com volumes reduzidos, confirmando que é possível obter resultados microbiológicos fiáveis utilizando apenas 25mg de amostra e volumes de reagentes 10 vezes inferiores ao protocolo standard.

Esta validação é particularmente relevante para contextos forenses, onde a quantidade de amostra disponível é frequentemente limitada e a sua preservação para análises complementares é essencial.

3. Comparação entre Amostras Legais e Ilegais

A análise comparativa entre os quatro grupos de amostras foi realizada através do teste de Kruskal-Wallis, adequado para comparar múltiplos grupos independentes com dados não-normais. Os resultados revelaram diferenças estatisticamente significativas tanto para TAMCs ($\chi^2=77,6$, $gl=3$, $p<0,001$) como para TYMCs ($\chi^2=46,4$, $gl=3$, $p<0,001$) (Tabela 16).

Tabela 16 - Teste de Kruskal-Wallis para comparação de TAMCs e TYMCs entre amostras legais e ilegais.

Kruskal-Wallis Legais vs. Ilegais			
	χ^2	gl	p
TAMCs	77.6	3	<.001
TYMCs	46.4	3	<.001

3.1. Microrganismos Aeróbios Totais: TAMCs

A análise post-hoc, realizada através do teste de comparações múltiplas de Dwass-Steel-Critchlow-Fligner (DSCF), permitiu identificar onde se encontram as diferenças significativas entre grupos.

As amostras ilegais apresentaram contagens significativamente superiores às amostras legais. Esta diferença foi particularmente evidente quando comparadas com o produto acabado legal: Ilegal_P1 vs. Legal_PA ($W=-8,013$, $p<0,001$) e Ilegal_P2 vs. Legal_PA ($W=-7,913$, $p<0,001$) (Tabela 17).

Mesmo quando comparadas com a matéria-prima legal não processada, as amostras ilegais mantiveram contagens significativamente superiores: Ilegal_P1 vs. Legal_MP ($W=-4,722$, $p=0,005$) e Ilegal_P2 vs. Legal_MP ($W=-4,639$, $p=0,006$) (Tabela 17).

A comparação entre matéria-prima e produto acabado legais confirmou a eficácia do processamento, com diferença altamente significativa ($W=-8,802$, $p<0,001$) (Tabela 17).

Não foram observadas diferenças significativas entre os dois procedimentos aplicados às amostras ilegais (P1 vs P2: $W=-0,166$, $p=0,999$), reforçando a equivalência dos métodos (Tabela 17).

Tabela 17 - Comparações múltiplas Dwass-Steel-Critchlow-Fligner para TAMCs entre amostras legais, matéria-prima (MP) e produto acabado (PA), e ilegais, Procedimento 1 (P1) e Procedimento 2 (P2).

Comparações múltiplas - TAMCs			
		W	p
Ilegais_P1	Ilegais_P2	-0.166	0.999
Ilegais_P1	Legal_MP	-4.722	0.005
Ilegais_P1	Legal_PA	-8.013	<.001
Ilegais_P2	Legal_MP	-4.639	0.006
Ilegais_P2	Legal_PA	-7.913	<.001
Legal_MP	Legal_PA	-8.802	<.001

3.2. Bolores e Leveduras: TYMCs

Para TYMCs, o padrão de diferenças foi semelhante ao observado para TAMCs, embora com algumas nuances interessantes.

As amostras ilegais apresentaram contagens significativamente superiores ao produto acabado legal: Ilegal_P1 vs Legal_PA ($W=-6,439$, $p<0,001$) e Ilegal_P2 vs Legal_PA ($W=-6,456$, $p<0,001$) (Tabela 18).

O processamento industrial demonstrou novamente eficácia significativa na redução da carga fúngica: Legal_MP vs Legal_PA ($W=-6,749$, $p<0,001$) (Tabela 18).

Curiosamente, quando comparadas com a matéria-prima legal, as amostras ilegais apresentaram valores de p próximos mas não atingindo significância estatística ao nível de 5%: Ilegal_P1 vs Legal_MP ($W=-3,229$, $p=0,102$) e Ilegal_P2 vs Legal_MP ($W=-3,246$, $p=0,099$) (Tabela 18). Isto sugere que, em termos de carga fúngica total, as amostras ilegais são comparáveis ao material vegetal legal não processado, indicando que as condições de secagem e armazenamento das amostras ilegais analisadas podem ter sido relativamente adequadas.

Tal como para TAMCs, não houve diferença significativa entre P1 e P2 ($W=-0,747$, $p=0,952$) (Tabela 18).

Resultados

Tabela 18 - Comparações múltiplas Dwass-Steel-Critchlow-Fligner para TYMCs entre amostras legais e ilegais.

Comparações múltiplas - TYMCs			
		W	p
Ilegais_P1	Ilegais_P2	-0.747	0.952
Ilegais_P1	Legal_MP	-3.229	0.102
Ilegais_P1	Legal_PA	-6.439	<.001
Ilegais_P2	Legal_MP	-3.246	0.099
Ilegais_P2	Legal_PA	-6.456	<.001
Legal_MP	Legal_PA	-6.749	<.001

3.3. Enterobactérias e outras Bactérias Gram-negativo

A comparação das enterobactérias foi realizada apenas entre matéria-prima e produto acabado legais (análise quantitativa), uma vez que nas amostras ilegais este parâmetro foi avaliado qualitativamente. O teste de Kruskal-Wallis revelou diferença significativa ($W = -4,08$, $p = 0,004$), com o produto acabado apresentando contagens inferiores à matéria-prima (Tabela 19).

Tabela 19 - Comparações múltiplas Dwass-Steel-Critchlow-Fligner para enterobactérias entre amostras legais.

Comparações múltiplas - Gram			
		W	p
Legal_MP	Legal_PA	-4.08	0.004

Nas amostras ilegais, a análise qualitativa mostrou que a grande maioria das amostras não apresentou enterobactérias: 100% das amostras P1 (18/18) e 94,4% das amostras P2 (17/18) foram negativas (Figura 1).

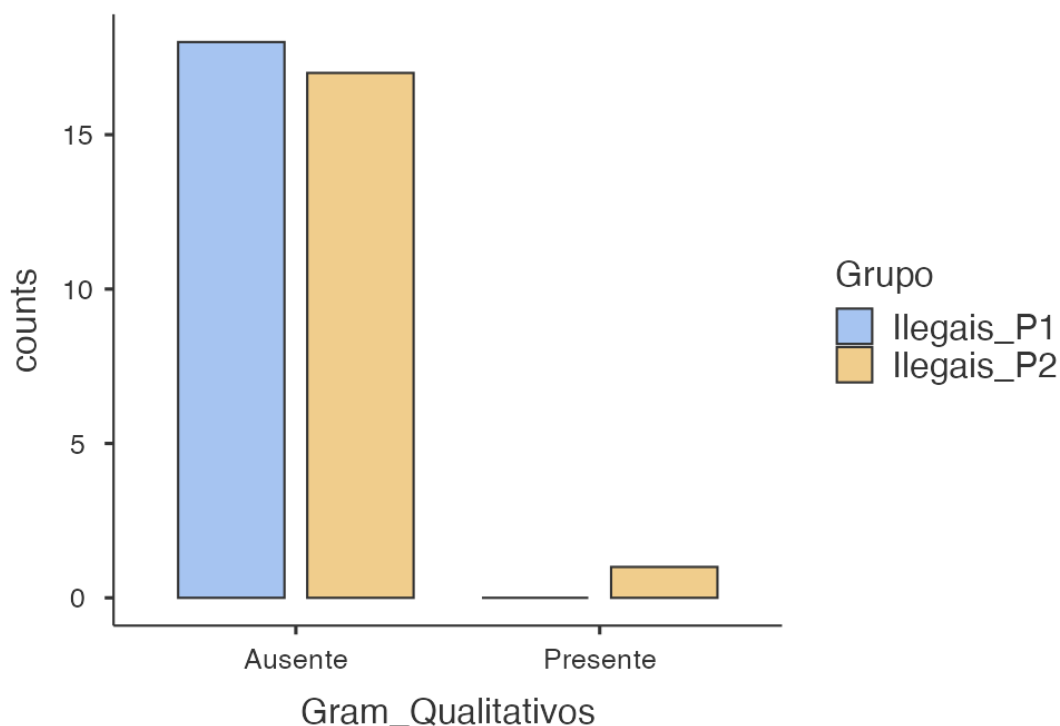


Figura 3 - Presença e ausência de enterobactérias nas amostras ilegais, Procedimento 1 (P1) e Procedimento 2 (P2).

4. Análise de Conformidade com a Farmacopeia Europeia

4.1. Amostra Legais

A avaliação da conformidade com os limites microbiológicos estabelecidos pela Farmacopeia Europeia para preparações à base de plantas revelou elevadas taxas de conformidade nas amostras legais.

4.1.1. Matéria-Prima

Para TAMCs (limite: $\leq 10^5$ UFC/g), observou-se 97% de conformidade, com apenas 5 amostras das 167 ultrapassando o limite estabelecido (Tabela 20). Para TYMCs (limite: $\leq 10^4$ UFC/g), a taxa de conformidade foi de 86,8%, com 22 amostras não conformes. As enterobactérias (limite: $\leq 10^3$ UFC/g) apresentaram 100% de conformidade (Tabela 21).

Resultados

Tabela 20 - Avaliação de conformidade de TAMCs para amostras legais de matéria-prima (MP).

Tabelas de Contingência TAMCs

		Grupo
TAMCs_Conforme		Legal_MP
Conforme	Observado	162
	% em coluna	97.0%
Não Conforme	Observado	5
	% em coluna	3.0%
Total	Observado	167
	% em coluna	100.0%

Tabela 21 - Avaliação de conformidade de TYMCs para amostras legais de matéria-prima (MP).

Tabelas de Contingência TYMCs

		Grupo
TYMCs_Conforme		Legal_MP
Conforme	Observado	145
	% em coluna	86.8%
Não Conforme	Observado	22
	% em coluna	13.2%
Total	Observado	167
	% em coluna	100.0%

Todos os patogênicos específicos pesquisados (*E. coli*, *Salmonella*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*) apresentaram 100% de conformidade, com ausência total em todas as amostras.

4.1.2. Produto Acabado

O produto acabado apresentou conformidade integral para todos os parâmetros avaliados: TAMCs (211/211, 100%), TYMCs (211/211, 100%), enterobactérias (210/210, 100%) e patogênicos específicos (100% ausência para todos).

A análise estatística através do teste qui-quadrado revelou diferenças significativas nas taxas de conformidade entre grupos para TYMCs ($\chi^2=34,4$, $p<0,001$) (Tabela 22) e enterobactérias ($\chi^2=22,1$, $p<0,001$) (Tabela 23).

Tabela 22 - Teste qui-quadrado para TYMCs do produto acabado (PA).

Testes χ^2 TYMCs

	Valor	gl	p
χ^2	34.4	3	<.001
χ^2 com Correção de Continuidade	34.4	3	<.001
N	414		

Tabela 23 - Teste qui-quadrado para enterobactérias do produto acabado (PA).

Testes χ^2 Gram

	Valor	gl	p
χ^2	22.1	3	<.001
χ^2 com Correção de Continuidade	22.1	3	<.001
N	414		

Para TAMCs, embora numericamente diferentes, as taxas de conformidade não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre grupos ($\chi^2=7,49$, $p=0,058$) (Tabela 24).

Tabela 24 - Teste qui-quadrado para TAMCs do produto acabado (PA).

Testes χ^2

	Valor	gl	p
χ^2	7.49	3	0.058
χ^2 com Correção de Continuidade	7.49	3	0.058
N	414		

É particularmente relevante notar que todas as não-conformidades observadas se concentraram exclusivamente na matéria-prima, sendo completamente eliminadas após o processamento industrial.

4.2. Amostras Ilegais

As amostras ilegais apresentaram um perfil de conformidade complexo, com conformidade para contagens totais mas não-conformidade para patogénicos específicos.

4.2.1. Procedimento 1

As amostras ilegais apresentaram conformidade total para contagens de microrganismos aeróbios totais, com todas as 18 amostras a apresentarem valores abaixo do limite de 10^5 UFC/g estabelecido pela Farmacopeia Europeia.

De forma semelhante, os bolores e leveduras mantiveram-se dentro dos limites aceitáveis, com todas as amostras inferiores a 10^4 UFC/g.

As enterobactérias também apresentaram conformidade total, não tendo sido detetadas em nenhuma amostra.

Contudo, a análise de *Staphylococcus aureus* revelou um resultado preocupante, com apenas 77,8% de conformidade. Das 18 amostras testadas, 4 apresentaram resultado positivo para este patogénico, enquanto 14 permaneceram negativas.

Para os restantes agentes patogénicos, a conformidade foi 100% com todas as 18 amostras a apresentar um resultado negativo.

4.2.2. Procedimento 2

Para o Procedimento 2, o padrão de conformidade foi semelhante ao observado no P1, com 100% das amostras conformes para TAMCs e TYMCs. No entanto, para enterobactérias observou-se uma ligeira redução na conformidade (94,4%), com uma amostra das 18 testadas a apresentar resultado positivo. Para *S. aureus*, a taxa de conformidade foi superior à do P1, atingindo 88,9%, com apenas 2 amostras positivas em 18 testadas.

Os restantes agentes patogénicos apresentaram, mais uma vez, 100% de conformidade com as 18 amostras a apresentarem resultado negativo.

A diferença mais marcada entre amostras legais e ilegais reside precisamente na deteção de *S. aureus*. Enquanto este patogénico está completamente ausente nas amostras de origem legal, apresenta-se em percentagem significativa nas amostras ilegais, constituindo o principal fator de diferenciação do ponto de vista de segurança microbiológica.

5. Microrganismos Patogénicos: Análise de Frequência

A análise da frequência de deteção de microrganismos patogénicos revelou um padrão claro de diferenciação entre produtos legais e ilegais (Tabela X, Figura X).

E. coli, *Salmonella spp.* e *P. aeruginosa* não foram detetados em nenhuma das 414 amostras analisadas (378 legais + 36 ilegais), representando 100% de conformidade global para estes patogénicos.

S. aureus apresentou um padrão completamente distinto. Nas amostras legais, não foi detetado em nenhuma das 156 amostras testadas (52 matéria-prima + 104 produto acabado), correspondendo a 100% de ausência. Em contraste, nas amostras ilegais foi detetado em 22,2% das amostras P1 (4/18) (Tabela 25) e em 11,1% das amostras P2 (2/18) (Tabela 26).

Resultados

Tabela 25 - Frequência de *Staphylococcus aureus* nas amostras ilegais do Protocolo 1 (P1).

Frequências de *S. aureus*

<i>S. aureus</i>	Grupo	Contadores	% do Total	% acumulada
Ausente	Ilegais_P1	14	77.8%	77.8%
Presente		4	22.2%	100.0%

Tabela 26 - Frequência de *Staphylococcus aureus* nas amostras ilegais do Protocolo 2 (P2).

Frequências de *S. aureus*

<i>S. aureus</i>	Grupo	Contadores	% do Total	% acumulada
Ausente	Ilegais_P2	16	88.9%	88.9%
Presente		2	11.1%	100.0%

O teste qui-quadrado confirmou que esta diferença na distribuição de *S. aureus* entre grupos é altamente significativa ($\chi^2=30,5$, $p<0,001$), demonstrando que as amostras ilegais apresentam risco microbiológico significativamente superior às amostras de origem controlada.

Tabela 27 - Teste de qui-quadrado de *Staphylococcus aureus* para amostras ilegais.

Testes χ^2

	Valor	gl	p
χ^2	30.5	3	<.001
χ^2 com Correção de Continuidade	30.5	3	<.001
N	192		

6. Distribuição Geográfica da Contaminação Microbiológica

A análise por país de origem das amostras legais revelou variabilidade significativa nos perfis microbiológicos entre diferentes regiões produtoras.

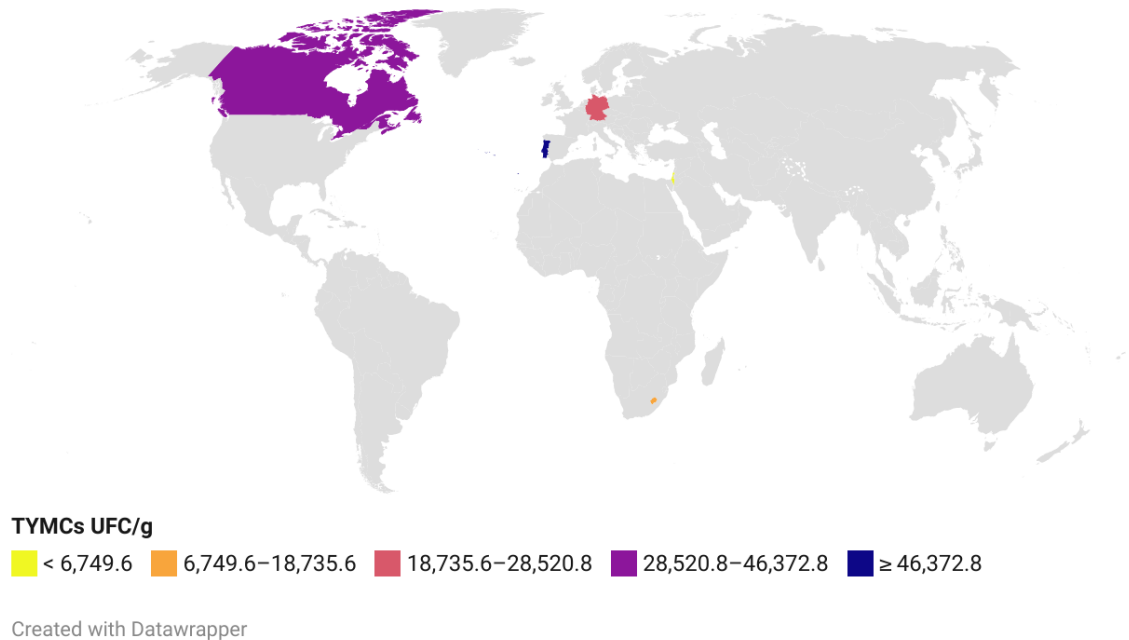


Figura 4 - Resultados de TAMCs por país de origem. Mapa Mundo.

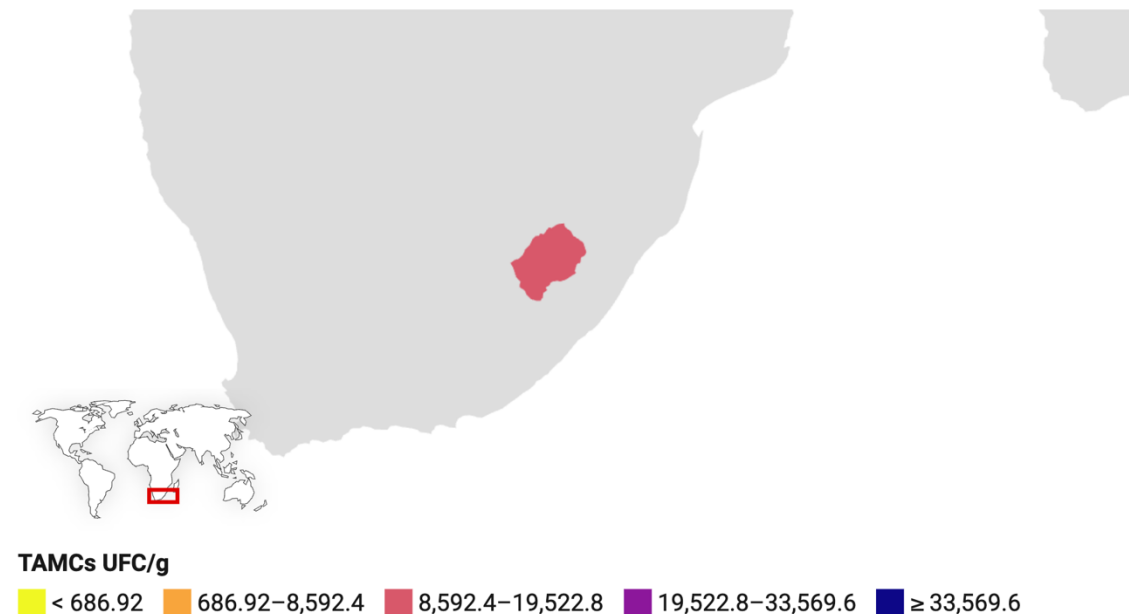


Figura 5 - Resultados de TAMCs por país de origem. Aproximação ao sul de África.

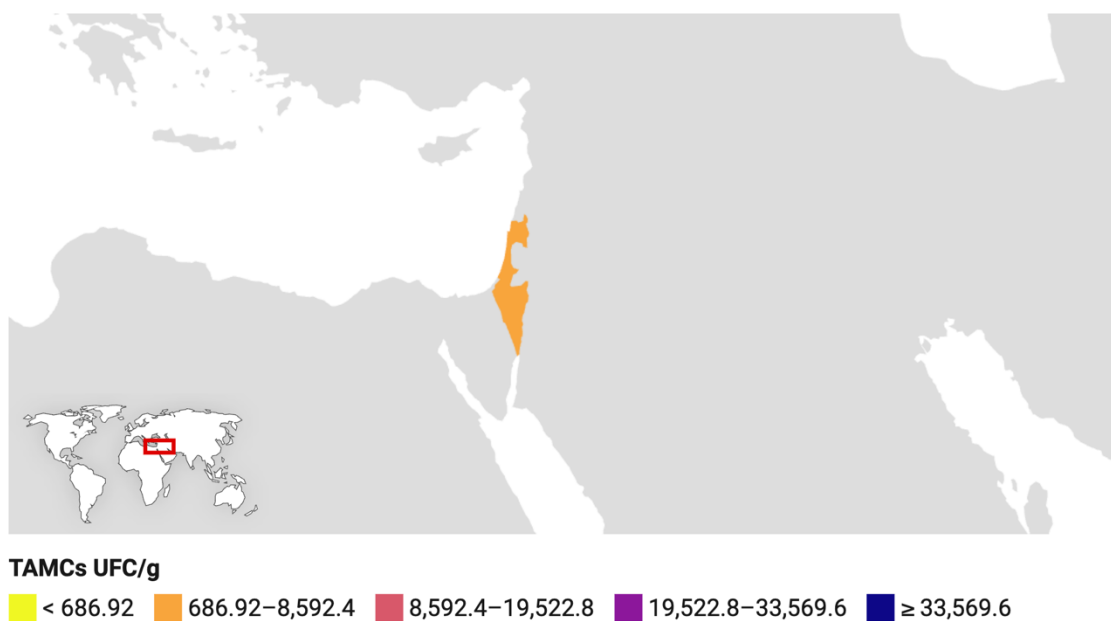
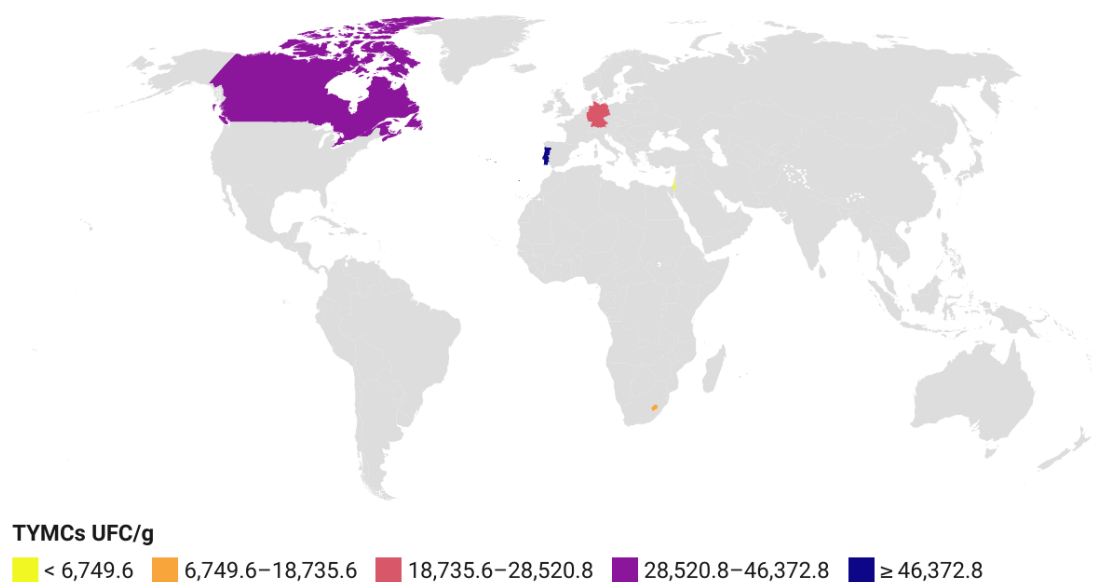


Figura 6 - Resultados de TAMCs por país de origem. Aproximação ao Médio Oriente.



Created with Datawrapper

Figura 7 - Resultados de TYMCs por país de origem. Mapa Mundo.

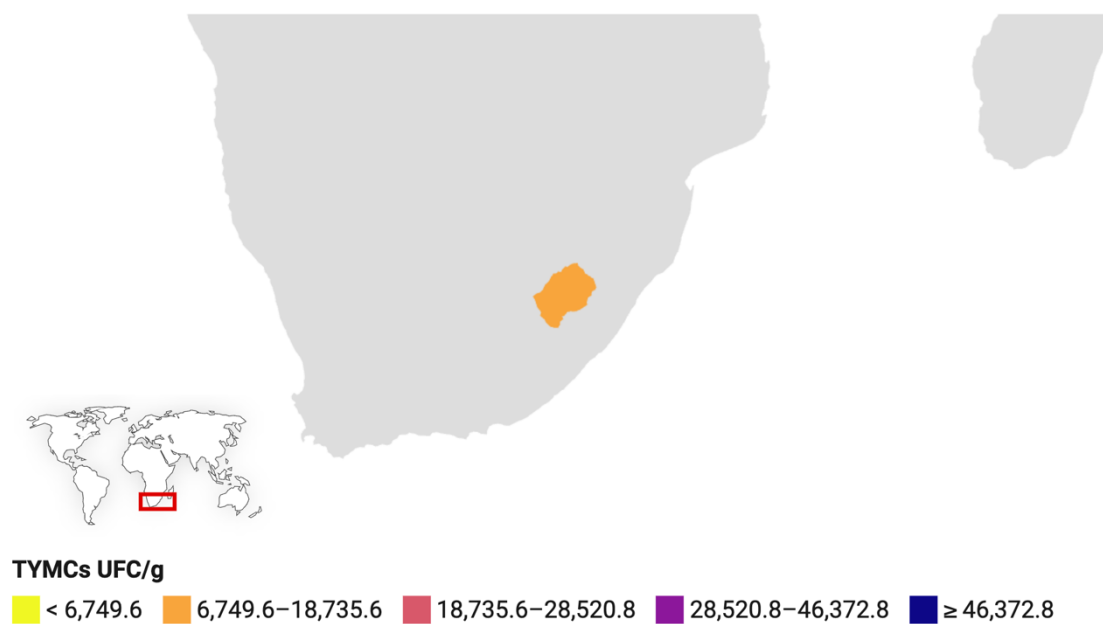


Figura 8 - Resultados de TYMCs por país de origem. Aproximação ao sul de África.

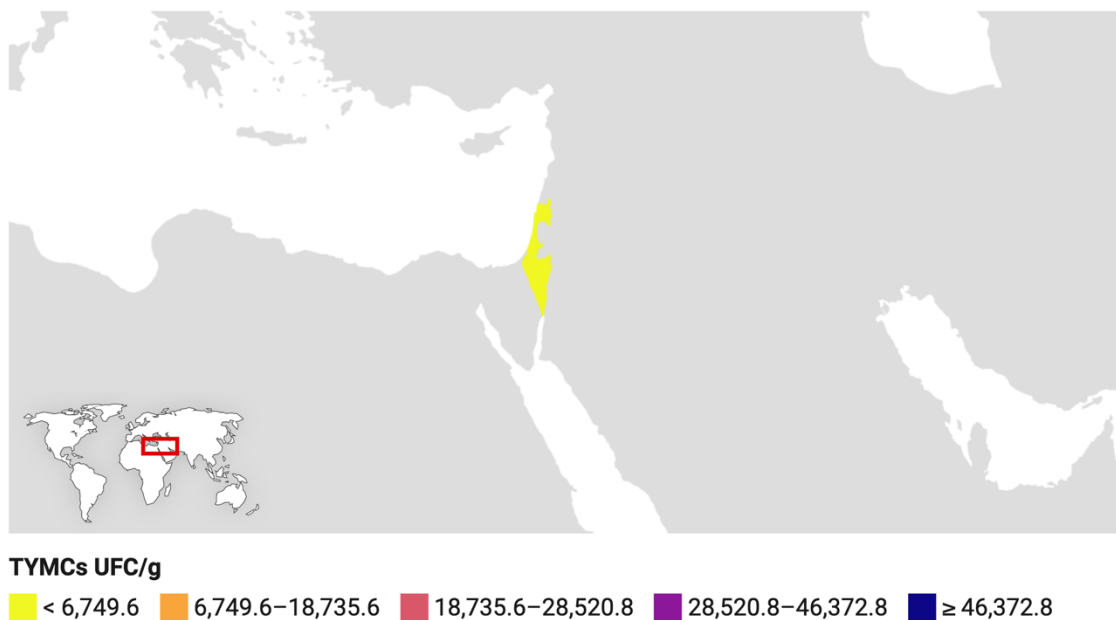


Figura 9 - Resultados de TYMCs por país de origem. Aproximação ao Médio Oriente.

Resultados

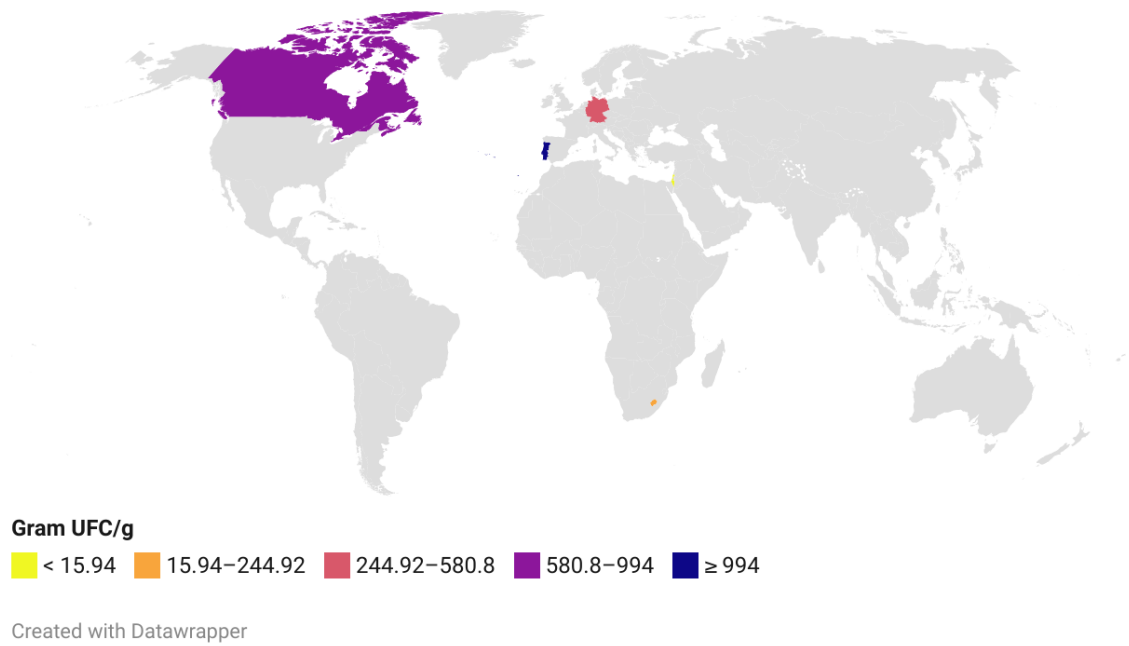


Figura 10 - Resultados de enterobactérias por país de origem. Mapa Mundo.

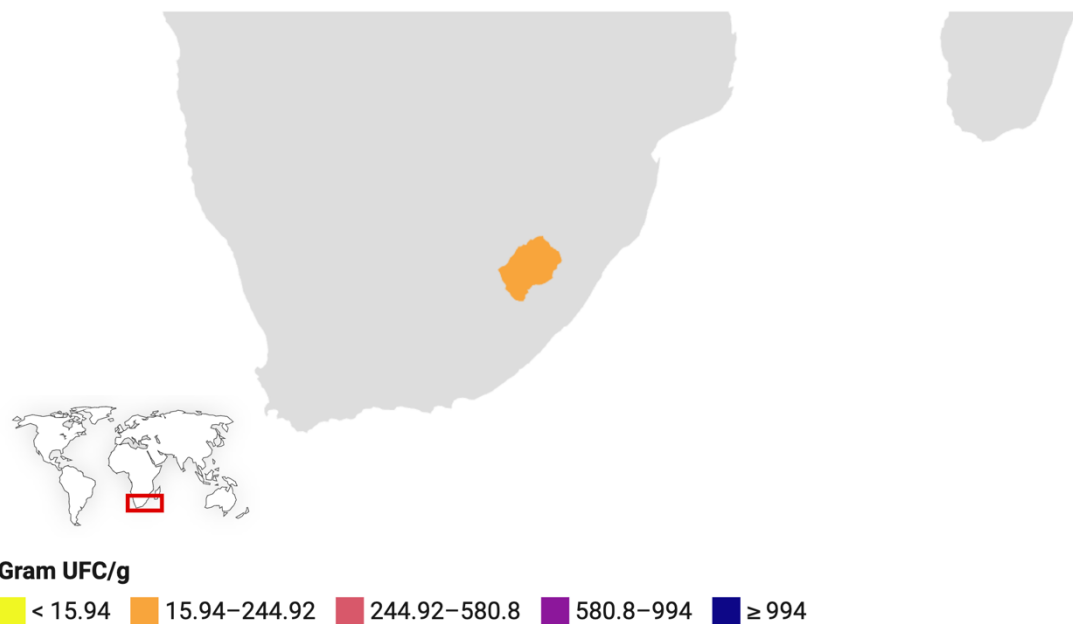


Figura 11 - Resultados de enterobactérias por país de origem. Aproximação ao sul de África.

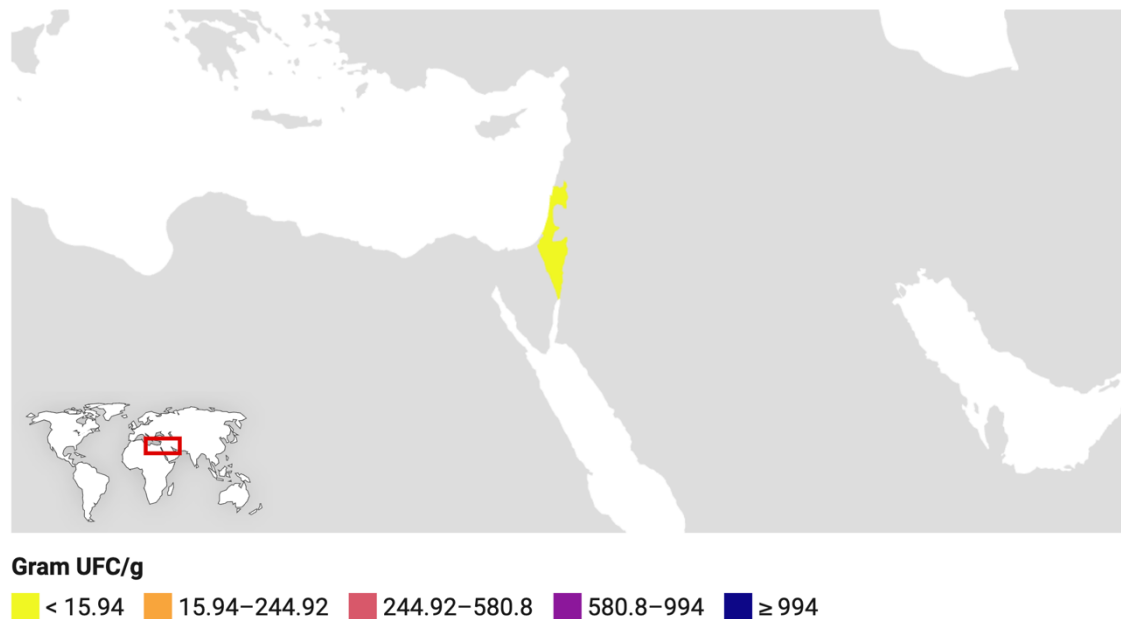


Figura 12 - Resultados de enterobactérias por país de origem. Aproximação ao Médio Oriente.

6.1. Caracterização por País

Para analisar a distribuição da contaminação microbiológica em função da origem geográfica, foram agrupados os resultados das amostras legais por região de produção. Esta abordagem permite identificar padrões regionais e avaliar se determinadas áreas apresentam níveis sistematicamente superiores de microrganismos totais ou de enterobactérias. A Tabela 28 apresenta a estatística descritiva dos parâmetros microbiológicos (TAMCs, TYMCs e enterobactérias) para cada região incluído no estudo.

Tabela 28 - Estatística descritiva de TYMCs, TAMCs e enterobactérias por país de origem.

Estatística Descritiva

	Localização	TAMCs	TYMCs	Gram
N	Europa Central	67	67	67
	Norte da América	217	217	217
	Médio Oriente	35	35	35
	Sul de África	2	2	2
	Sul da Europa	56	56	56
Média	Europa Central	1,06x10 ⁴	2,57x10 ⁴	3,96x10 ²

Resultados

Estatística Descritiva

	Localização	TAMCs	TYMCs	Gram
	Norte da América	2,81x10 ⁴	3,27x10 ⁴	8,58x10 ²
	Médio Oriente	8,56 x10 ²	7,48 x10 ²	6,52
	Sul de África	1,3750 x10 ²	8,25 x10 ³	18,3
	Sul da Europa	5,51 x10 ⁴	1,01 x10 ⁵	1,538x10 ³
	Europa Central	50	50	5,00
Mediana	Norte da América	5,00x10 ²	5,00x10 ²	5,00
	Médio Oriente	50	50	5,00
	Sul de África	1,38x10 ²	8,250x10 ³	18,3
	Sul da Europa	1,50 x10 ³	1,60x10 ³	1,74 x10 ²
	Europa Central	7,22x10 ⁴	1,4910 ⁵	1,454x10 ³
Desvio-padrão	Norte da América	2,22 x10 ⁵	2,29 x10 ⁵	2,18x10 ²
	Médio Oriente	3,74x10 ³	3,04x10 ³	6,26
	Sul de África	1,87 x10 ⁴	1,10 x10 ⁴	18,8
	Sul da Europa	1,16 x10 ⁵	4,13x10 ⁵	2,92x10 ³
	Europa Central	50	5	5,00
Mínimo	Norte da América	50	5	5,00
	Médio Oriente	5	5	5,00
	Sul de África	5,00x10 ²	5,00x10 ²	5,00
	Sul da Europa	5	5	5,00
	Europa Central	5,90x10 ⁵	1,10x10 ⁶	1,00x10 ⁴
Máximo	Norte da América	3,00x10 ⁶	3,00x10 ⁶	1,00x10 ⁴
	Médio Oriente	2,20x10 ⁴	1,80 x10 ⁴	31,6
	Sul de África	27000	16000	31,6
	Sul da Europa	5,00 x10 ⁵	3,00 x10 ⁶	1,00 x10 ⁴
	Europa Central			

6.1.1. Médio Oriente

O Médio Oriente apresentou os melhores resultados microbiológicos entre todos os países analisados (n=35). As medianas de TAMCs, TYMCs e enterobactérias mantiveram-se no valor mínimo de deteção (50, 50 e 5 UFC/g, respetivamente) (Tabela 28), com conformidade de 100% para todos os parâmetros avaliados.

6.1.2. Europa Central

A Europa Central (n=67) apresentou medianas de 50 UFC/g para TAMCs e TYMCs (Tabela 28), e 5 UFC/g para enterobactérias, com taxas de conformidade de 98,5% para TAMCs e 97,0% para TYMCs (Tabela 29). Todos os outros parâmetros se encontraram 100% conformes.

Tabela 29 - Tabela de contingência de TAMCs e TYMCs para a Europa Central.

Tabela de Contingência Europa Central

Europa Central		Microrganismo	
		TAMCs	TYMCs
Conforme	Observado	66	65
	% em coluna	98.5%	97.0%
Não Conforme	Observado	1	2
	% em coluna	1.5%	3.0%
Total	Observado	67	67
	% em coluna	100.0%	100.0%

6.1.3. Norte da América

O norte da América, com a maior representação amostral (n=217, 57,6% do total), apresentou medianas de 500 UFC/g para TAMCs e TYMCs, e 5 UFC/g para enterobactérias. As taxas de conformidade foram de 98,2% para TAMCs e 95,4% para TYMCs (Tabela 30).

Resultados

Tabela 30 - Tabela de contingência de TAMCs e TYMCs para o norte da América.

Tabela de Contingência Norte da América

Norte da América		Microrganismo	
		TAMCs	TYMCs
Conforme	Observado	213	207
	% em coluna	98.2%	95.4%
Não Conforme	Observado	4	10
	% em coluna	1.8%	4.6%
Total	Observado	217	217
	% em coluna	100.0%	100.0%

6.1.4. Sul da Europa

O sul da Europa (n=56) apresentou as medianas mais elevadas: 1500 UFC/g para TAMCs, 1600 UFC/g para TYMCs e 174 UFC/g para enterobactérias. A taxa de não-conformidade para TYMCs foi de 17,9%, a mais elevada entre todos os países (Tabela 31).

Tabela 31 - Tabela de contingência de TAMCs e TYMCs para o sul da Europa.

Tabela de Contingência Sul da Europa

Sul da Europa		Microrganismo	
		TAMCs	TYMCs
Conforme	Observado	56	46
	% em coluna	100.0%	82.1%
Não Conforme	Observado	0	10
	% em coluna	0.0%	17.9%
Total	Observado	56	56
	% em coluna	100.0%	100.0%

6.1.5. Sul de África

O sul da África, com apenas 2 amostras, apresentou valores intermédios com 100% de conformidade (Tabela 32).

Tabela 32 - Tabela de contingência de TAMCs e TYMCs para o sul da África.

Tabela de Contingência Sul da África

Sul da África		Microrganismo	
		TAMCs	TYMCs
Conforme	Observado	2	2
	% em coluna	100.0%	100.0%
Não Conforme	Observado	0	0
	% em coluna	0.0%	100.0%
Total	Observado	2	2
	% em coluna	100.0%	100.0%

6.2. Análise Estatística por País

O teste de Kruskal-Wallis revelou diferenças estatisticamente significativas entre países para TYMCs ($\chi^2=18,56$, gl=4, $p<0,001$), mas não para TAMCs ($\chi^2=1,70$, gl=4, $p=0,790$) (Tabela 33).

Tabela 33 - Teste de Kruskal-Wallis para TAMCs e TYMCs.

Kruskal-Wallis

	χ^2	gl	p
TAMCs_Conforme	1.70	4	0.790
TYMCs_Conforme	18.56	4	<.001

O teste qui-quadrado para taxas de conformidade confirmou diferença significativa para TYMCs ($\chi^2=18,6$, $p<0,001$) (Tabela 34), com Portugal contribuindo de forma desproporcional para as não-conformidades observadas.

Tabela 34 - Teste qui-quadrado para TYMCs

Testes χ^2 TYMCs

	Valor	gl	p
χ^2	18.6	4	<.001
χ^2 com Correção de Continuidade	18.6	4	<.001
N	377		

6.3. Ausência Universal de Patogénicos

Independentemente da origem geográfica, todas as amostras legais apresentaram ausência de *E. coli*, *Salmonella*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* (100% conformidade em todos os países). Esta consistência demonstra que os controlos críticos para segurança sanitária são eficazmente implementados em todos os contextos de produção legal analisados, independentemente das variações observadas nas contagens totais.

Capítulo 4: Discussão

1. Qualidade Microbiológica da Produção Legal de *Cannabis*

Os resultados obtidos demonstram que as amostras de *Cannabis sativa* de origem legal apresentam, de forma geral, boa qualidade microbiológica, com taxas de conformidade elevadas relativamente aos limites estabelecidos pela Farmacopeia Europeia. Este facto reflete a implementação de sistemas de controlo de qualidade rigorosos em ambiente de produção regulamentado.

1.1. Variabilidade Natural da Matéria-Prima

A elevada variabilidade observada nas contagens microbianas da matéria-prima não é inesperada. Produtos de origem vegetal, particularmente aqueles que não são submetidos a processamento térmico intensivo, estão naturalmente expostos a microrganismos ambientais durante todo o ciclo de cultivo. Estudos prévios em *Cannabis* medicinal reportaram variabilidades semelhantes, com contagens de TAMCs que variaram entre 10^2 e 10^7 UFC/g dependendo das condições de cultivo e armazenamento (47,60).

O facto de a mediana se situar em 500 UFC/g, apesar de alguns valores extremos muito elevados, sugere que a maioria das amostras é produzida em condições adequadas de controlo microbiológico.

Os valores extremos observados podem estar relacionados com lotes específicos que sofreram problemas durante o cultivo ou armazenamento, como exposição a humidade excessiva ou temperaturas inadequadas. Thompson e colaboradores, identificaram a humidade residual e as condições de armazenamento como os fatores mais críticos para proliferação microbiana em *Cannabis* seca (61).

A taxa de não-conformidade de 13,2% para TYMCs na matéria-prima, embora não negligenciável, é compreensível considerando a natureza do material. Flores secas de plantas são substratos favoráveis ao crescimento fúngico, especialmente quando a secagem não é completamente eficaz ou quando o armazenamento ocorre em condições de humidade relativa elevada. O facto de todas estas não-conformidades terem sido eliminadas no produto acabado demonstra que o sistema de controlo de qualidade está a funcionar adequadamente, identificando e corrigindo problemas antes da libertação do produto final.

1.2. Eficácia do Processamento Industrial

A redução significativa observada entre matéria-prima e produto acabado para todos os parâmetros microbiológicos ($p < 0,001$) demonstra claramente a eficácia das etapas de processamento implementadas. A redução de 10 vezes na mediana de TAMCs e TYMCs, associada à eliminação total de não-conformidades, evidencia que os processos aplicados são adequados e consistentes.

Embora este estudo não tenha caracterizado especificamente as etapas de processamento utilizadas pela Cannprisma Pharma (por razões de confidencialidade comercial), é provável que incluam combinação de secagem controlada, possível tratamento por irradiação ou outras tecnologias de redução microbiana, e condições rigorosas de embalagem. Um estudo desenvolvido por Romano & Hazekamp demonstrou que a irradiação gama é eficaz na redução de contagens microbianas em *Cannabis* sem degradação significativa dos canabinóides, sendo uma tecnologia aprovada em vários países para produtos medicinais (62).

A redução particularmente acentuada nas enterobactérias reforça a adequação dos processos aplicados, uma vez que este grupo microbiano é reconhecidamente sensível a tratamentos de redução de carga microbiana.

1.3. Ausência de Agentes Patogénicos Específicos

A ausência total de *E. coli*, *Salmonella*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* em todas as amostras legais ($n=378$) é um resultado extremamente positivo e representa o aspeto mais relevante do ponto de vista de saúde pública. Estes microrganismos são típicos de contaminação fecal (*E. coli*, *Salmonella*), contaminação por manipulação humana inadequada (*S. aureus*) ou contaminação por água (*P. aeruginosa*).

Esta ausência universal sugere que os sistemas de boas práticas de cultivo (GACP) e boas práticas de fabrico (GMP) estão a ser rigorosamente implementados. Estudos internacionais identificaram presença esporádica destes patogénicos em produtos de *Cannabis*, particularmente em mercados menos regulamentados (63). O contraste com os resultados do presente estudo reforça a importância da regulamentação e fiscalização para garantir a segurança microbiológica.

2. Amostras Ilegais: Qualidade e Riscos Associados

2.1. Contagens Microbianas Totais

Os resultados obtidos para as amostras ilegais revelaram um padrão interessante e, de certa forma, inesperado. Embora as contagens de TAMCs e TYMCs fossem substancialmente superiores às do produto acabado legal, todas as amostras permaneceram dentro dos limites estabelecidos pela Farmacopeia Europeia para estes parâmetros.

Este resultado pode parecer contraditório mas é importante compreender que contagens totais de aeróbios e fungos, por si só, não são necessariamente indicadores diretos de risco sanitário elevado. Muitos dos microrganismos incluídos nestas contagens totais são saprófitas ambientais que não representam perigo para consumidores saudáveis. O risco sanitário está mais associado à presença de microrganismos patogénicos específicos.

A comparação das medianas das amostras ilegais com a matéria-prima legal é particularmente reveladora. Para TYMCs, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa ($p \approx 0,10$), sugerindo que as amostras ilegais analisadas foram armazenadas em condições que preveniram proliferação fúngica excessiva, ou que foram adequadamente secas. Este facto pode indicar que, embora ilegais, estas amostras não foram completamente negligenciadas do ponto de vista de conservação.

2.2. Presença de *Staphylococcus aureus*

O achado mais relevante e preocupante foi a deteção de *S. aureus* em 22,2% das amostras no Procedimento 1 e 11,1% no Procedimento 2, contrastando com ausência total nas amostras legais. Esta diferença estatisticamente significativa ($\chi^2=30,5$, $p<0,001$) constitui a evidência mais clara de que o contexto de produção ilegal vs. legal tem impacto direto na segurança microbiológica.

S. aureus é um patogénico oportunista comumente encontrado na pele e mucosas humanas. A sua presença em produtos vegetais é quase sempre indicativa de contaminação por manipulação humana inadequada, ausência de práticas básicas de higiene, ou condições inadequadas de processamento. Mais preocupante ainda é o facto de algumas estirpes de *S. aureus* serem capazes de produzir enterotoxinas termoestáveis que podem causar intoxicação alimentar.

Estudos anteriores identificaram *S. aureus* em produtos de *Cannabis* de mercado não regulado com frequências entre 10-30% (64,65), valores consistentes com os obtidos no presente estudo. A presença deste patógeno é particularmente problemática para utilizadores de *Cannabis* medicinal, que incluem frequentemente pacientes imunocomprometidos (oncológicos, HIV/SIDA) particularmente vulneráveis a infeções oportunistas.

A redução na frequência de deteção de *S. aureus* no Procedimento 2 (11,1% vs. 22,2%) pode refletir um efeito de diluição ligeiramente superior, embora esta diferença não seja estatisticamente significativa. Esta observação sugere que, para aplicações forenses onde a deteção de patógenos é crítica, o Procedimento 1 pode ser preferível quando a quantidade de amostra o permitir.

2.3. Implicações para a Saúde Pública

Os resultados obtidos fornecem evidência científica clara para suportar políticas de regulamentação de *Cannabis* medicinal. Demonstram que, embora as contagens microbianas totais possam ser comparáveis entre produtos de diferentes origens, a presença de patógenos específicos distingue claramente produtos seguros de produtos de risco.

Esta distinção é fundamental para políticas de saúde pública. Enquanto um produto com contagens elevadas de microrganismos totais pode ainda ser seguro se não contiver patógenos, um produto com contagens baixas mas contendo *S. aureus* representa risco claro e imediato. Os resultados sublinham que a avaliação de segurança microbiológica não se pode limitar a contagens totais, devendo sempre incluir pesquisa de patógenos específicos com relevância clínica.

3. Validação do Protocolo adaptado a Pequenas Quantidades

A ausência de diferenças significativas entre Procedimento 1 e Procedimento 2 ($p > 0,05$ para TAMCs e TYMCs) valida a aplicabilidade do protocolo adaptado para análises com quantidades reduzidas de amostra. Este resultado tem implicações práticas importantes, particularmente para contextos forenses.

Em situações de apreensão criminal, as quantidades de *Cannabis* disponíveis para análise são frequentemente limitadas, e é necessário preservar material para múltiplas análises complementares (químicas, genéticas, microscópicas). A possibilidade de obter resultados microbiológicos fiáveis com apenas 25mg de material, utilizando volumes de reagentes 10 vezes inferiores ao protocolo standard, permite integrar a análise microbiológica num *workflow* forense sem comprometer as outras análises essenciais.

A ligeira redução na deteção de *S. aureus* no P2, embora não significativa, sugere que quando a deteção de patogénicos é o objetivo primário da análise, o P1 deve ser preferido se a quantidade de amostra o permitir. Contudo, quando as quantidades são verdadeiramente limitadas, o P2 continua a ser uma alternativa viável e validada.

4. Conformidade com *Standard* Internacionais

Os limites microbiológicos estabelecidos pela Farmacopeia Europeia para preparações à base de plantas demonstraram-se adequados e discriminatórios para avaliação da qualidade de *Cannabis* medicinal. O facto de o produto acabado legal cumprir integralmente todos os critérios (100% conformidade) valida a aplicabilidade destes standards ao controlo de qualidade específico de *Cannabis*.

A taxa de não-conformidade na matéria-prima, totalmente eliminada após processamento, reforça a adequação dos limites estabelecidos. Os critérios parecem ser suficientemente rigorosos para produto final mas realistas para matéria-prima, onde alguma variabilidade é inevitável devido à natureza vegetal do produto.

A conformidade integral para patogénicos específicos nas amostras legais, contrastando com as não-conformidades nas ilegais, demonstra que os critérios de ausência para *E. coli*, *Salmonella*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* são particularmente discriminatórios entre produtos seguros e de risco.

5. Variabilidade Geográfica na Qualidade Microbiológica

A análise por país de origem revelou que, apesar de todos operarem sob regulamentação e implementarem boas práticas, existe variabilidade significativa na qualidade microbiológica final, particularmente em bolores e leveduras.

5.1. Fatores Potencialmente Explicativos

O Médio Oriente apresentou consistentemente os melhores resultados microbiológicos. Esta zona é reconhecida internacionalmente pela qualidade da sua *Cannabis* medicinal e pela investigação avançada nesta área (66). Vários fatores podem contribuir para estes resultados: clima mediterrânico seco que desfavorece proliferação fúngica, tecnologias avançadas de cultivo em ambiente controlado (indoor), e protocolos de processamento particularmente rigorosos.

O sul da Europa, apesar de apresentar conformidade elevada para TAMCs e enterobactérias, mostrou a taxa mais elevada de não-conformidade em TYMCs (17,9%). O clima atlântico mais húmido pode favorecer proliferação fúngica durante o cultivo e armazenamento, requerendo atenção particular ao controlo de humidade em todas as fases da produção. É importante notar que estas não-conformidades se concentraram na matéria-prima, sendo corrigidas no produto acabado, o que demonstra que os sistemas de controlo de qualidade estão a funcionar adequadamente.

O norte da América, com a maior representação amostral e um programa de *Cannabis* medicinal bem estabelecido desde 2001, apresentou resultados consistentes e taxas de conformidade elevadas, refletindo a maturidade do seu trabalho regulatório (67).

5.2. Importância da Ausência Universal de Patogénicos

Independentemente da variabilidade observada em contagens totais, o facto mais relevante é que todos os países apresentaram ausência total de patogénicos específicos. Esta consistência demonstra que os controlos críticos para segurança sanitária - prevenção de contaminação fecal, boas práticas de higiene na manipulação, controlo de água - são eficazmente implementados em todos os contextos de produção legal analisados.

Esta observação reforça que, embora existam diferenças na qualidade microbiológica geral entre países, os riscos sanitários críticos são adequadamente controlados em todos os contextos regulamentados. A variabilidade em contagens totais reflete mais diferenças em condições ambientais e tecnologias de processamento do que diferenças em segurança sanitária fundamental.

6. Contexto Internacional e Comparação com a Literatura

Os resultados obtidos são consistentes com estudos internacionais que compararam *Cannabis* de diferentes origens. Segundo um estudo de McKernan e colaboradores, foram reportadas contaminações fúngicas significativas em 20% de amostras dum comércio não regulamentados nos EUA (60), enquanto outro estudo, de Punja e colaboradores, identificaram presença de patogénicos bacterianos em 15% de amostras de mercado ilegal no Canadá (47).

A revisão sistemática de Hazekamp sobre qualidade de *Cannabis* medicinal na Europa concluiu que produtos de origem regulamentada apresentam qualidade superior e mais consistente comparativamente a produtos de mercado negro (63). Os dados do presente estudo corroboram esta conclusão, fornecendo evidência adicional quantitativa da importância da regulamentação.

É importante notar que a comparação direta com estudos internacionais é por vezes dificultada por diferenças metodológicas e diferentes critérios de conformidade entre países. Este facto reforça a importância de estudos nacionais que utilizem os critérios específicos aplicáveis em Portugal e na União Europeia.

7. Limitações do Estudo

Este estudo apresenta algumas limitações que devem ser consideradas na interpretação dos resultados.

7.1. Tamanho Amostral da *Cannabis* Ilegal

As 18 amostras ilegais, embora adequadas para validação metodológica, representam um número limitado para generalização de conclusões. O poder estatístico para detetar algumas diferenças, particularmente nas contagens de TYMCs, foi limitado, o que se evidenciou pelos valores de p próximos mas não atingindo significância estatística ($p \approx 0,10$).

7.2. Diferenças Metodológicas

A análise quantitativa de enterobactérias nas amostras legais vs. qualitativa nas ilegais, embora adequada para avaliação de conformidade, impediu comparação estatística direta deste parâmetro entre grupos.

7.3. Origem Única das Amostras Legais

Os dados legais provêm de uma única empresa, a Cannprisma Pharma. Embora esta empresa seja representativa da produção legal em Portugal e processe material de múltiplos países, os resultados podem não ser completamente generalizáveis a toda a indústria. Uma mais valia seria realizar estudos incluindo múltiplos produtores.

7.4. Ausência de Identificação a Nível de Espécies

O estudo limitou-se à identificação presuntiva de grupos microbianos e alguns patogénicos específicos. A identificação ao nível de espécie, através de métodos moleculares poderia fornecer informação adicional sobre fontes de contaminação e diversidade microbiana.

7.5. Variáveis Não Controladas

Fatores como tempo de armazenamento, condições específicas de transporte e características das variedades de *Cannabis* (como o teor de humidade e o perfil de canabinóides) não foram sistematicamente controlados, podendo ter influenciado os resultados microbiológicos.

8. Aplicabilidade Forense

Do ponto de vista forense, os resultados demonstram que a análise microbiológica pode constituir ferramenta complementar útil na caracterização de amostras de *Cannabis*. A presença/ausência de patogénicos específicos, particularmente *S. aureus*, mostrou-se discriminatória entre origens legal e ilegal.

Os perfis microbiológicos, quando associados a dados químicos (perfil de canabinóides, presença de contaminantes) e geográficos (mapa de prevalência por país), podem fornecer informação valiosa para:

- Distinção entre produtos de origem legal e ilegal;
- Avaliação de risco sanitário em casos envolvendo consumidores vulneráveis;
- Apoio à investigação através de caracterização de padrões microbiológicos;
- Fornecimento de evidência em processos judiciais relacionados com tráfico de produtos impróprios.

A validação do protocolo adaptado torna viável a integração de análises microbiológicas em contexto forense, complementando as análises químicas tradicionais sem comprometer a quantidade de amostra disponível para outros testes.

9. Perspetivas Futuras

Os resultados abrem várias direções para investigação futura que poderiam aprofundar e expandir os conhecimentos obtidos:

Estudos metagenômicos: A caracterização do microbioma completo através de sequenciação de 16S rRNA (bactérias) e ITS (fungos) poderia identificar marcadores microbianos específicos de origem ou processamento, expandindo o potencial de rastreabilidade.

Investigação de micotoxinas: A avaliação de micotoxinas em amostras com elevada carga fúngica seria relevante para avaliação completa de risco.

Caracterização de resistência antimicrobiana: Os isolados de *S. aureus* poderiam ser caracterizados quanto a perfis de resistência e fatores de virulência, fornecendo uma informação relevante para saúde pública.

Correlações com parâmetros físico-químicos: Análise de associações entre carga microbiana e teor de humidade, perfil de canabinóides, ou presença de contaminantes químicos poderia identificar fatores de risco.

Estudos multicêntricos: Expansão do estudo a múltiplos produtores, regiões e períodos temporais permitiria generalização mais robusta dos resultados.

Capítulo 5: Conclusões

Este trabalho permitiu atingir os objetivos propostos, fornecendo uma caracterização microbiológica abrangente de amostras de *Cannabis sativa* de diferentes origens e validando um protocolo adaptado para análise de pequenas quantidades de amostra. Os principais resultados e conclusões obtidos são apresentados de seguida.

1. Principais Conclusões

1.1. Qualidade Microbiológica da Produção Legal

As amostras de *Cannabis* medicinal de origem legal apresentaram qualidade microbiológica elevada, com conformidade integral - 100% - do produto acabado relativamente aos limites estabelecidos pela Farmacopeia Europeia. O processamento industrial demonstrou eficácia significativa na redução da carga microbiana - $p < 0,001$ -, transformando matéria-prima com variabilidade natural esperada em produto final seguro e conforme com os requisitos regulamentares.

A ausência total de microrganismos patogénicos específicos - *E. coli*, *Salmonella*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* - em todas as 378 amostras legais analisadas constitui o resultado mais relevante do ponto de vista de saúde pública, demonstrando que os sistemas de controlo implementados na produção regulamentada são eficazes na prevenção de contaminação por patogénicos.

1.2. Diferenças entre *Cannabis* Legal e Ilegal

A principal diferença entre amostras legais e ilegais não residiu nas contagens microbianas totais, mas sim na presença de microrganismos patogénicos específicos. *Staphylococcus aureus* foi detetado em 22,2% das amostras ilegais no Procedimento 1 e 11,1% no Procedimento 2, contrastando com ausência total nas amostras legais. Esta diferença, estatisticamente significativa - $\chi^2 = 30,5$, $p < 0,001$ -, evidencia que produtos de origem não regulamentada apresentam risco sanitário superior, particularmente relevante para populações vulneráveis como doentes imunocomprometidos.

1.3. Validação Metodológica

O protocolo adaptado para análise de 25mg de amostra, com redução de 10× nos volumes de reagentes, demonstrou equivalência estatística ao protocolo standard - $p > 0,05$ para todos os parâmetros quantitativos -, validando a sua aplicabilidade em contexto forense onde as quantidades de amostra são limitadas. Esta validação permite integrar análises microbiológicas na rotina de análise forense sem comprometer a disponibilidade de material para outras análises complementares essenciais.

1.4. Adequação dos *Standards* Internacionais

Os limites microbiológicos estabelecidos pela Farmacopeia Europeia demonstraram-se adequados e discriminatórios para avaliação da qualidade de *Cannabis* medicinal. O facto de o produto acabado legal cumprir todos os critérios, enquanto as amostras ilegais apresentaram não-conformidades para patogénicos específicos, valida a aplicabilidade destes *standards* ao contexto da *Cannabis* medicinal.

1.5. Variabilidade Geográfica

A análise por país de origem revelou variabilidade significativa nas contagens de bolores e leveduras - $p < 0,001$ -, com o Médio Oriente apresentando os melhores resultados e o sul da Europa a taxa mais elevada de não-conformidade. Contudo, independentemente desta variabilidade em contagens totais, todos os países apresentaram ausência universal de patogénicos específicos, demonstrando que os controlos críticos para segurança sanitária são eficazmente implementados em todos os contextos de produção legal, independentemente da localização geográfica.

2. Contributos do Estudo

Este trabalho representa uma das primeiras caracterizações microbiológicas comparativas de *Cannabis* legal e ilegal realizadas em contexto português. A abordagem metodológica, combinando análise retrospectiva de dados industriais reais com estudo laboratorial controlado, permitiu obter perspectiva abrangente da realidade microbiológica da *Cannabis* em Portugal.

2.1. Indústria de *Cannabis* medicinal

Para a indústria da *Cannabis*, os resultados validam a eficácia dos processos de controlo microbiológico implementados e fornecem evidência da importância do processamento adequado para segurança do produto. A demonstração de que o processamento elimina totalmente as não-conformidades observadas na matéria-prima reforça o valor das etapas de processamento microbiológico na cadeia de produção.

2.2. Autoridades Reguladoras

Para as autoridades reguladoras, o estudo fornece evidência científica robusta para políticas de regulamentação de *Cannabis* medicinal, demonstrando que regulamentação e fiscalização resultam em produtos significativamente mais seguros. A demonstração de que produtos legais e ilegais se distinguem claramente pela presença/ausência de patogénicos específicos suporta a importância de critérios microbiológicos rigorosos na regulamentação.

2.3. Ciências Forenses

Para as Ciências Forenses, a validação de um protocolo aplicável a amostras de quantidade limitada e a demonstração da utilidade de análises microbiológicas como ferramenta complementar na caracterização de amostras representa um avanço metodológico relevante. O potencial para distinção entre produtos de origem legal e ilegal com base em perfis microbiológicos abre perspetivas para aplicação desta abordagem em investigações criminais.

2.4. Saúde Pública

Para a saúde pública, a identificação de risco sanitário específico (neste caso a presença de *S. aureus*) em produtos de origem ilegal, associada à demonstração da segurança de produtos de origem regulamentada, fornece evidência para programas de educação sobre riscos de produtos não regulamentados e suporta políticas de saúde baseadas em evidência científica.

3. Implicações Práticas

A construção do mapa de prevalência microbiana por país de origem, utilizando a plataforma Datawrapper, demonstrou ser ferramenta útil para visualização de padrões geográficos de contaminação, mesmo que a variabilidade observada em contagens totais tenha um significado limitado dado que todos os países apresentaram ausência de patógenos. A implementação de um método que utilize este tipo de ferramenta pode ser uma ideia a ser expandida no futuro para incluir outros parâmetros e funcionar como referência para rastreabilidade.

A metodologia de tratamento de dados aplicada neste estudo, seguindo recomendações de literatura científica estabelecida, pode servir de referência para outros estudos em *Cannabis* e produtos de origem vegetal, contribuindo para harmonização de práticas de análise de dados.

4. Limitações e Recomendações

As limitações identificadas neste estudo apontam direções claras para investigação futura. O tamanho amostral limitado de amostras ilegais, embora adequado para validação metodológica, deve ser expandido em estudos futuros para permitir conclusões mais robustas. A origem única das amostras legais e ilegais limita a generalização dos resultados, recomendando-se estudos multicêntricos.

A ausência de caracterização molecular dos isolados microbianos representa oportunidade para estudos futuros que poderiam identificar marcadores específicos de origem ou processamento. Técnicas metagenômicas permitiriam caracterização completa do microbioma associado e potencial identificação de assinaturas microbianas biogeográficas.

A correlação com parâmetros físico-químicos (humidade, canabinóides, terpenos, contaminantes) não foi sistematicamente explorada mas representa direção valiosa para compreensão mais profunda dos fatores que influenciam qualidade microbiológica.

5. Perspetivas Futuras

Os resultados obtidos abrem várias perspetivas para desenvolvimento futuro desta linha de investigação.

A criação de bases de dados microbiológicas robustas, integrando dados de múltiplos produtores e regiões, poderia servir como referência para rastreabilidade e controlo de qualidade. A associação com dados químicos e genéticos poderia criar ferramentas de caracterização multidimensional com aplicação tanto industrial como forense.

O desenvolvimento de métodos rápidos de deteção microbiológica, complementando os métodos clássicos validados, poderia acelerar controlos de qualidade e permitir *feedback* mais rápido para correções de processo quando necessário.

6. Reflexão Final

Este estudo demonstra que o contexto de produção tem impacto direto e mensurável na segurança microbiológica de *Cannabis sativa*. Enquanto as contagens microbianas totais podem ser comparáveis em alguns casos, a presença de patogénicos específicos distingue claramente produtos de risco.

A análise microbiológica, frequentemente negligenciada em estudos de *Cannabis* face à análise química de canabinóides, revela-se ferramenta essencial para avaliação completa de qualidade e segurança. A integração desta perspetiva microbiológica com análises químicas e genéticas tradicionais oferece visão mais completa e rigorosa da qualidade de produtos de *Cannabis*.

Os resultados fornecem evidência científica sólida para políticas de regulamentação de *Cannabis* medicinal, demonstrando que sistemas regulados com implementação de boas práticas e controlos sistemáticos são eficazes na proteção da saúde pública. A validação do protocolo adaptado facilita a integração de análises microbiológicas em investigações forenses, complementando abordagens químicas tradicionais.

Em conclusão, a qualidade microbiológica deve ser considerada critério fundamental na avaliação de *Cannabis* para fins medicinais, e a regulamentação adequada constitui ferramenta essencial para garantir a segurança dos consumidores. A abordagem metodológica desenvolvida neste trabalho pode servir de referência para estudos futuros e para implementação de controlos de qualidade, tanto em contexto industrial como

forense, contribuindo para o desenvolvimento de uma indústria de *Cannabis* medicinal segura, regulamentada e baseada em evidência científica sólida.

Referências Bibliográficas

1. Zuardi AW. History of cannabis as a medicine: a review. *Braz J Psychiatry*. 2006 Jun 26;
2. Dhillon GS, Hukkeri S, Nightingale D, Callaway J. Evaluation of Different Techniques to Decontaminate Medical Cannabis and Their Effect on Cannabinoid Content. Vol. 2, *ACS Agricultural Science and Technology*. American Chemical Society; 2022. p. 1126–33.
3. Schofs L, Sparo MD, Sánchez Bruni SF. The antimicrobial effect behind *Cannabis sativa*. Vol. 9, *Pharmacology Research and Perspectives*. John Wiley and Sons Inc; 2021.
4. Russo EB. History of cannabis and its preparations in saga, science, and sobriquet. Vol. 4, *Chemistry and Biodiversity*. 2007. p. 1614–48.
5. Li HL. An Archaeological and Historical Account of Cannabis in China. 1974.
6. Karki P, Rangaswamy M. A Review of Historical Context and Current Research on Cannabis Use in India. *Indian J Psychol Med*. 2023 Mar 1;45(2):105–16.
7. Behere A, Behere P, Sathyanarayana Rao T. Cannabis: Does it have a medicinal value? Vol. 59, *Indian Journal of Psychiatry*. Medknow Publications; 2017. p. 262–3.
8. Trono D. Cannabis sativa: From Plants to Humans. Vol. 25, *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2024.
9. Seltenrich N. Cannabis contaminants: Regulating solvents, microbes, and metals in legal weed. *Environ Health Perspect*. 2019 Aug 1;127(8).
10. Schilling S, McCabe PF, Melzer R. Cannabis sativa. 2020 Jan 6 [cited 2025 Oct 2]; Available from: [https://www.cell.com/current-biology/fulltext/S0960-9822\(19\)31379-X](https://www.cell.com/current-biology/fulltext/S0960-9822(19)31379-X)
11. McPartland JM. Cannabis Systematics at the Levels of Family, Genus, and Species. *Cannabis Cannabinoid Res*. 2018 Oct 1;3(1):203–12.
12. Anderberg AA, Fay MF, Goldblatt P, Judd WS, Källersjö M, Kårehed J, et al. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. Vol. 141, *Botanical Journal of the Linnean Society*. 2003.

13. McPartland JM, Cubeta MA. New species, combinations, host associations and location records of fungi associated with hemp (*Cannabis sativa*). *Mycol Res.* 1997;101(7):853–7.
14. Simon M. Guide to Cannabis - Everything you need to know about THC, CBD, terpenes, and the entourage effect. WIRED; 2019.
15. Mikuriya TH, Francisco S. Marijuana in Medicine. *Calif Med.* 1969 Jan;
16. Cortés JG, Ryu BR, Pauli C, Barroso LR, Park SH. Industrial Applications of Hemp Fiber in Europe and Evolving Regulatory Landscape. *Journal of Natural Fibers.* 2024;21(1).
17. Collins J. SYMPOSIUM ON DRUG DECRIMINALIZATION, LEGALIZATION, AND INTERNATIONAL LAW A BRIEF HISTORY OF CANNABIS AND THE DRUG CONVENTIONS. *AJIL Unbound.* 2020 Oct 12;114:279–84.
18. Johnson JK, Colby A. History of Cannabis Regulation and Medicinal Therapeutics: It's Complicated. *Clin Ther.* 2023 Jun 1;45(6):521–6.
19. Carlini BH, Garrett SB, Carter GT. Medicinal Cannabis: A Survey Among Health Care Providers in Washington State. *American Journal of Hospice and Palliative Medicine.* 2017 Feb 1;34(1):85–91.
20. Whiting PF, Wolff RF, Deshpande S, Di Nisio M, Duffy S, Hernandez A V., et al. Cannabinoids for medical use: A systematic review and meta-analysis. Vol. 313, *JAMA - Journal of the American Medical Association.* American Medical Association; 2015. p. 2456–73.
21. Svrakic DM, Lustman PJ, Mallya A, Lynn TA, Finney R, Svrakic NM. FEATURE REVIEW Legalization, Decriminalization & Medicinal Use of Cannabis. 2012 Apr.
22. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). European Drug Report 2024: Trends and Developments. Luxembourg; 2024.
23. Hughes CE, Stevens A. What can we learn from the portuguese decriminalization of illicit drugs? *British Journal of Criminology.* 2010;50(6):999–1022.
24. Rêgo X, Oliveira MJ, Lameira C, Cruz OS. 20 years of Portuguese drug policy - developments, challenges and the quest for human rights. *Subst Abuse Treat Prev Policy.* 2021 Dec 1;16(1).

25. Drug Policy Alliance. Drug Decriminalization in Portugal Learning from a Health and Human-Centered Approach [Internet]. 2018. Available from: www.drugpolicy.org
26. Euronews. Portugal becomes a key hub for Europe's medical cannabis industry. 2024.
27. Gwinn KD, Leung MCK, Stephens AB, Punja ZK. Fungal and mycotoxin contaminants in cannabis and hemp flowers: implications for consumer health and directions for further research. Vol. 14, *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media SA; 2023.
28. Pérez-Moreno M, Pérez-Lloret P, González-Soriano J, Santos-Álvarez I. Cannabis resin in the region of Madrid: Adulteration and contamination. *Forensic Sci Int*. 2019 May 1;298:34–8.
29. Touw M. The religious and medicinal uses of Cannabis in China, India and Tibet. *J Psychoactive Drugs*. 1981;13(1):23–34.
30. Coelho MJ, Araújo MD, Carvalho M, Cardoso IL, Manso MC, Pina C. Antimicrobial Potential of Cannabinoids: A Scoping Review of the Past 5 Years. Vol. 13, *Microorganisms*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2025.
31. Luz-Veiga M, Amorim M, Pinto-Ribeiro I, Oliveira ALS, Silva S, Pimentel LL, et al. Cannabidiol and Cannabigerol Exert Antimicrobial Activity without Compromising Skin Microbiota. *Int J Mol Sci*. 2023 Feb 1;24(3).
32. European Pharmacopoeia Commission. European Pharmacopoeia, 11th Edition [Internet]. 11th Edition. Council of Europe; 2024 [cited 2025 Jun 30]. Available from: <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia>
33. Buirs L, Punja ZK. Integrated Management of Pathogens and Microbes in Cannabis sativa L. (Cannabis) under Greenhouse Conditions. Vol. 13, *Plants*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2024.
34. Sopovski DS, Han J, Stevens-Riley M, Wang Q, Erickson BD, Oktem B, et al. Investigation of microorganisms in cannabis after heating in a commercial vaporizer. *Front Cell Infect Microbiol*. 2023 Jan 13;12.
35. McPartland JM, McKernan KJ. Contaminants of concern in cannabis: Microbes, heavy metals and pesticides. In: *Cannabis sativa L - Botany and Biotechnology*. Springer International Publishing; 2017. p. 457–74.

36. Punja ZK, Ni L, Lung S, Buirs L. Total yeast and mold levels in high THC-containing cannabis (*Cannabis sativa* L.) inflorescences are influenced by genotype, environment, and pre-and post-harvest handling practices. *Front Microbiol.* 2023;14.
37. Seltnerich N. What's in Your Gummy? State Cannabis Contaminant Rules Vary Widely. Vol. 130, *Environmental Health Perspectives*. Public Health Services, US Dept of Health and Human Services; 2022.
38. Spampinato G, Candeliere F, Amaretti A, Paris R, Montanari M, Virzì N, et al. A three-years survey of microbial contaminants in industrial hemp inflorescences from two Italian cultivation sites. *J Cannabis Res.* 2024 Dec 1;6(1).
39. Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE). ASAE – Autoridade de Segurança Alimentar e Económica. 2025 [cited 2025 Oct 19]. *Salmonella*. Available from: <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-biologicos/salmonella.aspx>
40. Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE). ASAE - Autoridade de Saúde Alimentar e Económica. 2025 [cited 2025 Oct 19]. *Escherichia coli*. Available from: <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-biologicos/escherichia-coli.aspx>
41. Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE). ASAE - Autoridade de Segurança Alimentar e Económica. 2025 [cited 2025 Oct 19]. *Staphylococcus aureus*. Available from: <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-biologicos/staphylococcus-aureus.aspx>
42. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). CDC. 2025 [cited 2025 Oct 19]. About *Pseudomonas aeruginosa*. Available from: <https://www.cdc.gov/pseudomonas-aeruginosa/about/index.html>
43. Botelho D, Rackov AA, Balonova B. Analysis of Illicit and Legal Cannabis Products for a Suite of Chemical and Microbial Contaminants Experiment Findings · September 2021 CITATIONS 7 READS 207 [Internet]. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/361817857>
44. Ali EMM, Almagboul AZI, Khogali SME, Gergeir UMA. Antimicrobial Activity of *Cannabis sativa* L. *Chin Med.* 2012;03(01):61–4.
45. Barnett SE, Cala AR, Hansen JL, Crawford J, Viands DR, Smart LB, et al. Evaluating the Microbiome of Hemp. *Phytobiomes J.* 2020 Oct 16;4(4):351–63.

46. Vujanovic V, Korber DR, Vujanovic S, Vujanovic J, Jabaji S. Scientific prospects for cannabis-microbiome research to ensure quality and safety of products. Vol. 8, Microorganisms. MDPI AG; 2020.
47. Punja ZK, Collyer D, Scott C, Lung S, Holmes J, Sutton D. Pathogens and Molds Affecting Production and Quality of Cannabis sativa L. Front Plant Sci. 2019 Oct 17;10.
48. Gilbert JA, Blaser MJ, Caporaso JG, Jansson JK, Lynch S V., Knight R. Current understanding of the human microbiome. Nat Med. 2018 Apr 10;24(4):392–400.
49. Hawksworth DL, Wiltshire PEJ. Forensic mycology: The use of fungi in criminal investigations. Vol. 206, Forensic Science International. Elsevier Ireland Ltd; 2011. p. 1–11.
50. INFARMED – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde IP. INFARMED. 2023 [cited 2025 Oct 24]. Cannabis medicinal: Normas e critérios de qualidade microbiológica. Available from: <https://www.infarmed.pt/web/infarmed/canabis-medicinal>
51. Jamovi. The Jamovi Project [Internet]. 2024. Available from: <https://www.jamovi.org>
52. Datawrapper GmbH. Datawrapper: Create charts, maps, and tables. [Internet]. 2024. Available from: <https://www.datawrapper.de>
53. Hornung RW, Reed LD. Estimation of Average Concentration in the Presence of Nondetectable Values. Appl Occup Environ Hyg. 1990 Jan 1;5(1):46–51.
54. Helsel DR. Statistics for Censored Environmental Data Using Minitab and R. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2012.
55. International Organization for Standardization. Microbiology of food and animal feed — General requirements and guidance for microbiological examinations. Geneva, Switzerland; 2013.
56. Busschaert P, Geeraerd AH, Uyttendaele M, Van Impe JF. Estimating distributions out of qualitative and (semi)quantitative microbiological contamination data for use in risk assessment. Int J Food Microbiol. 2010 Apr;138(3):260–9.
57. Navas-Acien A, Selvin E, Sharrett AR, Calderon-Aranda E, Silbergeld E, Guallar E. Lead, cadmium, smoking, and increased risk of peripheral arterial disease. Circulation. 2004;109(25):3196–201.

58. Antweiler RC, Taylor HE. Evaluation of statistical treatments of left-censored environmental data using coincident uncensored data sets: I. Summary statistics. *Environ Sci Technol*. 2008 May 15;42(10):3732–8.
59. EPA U, Quality Management Division E. Guidance for Data Quality Assessment: Practical Methods for Data Analysis: EPA QA/G9: QA00 Update: July 2000. 2000.
60. McKernan K, Smith DR, Spangler J, Helbert Y, Lynch RC, Devitt-Lee A, et al. Metagenomic analysis of medicinal Cannabis samples; pathogenic bacteria, toxigenic fungi, and beneficial microbes grow in culture-based yeast and mold tests. *F1000Res*. 2016;5.
61. Thompson GR, Tuscano JM, Dennis M, Singapuri A, Libertini S, Gaudino R, et al. A microbiome assessment of medical marijuana. Vol. 23, *Clinical Microbiology and Infection*. Elsevier B.V.; 2017. p. 269–70.
62. Romano LL, Hazekamp A. Cannabis Oil: chemical evaluation of an upcoming cannabis-based medicine [Internet]. Vol. 1, *Cannabinoids*. 2013. Available from: www.cannabis-med.org
63. Hazekamp A. The Trouble with CBD Oil. Vol. 1, *Medical Cannabis and Cannabinoids*. S. Karger AG; 2018. p. 65–72.
64. Raber JC, Elzinga S, Kaplan C. Understanding dabs: contamination concerns of cannabis concentrates and cannabinoid transfer during the act of dabbing.
65. Carcieri C, Tomasello C, Simiele M, De Nicolò A, Avataneo V, Canzoneri L, et al. Cannabinoids concentration variability in cannabis olive oil galenic preparations. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2018 Jan 1;70(1):143–9.
66. Mechoulam R, Parker LA. The endocannabinoid system and the brain. Vol. 64, *Annual Review of Psychology*. Annual Reviews Inc.; 2013. p. 21–47.
67. Health Canada. Government of Canada. 2022. Cannabis in Canada: Get the facts. Available from: <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/drugs-medication/cannabis.html>

Anexos

Tabela 35 - Avaliação dos controlos positivos e negativos dos meios de cultura

Meio	Microrganismo	Controlo Positivo	Controlo Negativo	Interpretação
TSB	<i>Escherichia coli</i>	Crescimento típico	Sem crescimento	Confirmou a capacidade de crescimento e esterilidade do meio
Mossel	<i>Escherichia coli</i>	Crescimento típico	Sem crescimento	Confirmou eficácia seletiva e esterilidade do meio
Rappaport-Vassiliadis	<i>Salmonella spp.</i>	Crescimento típico	Sem crescimento	Confirmou eficácia seletiva e esterilidade do meio
MacConkey Broth	<i>Escherichia coli</i>	Crescimento típico	Sem crescimento	Confirmou a capacidade de crescimento e esterilidade do meio
Mannitol	<i>Staphylococcus aureus</i>	Crescimento típico	Sem crescimento	Confirmou eficácia seletiva e esterilidade do meio
Cetrimida	<i>Pseudomonas spp.</i>	Crescimento típico	Sem crescimento	Confirmou eficácia seletiva e esterilidade do meio
VRBGA	<i>Escherichia coli</i>	Crescimento típico	Sem crescimento	Confirmou eficácia seletiva e esterilidade do meio
XLD	<i>Salmonella spp.</i>	Crescimento típico	Sem crescimento	Confirmou eficácia seletiva e esterilidade do meio
MacConkey Agar	<i>Escherichia coli</i>	Crescimento típico	Sem crescimento	Confirmou a capacidade de crescimento e esterilidade do meio

