

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO EM TECNOLOGIAS LABORATORIAIS EM CIÊNCIAS FORENSES

DESENVOLVIMENTO DE UMA NOVA ABORDAGEM VERDE PARA DETERMINAÇÃO DE FITOCANABINOIDES NATURAIS E SEMISSINTÉTICOS EM MATRIZES BIOLÓGICAS

Trabalho submetido por

Maria Beatriz Jeremias Pereira

para a obtenção do grau de Mestre em Tecnologias Laboratoriais em
Ciências Forenses

novembro de 2024

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO EM TECNOLOGIAS LABORATORIAIS EM CIÊNCIAS FORENSES

DESENVOLVIMENTO DE UMA NOVA ABORDAGEM VERDE PARA DETERMINAÇÃO DE FITOCANABINOIDES NATURAIS E SEMISSINTÉTICOS EM MATRIZES BIOLÓGICAS

Trabalho submetido por

Maria Beatriz Jeremias Pereira

para a obtenção do grau de **Mestre** em Tecnologias Laboratoriais em
Ciências Forenses

Trabalho orientado por

Prof. Doutor Nuno da Rosa Neng

e coorientado por

**Prof. Doutor Alexandre Quintas
Mestre Beatriz Correia**

novembro de 2024

Agradecimentos

*“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós.
Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.”
“O Príncipezinho” - Antoine de Saint-Exupéry*

A elaboração da presente dissertação só se tornou possível graças à disponibilidade e apoio de algumas pessoas que, de forma direta ou indireta, me auxiliaram neste percurso crucial da minha vida pessoal e académica.

Primeiramente, começo por fazer um sincero agradecimento ao meu orientador, Prof. Doutor Nuno da Rosa Neng, por todo o apoio fulcral, paciência, conhecimentos transmitidos e por estar sempre disponível no decorrer do trabalho neste último ano.

Ao Prof. Doutor Alexandre Quintas, meu coorientador, agradeço a disponibilidade, motivação e auxílio prestados durante a realização deste trabalho. Agradeço-lhe ainda, de forma especial e com grande carinho, todas as oportunidades que me proporcionou no Laboratório de Patologia Molecular e Bioquímica Forense.

À Mestre Beatriz Correia, minha coorientadora, um especial obrigada por toda a entreajuda, momentos de descontração, ensinamentos e disponibilidade que, sem dúvida, me ajudaram a crescer no laboratório, principalmente no início deste trabalho.

Ao Instituto Universitário Egas Moniz, por ter sido a minha casa ao longo destes últimos cinco anos, sem esquecer os seus docentes. Há que fazer também um estimado agradecimento a todos aqueles com quem, desde o primeiro dia, me fui cruzando no Laboratório de Patologia Molecular e Bioquímica Forense, que sempre se mostraram dispostos a ajudar nesta jornada, com especial menção a todos os professores e aos técnicos Daniela Rente e Gustavo Pedro.

À Neuza Amaral, à Prof. Doutora Helena Gaspar e ao Prof. Doutor Gonçalo Justino pela confirmação estrutural de hexahidrocanabinol.

À Francesca pela ajuda na purificação de hexahidrocanabinol, que só nós sabemos aquilo que nos custou. Ao Alfredo, Catarina, Inês, Rafaela e Stella, colegas desta longa caminhada, um obrigada por toda a motivação e animação diária no laboratório e por todos os almoços, onde o desespero era tema de conversa.

Ao Bernardo agradeço a muita paciência, o apoio, o companheirismo e todos os conselhos em alguns dos momentos mais importantes da minha vida.

Por fim, mas não menos importante, o meu sincero obrigado à minha família, principalmente aos meus pais e avó, por sempre acreditarem em mim e me incentivarem a dar o meu melhor, mostrando o seu apoio incondicional. Obrigada do fundo do coração pela paciência. Sem vocês isto não seria mesmo possível.

Declaração de Honra

Código | IMP-EM-EI-111_00

Declaro, por minha honra, que o presente trabalho académico é original e foi elaborado por mim própria, 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 “*Desenvolvimento de uma Nova Abordagem Verde para Determinação de Fitocanabinoides Naturais e Semissintéticos em Matrizes Biológicas*” não foi apresentada, para efeitos de avaliação, a qualquer outra entidade ou instituição, para além da diretamente envolvida 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: 21/11/2024

Declaração Conflito de Interesses (DCI)

Código | IMP-EM-EI-110_00

Eu, Maria Beatriz Jeremias Pereira, referente a Dissertação “*Desenvolvimento de uma Nova Abordagem Verde para Determinação de Fitocannabinoides Naturais e Semissintéticos em Matrizes Biológicas*” declaro que não possuo conflitos de interesse de ordem pessoal, comercial, académica, político ou financeiro.

Data: 21/11/2024

Declaração de Financiamento

Código | IMP-EM-EI-113_00

Eu, Maria Beatriz Jeremias Pereira, referente a Dissertação “Desenvolvimento de uma Nova Abordagem Verde para Determinação de Fitocannabinoides Naturais e Semissintéticos em Matrizes Biológicas” declaro que o meu trabalho se encontra financiado pelo Laboratório de Patologia Molecular e Bioquímica Forense e pelo projeto “*Implementation of a cost-effective and competitive Analytical Service for the Determination of Phytocannabinoids in Cannabis Sativa and in urine samples*” (105030223) da Egas Moniz School of Health and Science, no montante de 1000 euros, para aquisição de soluções-padrão, reagentes e materiais consumíveis para instrumentação.

Data: 21/11/2024

Declaração de Ética e Registo

Código | IMP-EM-EI-113_00

Eu Maria Beatriz Jeremias Pereira, referente a Dissertação “*Desenvolvimento de uma Nova Abordagem Verde para Determinação de Fitocannabinoides Naturais e Semissintéticos em Matrizes Biológicas*” declaro que o meu trabalho se encontra aprovado pela Comissão de Ética Egas Moniz sob o número de Processo Interno 1319.

Data: 21/11/2024

Comunicações

Comunicações Orais:

Pereira, M. Beatriz; Neng, Nuno R.; Quintas, Alexandre. “*Determinação de Fitocannabinoides Naturais e Semissintéticos em Matrizes Biológicas*” apresentado nas IV Jornadas Científicas Universitárias e Politécnicas. Monte da Caparica, Portugal. 27 a 30 de novembro de 2023.

Pereira, M. Beatriz; Neng, Nuno R.; Quintas, Alexandre. “*Desenvolvimento de uma Nova Abordagem Verde para Determinação de Canabinoides Naturais e Semissintéticos em Matrizes Biológicas*” apresentado no 22º Congresso Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses. Lisboa, Portugal. 17 a 19 de outubro de 2024.

Comunicações em Póster:

Pereira, M. Beatriz; Pivotto, Francesca; Justino, Gonçalo; Neng, Nuno R.; Quintas, Alexandre. “*Purification of Semi-Synthetic Cannabinoids from Herbal Cannabis Products by HPLC-UV/Vis*” apresentado no CQE Days 2024. Lisboa, Portugal. 18 e 19 de junho de 2024.

Pereira, M. Beatriz; Quintas, Alexandre; Neng, Nuno R.. “*Nova Abordagem Verde para Determinação de Canabinoides Naturais e Semissintéticos em Saliva*” apresentado nas IV Jornadas Ibéricas de Toxicologia. Covilhã, Portugal. 26 e 27 de setembro de 2024.

Pereira, M. Beatriz; Correia, Beatriz; Neng, Nuno R.; Quintas, Alexandre. “*Determinação de Canabinoides Naturais e Semissintéticos em Saliva*” apresentado nas V Jornadas Científicas Universitárias e Politécnicas. Monte da Caparica, Portugal. 25 a 29 de novembro de 2024. (Aceite).

Resumo

Atualmente, a canábis é a substância de abuso mais consumida a nível mundial. No início do século XXI, surgiram no mercado recreativo os canabinoides sintéticos e semissintéticos como alternativas legais à canábis e que representam um perigo emergente à saúde dos consumidores por serem mais potentes e imprevisíveis do que os fitocanabinoides. O presente trabalho visou o desenvolvimento, otimização, validação e aplicação de uma metodologia verde para a análise de canabinoides naturais e semissintéticos (canabidiol (CBD), Δ^8 -tetrahydrocannabinol (Δ^8 -THC), Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) e hexahydrocannabinol (HHC)) em saliva, por microextração adsorptiva em barra (BA μ E) seguida de análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS). Pela dificuldade em obter, à data de início do trabalho, padrões analíticos certificados dos diastereoisómeros de HHC, purificou-se este composto a partir de uma amostra de canábis herbal por cromatografia líquida de alta eficiência (LC), tendo os produtos obtidos sido estruturalmente confirmados por GC-MS, LC-MS e espectroscopia de ressonância magnética nuclear. A pureza obtida por GC-MS foi de 72 % para 9R-HHC e 91 % para 9S-HHC. Vários parâmetros que afetam a eficiência da BA μ E foram otimizados, tendo-se obtido recuperações médias entre 57,3 (9R-HHC) e 80,6 % (CBD). A validação do método BA μ E/GC-MS, em condições experimentais otimizadas, permitiu estimar baixos limites de deteção (1,25 ng/mL) e de quantificação (4,13 ng/mL). Obteve-se boa linearidade na gama compreendida entre 5 e 300 ng/mL ($r^2 \geq 0,9963$), sendo que todos os valores relativos à precisão e justeza se encontraram dentro dos parâmetros referidos na guia diretiva da UNODC (< 20 %) na qual este trabalho foi baseado. A metodologia otimizada e validada foi aplicada a três amostras reais de saliva fornecidas por voluntários após o consumo, tendo a presença de todos os canabinoides em estudo sido confirmada com concentrações entre 4,4 ng/mL (Δ^8 -THC) e 672,9 ng/mL (Δ^9 -THC), encontrando-se na mesma ordem de magnitudes descritas na literatura. A metodologia desenvolvida revelou-se uma alternativa analítica simples, ecológica, de baixo custo e miniaturizada, com potencial para ser utilizada como método de rotina no laboratório.

Palavras-chave: Fitocanabinoide; BA μ E; GC-MS; Amostras Biológicas.

Abstract

Cannabis is currently the most widely consumed substance of abuse worldwide. At the beginning of the 21st century, synthetic and semi-synthetic cannabinoids emerged on the recreational market as legal alternatives to cannabis and representing an emerging danger to consumers' health due to their higher potency and unpredictability than phytocannabinoids. This work aimed to develop, optimize, validate and apply a green methodology for the analysis of natural and semi-synthetic cannabinoids (cannabidiol (CBD), Δ^8 -tetrahydrocannabinol (Δ^8 -THC), Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) and hexahydrocannabinol (HHC)) in saliva, by bar adsorptive microextraction (BA μ E) followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) analysis. Due to the difficulty in obtaining certified analytical standards for HHC diastereoisomers at the time the work began, this compound was purified from an herbal cannabis sample by high-performance liquid chromatography (LC), and the products obtained were structurally confirmed by GC-MS, LC-MS and nuclear magnetic resonance spectroscopy. The purity obtained by GC-MS was 72 % for 9R-HHC and 91 % for 9S-HHC. Several parameters affecting the efficiency of BA μ E were optimized, obtaining average recoveries between 57,3 (9R-HHC) and 80,6 % (CBD). Validation of the BA μ E/GC-MS method, under optimized experimental conditions, allowed the estimation of low limits of detection (1,25 ng/mL) and quantification (4,13 ng/mL). Good linearity was obtained in the range between 5 and 300 ng/mL ($r^2 \geq 0.9963$), and all the precision and trueness values were within the parameters stated in the UNODC guideline (< 20 %) on which this work was based. The optimized and validated methodology was applied to three real saliva samples provided by volunteers after consumption and the presence of all the cannabinoids under study was confirmed with concentrations between 4,4 ng/mL (Δ^8 -THC) and 672,9 ng/mL (Δ^9 -THC), which are in the same order of magnitude as those described in the literature. The methodology developed proved to be a simple, environmentally friendly, low-cost and miniaturized analytical alternative, with the potential to be used as a routine method in the laboratory.

Keywords: Phytocannabinoid; BA μ E; GC-MS; Biological Samples.

Índice Geral

<i>Resumo</i>	1
<i>Abstract</i>	3
<i>Índice Geral</i>	5
<i>Índice de Figuras</i>	7
<i>Índice de Tabelas</i>	11
<i>Lista de Abreviaturas</i>	13
<i>1. Introdução</i>	15
1.1. Contexto Histórico da Planta da Canábis.....	15
1.2. Caracterização Botânica da Planta da Canábis	20
1.3. Classificação de Canabinoides.....	23
1.3.1. Fitocanabinoides	24
1.3.2. Endocanabinoides	26
1.3.3. Canabinoides Sintéticos e Semissintéticos	26
1.4. Prevalência de Consumo de Canábis	31
1.5. Perigos Inerentes ao Consumo de Canabinoides Naturais e Semissintéticos	31
1.6. Legislação em Portugal.....	32
1.7. Metodologias Analíticas para Monitorização de Canabinoides.....	35
1.7.1. Técnicas de Preparação de Amostra	35
1.7.2. Técnicas Cromatográficas.....	38
1.7.3. Matrizes Biológicas.....	44
1.8. Objetivos do Trabalho.....	45
<i>2. Materiais e Métodos</i>	47
2.1. Reagentes Químicos, Materiais e Amostras	47
2.2. Instrumentação e Sistemas Cromatográficos	49
2.3. Procedimento Experimental.....	51

2.3.1. Extração da Amostra de Canábis Herbal	51
2.3.2. Purificação de HHC por HPLC-UV/Vis	51
2.3.3. Confirmação Estrutural dos Compostos	52
2.3.4. Análise por Cromatografia Gasosa acoplada a Espetrometria de Massa.....	52
2.3.5. Microextração Adsorativa em Barra.....	54
2.3.6. Aplicação a Amostras Reais	56
3. <i>Resultados e Discussão</i>	57
3.1. Purificação de Hexahidrocanabinol por HPLC-UV/Vis.....	57
3.2. Confirmação Estrutural dos Compostos	58
3.3. Condições Instrumentais	58
3.4. Ensaios de Otimização da Microextração Adsorativa em Barra	61
3.4.1. Seleção da fase sorvente	61
3.4.2. Otimização da Dessorção Líquida	63
3.4.3. Otimização dos Efeitos na Matriz.....	65
3.4.4. Otimização da Extração	68
3.5. Validação do Método	71
3.6. Aplicação a Amostras Reais	73
3.7. Comparação com Estudos Anteriores	75
4. <i>Conclusões</i>	77
5. <i>Referências Bibliográficas</i>	79

Índice de Figuras

Figura 1. Planta <i>Cannabis sativa</i> L. (A) e respetiva folha (B) e flor (C). Retirado de Bonini et al. (2018) (A), Malabadi et al. (2023) (B) e Adams et al. (2021) (C).....	15
Figura 2. Distribuição geográfica das plantas <i>Cannabis sativa</i> L.. Retirado de Hourfane (2023).....	21
Figura 3. Subespécies da <i>Cannabis sativa</i> L.: <i>sativa</i> , <i>indica</i> e <i>ruderalis</i> . Retirado de McPartland (2018).	22
Figura 4. Estruturas químicas do Δ^8 -THC e do Δ^9 -THC, respetivamente.	25
Figura 5. Estrutura química do JWH-018.	27
Figura 6. Estruturas químicas dos isómeros 9R-HHC e 9S-HHC, respetivamente... ..	29
Figura 7. Sobreposição das estruturas moleculares tridimensionais do 9R-HHC (a cinzento), 9S-HHC (a preto) e Δ^9 -THC (a branco). Adaptado de Ujváry (2023).....	30
Figura 8. Representação esquemática do processo de microextração adsortiva em barra. (Criado com BioRender.com).....	37
Figura 9. Representação do tempo morto (t_M), tempo de retenção total (t_R) e tempo de retenção ajustado (t'_R) num cromatograma. Adaptado de Harris (2010).	39
Figura 10. Representação esquemática de um sistema de HPLC simplificado. (Criado com BioRender.com).	41
Figura 11. Representação esquemática de um sistema de GC simplificado. (Criado com BioRender.com).	42
Figura 12 - Extração sólido-líquido da amostra de cânabis herbal assistida por banho de ultrassons.....	51
Figura 13. Representação esquemática da metodologia de análise BA μ E /GC-MS.	55
Figura 14. Cromatograma obtido através da análise por HPLC-UV/Vis, sob condições instrumentais otimizadas, da amostra de cânabis herbal em estudo, numa concentração de 25 mg/mL a 230 nm. (Legenda: A- CBDA; B- CBD; C e D – picos cromatográficos cuja identidade é desconhecida).	57

Figura 15. Cromatograma obtido por GC-MS(SIM) dos canabinoides nas condições instrumentais otimizadas. (Legenda: A- PI; B- CBD; C- 9S-HHC; D- Δ^8 -THC; E- Δ^9 -THC; F- 9R-HHC). 59

Figura 16. Efeito da seletividade dos polímeros e dos ACs em estudo na recuperação de canabinoides (CBD, Δ^8 -THC, Δ^9 -THC, 9S-HHC e 9R-HHC) por BA μ E/GC-MS. Condições de ensaio: microextração de 1 h a 1000 rpm; retroextração com 100 μ L de MeOH e posterior tratamento ultrassônico durante 45 minutos. 62

Figura 17. Efeito do tempo de retroextração na recuperação de canabinoides (CBD, Δ^8 -THC, Δ^9 -THC, 9S-HHC e 9R-HHC) por BA μ E/GC-MS. Condições de ensaio: microextração de 1 h a 1000 rpm com HLB; retroextração com 100 μ L de MeOH e posterior tratamento ultrassônico de 30/45/60 minutos. 63

Figura 18. Efeito do tipo de solvente de retroextração na recuperação de canabinoides (CBD, Δ^8 -THC, Δ^9 -THC, 9S-HHC e 9R-HHC) por BA μ E/GC-MS. Condições de ensaio: microextração de 1 h a 1000 rpm com HLB; retroextração com 100 μ L MeOH/ACN/Mistura MeOH:ACN (50:50, v:v) e posterior tratamento ultrassônico de 45 minutos. 64

Figura 19. Efeito do pH da matriz na recuperação de canabinoides (CBD, Δ^8 -THC, Δ^9 -THC, 9S-HHC e 9R-HHC) por BA μ E/GC-MS. Condições de ensaio: microextração de 1 h a 1000 rpm com HLB a pH 2/5,5/12; retroextração com 100 μ L de mistura MeOH:ACN (50:50, v:v) e posterior tratamento ultrassônico de 45 minutos. 65

Figura 20. Efeito do modificador orgânico na recuperação de canabinoides (CBD, Δ^8 -THC, Δ^9 -THC, 9S-HHC e 9R-HHC) por BA μ E/GC-MS. Condições de ensaio: microextração de 1 h a 1000 rpm com HLB a pH 12 e 0/5/10/15 % (v:v) de MeOH; retroextração com 100 μ L de mistura MeOH:ACN (50:50, v:v) e posterior tratamento ultrassônico de 45 minutos. 66

Figura 21. Efeito da força iônica na recuperação de canabinoides (CBD, Δ^8 -THC, Δ^9 -THC, 9S-HHC e 9R-HHC) por BA μ E/GC-MS. Condições de ensaio: microextração de 1 h a 1000 rpm com HLB, a pH 12 com 5 % (v:v) de MeOH e 0/5/10/15 % (p:v) de NaCl; retroextração com 100 μ L de mistura MeOH:ACN (50:50, v:v) e posterior tratamento ultrassônico de 45 minutos. 67

Figura 22. Efeito da temperatura na recuperação de canabinoides (CBD, Δ^8 -THC, Δ^9 -THC, 9S-HHC e 9R-HHC) por BA μ E/GC-MS. Condições de ensaio: microextração

de 1 h a 1000 rpm a 23/30 °C com HLB, a pH 12 e 5 % (v:v) de MeOH; retroextração com 100 µL de mistura MeOH:ACN (50:50, v:v) e posterior tratamento ultrassónico de 45 minutos.....	68
Figura 23. Efeito do tempo de equilíbrio na recuperação de canabinoides (CBD, Δ^8 -THC, Δ^9 -THC, 9S-HHC e 9R-HHC) por BAµE/GC-MS. Condições de ensaio: microextração de 1/2/2:30/3/16 h a 1000 rpm a 23/30 °C com HLB, a pH 12 e 5 % (v:v) de MeOH; retroextração com 100 µL de mistura MeOH:ACN (50:50, v:v) e posterior tratamento ultrassónico de 45 minutos.	69
Figura 24. Efeito da velocidade de agitação na recuperação de canabinoides (CBD, Δ^8 -THC, Δ^9 -THC, 9S-HHC e 9R-HHC) por BAµE/GC-MS. Condições de ensaio: microextração de 1 h a 700/1000/1300 rpm a 23/30 °C com HLB, a pH 12 e 5 % (v:v) de MeOH; retroextração com 100 µL de mistura MeOH:ACN (50:50, v:v) e posterior tratamento ultrassónico de 45 minutos.	70
Figura 25. Cromatograma obtido por BAµE/GC-MS nas condições experimentais otimizadas, relativo a uma solução controlo (2,5 µg/mL) e à amostra 2.....	74
Figura A.1. Proporção das espécies neutras e ionizadas de CBD em função do pH.	101
Figura A.2. Proporção das espécies neutras e ionizadas de Δ^8 -THC em função do pH.	101
Figura A.3. Proporção das espécies neutras e ionizadas de Δ^9 -THC em função do pH.	102
Figura A.4. Proporção das espécies neutras e ionizadas de HHC em função do pH.	102
Figura A.5. Gráfico de resíduos do CBD.....	103
Figura A.6. Gráfico de resíduos do Δ^8 -THC.....	103
Figura A.7. Gráfico de resíduos do Δ^9 -THC.....	104
Figura A.8. Gráfico de resíduos do 9S-HHC.....	104
Figura A.9. Gráfico de resíduos do 9R-HHC.	104

Índice de Tabelas

Tabela 1. Condições experimentais utilizadas para purificação de HHC por HPLC-UV/Vis.	52
Tabela 2. Iões selecionados, expressos em razão m/z , e tempo de retenção do padrão interno e de cada canabinoide, para monitorização em modo SIM.	59
Tabela 3. Valores de limites de deteção (LOD) e de quantificação (LOQ), gama de trabalho, equações das retas e coeficientes de determinação (r^2) obtidos para cada canabinoide em estudo para a calibração instrumental por GC-MS.	60
Tabela 4. Condições otimizadas para o método desenvolvido por BA μ E/GC-MS.	71
Tabela 5. Recuperações médias dos canabinoides em estudo nas condições otimizadas do método BA μ E/GC-MS.	71
Tabela 6. Valores de limites de deteção (LOD) e de quantificação (LOQ), gama de trabalho, equações das retas e coeficientes de determinação (r^2) obtidos para cada canabinoide em estudo para a validação da metodologia BA μ E/GC-MS.	72
Tabela 7. Valores de RSD (%) para o estudo da repetibilidade e da precisão intermediária e de viés (%) para o estudo da justeza inter-dia obtidos para a validação da metodologia BA μ E/GC-MS.	73
Tabela 8. Concentrações dos canabinoides em estudo em amostras de saliva reais de voluntários determinadas por BA μ E/GC-MS.	75
Tabela 9. Comparação de métodos de recolha e analíticos, recuperação (%), LOD (ng/mL), LOQ (ng/mL) e gama linear (ng/mL) de publicações científicas e do presente trabalho.	76
Tabela A.1. Valores de RSD (%) para o estudo da repetibilidade e da precisão intermediária e de viés (%) para o estudo da justeza inter-dia obtidos para a calibração instrumental.	100
Tabela A.2. Valores de F_{Tab} e F_{Calc} obtidos para os testes estatísticos <i>Lack-of-Fit</i> e <i>Goodness-of-Fit</i> para os canabinoides em estudo.	105

Lista de Abreviaturas

a.C.	Antes de Cristo
AC	Carvão Ativado (do inglês, <i>Activated Carbon</i>)
ACN	Acetonitrilo
BA μ E	Microextração Adsorptiva em Barra (do inglês, <i>Bar Adsorptive Microextraction</i>)
CBD	Canabidiol
CBDA	Ácido Canabidiólico (do inglês, <i>Cannabidiolic acid</i>)
CBN	Canabinol
d.C.	Depois de Cristo
DLLME	Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (do inglês, <i>Dispersive Liquid-Liquid Microextraction</i>)
GAC	Química Analítica Verde (do inglês, <i>Green Analytical Chemistry</i>)
GC	Cromatografia em Fase Gasosa (do inglês, <i>Gas Chromatography</i>)
HHC	Hexahidrocanabinol
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês, <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
LD	Dessorção Líquida (do inglês, <i>Liquid Desorption</i>)
LLE	Extração Líquido-líquido (do inglês <i>Liquid-Liquid Extraction</i>)
LOD	Limite de Detecção (do inglês, <i>Limit of Detection</i>)
LOQ	Limite de Quantificação (do inglês, <i>Limit of Quantification</i>)
MS	Espectrometria de Massa (do inglês, <i>Mass Spectrometry</i>)
MSTFA	N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida
NMR	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (do inglês, <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
NOESY	Espectroscopia de Efeito Nuclear <i>Overhauser</i> (do inglês, <i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>)
OVAT	Estratégia de Otimização Univariante (do inglês, <i>One Variable At A Time</i>)
PI	Padrão Interno
RSD	Desvio Padrão Relativo (do inglês, <i>Relative Standard Deviation</i>)
S/N	Razão Sinal/Ruído (do inglês, <i>Signal-to-Noise</i>)
SIM	Modo de Monitorização de Iões Seleccionados (do inglês, <i>Single Ion Monitoring</i>)
SLE	Extração Sólido-Líquido (do inglês, <i>Solid-Liquid Extraction</i>)
SPME	Microextração Em Fase Sólida (do inglês, <i>Solid-Phase Microextraction</i>)

THC	Tetrahydrocannabinol
THCA	Ácido Tetrahydrocannabinólico
UV/Vis	Ultravioleta-Visível
Δ^8 -THC	Δ^8 -tetrahydrocannabinol
Δ^9 -THC	Δ^9 -tetrahydrocannabinol
C_M	Fase móvel
C_S	Fase estacionária
F_{Calc}	F calculado
F_{Tab}	F tabelado
K	Coeficiente de distribuição
k'	Fator de capacidade
N	Número de pratos teóricos
pH	Simétrico do logaritmo decimal da concentração em hidrogeniões
pH _{PZC}	pH no ponto de carga zero
pK _a	Logaritmo negativo da constante de acidez
r^2	Coeficiente de determinação
R_S	Resolução
t'_R	Tempo de retenção ajustado
t_M	Tempo morto
t_R	Tempo de retenção
W	Largura da base de pico cromatográfico
α	Seletividade
λ	Comprimento de onda
%	Porcentagem
g	Gramma
h	Hora
L	Litro
m/z	Razão massa/carga
min	Minuto
° C	Grau Centigrado
rpm	Rotações por minuto

1. Introdução

A canábis (figura 1), é uma planta utilizada há milhares de anos pelo ser humano, constituindo-se, atualmente, como a substância de abuso com maior índice de consumo, com mais de 228 milhões de consumidores em todo o mundo no ano de 2022 (EMCDDA, 2024a; UNODC, 2024).

De modo a contornar a legislação relativa às substâncias ilícitas, surgiram, no início do século XXI, canabinoides sintéticos e semissintéticos como alternativas legais à canábis, capazes de mimetizar os efeitos por si provocados. Apesar dos esforços para o controlo legal destas substâncias continuam a surgir novas moléculas no mercado. O facto de serem compostos tão recentes, faz com que não exista uma devida descrição na literatura sobre os mesmos, nem sobre a sua toxicidade, podendo pôr em risco a saúde dos seus utilizadores.

Deste modo, a monitorização dos compostos naturalmente presentes na canábis, nomeadamente tetrahydrocannabinol (THC) e canabidiol (CBD), bem como dos novos canabinoides sintéticos e semissintéticos que vão surgindo no mercado, torna-se imperativa, desempenhando um papel crucial em contexto forense.



Figura 1. Planta *Cannabis sativa* L. (A) e respetiva folha (B) e flor (C). Retirado de Bonini et al. (2018) (A), Malabadi et al. (2023) (B) e Adams et al. (2021) (C).

1.1. Contexto Histórico da Planta da Canábis

A *Cannabis sativa* L. é uma planta que acompanha a espécie humana desde o período neolítico, sendo por ela utilizada tanto a nível recreativo, medicinal e industrial (Filipiuc et al., 2021; Hädener et al., 2019; Neto et al., 2023). Registos históricos elucidam que esta planta, oriunda da Ásia central e do sudeste asiático, nomeadamente da Índia e da China, foi, e continua a ser usada, há milhares de anos, como fonte de sementes, fibra e óleo e alimentação, tendo mesmo sido considerada, no passado, como um dos cinco

principais grãos utilizados, em conjunto com arroz, cevada, milho e soja (Rubin, 1975; Touw, 1981).

As primeiras evidências arqueológicas da canábis remontam à República Checa, onde foi encontrada uma corda feita das fibras da planta (cânhamo) datada de 26900 a.C.. Desde esse ano até ao ano 300 a.C. são vários os vestígios da utilização humana desta planta, principalmente em países asiáticos, quer seja para decoração de cerâmicas ou para o fabrico de têxteis e papel (Hourfane et al., 2023). Com o desenvolvimento da escrita, vieram os primeiros registos escritos da utilização desta planta em diversas culturas. Os primeiros registos do uso medicinal da canábis encontram-se descritos na mais antiga farmacopeia chinesa “*Shen-nung Pen-tsao Ching*” (2700 a.C.) cuja autoria é atribuída ao imperador chinês Shen Nung, considerado como pai da medicina chinesa (Zuardi, 2006). Nesta farmacopeia são referidas propriedades para o tratamento de ciclos menstruais irregulares e dolorosos, dores reumáticas, malária, obstipação e outras condições (Pisanti & Bifulco, 2019; Stefkov et al., 2022). Shen Nung citou, pela primeira vez, propriedades psicoativas da planta referindo que “o seu consumo em excesso faz ver diabos” e, se usado por muito tempo, “pode comunicar-se com espíritos e iluminar o corpo” (Escohotado, 1998, p. 61).

No Antigo Egito, por volta de 1500 a.C., é mencionado no papiro de Ebers que a canábis pode ser utilizada para o controlo de dores e de transtornos emocionais, bem como de inflamações vaginais (mediante tratamento tópico). Tais benefícios fizeram com que a planta fosse considerada como sagrada (Crocq, 2020; Hourfane et al., 2023; Neto et al., 2023).

Na Índia, a planta apresentava duas finalidades: o uso religioso e o uso medicinal. Em “*Atharva Veda*” (1200-1000a.C.), uma das quatro obras sagradas do hinduísmo, a canábis é considerada como uma de cinco plantas divinas, acreditando-se que foi um presente do deus Shiva para que a humanidade construísse um mundo melhor. Como propriedades medicinais, foram sublinhadas na literatura as suas capacidades analgésicas, anticonvulsivantes, ansiolíticas, odontológicas e expetorantes, bem como afrodisíacas e estimulantes (Filipiuc et al., 2021; Neto et al., 2023; Zuardi, 2006).

Em geral, a canábis era um elemento habitual e incontroverso na vida quotidiana do império greco-romano, na qual era recorrente a sua utilização para o fabrico de tapetes, sapatos, tecidos e cordas (Russo & Franjo, 2006). No entanto, a utilização da canábis a

nível medicinal foi também abordada em alguns dos livros mais relevantes da altura, como “*De Materia Medica*” de Pedânio Dioscórides (Pisanti & Bifulco, 2019). Caio Plínio Segundo, naturalista e autor da enciclopédia mais antiga da época greco-romana “*Naturalis Historia*” (publicada entre os anos de 77 d.C. e 79 d.C), evidenciou algumas propriedades positivas da canábis, como curar a gota e ajudar a diminuir processos inflamatórios. Como efeitos secundários incluiu impotência masculina e cefaleias (Crocq, 2020; Pisanti & Bifulco, 2019). Cláudio Galeno, importante médico grego, menciona que, em Itália, era costume servir alimentos, nomeadamente bolos, contendo canábis, em banquetes, para promover a alegria e o prazer entre os convidados (Crocq, 2020; Touw, 1981). Adicionalmente, Galeno afirmou que “quando consumida em largas quantidades afeta o cérebro” (Abel, 1980; Hourfane et al., 2023, p. 4).

No segundo século d.C., foi descoberto, por Hua Tuo (108-208 d.C.), um novo uso medicinal para a canábis. Hua Tuo, considerado como o fundador da cirurgia chinesa, descreveu, pela primeira vez, a utilização de um composto de vinho e cânhamo como anestésico para procedimentos cirúrgicos complicados. Tal descrição ocorreu 1600 anos antes das primeiras anestésias no continente europeu (Abel, 1980; Neto et al., 2023).

Garcia de Orta (1501–1568), médico português, também descreveu alguns efeitos psicoativos da canábis no seu livro “*Colóquios dos Simples e Drogas e Coisas Medicinais da Índia*” evidenciando que o consumo de canábis fazia com que os indivíduos se sentissem eufóricos e com mais apetite, para além de provocar alucinações (Bonini et al., 2018; Messina et al., 2015; Russo, 2007).

A canábis é conhecida em África pelo menos desde o século XV, sendo que a sua introdução e difusão neste continente se deveu, possivelmente, a comerciantes árabes que realizavam as suas rotas comerciais entre a Índia e os países africanos. Esta planta passou a ser amplamente utilizada no tratamento de sintomas relacionados com a malária, disenteria, bem como de picadas de cobra e dores no momento do parto (Mack & Joy, 2000; Zuardi, 2006). No século seguinte, a chegada desta planta, primeiramente à América do Sul e, posteriormente, à América Central, deu-se por meio do tráfico humano de escravos africanos. Naquele tempo, a canábis era, então, bastante utilizada para o tratamento de sintomas de “agressões físicas e emocionais sofridas no período de escravidão” (Neto et al., 2023, p. 2; Warf, 2014; Zuardi, 2006).

Só no século XIX é que o continente europeu redescobriu a utilização medicinal da canábis através do exército comandado por Napoleão Bonaparte e por William

O'Shaughnessy. O exército francês foi responsável pelo transporte da canábis para o continente europeu, depois de uma invasão falhada ao Egito em 1798 (Warf, 2014). William Brooke O'Shaughnessy (1809 – 1889), médico irlandês que trabalhou em Calcutá, foi, ao que se sabe, o primeiro a aplicar um método experimental no estudo desta planta. Na Índia, O'Shaughnessy teve oportunidade de estudar diversas plantas, incluindo a canábis, avaliando a sua toxicidade em animais e, posteriormente, em pacientes com diferentes patologias (como doenças reumáticas, raiva, tétano e crises convulsivantes), tendo obtido bons resultados no tratamento dos indivíduos (Neto et al., 2023; Pisanti & Bifulco, 2019; Zuardi, 2006). Adicionalmente, O'Shaughnessy inferiu que a canábis cultivada na Índia diferia das plantas de canábis europeias, não só no aspeto, mas, também, nas suas propriedades farmacológicas (Crocq, 2020; Pisanti & Bifulco, 2019). No ano de 1839, O'Shaughnessy publica “*On the preparations of the Indian hemp, or gunjah*” (Sobre as Preparações do Cânhamo da Índia, ou Gujah), no qual refere que:

Os efeitos narcóticos do cânhamo são popularmente conhecidos no sul da África, América do Sul, Turquia, Egito, Ásia Menor, Índia e nos territórios adjacentes dos malaaios, birmaneses e siameses. (...) mas na Europa Ocidental o seu uso, seja como estimulante ou como remédio, é igualmente desconhecido. (O'shaughnessy, 1843, p. 343)

Ao regressar a Inglaterra, em 1841, O'Shaughnessy trouxe consigo pequenas quantidades de canábis que apresentou à Sociedade Farmacêutica Real como um medicamento inovador. Tal gesto fez com que esta planta passasse a ser estudada e utilizada em diversos países a nível mundial, tendo o seu uso sido difundido para o tratamento de determinadas doenças (Neto et al., 2023).

Jacques-Joseph Moreau (1804–1884) foi o principal responsável pela introdução de canábis herbáceo, sob forma de inflorescências e resina (haxixe), para o consumo social e recreativo na sociedade ocidental moderna (Leghissa et al., 2018; Pisanti & Bifulco, 2019). Por volta de 1840, Moreau, psiquiatra francês, ao viajar em trabalho por vários países árabes, observou que o consumo de haxixe era bastante comum e, interessado nos possíveis efeitos que poderiam ser provocados pelo seu consumo, decidiu experimentar. O psiquiatra notou, então, uma relação entre a quantidade de droga e os efeitos sentidos, sendo que uma pequena dose provocava sensações de euforia, calma e

apatia e, conforme a dose era aumentada, Moreau sentia que a sua atenção começava a dispersar e o sentido de tempo era distorcido. Com doses ainda mais altas de canábis, Moreau apresentava um fluxo de ideais extremamente rápido e tinha a percepção que os “sonhos inundavam o cérebro”, como se tratasse de uma alucinação (Abel, 1980, p. 97; Mechoulam, 2012; Zuardi, 2006). Em 1845 publicou o livro “*Du Hachisch et de l'Aliénation Mentale: Études Psychologiques*” (Haxixe e Problemas Mentais: Estudos Psicológicos), no qual descreveu que “um dos efeitos do haxixe que mais me impressionou e que geralmente recebe mais atenção é a excitação maníaca, sempre acompanhada de um sentimento de alegria inconcebível para aqueles que nunca a experimentaram” (Russo & Franjo, 2006, p. 14).

Após uma tendência de crescimento na utilização da canábis deu-se, durante o século passado, um decréscimo no seu consumo, devido tanto à introdução de novos fármacos que apresentavam margens de segurança mais definidas, como a aspirina pela empresa alemã Bayer, bem como a ações políticas de controlo da sua utilização, tendo como exemplos a *Marihuana Tax Act* de 1937 e a Convenção Única de 1961 sobre os Estupefacientes (Bonini et al., 2018; Crocq, 2020; Pisanti & Bifulco, 2019). A lei “*Marihuana Tax Act*”, promulgada, em 1937, pelo presidente americano Franklin Roosevelt (1882 – 1945), pretendia regular a importação, o cultivo, a distribuição e a comercialização de canábis no país. Estava então estabelecido que os fabricantes, traficantes e detentores deveriam declarar a posse do estupefaciente e proceder ao pagamento de um imposto que era comprovado através de um selo que se colocava nas embalagens. Para quem contornasse a lei estava prevista uma pena de prisão até cinco anos e/ou uma coima de 2000 dólares (Abel, 1980; Escohotado, 1998). A Convenção Única de 1961 sobre os Estupefacientes foi um tratado no qual os países, na altura membros das Nações Unidas (onde Portugal se incluía), visaram o combate ao abuso de substâncias psicotrópicas através de ações internacionais coordenadas, mediante a restrição da produção, distribuição, posse e uso da canábis, bem como da detenção de traficantes (Kaminski et al., 2024; UNODC, 2013). Tal foi considerado por se acreditar que estes compostos seriam um problema de saúde e de segurança público, devido ao risco elevado de potencial abuso e às suas baixas margens de segurança (Aguillón et al., 2021). Neste documento, a canábis foi colocada sob o regime de controlo e fiscalização mais rigoroso, juntamente com a heroína (Crocq, 2020).

Apesar do decréscimo do consumo de canábis em virtude das restrições em voga, na primeira metade da década de 1960, Raphael Mechoulam (1930-2023) descreveu a estrutura de alguns elementos químicos que compunham esta planta, mais tarde conhecidos pelos fitocanabinoides Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) e canabidiol. Esta descoberta levou a que a canábis voltasse a ser investigada cientificamente, tendo existido um aumento significativo de publicações científicas nos anos seguintes, bem como de medicamentos à base de fitocanabinoides (Neto et al., 2023).

Por volta da década de 1970 deu-se o surgimento de canabinoides sintéticos, quando investigadores de laboratórios farmacêuticos e académicos tentaram desenvolver novos medicamentos para o tratamento da dor oncológica (Alves et al., 2020).

1.2. Caracterização Botânica da Planta da Canábis

A canábis constitui-se como uma planta herbácea anual dióica (isto é, os gâmetas femininos e masculinos são encontrados em plantas separadas), não obstante a possibilidade, embora rara, de ser uma planta de natureza monóica (ou seja, a mesma planta é constituída por gâmetas dos dois sexos) (Micalizzi et al., 2021; UNODC, 2022). É sabido que esta planta pertence à família botânica Cannabaceae, no entanto, a classificação taxonómica sobre se o género *Cannabis* é caracterizado por apenas uma, ou mais espécies constitui-se, até aos dias de hoje, como um debate controverso e ainda em curso.

Carolus Linnaeus (1707-1778), botânico e zoólogo sueco publicou, em 1753, “*Species Plantarum*”, um livro que, segundo alguns autores, é assumido como um ponto de partida da nomenclatura botânica geral e, em particular, pelo início da taxonomia da canábis. Neste livro, Linnaeus propôs um sistema organizado de nomenclatura binominal botânica, até então nunca visto, mudando o paradigma taxonómico da altura. Com base na descrição das suas flores e sementes, Linnaeus considerou a existência de apenas uma espécie de canábis, a partir de então designada por *Cannabis sativa* L. (*C. sativa* L.). Anos mais tarde, em 1785, Jean Baptiste Pierre Antoine de Monet (1744-1829), conhecido por Lamarck, famoso naturalista francês e pioneiro no estudo sobre o evolucionismo, propôs a existência de outra espécie para além daquela considerada por Linnaeus, a *Cannabis indica* (*C. indica* Lam.). Já na segunda década do século XX, Dmitrij Erastovich Janischewsky (1875-1944), botânico russo, considerou a existência de uma terceira espécie pertencente ao género *Cannabis*, nomeadamente a *Cannabis ruderalis* (*C.*

ruderalis Jan.). Todas as classificações foram atribuídas tendo em conta as diferenças nas características físicas (como por exemplo a altura da planta), químicas (como o teor de fitocanabinoides) e geográficas das plantas analisadas (Lapierre et al., 2023; McPartland, 2018; Pollio, 2016).

As últimas evidências na literatura, incluindo resultados provenientes de ensaios de sequenciamento genómico e outras técnicas moleculares, sugerem que o género *Cannabis* consiste numa “espécie monotípica altamente diversificada”, considerando-se, então, que a canábis possui apenas uma espécie, designadamente, *Cannabis sativa* L. (*C. sativa* L.), que inclui três subespécies, *C. sativa subsp. sativa*, *C. sativa subsp. indica* e *C. sativa subsp. ruderalis* (Lapierre et al., 2023, p. 209; UNODC, 2022; Zhang et al., 2018).

A *Cannabis sativa* L. encontra-se espalhada por todo o mundo (figura 2). Geralmente, esta planta cresce espontaneamente nas regiões da Índia e da Ásia Central, enquanto que noutras zonas, incluído as regiões equatoriais, requer ser cultivada (Filipiuc et al., 2021).

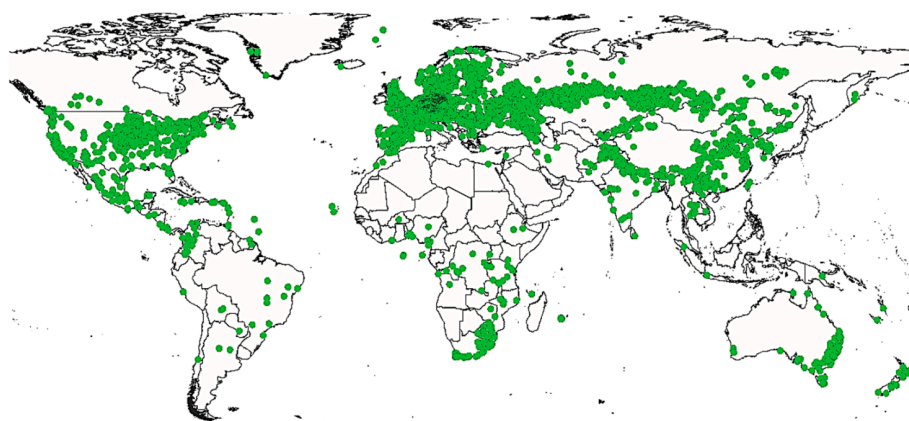


Figura 2. Distribuição geográfica das plantas *Cannabis sativa* L.. Retirado de Hourfane (2023).

Em termos morfológicos, a altura das plantas da espécie *C. sativa* L. pode variar entre 1 e 3 m, podendo mesmo chegar até aos 6 m, dependendo de fatores ambientais e hereditários, bem como do seu método de cultivo. As plantas masculinas são constituídas por estames e são, normalmente, mais altas, mas menos robustas que as plantas femininas, que são pistiladas (Farak & Kayser, 2017; UNODC, 2022). As suas flores, que contêm a maior percentagem de compostos biologicamente ativos, florescem entre o final do verão e meados de outono (Leghissa et al., 2018). Os pelos glandulares são responsáveis pelo odor característico apresentado por estas plantas (Hourfane et al., 2023).

As três subespécies podem ser diferenciadas morfologicamente, sendo que a subespécie *sativa* é caracterizada por ser mais alta, ramificada e possuir um caule fibroso, enquanto que a subespécie *indica* tem, geralmente, dimensões mais reduzidas, folhas mais largas e caules lenhosos. A subespécie *ruderalis* é, igualmente, mais pequena (figura 3) (McPartland, 2018).

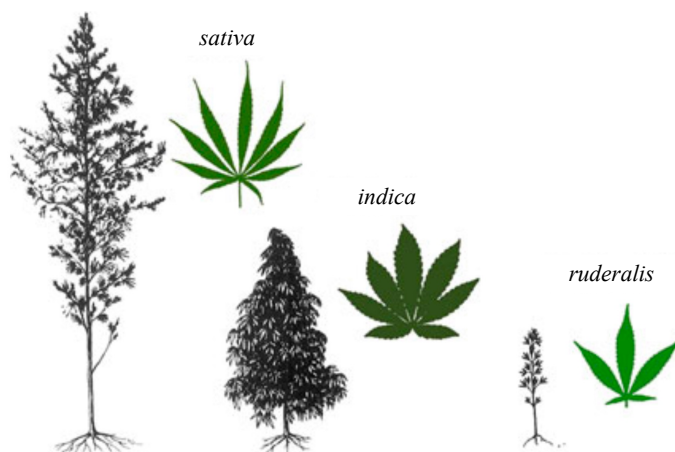


Figura 3. Subespécies da *Cannabis sativa* L.: *sativa*, *indica* e *ruderalis*. Retirado de McPartland (2018).

A proporção dos diferentes canabinoides é largamente influenciada pela subespécie da planta, bem como das condições ambientais e de cultivo (Hädener et al., 2019). Originalmente, Lamarck descreveu que a *C. sativa subsp. indica* tinha um odor forte característico e, quando consumida, apresentava efeitos psicoativos, nomeadamente euforia (McPartland, 2018; Rubin, 1975). Mais tarde, verificou-se que esta subespécie possuía um teor de THC superior ao de CBD, ao contrário da *C. sativa subsp. sativa* (na qual o teor de CBD é superior ao de THC) e da *C. sativa subsp. ruderalis* (onde o teor de canabinoides é mais reduzido) (Kumar et al., 2021; Micalizzi et al., 2021). No entanto, à semelhança da divergência na classificação taxonómica, a identificação das subespécies da canábis em função do teor de canabinoides em si presentes não é consensual, uma vez que existe uma grande hibridação entre as três subespécies, não sendo possível uma distinção inequívoca entre as três.

1.3. Classificação de Canabinoides

A planta da canábis é quimicamente complexa, na medida em que nos seus tricomas glandulares, nomeadamente das flores femininas, são produzidos um grande número de compostos bioativos, tendo sido identificadas mais de 550 moléculas. Estes compostos, que consoante as suas proporções modulam a potência do efeito psicoativo, incluem terpenos e compostos fenólicos, para além de canabinoides (na sua larga maioria) (Andre et al., 2016; Filipiuc et al., 2021; Hourfane et al., 2023; Schurman et al., 2020). Os terpenos são compostos responsáveis pelo aroma característico da planta da canábis e que, para além do seu potencial inseticida, provocam efeitos medicinais específicos, podendo auxiliar no tratamento de transtornos de ansiedade social ou no tratamento de distúrbios do sono (Aizpurua-Olaizola et al., 2016; Sommano et al., 2020).

Os canabinoides constituem-se como uma classe de compostos químicos que atuam sobre recetores específicos do cérebro (recetores canabinoides do tipo CB₁ ou CB₂), modulando a libertação de neurotransmissores. Os recetores do tipo CB₁ foram descobertos em 1990, enquanto os do tipo CB₂ foram descobertos três anos mais tarde, em 1993 (Pertwee, 2006). A expressão cerebral dos recetores do tipo CB₁ é realizada em todas as regiões que se relacionam com o desempenho de funções cognitivas e de controlo motor e do humor, nomeadamente o hipocampo, amígdalas, gânglios basais e cerebelo. Este tipo de recetores encontra-se relacionado com a modulação dos efeitos psicoativos sentidos. Por outro lado, os recetores do tipo CB₂, que se encontram, geralmente, nos tecidos periféricos e no sistema imunitário, demonstraram terem potencial como alvo terapêutico, devido à sua capacidade de modular a atividade das células imunitárias e reduzir a dor. A expressão destes recetores é muito inferior à dos recetores do tipo CB₁, à exceção de quando existe inflamação, momento em que os níveis deste segundo recetor aumentam drasticamente (Bie et al., 2018; Bonini et al., 2018; Messina et al., 2015; Turcotte et al., 2016).

Quando um canabinoide atua sobre determinado recetor canabinoide existe a ativação de uma proteína G_i acoplada, o que diminui a concentração intracelular de adenosina monofosfato cíclico nas células e leva à redução da libertação de neurotransmissores (Durydivka et al., 2024; Hampson & Grimaldi, 2001; Saito et al., 2010). Nos neurónios GABAérgicos, a ativação do recetor CB₁ diminui os níveis de ácido gama-aminobutírico libertados, enquanto nos neurónios glutamatérgicos reduz os níveis de glutamato libertados (Albayram et al., 2011; Hoffman et al., 2010).

Os canabinoides podem classificar-se em três categorias, de acordo com a sua proveniência, designadamente fitocanabinoides (ou canabinoides naturais), endocanabinoides e canabinoides sintéticos (Gülck & Møller, 2020; WHO, 2016; Wiley et al., 2018).

1.3.1. Fitocanabinoides

Os fitocanabinoides, que representam aproximadamente 24 % do total dos produtos naturais da planta, são um grupo de compostos terpenofólicos que são biossintetizados na sua forma ácida, sendo depois transformados nos seus homólogos neutros por descarboxilação na presença de luz ou calor (Turner et al., 2017). Os principais fitocanabinoides presentes na planta da canábida, e os mais citados na literatura, designadamente os ácidos do tetrahydrocannabinol e do cannabidiol, THCA e CBDA, respetivamente, são sintetizados a partir ácido cannabigerólico. Outros canabinoides que também podem ser encontrados na *Cannabis sativa* L. são o cannabinol (CBN) e o Δ^8 -tetrahydrocannabinol (Δ^8 -THC), isómero do Δ^9 -THC, que difere na posição da dupla ligação do anel alicíclico, e que pode ser encontrado em baixas quantidades na planta (Aizpurua-Olaizola et al., 2016; Andre et al., 2016; Brighenti et al., 2021; Turner et al., 2017).

1.3.1.1. Tetrahydrocannabinol

O THC é o principal fitocanabinoide controlado pela Convenção Única de 1961 sobre os Estupefacientes das Nações Unidas, por ser responsável pela atividade psicoativa, pelos estados de euforia e relaxamento produzidos, pelo aprimoramento dos sentidos e pelo comprometimento da memória. Estas variações antagónicas nos efeitos sentidos devem-se, possivelmente, à atividade bifásica do THC, que, em doses baixas, pode provocar efeitos opostos àqueles produzidos quando existe um consumo em doses mais elevadas (Gülck & Møller, 2020; Mechoulam & Parker, 2013).

Geralmente, quando se fala em THC, o composto referido é o Δ^9 -THC, devido ao facto de ser mais abundante na planta. No entanto, esta planta sintetiza outras formas do THC, que diferem na estrutura química e, consequentemente, na forma como interagem com o organismo, como é o caso do Δ^8 -THC, que é produzido em teores inferiores na canábida. Assim, o tetrahydrocannabinol engloba, maioritariamente, dois compostos: Δ^9 -THC e Δ^8 -THC (Filipiuc et al., 2021). A principal diferença entre o Δ^8 -THC e o Δ^9 -

THC reside no facto de o primeiro apresentar uma ligação dupla entre os átomos de carbono 8 e 9, em vez de ser nos átomos de carbono 9 e 10, como é possível observar na figura 4. Devido a esta alteração estrutural, o Δ^8 -THC acaba por ter uma menor afinidade para o recetor CB₁ e, conseqüentemente, proporciona efeitos psicoativos menores comparativamente ao Δ^9 -THC (Gülck & Möller, 2020; Kruger & Kruger, 2022).

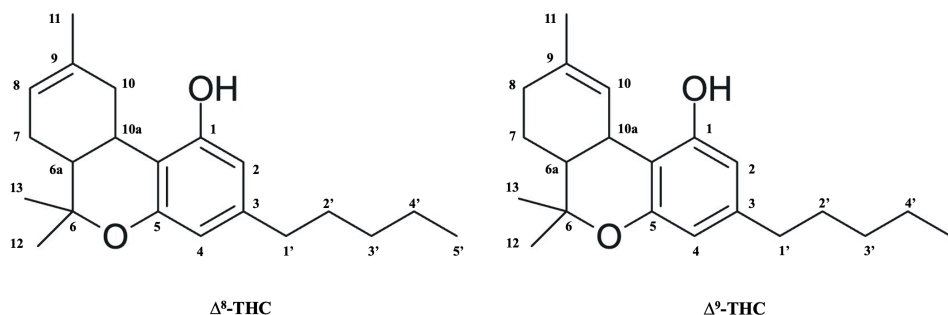


Figura 4. Estruturas químicas do Δ^8 -THC e do Δ^9 -THC, respetivamente.

Quimicamente, o Δ^8 -THC é mais estável que o Δ^9 -THC e pode comportar-se como um antagonista do recetor do tipo CB₁ e agonista parcial do CB₂ (Filipiuc et al., 2021; Leghissa et al., 2018). Do ponto de vista farmacológico, o Δ^9 -THC é um agonista parcial de ambos os recetores canabinoides, mas apresenta uma maior afinidade para o recetor CB₁ (Andre et al., 2016; Bonini et al., 2018; Pertwee, 2008).

1.3.1.2. Canabidiol

Ao contrário do THC, o CBD é um composto não psicoativo que apresenta uma série de propriedades de interesse medicinal e terapêutico. Nos seres humanos, este fitocanabinoide atua como modulador negativo alostérico do recetor canabinoide CB₁ e, apesar dos mecanismos de ação da ligação entre o CBD e o recetor CB₂ se encontrarem, ainda, por esclarecer, pensa-se que atue como agonista parcial (Lucas et al., 2018; Shahbazi et al., 2020; Turner et al., 2017).

A nível medicinal, o CBD apresenta numerosos benefícios, constituindo-se como um potente agente relaxante, anti-inflamatório, analgésico, antiepilético e antipsicótico (na medida em que é capaz de modular a ação do Δ^9 -THC no cérebro, diminuindo os seus efeitos psicoativos) (Leghissa et al., 2018; Mechoulam & Parker, 2013; Messina et al., 2015). O CBD é considerado como um canabinoide promissor, visto que mostrou potencial como agente terapêutico em modelos pré-clínicos para o tratamento de doenças oncológicas (uma vez que induz a apoptose das células cancerígenas, inibindo a sua proliferação) e do sistema nervoso central, como epilepsia, doenças neurodegenerativas,

esquizofrenia, esclerose múltipla e doenças do foro alimentar, entre outras (Aizpurua-Olaizola et al., 2016; Andre et al., 2016; Hourfane et al., 2023).

Em Portugal, o CBD é uma substância legal, sendo possível encontrar diversos produtos contendo este fitocanabinoide em lojas destinadas à sua venda.

1.3.2. Endocanabinoides

Os endocanabinoides são ligandos endógenos (ou seja, produzidos pelo corpo humano) agonistas dos recetores canabinoides, como por exemplo a anandamida e o 2-araquidonilglicerol, que ativam os recetores canabinoides no normal funcionamento fisiológico do corpo humano. Os fitocanabinoides, por apresentarem uma estrutura semelhante à dos endocanabinoides, interagem e ativam os recetores canabinoides tipo 1 ou tipo 2 com uma maior afinidade comparativamente aos ligandos endógenos (Alves et al., 2020; Lambert & Fowler, 2005).

1.3.3. Canabinoides Sintéticos e Semissintéticos

Como supramencionado, em 1960, Mechoulam identificou a estrutura do Δ^9 -THC e do CBD, tendo-se dedicado, nos anos seguintes, à modificação da estrutura do THC para compreender os mecanismos subjacentes às suas ações. Adicionalmente, algumas empresas farmacêuticas também desenvolveram canabinoides sintéticos como potenciais medicamentos, como a Nabilona utilizada no tratamento de pacientes com cancro para o controlo de náuseas e vômitos (Schurman et al., 2020).

De modo a contornar as leis relativas às drogas surgiram, no início do século XXI, os canabinoides sintéticos, que se estabelecem como substâncias resultantes de ligeiras modificações às estruturas moleculares de canabinoides controlados pela legislação, em particular o Δ^9 -THC, realizadas, usualmente, em laboratórios clandestinos e que, sendo estruturalmente análogos, atuam por mecanismos biológicos semelhantes (Gunderson, 2013; Haspolat et al., 2023). Estes compostos, legais à data, são, posteriormente, adicionados, misturados, pulverizados ou imersos, nos produtos de cânabis (Alves et al., 2020). Ao ligarem-se aos recetores canabinoides do tipo CB₁ e CB₂, este grupo de compostos acaba por mimetizar os efeitos do Δ^9 -THC, tornando-se como uma alternativa legal a este fitocanabinoide (EMCDDA, 2017). Por, geralmente, serem mais potentes e imprevisíveis do que os fitocanabinoides, a sua utilização está frequentemente associada a diversos efeitos adversos (Correia et al., 2022).

Em 2008, na Alemanha e na Áustria, foram identificados os primeiros canabinoides sintéticos, sendo que de acordo com o relatório do Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência desse mesmo ano, a substância JWH-018 (figura 5) foi a primeira a ser classificada como um canabinoide não clássico, definindo-se uma nova categoria de compostos psicoativos denominada por “Novas Substâncias Psicoativas”. Desde então, o grupo dos canabinoides sintéticos é a classe de novas substâncias psicoativas mais representativa e é o maior grupo de compostos atualmente monitorizados a nível europeu pelo Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência, através do mecanismo de alerta rápido sobre novas substâncias psicoativas da União Europeia (EMCDDA, 2017; Ernst et al., 2012; Graziano et al., 2023).

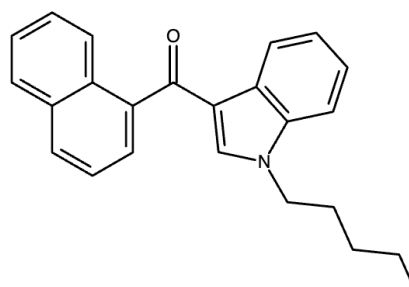


Figura 5. Estrutura química do JWH-018.

Os canabinoides semissintéticos apareceram muito recentemente no mercado europeu e envolvem, igualmente, a modificação química de moléculas de fitocanabinoides visando a produção de novas moléculas capazes de se ligarem, com elevada afinidade, aos recetores canabinoides do tipo CB₁ e CB₂ produzindo efeitos psicoativos (Santos et al., 2024; Shi et al., 2022). O canabidiol é utilizado como molécula precursora dos canabinoides semissintéticos, isto é, os produtos são produzidos a partir de CBD o qual, por sua vez, é extraído de plantas de cânabis com baixo teor de Δ^9 -THC (cânhamo), que não são controladas ao abrigo das convenções internacionais sobre drogas (EMCDDA, 2023b, 2023a, 2024a; Shi et al., 2022).

Exemplos de substâncias contidas neste grupo incluem o agora em voga hexahidrocanabinol (HHC), mas também o hexahidrocanabiforol e o tetrahydrocanabiforol.

Apesar dos esforços legislativos contra o problema global dos canabinoides sintéticos e semissintéticos, continuam a surgir novas moléculas no mercado, indicando, aparentemente, que os fabricantes destes produtos permanecem um passo à frente da legislação (Alves et al., 2020).

1.3.3.1. Hexahidrocanabinol

O HHC ou 6,6,9-trimetil-3-pentil-6a,7,8,9,10,10a-hexahydrobenzo[c]chromen-1-ol (nomenclatura IUPAC), foi descrito e sintetizado, por hidrogenação catalítica, pela primeira vez por Adams, em 1940, na tentativa de elucidar a estrutura química dos constituintes psicoativos da canábis (Adams, 1940). É um composto estruturalmente análogo ao Δ^9 -THC, excetuando na falta da ligação dupla no anel ciclo-hexano, constituindo-se como um derivado hidrogenado deste fitocanabinoide (Collins et al., 2023; Graziano et al., 2023).

Trata-se de um canabinoide existente na planta *Cannabis sativa* L., nomeadamente no seu pólen e nas suas sementes, porém em quantidades ínfimas, não sendo, deste modo, viável a sua extração (Höfert et al., 2023). Consequentemente, o HHC começou a ser sintetizado em larga escala a partir do CBD (Collins et al., 2023).

Em maio de 2022, na Dinamarca, foi pela primeira vez detetado num produto comercializado para insónias e foi notificado pelo mecanismo de alerta rápido do Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência. A partir daí, a sua divulgação e consumo rapidamente se tornaram um tema de preocupação, na medida em que entre maio e dezembro desse mesmo ano foi identificado em mais de 70 % dos Estados-Membro da União Europeia (EMCDDA, 2023b; Pitterl et al., 2024). Atualmente, o HHC constitui-se como um canabinoide que tem ganho bastante popularidade na comunidade por ser uma alternativa legal ao Δ^9 -THC.

O HHC é um composto apolar que apresenta dois diastereoisómeros, designadamente (6a-9S,10aR)-6,6,9-trimetil-3-pentil-6a,7,8,9,10,10a-hexahydrobenzo[c]chromen-1-ol (9S-HHC ou, também designado por 9 α -HHC) e (6a-9R,10aR)-6,6,9-trimetil-3-pentil-6a,7,8,9,10,10a-hexahydrobenzo[c]chromen-1-ol (9R-HHC ou 9 β -HHC) (Persson et al., 2024; Ujváry, 2023). A diferença entre os diastereoisómeros encontra-se na orientação do grupo metil do carbono 9, dado que no diastereoisómero 9R, este apresenta um grupo metil equatorial, ao contrário do diastereoisómero 9S, que exibe um grupo metil axial, como é possível observar na figura 6 (Durydivka et al., 2024; Nasrallah & Garg, 2023).

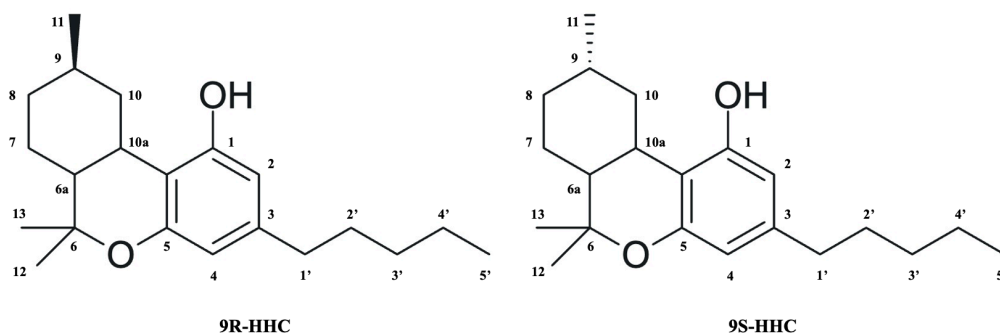


Figura 6. Estruturas químicas dos isómeros 9R-HHC e 9S-HHC, respetivamente.

Existem duas metodologias para a síntese química deste canabinoide: síntese total de HHC a partir de pequenas moléculas ou a abordagem semissintética. Nesta última, o CBD é utilizado como precursor, sofrendo uma ciclização ácida e originando Δ^8 -THC e Δ^9 -THC e uma ampla gama de produtos que, posteriormente, são hidrogenados, obtendo-se HHC. Esta metodologia está a ser utilizada em larga escala pela indústria devido à sua relativamente simples preparação e à disponibilidade de CBD. No entanto, a abordagem semissintética leva a misturas dos diastereoisómeros 9R e 9S nos produtos, numa proporção que está dependente das condições de síntese. Para além disso, esta via semissintética também pode originar vestígios de metais pesados resultantes da hidrogenação, os quais podem ser bastante perigosos para a saúde dos consumidores (Durydivka et al., 2024; Janssens et al., 2024; Pitterl et al., 2024; Ujváry, 2023).

Farmacologicamente, estudos em animais sugerem que o HHC é menos potente do que o Δ^9 -THC. Adicionalmente, a afinidade *in vitro* dos dois diastereoisómeros do HHC para com os recetores canabinoides CB₁ e CB₂ é igualmente diferente entre os dois, provocando, consequentemente, efeitos dispare. Apesar da única diferença entre o 9R e o 9S-HHC ser a quiralidade de um átomo de carbono, essa diferença é suficiente para que o diastereoisómero 9R seja cerca de dez vezes mais potente e três vezes mais eficaz que o diastereoisómero 9S, uma vez que o primeiro apresenta uma afinidade superior para com o recetor CB₁ (Durydivka et al., 2024; Graziano et al., 2023; Haghdooost et al., 2024; Höfert et al., 2023; Janssens et al., 2024).

Apesar das informações disponíveis na literatura sobre o HHC serem escassas, é sugerido que os efeitos provocados podem depender da configuração tridimensional do 9R-HHC que é estruturalmente mais semelhante ao Δ^9 -THC, como é possível observar na figura 7. Devido à sua estrutura química, é expectável que o HHC sofra reações de

biotransformação semelhantes à de outros canabinoides, como o THC ou o CBD (Graziano et al., 2023; O'Mahony et al., 2024; Pitterl et al., 2024).

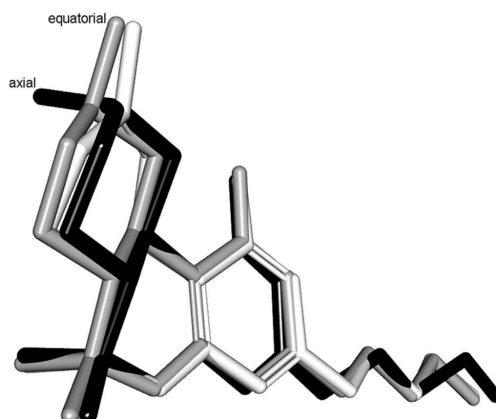


Figura 7. Sobreposição das estruturas moleculares tridimensionais do 9R-HHC (a cinzento), 9S-HHC (a preto) e Δ^9 -THC (a branco). Adaptado de Ujváry (2023).

O enquadramento legal do HHC não é unânime globalmente, permanecendo numa “zona cinzenta”, na medida em que existem países onde o mesmo é considerado ilegal, sendo considerado legal por muitos outros. No entanto, tem existido uma rápida tendência para a sua ilegalização. Aos dias de hoje, o HHC constitui-se como uma substância regulamentada em pelo menos 18 Estados-Membros da União Europeia, tais como a Áustria, Suíça, França, Itália ou Eslovénia (Bottinelli et al., 2024; EMCDDA, 2024b; Pitterl et al., 2024; Schirmer et al., 2023). Por outro lado, produtos que contenham HHC podem ser facilmente encontrados em lojas físicas e *on-line* em Portugal. Estes produtos podem apresentar-se sobre diversas formas, nomeadamente, flores e resinas de cânabis com baixo teor de Δ^9 -THC, cigarros eletrónicos, óleos e artigos comestíveis, como gomas, bolachas ou pastilhas elásticas (EMCDDA, 2023b; Lindbom et al., 2024; Persson et al., 2024).

Consumidores de HHC reportam efeitos semelhantes aqueles provocados pelo Δ^9 -THC, como relaxamento e euforia, bem como episódios psicóticos, sendo que a intensidade dos efeitos pode variar de indivíduo para indivíduo (Caprari et al., 2024; O'Mahony et al., 2024; Reiter et al., 2024).

1.4. Prevalência de Consumo de Canábis

Atualmente, a canábis constitui-se como a substância ilícita com maior prevalência de consumo a nível global, sendo que, nos últimos anos, a sua utilização tem vindo a aumentar, tendo-se estimado mais de 228 milhões de consumidores em todo o mundo no ano de 2022 (UNODC, 2024). O Relatório Europeu sobre as Drogas de 2024 do Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência estima que cerca de 8 % dos adultos europeus (22,8 milhões com idades compreendidas entre os 15 e 64 anos) consumiram canábis no último ano, sendo tipicamente mais prevalente o consumo em homens do que em mulheres (EMCDDA, 2024a). Já em Portugal, Balsa e colaboradores (2023) estimaram, através do “V Inquérito Nacional ao Consumo de Substâncias Psicoativas na População Geral”, que aproximadamente 2,8 % da população residente entre os 15 e 64 anos consome, numa base diária, esta substância de abuso (Balsa et al., 2023).

Este consumo está intrinsecamente associado com o tráfico de estupefacientes que, segundo o Relatório de Segurança Interna de 2023, acontece tanto por via terrestre como por via marítima, sendo Portugal um dos pontos de destino final (Sistema de Segurança Interna, 2023). Em 2023 foram apreendidas mais de 37 toneladas de canábis, sendo este o valor mais elevado dos últimos anos e representando um aumento de 62,3 % face ao ano anterior (Polícia Judiciária, 2023).

1.5. Perigos Inerentes ao Consumo de Canabinoides Naturais e Semissintéticos

Ao consumo de canábis são inerentes diversos efeitos adversos. Se, por um lado, raramente o seu consumo é diretamente associado a mortalidade, por outro, vários autores defendem que a canábis se constitui como uma “*gateway drug*”, tratando-se de uma droga que abre portas ao consumo de outras substâncias ilícitas mais perigosas, como opioides (UNODC, 2024; Williams, 2020).

O consumo de canábis pode causar ou exacerbar uma variedade de problemas de saúde, tanto a nível psicológico, originando dependência e perturbações cognitivo-comportamentais (onde se incluem psicoses), como a nível físico, tendo sido reportadas doenças cardiovasculares e pulmonares. Adicionalmente, estudos revelaram que um consumo regular desta planta pode estar associado a piores resultados escolares e a um risco acrescido de práticas criminais (Dhein, 2020; EMCDDA, 2024a).

No que diz respeito aos canabinoides semissintéticos, não existe um controlo de qualidade efetivo. Alguns dos problemas inerentes a estas substâncias relacionam-se com o facto de serem compostos tão recentes, não existindo uma descrição detalhada na literatura sobre os mesmos, nem a sua devida caracterização e rotulagem, não garantindo aos indivíduos que, de facto, estão a consumir o que é apresentado na embalagem e, consequentemente, pondo em risco a sua saúde. Adicionalmente, como referido anteriormente, a síntese destes canabinoides poder levar à existência de vestígios de metais pesados originados na etapa de hidrogenação, bem como de outros subprodutos, que se podem revelar perigosos para os consumidores. Por serem, geralmente, mais potentes do que os fitocanabinoides, a utilização dos canabinoides semissintéticos é frequentemente associada a experiências desagradáveis e a efeitos nocivos, tendo sido reportadas tonturas, alucinações, convulsões, ansiedade, irritabilidade, vômitos e dores no peito, podendo existir uma agravação de sintomas, constituindo-se como uma ameaça séria à saúde pública (Caprari et al., 2024; Correia et al., 2022; Docampo-Palacios et al., 2024; Santos et al., 2024; Ujváry, 2023).

1.6. Legislação em Portugal

Na Convenção Única de 1961 sobre os Estupefacientes organizada pelas Nações Unidas, ficou definido no artigo 1º alínea b) que o termo “canábis” representa a extremidade dos ramos floridos ou frutificados da planta de cânhamo (com a exclusão das sementes e das folhas que não sejam acompanhadas de sumidades), cuja seiva não tenha sido extraída, qualquer que seja a sua aplicação. (United Nations, 1961; UNODC, 2013, p. 24). Nas alíneas seguintes, c) e d), respetivamente, é ainda estabelecido que o termo “planta canábis” se refere a qualquer planta do género *Cannabis*, abrangendo todas as subespécies, e que a expressão “resina de canábis” reporta a resina que é obtida desta planta, em bruto ou purificada.

Baseando-se sobretudo no que ficou definido na Convenção Única de 1961 sobre os Estupefacientes, diferentes países têm diferentes visões legais sobre a canábis. Adicionalmente, existem diferentes quadros legislativos consoante o propósito do uso da canábis, nomeadamente, se se destina a um consumo recreativo, medicinal ou industrial.

Após a revolução de 25 de abril de 1974, que pôs fim a um longo período de governação ditatorial, a prevalência de consumo de estupefacientes aumentou em Portugal (Cabral, 2017). A Legislação de Combate à Droga estatuída no Decreto-Lei n.º

15/93 de 22 de janeiro definiu o regime jurídico aplicável ao tráfico e ao consumo de estupefacientes. Neste mesmo decreto-lei é estabelecido que folhas, sumidades floridas ou frutificadas da planta *Cannabis sativa* L., bem como a resina e óleos obtidos a partir da mesma (em bruto ou purificados) e, ainda, isómeros das substâncias nele mencionados estão controlados. Adicionalmente o nº1 do artigo 21º prevê que quem, sem devida autorização, cultivar, extrair, transportar, vender ou comprar a outrem plantas, substâncias ou preparações compreendidas no decreto supramencionado é punido com pena de prisão de 4 a 12 anos (Procuradoria-Geral Distrital de Lisboa, 2023).

Anos mais tarde, em 2001, é implementada a descriminalização do uso, aquisição e posse de drogas ilícitas e preparações que constavam no Decreto-Lei n.º 15/93 de 22 de janeiro pela Lei n.º 30/2000 de 29 de novembro, comumente chamada de “Lei da Descriminalização” (Rêgo et al., 2021). É importante salientar que existe uma descriminalização, mas não despenalização, da posse e do uso de canábis em função da quantidade que o indivíduo detém, distinguindo consumo pessoal de tráfico de droga (EMCDDA, 2018; Warf, 2014). Assim, o consumo, aquisição e detenção para consumo próprio, desde que não excedam a quantidade necessária para o consumo médio de um indivíduo num intervalo de 10 dias, passaram a constituir “apenas” contraordenação. O facto de o indivíduo apresentar quantidades superiores para mais de 10 dias como o regulamentado pela Portaria n.º 94/96, de 26 de março (2,5 g para folhas e sumidades floridas ou frutificadas, 0,5 g de resina e 0,25 g de óleo diárias) pode constituir indício de que o propósito não é apenas o consumo próprio, consistindo, assim, numa prática criminal (Diário da República Eletrónico, 2000; Procuradoria-Geral Distrital de Lisboa, 1996).

Nos termos da lei portuguesa, o uso da canábis para fins medicinais é admissível, desde que dentro de requisitos necessários e de licenças obrigatórias. Entende-se por uso da canábis para fins medicinais a utilização de “medicamentos, preparações e substâncias à base da planta da canábis, quando prescritas por médico, mediante receita médica especial, com o objetivo de explorar as suas propriedades medicinais”, conforme estatuído na alínea a) do artigo 3º da Lei n.º 33/2018 de 18 de julho (Diário da República Eletrónico, 2018, p. 3241). É ainda referido que estes mesmos produtos se encontram sempre sujeitos a autorização emitida pelo INFARMED - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I. P..

Relativamente ao uso de cânabis para fins industriais, embora não exista um limite máximo para o teor de CBD ou CBDA nas preparações à venda na maioria dos países europeus, existe sim um limite máximo para o teor de Δ^9 -THC ou THC, que varia entre 0,1 e 1 %. Na maioria dos países europeus o teor de Δ^9 -THC constitui-se como uma ferramenta para classificar a planta da cânabis como cânhamo ($\leq 0,2$ % de THC) ou marijuana ($> 0,2$ %) (Micalizzi et al., 2021; Zivovinic et al., 2018). Em Portugal, o Decreto Regulamentar n.º 2/2020, de 4 de agosto e a Portaria n.º 83/2021, de 15 de abril, preveem que o cultivo de cânhamo, independentemente do destino final da respetiva produção, deve estar sujeito a autorização, sendo que apenas podem ser cultivadas variedades que contenham um teor de THC inferior a 0,2 % (Diário da República Eletrónico, 2020, 2021). Deste modo, nas lojas especializadas na distribuição de produtos de cânabis, é permitida a sua venda, desde que o teor de THC não exceda a percentagem referida.

Em 2013, o Decreto-Lei n.º 54/2013 de 17 de Abril veio proibir a produção, importação, exportação, publicitação, distribuição, venda, detenção ou disponibilização de novas substâncias psicoativas, descritas na Portaria n.º 154/2013 de 17 de abril, exceto quando o consumo das mesmas for destinado a fins medicinais ou industriais (Diário da República Eletrónico, 2013; Procuradoria-Geral Distrital de Lisboa, 2013). Devido ao dinamismo deste mercado, é sabido que lista de substâncias apresentadas na portaria supramencionada deve ser atualizada regularmente.

1.7. Metodologias Analíticas para Monitorização de Canabinoides

A monitorização dos canabinoides naturais e semissintéticos emergentes constitui-se como um desafio rigoroso, mas crucial e imperativo para fins forenses e toxicológicos (Graziano et al., 2023; Shi et al., 2022).

Geralmente, os métodos mais utilizados para determinar e quantificar estes compostos são as cromatografias líquida e gasosa acopladas à espetrometria de massa ((LC-MS (do inglês *Liquid Chromatography Mass Spectrometry*) e GC-MS (do inglês *Gas Chromatography Mass Spectrometry*)), respetivamente, ou em tandem (MS/MS). Normalmente, como descrito na literatura, recorre-se a uma etapa prévia de preparação de amostras (Gorziza et al., 2021; Lazarjani et al., 2020; Shi et al., 2022).

1.7.1. Técnicas de Preparação de Amostra

A etapa de preparação da amostra revela-se, geralmente, fundamental em diversos métodos cromatográficos, uma vez que a sua maioria não se encontra pronta para uma análise instrumental direta, como é o caso de amostras de cânabis herbal que necessitam, primeiramente, de uma extração visando a transferência dos analitos em estudo para uma fase mais compatível com os sistemas instrumentais. Tal é, ainda, de extrema importância quando são analisadas matrizes complexas (como matrizes biológicas), quando existem interferentes ou quando os compostos se encontram em baixas concentrações, sendo necessária a sua pré-concentração (Mitra & Brukh, 2003; Nogueira, 2015).

Normalmente, o método de preparação de amostras de cânabis mais empregue é a extração sólido-líquido (SLE, do inglês *Solid-Liquid Extraction*) que se baseia na afinidade dos analitos, neste caso em concreto dos canabinoides, para com um solvente específico. De modo a aumentar a recuperação e a diminuir o tempo de preparação de amostra, também se pode associar este tipo de extração à ultrassonicação. É, também, utilizada a extração em fase sólida (SPE, do inglês *Solid-Phase Extraction*) que é uma técnica de separação sólido-líquido que permite isolar ou concentrar analitos através da sua fixação num cartucho, seguida da sua recuperação através de uma eluição com um solvente apropriado. Já em matrizes biológicas recorre-se, geralmente, à extração líquido-líquido (LLE, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*) que se relaciona com as diferentes solubilidades entre líquidos imiscíveis (Gorziza et al., 2021; Micalizzi et al., 2021).

No entanto, esta etapa é considerada a mais poluente em todo o processo analítico (Prieto et al., 2010). Deste modo, tem existido uma tendência de evolução dos métodos de preparação de amostras para análise cromatográfica, sendo que, nos últimos anos, tem-se dado ênfase a técnicas de microextração visando a implementação de procedimentos laboratoriais que vão de acordo com a química analítica verde (GAC, do inglês *Green Analytical Chemistry*). Entende-se por química analítica verde a utilização de técnicas e metodologias que diminuam a quantidade e toxicidade dos solventes orgânicos empregues e que requeiram um baixo volume de amostra, bem como a redução, ou mesmo eliminação, da produção de resíduos perigosos para a saúde humana e/ou do meio ambiente. Adicionalmente, estas técnicas apresentam, geralmente, uma favorável relação custo-benefício e um manuseamento mais facilitado (Armenta et al., 2008; Mehta et al., 2024; Nogueira, 2015; Tobiszewski et al., 2009)

Deste modo, tem-se dado destaque a técnicas de microextração ambientalmente mais vantajosas, destacando-se a microextração em fase sólida (SPME, do inglês *Solid-Phase Microextraction*), a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME, do inglês *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*) e a microextração adsorptiva em barra (BA μ E, do inglês *Bar Adsorptive Microextraction*), por serem mais eficientes e necessitarem de uma menor quantidade de amostra e solventes orgânicos (Jain & Singh, 2016).

A SPME é uma técnica sensível, desenvolvida por Arthur e Pawliszyn na década de 1990, que envolve a utilização de uma fibra de sílica revestida por uma fase sorvente para concentrar e isolar o analito alvo. Posteriormente, este composto é retroextraído por dessorção térmica ou por meio de dessorção líquida (LD, do inglês *Liquid Desorption*). As principais vantagens que tornaram esta técnica popular relacionam-se com a redução do tempo de preparação, do consumo de solventes e, consequentemente, dos custos associados (Arthur & Pawliszyn, 1990; Gorziza et al., 2021; Jain & Singh, 2016). Por outro lado, a DLLME, introduzida por Rezaee e colaboradores em 2006, é uma forma miniaturizada da LLE que envolve a dispersão de gotículas finas de um solvente de extração imiscível em água numa amostra aquosa (Prosen, 2014).

A BA μ E foi desenvolvida por Neng e colaboradores, em 2010, como uma alternativa às técnicas de microextração até então existentes, visando a análise de compostos polares ou não polares em meio aquoso (Ahmad et al., 2014; Almeida & Nogueira, 2014).

Para tal, são utilizados dispositivos cilíndricos de polipropileno com, aproximadamente, 7,5 mm de comprimento e 3 mm de diâmetro, revestidos com uma fase sorvente adequada e que são colocados numa matriz aquosa que contém a amostra em estudo. Os materiais sorventes são fixados aos tubos cilíndricos por meio de adesivos, sendo que os mais utilizados englobam carvões ativados (ACs, do inglês *Activated Carbons*) e fases poliméricas. Ao existir um movimento rotacional da matriz aquosa que contém a amostra, dá-se a promoção da difusão dos solutos em direção à fase sorvente dos dispositivos que se encontram em flutuação, por serem menos densos que a matriz (figura 8) (Ide & Nogueira, 2018). A este procedimento estão inerentes duas etapas que requerem um processo de otimização, designadamente a microextração dos analitos para a fase sorvente e a sua respetiva retroextração para um solvente adequado (dessorção líquida) para posterior análise pelo sistema analítico desejado.

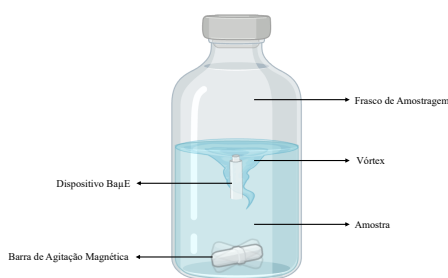


Figura 8. Representação esquemática do processo de microextração adsorptiva em barra. (Criado com BioRender.com).

Os analitos presentes nas amostras são adsorvidos através de nanoporos presentes nos revestimentos. Nos carvões ativados, estes poros exercem interações eletrostáticas e/ou dispersivas (propriedades de “adsorção-dessorção”), enquanto que nos materiais poliméricos, por serem, geralmente, de fase-reversa, existem ligações π - π , dipolo-dipolo, iónicas e pontes de hidrogénio que retêm os analitos. Os ACs diferem nas propriedades físico-químicas, como a porosidade, textura e no pH do ponto de carga zero (pH_{PZC}), dependendo do seu material, da sua preparação ou da sua ativação. Já nas fases poliméricas, habitualmente, o tamanho da partícula, a área superficial, a microporosidade e o pH são propriedades que podem exercer influência nas interações com os analitos em estudo (Ahmad et al., 2020; Nogueira, 2012).

Para além da BAμE se encontrar de acordo com os princípios da GAC por usar um baixo volume de solventes orgânicos e de amostra, esta abordagem analítica apresenta algumas vantagens, como o facto dos dispositivos poderem ser facilmente preparados em laboratório e de ser possível a seleção do revestimento sorvente mais adequado a cada

tipo de compostos alvo em estudo, aumentado a eficácia da análise vestigial. Consequentemente, constitui-se como uma técnica extremamente rentável em termos financeiros (Ahmad et al., 2017, 2020; Ide & Nogueira, 2018).

Atualmente, já se encontram descritos vários trabalhos nos quais a microextração adsorptiva em barra tem revelado eficiência e potencial, apresentando boas recuperações em diversas matrizes, nomeadamente em análises forenses, biomédicas, ambientais ou farmacêuticas (Almeida et al., 2024; De Souza et al., 2018; Jain et al., 2024).

1.7.2. Técnicas Cromatográficas

O termo “cromatografia” foi introduzido, pela primeira vez, em 1906, pelo botânico russo Mikhail Semenovich Tswett (1872-1919). Tswett aplicou a técnica com o objetivo de separar vários pigmentos vegetais, como clorofilas e xantofilas, através de uma coluna de vidro empacotada com carbonato de cálcio. O botânico russo percebeu que os pigmentos eram separados e apareciam como bandas coloridas na coluna, tendo dado o nome de “*chroma*” e “*graphein*” que, em grego, significa escrita da cor, a este fenómeno (Skoog et al., 2007).

A cromatografia constitui-se como uma técnica analítica versátil e bastante útil na separação, identificação e determinação de diversas substâncias em misturas complexas, baseando-se na afinidade e na distribuição de compostos entre duas fases diferentes. A mistura é transportada numa fase móvel (eluente), que pode ser gasosa, líquida ou um fluído supercrítico, e que percorre uma fase estacionária, não miscível com a anterior, sólida ou líquida, que se encontra fixa numa coluna cromatográfica ou numa superfície sólida. O facto de existirem diferenças na velocidade de arraste dos componentes da mistura pela fase móvel faz com que se dê a sua separação, sendo que estas diferenças se prendem, essencialmente, com as interações que os compostos, com características distintas entre si, estabelecem com a fase estacionária, promovendo equilíbrios distintos relativamente à distribuição dos mesmos entre as duas fases (Chaves das Neves & Costa Freitas, 1996; Skoog et al., 2007).

As concentrações de um analito na fase estacionária (C_S) e na fase móvel (C_M) relacionam-se através do coeficiente de distribuição (K), como representado na seguinte equação:

$$K = \frac{C_S}{C_M}$$

Assim, substâncias com maior poder de interação com a fase estacionária movem-se mais lentamente pela fase móvel e, em contraste, os componentes com menor poder de retenção face à fase estacionária percorrem-na mais rapidamente.

Relativamente aos intervalos de tempo que os analitos de uma mistura levam a percorrer a coluna cromatográfica, destacam-se três: tempo morto (t_M), o tempo de retenção total (t_R) e o tempo de retenção ajustado (t'_R) que se encontram representados na figura 9 (Hage, 2018). O primeiro corresponde ao intervalo de tempo no qual não existe qualquer interação entre os compostos e a fase estacionária, desde a injeção até ao detetor. O intervalo de tempo que um composto demora desde a sua injeção até ao ponto máximo da eluição registado pelo detetor designa-se por t_R . Por sua vez, o tempo de retenção ajustado é o intervalo de tempo que um composto despende na fase estacionária, sendo traduzido na diferença entre os valores de t_R e t_M .

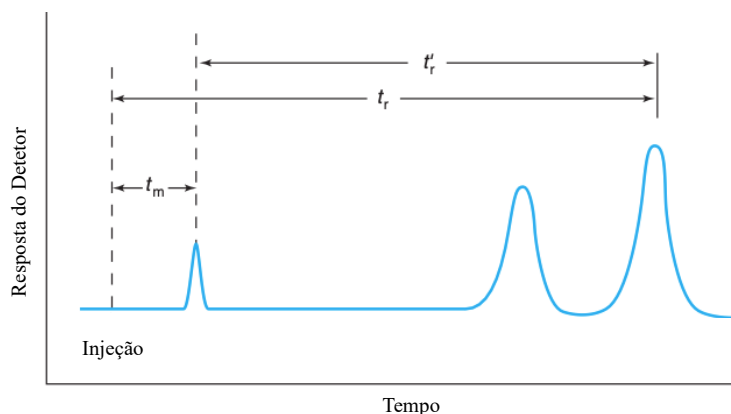


Figura 9. Representação do tempo morto (t_M), tempo de retenção total (t_R) e tempo de retenção ajustado (t'_R) num cromatograma. Adaptado de Harris (2010).

Uma medida do grau de retenção dos analitos é expressa pelo fator de capacidade (k') que, desde que a velocidade de fluxo se mantenha constante, pode ser calculado a partir da equação:

$$K' = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

A separação dos compostos de uma mistura numa coluna cromatográfica só será possível se os mesmos forem retidos pela fase estacionária de forma diferente. A capacidade que o sistema cromatográfico apresenta para a separação de dois compostos (A e B) próximos pode ser expressa pelo fator de separação ou de seletividade (α), o qual é influenciado pelas características da fase estacionária e pelas condições de operação e é traduzido pela equação seguinte:

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A}$$

na qual α representa o fator de separação ou de seletividade e k'_A e k'_B referem-se aos fatores de capacidade de retenção de dois picos cromatográficos adjacentes (Hage, 2018).

A eficiência apresentada por uma coluna cromatográfica relaciona-se com a capacidade do sistema cromatográfico em produzir picos cromatográficos bem definidos e é expressa pelo número de pratos teóricos (N), grandeza que exprime o número de equilíbrios que ocorrem durante a separação e que é calculada através da seguinte equação:

$$N = 16 \times \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$$

na qual t_R refere-se ao tempo de retenção de um determinado composto e W corresponde à largura da base de pico cromatográfico simétrico.

A cromatografia, como supramencionado, visa a separação dos componentes presentes numa dada mistura, sendo que a medida do grau de separação completa entre dois picos cromatográficos adjacentes se designa por resolução (R_s). Este parâmetro é influenciado pela seletividade, pelo fator de capacidade e pela eficiência, como é demonstrado na seguinte equação:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \times \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \times \left(\frac{k'_B}{(k'_B + 1)} \right)$$

1.7.2.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) tornou-se uma ferramenta analítica indispensável em diversas análises laboratoriais, nomeadamente naquelas realizadas em contexto forense, sendo altamente versátil e utilizada para separar e determinar compostos em misturas (Skoog et al., 2014). Neste tipo de cromatografia, as separações baseiam-se no transporte da mistura em análise por um solvente líquido (fase móvel) através de uma fase estacionária porosa sólida (Kazakevich & LoBrutto, 2007).

Um sistema básico de HPLC (figura 10) é constituído por uma bomba que propulsiona, a um fluxo de alta pressão, o eluente (fase móvel) proveniente de reservatórios adequados e inertes, um desgaseificador que permita desgaseificar a fase

móvel para eliminar os gases presentes, um sistema de injeção para a introdução da amostra no equipamento, uma coluna cromatográfica de separação apropriada e, por fim, um detetor localizado à saída da coluna e um computador que regista os dados. Adicionalmente, poderão ser utilizados acessórios, como coletores de frações, para a purificação de analitos de interesse de uma mistura. Através de um software é possível proceder à alteração das condições de análise, bem como visualizar os cromatogramas obtidos.

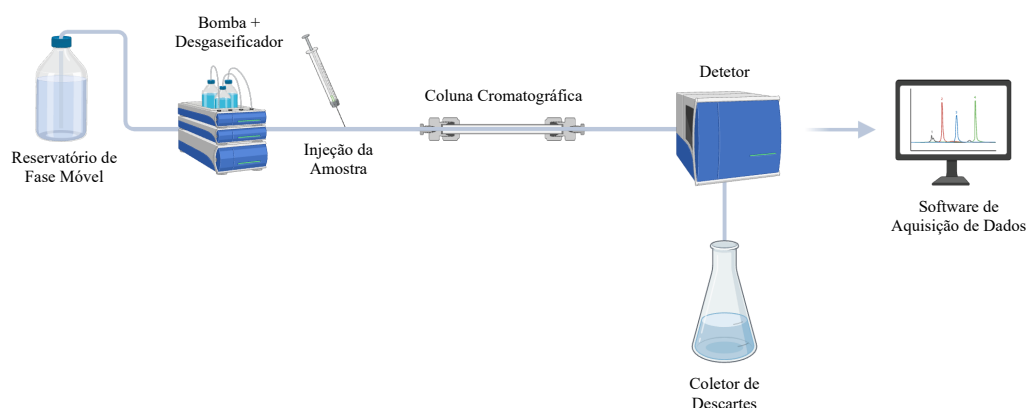


Figura 10. Representação esquemática de um sistema de HPLC simplificado. (Criado com BioRender.com).

As análises cromatográficas por HPLC podem ser realizadas mantendo a composição da fase móvel constante, procedimento conhecido por eluição isocrática, ou variável, designando-se por eluição em gradiente (Harris, 2007). Podem ser empregues diferentes tipos de detetores, como, entre outros, o ultravioleta-visível (UV-Vis), a rede de díodos, o de fluorescência e a espectrometria de massa (MS, do inglês *Mass Spectrometry*) (Hage, 2018; Harris, 2007, 2010; Kazakevich & LoBrutto, 2007; Swartz, 2010).

Apesar de parecer justificada a investigação dos diversos canabinoides que existem, o maior obstáculo relaciona-se com a disponibilidade de padrões de referência certificados para a realização dos métodos analíticos. Para contornar isso, esta técnica é frequentemente utilizada para purificar compostos que se encontrem em misturas complexas, como é o caso da purificação de determinados canabinoides presentes em amostras de cânabis. Posteriormente, dá-se a confirmação estrutural dos analitos alvo obtidos através de outras técnicas analíticas, como por exemplo a espectroscopia de ressonância magnética (NMR, do inglês *Nuclear Magnetic Resonance*) ou a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (Brighenti et al., 2021; Hazekamp et al., 2004; Micalizzi et al., 2021).

1.7.2.2. Cromatografia Gasosa

A cromatografia gasosa (GC, do inglês *Gas Chromatography*) constitui-se como um método de separação dos diversos constituintes voláteis e semi-voláteis de uma mistura através da passagem, por meio de uma fase móvel gasosa (gás de arraste), da amostra vaporizada ao longo de uma coluna cromatográfica que contém uma fase estacionária. Esta separação baseia-se nas diferenças de volatilidades e de afinidades com a fase estacionária, fazendo com que existam diferentes velocidades e, consequentemente, diferentes tempos de retenção. A fase móvel trata-se de um gás inerte purificado, como hélio, azoto, hidrogénio ou argon, e é responsável pelo transporte das amostras em análise, não interagindo com as mesmas (Hage, 2018; Harris, 2010; Skoog et al., 2014).

Como é possível verificar na figura 11, um sistema básico de GC é constituído por um reservatório de gás de arraste, responsável pelo transporte, por todo o sistema, das moléculas que são introduzidas no injetor onde as mesmas são aquecidas e vaporizadas. De seguida, os analitos no estado gasoso são, então, separados na coluna cromatográfica, sendo depois detetados, de acordo com as suas características físico-químicas, por um detetor, produzindo uma resposta que culmina num cromatograma (Harris, 2010).

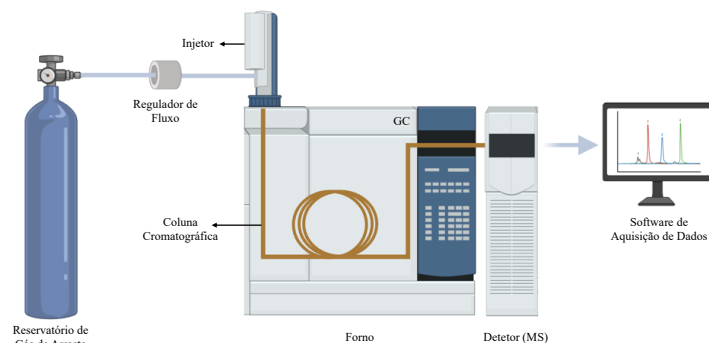


Figura 11. Representação esquemática de um sistema de GC simplificado. (Criado com BioRender.com).

Na cromatografia gasosa, existem dois modos de injeção: *split*, no qual a amostra é repartida, entrando uma pequena fração na coluna, e *splitless*, onde toda a amostra injetada é introduzida na coluna, sendo esta mais indicada em análises vestigiais. A coluna cromatográfica encontra-se no interior de um forno que pode operar no modo isotérmico ou com rampa de temperatura. Existem dois tipos de colunas cromatográficas, designadamente, as colunas de empacotamento e as colunas capilares, sendo estas últimas mais utilizadas nos dias de hoje devido à elevada eficiência que oferecem para resolução da maioria das amostras. O detetor deve ser sensível, seletivo, estável, reprodutível e

oferecer uma resposta linear numa gama ampla de concentrações para os analitos em estudo. Atualmente, existe uma gama variada de detetores para GC, conforme o propósito pretendido, dos quais se destacam o detetor de ionização de chama, de condutividade térmica, de captura de eletrões, de azoto-fósforo e o de espetrometria de massa (Harris, 2010; Skoog et al., 2007, 2014). Este último detetor é considerado um poderoso dispositivo, na medida em que exhibe vantagens acrescidas em termos da identificação espectral, sensibilidade, seletividade e precisão, apresentando diversas aplicações nas quais se englobam as ciências forenses (Awad et al., 2015).

A espetrometria de massa é uma técnica que tem por princípio a fragmentação dos analitos e a separação das partículas ionizadas originadas em função das suas razões massa/carga (m/z), onde m é a massa molecular do ião (em daltons) e z é o número de cargas presentes na molécula (Skoog et al., 2014). No GC-MS, após a amostra ser introduzida no injetor e percorrer a coluna cromatográfica, os compostos entram na câmara de ionização, onde são sujeitos a uma determinada fonte de ionização que os fragmenta em partículas eletricamente carregadas. A técnica de ionização mais comum é a ionização eletrónica, também conhecida por impacto eletrónico, que resulta diretamente da interação de um feixe de eletrões com os átomos da molécula. O conjunto de iões formados é desviado e acelerado, por ação de um campo eletromagnético, na direção do analisador de massas, sendo então separados em função das suas razões m/z . Posteriormente, o detetor é responsável por medir o sinal dos iões, estabelecendo a abundância de cada ião e fazendo com que seja possível a visualização dos espetros de massa característicos de cada composto (Rockwood et al., 2018; Skoog et al., 2014). Esta técnica hifenada permite operar em modo de varrimento total (SCAN), efetuando-se um varrimento contínuo para obtenção de espetros de massa característicos de cada composto, comparando-se, posteriormente, com bases de dados espectrais, ou em modo SIM (do inglês, *Single Ion Monitoring*), monitorizando, apenas, os iões selecionados, aumentando a sensibilidade (Hage, 2018).

Relativamente aos canabinoides, a cromatografia gasosa constitui-se como um método tipicamente simples e mais rápido do que o HPLC para a sua deteção, tornando-se preferencial. No entanto, as altas temperaturas de operação do GC promovem a descarboxilação dos ácidos canabinoides nos seus homólogos neutros, pelo que é necessário realizar um passo de derivatização, para preservar a sua estrutura.

Adicionalmente, a sua derivatização torna os compostos mais voláteis, o que melhora a forma do pico cromatográfico (Leghissa et al., 2018; Nahar et al., 2020).

1.7.3. Matrizes Biológicas

Em toxicologia forense, a monitorização dos canabinoides naturais e sintetizados é, preferencialmente, realizada em sangue (sangue total ou plasma) ou em urina, sendo esta última matriz a mais utilizada. No entanto, tem surgido o interesse em utilizar matrizes alternativas, como a saliva ou o cabelo, devido ao facto da recolha de sangue se revelar extremamente invasiva, onerosa e de necessitar de pessoal especializado. Adicionalmente, a recolha de amostras de urina está intrinsecamente sujeita a adulteração, para além de estar dependente de muitos outros fatores, entre eles, a diluição, que poderá afetar a deteção dos analitos em causa (Antunes et al., 2023; Castaneto et al., 2015; Nicolaou et al., 2021).

A saliva, nos dias de hoje, constitui-se como uma matriz biológica que se encontra em contínuo crescimento para a sua utilização em testes clínicos e em análises forenses. Comparativamente ao sangue e à urina, a sua recolha tem como vantagens o facto de ser mais simples, rápida e não invasiva, podendo ser realizada por pessoal não especializado e no local em diversas situações, como é o caso de operações stop, controlo *anti-doping* e na testagem de funcionários de empresas. A adulteração da recolha, quando comparada com a de amostras de urina, torna-se mais difícil. Ademais, uma vez que a concentração de THC na saliva diminui rapidamente, nesta matriz existe uma maior probabilidade de presença de compostos mãe (*parent drugs*), refletindo o consumo recente de substâncias, o que é de extrema importância em contextos de condução sob influência de estupefacientes (Antunes et al., 2023; Arvidsson et al., 2019; Gorziza et al., 2021; Haspolat et al., 2023; Nicolaou et al., 2021).

As amostras de saliva podem ser recolhidas diretamente para um tubo limpo e estéril ou podem ser recolhidas utilizando dispositivos de colheita comerciais. No entanto, estes dispositivos contêm, geralmente, uma solução que auxilia o controlo da viscosidade da saliva, configurando-se, consequentemente, como um fator de diluição das amostras (Gorziza et al., 2021)

A monitorização de Δ^9 -THC e de CBD em matrizes biológicas e não biológicas está incluída nas análises forenses usualmente realizadas, à semelhança, cada vez mais, do Δ^8 -THC, devido à sua crescente popularidade. No que concerne ao HHC, já foram

desenvolvidos alguns métodos analíticos para determinar os seus diastereoisómeros, em conjunto com outros canabinoides naturais, em matrizes não biológicas, mas, em matrizes biológicas, estas metodologias são escassas e não disponíveis à maioria dos laboratórios (Di Trana et al., 2024; Graziano et al., 2023; Kobidze et al., 2024). Adicionalmente, por ser muito recente, a monitorização deste canabinoide semissintético não está incluída nas análises de rotina. Deste modo, o desenvolvimento de um método capaz de monitorizar, em matrizes biológicas, canabinoides naturais e canabinoides semissintéticos, os quais se encontram em constante evolução e crescimento, revela-se de extrema importância (Bottinelli et al., 2024; Graziano et al., 2023; Ujváry, 2023).

1.8. Objetivos do Trabalho

O presente trabalho visa o desenvolvimento de uma nova abordagem verde analítica para determinação e quantificação de fitocannabinoides naturais e semissintéticos, nomeadamente Δ^8 -THC, Δ^9 -THC, CBD e HHC, em amostras de saliva, baseada na BA μ E, seguida de análise por GC-MS. Devido à dificuldade em adquirir padrões analíticos certificados à data de início do trabalho, foi necessário proceder à purificação deste composto em amostras de cânabis herbal por HPLC.

2. Materiais e Métodos

2.1. Reagentes Químicos, Materiais e Amostras

Para o desenvolvimento do presente trabalho foram utilizados reagentes e solventes químicos analiticamente certificados e com elevado grau de pureza. O acetonitrilo (ACN, 99,9 %), *n*-hexano (97,0 %) e etanol (EtOH, 99,8 %) foram obtidos através da Honeywell (Carolina do Norte, Estados Unidos da América). O metanol (MeOH, 99,9 %) foi adquirido à Carlo Erba (Milão, Itália). O ácido fórmico (98 %) foi provido pela Sigma-Aldrich (Missouri, Estados Unidos da América). O cloreto de sódio (NaCl, 99,5 %) foi obtido pela PanReac (Barcelona, Espanha), enquanto que o hidróxido de sódio (NaOH) foi adquirido à LabChem (Pensilvânia, Estados Unidos da América). A água ultrapura foi obtida através de um sistema de purificação de água Simplicity® UV da Millipore (Massachusetts, Estados Unidos da América).

As soluções-padrão de fitocanabinoides utilizadas, nomeadamente, CBD (1 mg/mL em metanol), Δ^8 -THC (1 mg/mL em metanol) e Δ^9 -THC (1 mg/mL em metanol) foram adquiridas à LGC Dr. Ehrenstorfer™ (Middlesex, Reino Unido). Após a abertura das ampolas das soluções-padrão referidas, procedeu-se à transferência das respetivas soluções para *vials* de vidro âmbar, de 2 mL, com tampa de enroscar de polipropileno. As soluções-padrão foram armazenadas a -20 °C num frigorífico, seguindo as recomendações do fornecedor.

A amostra de cânabis herbal que continha HHC foi obtida através de uma loja dedicada à venda deste tipo de produtos (Green CBD Coffee, Braga, Portugal). A amostra foi armazenada, na sua embalagem de origem, em local seguro e à temperatura ambiente, assegurando a total ausência de luz e humidade. As soluções de HHC resultantes da purificação de amostras de cânabis herbal foram, igualmente, armazenadas a -20 °C.

O bromopentafluorobenzeno (99 %), composto selecionado como padrão interno (PI), foi adquirido através da Sigma-Aldrich (Missouri, Estados Unidos da América). O agente derivatizante utilizado foi o N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida (MSTFA, 95-100%) da Machery-Nagel (Düren, Alemanha). Tanto o padrão interno como o agente derivatizante foram armazenados a 4 °C.

Como fases sorventes para o revestimento dos dispositivos BA μ E foram utilizados diferentes carvões ativados e polímeros em pó, cujas respetivas informações

foram disponibilizadas pelos fornecedores. Os ACs comerciais em pó, nomeadamente CA1 (área superficial de 1400 m²/g e pH_{PZC} 2,2), CN1 (área superficial de 1400 m²/g e pH_{PZC} 6,4) e SX Plus (área superficial de 1100 m²/g e pH_{PZC} 7,5) foram fornecidos pela Salmon & Cia (Lisboa, Portugal), enquanto que o carvão ativado R (área superficial de 937 m²/g e pH_{PZC} 6,5) foi cedido pela Riëdel-de-Haën (Seelze, Alemanha). Relativamente aos polímeros, o Oasis® HLB, co-polímero de N-vinilpirrolidona-divinilbenzeno de fase reversa (área superficial de 800 m²/g, tamanho de partícula de 30 µm e tamanho do poro de 80 Å), foi adquirido à Waters (Massachusetts, Estados Unidos da América). O DVB, co-polímero de estireno-divinilbenzeno de fase reversa (área superficial de 1200 m²/g, tamanho de partícula de 40 a 120 µm e tamanho do poro de 60 Å), foi obtido pela Merck (Darmstadt, Alemanha). O Strata®-X, polímero que contém N-vinilpirrolidona de fase reversa (área superficial de 800 m²/g, tamanho de partícula de 33 µm e tamanho do poro de 85 Å) foi adquirido à Phenomenex (Califórnia, Estados Unidos da América). Por último, o polímero octadecilo de fase reversa Supelclean ENVI™-18 (área superficial de 475 m²/g, tamanho de partícula de 45 µm e tamanho do poro de 60 Å) foi obtido pela Sigma-Aldrich (Missouri, Estados Unidos da América).

As amostras de saliva foram recolhidas a voluntários que providenciaram o seu consentimento informado aprovado pela Comissão de Ética da Egas Moniz. Todos os dados recolhidos encontram-se assegurados pelo Regulamento Geral sobre a Proteção de Dados da Lei n.º 58/2019, de 08 de Agosto (Diário da República Eletrónico, 2019). As amostras de saliva de controlo (em branco) foram disponibilizadas por voluntários que garantiram não ter consumido qualquer tipo de estupefacientes. A recolha das amostras de saliva foi realizada diretamente para tubos Falcon de 50 mL (Deltalab, Barcelona, Espanha). Todas as amostras foram armazenadas a -80 °C até serem analisadas.

2.2. Instrumentação e Sistemas Cromatográficos

Para além do material comum do laboratório, foram utilizadas micropipetas de volume regulável entre 0,5-10 μ L, 20-200 μ L e 100-1000 μ L, modelos Research, e respetivas pontas de polipropileno da *Eppendorf* (Hamburgo, Alemanha). Utilizou-se, também, uma microseringa de alta precisão com êmbolo flexível de 100 μ L da Hamilton (Nevada, Estados Unidos da América), seringas de plástico de uso único de 5 mL com as respetivas agulhas de aço inoxidável com extremidade oblíqua da Terumo Europe (Lovaina, Bélgica), filtros de politetrafluoretileno de 13 mm com diâmetro de poro de 0,22 μ m da Labfil (Zhejiang, China), barras de agitação revestidas por teflon (20×6 mm) da VWR International (Pensilvânia, Estados Unidos da América) e tubos Falcon de 15 mL adquiridos à Deltalab (Barcelona, Espanha).

Os *vials* de vidro transparente de 2 mL (12×32 mm) e tampas de enroscar de polipropileno com septo de politetrafluoretileno e silicone (9 mm) foram obtidos através da Agilent Technologies (Califórnia, Estados Unidos da América). Os frascos de vidro âmbar de 5 mL, os frascos de 10 mL de vidro transparente, as respetivas tampas de enroscar de polipropileno (18 mm) e os *inserts* de vidro transparente de base plana (6×31 mm) foram adquiridos à Labbox (Barcelona, Espanha).

Recorreu-se a uma balança analítica AZ214 M-Power da Sartorius (Gottingen, Alemanha), a um banho de ultrassons, modelo Dentsonic UC-1000, da TPC Advanced Technology (Califórnia, Estados Unidos da América), a um vórtex, modelo Vortex-vib e a uma placa de agitação magnética, modelo Anigmatic-N, ambos da J. P. Selecta (Barcelona, Espanha). Foram também utilizados um medidor de pH, modelo PHM210, da Radiometer (Copenhaga, Dinamarca), um Termoshaker Compact 5350 com 24 posições da *Eppendorf* (Hamburgo, Alemanha), uma centrífugadora, modelo Minicen, da Ortoalresa (Madrid, Espanha), um termo bloco digital, modelo QBT2, da Grant Instruments (Cambridgeshire, Reino Unido) e uma hotte, modelo BYKG-III, da Biobase (Shandong, China). Adicionalmente, foi utilizado um liofilizador, modelo Modulyo D-230, da Thermo Electron Corporation (Massachusetts, Estados Unidos da América).

O presente trabalho foi desenvolvido, numa primeira fase, com recurso a um sistema cromatográfico de HPLC-UV/Vis equipado com uma bomba isocrática simples, modelo PU-2080 Plus e um detetor ultravioleta-visível modelo UV-2075 Plus da Jasco (Tóquio, Japão). As análises foram efetuadas numa coluna semipreparativa de fase

reversa Luna® C18(2) 100Å (250 × 10 mm), com 5 µm de tamanho de partícula da Phenomenex (Califórnia, Estados Unidos da América). A aquisição de dados e o controlo instrumental foi efetuado a partir do software Clarity Lite Chromatography Station (Versão 2.6.2.226).

A confirmação estrutural dos compostos-alvo obtidos foi realizada por GC-MS pela Neuza Amaral, por LC-MS pelo Prof. Doutor Gonçalo Justino (Instituto Superior Técnico) e por NMR pela Prof. Doutora Helena Gaspar (Laboratório de NMR do Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa).

Numa segunda fase, as análises por GC-MS foram efetuadas num sistema de cromatografia gasosa da Agilent Technologies (California, Estados Unidos da América) constituído por um cromatógrafo em fase gasosa (Agilent 6890 series) equipado com um amostrador automático (Agilent 7683 series), um injetor *split/splitless* e acoplado a um detetor de espetrometria de massa (Agilent 5983N series). Nas análises foi utilizada uma coluna capilar Mega-5MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm) com um revestimento de 5% difenil e 95% dimetilpolisiloxano da Mega (Legnano, Itália). O volume de injeção de amostra foi de 2 µL, em modo SIM, sendo que o injetor *split/splitless*, utilizado em modo *splitless*, foi mantido a 280 °C. A temperatura do forno foi programada desde 50 °C durante 2 minutos até 60 °C (2,5 °C/min), seguida de aumento para 240 °C (60 °C/min) e, por fim, para os 300 °C (30 °C/min), mantendo-se 2 minutos em isotérmico, obtendo-se, deste modo, uma corrida cromatográfica de 16,33 minutos. Em todas as análises, o gás de arraste foi hélio da Gasin (Premier, 99,9992 %, Leça da Palmeira, Portugal) a um fluxo de 1,5 mL/min, mantido no modo de pressão constante (12,60 psi). No MS, as temperaturas da linha de transferência, da fonte de ionização e do quadrupólo foram mantidas a 300 °C, 250 °C e 200 °C, respetivamente. Em todas as análises foi utilizado um *solvent delay* de 4 minutos. No modo de aquisição de varrimento contínuo, os espetros de massa foram obtidos por impacto eletrónico a 70 eV, numa gama de massas compreendidas entre 35 e 400 Da, usando uma corrente de ionização de 34,6 µA e um potencial multiplicador de 1700 V. A aquisição de dados e o controlo instrumental foi realizado no *software* 5973N-6890N Data Analysis (Versão E.02.00.493) da Agilent Technologies (Califórnia, Estados Unidos da América).

2.3. Procedimento Experimental

2.3.1. Extração da Amostra de Canábis Herbal

Devido à dificuldade em adquirir padrões analíticos certificados de HHC à data de início do presente trabalho foi necessário purificar este composto a partir de uma amostra de canábis herbal adquirida numa loja de venda on-line deste tipo de produtos. Para a preparação da amostra de canábis herbal que continha HHC para posterior purificação por HPLC-UV/Vis realizou-se uma extração sólido-líquido assistida por banho de ultrassons, com base no trabalho de Correia e colaboradores (2023). Para tal, homogeneizaram-se 50 mg de amostra de canábis, com recurso a almofariz e pilão, transferindo-se para um frasco de vidro de cor âmbar, e adicionaram-se 2 mL de uma solução de acetonitrilo e etanol (50:50, v:v). Levou-se o preparado a um banho de ultrassons durante 10 minutos e, de seguida, filtrou-se a solução com recurso a um filtro de politetrafluoretileno com diâmetro de poro de 0,22 µm. A figura 12 apresenta o esquema do procedimento descrito.

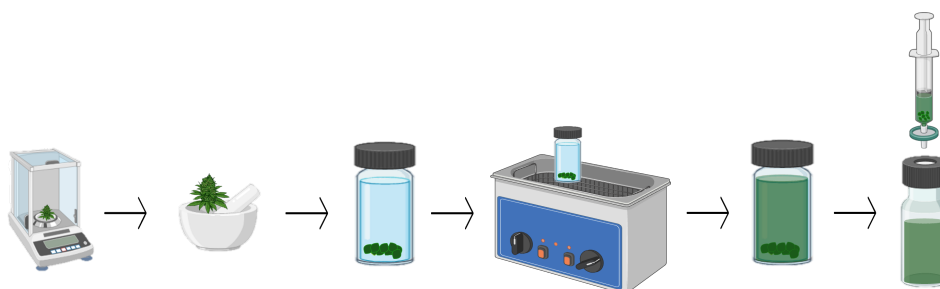


Figura 12 - Extração sólido-líquido da amostra de canábis herbal assistida por banho de ultrassons.

2.3.2. Purificação de HHC por HPLC-UV/Vis

Numa fase inicial, por forma a ser possível alcançar as melhores condições instrumentais, e com base na literatura, procedeu-se à análise da amostra utilizando uma fase móvel, previamente desgaseificada por tratamento ultrassónico, composta por acetonitrilo e uma solução aquosa com 0,1 % de ácido fórmico (75:25 %, v:v), a um fluxo de 3,5 mL/min e a um comprimento de onda de 230 nm (Correia et al., 2023; Micalizzi et al., 2021). Uma vez que os picos cromatográficos de interesse não se encontravam bem resolvidos, alterou-se a composição da fase móvel para 70:30 % (v:v). Esta alteração permitiu uma melhor separação dos picos cromatográficos.

Deste modo, as condições instrumentais otimizadas para purificação de HHC por HPLC-UV/Vis encontram-se descritas na tabela 1.

Tabela 1. Condições experimentais utilizadas para purificação de HHC por HPLC-UV/Vis.

Condições Instrumentais	
Composição da Fase Móvel	Acetonitrilo + Solução Aquosa com 0,1% de Ácido Fórmico (70:30 %, v:v)
Modo	Isocrático
Fluxo (mL/min)	3,5
Volume de Injeção (μL)	100
Comprimento de Onda (λ, nm)	230
Duração da Corrida (min)	70

Por forma a caracterizar os canabinoides presentes na amostra de cânabis herbal, procedeu-se à análise, nas condições acima descritas, de soluções individuais de padrões de seis canabinoides, nomeadamente, CBD, CBDA, CBN, Δ^8 -THC, Δ^9 -THC e THCA, cujos tempos de retenção eram conhecidos. Tais análises visaram a comparação dos tempos de retenção dos compostos conhecidos com os da amostra de cânabis em estudo.

Posteriormente, procedeu-se à recolha dos picos cromatográficos maioritários, de forma manual, para frascos de vidro de 10 mL que, seguidamente, foram armazenados a -20 °C.

2.3.3. Confirmação Estrutural dos Compostos

Antes da utilização dos compostos purificados como padrões analíticos no desenvolvimento do presente trabalho, foi necessário proceder-se à sua confirmação estrutural por GC-MS, LC-MS e NMR. Para tal, as amostras foram devidamente liofilizadas e, posteriormente, entregues nos respetivos laboratórios para análise.

2.3.4. Análise por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa

2.3.4.1. Otimização do Método Cromatográfico

Para a otimização dos parâmetros instrumentais do GC-MS, procedeu-se à injeção de uma solução mistura dos compostos em estudo e do padrão interno em modo SCAN. A partir dos dados obtidos, analisou-se cada composto individualmente, de modo a obter os respetivos tempos de retenção e espectros de massa correspondentes, visando a seleção dos iões a monitorizar, de acordo com a sua abundância relativa e com a literatura. No

método cromatográfico foram selecionados três iões para cada fitocanabinoide e PI. De seguida, a otimização do método foi baseada na variação da temperatura do forno, com o intuito de obter a melhor resolução dos picos cromatográficos num intervalo de tempo de análise considerável.

2.3.4.2. Otimização do Tempo de Derivatização

Para os ensaios do tempo ideal de derivatização, preparou-se uma solução mistura dos canabinoides em estudo a 5 µg/mL e retiraram-se 50 µL da solução para quatro *vials* com *insert* de vidro. De seguida, secou-se o extrato sob aquecimento a 70 °C e adicionaram-se 50 µL de MSTFA. Posteriormente, procedeu-se à derivatização, em micro-ondas, dos compostos durante 1, 2, 3 ou 5 minutos.

2.3.4.3. Calibração Instrumental

Na etapa da calibração instrumental foi necessário a avaliação dos parâmetros de sensibilidade, linearidade, precisão e justeza.

A sensibilidade instrumental foi determinada a partir da injeção no sistema cromatográfico de diluições sucessivas (50:50, v:v) de uma solução mistura dos canabinoides em estudo a 5 µg/mL. Os limites de deteção (LOD, do inglês *Limit of Detection*) e de quantificação (LOQ, do inglês *Limit of Quantification*) instrumentais foram estimados com recurso à razão sinal/ruído (S/N) 3:1 e 10:1, respetivamente.

Para o estudo da linearidade, prepararam-se soluções mistura dos canabinoides com sete níveis de concentração (160; 312,5; 625; 1250; 2500; 3750 e 5000 ng/mL) e injetaram-se, no sistema cromatográfico, em triplicado.

Para a determinação da repetibilidade (precisão intra-dia), da precisão intermediária (precisão inter-dia) e da justeza foram preparadas três novas soluções a três níveis de concentração diferentes: baixo, médio e alto (480, 1250 e 4000 ng/mL, respetivamente), tendo os ensaios sido efetuados num único dia para a avaliação da repetibilidade e em três dias para a avaliação da precisão intermediária e da justeza.

As fórmulas para calcular a precisão (intra-dia e inter-dia) e justeza encontram-se no anexo I.

2.3.5. Microextração Adsorativa em Barra

A partir das soluções-mãe a 100 µg/mL de cada canabinoide, foi preparada, diariamente, uma solução mistura dos canabinoides a 2,5 µg/mL em metanol e utilizada para os ensaios de otimização da microextração adsorativa em barra.

Os dispositivos em barra para a técnica BAµE foram preparados manualmente no laboratório com recurso a tubos cilíndricos ocos de polipropileno. Os dispositivos foram revestidos externamente com material adesivo, ao qual foi fixado o material sorvente (carvão ativado ou polímero). Antes da sua utilização, cada dispositivo foi limpo em água ultrapura, sob agitação, durante 10 minutos, de modo a retirar o excesso de material sorvente. De seguida, cada dispositivo foi seco em papel para retirar o excesso de água do interior e da superfície dos dispositivos.

2.3.5.1. Ensaios de Otimização

De forma a maximizar a eficiência da metodologia BAµE/GC-MS, procedeu-se à otimização de diversos parâmetros, nomeadamente, a fase sorvente (CA1, CN1, SX Plus, R, HLB, DVB, Strata-X e ENVI-18), o tempo de dessorção (30, 45 e 60 min), o solvente para dessorção (MeOH, ACN e MeOH:ACN (50:50, v:v)), o pH da matriz (2,0; 5,5 e 12,0), o modificador orgânico (0, 5, 10, 15 % em MeOH (v:v)), a força iónica da matriz (0, 5, 10, 15 % em NaCl (p:v)), a temperatura de equilíbrio (23 °C e 30 °C), o tempo de equilíbrio (1, 2, 2:30, 3 e 16 h) e a velocidade de agitação (700, 1000 e 1300 rpm).

Para tal, numa primeira fase, os parâmetros iniciais foram fixos, tendo sido efetuados ensaios de extração medindo 1 mL de água ultrapura para um *eppendorf*, fortificando, de seguida, com 50 µL da solução mistura dos canabinoides em estudo a uma concentração de 2,5 µg/mL. Posteriormente, colocou-se o dispositivo BAµE com o sorvente selecionado. A microextração foi promovida pela agitação no thermoshaker, durante 1 h a 1000 rpm. Após a etapa de extração, o dispositivo em barra foi retirado do *eppendorf* e seco em papel. Para a etapa da retroextração, colocou-se o dispositivo num *insert* de vidro contendo 100 µL de solvente e levou-se a tratamento ultrassónico durante 45 minutos. Seguidamente, retirou-se o dispositivo do *insert* de vidro e levou-se à secura sob aquecimento a 70 °C. Adicionaram-se 50 µL de agente derivatizante MSTFA e levou-se ao micro-ondas por 2 minutos. Antes de se proceder à análise por GC-MS, adicionaram-se 2 µL de PI. Todos os ensaios foram efetuados em triplicado.

Na figura 13 encontra-se representado um esquema simplificado da metodologia BA μ E /GC-MS.

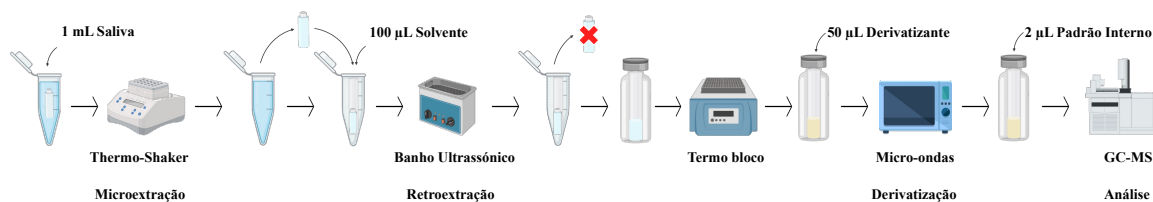


Figura 13. Representação esquemática da metodologia de análise BA μ E /GC-MS.

Os parâmetros supramencionados foram estudados com base em trabalhos anteriores e seguindo uma abordagem de otimização univariável (OVAT, do inglês, *One Variable at a Time*) (Ahmad et al., 2016, 2017; Almeida & Nogueira, 2015; Ide & Nogueira, 2018; Mafra et al., 2018; Morelli et al., 2020; Neng et al., 2015; Neng & Nogueira, 2017; Nogueira, 2013).

A fórmula para calcular as recuperações encontra-se no anexo I.

2.3.5.2. Ensaios de Validação

Para os ensaios de validação da metodologia proposta neste trabalho, foram realizados os procedimentos analíticos nas condições otimizadas descritas anteriormente, utilizando saliva de voluntários que garantiram não ter consumido qualquer tipo de estupefaciente.

Nesta etapa, adotou-se a guia diretiva da UNODC “*Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens*” (UNODC, 2009). Com base nesta norma, avaliaram-se parâmetros como a seletividade, sensibilidade, linearidade, precisão e justeza. Todos os ensaios de validação, à semelhança da etapa de otimização, foram efetuados em triplicado.

Para avaliar a seletividade do método verificou-se a presença/ausência de interferentes nos mesmos tempos de retenção de cada analito através da análise de amostras em branco com o método BA μ E/GC-MS otimizado (ENFSI, 2020).

A sensibilidade da metodologia foi verificada através da determinação dos LOD e LOQ, através da razão S/N de 3:1 e 10:1, respetivamente.

As soluções mistura de canabinoides foram preparadas na gama de trabalho de 5 a 300 ng/mL e foram analisadas com o método em estudo. A linearidade foi estimada

através dos respetivos coeficientes de determinação (r^2), da avaliação da dispersão de resíduos e dos testes estatísticos *Lack-of-Fit* e *Goodness-of-Fit*. No anexo I são apresentadas as respetivas equações para o cálculo destes testes estatísticos.

A repetibilidade, precisão intermediária e justeza foram avaliadas através de ensaios nos quais amostras de saliva em branco foram fortificadas com os canabinoides em questão a três níveis de concentração: baixo, médio e alto (15, 150 e 240 ng/mL, respetivamente). Para a determinação da repetibilidade, os ensaios foram realizados num único dia e em três dias para a avaliação da precisão intermediária e da justeza.

2.3.6. Aplicação a Amostras Reais

Os ensaios em amostras reais foram realizados em saliva de voluntários fumadores de HHC recolhida trinta minutos após o consumo de produtos de cânabis. Aplicou-se a metodologia otimizada e validada previamente descrita, utilizando 1000 μ L de amostra de saliva contendo 5 % de MeOH. Todos os ensaios foram realizados em triplicado. Como referido, as amostras em estudo foram armazenadas a -80 °C até serem analisadas.

3. Resultados e Discussão

3.1. Purificação de Hexahidrocanabinol por HPLC-UV/Vis

O passo inicial deste trabalho foi purificar HHC a partir de uma amostra de cânabís herbal que continha este composto, devido à dificuldade em obter padrões analíticos certificados à data de início do projeto.

Para tal, otimizou-se um método desenvolvido no Laboratório de Patologia Molecular e Bioquímica Forense para purificação de canabinoides com recurso a HPLC. Numa primeira fase, otimizou-se a fase móvel utilizada, tendo-se obtido uma melhor separação dos picos cromatográficos com uma mistura de acetonitrilo e uma solução aquosa com 0,1 % de ácido fórmico na proporção de 70:30 % (v:v). Numa segunda fase, e de modo a identificar os canabinoides presentes na amostra de cânabís herbal através da comparação dos respetivos tempos de retenção, procedeu-se à análise de soluções individuais de padrões de seis canabinoides (CBD, CBDA, CBN, Δ^8 -THC, Δ^9 -THC e THCA). Desta forma, inferiu-se que os picos cromatográficos maioritários (assinalados a A e B na figura 14) na análise da amostra de cânabís são CBDA e CBD, respetivamente, uma vez que os tempos de retenção eram coincidentes com os das suas soluções-padrão. No entanto, existem, ainda, outros dois picos cromatográficos maioritários (C e D) cuja identidade é desconhecida, uma vez que os tempos de retenção não eram coincidentes com nenhuma das soluções-padrão utilizadas. Tal facto sugeriu que poderiam tratar-se dos diastereoisómeros do hexahidrocanabinol (9R-HHC e 9S-HHC), indo ao encontro da literatura (Casati et al., 2022; Russo et al., 2023; Stothard et al., 2023).

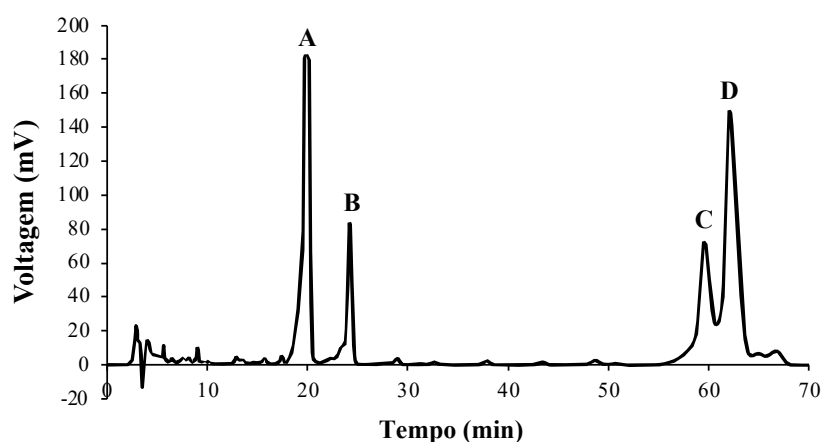


Figura 14. Cromatograma obtido através da análise por HPLC-UV/Vis, sob condições instrumentais otimizadas, da amostra de cânabís herbal em estudo, numa concentração de 25 mg/mL a 230 nm. (Legenda: A- CBDA; B- CBD; C e D – picos cromatográficos cuja identidade é desconhecida).

3.2. Confirmação Estrutural dos Compostos

Para se efetuar a confirmação estrutural dos picos cromatográficos C e D, visando a sua utilização no decorrer do trabalho como padrões analíticos, os mesmos foram analisados por GC-MS pela Neuza Amaral durante o seu estágio no Laboratório de Patologia Molecular e Bioquímica Forense, bem como por LC-MS pelo Prof. Doutor Gonçalo Justino do Instituto Superior Técnico e por NMR pela Prof. Doutora Helena Gaspar do Laboratório de NMR do Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

A partir do estudo das respetivas fragmentações do espectro de massa, confirmou-se que os dois picos cromatográficos (C e D) se tratavam de HHC (Amaral, 2024). Verificou-se que os picos cromatográficos C e D apresentavam cerca de 72 % e 91 % de pureza por GC-MS, respetivamente.

A análise por LC-MS permitiu verificar que ambos os picos cromatográficos apresentaram um espectro de massa contendo o ião molecular com razão m/z de 317, correspondente ao ião molecular $[M+H]^+$ do hexahidrocanabinol descrito na literatura (Kobidze et al., 2024; Schirmer et al., 2023).

A análise por NMR através de uma sequência com recurso ao efeito nuclear *Overhauser* (NOESY, do inglês *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*) permitiu a distinção dos dois diastereoisómeros, confirmando que os compostos C e D se tratavam dos diastereoisómeros 9R e 9S, respetivamente (Collins et al., 2023; Russo et al., 2023; Stothard et al., 2023; Tanaka & Kikura-Hanajiri, 2024).

3.3. Condições Instrumentais

3.3.1. Otimização do Método Cromatográfico

Para a identificação de compostos por GC-MS, parâmetros como o tempo de retenção e o espectro de massa, característico de cada substância, são cruciais. Neste contexto, procedeu-se à análise de uma solução mistura dos compostos em estudo e do padrão interno em modo SCAN. Esta abordagem, permitiu a identificação dos picos cromatográficos correspondentes a cada canabinoide e, conseqüentemente, do seu tempo de retenção, bem como a obtenção dos respetivos espectros de massa. Como referido no subtítulo 2.3.4.1., para o método cromatográfico eleito foram selecionados três iões para

cada fitocanabinoide e para o PI, como se encontra descrito na tabela 2, na qual os iões quantificadores se encontram realçados a negrito. Na mesma tabela encontram-se igualmente descritos os tempos de retenção de cada composto em estudo, bem como do PI utilizado.

Tabela 2. Iões seleccionados, expressos em razão m/z , e tempo de retenção do padrão interno e de cada canabinoide, para monitorização em modo SIM.

Composto	Iões Monitorizados (m/z)	Tempo de Retenção (min)
PI	246 , 248, 167	5,340
CBD	337 , 390, 301	11,880
9S-HHC	388 , 332, 345	12,472
Δ^8-THC	303 , 386, 330	12,717
Δ^9-THC	371 , 386, 303	12,852
9R-HHC	332 , 345, 388	12,920

Através da variação da temperatura do forno, com o intuito de obter a melhor resolução dos picos cromatográficos num intervalo de tempo de análise considerável, adaptou-se um método existente no Laboratório de Patologia Molecular e Bioquímica Forense para a análise de canabinoides, obtendo-se o cromatograma abaixo (figura 15). O tempo total de corrida foi de 16,33 minutos, tendo-se obtido uma boa separação dos picos cromatográficos dos canabinoides em estudo.

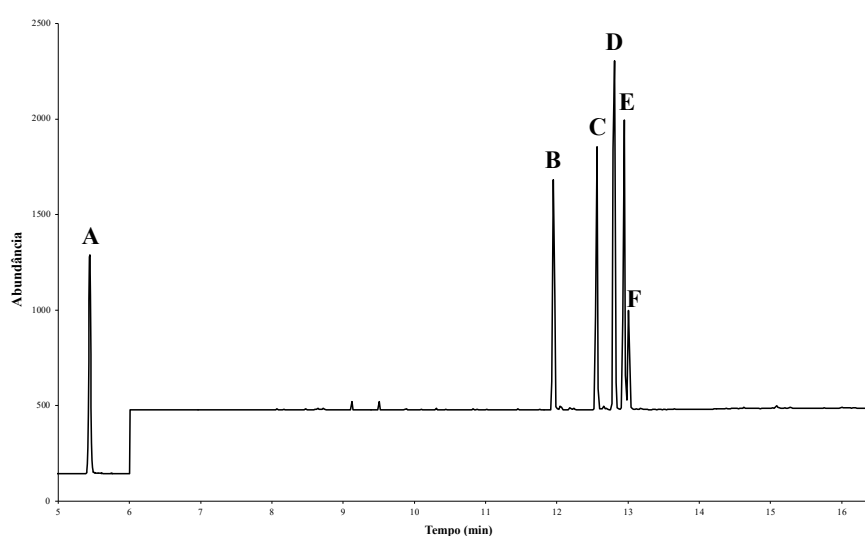


Figura 15. Cromatograma obtido por GC-MS(SIM) dos canabinoides nas condições instrumentais otimizadas. (Legenda: A- PI; B- CBD; C- 9S-HHC; D- Δ^8 -THC; E- Δ^9 -THC; F- 9R-HHC).

3.3.2. Otimização do Tempo de Derivatização

Segundo a UNODC, um dos derivatizantes mais utilizados para a análise de canabinoides é o MSTFA, visando tornar os compostos mais voláteis e a preservar a sua estrutura devido às altas temperaturas do GC (UNODC, 2022). Nos últimos anos, a derivatização de substâncias de abuso por micro-ondas tem sido adotada por alguns autores, principalmente por minimizar o tempo laboratorial necessário para que este processo químico ocorra (Margalho et al., 2016; Söderholm et al., 2010).

Para a avaliação do tempo ideal para a derivatização dos canabinoides, foi testado este processo durante 1, 2, 3 ou 5 minutos em micro-ondas e, através das áreas dos picos cromatográficos dos canabinoides em estudo, inferiu-se que aos dois minutos atingiu-se o máximo de resposta.

3.3.3. Calibração Instrumental

Como supramencionado no subtítulo 2.3.4.3., a sensibilidade instrumental foi determinada a partir da injeção no sistema cromatográfico de diluições sucessivas (50:50, v:v) de uma solução mistura dos canabinoides em estudo a 5000 ng/mL, tendo os LOD e LOQ instrumentais sido calculados com recurso à razão S/N 3:1 e 10:1, respetivamente. Foram obtidos valores de LOD entre 16 e 39 ng/mL e valores de LOQ entre 53 e 130 ng/mL como representado na tabela 3. Visando a construção de curvas de calibração e a respetiva avaliação da linearidade, prepararam-se soluções mistura dos canabinoides com diferentes concentrações que variaram entre 160 e 5000 ng/mL (envolvendo sete níveis de concentração, cada uma analisada em triplicado), tendo demonstrando elevada linearidade, com coeficientes de determinação iguais ou superiores a 0,9968 (tabela 3).

Tabela 3. Valores de limites de deteção (LOD) e de quantificação (LOQ), gama de trabalho, equações das retas e coeficientes de determinação (r^2) obtidos para cada canabinoide em estudo para a calibração instrumental por GC-MS.

Composto	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	Gama de Trabalho (ng/mL)	Equação da Reta	r^2
CBD	16	53	160 - 5000	$y = 0,0902x - 0,0013$	0,9981
9S-HHC	39	130		$y = 0,0934x + 0,0061$	0,9968
Δ^8-THC	16	53		$y = 0,1454x + 0,0009$	0,9986
Δ^9-THC	16	53		$y = 0,093x - 0,0007$	0,9976
9R-HHC	39	130		$y = 0,0348x + 0,0004$	0,9995

Para a determinação da precisão (intra-dia e inter-dia) e da justeza (inter-dia) analisaram-se replicados com três níveis de concentração: baixo (480 ng/mL), médio (1250 ng/mL) e alto (4000 ng/mL).

De acordo com a norma da UNODC, o critério de aceitação para a precisão reporta que os valores dos desvios padrão relativos (RSD %) (do inglês, *Relative Standard Deviation* (%)) devem ser iguais ou inferiores a 15 %, com exceção dos valores correspondentes à concentração de nível mais baixo, para o qual são aceites valores ≤ 20 %. Para a justeza, é referido que os valores de viés (%) devem ser $\leq \pm 15$ %, à exceção dos valores da concentração de nível mais baixo, que devem ser $\leq \pm 20$ % (UNODC, 2009).

Para a precisão intra-dia, os valores de RSD (%) encontraram-se dentro dos parâmetros descritos na guia diretiva, uma vez que foram $\leq 12,05$ %. Para a precisão intermediária e justeza, os valores de RSD (%) e de viés (%) também se encontraram dentro dos parâmetros aceitáveis pela diretriz na qual este trabalho foi baseado. Todos os valores obtidos encontram-se apresentados na tabela A.1. do anexo II.

3.4. Ensaios de Otimização da Microextração Adsorptiva em Barra

Após estabelecidos os parâmetros instrumentais de GC-MS, seguiu-se o estudo da influência dos parâmetros experimentais nas etapas inerentes à microextração adsorptiva em barra, nomeadamente na extração e na dessorção, adotando uma abordagem de otimização univariável. Nesta abordagem, utilizada recorrentemente em trabalhos envolvendo a BA μ E, todas as variáveis, à exceção de uma, estão fixadas e é estudado o comportamento de cada parâmetro individualmente. Embora este procedimento não permita a identificação de possíveis interações entre as variáveis em estudo e exija um elevado número de ensaios, é uma abordagem que muitos autores defendem ser de fácil implementação pelo facto do número de variáveis ser relativamente baixo e de não serem esperadas interações significativas (Oliveira et al., 2021; Prieto et al., 2010).

3.4.1. Seleção da fase sorvente

O primeiro ensaio de otimização da BA μ E foi a seleção do sorvente a ser usado para a microextração dos compostos alvo em estudo. Neste sentido, foram selecionados quatro polímeros (HLB, DVB, Strata-X e Envi-18) e quatro carvões ativados (CA1, CN1, R e SX Plus) para serem testados como fases extrativas.

Na figura 16 encontram-se representadas as percentagens de recuperação para cada fase sorvente relativamente aos canabinoides em estudo, sendo possível observar que os polímeros, à exceção do DVB, apresentam uma maior percentagem de recuperação, em comparação aos carvões ativados, que tendem a ter piores recuperações.

Os resultados demonstram que o polímero HLB apresentou, na maioria dos analitos, maiores taxas de recuperação, enquanto que os carvões ativados R e SX Plus apresentaram os menores valores de recuperação.

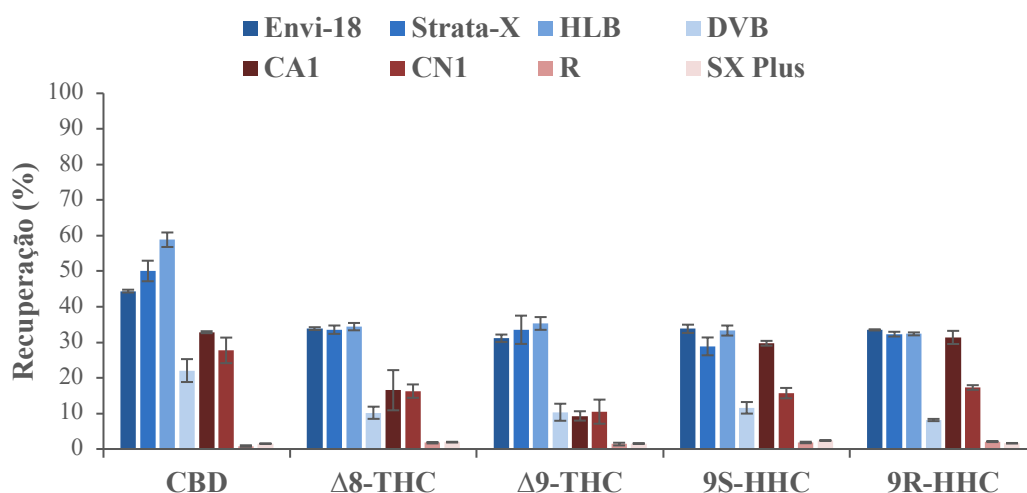


Figura 16. Efeito da seletividade dos polímeros e dos ACs em estudo na recuperação de canabinoides (CBD, Δ^8 -THC, Δ^9 -THC, 9S-HHC e 9R-HHC) por BA μ E/GC-MS. Condições de ensaio: microextração de 1 h a 1000 rpm; retroextração com 100 μ L de MeOH e posterior tratamento ultrassônico durante 45 minutos.

Tanto os canabinoides naturais como os semissintéticos apresentam características apolares, característica que pode influenciar significativamente os mecanismos de interação com as fases sorventes. Os carvões ativados são materiais sólidos porosos que retêm os solutos através de interações electrostáticas e/ou dispersivas, de acordo com a sua porosidade, textura e pH do ponto de carga zero (pH_{PZC}) (Almeida & Nogueira, 2012). Neste caso em particular, ao pH experimental ensaiado (5,5), as cargas superficiais predominantes à superfície do CA1 são negativas (pH > pH_{PZC} (2,2)), enquanto que os restantes ACs estudados apresentam carga positiva (pH < pH_{PZC} ($\approx$ 6,4 - 7,5)). Para além disso, aparentemente, as elevadas áreas superficiais dos ACs não são suficientes para a obtenção de resultados de recuperação superiores. Por outro lado, os polímeros testados são do tipo fase reversa, retendo os analitos de acordo com o tamanho das suas partículas, área de superfície e mecanismos envolvidos, ou seja,

ligações π - π , dipolo-dipolo, pontes de hidrogénio e interações iónicas (Almeida & Nogueira, 2012).

Com base nos resultados obtidos, o polímero HLB demonstrou ter a capacidade de promover interações químicas significativamente mais intensas com o CBD, em comparação com as restantes fases sorventes. Assim, o polímero HLB foi selecionado como a fase sorvente a ser utilizada.

3.4.2. Otimização da Dessorção Líquida

A segunda etapa na otimização desta técnica de microextração passa pelo estudo de dois parâmetros, nomeadamente, o tempo necessário para a dessorção dos analitos da fase sorvente e o efeito do tipo de solvente de retroextração para que tal aconteça, visando a obtenção da máxima recuperação dos analitos.

3.4.2.1. Efeito do Tempo de Retroextração

Para a otimização do tempo de retroextração sob tratamento ultrassónico foram estudados três tempos diferentes, designadamente 30, 45 e 60 minutos, utilizando MeOH como solvente de retroextração. Na figura 17 encontram-se representados os resultados obtidos.

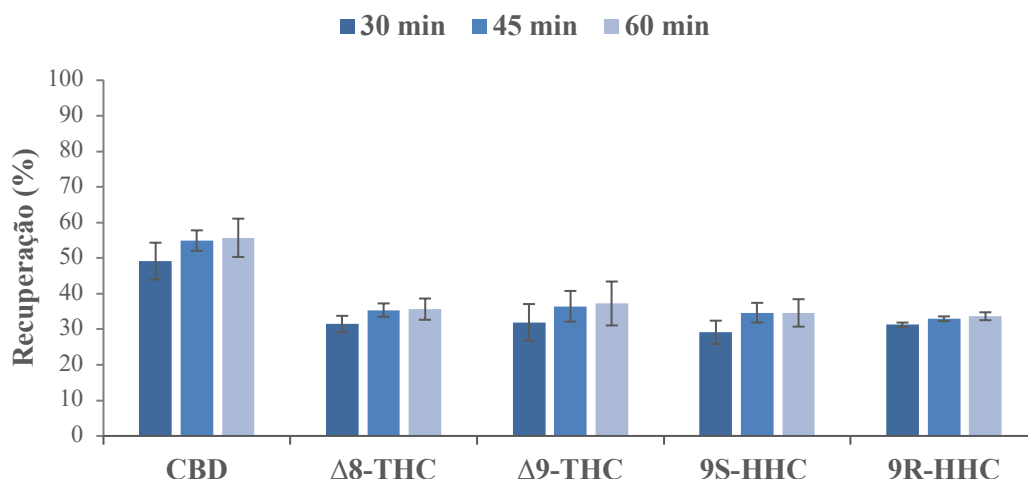


Figura 17. Efeito do tempo de retroextração na recuperação de canabinoides (CBD, Δ^8 -THC, Δ^9 -THC, 9S-HHC e 9R-HHC) por BA μ E/GC-MS. Condições de ensaio: microextração de 1 h a 1000 rpm com HLB; retroextração com 100 μ L de MeOH e posterior tratamento ultrassónico de 30/45/60 minutos.

Como é possível observar, o ensaio com 30 minutos de tratamento ultrassónico apresenta os valores de recuperação mais baixos entre os compostos, o que sugere que não era tempo suficiente para quebrar a maioria das ligações entre os analitos e a fase

sorvente dos dispositivos de polipropileno visando a sua passagem para a fase orgânica. Os tempos de sonicação de 45 e 60 minutos apresentaram valores de recuperação semelhantes. No entanto, foi possível notar que 60 minutos de tratamento ultrassônico aumentava a temperatura do banho, o que pode levar à degradação do dispositivo. Deste modo, e uma vez que o tratamento ultrassônico mais longo apresentou maiores valores de RSD (%), optou-se por selecionar uma retroextração líquida de 45 minutos.

3.4.2.2. Efeito do Tipo de Solvente

De seguida, realizou-se o ensaio que se relaciona com a escolha do solvente adequado para promover a quebra das interações entre os analitos e a fase sorvente na dessorção líquida. Para tal, testaram-se acetonitrilo, metanol e uma mistura 50:50 (v:v) de ambos, que em estudos anteriores demonstraram boa eficiência (Ahmad et al., 2020; Almeida & Nogueira, 2014; Oliveira et al., 2021). Na figura seguinte (figura 18) encontram-se representados os resultados obtidos neste ensaio.

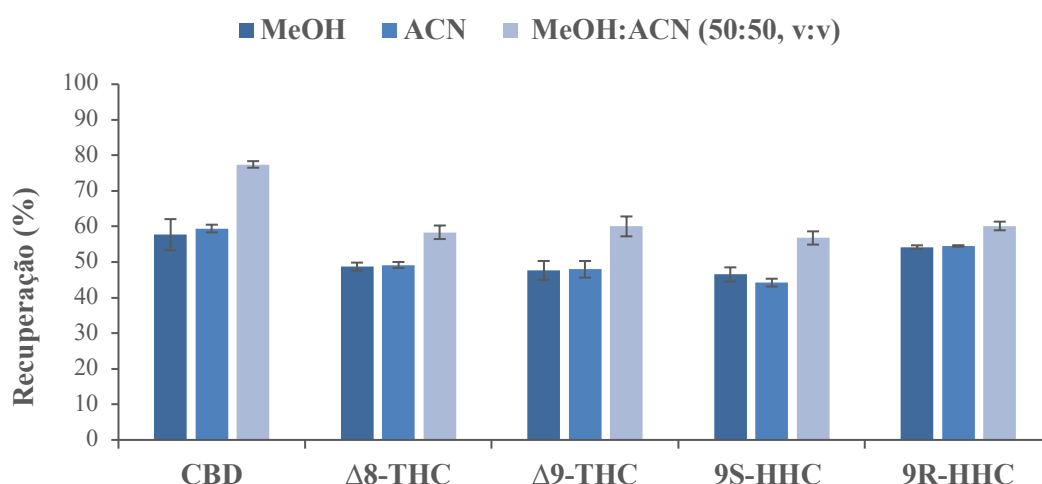


Figura 18. Efeito do tipo de solvente de retroextração na recuperação de canabinoides (CBD, Δ⁸-THC, Δ⁹-THC, 9S-HHC e 9R-HHC) por BAμE/GC-MS. Condições de ensaio: microextração de 1 h a 1000 rpm com HLB; retroextração com 100 μL MeOH/ACN/Mistura MeOH:ACN (50:50, v:v) e posterior tratamento ultrassônico de 45 minutos.

Os resultados obtidos evidenciaram que a utilização da solução mistura com MeOH e ACN (50:50, v:v) como solvente de retroextração permitiu a obtenção de uma melhor recuperação para todos os canabinoides em estudo, não existindo diferenças significativas para a extração dos mesmos utilizando apenas ACN ou MeOH como solventes para a retroextração. Consequentemente, a solução mistura com MeOH e ACN (50:50, v:v) foi selecionada como solvente para retroextração para o decorrer do trabalho.

3.4.3. Otimização dos Efeitos na Matriz

A otimização dos efeitos na matriz compreende o estudo de três parâmetros, designadamente, a influência do pH, do modificador orgânico e da força iónica na matriz.

3.4.3.1. Efeito de pH na Matriz

O pH da matriz pode modificar os analitos ou as condições da amostra, podendo influenciar o equilíbrio (Prieto et al., 2010). Deste modo, pretendeu-se determinar se o pH da matriz tem, ou não, influência na recuperação dos analitos em estudo. Para tal, foram realizados três ensaios com diferentes valores de pH: 2, 5,5 e 12 (figura 19).

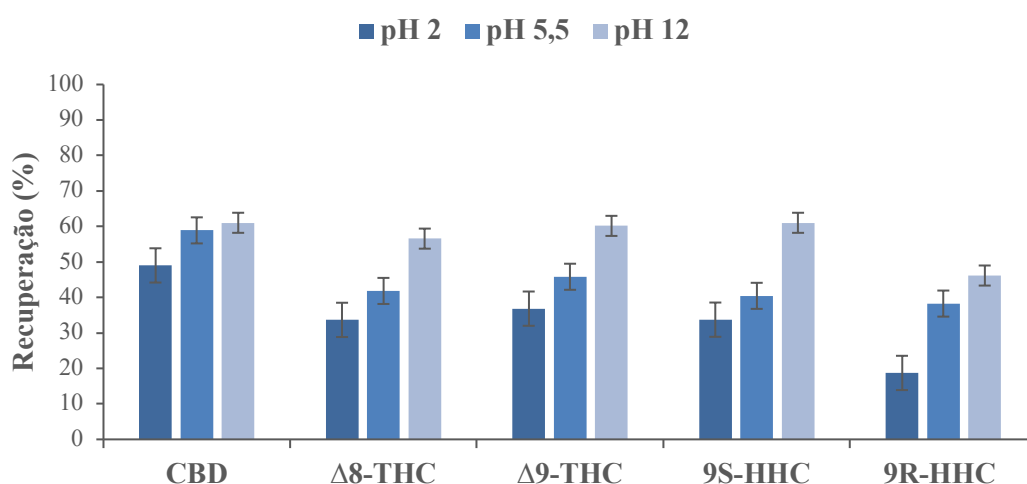


Figura 19. Efeito do pH da matriz na recuperação de canabinoides (CBD, Δ^8 -THC, Δ^9 -THC, 9S-HHC e 9R-HHC) por BA μ E/GC-MS. Condições de ensaio: microextração de 1 h a 1000 rpm com HLB a pH 2/5,5/12; retroextração com 100 μ L de mistura MeOH:ACN (50:50, v:v) e posterior tratamento ultrassónico de 45 minutos.

Os resultados demonstraram que existe uma tendência para os valores de recuperação aumentarem à medida que o pH se vai tornando mais alcalino para todos os canabinoides em questão, sendo o pH 12 aquele que apresentou melhores taxas de recuperação. Não foram testados valores de pH superiores devido ao facto de poder levar à degradação do dispositivo BA μ E.

No anexo III encontra-se apresentada a especiação dos compostos em estudo em função do pH. Todos os valores de pK_a dos canabinoides em estudo são iguais ou superiores a 9,13. Quando mantidos em meio mais básico do que o seu pK_a , estes compostos estão na sua forma ionizada, o que favorece a sua disponibilização na fase aquosa da matriz, aumentando as taxas de recuperação. Assim sendo, seguiu-se com a otimização com pH 12 na matriz.

3.4.3.2. Efeito do Modificador Orgânico

A polaridade da matriz pode ser alterada com a adição de um solvente orgânico, nomeadamente metanol. Este procedimento aumenta a solubilidade dos compostos apolares na matriz, minimizando a adsorção destes nas paredes dos frascos de amostragem durante a fase de microextração (“*wall effect*”). No entanto, existe a possibilidade de quantidades superiores do solvente orgânico apresentarem um efeito contrário, pois podem aumentar a solubilidade dos analitos de tal ordem que a partição para a fase sorvente pode ser comprometida (Prieto et al., 2010).

Para a otimização do efeito do modificador orgânico testaram-se quatro percentagens de MeOH diferentes (0, 5, 10 e 15 % (v:v)), estando os resultados obtidos apresentados na figura seguinte (figura 20).

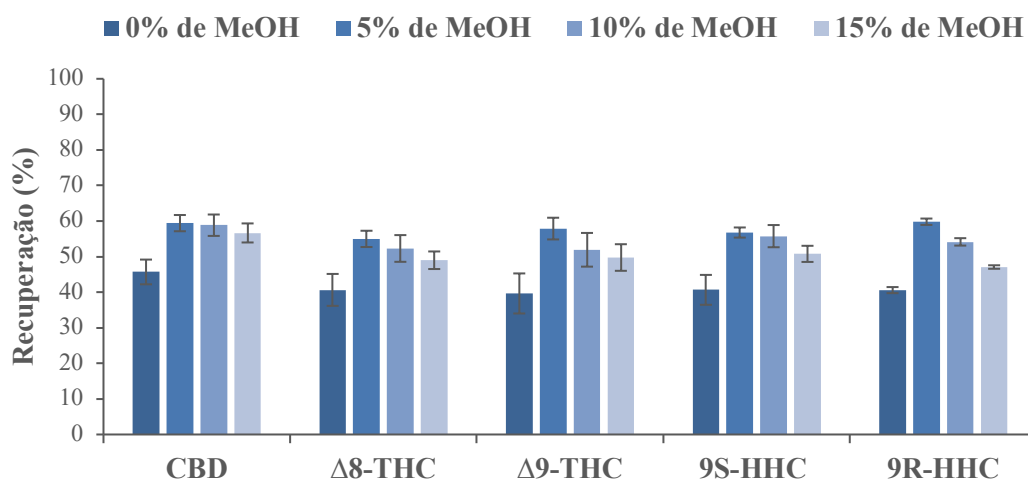


Figura 20. Efeito do modificador orgânico na recuperação de canabinoides (CBD, Δ^8 -THC, Δ^9 -THC, 9S-HHC e 9R-HHC) por BA μ E/GC-MS. Condições de ensaio: microextração de 1 h a 1000 rpm com HLB a pH 12 e 0/5/10/15 % (v:v) de MeOH; retroextração com 100 μ L de mistura MeOH:ACN (50:50, v:v) e posterior tratamento ultrassónico de 45 minutos.

Os resultados demonstraram que a não adição de metanol piora as recuperações obtidas. Por outro lado, é notório que existe uma melhoria na recuperação de todos os canabinoides quando é adicionado 5 % de MeOH, sendo que o aumento dessa percentagem acaba por diminuir os valores de recuperação. Este resultado pode ser explicado pelo facto dos compostos em estudo apresentarem características apolares, com coeficientes de partição octanol/água ($\log K_{O/W}$) para o Δ^8 -THC, Δ^9 -THC e CBD superiores a 5. Apesar de não existirem informações relativas ao $\log K_{O/W}$ do HHC, pensa-se que este seja semelhante ao do Δ^9 -THC (EMCDDA, 2023b). Desta forma, prosseguiu-se o trabalho com a adição de 5 % de modificador orgânico.

3.4.3.3. Efeito da Força Iônica

Por fim, analisou-se o efeito da força iônica utilizando cloreto de sódio. De um modo geral, a incorporação de um eletrólito forte às amostras incrementa a força iônica e reduz a solubilidade dos compostos orgânicos, promovendo o efeito de “*salting-out*”, facilitando a transferência dos analitos para a fase sorvente. No entanto, este efeito é altamente influenciado pelas propriedades físico-químicas de cada molécula. Geralmente, para analitos apolares, a sua adição não melhora a recuperação, podendo chegar mesmo reduzir a eficiência da extração (Camino-Sánchez et al., 2014).

Neste ensaio, testaram-se quatro percentagens de NaCl diferentes (0, 5, 10 e 15 % (p:v)), estando os resultados obtidos apresentados na figura 21.

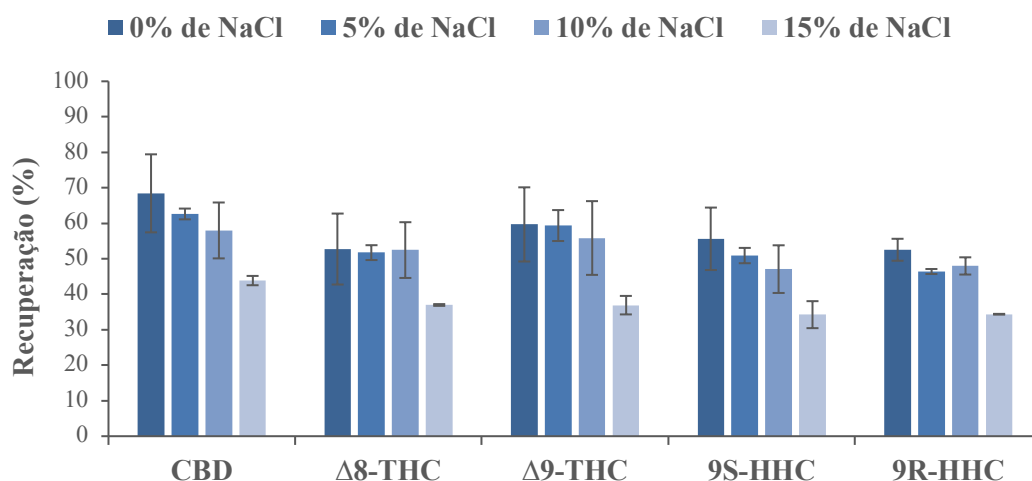


Figura 21. Efeito da força iônica na recuperação de canabinoides (CBD, Δ^8 -THC, Δ^9 -THC, 9S-HHC e 9R-HHC) por BA μ E/GC-MS. Condições de ensaio: microextração de 1 h a 1000 rpm com HLB, a pH 12 com 5 % (v:v) de MeOH e 0/5/10/15 % (p:v) de NaCl; retroextração com 100 μ L de mistura MeOH:ACN (50:50, v:v) e posterior tratamento ultrassônico de 45 minutos.

Como é possível observar na figura 21, o aumento da percentagem de NaCl diminui o desempenho na recuperação para todos os analitos em questão, facto que vai de acordo com a literatura acima descrita. Este fenómeno pode estar relacionado com a adsorção dos iões de sal aos poros da fase polimérica, resultando na diminuição da área superficial disponível para a interação com os analitos em estudo. Deste modo, a adição de NaCl não apresenta nenhuma vantagem.

3.4.4. Otimização da Extração

Após a otimização do processo de dessorção líquida e dos fatores que possam influenciar a matriz, procedeu-se à otimização da fase de microextração. Os parâmetros analisados que podem influenciar esta etapa são a temperatura, o tempo de equilíbrio e velocidade de agitação.

3.4.4.1. Efeito da Temperatura

Para a otimização deste parâmetro foram testadas duas temperaturas durante a extração: temperatura normal do laboratório (23 °C) e 30 °C. Os resultados obtidos para este ensaio encontram-se apresentados na figura 22.

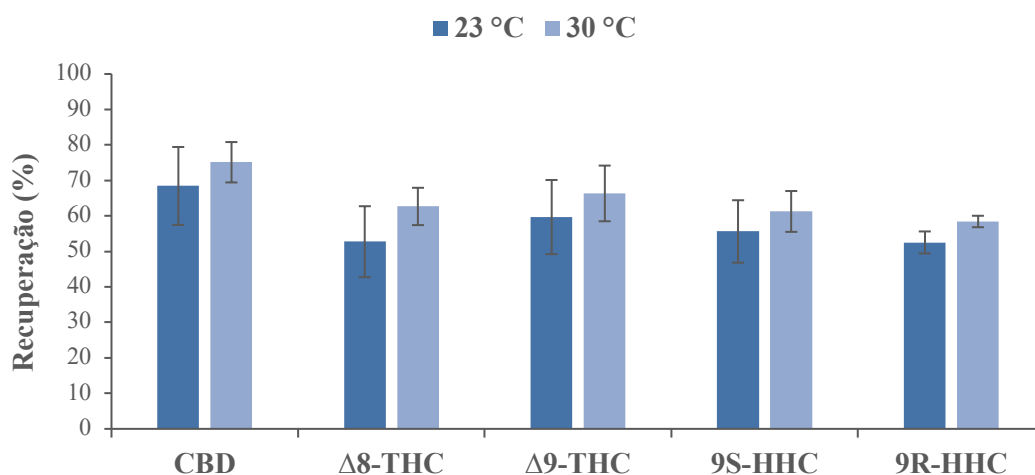


Figura 22. Efeito da temperatura na recuperação de canabinoides (CBD, Δ^8 -THC, Δ^9 -THC, 9S-HHC e 9R-HHC) por BA μ E/GC-MS. Condições de ensaio: microextração de 1 h a 1000 rpm a 23/30 °C com HLB, a pH 12 e 5 % (v:v) de MeOH; retroextração com 100 μ L de mistura MeOH:ACN (50:50, v:v) e posterior tratamento ultrassónico de 45 minutos.

Foi perceptível que o aumento da temperatura no momento do equilíbrio influenciava a recuperação dos analitos em questão. Não foram testadas temperaturas superiores devido ao facto de poder levar à degradação do material adesivo do dispositivo de polipropileno (Neng et al., 2010). Assim sendo, optou-se por continuar o presente trabalho utilizando uma temperatura de 30 °C no momento da extração.

3.4.4.2. Efeito do Tempo de Equilíbrio

A recuperação encontra-se intrinsecamente relacionada com o tempo de equilíbrio, isto é, o tempo que cada analito demora a ser extraído da fase aquosa para a fase extrativa. Geralmente, e consoante determinadas características, os melhores resultados surgem com o aumento do tempo de extração. No entanto, elevados períodos de tempo de extração podem ser sacrificados, devido à sua impraticabilidade laboratorial.

Para a otimização do tempo de equilíbrio, foram testados cinco períodos de tempo diferentes: 1, 2, 2:30, 3 e 16 horas com base em trabalhos anteriores (Ahmad et al., 2017; Almeida et al., 2017; Neng & Nogueira, 2017). Na figura 23 estão representados os resultados obtidos neste estudo.

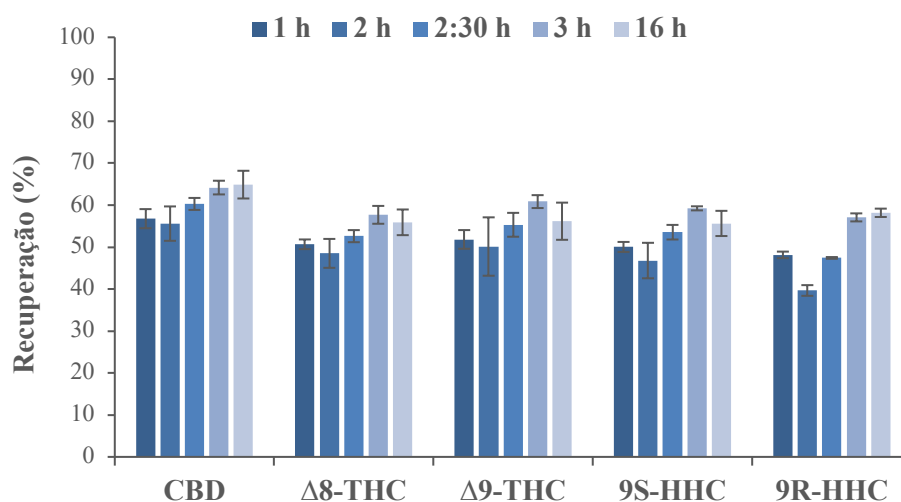


Figura 23. Efeito do tempo de equilíbrio na recuperação de canabinoides (CBD, Δ^8 -THC, Δ^9 -THC, 9S-HHC e 9R-HHC) por BA μ E/GC-MS. Condições de ensaio: microextração de 1/2/2:30/3/16 h a 1000 rpm a 23/30 °C com HLB, a pH 12 e 5 % (v:v) de MeOH; retroextração com 100 μ L de mistura MeOH:ACN (50:50, v:v) e posterior tratamento ultrassónico de 45 minutos.

Excluindo o tempo de extração de 2 horas, devido, provavelmente, a um erro experimental, é possível verificar que, para a maioria dos canabinoides, existe uma tendência de aumento das taxas de recuperação até às 3 horas. Com 3 horas de tempo de extração verifica-se que se obtêm valores máximos de recuperação para a maioria dos canabinoides, não existindo melhorias significativas para tempos superiores. Adicionalmente, também se optou por este tempo de duração devido a uma maior praticabilidade laboratorial comparando com as 16 horas.

3.4.4.3. Efeito da Velocidade de Agitação

O estudo do efeito da velocidade de agitação revela-se como um ensaio essencial, uma vez que pode acelerar o processo de extração ao promover a transferência de massa dos analitos presentes na matriz para a fase extrativa da barra. Por outro lado, são evitadas velocidades elevadas, por poderem causar elevada turbulência, provocando instabilidade no dispositivo e, consequentemente, afetar negativamente o processo de microextração. Enquanto alguns autores sustentam que não ocorre melhoria nas recuperações para valores acima de 750 rpm, outros indicam que velocidades de agitação mais elevadas, nomeadamente superiores a 1000, produzem resultados superiores (Prieto et al., 2010).

No presente ensaio, foram testadas três velocidades de agitação (700, 1000 e 1300 rpm), encontrando-se representados os resultados obtidos na figura 24.

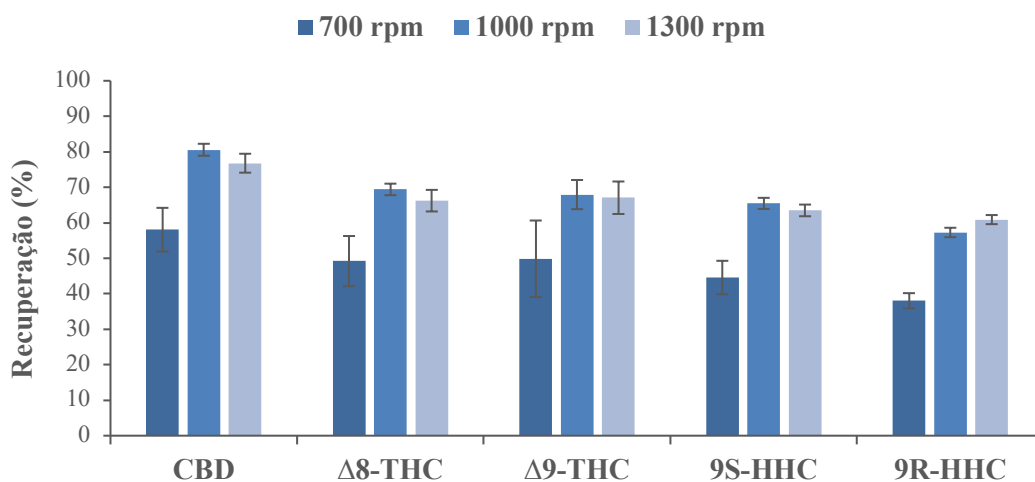


Figura 24. Efeito da velocidade de agitação na recuperação de canabinoides (CBD, Δ^8 -THC, Δ^9 -THC, 9S-HHC e 9R-HHC) por BA μ E/GC-MS. Condições de ensaio: microextração de 1 h a 700/1000/1300 rpm a 23/30 °C com HLB, a pH 12 e 5 % (v:v) de MeOH; retroextração com 100 μ L de mistura MeOH:ACN (50:50, v:v) e posterior tratamento ultrassónico de 45 minutos.

De acordo com os resultados obtidos, percebeu-se que a 700 rpm os valores de recuperação eram inferiores aos dos restantes ensaios. Comparando-se o ensaio a 1000 rpm com o ensaio a 1300 rpm, é possível verificar que, para a maioria dos canabinoides em estudo, existe uma muito ligeira melhoria nos valores de recuperação a 1000 rpm. Por esta razão, e pelo facto de a 1300 rpm existir uma maior instabilidade dos dispositivos, continuou-se a otimização com a velocidade de agitação estabelecida nos 1000 rpm.

3.5. Validação do Método

Após a fase de otimização da metodologia, encontram-se sumariadas as condições otimizadas para o método em estudo (tabela 4).

Tabela 4. Condições otimizadas para o método desenvolvido por BA μ E/GC-MS.

Condições Experimentais Otimizadas	
Material Sorvente	HLB
Solvente de Retroextração	MeOH:ACN (50:50, v:v)
Tempo de Retroextração	45 minutos
pH da Matriz	12
Modificador Orgânico	5 % MeOH
Força Iônica	0 % NaCl
Temperatura de Equilíbrio	30 °C
Tempo de Equilíbrio	3 horas
Velocidade de Agitação	1000 rpm

A otimização de todos os parâmetros permitiu obter recuperações médias para cada canabinoide em estudo compreendidas entre 57,3 e 80,6 %, as quais se encontram apresentadas na tabela 5.

Tabela 5. Recuperações médias dos canabinoides em estudo nas condições otimizadas do método BA μ E/GC-MS

Composto	Recuperação (%) $\pm$ RSD (%)
CBD	80,6 $\pm$ 1,7
9S-HHC	65,5 $\pm$ 1,6
Δ^8 -THC	69,4 $\pm$ 4,1
Δ^9 -THC	67,9 $\pm$ 1,6
9R-HHC	57,3 $\pm$ 1,3

Visando a aplicação do método a amostras de saliva reais, após a determinação das condições ótimas para o método BA μ E/GC-MS, procedeu-se à sua validação utilizando os parâmetros otimizados.

Para avaliar a seletividade do método, que se relaciona com a capacidade da metodologia em identificar e/ou quantificar os analitos de interesse numa determinada amostra perante a presença de outras substâncias, verificou-se que não existiam

interferentes nos mesmos tempos de retenção de cada analito através da análise de amostras em branco com a metodologia otimizada.

A sensibilidade da metodologia proposta foi determinada através da estimativa dos valores de LOD e LOQ, avaliada através da razão S/N de 3:1 e 10:1, obtendo-se valores de 1,25 e 4,13 ng/mL, respetivamente, para todos os canabinoides em estudo (tabela 6).

Para a construção de curvas de calibração e a respetiva avaliação da linearidade, prepararam-se soluções mistura dos canabinoides com diferentes concentrações que variaram entre 5 e 300 ng/mL, as quais demonstraram elevada linearidade, com coeficientes de determinação iguais ou superiores a 0,9963 (tabela 6).

Tabela 6. Valores de limites de deteção (LOD) e de quantificação (LOQ), gama de trabalho, equações das retas e coeficientes de determinação (r^2) obtidos para cada canabinoide em estudo para a validação da metodologia BAμE/GC-MS.

Composto	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	Gama de Trabalho (ng/mL)	Equação da Reta	r^2
CBD	1,25	4,13	5 - 300	$y = 0,0019x - 0,0119$	0,9971
9S-HHC				$y = 0,0012x + 0,0016$	0,9965
Δ^8-THC				$y = 0,0021x + 0,0074$	0,9978
Δ^9-THC				$y = 0,0014x + 0,0079$	0,9968
9R-HHC				$y = 0,0004x + 0,0061$	0,9963

A análise da distribuição dos resíduos sugeriu que os mesmos poderiam apresentar uma distribuição aleatória, o que indica, por conseguinte, a homocedasticidade nos dados obtidos, corroborando a sua relação linear (anexo IV). No entanto, este aspeto foi, ainda, avaliado através da aplicação dos testes estatísticos *Lack-of-Fit* e *Goodness-of-Fit*, de modo a examinar a uniformidade da distribuição dos dados. Estes testes baseiam-se na comparação de dois valores, o valor tabelado (F_{Tab}) e o valor calculado (F_{Calc}), com base num nível de confiança de 95 % (neste caso em particular), sendo que os dados são adequados à função linear quando F_{Tab} é superior a F_{Calc} .

Os resultados obtidos para os dois testes estatísticos demonstraram que todos os valores tabelados são superiores aos valores calculados, verificando-se, assim, homocedasticidade nos dados (tabela A.2. – anexo V).

Para a avaliação da precisão e justeza procedeu-se à análise de ensaios replicados com concentrações de 15, 150 e 240 ng/mL. A repetibilidade foi avaliada no mesmo dia ($n = 3$) e a precisão intermediária e a justeza foram avaliadas em três dias diferentes ($n = 9$). Foram calculados os respetivos valores de RSD (%) e de viés (%), que se encontram apresentados na tabela 7, na qual é possível verificar que todos os valores obtidos se encontraram dentro dos critérios de aceitação da norma da UNODC.

Tabela 7. Valores de RSD (%) para o estudo da repetibilidade e da precisão intermediária e de viés (%) para o estudo da justeza inter-dia obtidos para a validação da metodologia BA μ E/GC-MS.

Composto	Repetibilidade ^a (RSD %)			Precisão Intermediária ^b (RSD %)			Justeza Inter-dia ^b (Viés %)		
	Nível de Concentração								
	Baixo ^c	Médio ^d	Alto ^e	Baixo ^c	Médio ^d	Alto ^e	Baixo ^c	Médio ^d	Alto ^e
CBD	17,5	11,3	12,7	13,2	9,5	8,5	19,2	-3,4	-2,2
9S-HHC	19,0	13,6	14,2	17,2	11,4	10,3	-18,8	6,4	5,6
Δ ⁸ -THC	16,0	12,9	14,7	12,3	10,5	9,4	-18,1	1,8	6,8
Δ ⁹ -THC	9,5	12,1	14,5	6,1	8,6	9,5	-3,7	6,5	13,1
9R-HHC	8,4	11,7	10,0	5,8	8,8	7,8	5,0	13,2	10,9

^a $n = 3$; ^b $n = 9$; ^c Nível de Concentração Baixo = 15 ng/mL;

^d Nível de Concentração Médio = 150 ng/mL; ^e Nível de Concentração Alto = 240 ng/mL.

3.6. Aplicação a Amostras Reais

O presente trabalho propõe a utilização de BA μ E/GC-MS para quantificação de canabinoides naturais e semissintéticos em saliva. Para tal, aplicou-se a metodologia otimizada e validada em três amostras de saliva de voluntários fumadores de HHC recolhidas trinta minutos após o consumo de produtos de cânabis.

A identificação dos canabinoides existentes nas amostras foi realizada através da comparação dos tempos de retenção e dos respetivos espectros de massa dos picos cromatográficos. Assim, para a amostra 1 foi possível identificar CBD, Δ^9 -THC e os dois diastereoisómeros do HHC, enquanto que nas amostras 2 e 3 se identificaram todos os canabinoides em estudo. Os cromatogramas relativos à análise de uma solução controlo e da amostra 2 encontram-se apresentados na figura 25.

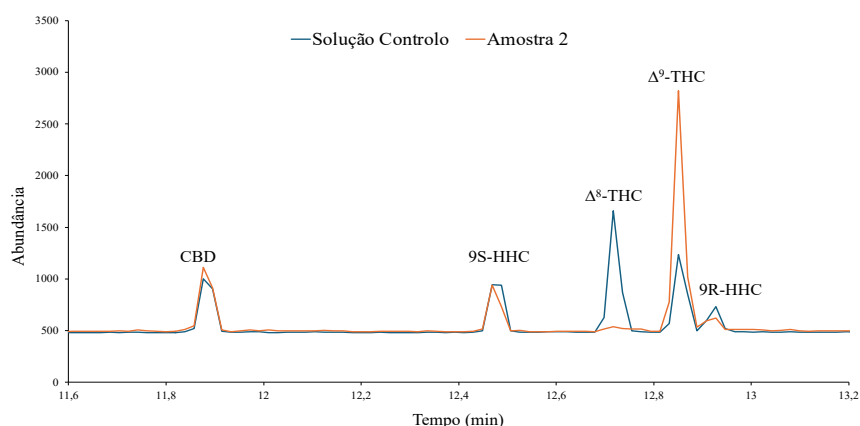


Figura 25. Cromatograma obtido por BAμE/GC-MS nas condições experimentais otimizadas, relativo a uma solução controlo (2,5 μg/mL) e à amostra 2.

A partir das equações das retas de CBD, Δ^8 -THC e dos diastereoisómeros do HHC, foi possível determinar a concentração destes compostos nas salivas dos voluntários. No entanto, as concentrações de Δ^9 -THC encontravam-se acima da gama linear definida, pelo que, no sentido de obter uma ideia da sua concentração, efetuou-se uma extrapolação da gama linear proposta.

Relativamente às concentrações de CBD, estas variaram entre 19,2 e 191,2 ng/mL, enquanto que as de Δ^9 -THC foram as mais superiores, apresentando resultados entre 486,6 ng/mL e 672,9 ng/mL (valores obtidos por extrapolação). No estudo de Anizan e colaboradores (2013) é referido que as concentrações máximas de CBD trinta minutos após consumo variaram entre 4,5 e 255 ng/mL para fumadores frequentes e 1,9 e 41,1 ng/mL para fumadores ocasionais. No entanto, as concentrações médias foram de 21 ng/mL e 14,6 ng/mL, respetivamente. Já para o Δ^9 -THC as concentrações variaram entre 189 e 6508 ng/mL para fumadores frequentes (sendo a média de 517 ng/mL) e 84,5 e 1471 ng/mL (com uma média de 533 ng/mL) para fumadores ocasionais. As concentrações obtidas de Δ^9 -THC e CBD encontram-se, então, na mesma ordem das descritas na literatura.

O canabinoide Δ^8 -THC foi aquele que apresentou menores valores de concentração, estando abaixo do LOD na amostra 1 e do LOQ na amostra 3. O estudo desenvolvido por Lin et al. (2022) para quantificação de vários canabinoides em saliva por LC-MS/MS demonstrou que a concentração de Δ^8 -THC pode variar bastante (entre 0,2 e 925,7 ng/mL). As baixas concentrações podem ser explicadas pelos teores ínfimos de Δ^8 -THC que podem ser encontrados nas plantas e, consequentemente serem

consumidos involuntariamente pelos indivíduos. Por outro lado, quando as concentrações de Δ^8 -THC são superiores, pode considerar-se que o consumo não foi involuntário. Assim, a concentração determinada de 4,4 ng/mL na amostra 2 também está de acordo com a descrita na literatura.

Foi possível determinar concentrações de 9S-HHC entre 9,5 e 190,7 ng/mL e de 9R-HHC entre 47,1 e 299,4 ng/mL. A diferença entre estas concentrações pode relacionar-se com as condições de síntese semissintética. Estes valores encontram-se de acordo com aqueles descritos na literatura para a análise de hexahidrocanabinol em saliva por diferentes métodos analíticos (Bottinelli et al., 2024; Di Trana et al., 2024; Kobidze et al., 2024). No entanto, comparativamente ao trabalho de Höfert et al. (2023), observa-se que a metodologia BA μ E/GC-MS em amostras de saliva apresenta resultados cerca de dez vezes superiores àqueles obtidos em sangue por GC-MS.

As concentrações determinadas estão apresentadas na tabela 8.

Tabela 8. Concentrações dos canabinoides em estudo em amostras de saliva reais de voluntários determinadas por BA μ E/GC-MS.

Composto	Concentração (ng/mL)		
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
CBD	67,4	191,2	19,2
9S-HHC	68,7	190,7	9,5
Δ^8-THC	< LOD	4,4	< LOQ
Δ^9-THC	486,6	672,9	668,0
9R-HHC	47,1	143,1	299,4

3.7. Comparação com Estudos Anteriores

Na tabela 9 encontra-se apresentada uma comparação entre métodos previamente publicados relativos a amostras de saliva e o presente estudo. Com base na pesquisa científica, foi possível perceber que o Δ^9 -THC e o CBD são os fitocannabinoides mais investigados, existindo diversos artigos sobre estes compostos e sobre metodologias para a sua determinação. Por outro lado, não existem muitos trabalhos científicos sobre o Δ^8 -THC e o HHC, nem sobre abordagens para a sua análise. Na análise de amostras de saliva, ao contrário do presente trabalho, a maioria da literatura refere a utilização de um dispositivo de colheita de amostra, o que se pode constituir como um fator de diluição das amostras. A gama de trabalho proposta é mais abrangente comparada com a maioria dos trabalhos encontrados na literatura.

Tabela 9. Comparação de métodos de recolha e analíticos, recuperação (%), LOD (ng/mL), LOQ (ng/mL) e gama linear (ng/mL) de publicações científicas e do presente trabalho.

Composto	Método Recolha	Método Analítico	Recuperação (%)	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	Gama Linear (ng/mL)	Referência
Δ^8 -THC	Quantisal TM	LC-MS/MS	80,0 – 89,5	-	0,1	0,10 – 800	Lin et al. (2022)
Δ^9 -THC							
CBD	Quantisal TM	SLE-LC-MS	53 – 65	0,1– 0,5	0,5 – 1,5	1 – 100	Swaminathan et al. (2024)
Δ^9 -THC	Statsure Saliva Sampler TM	2D-GC-MS	-	-	0,5 – 15	-	Anizan et al. (2013)
CBD	Direta	SPME-GC-MS	-	1– 5	1 – 10	10 – 1000	Anzillotti et al. (2019)
Δ^9 -THC	Greiner Bio-One Saliva Collection System	LC-MS/MS	51,8	-	-	0,5 – 25	Reinstadler et al. (2023)
	-	QuEChERS - GC-MS/MS	99,2 – 101,6	0,2	1	1 – 150	Di Trana et al. (2024)
9R-HHC	-	Precipitação Proteica - LC-MS/MS	112 – 119	0,1	0,25	0,25 – 240	Kobidze et al. (2024)
9S-HHC							
	FLOQSwab®	LC-MS/MS	-	0,5	-	-	Bottinelli et al. (2024)
Δ^8 -THC	Direta	BA μ E/GC-MS	57,3 – 80,6	1,25	4,13	5 – 300	Presente trabalho
Δ^9 -THC							
CBD							
9R-HHC							
9S-HHC							

QuEChERS: *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe technique.*

4. Conclusões

Atualmente, a canábis é a substância ilícita com maior prevalência de consumo a nível global, sendo que, nos últimos anos, a sua utilização tem vindo a aumentar, não só a nível recreativo, como também a nível medicinal. Inerente a esta tendência de aumento da sua utilização, vão surgindo nos mercados, legais e ilegais, novos canabinoides, que se constituem como um perigo à sociedade e à saúde pública.

No âmbito da toxicologia forense, o presente trabalho visou o desenvolvimento de uma nova metodologia verde, baseada na BA μ E e análise por GC-MS, para a análise de canabinoides naturais e semissintéticos (CBD, Δ^8 -THC, Δ^9 -THC e HHC) numa matriz biológica não invasiva, designadamente a saliva. Para tal, numa fase inicial, e de modo a obterem-se padrões analíticos de HHC, purificou-se este composto a partir de amostras de canábis herbal por HPLC-UV/Vis e, através de técnicas para confirmação estrutural dos analitos obtidos, nomeadamente GC-MS, LC-MS e NMR, foi possível verificar que os mesmos se tratavam dos diastereoisómeros do HHC. A pureza obtida por GC-MS foi de 72 % para 9R-HHC e 91 % para 9S-HHC. Deste modo foram utilizados como padrões analíticos no decorrer do trabalho.

A otimização e calibração de parâmetros instrumentais do sistema GC-MS permitiu a separação dos canabinoides em estudo em aproximadamente 16 minutos. Estimaram-se LOD entre 16 (para o CBD, Δ^8 -THC e Δ^9 -THC) e 39 ng/mL (para o 9R-HHC e o 9S-HHC) e LOQ de 53 e 130 ng/mL, respetivamente. Verificou-se uma boa linearidade ($r^2 \geq 0,9968$) na gama de trabalho de 160 a 5000 ng/mL, sendo que todos os valores relativos à precisão e justeza se encontraram dentro dos parâmetros referidos na guia diretiva da UNODC (< 20 %) na qual este trabalho foi baseado.

Posteriormente, procedeu-se à otimização da metodologia, que consistiu no estudo de diversos parâmetros que poderiam influenciar a eficiência da BA μ E. As condições otimizadas foram de 3 horas de extração a 1000 rpm e 30 °C com 5 % MeOH e a pH 12, seguida de retroextração com uma mistura de MeOH e ACN (50:50, v:v) durante 45 minutos sob tratamento ultrassónico utilizando a fase polimérica HLB. A otimização de todos os parâmetros em estudo permitiu obter recuperações médias para cada canabinoide em estudo compreendidas entre 57,3 (9R-HHC) e 80,6 % (CBD).

De seguida, procedeu-se à validação da metodologia BA μ E/GC-MS em amostras de saliva, tendo-se estimado valores de LOD de 1,25 ng/mL e LOQ de 4,13 ng/mL,

revelando uma boa sensibilidade da metodologia. Na gama de trabalho de 5 a 300 ng/mL obteve-se boa linearidade ($r^2 \geq 0,9963$), sendo a mesma confirmada pelos testes estatísticos *Lack-of-Fit* e *Goodness-of-Fit*. Para a repetibilidade e precisão intermediária obtiveram-se valores de RSD (%) inferiores a 14,7 e 19,0 % para a menor concentração e, para a justeza, obtiveram-se valores de viés (%) inferiores a 13,2 e 19,2 % para a concentração inferior. Estes resultados encontram-se em concordância com aqueles apresentados pela norma da UNODC (< 20 %). O método BA μ E/GC-MS otimizado e validado foi, posteriormente, aplicado a três amostras de saliva de voluntários. As concentrações encontradas estão na mesma ordem de magnitudes encontradas por outros autores.

Em conclusão, foi possível cumprir os objetivos do trabalho, tendo sido desenvolvida e validada uma nova metodologia verde, empregando os princípios da GAC, para a determinação de canabinoides naturais e semissintéticos numa matriz não invasiva, a saliva. Adicionalmente, foi possível obter bons resultados sem a utilização de dispositivos de recolha de saliva, o que se apresenta como uma vantagem do método. A metodologia revelou-se uma alternativa analítica simples, de baixo custo e miniaturizada, uma vez que utiliza baixo volume de amostra e de solventes orgânicos para as análises, podendo, futuramente, ser empregue como método de rotina no laboratório. Numa sociedade em que o aparecimento de canabinoides produzidos em laboratórios ilegais é considerável, foi imperativo o desenvolvimento de um método de rotina que se adapte e permita a análise destes compostos em contexto forense, toxicológico e clínico.

Como perspetivas futuras, propõe-se a diluição das amostras, para a correta determinação de Δ^9 -THC. Pretende-se, também, a realização de testes de integridade de diluição e a análise de um maior número de amostras reais. A adição de outros canabinoides semissintéticos e sintéticos que vão surgindo e, ciclicamente, sendo proibidos no mercado, poderá ser vantajoso para a obtenção de um método mais abrangente. A extensão desta metodologia a diferentes matrizes biológicas alternativas e não invasivas, como amostras de cabelo, poderá, também, ser interessante. Sugere-se, ainda, a utilização de uma instrumentação diferente da utilizada, como LC-MS, visando a obtenção de uma técnica mais sensível.

5. Referências Bibliográficas

- Abel, E. L. (1980). *Marihuana - The First Twelve Thousand Years* (1.^a ed.). Springer Science & Business Media. <https://doi.org/10.1007/978-1-4899-2189-5>
- Adams, R. (1940). Marihuana. *Science*, 92(2380), 115–119. <https://www.jstor.org/stable/1665648>
- Adams, T. K., Masondo, N. A., Malatsi, P., & Makunga, N. P. (2021). Cannabis sativa: From Therapeutic Uses to Micropropagation and Beyond. *Plants*, 10(2078), 1–34. <https://doi.org/10.3390/plants10102078>
- Aguillón, A. R., Leão, R. A. C., Miranda, L. S. M., & de Souza, R. O. M. A. (2021). Cannabidiol Discovery and Synthesis—a Target-Oriented Analysis in Drug Production Processes. *Chemistry - A European Journal*, 27(18), 5577–5600. <https://doi.org/10.1002/chem.202002887>
- Ahmad, S. M., Almeida, C., Neng, N. R., & Nogueira, J. M. F. (2014). Application of bar adsorptive microextraction (BA μ E) for anti-doping control screening of anabolic steroids in urine matrices. *Journal of Chromatography B*, 969, 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.07.040>
- Ahmad, S. M., Almeida, C., Neng, N. R., & Nogueira, J. M. F. (2016). Bar adsorptive microextraction (BA μ E) coated with mixed sorbent phases-Enhanced selectivity for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in real matrices in combination with capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B*, 1008, 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.11.018>
- Ahmad, S. M., Calado, B. B. C., Oliveira, M. N., Neng, N. R., & Nogueira, J. M. F. (2020). Bar Adsorptive Microextraction Coated with Carbon-Based Phase Mixtures for Performance-Enhancement to Monitor Selected Benzotriazoles, Benzothiazoles, and Benzenesulfonamides in Environmental Water Matrices. *Molecules*, 25(9), 1–13. <https://doi.org/10.3390/molecules25092133>
- Ahmad, S. M., Ide, A. H., Neng, N. R., & Nogueira, J. M. F. (2017). Application of bar adsorptive microextraction to determine trace organic micro-pollutants in environmental water matrices. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 97(5), 484–498. <https://doi.org/10.1080/03067319.2017.1324024>

- Aizpurua-Olaizola, O., Soydaner, U., Öztürk, E., Schibano, D., Simsir, Y., Navarro, P., Etxebarria, N., & Usobiaga, A. (2016). Evolution of the Cannabinoid and Terpene Content during the Growth of Cannabis sativa Plants from Different Chemotypes. *Journal of Natural Products*, 79(2), 324–331. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00949>
- Albayram, O., Alferink, J., Pitsch, J., Piyanova, A., Neitzert, K., Poppensieker, K., Mauer, D., Michel, K., Legler, A., Becker, A., Monory, K., Lutz, B., Zimmer, A., & Bilkei-Gorzo, A. (2011). Role of CB1 cannabinoid receptors on GABAergic neurons in brain aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(27), 11256–11261. <https://doi.org/10.1073/pnas.1016442108>
- Almeida, C., Ahmad, S. M., & Nogueira, J. M. F. (2017). Bar adsorptive microextraction technique - application for the determination of pharmaceuticals in real matrices. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409(8), 2093–2106. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-0156-y>
- Almeida, C., & Nogueira, J. M. F. (2012). Comparison of the selectivity of different sorbent phases for bar adsorptive microextraction-Application to trace level analysis of fungicides in real matrices. *Journal of Chromatography A*, 1265, 7–16. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.09.047>
- Almeida, C., & Nogueira, J. M. F. (2014). Determination of trace levels of parabens in real matrices by bar adsorptive microextraction using selective sorbent phases. *Journal of Chromatography A*, 1348, 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.04.057>
- Almeida, C., & Nogueira, J. M. F. (2015). Determination of steroid sex hormones in real matrices by bar adsorptive microextraction (BA μ E). *Talanta*, 136, 145–154. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.11.013>
- Almeida, C. V. P., Neng, N. R., Nogueira, J. M. F., & Ruivo, J. (2024). Application of a bar adsorptive microextraction based methodology for doping control of alkylamine stimulants in urine matrices. *Journal of Chromatography B*, 1234. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2024.124006>
- Alves, V. L., Gonçalves, J. L., Aguiar, J., Teixeira, H. M., & Câmara, J. S. (2020). The synthetic cannabinoids phenomenon: from structure to toxicological properties. A

- review. *Critical Reviews in Toxicology*, 50(5), 359–382. <https://doi.org/10.1080/10408444.2020.1762539>
- Amaral, N. M. (2024). *Purificação de Hexahidrocanabinol de Material Resinoso e Confirmação por Cromatografia Gasosa-Espetrometria de Massa*.
- Andre, C. M., Hausman, J. F., & Guerriero, G. (2016). Cannabis sativa: The plant of the thousand and one molecules. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00019>
- Anizan, S., Milman, G., Desrosiers, N., Barnes, A. J., Gorelick, D. A., & Huestis, M. A. (2013). Oral fluid cannabinoid concentrations following controlled smoked cannabis in chronic frequent and occasional smokers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405, 8451–8461. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7291-5>
- Antunes, M., Barroso, M., & Gallardo, E. (2023). Analysis of Cannabinoids in Biological Specimens: An Update. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 20(3), 1–36. <https://doi.org/10.3390/ijerph20032312>
- Anzillotti, L., Marezza, F., Calò, L., Andreoli, R., Agazzi, S., Bianchi, F., Careri, M., & Cecchi, R. (2019). Determination of synthetic and natural cannabinoids in oral fluid by solid-phase microextraction coupled to gas chromatography/mass spectrometry: A pilot study. *Talanta*, 201, 335–341. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.04.029>
- Armenta, S., Garrigues, S., & de la Guardia, M. (2008). Green Analytical Chemistry. *Trends in Analytical Chemistry*, 27(6), 497–511. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.05.003>
- Arthur, C., & Pawliszyn, J. (1990). Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers. *Analytical Chemistry*, 62(19), 2145–2148. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/ac00218a019>
- Arvidsson, M., Ullah, S., Franck, J., Dahl, M., & Beck, O. (2019). Drug abuse screening with exhaled breath and oral fluid in adults with substance use disorder. *Drug Testing and Analysis*, 11(1), 27–32. <https://doi.org/10.1002/dta.2384>
- Awad, H., Khamis, M. M., & El-Aneed, A. (2015). Mass spectrometry, Review of the Basics: Ionization. *Applied Spectroscopy Reviews*, 50(2), 158–175. <https://doi.org/10.1080/05704928.2014.954046>

- Balsa, C., Vital, C., & Urbano, C. (2023). *V Inquérito Nacional ao Consumo de Substâncias Psicoativas na População Geral, Portugal 2022*. <https://www.fcsh.unl.pt/static/documentos/informacao/V%20Inqu%C3%A9rito%20Nacional%20ao%20Consumo%20de%20Subst%C3%A2ncias%20Psicoativas.pdf>
- Bie, B., Wu, J., Foss, J. F., & Naguib, M. (2018). An overview of the cannabinoid type 2 (CB2) receptor system and its therapeutic potential. *Current Opinion in Anaesthesiology*, 31(4), 407–414. <https://doi.org/10.1097/ACO.0000000000000616>
- Bonini, S. A., Premoli, M., Tambaro, S., Kumar, A., Maccarinelli, G., Memo, M., & Mastinu, A. (2018). Cannabis sativa: A comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history. *Journal of Ethnopharmacology*, 227, 300–315. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.09.004>
- Bottinelli, C., Baradian, P., Poly, A., Hoizey, G., & Chatenay, C. (2024). Identification and quantification of both isomers of hexahydrocannabinol, (9R)-hexahydrocannabinol and (9S)-hexahydrocannabinol, in three different matrices by mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 38(7), 1–11. <https://doi.org/10.1002/rcm.9711>
- Brighenti, V., Protti, M., Anceschi, L., Zanardi, C., Mercolini, L., & Pellati, F. (2021). Emerging challenges in the extraction, analysis and bioanalysis of cannabidiol and related compounds. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 192, 1–77. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113633>
- Cabral, T. S. (2017). The 15th anniversary of the Portuguese drug policy: Its history, its success and its future. *Drug Science, Policy and Law*, 3, 1–5. <https://doi.org/10.1177/2050324516683640>
- Camino-Sánchez, F. J., Rodríguez-Gómez, R., Zafra-Gómez, A., Santos-Fandila, A., & Vilchez, J. L. (2014). Stir bar sorptive extraction: Recent applications, limitations and future trends. *Talanta*, 130, 388–399. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.07.022>
- Caprari, C., Ferri, E., Vandelli, M. A., Citti, C., & Cannazza, G. (2024). An emerging trend in Novel Psychoactive Substances (NPSs): designer THC. *Journal of Cannabis Research*, 6(1), 1–34. <https://doi.org/10.1186/s42238-024-00226-y>

- Casati, S., Rota, P., Bergamaschi, R., Palmisano, E., La Rocca, P., Ravelli, A., Angeli, I., Minoli, M., Roda, G., & Orioli, M. (2022). Hexahydrocannabinol on the Light Cannabis Market: The Latest “New” Entry. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 9, 1–21. <https://doi.org/10.1089/can.2022.0253>
- Castaneto, M. S., Wohlfarth, A., Desrosiers, N. A., Hartman, R. L., Gorelick, D. A., & Huestis, M. A. (2015). Synthetic cannabinoids pharmacokinetics and detection methods in biological matrices. *Drug Metabolism Reviews*, 47(2), 124–174. <https://doi.org/10.3109/03602532.2015.1029635>
- Chaves das Neves, H. J., & Costa Freitas, A. M. (1996). *Introdução à Cromatografia Gás-líquido de Alta Resolução* (1.^a ed.). Dias de Sousa, LDA.
- Collins, A., Ramirez, G., Tesfatsion, T., Ray, K. P., Caudill, S., & Cruces, W. (2023). Synthesis and Characterization of the Diastereomers of HHC and H4CBD. *Natural Product Communications*, 18(3), 1–6. <https://doi.org/10.1177/1934578X231158910>
- Correia, B., Ahmad, S., & Quintas, A. (2023). Determination of phytocannabinoids in cannabis samples by ultrasound-assisted solid-liquid extraction and high-performance liquid chromatography with diode array detector analysis. *Journal of Chromatography A*, 1705, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.464191>
- Correia, B., Fernandes, J., Botica, M. J., Ferreira, C., & Quintas, A. (2022). Novel Psychoactive Substances: The Razor’s Edge between Therapeutical Potential and Psychoactive Recreational Misuse. *Medicines*, 9(3), 1–31. <https://doi.org/10.3390/medicines9030019>
- Crocq, M. A. (2020). History of cannabis and the endocannabinoid system. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 22(3), 223–228. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2020.22.3/mcrocq>
- De Souza, M. P., Rizzetti, T. M., Francesquett, J. Z., Prestes, O. D., & Zanella, R. (2018). Bar adsorptive microextraction (BA μ E) with a polymeric sorbent for the determination of emerging contaminants in water samples by ultra-high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Analytical Methods*, 10(7), 697–705. <https://doi.org/10.1039/c7ay02792c>
- Dhein, S. (2020). Different Effects of Cannabis Abuse on Adolescent and Adult Brain. *Pharmacology*, 105(11–12), 609–617. <https://doi.org/10.1159/000509377>

- Di Trana, A., Sprega, G., Kobidze, G., Taoussi, O., Lo Faro, A. F., Bambagiotti, G., Montanari, E., Fede, M. S., Carlier, J., Tini, A., Busardò, F. P., Di Giorgi, A., & Pichini, S. (2024). QuEChERS Extraction and Simultaneous Quantification in GC-MS/MS of Hexahydrocannabinol Epimers and Their Metabolites in Whole Blood, Urine, and Oral Fluid. *Molecules*, 29(14), 1–13. <https://doi.org/10.3390/molecules29143440>
- Diário da República Eletrónico. (2000). *Lei n.º 30/2000, de 29 de Novembro*. <https://diariodarepublica.pt/dr/detalhe/lei/30-2000-599720>
- Diário da República Eletrónico. (2013). *Portaria n.º 154/2013, de 17 de abril*. <https://files.diariodarepublica.pt/1s/2013/04/07500/0225402257.pdf>
- Diário da República Eletrónico. (2018). *Lei n.º 33/2018, de 18 de julho* (pp. 3241–3242). <https://diariodarepublica.pt/dr/detalhe/lei/33-2018-115712242>
- Diário da República Eletrónico. (2019). *Lei n.º 58/2019, de 8 de agosto* (pp. 3–40). <https://files.diariodarepublica.pt/1s/2019/08/15100/0000300040.pdf>
- Diário da República Eletrónico. (2020). *Decreto Regulamentar n.º 2/2020, de 4 de agosto*. <https://files.diariodarepublica.pt/1s/2020/08/15000/0000800010.pdf>
- Diário da República Eletrónico. (2021). *Portaria n.º 83/2021, de 15 de abril*. <https://files.diariodarepublica.pt/1s/2021/04/07300/0000500012.pdf>
- Docampo-Palacios, M. L., Ramirez, G. A., Tesfatsion, T. T., & Cruces, W. (2024). Cannabinoid Ethers: Identification, Binding interactions, and their ADME Properties Cannabinoid Ethers: Identification, Binding interactions, and their ADME properties. *Cannabis Science and Technology*, 7(3), 30–39. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-4523212/v1>
- Durydivka, O., Palivec, P., Gazdarica, M., Mackie, K., Blahos, J., & Kuchar, M. (2024). Hexahydrocannabinol (HHC) and Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) driven activation of cannabinoid receptor 1 results in biased intracellular signaling. *Scientific Reports*, 14(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-58845-7>
- EMCDDA. (2017). *Perspectives on drugs: Synthetic cannabinoids in Europe*. https://www.emcdda.europa.eu/publications/pods/synthetic-cannabinoids_en
- EMCDDA. (2018). *Cannabis Legislation in Europe*. <https://doi.org/10.2810/930744>

- EMCDDA. (2023a). *Cannabis - the current situation in Europe (European Drug Report 2023)*. https://www.emcdda.europa.eu/publications/european-drug-report/2023/cannabis_en
- EMCDDA. (2023b). *Hexahydrocannabinol (HHC) and related substances*. <https://doi.org/10.2810/852912>
- EMCDDA. (2024a). *European Drug Report 2024: Cannabis - the Current Situation in Europe*. https://www.emcdda.europa.eu/sites/default/files/pdf/31813_en.pdf?238902
- EMCDDA. (2024b). *European Drug Report 2024: New Psychoactive Substances - The Current Situation in Europe*. <https://doi.org/10.2810/91693>
- Ernst, L., Krüger, K., Lindigkeit, R., Schiebel, H. M., & Beuerle, T. (2012). Synthetic Cannabinoids in «Spice-Like» Herbal Blends: First Appearance of JWH-307 and Recurrence of JWH-018 on the German Market. *Forensic Science International*, 222(1–3), 216–222. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2012.05.027>
- Escohotado, A. (1998). *Historia General de las Drogas* (7.^a ed.). Alianza Editorial.
- ENFSI. (2020). *Best Practice Manual (BPM) for controlled drug analysis*. <https://enfsi.eu/wp-content/uploads/2017/06/BPM-Control-drug-Analysis-final-version.-21-02-2020.pdf>
- Farag, S., & Kayser, O. (2017). The Cannabis Plant: Botanical Aspects. Em V. R. Preedy (Ed.), *Handbook of Cannabis and Related Pathologies: Biology, Pharmacology, Diagnosis, and Treatment* (pp. 3–12). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800756-3.00001-6>
- Filipiuc, L. E., Ababei, D. C., Alexa-Stratulat, T., Pricope, C. V., Bild, V., Stefanescu, R., Stanciu, G. D., & Tamba, B. I. (2021). Major Phytocannabinoids and Their Related Compounds: Should We Only Search for Drugs That Act on Cannabinoid Receptors? *Pharmaceutics*, 13(11), 1–35. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13111823>
- Gorziza, R., Duarte, J., González, M., Arroyo-Mora, L., & Limberger, R. (2021). A systematic review of quantitative analysis of cannabinoids in oral fluid. *Journal of Forensic Sciences*, 66(6), 2104–2112. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.14862>

- Graziano, S., Vari, M. R., Pichini, S., Busardo, F. P., Cassano, T., & Di Trana, A. (2023). Hexahydrocannabinol Pharmacology, Toxicology, and Analysis: The First Evidence for a Recent New Psychoactive Substance. *Current Neuropharmacology*, 21(12), 2424–2430. <https://doi.org/10.2174/1570159x21666230623104624>
- Gülck, T., & Möller, B. (2020). Phytocannabinoids: Origins and Biosynthesis. *Trends in Plant Science*, 25(10), 985–1004. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.05.005>
- Gunderson, E. W. (2013). Synthetic Cannabinoids: A New Frontier of Designer Drugs. *Annals of Internal Medicine*, 159(8), 1–3. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-159-8-201310150-00707>
- Hädener, M., König, S., & Weinmann, W. (2019). Quantitative determination of CBD and THC and their acid precursors in confiscated cannabis samples by HPLC-DAD. *Forensic Science International*, 299, 142–150. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.03.046>
- Hage, D. S. (2018). Chromatography. Em N. Rifai, A. R. Horvath, & C. T. Wittwer (Eds.), *Principles and Applications of Clinical Mass Spectrometry: Small Molecules, Peptides, and Pathogens* (pp. 1–32). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816063-3.00001-3>
- Haghdoust, M., López de los Santos, Y., Brunstetter, M., Ferretti, M. L., Roberts, M., & Bonn-Miller, M. O. (2024). Using In Silico Molecular Docking to Explain Differences in Receptor Binding Behavior of HHC and THCV Isomers: Revealing New Binding Modes. *Pharmaceuticals*, 17(5), 1–13. <https://doi.org/10.3390/ph17050637>
- Hampson, A. J., & Grimaldi, M. (2001). Cannabinoid receptor activation and elevated cyclic AMP reduce glutamate neurotoxicity. *European Journal of Neuroscience*, 13(8), 1529–1536. <https://doi.org/10.1046/j.0953-816x.2001.01536.x>
- Harris, D. C. (2007). *Quantitative Chemical Analysis* (7.^a ed.). W. H. Freeman and Company. <https://archive.org/details/QuantitativeChemicalAnalysisHarris/page/n235/mode/2up>
- Harris, D. C. (2010). *Quantitative Chemical Analysis* (8.^a ed.). W. H. Freeman and Company.

- https://www.academia.edu/31178443/Harris_Quantitative_Chemical_Analysis_8th_edition
- Haspolat, Y. K., Uysal, C., & Karabel, M. (2023). *Narcotics*. Orient Publications. https://www.researchgate.net/publication/375083463_NARCOTICS
- Hazekamp, A., Simons, R., Peltenburg-Looman, A., Sengers, M., Van Zweden, R., & Verpoorte, R. (2004). Preparative Isolation of Cannabinoids from Cannabis sativa by Centrifugal Partition Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 27(15), 2421–2439. <https://doi.org/10.1081/JLC-200028170>
- Höfert, L., Becker, S., Dreßler, J., & Baumann, S. (2023). Quantification of (9R)- and (9S)-hexahydrocannabinol (HHC) via GC–MS in serum/plasma samples from drivers suspected of cannabis consumption and immunological detection of HHC and related substances in serum, urine, and saliva. *Drug Testing and Analysis*, 16(5), 1–9. <https://doi.org/10.1002/dta.3570>
- Hoffman, A., Laaris, N., Kawamura, M., Masino, S., & Lupica, C. (2010). Control of cannabinoid CB1 receptor function on glutamate axon terminals by endogenous adenosine acting at A1 receptors. *The Journal of Neuroscience*, 30(2), 545–555. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4920-09.2010>
- Hourfane, S., Mechqoq, H., Bekkali, A. Y., Rocha, J. M., & El Aouad, N. (2023). A Comprehensive Review on Cannabis sativa Ethnobotany, Phytochemistry, Molecular Docking and Biological Activities. *Plants*, 12(6), 1–43. <https://doi.org/10.3390/plants12061245>
- Ide, A. H., & Nogueira, J. M. F. (2018). New-generation bar adsorptive microextraction (BA μ E) devices for a better eco-user-friendly analytical approach—Application for the determination of antidepressant pharmaceuticals in biological fluids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 153, 126–134. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.02.001>
- Jain, B., Jain, R., Nowak, P. M., Ali, N., Ansari, M. N., Kabir, A., Chandravanshi, L. P., & Sharma, S. (2024). Comparison of various sample preparation methods for benzodiazepines in terms of the principles of white analytical chemistry. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 171, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2024.117524>

- Jain, R., & Singh, R. (2016). Microextraction techniques for analysis of cannabinoids. *Trends in Analytical Chemistry*, 80, 156–166. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.03.012>
- Janssens, L. K., Van Uytfanghe, K., Williams, J. B., Hering, K. W., Iula, D. M., & Stove, C. P. (2024). Investigation of the intrinsic cannabinoid activity of hemp-derived and semisynthetic cannabinoids with β -arrestin2 recruitment assays—and how this matters for the harm potential of seized drugs. *Archives of Toxicology*, 98, 2619–2630. <https://doi.org/10.1007/s00204-024-03769-4>
- Kaminski, K. P., Hoeng, J., Goffman, F., Schlage, W. K., & Latino, D. (2024). Opportunities, Challenges, and Scientific Progress in Hemp Crops. *Molecules*, 29(10), 1–20. <https://doi.org/10.3390/molecules29102397>
- Kazakevich, Y., & LoBrutto, R. (2007). *HPLC for Pharmaceutical Scientists* (1.^a ed.). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/0470087951>
- Kobidze, G., Sprega, G., Montanari, E., Taoussi, O., Bambagiotti, G., Fede, M. S., Di Trana, A., Pichini, S., Busardò, F. P., Tini, A., Chankvetadze, B., & Faro, A. F. Lo. (2024). The first LC-MS/MS stereoselective bioanalytical methods to quantitatively detect 9R- and 9S-hexahydrocannabinols and their metabolites in human blood, oral fluid and urine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 240, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2023.115918>
- Kruger, J. S., & Kruger, D. J. (2022). Delta-8-THC: Delta-9-THC's nicer younger sibling? *Journal of Cannabis Research*, 4(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s42238-021-00115-8>
- Kumar, P., Mahato, D. K., Kamle, M., Borah, R., Sharma, B., Pandhi, S., Tripathi, V., Yadav, H. S., Devi, S., Patil, U., Xiao, J., & Mishra, A. K. (2021). Pharmacological properties, therapeutic potential, and legal status of Cannabis sativa L.: An overview. *Phytotherapy Research*, 35(11), 6010–6029. <https://doi.org/10.1002/ptr.7213>
- Lambert, D. M., & Fowler, C. J. (2005). The Endocannabinoid System: Drug Targets, Lead Compounds, and Potential Therapeutic Applications. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48(16), 5059–5087. <https://doi.org/10.1021/jm058183t>

- Lapierre, É., Monthony, A. S., & Torkamaneh, D. (2023). Genomics-based taxonomy to clarify cannabis classification. *Genome*, 66(8), 202–211. <https://doi.org/10.1139/gen-2023-0005>
- Lazarjani, M., Torres, S., Hooker, T., Fowlie, C., Young, O., & Seyfoddin, A. (2020). Methods for quantification of cannabinoids: A narrative review. *Journal of Cannabis Research*, 2(35), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s42238-020-00040-2>
- Leghissa, A., Hildenbrand, Z. L., & Schug, K. A. (2018). A Review of Methods for the Chemical Characterization of Cannabis Natural Products. *Journal of Separation Science*, 41(1), 398–415. <https://doi.org/10.1002/jssc.201701003>
- Lin, L., Amaratunga, P., Reed, J., Huang, P., Lemberg, B. L., & Lemberg, D. (2022). Quantitation of Δ^8 -THC, Δ^9 -THC, Cannabidiol and 10 Other Cannabinoids and Metabolites in Oral Fluid by HPLC-MS-MS. *Journal of Analytical Toxicology*, 46(1), 76–88. <https://doi.org/10.1093/jat/bkaa184>
- Lindbom, K., Norman, C., Baginski, S., Krebs, L., Stalberga, D., Rautio, T., Wu, X., Kronstrand, R., & Gréen, H. (2024). Human metabolism of the semi-synthetic cannabinoids hexahydrocannabinol, hexahydrocannabiphorol and their acetates using hepatocytes and urine samples. *Drug Testing and Analysis*, 1–15. <https://doi.org/10.1002/dta.3740>
- Lucas, C. J., Galettis, P., & Schneider, J. (2018). The pharmacokinetics and the pharmacodynamics of cannabinoids. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 84(11), 2477–2482. <https://doi.org/10.1111/bcp.13710>
- Mack, A., & Joy, J. (2000). *Marijuana As Medicine : the Science Beyond the Controversy*. National Academy Press. <https://nap.nationalacademies.org/catalog/9586/marijuana-as-medicine-the-science-beyond-the-controversy>
- Mafrá, G., Oenning, A. L., Dias, A. N., Merib, J., Budziak, D., Silveira, C. B. da, & Carasek, E. (2018). Low-cost approach to increase the analysis throughput of bar adsorptive microextraction (BA μ E) combined with environmentally-friendly renewable sorbent phase of recycled diatomaceous earth. *Talanta*, 178, 886–893. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.10.022>

- Malabadi, R. B., Kolkar, K. P., & Chalannavar, R. K. (2023). Δ 9-Tetrahydrocannabinol (THC): The major psychoactive component is of botanical origin. *International Journal of Innovation Scientific Research and Review*, 05(03), 4177–4184. https://www.researchgate.net/publication/369636133_D9-TETRAHYDROCANNABINOL_THC_The_major_Psychoactive_Component_is_of_Botanical_origin
- Margalho, C., Castanheira, A., Real, F. C., Gallardo, E., & López-Rivadulla, M. (2016). Determination of «new psychoactive substances» in postmortem matrices using microwave derivatization and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 1020, 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.03.001>
- McPartland, J. M. (2018). Cannabis Systematics at the Levels of Family, Genus, and Species. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 3(1), 203–212. <https://doi.org/10.1089/can.2018.0039>
- Mechoulam, R. (2012). Cannabis - A Valuable Drug that Deserves Better Treatment. *Mayo Clinic Proceedings*, 87(2), 107–109. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2011.12.002>
- Mechoulam, R., & Parker, L. A. (2013). The Endocannabinoid System and the Brain. *Annual Review of Psychology*, 64(1), 21–47. <https://doi.org/10.1146/annurev-psych-113011-143739>
- Mehta, M., Mehta, D., & Mashru, R. (2024). Recent application of green analytical chemistry: eco-friendly approaches for pharmaceutical analysis. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10(1), 1–26. <https://doi.org/10.1186/s43094-024-00658-6>
- Messina, F., Rosati, O., Curini, M., & Marcotullio, M. C. (2015). Cannabis and bioactive cannabinoids. *Studies in Natural Products Chemistry*, 45, 17–57. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63473-3.00002-2>
- Micalizzi, G., Vento, F., Alibrando, F., Donnarumma, D., Dugo, P., & Mondello, L. (2021). Cannabis Sativa L.: a comprehensive review on the analytical methodologies for cannabinoids and terpenes characterization. *Journal of Chromatography A*, 1637, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461864>
- Mitra, S., & Brukh, R. (2003). *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry* (1.^a ed.). John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/0471457817>

- Morelli, D. C., Mafra, G., Santos, A. V., Merib, J., & Carasek, E. (2020). Designing a green device to BAμE: Recycled cork pellet as extraction phase for the determination of parabens in river water samples. *Talanta*, 219, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121369>
- Nahar, L., Guo, M., & Sarker, S. D. (2020). Gas chromatographic analysis of naturally occurring cannabinoids: A review of literature published during the past decade. *Phytochemical Analysis*, 31(2), 135–146. <https://doi.org/10.1002/pca.2886>
- Nasrallah, D., & Garg, N. (2023). Studies Pertaining to the Emerging Cannabinoid Hexahydrocannabinol (HHC). *ACS Chemical Biology*, 18(9), 2023–2029. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.3c00254>
- Neng, N. R., Ahmad, S. M., Gaspar, H., & Nogueira, J. M. F. (2015). Determination of mitragynine in urine matrices by bar adsorptive microextraction and HPLC analysis. *Talanta*, 144, 105–109. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.05.038>
- Neng, N. R., & Nogueira, J. M. F. (2017). Monitoring trace levels of hydroxy aromatic compounds in urine matrices by bar adsorptive microextraction (BAμE). *Analytical Methods*, 9(36), 5260–5265. <https://doi.org/10.1039/c7ay01410d>
- Neng, N. R., Silva, A. R. M., & Nogueira, J. M. F. (2010). Adsorptive micro-extraction techniques - Novel analytical tools for trace levels of polar solutes in aqueous media. *Journal of Chromatography A*, 1217(47), 7303–7310. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.09.048>
- Neto, P. A. P., Pierro, L. M. C., & Fernandes, S. T. (2023). Cannabis: 12,000 years of experiences and prejudices. *Brazilian Journal Of Pain*, 6, 80–84. <https://doi.org/10.5935/2595-0118.20230055-en>
- Nicolaou, A. G., Christodoulou, M. C., Stavrou, I. J., & Kapnissi-Christodoulou, C. P. (2021). Analysis of cannabinoids in conventional and alternative biological matrices by liquid chromatography: Applications and challenges. *Journal of Chromatography A*, 1651, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462277>
- Nogueira, J. M. F. (2012). Novel sorption-based methodologies for static microextraction analysis: A review on SBSE and related techniques. *Analytica Chimica Acta*, 757, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.10.033>

- Nogueira, J. M. F. (2013). Microextração adsortiva em barra (BA μ E): Um conceito analítico inovador para microextração estática. *Scientia Chromatographica*, 5(4), 275–283. <https://doi.org/10.4322/sc.2014.010>
- Nogueira, J. M. F. (2015). Stir-bar sorptive extraction: 15 years making sample preparation more environment-friendly. *Trends in Analytical Chemistry*, 71, 214–223. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.05.002>
- Oliveira, M. N., Gonçalves, O. C., Ahmad, S. M., Schneider, J. K., Krause, L. C., Neng, N. R., Caramão, E. B., & Nogueira, J. M. F. (2021). Application of bar adsorptive microextraction for the determination of levels of tricyclic antidepressants in urine samples. *Molecules*, 26(11), 1–18. <https://doi.org/10.3390/molecules26113101>
- O'Mahony, B., O'Malley, A., Kerrigan, O., & McDonald, C. (2024). HHC-induced psychosis: A case series of psychotic illness triggered by a widely available semisynthetic cannabinoid. *Irish Journal of Psychological Medicine*, 1–4. <https://doi.org/10.1017/ipm.2024.3>
- O'shaughnessy, W. B. (1843). On the Preparations of the Indian Hemp, or Gunjah. Em *Provincial Medical Journal and Retrospect of the Medical Sciences* (Vol. 5, Número 122). <https://www.jstor.org/stable/25491786>
- Persson, M., Kronstrand, R., Evans-Brown, M., & Green, H. (2024). In vitro activation of the CB1 receptor by the semi-synthetic cannabinoids hexahydrocannabinol (HHC), hexahydrocannabinol acetate (HHC-O) and hexahydrocannabiphorol (HHC-P). *Drug Testing and Analysis*. <https://doi.org/10.1002/dta.3750>
- Pertwee, R. G. (2006). Cannabinoid Pharmacology: The First 66 Years. *British Journal of Pharmacology*, 147, 163–171. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706406>
- Pertwee, R. G. (2008). The Diverse CB1 and CB2 Receptor Pharmacology of Three Plant Cannabinoids: Δ^9 -Tetrahydrocannabinol, Cannabidiol and Δ^9 -Tetrahydrocannabivarin. *British Journal of Pharmacology*, 153(2), 199–215. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707442>
- Pisanti, S., & Bifulco, M. (2019). Medical Cannabis: A plurimillennial history of an evergreen. *Journal of Cellular Physiology*, 234(6), 8342–8351. <https://doi.org/10.1002/jcp.27725>

- Pitterl, F., Pavlic, M., Liu, J., & Oberacher, H. (2024). Insights Into the Human Metabolism of Hexahydrocannabinol by Non-Targeted Liquid Chromatography-High-Resolution Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, 48(5), 1–9. <https://doi.org/10.1093/jat/bkae022/7660320>
- Polícia Judiciária. (2023). *Combate ao Tráfico de Estupefacientes em Portugal - Relatório Anual 2023*. <https://www.policiajudiciaria.pt/wp-content/uploads/2024/03/Relatorio-Anual-2023-Estatistica-TCD-1-2.pdf>
- Pollio, A. (2016). The Name of Cannabis: A Short Guide for Nonbotanists. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 1(1), 234–238. <https://doi.org/10.1089/can.2016.0027>
- Prieto, A., Basauri, O., Rodil, R., Usobiaga, A., Fernández, L. A., Etxebarria, N., & Zuloaga, O. (2010). Stir-bar sorptive extraction: A view on method optimisation, novel applications, limitations and potential solutions. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2642–2666. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.12.051>
- Procuradoria-Geral Distrital de Lisboa. (1996). *Portaria n.º 94/96, de 26 de Março*. https://www.pgdlisboa.pt/leis/lei_mostra_articulado.php?nid=192&tabela=leis&so_miolo=
- Procuradoria-Geral Distrital de Lisboa. (2013). *Decreto-Lei n.º 54/2013, de 17 de abril* (pp. 1–6). https://www.pgdlisboa.pt/leis/lei_print_articulado.php?tabela=leis&artigo_id=&nid=1903&nversao=&tabela=leis
- Procuradoria-Geral Distrital de Lisboa. (2023). *Decreto-Lei n.º 15/93, de 22 de janeiro*. https://www.pgdlisboa.pt/leis/lei_print_articulado.php?tabela=leis&artigo_id=&nid=181&nversao=&tabela=leis
- Prosen, H. (2014). Applications of liquid-phase microextraction in the sample preparation of environmental solid samples. *Molecules*, 19(5), 6776–6808. <https://doi.org/10.3390/molecules19056776>
- Rêgo, X., Oliveira, M. J., Lameira, C., & Cruz, O. S. (2021). 20 years of Portuguese drug policy - developments, challenges and the quest for human rights. *Substance Abuse: Treatment, Prevention, and Policy*, 16(59), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13011-021-00394-7>

- Reinstadler, V., Huber, S., Lierheimer, S., Boettcher, M., Rüscher, P., Tanzer, M., Jenny, K., Zoll, A., Gruber, W., & Oberacher, H. (2023). A rapid and convenient sample preparation method for the analysis of cannabinoids in oral fluid samples. *Biomedical Chromatography*, 37(8), 1–11. <https://doi.org/10.1002/bmc.5651>
- Reiter, N., Linnet, K., Andersen, N. Ø., Rasmussen, B. S., Nielsen, M. K., Eriksen, K. R., & Palmqvist, D. F. (2024). Severe poisoning with semi-synthetic cannabinoids. *Ugeskrift for Læger*, 186(37), 1–5. <https://doi.org/10.61409/V04240241>
- Rockwood, A. L., Kushnir, M. M., & Clarke, N. J. (2018). Mass spectrometry. Em N. Rifai, A. R. Horvath, & C. T. Wittwer (Eds.), *Principles and Applications of Clinical Mass Spectrometry: Small Molecules, Peptides, and Pathogens* (pp. 33–65). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816063-3.00002-5>
- Rubin, V. D. (1975). *Cannabis and culture* (1.^a ed.). Mouton. <https://doi.org/https://doi.org/10.1515/9783110812060>
- Russo, E. B. (2007). History of cannabis and its preparations in saga, science, and sobriquet. *Chemistry and Biodiversity*, 4(8), 1614–1648. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200790144>
- Russo, E. B., & Franjo, G. (2006). *Handbook of Cannabis Therapeutics - From Bench to Bedside* (1.^a ed.). Routledge. <https://doi.org/10.4324/9780203820803>
- Russo, F., Vandelli, M., Biagini, G., Schmid, M., Luongo, L., Perrone, M., Ricciardi, F., Maione, S., Laganà, A., Capriotti, A., Gallo, A., Carbone, L., Perrone, E., Gigli, G., Cannazza, G., & Citti, C. (2023). Synthesis and pharmacological activity of the epimers of hexahydrocannabinol (HHC). *Scientific reports*, 13(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-38188-5>
- Saito, V. M., Wotjak, C., & Moreira, F. (2010). Pharmacological exploitation of the endocannabinoid system: new perspectives for the treatment of depression and anxiety disorders? *Brazilian Journal of Psychiatry*, 32, 7–14. <https://doi.org/10.1590/S1516-44462010000500004>
- Santos, I. C., Maia, D., Dinis-Oliveira, R. J., & Barbosa, D. J. (2024). New Psychoactive Substances: Health and Legal Challenges. *Psychoactives*, 3(2), 285–302. <https://doi.org/10.3390/psychoactives3020018>

- Schirmer, W., Auwärter, V., Kaudewitz, J., Schürch, S., & Weinmann, W. (2023). Identification of human hexahydrocannabinol metabolites in urine. *European Journal of Mass Spectrometry*, 29(5–6), 326–337. <https://doi.org/10.1177/14690667231200139>
- Schurman, L. D., Lu, D., Kendall, D. A., Howlett, A. C., & Lichtman, A. H. (2020). Molecular mechanism and cannabinoid pharmacology. Em M. C. Michel (Ed.), *Handbook of Experimental Pharmacology* (pp. 323–353). Springer. https://doi.org/10.1007/164_2019_298
- Shahbazi, F., Grandi, V., Banerjee, A., & Trant, J. F. (2020). Cannabinoids and Cannabinoid Receptors: The Story so Far. *iScience*, 23(7), 1–22. <https://doi.org/10.1016/j.isci>
- Shi, Y., Liu, M., Li, X., Xu, N., Yuan, S., Yu, Z., Xiang, P., & Wu, H. (2022). Simultaneous screening of 239 synthetic cannabinoids and metabolites in blood and urine samples using liquid chromatography–high resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1663, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462743>
- Sistema de Segurança Interna. (2023). *Relatório Anual de Segurança Interna 2023*. <https://www.portugal.gov.pt/download-ficheiros/ficheiro.aspx?v=%3d%3dBQAAAB%2bLCAAAAAAABAAzNDEyNgEApqka1wUAAAA%3d>
- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2007). *Principles of Instrumental Analysis* (6.^a ed.). Thomson Brooks/Cole. <https://img1.wsimg.com/blobby/go/eda849b5-0706-4fa4-8bc1-c28aaff08b58/Principles%20of%20Instrumental%20Analysis%20sixth%20edit.pdf>
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2014). *Fundamentals of Analytical Chemistry* (9.^a ed.). Brooks/Cole. <https://tech.chemistrydocs.com/Books/Analytical/Fundamentals-of-Analytical-Chemistry-by-Douglas-A.-Skoog-9th-Ed.pdf>
- Söderholm, S. L., Damm, M., & Kappe, C. O. (2010). Microwave-assisted derivatization procedures for gas chromatography/mass spectrometry analysis. *Molecular Diversity*, 14(4), 869–888. <https://doi.org/10.1007/s11030-010-9242-9>

- Sommano, S. R., Chittasupho, C., Ruksiriwanich, W., & Jantrawut, P. (2020). The Cannabis Terpenes. *Molecules*, 25(24), 1–16. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25245792>
- Stefkov, G., Karanfilova, I. C., Gjorgievska, V. S., Trajkovska, A., Geskovski, N., Karapandzova, M., & Kulevanova, S. (2022). Analytical Techniques for Phytocannabinoid Profiling of Cannabis and Cannabis-Based Products—A Comprehensive Review. *Molecules*, 27(3), 1–42. <https://doi.org/10.3390/molecules27030975>
- Stothard, A. I., Layle, N. K., Martin, M. J., Liu, J., Bassman, J. R., Williams, J. B., & Hering, K. W. (2023). *Characterization of Hexahydrocannabinol Diastereomers by NMR, HPLC, GC-MS, and TLC*. Cayman Chemical. <https://cdn2.caymanchem.com/cdn/cms/caymanchem/LiteratureCMS/Characterization%20of%20HHC%20Diastereomers.pdf>
- Swaminathan, M., Tarifa, A., & DeCaprio, A. P. (2024). Development and validation of a method for analysis of 25 cannabinoids in oral fluid and exhaled breath condensate. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 416(19), 4325–4340. <https://doi.org/10.1007/s00216-024-05369-8>
- Swartz, M. (2010). HPLC detectors: A brief review. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 33(9–12), 1130–1150. <https://doi.org/10.1080/10826076.2010.484356>
- Tanaka, R., & Kikura-Hanajiri, R. (2024). Identification of hexahydrocannabinol (HHC), dihydro-iso-tetrahydrocannabinol (dihydro-iso-THC) and hexahydrocannabiphorol (HHCP) in electronic cigarette cartridge products. *Forensic Toxicology*, 42(1), 71–81. <https://doi.org/10.1007/s11419-023-00667-9>
- Tobiszewski, M., Mechlińska, A., Zygmunt, B., & Namieśnik, J. (2009). Green analytical chemistry in sample preparation for determination of trace organic pollutants. *Trends in Analytical Chemistry*, 28(8), 943–951. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.06.001>
- Touw, M. (1981). The Religious and Medicinal Uses of Cannabis in China, India and Tibet. *Journal of Psychoactive Drugs*, 13(1), 1–12. <https://doi.org/10.1080/02791072.1981.10471447>

- Turcotte, C., Blanchet, M.-R., Laviolette, M., & Flamand, N. (2016). The CB2 receptor and its role as a regulator of inflammation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(23), 4449–4470. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2300-4>
- Turner, S., Williams, C., Iversen, L., & Whalley, B. (2017). Molecular Pharmacology of Phytocannabinoids. Em A. D. Kinghorn, H. Falk, S. Gibbons, Y. Asakawa, J. Liu, & V. M. Dirsch (Eds.), *Progress in the chemistry of organic natural products* (pp. 61–101). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-45541-9_3
- Ujváry, I. (2023). Hexahydrocannabinol and closely related semi-synthetic cannabinoids: A comprehensive review. *Drug Testing and Analysis*, 16(2), 1–35. <https://doi.org/10.1002/dta.3519>
- United Nations. (1961). *Single Convention on Narcotic Drugs, 1961*. https://www.unodc.org/pdf/convention_1961_en.pdf
- UNODC. (2009). *Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens*. United Nations. https://www.unodc.org/documents/scientific/validation_E.pdf
- UNODC. (2013). *The International Drug Control Conventions*. https://www.unodc.org/documents/commissions/CND/Int_Drug_Control_Conventions/Ebook/The_International_Drug_Control_Conventions_E.pdf
- UNODC. (2022). *Recommended Methods for the Identification and Analysis of Cannabis and Cannabis Products*. https://www.unodc.org/documents/scientific/Recommended_methods_for_the_Identification_and_Analysis_of_Cannabis_and_Cannabis_products.pdf
- UNODC. (2024). *World Drug Report 2024*. UNITED NATIONS. <https://www.unodc.org/unodc/en/data-and-analysis/world-drug-report-2024.html>
- Warf, B. (2014). High Points: An Historical Geography of Cannabis. *Geographical Review*, 104(4), 414–438. <https://doi.org/10.1111/j.1931-0846.2014.12038.x>
- WHO. (2016). *The health and social effects of nonmedical cannabis use*. <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/251056/9789241510240-eng.pdf?sequence=1>

- Wiley, J. L., Owens, R. A., & Lichtman, A. H. (2018). Discriminative Stimulus Properties of Phytocannabinoids, Endocannabinoids, and Synthetic Cannabinoids. Em B. A. Ellenbroek, T. R. E. Barnes, S. L. Andersen, M. P. Paulus, & J. Olivier (Eds.), *Current Topics in Behavioral Neurosciences* (pp. 153–173). Springer. https://doi.org/10.1007/7854_2016_24
- Williams, A. R. (2020). Cannabis as a Gateway Drug for Opioid Use Disorder. *Journal of Law, Medicine and Ethics*, 48(2), 268–274. <https://doi.org/10.1177/1073110520935338>
- Zhang, Q., Chen, X., Guo, H., Trindade, L. M., Salentijn, E. M. J., Guo, R., Guo, M., Xu, Y., & Yang, M. (2018). Latitudinal adaptation and genetic insights into the origins of cannabis sativa L. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01876>
- Zivovinic, S., Alder, R., Allenspach, M. D., & Steuer, C. (2018). Determination of cannabinoids in Cannabis sativa L. samples for recreational, medical, and forensic purposes by reversed-phase liquid chromatography-ultraviolet detection. *Journal of Analytical Science and Technology*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s40543-018-0159-8>
- Zuardi, A. W. (2006). History of cannabis as a medicine: a review. *Brazilian Journal of Psychiatry*, 28(2), 153–157. [https://doi.org/https://doi.org/10.1590/S1516-44462006000200015](https://doi.org/10.1590/S1516-44462006000200015)

Anexos

Anexo I. Cálculos efetuados

O cálculo da média ($\bar{x}$), desvio padrão (σ) e a aplicação do método dos mínimos quadrados (linearização) foram efetuados com recurso às funções integradas e ferramentas estatísticas do software Microsoft Excel (Versão 16.91).

Para avaliar a dispersão dos resultados, bem como a repetibilidade e a precisão intermediária no âmbito da validação do método analítico, procedeu-se ao cálculo do RSD (%) através da seguinte expressão matemática:

$$RSD (\%) = \frac{\sigma}{\bar{x}} \times 100$$

O valor de viés (%), para avaliar a justeza, foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$Viés (\%) = \frac{x_{lab} - x_{ref}}{x_{ref}} \times 100$$

O cálculo do valor de recuperação foi determinado através da seguinte expressão:

$$Recuperação = \frac{\frac{\text{Área do pico cromatográfico}_{Amostra}}{\text{Área do pico cromatográfico}_{Padrão Interno}}}{\frac{\text{Área do pico cromatográfico}_{Padrão}}{\text{Área do pico cromatográfico}_{Padrão Interno}}}$$

O teste de *Lack-of-Fit* foi realizado através da equação:

$$F = \frac{MSS_{LoF}}{MSS_{Erro}} = \frac{p \times \frac{\sum (\bar{y}_i - \hat{y}_i)^2}{(n-2)}}{\frac{\sum (y_i - \bar{y}_i)^2}{n \times (p-1)}}$$

onde y_i representa o valor do sinal na concentração i ; $\bar{y}_i$ é o valor médio do sinal dos replicados na concentração i ; $\hat{y}_i$ constitui-se como o valor do sinal na concentração i , calculada a partir da curva de calibração; n é o número de concentrações diferentes na curva de calibração e p é o número de replicados por cada concentração diferente na curva de calibração.

O teste de *Goodness-of-Fit* foi realizado através da equação:

$$F = \frac{MSS_{Factor}}{MSS_{Residuals}} = \frac{\frac{\sum(\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2}{(p-1)}}{\frac{\sum(y_i - \hat{y}_i)^2}{(n-p)}}$$

Anexo II. Calibração instrumental

Tabela A.1. Valores de RSD (%) para o estudo da repetibilidade e da precisão intermediária e de viés (%) para o estudo da justeza inter-dia obtidos para a calibração instrumental.

Composto	Repetibilidade ^a (RSD %)			Precisão Intermediária ^b (RSD %)			Justeza Inter-dia ^b (Viés %)		
	Nível de Concentração								
	Baixo ^c	Médio ^d	Alto ^e	Baixo ^c	Médio ^d	Alto ^e	Baixo ^c	Médio ^d	Alto ^e
CBD	6,43	2,95	3,03	4,95	2,20	2,49	-7,43	8,83	11,41
9S-HHC	9,72	4,15	2,45	5,30	3,28	1,59	-16,29	-5,33	6,29
Δ ⁸ -THC	5,07	3,18	7,98	3,31	2,29	4,25	-13,68	9,29	6,33
Δ ⁹ -THC	12,05	4,19	1,98	5,67	2,07	1,73	-13,16	-3,10	6,67
9R-HHC	11,19	4,19	3,64	6,75	3,81	2,40	-19,46	6,00	13,20

^a n = 3; ^b n = 9; ^c Nível de Concentração Baixo = 480 ng/mL; ^d Nível de Concentração Médio = 1250 ng/mL;

^e Nível de Concentração Alto = 4000 ng/mL

Anexo III. *Especiação dos compostos em função do pH obtidos pelo programa MarvinSketch da Chemaxon (<https://chemicalize.com/>)*

a. Canabidiol (CBD)

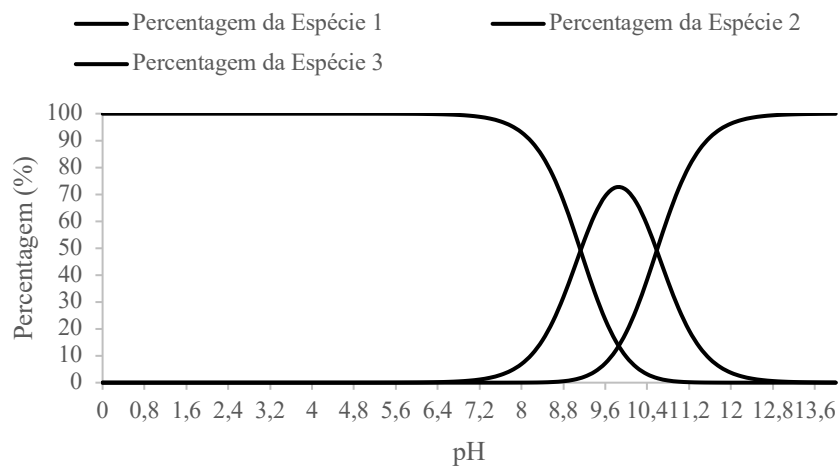


Figura A.1. Proporção das espécies neutras e ionizadas de CBD em função do pH.

b. Δ^8 -tetrahydrocannabinol (Δ^8 -THC)

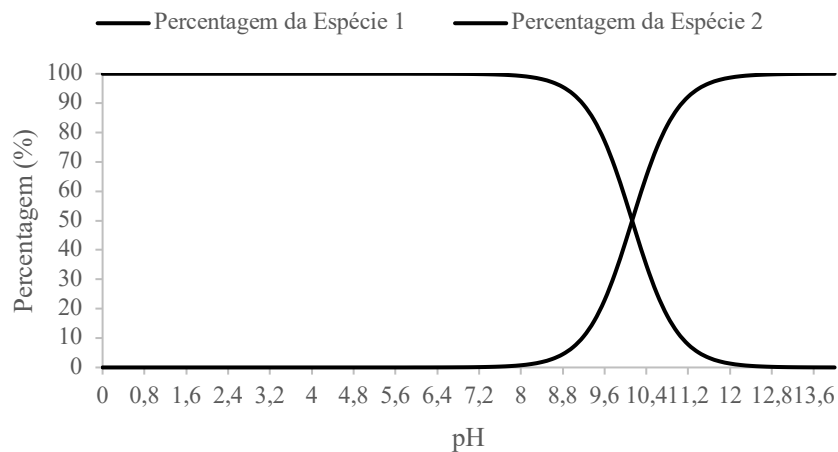


Figura A.2. Proporção das espécies neutras e ionizadas de Δ^8 -THC em função do pH.

c. Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC)

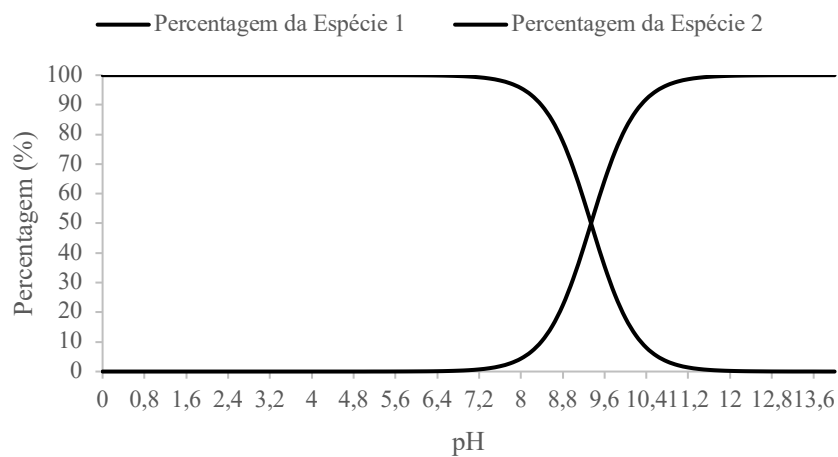


Figura A.3. Proporção das espécies neutras e ionizadas de Δ^9 -THC em função do pH.

d. Hexahidrocanabinol (HHC)

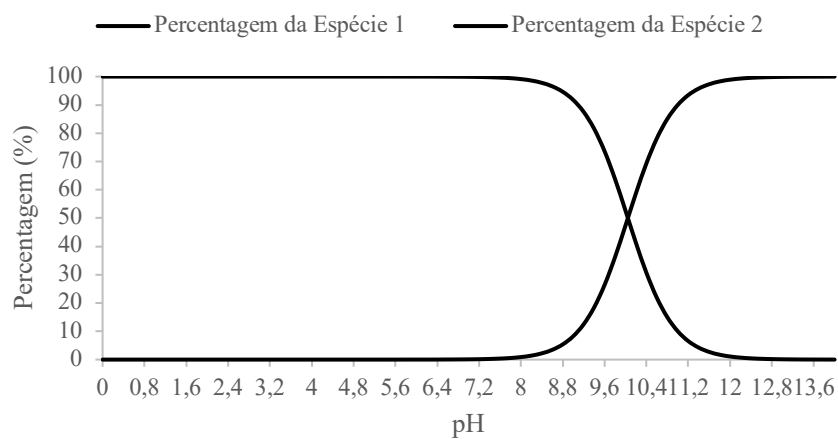


Figura A.4. Proporção das espécies neutras e ionizadas de HHC em função do pH.

Anexo IV. Gráficos de resíduos dos compostos em estudo

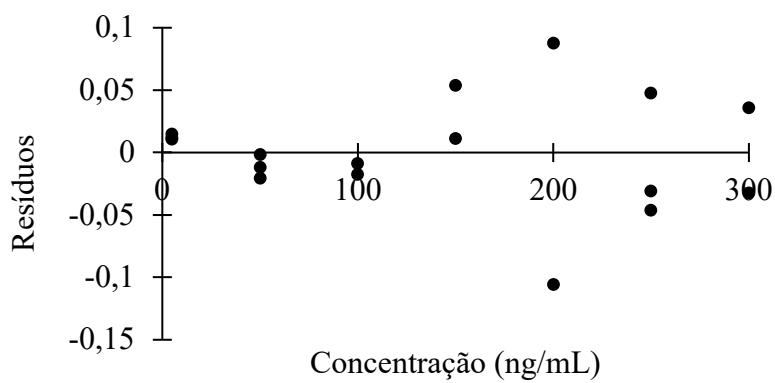
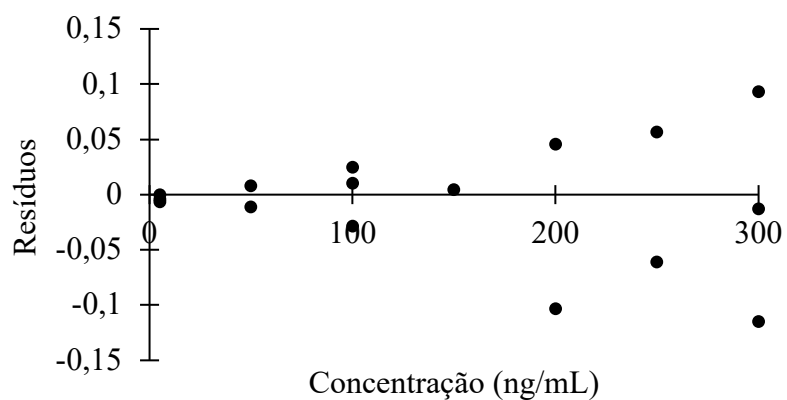
a. Canabidiol (CBD)

Figura A.5. Gráfico de resíduos do CBD.

b. Δ^8 -tetrahydrocannabinol (Δ^8 -THC)Figura A.6. Gráfico de resíduos do Δ^8 -THC.

c. Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC)

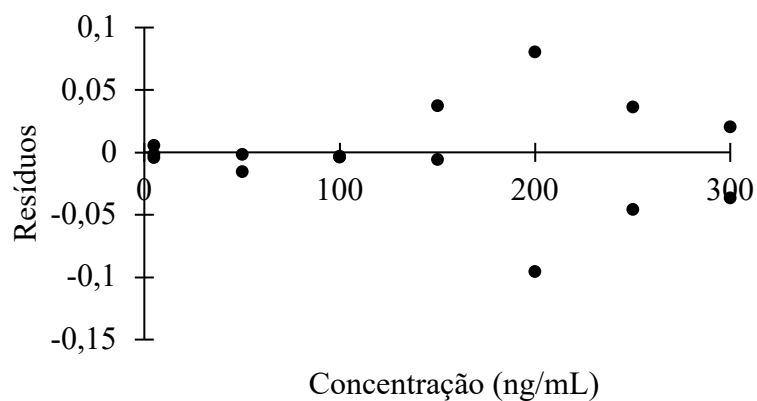


Figura A.7. Gráfico de resíduos do Δ^9 -THC.

d. Hexahidrocanabinol (9S-HHC)

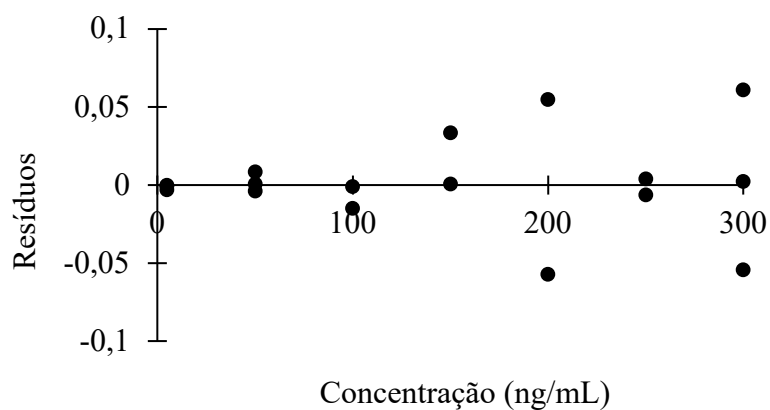


Figura A.8. Gráfico de resíduos do 9S-HHC.

e. Hexahidrocanabinol (9R-HHC)

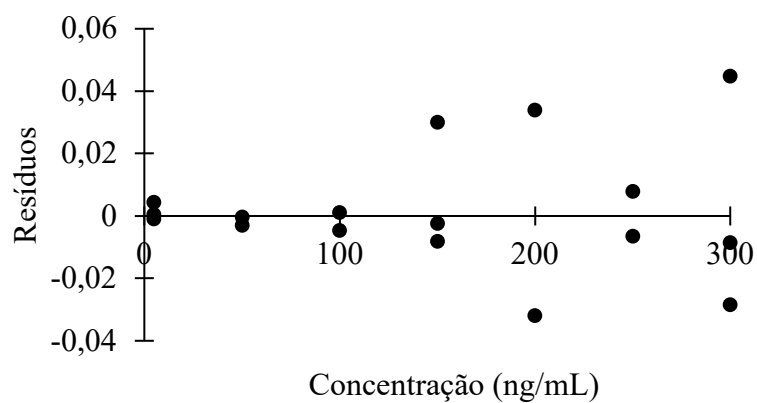


Figura A.9. Gráfico de resíduos do 9R-HHC.

Anexo V. *Testes estatísticos Lack-of-Fit e Goodness-of-Fit*

Tabela A.2. Valores de F_{Tab} e F_{Calc} obtidos para os testes estatísticos *Lack-of-Fit* e *Goodness-of-Fit* para os canabinoides em estudo.

Composto	<i>Lack-of-Fit</i>		<i>Goodness-of-Fit</i>	
	F_{Tab}	F_{Calc}	F_{Tab}	F_{Calc}
CBD		0,002		0,006
9S-HHC		0,001		0,003
Δ^8 -THC	2,958	0,001	6,944	0,002
Δ^9 -THC		0,001		0,002
9R-HHC		0,001		0,003