



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

**MESTRADO EM TECNOLOGIAS LABORATORIAIS EM
CIÊNCIAS FORENSES**

**DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CANABINOIDES A PARTIR DE
MATERIAL VEGETAL POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA
ACOPLADA A UM DETETOR DE MATRIZ DE FOTO-DÍODOS**

Trabalho submetido por

Beatriz Marques Correia

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

Outubro de 2022



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO EM TECNOLOGIAS LABORATORIAIS EM CIÊNCIAS FORENSES

DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CANABINOIDES A PARTIR DE MATERIAL VEGETAL POR CROMATOGRAPHIA LÍQUIDA ACOPLADA A UM DETETOR DE MATRIZ DE FOTO-DÍODOS

Trabalho submetido por

Beatriz Marques Correia

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

Trabalho orientado por

Prof. Doutor Samir Marcos Ahmad

e coorientado por

Mestre João Mário Dias

Prof. Doutor Alexandre Quintas

Outubro de 2022

Agradecimentos

Ao Instituto Universitário Egas Moniz, por ter sido a minha segunda casa durante 5 anos e a todos os colaboradores que contribuíram para a minha formação profissional, em particular ao Laboratório de Ciências Forenses e Psicológicas Egas Moniz. À associação Kosmicare, pela cedência de amostras de canábis, utilizadas na presente tese.

Ao Professor Doutor Samir Marcos Esmail Ahmad, sem o qual a presente dissertação não existiria. Agradeço profundamente pela orientação, amizade e paciência, demonstrada dentro e fora do laboratório nos últimos três anos. Pela confiança, disponibilidade e ensinamentos que me trouxeram à cientista e pessoa que hoje sou. Pelos almoços, gargalhadas e matrecos no final de um dia bom, mas sobretudo pelo amparo nos dias complicados. Por ter sempre a solução criativa para as minhas questões existenciais. Pelo relembrar do porquê deste fascínio pelo saber e fazer mais e melhor.

Ao Professor e Mestre Mário Dias, agradeço a orientação com rigor, permitindo autonomia e sempre com a sua boa disposição característica. À Professora e Mestre Carla Ferreira, pelo acompanhamento desta tese, pela simpatia e disponibilidade de sempre.

Ao Professor Doutor Alexandre Quintas, pela criação e coordenação do curso que deu resposta à minha sede pela ciência com vista à melhoria da sociedade. Pelas noites no laboratório, reportório musical, recomendação de obras literárias, expansão da mente e acima de tudo, “formação de carácter”.

Aos meus colegas de mestrado, pela partilha de coragem e de frustração, cada uma quando necessário. Aos melhores técnicos de laboratório, Daniela e Rafael.

Aos meus avós: Nandinha, Zé e Cecé, e tias: Ana e Marisa, pelo suporte familiar que sempre me permitiu ir atrás dos meus sonhos, sendo sempre uma rede de segurança.

Aos meus pais, pelo amor incondicional, ultimamente expresso em boleias ao fim das noites de laboratório, por já saberem o significado de todas as siglas de canabinoides, ou o que é afinal um HPLC. Pelo apoio e entusiasmo para me ouvir falar de um mundo que pouco lhes diz, com os mesmos olhos reluzentes com que eu dele falo.

Ao meu irmão Bruno, tal como o David, o Mata, a Xica e a Mar, parceiros de luta de entregas de tese, e à Rita, Ana e ao André, que também me apoiaram emocionalmente.

À minha Lara, por me recentrar e cuidar da minha criança interior.

Resumo

A importância da análise das plantas de cânabis tem vindo crescer, nomeadamente para controlo de qualidade dentro dos produtos para uso recreacional, indústria medicinal, ou ainda para discriminação forense entre a tipologia de substância de abuso ou cânhamo. No presente estudo foi desenvolvido um método com recurso a cromatografia líquida de alta eficiência com deteção por fotodíodos (HPLC-DAD), destinado à análise quantitativa dos canabinoides principais da planta de cânabis: Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) e canabidiol (CBD), respetivas formas ácidas, cannabinol (CBN) e o Δ^8 -tetrahydrocannabinol Δ^8 -THC, em material vegetal da cânabis.

A etapa de extração foi otimizada com recurso a desenhos experimentais, permitindo uma recuperação ~100% dos canabinoides. As amostras herbáceas foram extraídas com etanol:acetonitrilo (50:50), com recurso a ultrassons, e posterior deteção e quantificação dos canabinoides em HPLC-DAD, sendo apenas necessário utilizar 50 mg de amostra. Para os óleos da planta foi aplicada uma simples diluição em etanol.

A separação cromatográfica foi conseguida numa coluna de fase reversa, utilizando como eluente uma mistura de acetonitrilo/água contendo 0,1% ácido fórmico. Os compostos foram quantificados a 230 nm, em 30 minutos de corrida.

Os ensaios de validação do método mostraram que esta era linear ($R^2 > 0,997$), sendo seletivo e sensível, com a precisão e veracidade adequados, bem como excelente estabilidade e repetibilidade entre análise de amostra real. Os principais canabinoides identificados (% p/p) em amostras reais foram o Δ^9 -THCA, CBD, CBDA, e o Δ^9 -THC.

A presente metodologia foi aplicada com sucesso a várias amostras reais ricas em THC ou CBD, demonstrando a sua eficácia em análises de rotina para permitir dar resposta à atual procura de serviços de análise desta planta e seus derivados.

Palavras Chave: cânabis, fitocannabinoides, quantificação, HPLC-DAD, THC, desenho experimental, otimização, matrizes reais

Abstract

The importance of the analysis of cannabis plants has been developing globally, namely for quality control within products for recreational use, medicinal industry, or even for forensic discrimination between the typology of substance of abuse or hemp, for industrial purposes. In the present study, a HPLC-DAD method was developed for the quantitative analysis for the main cannabinoids: Δ^9 -THC and CBD, their acid forms, CBN and Δ^8 -THC, in cannabis plant material.

Extraction was optimized using experimental design (DoE), granting ~100% recovery of the cannabinoids. Herbal samples were extracted with ethanol:acetonitrile (50:50) by ultrasonication, and subsequent detection and quantification of cannabinoids in HPLC-DAD, only requiring 50 mg of sample. For the plant oils a simple dilution in ethanol was necessary.

Chromatographic separation was achieved on a reverse-phase C18 column, using an acetonitrile/water mixture containing 0.1% formic acid as eluent. The compounds were quantified at 230 nm in 30 minutes of run time.

Method validation proved its linearity ($R^2 > 0.997$), being selective and sensitive, with excellent results for precision and trueness, as well as excellent stability and repeatability. The main cannabinoids identified (% w/w) in actual samples were Δ^9 -THCA, CBD, CBDA, and Δ^9 -THC. The presented method was successfully applied to real samples, demonstrating its suitability in routine analyses to assist current demand for analysis services of this plant and its derivatives.

Keywords: Cannabis, phytocannabinoids, quantification, HPLC-DAD, THC, DoE, optimization, real matrices

Índice

Resumo	1
Abstract.....	3
Índice	5
Índice de Figuras	9
Índice de Tabelas	12
1. Introdução.....	13
1.1. Aspetos históricos e contextualização	13
1.2. Tratamento taxonómico e nomenclatura.....	15
1.2.1. Termos vernaculares.....	16
1.2.2. Botânica e Subespécies.....	16
1.3. Canabinoides.....	19
1.3.1. Biossíntese.....	20
1.3.1. Estrutura química dos fitocannabinoides.....	22
1.4. Tipos de Amostra.....	23
1.5. Enquadramento Legal da Canábis Recreativa, Medicinal e Industrial	24
1.5.1. Canábis Recreativa	24
1.5.2. Canábis Medicinal	25
1.5.3. Canábis Industrial.....	27
1.6. Principais Canabinoides Sujeitos a Controlo	28
1.7. Determinação do teor de Canabinoides na planta da canábis.....	29
1.7.1. Preparação da Amostra.....	29
1.7.2. Testes Presuntivos	29
1.7.2.1. Testes Colorimétricos- Fast Blue BB.....	30
1.7.3. Técnicas de Extração	31
1.7.4. Métodos e Condições de Análise.....	32
1.7.4.1. Técnicas Cromatográficas: Descrição Geral	32
1.7.4.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	33
1.7.4.3. Aspetos teóricos	37
1.8. Objetivo da tese	40
2. Materiais e Métodos	41

2.1.	Materiais	41
2.1.1.	Reagentes químicos e padrões analíticos.....	41
2.1.2.	Material corrente e equipamento de laboratório.....	41
2.1.3.	Amostras.....	43
2.2.	Procedimento Experimental.....	45
2.2.1.	Preparação de Soluções de trabalho	45
2.2.1.1.	Calibradores	45
2.2.1.2.	Solução de PI a 1000 µg/mL.....	46
2.2.1.3.	Controlos Positivos	46
2.2.1.4.	Controlos Negativos e Branco de reagentes.....	47
2.2.2.	Otimização do processo de extração	47
2.2.2.1.	Escolha do solvente.....	47
2.2.2.2.	Volume, número extrações e tempo extração	48
2.2.2.3.	Determinação do volume de extração	49
2.2.3.	Análise de óleos de cânabis	49
2.2.4.	Condições de operação instrumental para HPLC-DAD	49
2.2.5.	Recuperação.....	50
2.2.6.	Validação das metodologias analíticas	51
2.2.6.1.	Linearidade, sensibilidade e seletividade	51
2.2.6.2.	Precisão e veracidade	53
2.2.6.3.	Repetibilidade em amostra real	54
2.2.6.4.	Estabilidade	54
2.2.7.	Amostras Reais	55
2.2.7.1.	Procedimento experimental.....	55
2.2.7.2.	Cálculo do quimiotipo.....	57
2.2.8.	Teste colorimétrico: Fast Blue BB	57
3.	Resultados e discussão	59
3.1.	Otimização Instrumental.....	59
3.2.	Otimização do processo de extração.....	61
3.2.1.	Escolha do solvente	61
3.2.2.	Volume, número e tempo de extração	63
3.2.3.	Volume de solvente extrator.....	65
3.2.4.	Óleos de cânabis	67
3.2.5.	Recuperação.....	68
3.3.	Validação do método	70

3.3.1.	Curva de calibração	70
3.3.2.	Veracidade e Precisão.....	72
3.3.3.	Estabilidade	73
3.3.4.	Repetibilidade.....	74
3.4.	Aplicação a Amostras Reais	75
3.4.1.	Teores de fitocanabinoides	77
3.4.2.	Botânica	82
3.4.3.	Atribuição de Quimiotipo	83
3.4.4.	Enquadramento Legal.....	85
3.4.5.	Teste colorimétrico: Fast Blue BB	87
4.	Conclusão e Perspetivas Futuras	89
	Bibliografia.....	93
	Anexos	A

Índice de Figuras

Figura 1- Cannabis sativa observada em lupa. É possível observar os tricomas na sua superfície.	17
Figura 2 - As variedades de C. sativa subs. indica. Da esquerda para a direita, var. indica, var. himalayensis, var. afghanica e var. asperma. Adaptado de (McPartland,2020).....	18
Figura 3- Biossíntese dos fitocanabinoides em estudo. A partir do GPP e do OA, ocorre a formação do CBGA, catalisada pela GOT. O Δ^9 - THCA e o CBDA formam-se através das respectivas enzimas, THCA sintase e CBDA sintase. Estes canabinoides por descarboxilação dão origem às formas neutras, o Δ^9 - THC e o CBD. Por sua vez, o Δ^9 - THC, pode converter-se no seu isómero, o Δ^8 - THC, ou em CBN por oxidação. Figura elaborada no ChemDraw.	21
Figura 4- Estrutura de um canabinoide típico de cadeia lateral n-pentil. Os canabinoides vão variar no que diz respeito ao ácido carboxílico (ausente nas formas neutras), cadeia lateral alquílica e ao grupo R (álcool ou éter). Elaborado com recurso ao Marvin JS... 22	
Figura 5 - Exemplo de resultados obtidos com a aplicação do teste Fast Blue BB salt (FBBB). O CBD e a amostra de cânhamo obtiveram uma cor laranja, enquanto o Δ^9 - THC produz uma cor avermelhada. Adaptado de (Acosta. A; Almirall. J, 2021).	31
Figura 6 - Breve esquema dos constituintes de um sistema de HPLC. Elaborado no BioRender.....	34
Figura 7 - Ilustração do tempo morto (t_m), do tempo de retenção (t_r) e de retenção ajustado (t_r') num cromatograma típico. Adaptado de (Harris,2010).	38
Figura 8- Exemplo da apresentação de amostra herbácea (A7).	43
Figura 9- Rótulos de amostras herbácea (A) e de óleo de cânabis (B). Referem o cumprimento das leis e normas portuguesas e europeias, bem como um teor de THC inferior a 0,2%.	44
Figura 10-Esquema da preparação dos seis calibradores a partir de soluções intermédias. Aos calibradores foi adicionado o PI e aferidos com metanol.	45
Figura 11- Esquema do procedimento experimental. Após maceração de parte representativa da amostra, são pesadas 50mg. Adicionam-se 10mL de solvente extrator e leva-se ao banho de ultrassons. Após extração, o extrato é filtrado com recurso a filtro PTFE. Parte do extrato é de seguida analisado no HPLC-DAD. Figura realizada na aplicação Biorender.	55

Figura 12- Cromatograma obtido utilizando a metodologia otimizada descrita para uma mistura padrão contendo seis canabinoides a 5,0 µg/mL, foi fortificada com PI a 50,0 µg/mL.	60
Figura 13- Resultados do desenho experimental para a determinação do solvente de extração que maximize o sinal obtido de cada canabinoide. É observável que a mistura acetonitrilo: etanol (~50:50) permite obter os melhores resultados para o total dos canabinoides em estudo.	62
Figura 14- Contour Plot da mistura de solventes para o Δ^9 -THCA. As zonas representadas a verde mais escuro refletem a maior extração, refletindo que o uso de acetonitrilo e metanol em partes similares é ideal.	62
Figura 15- Resultados obtidos pelo desenho experimental para a determinação do volume necessário de solvente extrator, ciclos de extração e tempo da mesma. O volume de 10 mL resultou num sinal mais elevado para todos os canabinoides. O número de extrações bem como o tempo de extração em ultrassons não demonstra variação significativa.	64
Figura 16- Áreas obtidas para cada canabinoide com os diferentes volumes de solvente extrator.	65
Figura 17- Áreas normalizadas pelo valor mais elevado, para cada canabinoide por cada volume de solvente utilizada na extração.	66
Figura 18- Amostra de óleo de cânabis em metanol, após vórtex e banho de ultrassons, em duplicado.	67
Figura 19- Amostra de óleo de cânabis em isopropanol (esquerda), e em etanol (direita).	68
Figura 20 - Sobreposição dos cromatogramas obtidos para o Branco de Lúpulo contendo apenas PI (LB), Lúpulo Fortificado com os 6 canabinoides a 2,0 µg/mL e PI (LF) e a mistura padrão dos canabinoides a 2µg/mL e PI em metanol (Mix6). Da esquerda para a direita, surgem os picos de CBD, CBDA, CBN, Δ^9 -THC, Δ^8 -THC e Δ^9 -THCA.	69
Figura 21-Retas de calibração para cada canabinoide em estudo, e respectivos coeficientes de determinação, R^2	71
Figura 22- Gráfico de resíduos gerado para os dados normalizados do Δ^9 -THC.	71
Figura 23- Ensaio para averiguação da estabilidade. Uma mistura padrão a 10 µg/mL dos seis canabinoides em estudo, foi analisada pela metodologia desenvolvida nas datas	

apresentadas. Para todos os compostos, é possível verificar que não há alterações significativas nas áreas obtidas.....	74
Figura 24- Sobreposição de cromatogramas obtidos por HPLC-DAD nas condições descritas. A mistura padrão contendo os 6 canabinoides a 5.0 µg/mL (cinzento), pode ser comparada com uma amostra de cânabis herbácea (A8) rico em THCA (laranja) e ainda uma amostra de óleo de “CBD” (B1), a verde. Da esquerda para a direita, surgem os picos de CBD, CBDA, CBN, Δ^9 -THC, Δ^8 -THC e Δ^9 -THCA.....	76
Figura 25- Amostras analisadas e respetivos teores nos canabinoides detetados em cada uma delas.	78
Figura 26- Amostras fornecidas pela Kosmicare, e o seu teor de canabinoides analisados.	79
Figura 27- Canabinoides presentes nas amostras fornecidas pela Kosmicare, com os seus valores máximos e mínimos, a média representada com um X, e a mediana representada pela linha horizontal.	80
Figura 28-Amostras obtidas em lojas, e o seu teor nos canabinoides em estudo.	80
Figura 29-Canabinoides presentes nas amostras obtidas em lojas, com os seus valores máximos e mínimos, a média representada com um X, e a mediana representada pela linha horizontal.	81
Figura 30- Resultados obtidos na aplicação do teste do sal Fast Blue BB a duas amostras, A11 e A8. Na fila superior surge a amostra A11 rica em CBD, produzindo uma cor laranja na reação, a diferentes níveis de concentração. Na fila inferior, a amostra A8 rica em THC total revela um vermelho vivo, que se vai intensificando com o correspondente aumento no teor do composto.	88

Índice de Tabelas

Tabela 1- Listagem das amostras analisadas. Indicação da forma como foram obtidas, a percentagem de THC descrita no rótulo do produto, bem como outras informações e teores alegados.....	43
Tabela 2- Fitocanabinoides analisados por HPLC-DAD, com respectivos tempos de retenção (t_r) e tempos de retenção relativos ao PI (t_{rr}).....	60
Tabela 3- Recuperação obtida para os seis canabinoides em estudo e para o padrão interno (PI).....	69
Tabela 4- Valores de Veracidade e Precisão intra e inter dia obtidos para três níveis de controlos positivos distintos, 1; 12,5 e 20 $\mu\text{g/mL}$, para cada canabinoide em estudo. Ensaios feitos em pentaplicado. São ainda apresentados os valores obtidos experimentalmente para o limite de deteção (LOD) e para o limite de quantificação (LLOQ).	72
Tabela 5- Valores de desvio padrão residual (RSD) em percentagem, para cada canabinoide presente em cada amostra. Amostra A8, rica em CBD e CBDA; Amostra A11 rica em Δ^9 -THCA e Δ^9 -THC.....	75
Tabela 6- Amostras herbáceas (A) e de óleos (B) analisadas por HPLC-DAD e respectivos teores em cada um dos fitocanabinoides analisados pelo método desenvolvido. Indicados os casos de teores não quantificáveis, por se apresentarem abaixo do LOQ ou ainda não detetáveis, quando abaixo ao LOD.	77
Tabela 7- Amostras herbáceas e respetivo valor do rácio Δ^9 -THC _T /CBD _T	83
Tabela 8- Atribuição do quimiotipo às amostras em estudo, com base na fórmula estipulada (quimiotipo 1), e pelo rácio THCA/CBDA, proposto por (Mandrioli et al., 2019) para a definição de quimiotipos.....	84
Tabela 9- Amostras e o seu cumprimento do requisito da lei. O cumprimento do critério 1 refere-se a um teor de Δ^9 -THC não superior a 0,2%, enquanto o critério 2 tem em conta o teor total de Δ^9 -THC (forma neutra e ácida).	86

1. Introdução

A planta da canábis tem vindo a ser utilizada pelo Homem há vários milénios. O seu uso pelas civilizações antigas como fonte de alimentos e fibras têxteis, assim como de aplicações terapêuticas remonta a mais de 5000 anos (Charitos et al., 2020). A canábis possui um elevado número de compostos químicos, sendo que mais de 100 se classificam como fitocannabinoides, os principais responsáveis pelas propriedades farmacológicas conferidas a esta planta (Hädener, König, & Weinmann, 2019). Dentro deste vasto conjunto, destacam-se o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) e o canabidiol (CBD), maioritariamente concentrados nas inflorescências femininas nas suas formas ácidas, ácido Δ^9 -tetrahydrocannabinólico (THCA) e ácido canabidiólico (CBDA) (Pourseyed Lazarjani et al., 2020). Enquanto o Δ^9 -THC é o principal responsável pela atividade psicoativa, podendo levar a um estado de euforia e relaxamento no ser humano (Martins-Santos et al., 2012), o CBD é associado a propriedades anti-inflamatórias, anticonvulsivas, ansiolíticas e analgésicas, atenuando os efeitos psicoativos provocados pelo consumo de Δ^9 -THC (Iffland & Grotenhermen, 2017). Já o Δ^8 -tetrahydrocannabinol (Δ^8 -THC) tem sido sinteticamente sintetizado a partir do CBD (Bernhard, Heeb, & Tytgat, 2022), sendo usado para fortificar cânhamo (Song et al., 2022).

1.1. Aspectos históricos e contextualização

A canábis é uma planta anual herbácea que pode atingir até 3 metros de altura (Borille et al., 2017) oriunda das zonas montanhosas da Ásia Oriental (McPartland & Small, 2020). As evidências mais antigas da sua utilização datam do Período Gravetiano, na Europa Oriental, há cerca de 29000 anos, onde era utilizada para construir redes para caçar (Pringle, 1997).

A primeira evidência de utilização da canábis para fins medicinais foi documentada pelo Imperador chinês Sheng-Nung há 5000 anos. Na primeira farmacopeia chinesa, Pen-ts'ao Ching (Hou, 2012) explica que a planta fêmea de canábis poderia ser utilizada contra a fadiga menstrual, reumatismo, malária, obstipação, e outras doenças (Unschuld, 2010). A canábis é igualmente descrita no Atarvaveda hindu, compilado entre 3500 e 3000 anos atrás, e em textos egípcios do Novo Reino que datam de há 3550 anos, como planta sagrada para rituais e cerimónias (Hallmann-Mikołajczak, 2004; Russo, 2005; Tahir et al., 2021). Recentemente foram descobertas evidências de que no noroeste da China,

desde pelo menos há 2500 anos, variedades de cânabis com elevados níveis de THC seriam também inaladas e usadas em cerimónias fúnebres (Mcpartland & Small, 2020). Para além do uso para fins medicinais e cerimoniais, a cânabis tem vindo a ser utilizada na alimentação e para a produção de fibras. Por exemplo, o cultivo mais antigo já descrito do cultivo da cânabis para a produção de fibras remonta à China, tendo sido depois estendido Médio Oriente, Europa e Américas durante o início do século XVI (Chandra, Lata, & ElSohly, 2017).

Atualmente, a cânabis é utilizada para vários fins, incluindo industriais (têxteis, papel, roupa, construção, alimentação e cosméticos), medicinais e recreativos, sendo comumente designada de cânabis industrial (cânhamo), cânabis medicinal e cânabis recreativa, respetivamente (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA), 2018; Vasantha Rupasinghe et al., 2020). A principal diferença entre estas variantes prende-se com o seu conteúdo em THC. Neste sentido, a cânabis industrial caracteriza-se por um teor de THC de até 0,2% e um elevado conteúdo de CBD, apresentando um rácio de CBD/THC superior a 1 (Lipnik-Štangelj & Razinger, 2020).

O controlo das substâncias de abuso na União Europeia é igualmente regulado pelas Convenções das Nações Unidas de 1961 e 1971 (UNODC, 2013), que requerem a monitorização de plantas do género *Cannabis* por parte dos Estados-Membro quaisquer que sejam os níveis de Δ^9 -THC (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA), 2018). Em Portugal, a legislação de Combate à Droga, colocou sob controlo a planta *Cannabis sativa* L., a resina e o óleo obtidos a partir da mesma, bem como um conjunto de isómeros do THC (Procuradoria-Geral Distrital de Lisboa, 2021).

No contexto das substâncias de abuso ilícitas, em 2018, de acordo com o Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência (*European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction* – EMCDDA), 71% das apreensões foram atribuídas aos produtos derivados da cânabis (EMCDDA, 2020). Em 2020 a cânabis continuava a ser a substância ilícita mais apreendida (66% das apreensões) (EMCDDA, 2022). No relatório de 2022, é descrito que os números de apreensões de resina de cânabis aumentaram 16 % entre 2010 e 2020. No caso da cânabis herbácea esse aumento ficou pelos 19%. No entanto, quando são avaliadas as quantidades apreendidas na última década, verifica-se que para a cânabis herbácea o aumento foi 278% (EMCDDA, 2022), expondo a elevada procura deste produto no mercado negro.

A canábis tem um papel preponderante nas admissões em programas de tratamento de adições, sendo responsável por 45% das admissões, particularmente num momento em que se verifica um aumento no conteúdo de THC destes produtos (EMCDDA, 2022). Em 2020, o teor médio de THC na resina de canábis foi de 21 %, quase o dobro do observado para a canábis herbácea, com 11 %. É ainda importante destacar que vários países detetaram produtos de canábis adulterados com canabinoides sintéticos perigosos, representando elevados riscos para a saúde dos consumidores (Alipour et al., 2019; EMCDDA, 2022; Lipnik-Štangelj & Razinger, 2020; Meehan-Atrash & Rahman, 2022).

1.2.Tratamento taxonómico e nomenclatura

A classificação taxonómica da canábis não tem sido consensual. Se por um lado Linnaeus em *Species Plantarum* (1753) descreveu uma única espécie de cânhamo, *Cannabis sativa*, Lamarck (1783) propôs duas espécies de canábis: *Cannabis sativa*, a espécie largamente cultivada na Europa, e *Cannabis indica*, uma espécie selvagem que cresce maioritariamente na Índia e países vizinhos (Lamarck & Poiret, 1783; Linné & Salvius, 1753). O tratamento taxonómico de Lamarck foi rejeitado cerca de 50 anos depois por J. Lindley (Lindley & Lindley, 1838), que restringiu a *Cannabis* a *C. sativa*, seguindo a classificação de Linnaeus, e o conceito de *Cannabis* como um género único foi confirmado no século seguinte (Mcpartland & Small, 2020; Pollio, 2016).

Atualmente aceite como pertencente à ordem *Rosales*, e dando nome à família *Cannabaceae*, a planta da canábis, do género *Cannabis* L., possui apenas uma espécie: *Cannabis sativa* L. (Knight et al., 2010; McPartland & Small, 2020). Dentro desta, encontram-se duas subespécies, a subespécie *sativa* e a *indica*, cada uma com respetivas variedades, tal como comprovam os estudos genéticos de McPartland and Guy (International Cannabinoid Research Society, 2014). Existem ainda autores que relatam uma terceira subespécie, “*ruderalis*”, porém esta não é amplamente reconhecida (Hillig & Mahlberg, 2004a).

A família *Cannabaceae*, de acordo com *Royal Botanic Gardens Kew*, atualmente consiste em *Cannabis* L. e *Humulus* L., e mais sete géneros: *Celtis* L., *Pteroceltis* Maxim., *Aphananthe* Planch., *Chaetachme* Planch., *Gironniera* Gaudish, *Lozanella* Greenm., *Trema* Lour (Kew, 2022; Mcpartland, 2018).

1.2.1. Termos vernaculares

Alguns autores, seguindo a taxonomia popular, congregaram e simplificaram a nomenclatura de *C. sativa* e *C. indica*, com os termos "Sativa" e "Indica", utilizados incorretamente (Mcpartland & Small, 2020). Atualmente, milhares de sítios na *internet* divulgam e generalizam sobre as propriedades morfológicas, fitoquímicas, organoléticas, e clínicas de ambas, atribuindo-lhes diferenças. As plantas "Sativa" produzem mais THC do que CBD, e possuem um perfil de terpenos com um cheiro "herbático" ou "doce". As designadas por "indica" produzem mais CBD, com uma proporção de THC:CBD mais próxima de 1:1. Os terpenos de "Indica" conferem um aroma mais acre (Mcpartland, 2018). No entanto, atualmente a classificação da canábis como "Sativa" e "Indica" tornou-se irrelevante e subjetiva. A reprodução cruzada e a hibridação tornam a sua distinção praticamente impossível. A arbitrariedade destas designações é comprovada com o exemplo da "AK-47", uma planta híbrida que ganhou a categoria "Melhor Sativa" na "Cannabis Cup" de 1999, e quatro anos mais tarde venceu a categoria "Melhor Índica" (Chandra et al., 2017).

1.2.2. Botânica e Subespécies

A canábis é uma planta dioica, apresentando estruturas reprodutivas tanto masculinas como femininas em plantas individuais separadas. As plantas de canábis femininas produzem mais tricomas glandulares em comparação com a masculina (Lazarjani, Young, Kebede, & Seyfoddin, 2021). Os tricomas (**Error! Not a valid bookmark self-reference.**) são apêndices da planta, responsáveis pela produção, entre outros compostos, dos canabinoides, terpenos e flavonoides. Os dois primeiros são os compostos com maior potencial terapêutico e psicoativo na planta. Já os flavonoides, tal como os terpenos, são responsáveis pela cor e pelo cheiro, tendo um efeito sinérgico que pode alterar a atuação dos canabinoides (Baron, 2018; Cavalli & Dutra, 2021).



Figura 1- *Cannabis sativa* observada em lupa. É possível observar os tricomas na sua superfície.

Os tricomas servem ainda de dissuasor para os animais, pelo seu sabor amargo e aromas fortes, bem como proteção de ventos prejudiciais, ou mesmo de algumas variedades de crescimento fúngico (Tanney et al., 2021). Além dos terpenos, que são hidrocarbonetos, existem os terpenoides que são terpenos que contêm oxigénio. (Hanuš & Hod, 2020) e ambos refletem o ambiente circundante imediato, tais como as condições de crescimento da planta e do seu contexto ambiental (Leghissa, Hildenbrand, & Schug, 2017).

Para o presente trabalho, foi considerada a classificação taxonómica de McPartland e Small (2020) em relação às subespécies da canábida, pela sua atualidade e forma de justificação das escolhas tomadas com base na sua revisão e elevado número de plantas analisadas. Tendo por base os precedentes estabelecidos por Small e Cronquist (1976), que não só criaram o conceito de uma espécie singular, *sativa*, como ainda reconheceram 4 *Cannabis* taxa, segregando pelo conteúdo de THC (subespécies) e na sua fase de domesticação.

Os estudos intensivos de McPartland e Small permitiram-lhes desenvolver uma chave dicotómica para as 4 variedades da *C. sativa* subsp. *Indica*, utilizando características taxonómicas que incluíram aspetos morfológicos, fitoquímicos, genéticos, e relações hospedeiro-parasitas. As quatro variedades reconhecidas atualmente, são *indica* e *himalayensis*, *afghânica* e *asperrima* (referida também como *kafiristanica*) (Figura 2). As duas primeiras usualmente apresentam um rácio THC/CBD ≥ 7 e um perfil de terpenos normalmente sem álcoois sesquiterpenos, aroma fresco e “prazeroso”. As folhas frescas são de um verde mais escuro, e as inflorescências femininas produzem umas “cabeças” maiores. Já as variantes *afghânica* e *asperrima* caracterizam-se por um rácio THC/CBD < 7 , possuindo álcoois sesquiterpenos e com um aroma acre e “fedorento”. Estas plantas atingem mais de 2 metros, ao contrário do grupo anterior. Para a descrição total e pormenorizada, consultar a chave dicotómica da literatura.

O rácio THC/CBD normalmente bastante superior a 7 é atribuído à variedade *indica*, sendo esta doméstica do Sul Asiático. Uma base protuberante facilmente desarticulável das plantas é característica da *himalayensis*, tipo selvagem do sul da Ásia. Dentro do segundo grupo descrito, a variedade *afghanica* distingue-se da *asperrima* pelo rácio THC/CBD ser normalmente menor que 2 na segunda variedade, bem como a presença de uma base protuberante, facilmente desarticulável das plantas. Ambas atribuídas à Ásia Central, a *afghanica* sendo doméstica e a *asperrima* a selvagem (Hillig & Mahlberg, 2004).



Figura 2 - As variedades de *C. sativa* subs. *indica*. Da esquerda para a direita, var. *indica*, var. *himalayensis*, var. *afghanica* e var. *asperrima*. Adaptado de (McPartland, 2020)

Esta classificação vai de encontro aos estudos genéticos realizados, como o de Willig e Mahlberg, que em 2004 já atribuíam quatro biotipos a *C. indica* e dois a *C. sativa*, com níveis de THC significativamente maiores nas *C. indica* (Hillig & Mahlberg, 2004).

Em contraste com as variedades da subespécie *indica*, que crescem principalmente no continente asiático, Small e Cronquist referem as plantas da subespécie *sativa* como sendo comuns na América do Norte, Europa, e Ásia, com um potencial intoxicante limitado, contendo <0.3% THC. Atribui o nome *sativa* à variedade doméstica da subespécie *sativa*, e *spontanea* à selvagem, sendo que esta última possui uma zona basal definitiva, curta e contida (Small & Cronquist, 1976).

Ou seja, fazendo a ponte entre a classificação botânica e os termos populares, “Sativa” é na verdade *C. sativa* subsp. *indica* var. *indica* e “Indica” é a variedade *C. sativa* subsp. *indica* var. *afghanica*.

1.3.Canabinoides

O termo “canabinoide” originalmente referia-se ao grupo de compostos fenólicos prenilados de canábis. Atualmente engloba qualquer ligante capaz de se ligar especificamente aos recetores canabinoides humanos (CB1 e CB2) (Hanuš et al., 2016). Esta definição inclui igualmente canabinoides produzidos de forma endógena (endocanabinoides), sem semelhança estrutural com os seus homólogos terpeno-fenóis derivados de plantas – fitocanabinoides (Devane et al., 1992; Tahir et al., 2021). A definição de fitocanabinoides foi igualmente atualizada para incluir qualquer composto natural derivado de plantas que partilhe similaridade química com canabinoides e/ou seja capaz de interagir diretamente com os recetores de canabinoides. Estes compostos podem estar presentes em plantas floríferas (como *Helichrysum umbraculigerum* Less. da África do Sul), em hepáticas (como *Radula perrottetii*), e em fungos (como micorrizas do género *Albatrellus*) (Gülck & Möller, 2020; Hanuš et al., 2016).

Tal como referido anteriormente, a canábis tem sido utilizada para fins medicinais, recreativos e industriais. Possui um elevado número de compostos químicos, sendo que cerca de 144 (Pourseyed Lazarjani et al., 2020) se classificam como fitocanabinoides, os principais responsáveis pelas propriedades farmacológicas associadas a esta planta (Hädener et al., 2019). Alguns estudos relatam a possibilidade de que a combinação dos fitocanabinoides, terpenoides e outros fitoquímicos presentes na planta, proporciona uma maior eficácia no tratamento da dor crónica quando comparada com a de formulações orais de canabinoides isolados. No entanto, faltam dados experimentais definitivos que sustentem este efeito sinérgico (Walsh, McKinney, & Holmes, 2021).

As variantes desta planta podem classificar-se em função da concentração dos principais canabinoides previamente referidos, sendo que o Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime (*United Nations Office on Drugs and Crime* – UNODC) estabelece dois grandes quimiotipos, tendo por base a razão entre as concentrações nos canabinoides principais (CBD, THC e CBN). Se a razão entre a soma do THC+ CBN pelo CBD, for superior a 1, atribui o termo “drug-type”, ou seja, considera-se uma substância de abuso. No caso de ser inferior a 1, definem que é uma planta da canábis para fins industriais (UNODC, 2022).

Outros estudos sugerem ainda a atribuição de mais quimiotipos, bem como outra forma de os definir, pela razão THCA/CBDA (Mandrioli et al., 2019). O quimiotipo I (“drug

plants”), quando a razão é superior a 1; plantas que possuem um rácio intermédio, próximo de 1, classificam-se como pertencentes ao quimiotipo II; o quimiotipo III (“fiber plants”) define-se por uma razão THCA/CBDA inferior a 1 (Dei Cas et al., 2020). Existe ainda o quimiotipo IV, relativo às plantas cujo principal canabinoide é o ácido canabigerólico (CBGA), e o quimiotipo V, relativo a plantas cujo teor em canabinoides é bastante diminuto (Mandrioli et al., 2019).

É importante referir que Backer et al. (2012) determinaram que não é necessário esperar pela floração das plantas para se distinguir entre os diferentes quimiotipos (cânhamo e cânabis com concentrações de THC ilegais). Nos seus estudos, as plântulas e rebentos de cânabis foram cultivadas, amostradas todas as semanas e analisados os 8 canabinoides principais. O quimiotipo era reconhecível em qualquer fase de desenvolvimento devido às elevadas concentrações totais de THC, mesmo no início do cultivo, com a maturação das plantas (De Backer et al., 2012).

1.3.1. Biossíntese

A planta de cânabis é capaz de produzir várias dezenas de fitocannabinoides. É dentro dos tricomas que estes são enzimaticamente biossintetizados a partir do CBGA, o precursor ácido do canabigerol (CBG), o “composto mãe” de todos os fitocannabinoides (Zivovinic et al., 2018). Os fitocannabinoides representam um grupo de compostos terpenofenólicos produzidos predominantemente na planta da cânabis. Estes metabolitos secundários são biossintetizados como ácidos carboxílicos aromáticos prenilados, e embora quase nenhuma forma neutra surja em plantas frescas, os canabinoides em forma ácida, 95% da biomassa, podem converter-se nos seus homólogos neutros por descarboxilação espontânea sob a influência da luz, calor ou armazenamento prolongado (Tahir et al., 2021). A descarboxilação ocorre rapidamente acima dos 105°C, condição esta obtida durante o processo de fumar ou cozinhar (Hartsel et al., 2016).

As moléculas de pirofosfato de geranilo (GPP) combinam-se com um de dois ácidos. Para criar o CBGA, ocorre a condensação do ácido olivetólico (OA) com o GPP, catalisada por geranilo pirofosfato-olivetolato geranilo transferase (GOT), (Bergman et al., 2019; Luo et al., 2019). Esta molécula de CBGA dá então origem ao conjunto dos canabinoides mais conhecidos, com cadeia lateral de pentilo (Walsh et al., 2021).

Uma vez sintetizado, o CBGA é enzimaticamente convertido nas formas ácidas dos canabinoides. Na *C. sativa*, o CBGA é ciclizado por várias monooxigenases, nomeadamente THCA, CBDA e CBCA (ácido canabicroménico) sintases (THCAS, CBDAS e CBCAS) (Blatt-Janmaat & Qu, 2021).

Estas formas ácidas, juntamente com o próprio CBGA, podem então ser descarboxilados - um processo que implica a remoção dos seus ácidos carboxílicos, expondo-os à luz e/ou calor, para criar as moléculas de CBG, THC, CBC (canabicromeno) e CBD. Com o tempo, o THC pode converter-se em CBN, por oxidação não enzimática (Bergman et al., 2019; Russo & Marcu, 2017; Vladimir-Knežević et al., 2017).

Tanto o Δ^9 -THCA como o CBDA são produzidos com uma pureza ótica superior a 95%. O CBCA, contudo, apresenta uma relação de 5:1 de enantiómeros, possivelmente pela CBCA sintase libertar o substrato antes da reação estar completa, resultando numa pureza enantiomérica inferior (Morimoto et al. , 1997; Taura et al. , 2007).

O Δ^8 -THC, diferindo na localização de uma ligação dupla em relação ao Δ^9 -THC, surge em concentrações muito baixas na canábis, por isomerização (Gülck & Möller, 2020), estando associado ao processo de envelhecimento da planta (Tahir et al., 2021). Este processo encontra-se resumido na Figura 3.

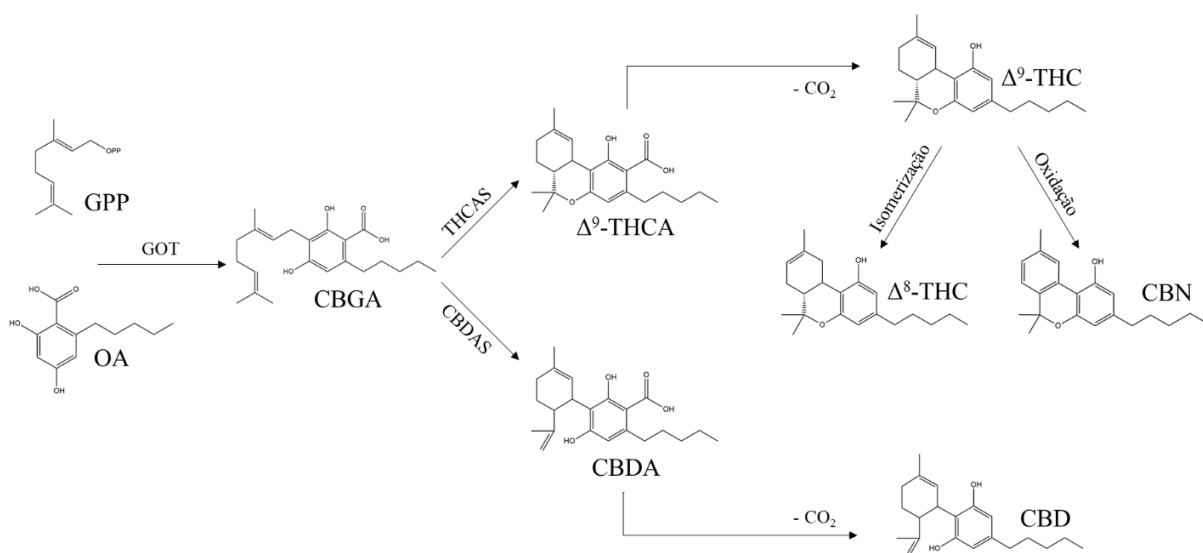


Figura 3- Biossíntese dos fitocanabinoides em estudo. A partir do GPP e do OA, ocorre a formação do CBGA, catalisada pela GOT. O Δ^9 -THCA e o CBDA formam-se através das respetivas enzimas, THCA sintase e CBDA sintase. Estes canabinoides por descarboxilação dão origem às formas neutras, o Δ^9 -THC e o CBD. Por sua vez, o Δ^9 -THC, pode converter-se no seu isómero, o Δ^8 -THC, ou em CBN por oxidação. Figura elaborada no ChemDraw.

1.3.1. Estrutura química dos fitocanabinoides

O grupo de compostos tipicamente com 21 carbonos, presentes na canábis, é conhecido como canabinoides e inclui os seus análogos assim como produtos de conversão (Brenneisen, 2007; ElSohly & Slade, 2005). Os canabinoides existem na planta maioritariamente sob a forma de ácidos, tendo na sua estrutura um ácido carboxílico ligado ao seu anel aromático. O comprimento distinto da cadeia lateral alquílica é normalmente onde surge a variabilidade estrutural, variando entre um e cinco carbonos. Os canabinoides mais comuns presentes na planta contêm um grupo *n*-pentilo situado na cadeia lateral (Figura 4). Também podem ser identificados, mas em menores quantidades grupos, *n*-butilo, *n*-propilo, etilo e metilo na mesma cadeia lateral (Hartsel et al., 2016).

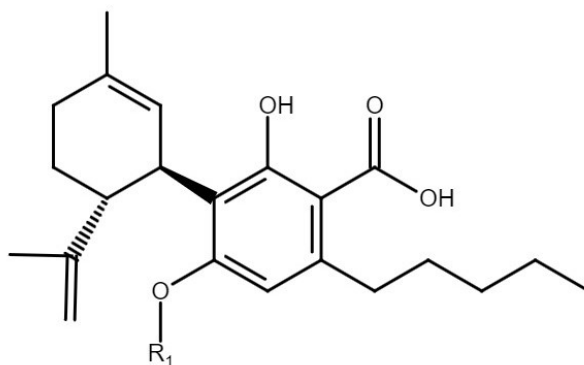


Figura 4- Estrutura de um canabinoide típico de cadeia lateral *n*-pentil. Os canabinoides vão variar no que diz respeito ao ácido carboxílico (ausente nas formas neutras), cadeia lateral alquílica e ao grupo *R* (álcool ou éter). Elaborado com recurso ao Marvin JS.

Com base na variação estrutural, Hanuš e os seus colegas (2016) classificaram os fitocanabinoides em 9 classes diferentes: tipo canabigerol (CBG), tipo canabicromeno (CBC), tipo canabidiol (CBD), tipo tetrahydrocannabinol (THC), tipo cannabinol (CBN), tipo timilo, tipo canabielsoína (CBE), tipo canabiciolol (CBL) e ainda do tipo 8,9-secomentilo (Blatt-Janmaat & Qu, 2021). Como referido anteriormente, nesta dissertação o foco será nos 6 considerados canabinoides (Δ^9 -THCA, Δ^8 -THC, Δ^9 -THC, CBDA e CBD e CBN), por serem os maioritários na planta, ou seus procedentes, e neste capítulo serão por isso mais aprofundadas apenas as classes a que pertencem.

O CBD, como principal representante dos compostos do tipo canabidiol, foi isolado em 1940 (Appendino, 2020). O CBD e o seu correspondente ácido são os canabinoides mais abundantes no quimiotipo “fiber plant”. A literatura ainda não é clara em relação à interação do CBD com os recetores CB1 e CB2, sendo mais consensual a sua atuação no recetor serotoninérgico (5-HT_{1A}) (Ji et al., 2020; Rock et al., 2020).

Os compostos do tipo tetrahidrocanabinol contêm várias formas de canabinol (CBN) bi-reduzidas, diferindo na localização da ligação dupla restante, e na configuração dos centros quirais. O constituinte mais proeminente desta subclasse é o Δ^9 -THC, isolado em 1942 (Wollner et al., 1942), mas estruturalmente elucidado apenas em 1964 (Gaoni & Mechoulam, 1964). Este tem a capacidade de se ligar aos dois recetores canabinoides, sendo o CB1 o seu principal “alvo” (Ji et al., 2020; Rock et al., 2020). Outro representante deste tipo é o Δ^8 -THC, isómero do Δ^9 -THC, mais fácil de sintetizar do que o este (Bernhard et al., 2022; Lumír et al., 2016; Vladimir-Knežević et al., 2017).

O CBN e os seus derivados e análogos (tipo canabinol) são considerados artefactos derivados da aromatização oxidativa dos compostos do tipo THC correspondentes. Nomeado pela primeira vez em 1896 (Wood, Spivey, & Easterfield, 1896), e a sua estrutura elucidada em 1940 (Adams et al., 1940). A sua concentração em produtos de canábis depende do tempo e das condições de armazenamento a que são sujeitos (Hädener et al., 2019; Nadal et al., 2017). O CBN é altamente estável em relação à degradação oxidativa, pelo que tem sido utilizado como marcador para a identificação de canábis narcótico em descobertas arqueológicas (Vladimir-Knežević et al., 2017).

1.4. Tipos de Amostra

Os produtos à base de canábis para consumo recreativo podem ser apresentados de diversas formas, de acordo com a sua forma de obtenção, bem como as partes seleccionadas. As amostras de interesse para o controlo analítico na determinação de canabinoides podem ser englobadas em três categorias principais, sendo elas canábis herbáceo, resina de canábis e canábis em estado líquido (óleos), correspondendo estas aos principais grupos de produtos ilícitos provenientes da canábis (UNODC, 2022).

O canábis herbáceo define-se como a floração ou a frutificação da planta de canábis das quais a resina não tenha sido extraída, sendo estas as partes da planta que contêm teores significativos de Δ^9 -THC (cerca de 10 a 12%) (UNODC, 2007; UNODC, 2009). No entanto, podem incluir-se ainda as folhas de maior dimensão localizadas a uma maior distância do topo da floração, tanto nas plantas masculinas como nas femininas. O conteúdo de Δ^9 -THC presente nas folhas varia normalmente entre 1 e 2 %, sendo inferior nas folhas da planta masculina, principalmente nas florescências, comparativamente à planta feminina. O caule central, os caules laterais e as sementes contêm quantidades

inferiores de THC face às folhas, podendo ser utilizados na produção dos óleos de cânabís (Dei Cas et al., 2020; UNODC, 2022).

Por sua vez, a resina de cânabís refere-se à resina separada, em bruto ou purificada, obtida a partir da planta (UNODC, 2007). As secreções resinosas, produzidas nos tricomas glandulares, podem ser recolhidas para criação de um produto concentrado, com um teor de fitocanabinoides mais elevado, normalmente com especial interesse no Δ^9 -THC (Nahar, Guo, & Sarker, 2020). Para além das secreções, a resina engloba um material vegetal mais fino e surge como um pó solto ou pegajoso prensado, dependendo do método de produção (UNODC, 2022). Os canabinoides na forma ácida, presentes nas plantas cultivadas no exterior, sofrem maior degradação face às que são cultivadas num espaço interior. Como tal, apresentam maiores teores de THC e CBD. Por outro lado, as plantas cultivadas num espaço interior possuem uma maior capacidade de retenção da resina, levando a teores mais elevados destes canabinoides, sendo que esta concentração depende ainda da variedade da planta (Aizpurua-Olaizola et al., 2014).

Por fim, o cânabís líquido apresenta-se como um concentrado da planta, possuindo um óleo vegetal na sua constituição, obtido pela aplicação de processos de extração na cânabís ou na sua resina, sendo produzido, normalmente, de forma a concentrar o teor em Δ^9 -THC (UNODC, 2007), sendo reportado atualmente um valor mediano de 24% (p/p) (EMCDDA, 2022). Geralmente, este produto apresenta uma coloração castanho-escura ou verde e uma consistência semelhante a um óleo espesso (UNODC, 2022). Este produto inclui ainda os óleos provenientes das sementes e óleos essenciais de coloração amarela que não possuem THC na sua constituição (UNODC, 2009b).

1.5. Enquadramento Legal da Cânabís Recreativa, Medicinal e Industrial

1.5.1. Cânabís Recreativa

A regulação legislativa que visa o controlo das substâncias de abuso na União Europeia baseia-se, essencialmente, nas Convenções das Nações Unidas de 1961, 1971 e 1988 (UNODC, 2013). É de salientar que todos os Estados-Membros da União Europeia são partes integrantes destes tratados, pelo que são obrigados a atuar em conformidade com os mesmos, ainda que possuam liberdade e competência para definir concretamente os

procedimentos criminais e administrativos a adotar neste contexto. Estas convenções requerem o controlo legal de plantas pertencentes ao género *Cannabis* (referidas como plantas de canábis), sendo que estas são normalmente controladas quando apresentam a capacidade de produzir níveis de Δ^9 -THC passíveis de utilização para diferentes fins (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA), 2018). No entanto, as leis relativas às penalizações perante o uso e fornecimento ilegal de canábis variam entre os diferentes países. Em Portugal, a legislação de Combate à Droga, materializada no Decreto-Lei n.º 15/93 de 22 de janeiro, determina que as folhas e sumidades floridas ou frutificadas da planta *Cannabis sativa* L., a resina e o óleo obtidos a partir da mesma e as sementes da planta não destinadas a sementeira, bem como um conjunto de isómeros do THC, destacando o Δ -9, se encontram sob controlo (Procuradoria-Geral Distrital de Lisboa, 2021). O artigo 21.º do respetivo diploma determina também que atividades como o cultivo, a produção, o fabrico, o transporte, a venda, a compra e a disponibilização a outro constituem crime, sendo puníveis com pena de prisão, de 4 a 12 anos. No entanto, através da Lei n.º 30/2000 de 29 de novembro, o consumo, a aquisição e a detenção para consumo próprio dos elementos inicialmente referidos encontram-se descriminalizados desde 2001 (Procuradoria-Geral Distrital de Lisboa, 2000). Como tal, a prática destes atos constitui uma contraordenação, devendo o produto identificado não exceder a quantidade necessária para consumo individual num intervalo de 10 dias (25 g, 5g e 2,5 g de folhas e sumidades floridas ou frutificadas, resina e óleo, respetivamente, de acordo com os limites máximos delineados no artigo 9.º da Portaria n.º 94/96 de 26 de Março) (Diário da República Eletrónico, 1996).

1.5.2. Canábis Medicinal

De acordo com as Convenções das Nações Unidas, as substâncias de abuso sob controlo internacional devem limitar-se, exclusivamente, a fins medicinais e científicos (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, 2018). Assim, os produtos derivados da canábis para fins medicinais não são estritamente proibidos pela legislação internacional. Porém, a autorização de prescrição, comercialização e consumo destes produtos encontra-se sujeita a procedimentos legais específicos da responsabilidade da autoridade definida pelo respetivo Estado-Membro (Comissão Europeia, 2001). Importa salientar que nenhum Estado-Membro da União Europeia autoriza fumar canábis para fins medicinais. Em Portugal, o quadro legal para a utilização de medicamentos,

preparações e substâncias à base da planta de canábis para fins medicinais é fixado pela Lei n.º 33/2018 de 18 de julho, sendo esta regulada pelo Decreto-Lei n.º 8/2019 de 15 de janeiro (Diário da República Eletrónico, 2018, 2019). Nesta extensão, medicamentos, preparações e substâncias à base da planta de canábis referem-se às folhas e sumidades floridas ou frutificadas da planta, ao óleo e outros extratos padronizados ou preparados extraídos ou produzidos a partir da respetiva planta. De acordo com o artigo 2.º desta Lei, estes produtos encontram-se sempre sujeitos a uma autorização emitida pela Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I. P. (INFARMED, I.P.) (Diário da República Eletrónico, 2018). Compete a esta autoridade determinar e supervisionar os procedimentos inerentes à produção e utilização dos mesmos, desde o seu cultivo e fabrico à determinação da sua adequabilidade para fins terapêuticos e medicinais, aprovação dos contextos terapêuticos de aplicação, venda e entrega. As autorizações necessárias para as atividades referidas devem ser requeridas ao INFARMED, como estatuído no Decreto Regulamentar n.º 61/94 de 12 de outubro que visa estabelecer as regras alusivas ao controlo do mercado lícito das substâncias e produtos constantes das tabelas I a VI do Decreto-Lei n.º 15/93 de 22 de janeiro (Diário da República Eletrónico, 1994). No que concerne à prescrição, como estatuído no artigo 5.º, esta requer uma receita médica especial emitida somente se as abordagens terapêuticas tradicionais com medicamentos autorizados não produzirem os efeitos esperados ou se desencadearem efeitos adversos relevantes (Diário da República Eletrónico, 2018). Salienta-se ainda que a sua dispensa em farmácia só sucede perante apresentação da receita referida.

Até ao momento, o INFARMED autorizou a utilização de apenas dois produtos derivados da canábis para fins medicinais e terapêuticos, sendo estes o Sativex e o Tilray Flor Seca THC. O Sativex, trata-se de uma solução para pulverização bucal, que foi o primeiro medicamento derivado da canábis aprovado em Portugal (Infarmed, 2022). Apesar da aprovação da sua comparticipação só ter ocorrido em 2018, este medicamento, que se encontrava limitado ao uso hospitalar, é comercializado em Portugal desde 2012 (Ordem dos Farmacêuticos, 2015). Este produto é vendido sob a forma de frascos nebulizadores de 10 mL e é utilizado para melhorar os sintomas associados à rigidez muscular (espasticidade) resultante da esclerose múltipla. Os seus princípios ativos, o Δ^9 -THC e o CBD, apresentam-se numa dosagem de 27 mg/mL e 25 mg/mL, respetivamente (Infarmed, 2022). Já em 2021, o INFARMED aprovou o Tilray Flor Seca THC 18, consistindo este numa preparação de origem vegetal para inalação por vaporização com

dispositivo médico certificado (Infarmed, 2021). O produto é vendido numa embalagem que contém 15 g de flores secas da planta fêmea de *Cannabis sativa* L., estando indicado para uma série de contextos terapêuticos, tais como náuseas e vômitos resultantes da quimioterapia, estimulação do apetite nos cuidados paliativos de doentes oncológicos ou portadores de SIDA, dor crónica, entre outros. Possui os mesmos princípios ativos que o Sativex, porém o seu teor de Δ^9 -THC (18 %) é bastante superior ao verificado de CBD (1%) (Infarmed, 2021).

1.5.3. Canábis Industrial

De acordo com o ponto 6 do artigo 32.º do Regulamento (UE) N.º 1307/2013 de 17 de dezembro, o cultivo e fornecimento das variedades de plantas de canábis é permitido para fins industriais desde que estas não apresentem níveis de THC superiores a 0,2% (p/p) (Jornal Oficial da União Europeia, 2013a). No seguimento deste limite, o artigo 189.º presente no Regulamento (UE) N.º 1308/2013, alusivo ao estabelecimento da organização comum dos mercados dos produtos agrícolas, define que a importação de cânhamo em bruto e das suas sementes para sementeira é permitida desde que o cumprimento do nível de THC referido esteja assegurado (Jornal Oficial da União Europeia, 2013b). Considerando o risco de dissimulação de culturas ilícitas, o Regulamento (UE) N.º 1307/2013 ressalva que os pagamentos definidos devem ser prestados exclusivamente face a culturas sobre as quais existam garantias relativas ao teor de substâncias psicotrópicas. Para tal, recomenda a definição de procedimentos de averiguação das variedades de cânhamo e dos respetivos conteúdos de THC (Jornal Oficial da União Europeia, 2013a). Em Portugal, devido ao crescente interesse no seu cultivo para produção de fibras, sementes e outros produtos de interesse agroindustrial, alterou-se o Decreto Regulamentar n.º 61/94 de 12 de outubro, através da redação do Decreto Regulamentar n.º 2/2020 de 4 de agosto, para estabelecimento do regime de autorização do cultivo e exploração industrial de variedades de cânhamo (Diário da República Eletrónico, 2020a). De acordo com o ponto 4 do artigo 13.º do Decreto Regulamentar n.º 2/2020, o controlo do cultivo de cânhamo para fins industriais e alimentares recai sobre o Instituto de Financiamento da Agricultura e Pescas, I.P., coadjuvado pela Polícia Judiciária, a Guarda Nacional Republicana e a Polícia de Segurança Pública, encontrando-se as competências definidas no Despacho n.º 10953/2020 de 9 de novembro

(Diário da República Eletrónico, 2020b). A autorização necessária para esta atividade deve ser requerida à Direção-Geral de Alimentação Veterinária.

Já os alimentos derivados da planta, autorizados para ser comercializados na União Europeia necessitam de ser provenientes exclusivamente das sementes do cânhamo com teor THC dentro do limite estabelecido (0,2%), nomeadamente óleo de sementes, proteína de cânhamo, farinha de cânhamo, e desde que não apresentem na sua rotulagem alegações de saúde e propriedades terapêuticas (ASAE, 2019). Como se inserem na categoria de novos alimentos, de acordo com o Regulamento (UE) n° 2015/2283 de 25 de novembro, para poderem ser colocados no mercado terão de passar pelo procedimento de autorização, sendo necessária uma realizar análise de risco pela Autoridade de Segurança Alimentar Europeia (EFSA) (Jornal Oficial da União Europeia, 2015). No ano de 2019, a Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE), nas suas ações de fiscalização a nível nacional, nos apenas 50 operadores económicos inspecionados, apreendeu produtos num valor superior a 15000€. As principais infrações reportadas remetem para a falsificação de géneros alimentícios por adição de substâncias não autorizadas, irregularidades de rotulagem e ainda a ausência de notificação à autoridade competente (ASAE, 2019).

1.6.Principais Canabinoides Sujeitos a Controlo

Considerando os aspetos supramencionados, referentes às propriedades dos fitocannabinoides e à sua regulamentação legal, verifica-se que o controlo do Δ^9 -THC e do seu precursor ácido é de extrema importância. A par destes, destacam-se o CBD, tanto devido às suas propriedades de interesse terapêutico como para o estabelecimento da razão entre as concentrações deste e do THC na planta, o seu precursor ácido (utilizado para a determinação do rácio THCA/CBDA), e ainda o CBN e o Δ^8 -THC, visto que estes cannabinoides derivam do Δ^9 -THC (Borille et al., 2017; Hädener et al., 2019). Para além disso, o Δ^8 -THC foi considerado recentemente uma NPS (*New Psychoactive Substance*), termo definido pela UNODC como substâncias de abuso não controladas pelas convenções de 1961 ou de 1971, mas que podem representar uma ameaça para a saúde pública (UNODC, 2019). O termo "novo" não remete necessariamente a uma nova criação ou descoberta, mas a substâncias que se tornaram recentemente disponíveis no

mercado. O Δ^8 -THC tem sido reportado em vários produtos, apresentado de diversas formas (Bernhard et al., 2022; Meehan-Atrash & Rahman, 2022).

1.7.Determinação do teor de Canabinoides na planta da canábis

1.7.1. Preparação da Amostra

Para o doseamento de canabinoides em material de origem vegetal é necessário realizar um passo de preparação da amostra antes da análise instrumental. No caso do canábis herbáceo, o material vegetal fresco (húmido) é seco ao ar, à temperatura ambiente, durante vários dias ou, alternativamente, a 40 °C num forno apropriado até as folhas se tornarem quebradiças (Fekete et al., 2018; Hädener et al., 2019). Concluído este processo, as flores e folhas secas são grosseiramente selecionadas e pulverizadas. Se a amostra se tratar de resina de canábis, esta é reduzida a pequenos pedaços. No entanto, se a sua consistência for pegajosa, a amostra é arrefecida com azoto líquido e imediatamente pulverizada (Thomsen et al., 2019; UNODC, 2022). Relativamente aos óleos de canábis, é comum realizar-se uma simples diluição da amostra com etanol ou metanol, não requerendo uma etapa de preparação mais complexa e trabalhosa (Calvi et al., 2018; Casiraghi et al., 2018; UNODC, 2009b). No entanto, é de realçar os estudos de Namdar et al., que se focaram nos diversos fatores que influenciam a composição química obtido do extrato, como a polaridade do solvente utilizado para a extração, os processos de secagem e métodos de separação. Verificaram ainda que independentemente dos métodos de extração e análise aplicados, as quantidades de canabinoides e terpenoides nas inflorescências diminuíam com a posição da inflorescência colhida. Ou seja, quão mais para baixo no caule está a inflorescência, menos quantidade de compostos ela terá (Namdar et al., 2018).

1.7.2. Testes Presuntivos

Para uma análise preliminar, não quantitativa, que indicará a possibilidade da presença dos principais canabinoides, os testes colorimétricos são a técnica mais utilizada. Por outro lado, para uma análise preliminar semi-quantitativa do teor de canabinoides em extratos de origem vegetal pode também ser empregue a cromatografia em camada fina (TLC) (UNODC, 2022). Nesta técnica, a fase estacionária é uma fina camada de material

adsorvente, geralmente sílica gel, revestida numa superfície de placa inerte, tipicamente de alumínio. A amostra é colocada na placa TLC e esta é posicionada verticalmente numa câmara fechada com um solvente orgânico, a fase móvel. A fase móvel elui na placa por forças capilares e os componentes da amostra, com base nas suas afinidades diferenciais para as fases estacionária e móvel, migram distâncias variáveis, conforme a sua retenção. A sua identificação assenta na comparação entre os valores dos fatores de retenção (R_f) de soluções padrão de canabinoides com os valores obtidos para as amostras em análise (Skoog, Holler, & Crouch, 2017).

1.7.2.1. Testes Colorimétricos- Fast Blue BB

Os testes colorimétricos desenvolvidos para a deteção de canábis encontram-se entre os testes colorimétricos mais específicos disponíveis. Neste sentido, a UNODC estabeleceu três testes colorimétricos para a análise presuntiva de canabinoides, sendo estes o Fast Corinth V Salt, o Fast Blue BB Salt e o Rapid Duquenois (teste de Duquenois-Levine) (Garrido, Ribeiro, & de Moura Neto, 2013; UNODC, 2009b). Na presença de canábis, os dois primeiros testes originam uma coloração roxa avermelhada, enquanto o terceiro teste resulta numa cor roxa (UNODC, 2009b). Tratando-se de um teste presuntivo, importa salientar que o resultado é somente uma indicação da possível presença de canábis no material sob análise. Como tal, a realização de uma análise, baseada numa técnica confirmatória, com maior poder discriminatório revela-se imprescindível para confirmar o resultado previamente obtido.

O teste Fast Blue BB Salt consiste na aplicação de um solvente extrator, éter de petróleo, num primeiro filtro de papel. Num segundo filtro, é aplicado o sal Fast Blue BB, que reage com a amostra, e uma solução aquosa de bicarbonato de sódio que garante condições básicas. Foi determinado por (Acosta & Almirall, 2021) que, em condições básicas, o Δ^9 -THC torna-se um anião fenolato e que este anião “ataca” o grupo diazo (dois azotos ligados) no sal Fast Blue BB na posição para, formando o cromóforo (vermelho). Um deslocamento batocrómico - alteração da posição da banda espectral para um comprimento de onda maior, resulta da conjugação prolongada no cromóforo e da transição causada pelos eletrões do grupo diazo do sal (Clarke, 2011; Pavia, Lampman, Kriz, & Vyvyan, 2013; UNODC, 2022). Para o CBD a reação é semelhante, porém o

deslocamento é menor, originando um tom alaranjado, como pode ser observado na Figura 5 (Acosta, Li, Weaver, Capote, & Perr, 2022).

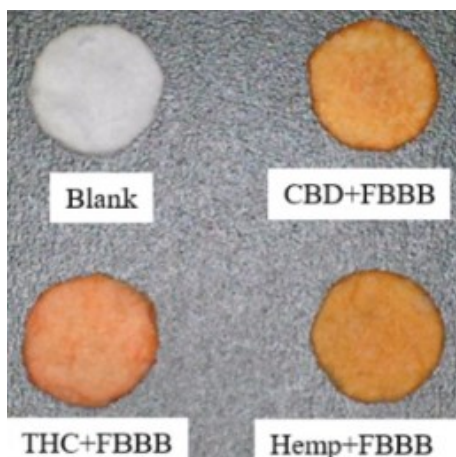


Figura 5 - Exemplo de resultados obtidos com a aplicação do teste Fast Blue BB salt (FBBB). O CBD e a amostra de cânhamo obtiveram uma cor laranja, enquanto o Δ^9 -THC produz uma cor avermelhada. Adaptado de (Acosta, A.; Almirall, J, 2021).

1.7.3. Técnicas de Extração

Relativamente ao cânabis herbáceo, a matriz mais referida na determinação de canabinoides em material vegetal, a técnica de extração mais aplicada é a extração sólido-líquido (LSE), usualmente assistida de sonicação (Aizpurua-Olaizola et al., 2014; Hädener et al., 2019). Este procedimento envolve a utilização de um solvente apropriado para o qual os canabinoides possuam elevada afinidade (Mandrioli et al., 2019; Nemeškalová et al., 2020). Relativamente ao procedimento de extração em resina, a LSE é também amplamente utilizada, bem como o recurso à sonicação (Ferrer & Thurman, 2020). Relativamente aos óleos derivados da cânabis, é comum recorrer-se à LLE (Carcieri et al., 2017) porém, a diluição referida anteriormente pode ser suficiente para alcançar os objetivos analíticos (Casiraghi et al., 2018). A extração dos canabinoides nas suas formas ácidas e neutras pode executar-se com recurso a um único solvente orgânico comum ou a uma mistura destes. O etanol e o metanol são os solventes mais empregues, tanto isolados como em misturas, apresentando uma elevada eficiência devido à grande afinidade com a estrutura molecular dos canabinoides (Borille et al., 2017; Dei Cas et al., 2020; Nahar, Onder, & Sarker, 2020). Alguns dos solventes tipicamente utilizados em conjugação com estes álcoois são o clorofórmio, o hexano e a acetona (Cardenia et al.,

2018; Hädener et al., 2019; UNODC, 2022; Wang et al., 2017). Quando o alvo da análise são os canabinoides na forma ácida, é necessário efetuar a extração à temperatura ambiente, garantindo que não ocorre a sua conversão nas respectivas formas neutras. e com ela, a alteração da constituição da amostra. Mais recentemente, têm vindo a aplicar-se novas técnicas de extração para canabinoides em material vegetal, destacando-se a microextração de fase sólida (SPME) (Calvi et al., 2018; Ferrer & Thurman, 2020) e a extração por fluido supercrítico (SFE) (Aizpurua-Olaizola et al., 2014; Citti et al., 2018; Nahar, Guo, & Sarker, 2020).

1.7.4. Métodos e Condições de Análise

O termo “cromatografia” foi apresentado e primeiramente utilizado pelo botânico russo Mikhail S. Tswett em 1906, quando empregou a técnica para separar diversos pigmentos de plantas através da passagem de soluções numa coluna de vidro empacotada com carbonato de sódio. As espécies separadas surgiam como bandas coradas na coluna surgindo o termo “cromatografia”, do grego “chroma” - cor e “graphein” - escrita (Ettre & Hinshaw, 2008).

1.7.4.1. Técnicas Cromatográficas: Descrição Geral

As técnicas cromatográficas têm sido as técnicas de separação mais utilizadas devido à grande necessidade de métodos capazes de caracterizar diversos tipos de misturas complexas. Assim, a cromatografia tem tido um papel decisivo nas diversas descobertas científicas (Miller, 2009; Skoog et al., 2017).

Em todas as separações cromatográficas, a amostra é dissolvida numa fase móvel, que pode ser um gás, um líquido, ou um fluido supercrítico. Esta fase móvel é então forçada através de uma fase estacionária imiscível, fixada numa coluna ou numa superfície sólida (Fanali et al., 2013). As duas fases são escolhidas de modo que os componentes da amostra se distribuam entre as fases móvel e estacionária de forma diferente. Os componentes fortemente retidos pela fase estacionária movem-se mais lentamente com o fluxo da fase móvel, ao contrário dos menos retidos. Devido a estas diferenças de migração, os componentes da amostra separam-se em bandas distintas, permitindo a sua análise qualitativa e quantitativamente (Harris, 2010; Skoog et al., 2017).

1.7.4.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A cromatografia líquida (LC) é um método de separação cromatográfica baseada na diferença na distribuição dos compostos entre duas fases não miscíveis, em que a fase móvel é um líquido que transita através de uma fase estacionária contida numa coluna (Akram & Umamahesh, 2018). Na cromatografia em fase líquida em coluna clássica, o movimento da fase móvel ocorre por ação da gravidade, sendo a separação lenta. No entanto, com recurso à moderna instrumentação cromatográfica, a cromatografia em fase líquida de alta eficiência (HPLC) permite obter uma melhor resolução para além de maior rapidez de análise, sendo considerada a mais versátil e a mais usada para a separação de compostos.

Especificamente nos estudos de canabinoides, na constituição da fase móvel a utilização de acetonitrilo (Mandrioli et al., 2019) ou metanol (Nemeškalová et al., 2020) com a conjugação com água e uma pequena percentagem, geralmente 0,1%, de ácido fórmico (Aizpurua-Olaizola et al., 2014; Hädener et al., 2019) ou ácido acético (Nahar, Onder, et al., 2020) são as mais referidas.

Em relação à sua classificação, no que reporta aos mecanismos de separação, as variedades incluem a partição (cromatografia L-L), adsorção (cromatografia S-L), permuta iónica (cromatografia iónica), cromatografia de afinidade, e ainda a cromatografia exclusão molecular (Akram & Umamahesh, 2018; Skoog et al., 2017), sendo que a HPLC utilizada todos estes processos de distribuição.

Os principais componentes de um sistema de HPLC são compostos por uma bomba que propulsiona o eluente proveniente de reservatórios, um sistema de injeção onde a amostra é introduzida, uma coluna onde ocorre a separação e um detetor que permite registar a separação, controlados por um *software*. A Figura 6 ilustra um esquema simplificado de um sistema de HPLC convencional, podendo ainda conter coletores de frações, dispositivos para condicionamento da coluna (termostato), pré-coluna, entre outros.

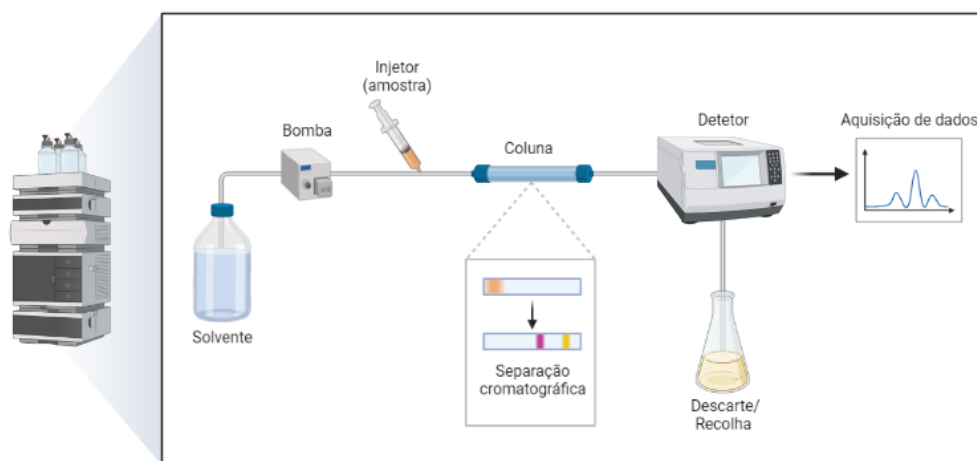


Figura 6 - Breve esquema dos constituintes de um sistema de HPLC. Elaborado no BioRender.

O processo cromatográfico começa com a injeção do soluto no sistema instrumental. A separação dos componentes ocorre quando os analitos e a fase móvel são bombeados através da coluna. Eventualmente, cada componente é eluído da coluna e é registado como um pico. A detecção dos componentes eluídos é importante; podendo ser seletivo ou universal, dependendo do detetor utilizado. A resposta do detetor a cada componente é obtida, o cromatograma. Para recolher, armazenar e analisar os dados cromatográficos, são utilizados frequentemente computadores, e outros equipamentos de processamento de dados (Clarke, 2011). Para além da receção e comunicação de resultados do detetor, os computadores permitem controlar configurações e operações cromatográficas (Akram & Umamahesh, 2018).

Em HPLC, os reservatórios para a fase móvel devem ser o mais inertes possíveis, equipados com um sistema que permita desgaseificar a fase móvel, pois a análise pode ser prejudicada pela presença de gases dissolvidos na mesma. As análises por HPLC podem ser efetuadas de duas formas, ou mantendo a composição constante ou variável, designando-se por eluição isocrática ou por gradiente, respetivamente (Skoog et al., 2017). A maioria dos trabalhos com canabinoides, refere a utilização de um gradiente de eluição para obtenção de uma resolução satisfatória na separação (Aizpurua-Olaizola et al., 2014; Dei Cas et al., 2020), existindo ainda alguns trabalhos empregando uma eluição isocrática (Borille et al., 2017; Chandra et al., 2017).

A fase móvel é impulsionada por uma bomba, sendo as recíprocas as mais utilizadas, podendo o sistema de funcionamento ser isocrático, binário ou quaternário. Para tal, é

necessária aplicação de altas pressões, sendo que quanto menores são as partículas de empacotamento utilizadas nas colunas, maior terá de ser a pressão (Clarke, 2011).

No sistema de injeção, a amostra é introduzida com o auxílio de uma seringa convencional e válvulas especiais que possibilitam grande precisão e exatidão. Existem dois modos de injeção, o modo de injeção “stop-flow” e o modo de injeção com sistema de “loop”, mais comumente utilizado, sendo atualmente automático (Harris, 2010). É nas colunas cromatográficas que a separação dos vários analitos da amostra ocorre.

As colunas utilizadas em HPLC são vulgarmente em aço inoxidável contendo um enchimento com partículas de diâmetro compreendido entre 3 e 5 μm . As colunas analíticas têm usualmente cerca de 5 a 25 cm em comprimento e 3 a 5 mm de diâmetro interno. Dependendo do tipo de análise ou amostras a estudar, são por vezes usadas pré-colunas colocadas à entrada da coluna analítica, que têm como finalidade prolongar o seu tempo de vida útil, retendo eventuais impurezas. Consoante a polaridade das partículas usadas no enchimento das colunas, estas podem ser classificadas como fase normal, para um enchimento com partículas de características mais polares, ou como fase reversa, quando as partículas apresentam características apolares, sendo as últimas as mais vulgarmente usadas e referidas na determinação de canabinoides. Na sua grande maioria, constituídas por metilo, octilo (C8) (Borille et al., 2017) e octadecilsílica (C18) (Nemeškalová et al., 2020).

Os compostos separados na coluna cromatográfica são posteriormente detetados por um dispositivo adequado. Há uma grande variedade de sistemas de deteção que se baseiam tanto em propriedades físicas como nas propriedades químicas dos solutos, podendo ainda basear-se na variação das propriedades físicas da fase móvel como é, por exemplo, o índice de refração. Um dos detetores mais comuns em HPLC é o ultravioleta/visível (UV/Vis) (Mandrioli et al., 2019), podendo operar com comprimento de onda variável ou múltiplo. Ultimamente, o recurso a detetores por rede de díodos (DAD), cujo funcionamento possibilita o varrimento espectral em simultâneo, apresenta vantagens qualitativas, em particular para identificação (Hädener et al., 2019). Outros detetores muito usados são o de fluorescência, eletroquímico, condutividade e, na atualidade, o acoplamento a espectrometria de massa (MS) (Harris, 2010; Swartz & Swartz, 2010).

Atualmente, os detetores óticos são os mais utilizados em sistemas HPLC. A maioria das aplicações na análise de drogas utilizam detetores que respondem à absorção da radiação

UV (ou luz visível) pelo soluto à medida que este passa através da célula de fluxo. As alterações de absorção são proporcionais à concentração, seguindo a Lei de Lambert-Beer. Estes detetores oferecem boa sensibilidade com muitos compostos, não são afetados por ligeiras flutuações no fluxo e na temperatura, e não são destrutivos, o que permite que os solutos sejam posteriormente recolhidos e analisados, se desejado (Clarke, 2011; Swartz & Swartz, 2010).

O DAD é um tipo avançado de detetor UV-Vis. Dependendo do comprimento de onda, uma lâmpada de tungsténio e uma lâmpada de deutério são utilizadas como fontes de luz. O feixe de luz policromático é focado numa célula de fluxo e subsequentemente disperso por uma grelha holográfica ou prisma de quartzo. A luz espectral chega então a um “chip” que contém 100-1000 díodos fotossensíveis dispostos lado a lado. Cada díodo regista apenas uma fração definida da informação permitindo que todos os comprimentos de onda sejam medidos ao mesmo tempo. No final da execução, um cromatograma tridimensional é armazenado no computador e pode ser avaliado qualitativa e quantitativamente. O conhecimento dos espectros dos compostos de interesse permite eliminar os picos de interferência de modo que uma quantificação precisa dos picos de interesse possa ser conseguida apesar de uma resolução inferior à ótima (Clarke, 2011).

Ao contrário da cromatografia gasosa (GC), esta técnica não só é não destrutiva como pode ser aplicada a compostos não voláteis além dos semi-voláteis, e ainda termicamente instáveis (termolábeis). A maioria das separações difíceis são muitas vezes facilmente atingidas por HPLC porque ambas as fases utilizadas participam no processo cromatográfico (em oposição a apenas uma em GC), de forma a aumentar as interações mais seletivas com as moléculas da amostra em estudo (Akram & Umamahesh, 2018). No contexto da presente dissertação, a sua principal vantagem é a capacidade de separação e quantificação de canabinoides, tanto na forma neutra como na forma ácida, sem necessidade de uma etapa de derivatização (Borille et al., 2017; Chandra et al., 2017; Citti et al., 2018). Adicionalmente, a HPLC apresenta um risco de decomposição da amostra muito inferior, uma vez que são executadas a temperaturas menores, o que permite a análise direta das formas ácidas dos canabinoides extraídos da amostra.

1.7.4.3. Aspectos teóricos

As técnicas cromatográficas podem ser classificadas pela sua configuração, pelo mecanismo de separação que utilizam ou ainda pelo tipo de fase móvel. Pela configuração- forma física de contacto entre as fases móvel e estacionária, existem a forma planar, no qual a fase móvel é mantida num prato ou folha de papel e a fase móvel move-se por capilaridade ou gravidade, ou em coluna, no qual a fase estacionária é mantida num tubo estreito pelo qual a fase móvel é forçada a passar, sob pressão. No que reporta aos mecanismos de separação, o processo de distribuição pode basear-se na partição, adsorção, permuta iónica, afinidade, e ainda exclusão molecular. Se a classificação tiver por base o tipo de fase móvel, existem três categorias gerais de cromatografia, a GC, a LC e a cromatografia de fluidos supercríticos (SFC). A HPLC e a GC encontram-se sob constante desenvolvimento, sendo técnicas utilizadas em diversas áreas tais como química, biologia, medicina, farmacêutica, controlo de qualidade, entre muitas outras (Clarke, 2011; Skoog et al., 2017).

A separação entre os componentes resulta em diferenças de velocidade ocorridas pela fase móvel que ocorrem devido a diferenças de interação com a fase estacionária, promovendo diferentes distribuições no equilíbrio entre as fases. As concentrações relativas de um componente na fase estacionária (c_S) e na fase móvel (c_M) relacionam-se através do coeficiente de distribuição (K), dado pela seguinte equação (1) (Skoog et al., 2017):

$$K = \frac{c_S}{c_M} \quad (1)$$

Quanto maior for o valor de c_S , maior será o valor de K , ou seja, maior será a interação com a fase estacionária. Os componentes com um valor de K elevado irão mover-se mais lentamente ao longo da coluna, permitindo a sua separação dos componentes com um valor de K mais baixo.

A separação não advém sem diferenças na forma como os componentes se repartem. A migração diferencial depende de variáveis experimentais que afetam a distribuição, como as características das fases móvel e estacionária, bem como de outros fatores experimentais. A fase móvel ou um composto não retido, chega ao detector quase imediatamente assim que a eluição se inicia, sendo eluído num tempo morto (t_m), enquanto um composto retido eluirá posteriormente, atravessando a coluna num tempo de retenção (t_r) superior, sendo o tempo de retenção relativo (t'_r ou t_{rr}) o tempo adicional que o composto fica na fase estacionária, além do exigido pelo solvente, Figura 7 (Harris, 2010).

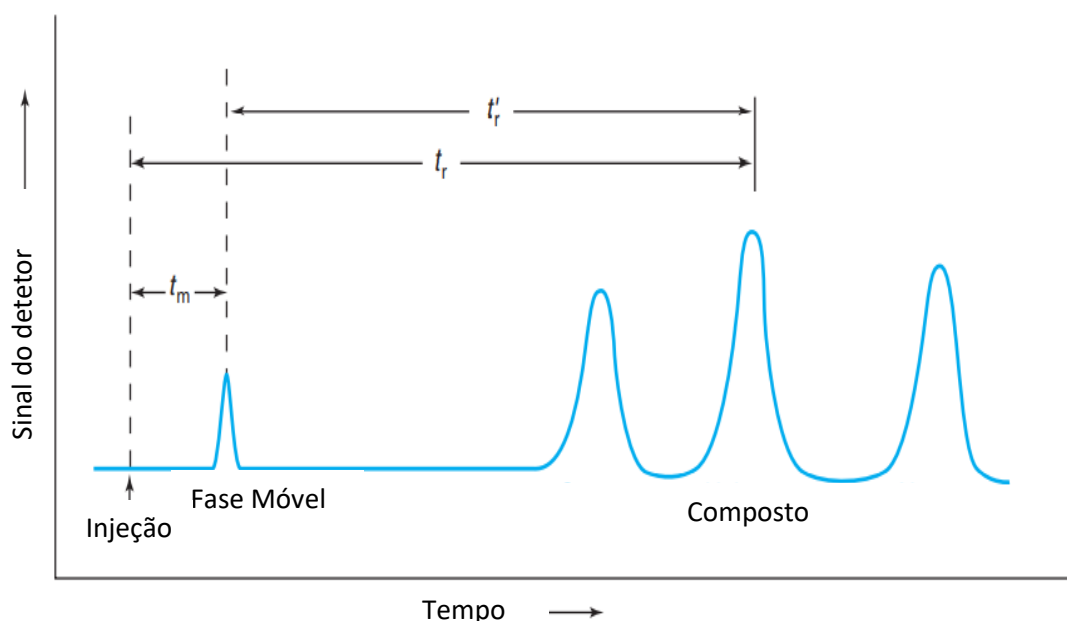


Figura 7 - Ilustração do tempo morto (t_m), do tempo de retenção (t_r) e de retenção ajustado (t'_r) num cromatograma típico. Adaptado de (Harris, 2010).

Uma medida do grau de retenção é representada pelo fator de retenção ou de capacidade (k') que pode ser calculado a partir da equação (2), desde que a velocidade de fluxo seja constante (Harris, 2010):

$$k' = \frac{t_r - t_m}{t_m} \quad (2)$$

A separação de dois compostos adjacentes pode ser expressa pelo fator de separação ou de seletividade (α), que está relacionado com a fase estacionária e condições de operação. Obtém-se pela razão entre os fatores de capacidade de dois compostos adjacentes (1 e 2), equação (3) (Clarke, 2011):

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1}$$

A cromatografia é um fenómeno de depende da transferência de massa, logo a eficiência de uma coluna cromatográfica, que exprime o número de equilíbrios que ocorrem durante a separação, pode ser expressa quantitativamente pelo número de pratos teóricos (N), e correspondente altura equivalente (H ou HETP). A altura equivalente a um prato teórico, pode entender-se como o segmento da coluna no qual o soluto alcança o equilíbrio entre as fases móvel e estacionária. O número de pratos teóricos depende de L e de H, e relacionam-se na equação 4:

$$N = L/H \quad (4)$$

em que L representa o comprimento da coluna cromatográfica. A cada prato teórico corresponde um fenómeno de adsorção-dessorção dos componentes da amostra, entre a fase estacionária e a fase móvel. Assim, quanto menor for o valor de H, maior será o valor de N (Martin & Synge, 1941).

O valor de N é normalmente calculado pela equação (5), em que W é a largura da base de um pico simétrico:

$$N = 16 \times \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 \quad (5)$$

Assim, quanto maior for o N, maior será a eficiência e, portanto, o potencial para separar dois solutos, pela menor largura dos picos.

A teoria dos pratos teóricos possibilita uma descrição aproximada da separação cromatográfica. A nível prático, porém, pode ocorrer o alargamento dos picos ou bandas devido a distintos processos de transporte de massa, os quais modificam a velocidade de migração das moléculas dos compostos no interior da coluna. Portanto, a equação de “Van Deemter” descreve os fenómenos que ocorrem na coluna e que contribuem para a dispersão da banda (Skoog et al., 2017):

$$H = A + \frac{B}{u_x} + C u_x \quad (6)$$

Na equação 6, a constante A está relacionada com a difusão axial, ou seja, com os diferentes percursos que um analito pode percorrer ao atravessar o empacotamento da fase estacionária. O termo B/u_x resulta da difusão molecular longitudinal, sendo esta a dispersão do soluto ao longo do comprimento da coluna – principalmente por difusão na

fase móvel, sendo inversamente proporcional à velocidade linear (u_x) (Edge, 2003; Ibrahim & Ghanem, 2018). O termo Cu_x é de transferência de massa e consiste no tempo necessário para o equilíbrio eluição/retenção do soluto entre as fases móvel e a estacionária, sendo diretamente proporcional à velocidade linear (u_x).

Assim, para a LC, a eficiência da coluna- a capacidade de eluição com o mínimo de dispersão do analito, deverá aumentar drasticamente com a diminuição do tamanho das partículas do preenchimento da coluna e com a sua homogeneidade na mesma.

Tendo em conta que o objetivo das utilizações cromatográficas consta em separar todos os componentes de uma dada mistura, é relevante avaliar o grau de separação entre dois picos adjacentes, designado por resolução (R_s). Assim, a expressão que exprime a R_s em termos dos seus três fatores fundamentais, ou seja, seletividade (α), fator de capacidade (k') e eficiência (N), é a equação (7) (Harris, 2010):

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \times \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \times \left(\frac{k'_2}{k'_2 + 1} \right) \quad (7)$$

Para qualquer pico com formato gaussiano, considera-se uma separação completa ou resolução entre eventuais picos adjacentes sempre que R_s seja superior ou igual a 1,5 (Skoog et al., 2017). O aumento do comprimento da coluna, com o associado aumento no tempo de análise, aumenta de forma pouco significativa a eficiência da separação. Já um modesto aumento na seletividade, terá um impacto mais significativo na resolução (Clarke, 2011).

1.8. Objetivo da tese

Na presente dissertação, pretende-se descrever o desenvolvimento, otimização e validação de uma metodologia de análise utilizada no controlo analítico de 6 principais canabinoides, Δ^9 -THC e CBD, respetivas formas ácidas, CBN e Δ^8 -THC, em material vegetal da canábis. Para tal, recorreu-se à extração sólido-líquido apoiada pela sonicação, com posterior deteção e quantificação por HPLC-DAD. Adicionalmente, é pretendido analisar amostras reais, de forma a averiguar sobre o seu conteúdo de fitocanabinoides e determinar o seu enquadramento legal, bem como a comparação entre o rotulado e os valores quantificados.

2. Materiais e Métodos

A identificação e quantificação dos fitocannabinoides Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), canabidiol (CBD), as suas respetivas formas ácidas (THCA e CBDA), Δ^8 -tetrahydrocannabinol (Δ^8 -THC) bem como canabinol (CBN) por HPLC-DAD em material vegetal da canábis requer processos de preparação da amostra, extração dos componentes da matriz, e posterior análise cromatográfica.

2.1. Materiais

2.1.1. Reagentes químicos e padrões analíticos

O etanol absoluto anidro (EtOH, 99,9 %) de qualidade para HPLC e o ácido fórmico (COOH, 99,0 %) foram fornecidos pela Carlo Erba (França), bem como o sulfato de sódio anidro (99,0%) (Itália).

O metanol (MeOH, 99,9 %), acetonitrilo (ACN, 99,9 %), propan-2-ol (2-PrOH, 99,9 %) de qualidade para HPLC foi obtido da Honeywell (França). O bicarbonato de sódio (99,0%) foi obtido pela Merck (Alemanha). Já o éter de petróleo (95%) foi obtido pela Sigma-Aldrich (Israel), bem como o sal Fast Blue BB (Alemanha). A água ultrapura tipo I usada nos diversos ensaios foi obtida através de um sistema de purificação de água Sinergy-UV (Merck, Portugal).

Todos os materiais de referência certificados (CRM), ou seja, os cannabinoides em solução, Δ^9 -THC, CBD, Δ^8 -THC e CBN, em metanol e Δ^9 -THCA, CBDA em acetonitrilo, foram obtidos à Dr. Ehrenstorfer (Reino Unido) a uma concentração de 1 mg/mL. A femprocumona (97,1%), utilizada como padrão interno (PI), foi também obtido pela Dr. Ehrenstorfer (Reino Unido). A planta de lúpulo seco foi adquirida pela Novadiet (Espanha).

2.1.2. Material corrente e equipamento de laboratório

Para o desenvolvimento da presente dissertação, além de material de vidro e de plástico corrente de laboratório, foram igualmente usadas micropipetas de volume regulável 2-20 μ L, 20-200 μ L e 100-1000 μ L e respetivas pontas de polipropileno (Eppendorf Research, Espanha), *vials* de vidro âmbar de 1,5 mL, 2 mL, 4 mL e 12 mL, tampas seladas e outras

com septo de borracha, bem como *inserts* de vidro de base afilada de 250 μ L (Agilent Technologies, Alemanha).

Foram ainda empregues filtros de papel (Wattman, Reino Unido) e filtros de membrana de polietersulfona (PES) (Filter-Lab, Espanha) com 0,45 μ m de tamanho de poro. Os filtros de politetrafluoroetileno (PTFE) (13 mm, 0,2 μ m de tamanho de poro) foram obtidos pela Wattman, Reino Unido. As extrações foram efetuadas em banho de ultrassons (TPC UC-1000 Ultrasonic Cleaner, 40 kHz, 180 W, EUA) com posterior recurso a seringas esterilizadas de 10 mL (Terumo, Bélgica). As pesagens foram efetuadas numa balança analítica (Sartorius m-power AZ214, Alemanha) e as medições de pH num medidor de pH modelo pHM210, equipado com um eletrodo de vidro combinado (MeterLab, França). Foi igualmente usado um vórtex (“vortex-vib”) modelo 7001725 (J.P. Selecta, 50/60 Hz, Espanha), sistema de secagem por azoto (N_2 , 99,9%) (NIPPON, Espanha) e uma *hotte* Bykg air segregation Equipment modelo BYKG-III (Biobase Biodustry, China). Foram também utilizados um frigorífico combinado (4°C) com compartimento de congelador -20 °C, (Whirlpool CB333W, Portugal), e um congelador vertical a temperaturas ultrabaixas (-80 °C, Panasonic MDF-DU500VH-PE, Japão). O presente trabalho foi desenvolvido com recurso a um cromatógrafo líquido de alta eficiência com deteção por rede de díodos (HPLC-DAD) da Agilent Technologies (Alemanha). O sistema de HPLC-DAD era constituído por uma bomba quaternária (G1311A), um amostrador automático (G1313A), um compartimento da coluna termostaticado (G1316A) e um DAD (G1315A). O registo de dados e controlo instrumental foram efetuados a partir do *software* Clarity Chromatography Station (versão 7.4.1.88; DataApex). A separação cromatográfica foi efetuada numa coluna Kinetex C18 (com 150 $\times$ 4,6 mm, 2,6 μ m de tamanho de partícula; Phenomenex, EUA).

O tratamento de dados foi efetuado com recurso à Minitab e ao Microsoft Excel. A aplicação Minitab (versão 17.1.0) é um *software* de análise estatística que oferece um conjunto de ferramentas de análise de dados. Disponibiliza diferentes tipos de desenhos experimentais, e permite obter gráficos, tabelas e imagens representativas dos resultados obtidos.

A aplicação Microsoft Excel (versão 2208), é das mais utilizadas atualmente para recolha e tratamento de dados, fazendo uso de folhas de cálculo. Tem uma vasta gama de funções fornecidas para responder a necessidades estatísticas, permitindo construir gráficos para diferentes fins.

2.1.3. Amostras

As amostras de canábис utilizadas neste estudo foram obtidas em diversas lojas no concelho de Almada ($n = 10$), de diferentes marcas, de forma a ter uma amostragem rápida dos produtos disponíveis no mercado (Figura 8).



Figura 8- Exemplo da apresentação de amostra herbácea (A7).

Outras amostras de canábис ($n = 7$) foram fornecidas pela Kosmicare, ao abrigo de um protocolo existente com o Laboratório de Ciências Forenses e Psicológicas Egas Moniz (LCFPEM) datado a novembro de 2020. A Associação Kosmicare tem como uma das suas principais missões reduzir os riscos e minimizar os danos associados ao consumo de substâncias psicoativas licitas e ilícitas, nomeadamente através da prestação de um serviço que permite às pessoas que consomem substâncias psicoativas analisarem quimicamente os produtos para consumo e receberem informação objetiva e aconselhamento sobre a composição e os efeitos das mesmas (serviço de *Drug Checking*).

Todas as amostras foram armazenadas em cofre e preservado do sol e do calor, em vidro âmbar e cobertas com papel alumínio (Tabela 1).

Tabela 1- Listagem das amostras analisadas. Indicação da forma como foram obtidas, a percentagem de THC descrita no rótulo do produto, bem como outras informações e teores alegados.

Amostra	Origem	Tipo	% THC descrita	Observações
A1	Kosmicare	Herbáceo		
A2	Kosmicare	Herbáceo		
A3	Kosmicare	Herbáceo		Odor mais intenso, acre
A4	Kosmicare	Herbáceo		Amostra com mais de 6 anos
A5	Loja	Herbáceo	<0,2 %	Rótulo a indicar: “CBD 10%”

A6	Kosmicare	Herbáceo		
A7	Kosmicare	Herbáceo		
A8	Kosmicare	Herbáceo		Odor intenso
A9	Loja	Herbáceo	<0,2 %	Rótulo a indicar: “CBD+CBDA alto”
A10	Loja	Herbáceo	<0,2 %	Rótulo a indicar: “4 a 9% CBD”
A11	Loja	Herbáceo	<0,2 %	Rótulo a indicar: “6 a 8% CBD”; odor adocicado
A12	Loja	Herbáceo	0.14%	Rótulo a indicar: “Mix de flores <i>outdoor</i> . Análise de laboratório certificado. CBDA:6.30%, CBD:0.07%, CBN:0.01%”
A13	Loja	Herbáceo	<0,2 %	Rótulo a indicar: “CBD < 14%”
A14	Loja	Herbáceo	<0,2 %	Rótulo a indicar: “CBD < 12%”
A15	Loja	Herbáceo	<0,2 %	Rótulo a indicar: “CBD 18-20%”
B1	Loja	Óleo “de cânhamo”	<0,2 %	Rótulo a indicar: “500 mg CBD”; “Testado em laboratórios”; 10 mL
B2	Loja	Óleo	<0,2 %	Rótulo a indicar: “CBD oil 1000 mg”; “food supplement”; 10 mL

As amostras herbáceas (A) e os óleos (B) (Figura 9) obtidas nas lojas têm sempre a indicação para “não destinado a consumo humano”, e algumas ainda “destinado a utilização técnica/coleccionismo”. Todas garantem ser “canábis legal”, com um teor “legal de THC”, algumas apresentando ainda resultados de “análises em laboratório”, como a amostra A12 ou a A15. Refere-se ainda o controlo de qualidade a que são submetidas, sendo “colhidas manualmente”, “100% orgânico” e “não contendo organismos geneticamente modificados (GMO)”.

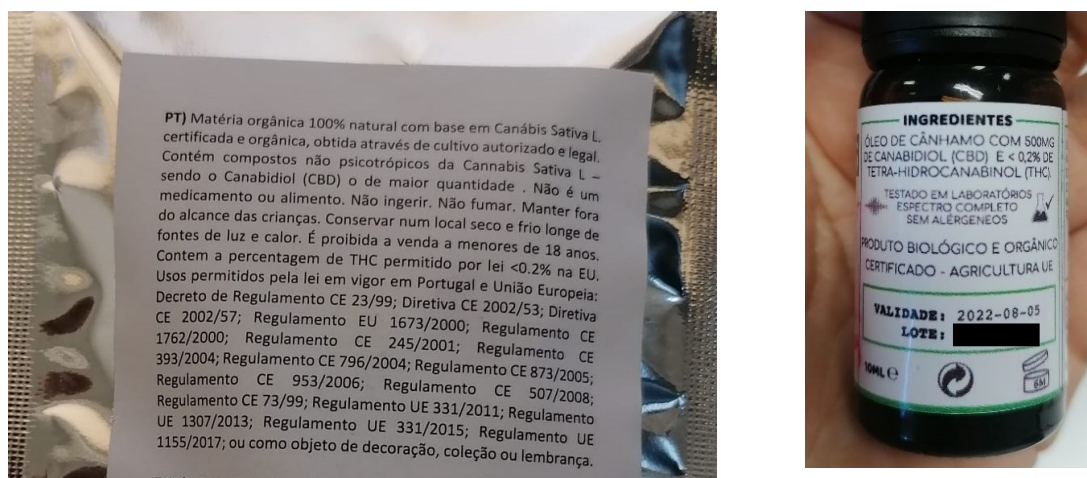


Figura 9- Rótulos de amostras herbácea (A) e de óleo de cânabis (B). Referem o cumprimento das leis e normas portuguesas e europeias, bem como um teor de THC inferior a 0,2%.

2.2.Procedimento Experimental

2.2.1. Preparação de Soluções de trabalho

2.2.1.1. Calibradores

A reta de calibração foi elaborada com calibradores analisados em triplicado. A gama de trabalho definida foi entre 0,5 µg/mL e 25,0 µg/mL, pelo que foram escolhidos 6 valores para a sua construção.

Cada calibrador (0,5; 2,5; 5,0; 10,0; 15,0 e 25,0 µg/mL) foi preparado individualmente a partir de soluções intermédias de mistura dos fitocannabinoides em estudo, evitando assim a propagação do erro, com recurso a micropipetas P20, P100, P200, P1000 e respetivas pontas.

A partir de uma solução mistura com os 6 canabinoides, cada a 50,0 µg/mL, foram preparadas as soluções a 25,0 µg/mL, a 15,0 µg/mL e 10,0 µg/mL. A partir de uma solução mistura a 10,0 µg/mL, foram preparadas as soluções a 5,0 e 2,5 µg/mL. Por fim, a solução a 0,5 µg/mL foi preparada partindo de uma solução mistura a 5,0 µg/mL, como esquematizado na Figura 10.

Todas as soluções foram aferidas com metanol (WHO, UNODC) e PI a 100 µg/mL, de forma a obter uma concentração final de PI de 50,0 µg/mL em cada solução, e posteriormente armazenadas e conservadas em frascos de vidro âmbar, nas temperaturas

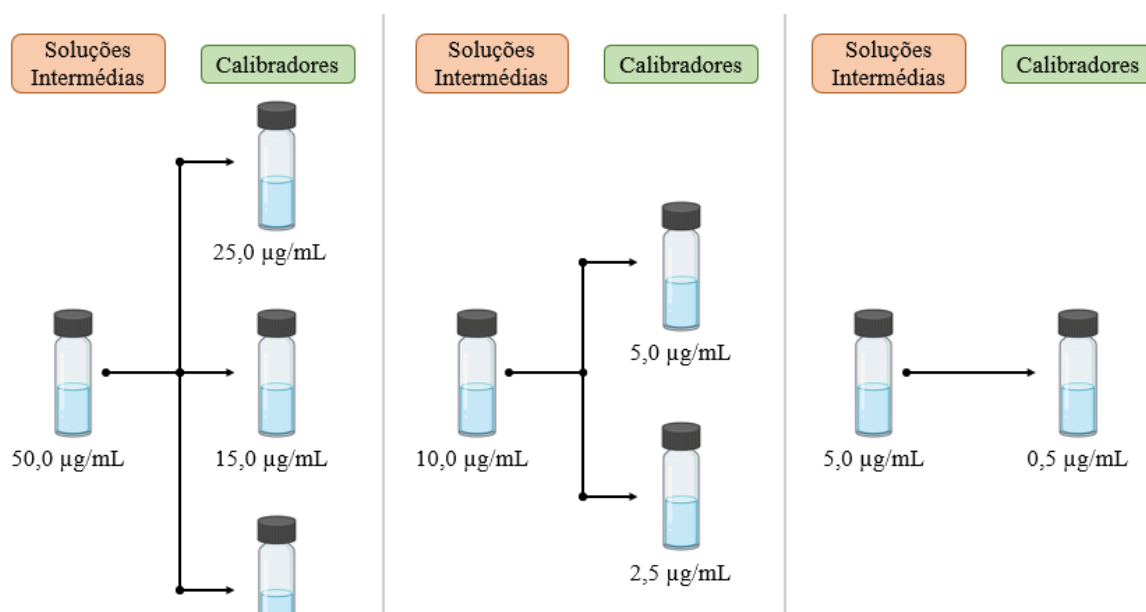


Figura 10-Esquema da preparação dos seis calibradores a partir de soluções intermédias. Aos calibradores foi adicionado o PI e aferidos com metanol.

recomendas para cada material de referência (-80°C no caso de misturas contendo Δ^9 -THCA).

2.2.1.2. Solução de PI a 1000 µg/mL

Para um frasco de vidro âmbar de 2 mL, pesou-se 2 mg de femprocumon e adicionou-se 2 mL de metanol. De seguida, levou-se ao vórtex. Caso o vórtex não fosse suficiente para solubilizar o composto, a solução era levada ao aparelho de ultrassons.

Solução de femprocumona 100 µg/mL

Para um frasco de vidro âmbar de 2 mL, transferiu-se 200 µL da solução de femprocumona a 1000,0 µg/mL e adicionou-se 1,8 mL de metanol. De seguida, levou-se ao vórtex.

Solução de femprocumona 50 µg/mL

Para um frasco de vidro âmbar de 2 mL, transferiu-se 1 mL da solução de femprocumona 100 µg/mL e adiciona-se 1 mL de metanol. De seguida, levou-se ao vórtex.

Todas as soluções de PI foram armazenadas e conservadas no frigorífico a -4 °C em frascos de vidro âmbar, de acordo com as condições recomendadas.

2.2.1.3. Controlos Positivos

De forma a garantir um controlo de qualidade do método desenvolvido, são utilizados controlos positivos de diferentes concentrações contendo os compostos em estudo, dentro da gama de trabalho estabelecida. Foram definidos três níveis, baixo (1,0 µg/mL), médio (12,5 µg/mL) e alto (20,0 µg/mL). Os controlos foram realizados partindo de soluções intermédias de mistura com todos os canabinoides em estudo, utilizando uma solução a 50,0 µg/mL na preparação do controlo positivo médio e alto, e uma solução a 10,0 µg/mL na preparação do calibrador baixo, sempre com recurso a micropipetas e pontas adequadas. Os controlos positivos foram armazenados e conservados a -80°C em frascos de vidro âmbar.

2.2.1.4. Controlos Negativos e Branco de reagentes

Foram ainda preparadas soluções de brancos para os ensaios de recuperação e de todo o processo de validação do método. Prepararam-se soluções da mesma forma descrita para cada ensaio anterior, contendo apenas o solvente extrator (branco de reagentes), lúpulo fortificado apenas com PI e ainda lúpulo sem fortificação (controlos negativos).

2.2.2. Otimização do processo de extração

Para a otimização do processo da extração, foram avaliados vários parâmetros com recurso a diferentes desenhos experimentais, de forma a facilitar o manuseamento, diminuir a quantidade de solventes e de tempo despendido. Os parâmetros considerados foram o tipo de solvente e volume de extrator, assim como o número e tempo de extração. Os ensaios descritos nesta secção foram elaborados com 50 mg da amostra A6 (3.1 e 3.2) e utilizando a amostra A7 (3.3), de forma a ter em conta possíveis interferências da própria matriz, e facilitando a análise dos resultados, sendo apenas necessário a comparação entre as áreas dos picos para cada canabinoide presente nas amostras. A ordem dos ensaios foi aleatória, atribuída pelo próprio Minitab.

2.2.2.1. Escolha do solvente

Após a construção inicial do método, utilizando uma amostra herbácea para o estudo preliminar, foram realizados ensaios de canabinoides a partir do material vegetal. Primeiramente, foi elaborado um desenho experimental com recurso à aplicação Minitab. Este consistiu num desenho de misturas com centroide simples, com recurso a três solventes.

De acordo com os atuais métodos recomendados pela UNODC para a análise de canabinoides (UNODC, 2022), na extração dos canabinoides neutros e ácidos, os solventes polares são os mais adequados, como o etanol e o metanol, sugerindo ainda misturas de solventes, com clorofórmio ou acetonitrilo (WHO, 2018). O clorofórmio não foi incluído neste estudo uma vez que a sua utilização não é compatível com as condições cromatográficas empregues, e pela adição de etapas analíticas desnecessária. Desta forma, foram selecionados o etanol, metanol e o acetonitrilo para o desenho de misturas, com 3 componentes, testando extrair de material vegetal de canábis com diversas misturas geradas pelo programa Minitab, os canabinoides em estudo.

Tendo por base os métodos recomendados pela UNODC, o estudo para a determinação do solvente extrator foi elaborado, seguindo o procedimento de extração, com três ciclos de 5 minutos de banho em ultrassons e com recurso a 10 segundos ao vórtex entre eles. O volume utilizado neste ensaio foi de 4 mL em 50 mg de amostra, uma vez que nos estudos preliminares e de acordo com a literatura, foi determinado que uma quantidade mais reduzida é suficiente para a realização da análise proposta (Song et al., 2022; Zivovinic et al., 2018). No caso de o solvente extrator ser uma mistura, esta foi preparada previamente num balão volumétrico de 5 mL. A solução final foi filtrada através de um filtro PTFE 0,2 μm , e posteriormente 1 mL colocado num *vial* para posterior análise instrumental.

O desenho experimental obtido encontra-se na Tabela A2 dos anexos.

2.2.2.2. Volume, número extrações e tempo extração

Após a escolha do solvente, foi elaborado outro desenho experimental para determinar as melhores condições de extração. Neste caso, fez-se uso de um Desenho Fatorial Completo, com dois fatores contínuos (2 níveis cada) e um categórico (com 3 níveis). Os fatores escolhidos foram o volume de solvente utilizado, o tempo de extração em ultrassons e o número de extrações empregues.

Os ensaios foram realizados em duplicado (24 ensaios no total), testando 3 mL e 10 mL de solvente extrator acetonitrilo:etanol (50:50, v:v). Para o tempo de extração comparou-se 1 minuto com 20 minutos, sendo este condicionado, bem como o volume, ao número de ciclo extrações (1, 2 ou 3), de acordo com a tabela A2 em anexo.

Assumindo como exemplo um ensaio com 3 ciclos de extração, com 10 mL e 20 minutos, em cada extração foram utilizados 3,33 mL por 6 minutos e 40 segundos. Após o primeiro ciclo, o solvente contendo os compostos é transferido para um segundo vial de 12 mL, e submete-se a amostra a uma segunda extração, nas mesmas condições. No final de 3 extrações, o volume total (10 mL) é filtrado e parte do mesmo (1 mL) é posteriormente analisado por cromatografia líquida, nas condições descritas na respetiva secção. Nos casos em que o volume final era de 3 mL, de forma a ser comparável com os resultados obtidos com 10 mL, após a filtração descrita, a amostra foi diluída com solvente extrator, obtendo o mesmo fator de diluição para todas as análises do estudo.

2.2.2.3. Determinação do volume de extração

Por fim, para a determinação do volume empregue em cada extração foi elaborado um ensaio em triplicado, com o solvente extrator e as condições de extração previamente determinadas. Foram considerados cinco valores entre 0,5 mL e 15,0 mL. No final de cada filtração, parte do extrato era dissolvido de forma a todas as amostras apresentarem no fim do processo o mesmo fator de diluição (50 mg em 15 mL), para ser possível fazer a sua comparação. Os valores escolhidos foram 0,5 mL, 2 mL, 6 mL, 10 mL e 15 mL. Neste parâmetro, a ordem dos ensaios foi determinada pela função *Rand*, do Microsoft Excel.

2.2.3. Análise de óleos de canábis

Tal como descrito no ponto 1.7.3, a técnica de extração mais referida na literatura para a análise de óleos derivados da canábis é a LLE ou uma simples diluição. Para este tipo de amostra, foram efetuados estudos de forma a determinar qual o solvente e o método mais prático e verde. Os ensaios descritos em seguida foram efetuados em duplicado.

Utilizando a amostra B1, foram testados diferentes solventes, bem como a diferença entre extração ou apenas uma diluição, com recurso ao vórtex, para homogeneização da mistura.

2.2.4. Condições de operação instrumental para HPLC-DAD

De forma a conseguir as melhores condições instrumentais por HPLC-DAD, os canabinoides em estudo foram analisados individualmente com o propósito de obter os respetivos tempos de retenção e espectros de UV/Vis. Os diferentes parâmetros foram estudados, nomeadamente a composição da fase móvel, volume de injeção, temperatura para o acondicionamento da coluna, comprimentos de onda, entre outros.

A fase móvel utilizada foi constituída por 75% acetonitrilo, 25% água ultrapura com ácido fórmico a 0,1% (pH ~ 2,8). A mesma foi preparada com recurso a uma bomba de vácuo, funil de Buchner, filtro PES e kitasato para filtração dos solventes. A solução filtrada foi

colocada num frasco de schott esterilizado, levando a mesma ao banho de ultrassons por 15 minutos, com o intuito de desgaseificar a fase móvel antes da sua utilização.

A coluna utilizada para a determinação e quantificação de canabinoides foi a coluna de fase reversa Kinetex 2,6 µm C18 150 mm x 2.1 mm, no HPLC da Agilent 1100 Series, acoplado a um detetor DAD. A fase móvel constituída por 75% acetonitrilo, 25% água ultrapura com ácido fórmico a 0,1%, foi sempre desgaseificada antes de ser utilizada, com recurso ao banho de ultrassons. A corrida cromatográfica foi efetuada em modo isocrático, com 30 minutos de corrida a 20°C. A deteção foi realizada com recurso ao detetor de fotodíodos, nos comprimentos de onda de 230, 280, 254 e 320 nm, selecionados previamente de acordo com revisão bibliográfica e confirmação da absorvância máxima dos espectros dos compostos (Aizpurua-Olaizola et al., 2016; Song et al., 2022), sendo que o comprimento de onda determinado e selecionado para a quantificação foi 230 nm. O fluxo estabelecido foi de 0,5 mL/min, com um volume de injeção da amostra de 10 µL.

2.2.5. Recuperação

De forma a economizar solventes, padrões, materiais de referência e tempo de trabalho, foram realizados ensaios para garantir que a recuperação obtida permitisse considerar que a fortificação em matriz não seria necessária nos futuros ensaios (retas de calibração, controlos positivos e validação).

Foi efetuado um ensaio em triplicado, com lúpulo (*Humulus lupulus*) como matriz de substituição, uma vez que esta planta é similar à canábida, sendo ambas membros da família Cannabaceae, permitindo ter uma matriz similar, sem os elementos de estudo presentes, os fitocannabinoides (Song et al., 2022; Zivovinic et al., 2018).

Foram efetuadas fortificações em dois níveis de concentração, com os diferentes canabinoides, no lúpulo, bem como de PI, de forma a ser possível normalizar os valores obtidos no final do processo.

As fortificações foram efetuadas logo após a maceração e pesagem de 50 mg de lúpulo, sendo submetido a todo o processo de extração, permitindo averiguar sobre o impacto de cada etapa na recuperação dos compostos em análise. Como forma de controlo e comparação com a matriz, foram também realizadas extrações sem fortificação (com e sem PI).

A recuperação foi calculada através da equação 14:

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{Sinal das Fortificações}}{\text{Sinal das Misturas Padrão}} \times 100 \quad (14)$$

em que o Sinal das Fortificações corresponde à média das áreas nos três replicados, e o Sinal das Misturas Padrão à média das áreas dos mesmos compostos nas misturas padrão feitas com a mesma concentração das fortificações.

Para além destes parâmetros, foi igualmente calculado o RSD da recuperação, da mesma forma descrita anteriormente, por forma a avaliar as variações que poderiam surgir (RSD $\leq 15,0$ % foi considerado aceitável).

2.2.6. Validação das metodologias analíticas

O processo de validação da metodologia aqui proposto foi realizado de forma a garantir o cumprimento de diversos critérios considerados essenciais, tendo por base os princípios de orientação da UNODC e da Eurachem (Eurachem, 2014; UNODC, 2009a). Para tal, foram efetuados ensaios com diferentes níveis de concentração sob condições otimizadas para determinação da sensibilidade, seletividade, linearidade, precisão, veracidade, gama de trabalho, recuperação, repetibilidade e estabilidade. Como controlo, foram ainda realizados ensaios em branco, utilizando metanol sem qualquer fortificação. Exceto quando especificado, todos os ensaios relativos a estas validações foram efetuados em triplicado.

2.2.6.1. Linearidade, sensibilidade e seletividade

A linearidade mede o quão bem uma curva de calibração segue uma linha reta, demonstrando que a resposta é proporcional à quantidade de analito (Harris, 2010).

Por forma a demonstrar a linearidade das diferentes metodologias desenvolvidas, foram realizados diversos ensaios (seis pontos) recorrendo à diluição dos canabinoides em estudo em metanol. Os resultados permitiram a produção de curvas de regressão linear. O critério de aceitação foi o coeficiente de determinação (R^2) ser superior a 0,99, os gráficos de resíduos demonstrarem que o modelo é adequado e apresentar homocedasticidade. O R^2 foi calculado com recurso à função “LINEST” do Excel.

A linearidade foi igualmente avaliada empregando o teste “goodness-of-fit” (GoF), com um intervalo de confiança de 95 %, equação 8.

$$F = \frac{MSS_{factor}}{MSS_{residuals}} = \frac{\sum(\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2 / (p - 1)}{\sum(y_i - \hat{y}_i)^2 / (n - p)} \quad (8)$$

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

Para a averiguação da homocedasticidade, foi utilizado o teste estatístico F, para as variâncias.

$$F_{calc} = \frac{S1^2}{S2^2} \quad (9.1)$$

$$F_{tab} = (f_1; f_2; 0,95) \quad (9.2)$$

Em que $S1^2$ é a variância das alíquotas fortificadas em concentração igual ao calibrador de menor concentração; $S2^2$ a variância das alíquotas fortificadas em concentração igual ao calibrador de maior concentração; f_1 - graus de liberdade ($n-1$) correspondentes ao primeiro conjunto de alíquotas; f_2 - graus de liberdade ($n-1$) do segundo conjunto; 0,95 corresponde a um nível de confiança de 95%. Quando o $F_{calc} \leq F_{tab}$, a hipótese de homocedasticidade é verdadeira, ou seja, não existe diferenças estatisticamente significativas entre as variâncias estudadas (equação 9.1 e 9.2).

Já a sensibilidade da metodologia, a sua capacidade de discriminar entre pequenas diferenças na concentração do analito (Skoog et al., 2017), foi averiguada através dos limites de detecção (LODs) e quantificação (LOQs), para uma concentração na qual era obtida uma razão sinal/ruído (S/N) de 3/1 e 10/1, respetivamente. O limite inferior de quantificação (LLOQ) foi igualmente avaliado, tendo sido definido como o valor de concentração mais baixo dentro dos níveis aceitáveis de veracidade e de precisão, correspondendo ao calibrador de concentração mais baixa. A seletividade de um método analítico refere-se ao grau em que o método está livre de interferência de outras espécies contidas na matriz da amostra (Skoog et al., 2017). Foi avaliada através da verificação de compostos interferentes presentes na matriz de substituição (lúpulo), e nas próprias

matrizes vegetais analisadas, verificando os cromatogramas resultantes para quaisquer compostos interferentes, tendo especial atenção aos tempos de retenção característicos de cada composto analisado. Para este caso, o critério de aceitação foi de que nenhum composto interferente coeluisse nos tempos de retenção dos compostos alvo em estudo. A especificidade, ou seja, a capacidade de um método analítico distinguir o analito de tudo o resto que possa estar na amostra, foi também assim considerada. Um requisito razoável de especificidade pode ser que haja uma separação de linha de base da substância a analisar de todas as impurezas que possam estar presentes. A separação da linha de base significa que o sinal do detetor regressa à sua linha de base antes que o próximo composto chegue ao detetor.

2.2.6.2. Precisão e veracidade

A precisão intermédia e veracidade intradias assim como interdias (3 dias consecutivos) da metodologia desenvolvida foram avaliadas, para os três níveis de controlos positivos, em pentaplicado. A precisão dos dados analíticos é o grau de acordo mútuo entre dados que foram obtidos da mesma forma. Fornece uma medida do erro aleatório, ou indeterminado, de uma análise, usualmente expressa como um desvio padrão (Harris, 2010; Skoog et al., 2017).

A precisão intradia foi calculada como o desvio padrão residual (RSD, do inglês *Relative Standard Deviation*), para cada controlo positivo de cada canabinoide, pela expressão 10:

$$RSD = \frac{\text{Desvio Padrão}}{\text{Média}} \times 100 \quad (10)$$

De forma a obter um método mais robusto, a precisão interdia foi calculada pelo RSD_{pooled} , que se dá pela seguinte equação 11:

$$RSD_{pooled} = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)RSD_1^2 + (n_2 - 1)RSD_2^2 + (n_k - 1)RSD_k^2}{n_1 + n_2 + \dots + n_k - k}} \quad (11)$$

Em que n representa o tamanho do grupo, isto é, o número de replicados em cada nível, e k representa o número de níveis (neste caso, controlos positivos).

A veracidade reflete o quão próxima está uma medição do verdadeiro valor da quantidade que foi medida (Chang, 2010). A veracidade intra e interdia foi calculada como o percentual relativo do erro (ou *bias*), segundo a equação 12:

$$Bias(\%) = \frac{V_{exp} - V_T}{V_T} \times 100 \quad (12)$$

onde V_{exp} diz respeito à concentração determinada experimentalmente e V_T à concentração teórica.

Os critérios de aceitação para a precisão e veracidade foram de que o *bias* e os RSD deveriam ambos de ser inferiores a 15,0 %.

2.2.6.3. Repetibilidade em amostra real

Por forma a garantir que a metodologia desenvolvida leva a resultados reprodutíveis para análises provenientes da mesma matriz, foram elaborados testes de repetibilidade em matriz real. Para tal, duas amostras de material vegetal canábico de previamente analisadas (A8 e A11) foram selecionadas, uma contendo um teor mais elevado de Δ^9 -THCA e Δ^9 -THC (A11) e outra apresentando maiores níveis de CBD e CBDA (A8). Para cada uma, foram efetuadas análises em triplicado, em três dias diferentes.

A avaliação foi feita com base no cálculo do RSD, para a repetibilidade intradia e RSD_{pooled} , na averiguação da repetibilidade interdia, como descrito na secção da precisão. Os critérios de aceitação foram de que os RSD deveriam ambos ser inferiores a 15,0 % (ENFSI, 2014).

2.2.6.4. Estabilidade

A estabilidade dos compostos alvo deve ser garantida durante a amostragem, no seu processamento e armazenamento, assim como durante os procedimentos de preparação da amostra e na duração da análise por forma a produzir dados analíticos fiáveis. Assim, os ensaios de estabilidade estão entre os testes mais demorados no procedimento de validação. Na garantia e controlo dos padrões utilizados nos ensaios descritos, a mesma

mistura padrão dos seis canabinoides a 10 µg/mL, foi analisada pela metodologia instrumental descrita várias vezes durante cerca de três meses. Entre análises, a mistura foi conservada a -80°C, juntamente com os materiais de referência referidos.

2.2.7. Amostras Reais

2.2.7.1. Procedimento experimental

Tendo por base os resultados obtidos na otimização do processo de extração e na validação do método, a metodologia desenvolvida foi aplicada em amostras reais. Na Figura 11 surge em esquema o processo experimental descrito nesta secção.

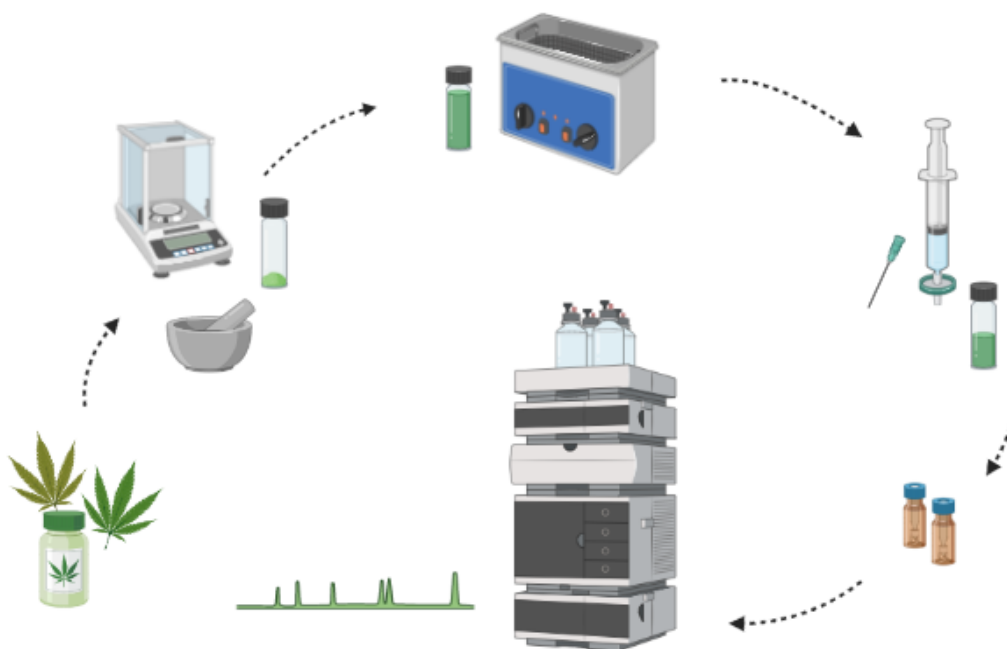


Figura 11- Esquema do procedimento experimental. Após maceração de parte representativa da amostra, são pesadas 50mg. Adicionam-se 10mL de solvente extrator e leva-se ao banho de ultrassons. Após extração, o extrato é filtrado com recurso a filtro PTFE. Parte do extrato é de seguida analisado no HPLC-DAD. Figura realizada na aplicação Biorender.

Para a determinação e quantificação de canabinoides nas amostras de cânabis, é necessário ocorrer a extração dos mesmos da sua matriz de forma a poderem ser analisados. Com recurso a pinça e tesoura, foram retiradas partes variadas da amostra de material vegetal, de forma a obter uma amostra homogénea e representativa. De seguida transferiu-se o material para um almofariz de vidro e pulveriza-se a amostra por maceração. Utilizando uma espátula, transferiu-se parte do pulverizado para um *vial* de vidro âmbar de 12 mL, previamente colocado na balança analítica, até obter 50 mg e adicionou-se a solução de PI a 1000 µg/mL, com recurso a micropipeta P1000 e respetivas pontas. Permitiu-se a evaporação do solvente do PI e se necessário, recorre-se à evaporação por azoto.

De forma a executar a extração, transferiu-se 10 mL de solvente extrator, EtOH:ACN (50:50, v:v) para o frasco de vidro âmbar contendo a amostra pulverizada, levou-se ao vórtex por breves segundos, e ao banho de ultrassons por um minuto. Estando concluída a extração, procede-se à filtração do mesmo, com recurso a seringa esterilizada 3 mL com agulha, e filtro de PTFE 0,22 µm, para um segundo vial de 12 mL. Transfere-se parte do extrato para um *microvial* de vidro âmbar 2 mL com tampa com septo PTFE e, se necessário, adiciona-se um *insert*, para trabalhar com volumes inferiores, para análise cromatográfica em HPLC-DAD.

Se o teste presuntivo indicar uma concentração expectável muito elevada de canabinoides ou se após a primeira análise cromatográfica assim se verificar, efetua-se uma diluição mais adequada (por exemplo 1:500), de forma aos valores da absorvância ficarem dentro da gama de trabalho estabelecida e salvaguardando o sistema cromatográfico. Colocou-se a amostra diluída num *microvial* de vidro âmbar com tampa com septo e, se necessário, adicionou-se um *insert*, para trabalhar com volumes baixos.

A quantidade final de analito em amostras herbáceas (% p/p) foi calculada utilizando o fator de diluição atribuído ao procedimento e a quantidade pesada de amostra. No caso das amostras de óleo, a quantidade dos canabinoides (% g/mL) foi calculada tendo em conta o fator de diluição aplicado.

2.2.7.2. Cálculo do quimiotipo

A determinação do quimiotipo teve por base a recomendação da UNODC. Para tal, considera-se as áreas dos picos do Δ^9 -THC e CBD, bem como das respetivas formas ácidas, e ainda do CBN, por ser um derivado do Δ^9 -THC (UNODC, 2022). Na construção da fórmula X, THC_T (total), reporta à soma das áreas do Δ^9 -THC e Δ^9 -THCA. Pela mesma lógica, CBD_T representa a soma das áreas da forma neutra e ácida deste canabinoide.

$$X = \frac{(THC_T + CBN)}{CBD_T}$$

Segundo a literatura, quando $X > 1$, indica que a amostra é do quimiotipo “drug type”, sendo considerada uma substância de abuso pelo seu teor em THC. Já quando $X < 1$, o quimiotipo atribuído é o de propósito industrial.

2.2.8. Teste colorimétrico: Fast Blue BB

Como referido anteriormente, os testes presuntivos ou de *screening* permitem ter uma primeira ideia do conteúdo da amostra, bem como da sua concentração. Para tal, recorreu-se ao Fast Blue BB, um teste colorimétrico que faz uso da formação de cor pela reação do sal com a amostra, em condições básicas, para determinar a presença de THC e CBD nas amostras herbáceas (Acosta & Almirall, 2021). Foram igualmente seguidas as orientações sugeridas pela UNODC para a análise de canábis (UNODC, 2022).

Começou-se por dobrar dois filtros de papel, um colocado sobre o outro, em quartos e abriu-se parcialmente de forma a formar um funil, colocando num gobelet para suporte. Pulverizou-se uma porção da amostra cujo conteúdo e teor de fitocanabinoides se pretendeu analisar, pesando 10 mg da mesma com recurso a uma balança analítica, e transferindo para o centro do filtro superior, presente no gobelet. De seguida, adicionou-se 5 gotas de éter de petróleo e permitiu-se que este penetrasse o filtro inferior. Descartou-se o filtro superior e deixou-se secar o inferior por completo. Adicionou-se uma pequena quantidade da mistura a 1% p/p de sal Fast Blue BB diluído com sulfato de sódio anidro no centro do filtro e adicionou-se 5 gotas da solução aquosa 10% p/v de bicarbonato de sódio. Dependendo dos compostos alvo, é formada uma mancha vermelha no filtro, indicando a presença de THC na amostra, ou laranja, no caso da presença de CBD. A observação da cor e a captação da fotografia foram se imediatas, uma vez que com o tempo a cor podia alterar-se.

Por forma a determinar a viabilidade deste tipo de ensaio para uma análise semi-quantitativa em contexto real, foram seleccionadas duas amostras, A8, contendo maior teor total de THC (THC_T) e a amostra A11, com maior teor total de CBD, CBD_T. As amostras, previamente analisadas e tendo sido quantificados os seus canabinoides, pela metodologia otimizada e validada, foram misturadas com lúpulo, em diferentes quantidades, de forma a averiguar sobre a capacidade de deteção e diferenciação dos teores em CBD e THC.

Para inferir sobre a influência do estado do composto, ou seja, forma neutra ou forma ácida, submeteu-se uma amostra rica em Δ^9 -THCA a 180°C por 10 minutos, comparando o resultado do teste colorimétrico antes (rica na forma ácida de Δ^9 -THC) e após a sua descarboxilação (Δ^9 -THCA converte-se em Δ^9 -THC). Foram ainda elaborados ensaios de brancos em lúpulo sem fortificação, ou apenas com PI.

3. Resultados e discussão

3.1.Otimização Instrumental

De forma a conseguir obter as melhores condições instrumentais por HPLC-DAD, os canabinoides em estudo foram analisados individualmente com o propósito de obter os respectivos tempos de retenção e espectros de UV/Vis. Os diferentes parâmetros foram estudados por forma a obter a melhor resolução, seletividade e sensibilidade, nomeadamente a composição da fase móvel, volume de injeção, temperatura para o acondicionamento da coluna, comprimentos de onda, entre outros. As condições cromatográficas apresentadas em seguida resultam dessa otimização instrumental.

Tendo por base a literatura, foram testados vários métodos, por gradiente e isocrático, utilizando diversas fases móveis, entre elas MeOH e água ou ACN com água, com diferentes proporções entre solventes. A escolha de ACN a 75% resultou numa linha de base mais estável, e separação ótima dos canabinoides, comparando com outras misturas ACN: água ultrapura com ácido fórmico a 0,1%. O fluxo foi estabelecido a 0,5 mL/min, uma vez que o seu aumento provocava uma subida da pressão, mas sem vantagens no estreitamento dos picos dos compostos. Foram também testadas diferentes temperaturas do forno da coluna, de 20°C a 50°C. A temperatura que permitiu melhor linha de base, com menos possíveis interferências de outros compostos presentes na matriz, e melhor separação entre picos foi a de 20°C.

A deteção com recurso ao detector de fotodíodos foi estabelecida nos comprimentos de onda de 230, 280, 254 e 320 nm, selecionados com base na revisão bibliográfica. Após confirmação da absorvância máxima dos espectros dos compostos a 230nm, este comprimento de onda foi definido para a sua quantificação. Os restantes comprimentos de onda demonstraram-se bastante úteis, uma vez que permitiram aumentar a especificidade do método, identificando interferências de compostos que não eram canabinoides, uma vez que acima dos 230 nm os canabinoides não produziam sinal no detector DAD.

O volume de injeção estabelecido foi de 10 µL, para todas as soluções, calibradores, e amostras analisadas, o que permite analisar volumes muito baixos de amostra, se necessário. Os tempos de retenção obtidos nas condições descritas apresentam-se na Tabela 2.

Tabela 2- Fitocanabinoides analisados por HPLC-DAD, com respectivos tempos de retenção (t_r) e tempos de retenção relativos ao PI (t_{rr}).

Composto	T_r (min)	T_{rr} (min)
Femprocumona (PI)	4,47	
CBD	8,78	4,31
CBDA	9,94	5,47
CBN	15,13	10,66
Δ^9-THC	19,05	14,58
Δ^8-THC	19,73	15,26
Δ^9-THCA	26,31	21,84

De forma ilustrativa dos melhores resultados obtidos com o compromisso entre o tempo de análise e a corrida isocrática que se revelou necessária, resultou na separação cromatográfica apresentada na Figura 12, utilizando as condições descritas.

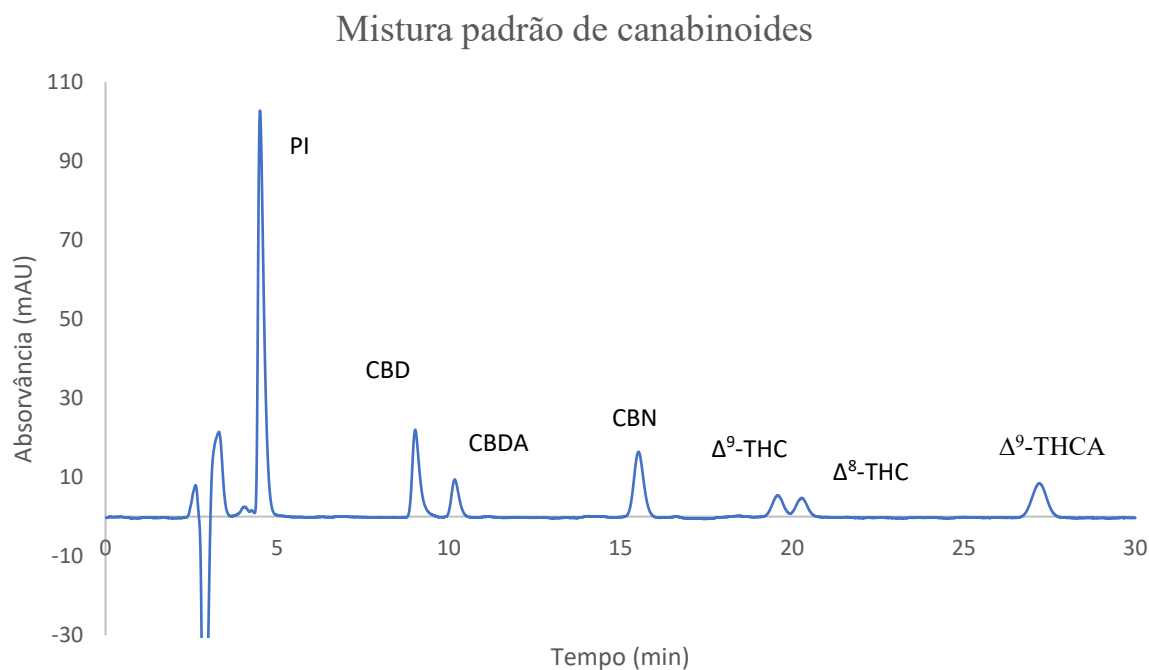


Figura 12- Cromatograma obtido utilizando a metodologia otimizada descrita para uma mistura padrão contendo seis canabinoides a 5,0 $\mu\text{g/mL}$, foi fortificada com PI a 50,0 $\mu\text{g/mL}$.

A resolução foi calculada entre cada pico adjacente (consultar Tabela A1 dos anexos). Embora a resolução obtida entre o Δ^9 -THC e Δ^8 -THC não ser a ideal (~ 1), esta foi considerada suficiente, justificada pelo ótimo R^2 conseguido para cada uma das curvas de calibração aquando da sua elaboração, permitindo a sua quantificação em amostras.

3.2.Otimização do processo de extração

Por forma a maximizar o sinal obtido aquando da análise dos compostos, e diminuir o volume de solventes necessário bem como o tempo despendido, o processo foi otimizado. O foco foi a extração, sendo esta a etapa considerada crítica, por possuir maior número de fatores e condicionantes.

A escolha da utilização de cânabis como matriz permitiu em todos os ensaios obter resposta analítica semelhantes a matriz real durante todo o processo. Assim, a amostra A6 foi selecionada e macerada, permitindo pesagens representativas da mesma. A comparação das áreas dos picos para cada composto presente, permitiu a otimização do processo da extração, nomeadamente do solvente utilizado, número de ciclos de extração bem como o tempo despendido.

3.2.1. Escolha do solvente

Como descrito previamente, foram selecionados o etanol, metanol e acetonitrilo para determinação do solvente extrator em amostras herbáceas.

De forma a maximizar o sinal obtido para cada canabinoide, foram realizados ensaios em duplicado, utilizando uma amostra de material vegetal de cânabis, para determinação do solvente ou mistura de solventes que o permitissem. O desenho experimental desenvolvido na aplicação Minitab, e a sua escolha, desenho de misturas com centroide simples, teve por base o número de solventes, metanol, etanol e acetonitrilo. Este permitiu analisar cada solvente de forma individual, bem como em misturas de dois ou com os três constituintes (desenho experimental na Tabela A2 dos anexos).

Os resultados obtidos presentes na Figura 13 demonstram que a mistura ideal é etanol:acetonitrilo (50:50, v/v), que permite maximizar os sinais de todos os canabinoides presentes na amostra, definindo assim a mistura como o solvente extrator de eleição.

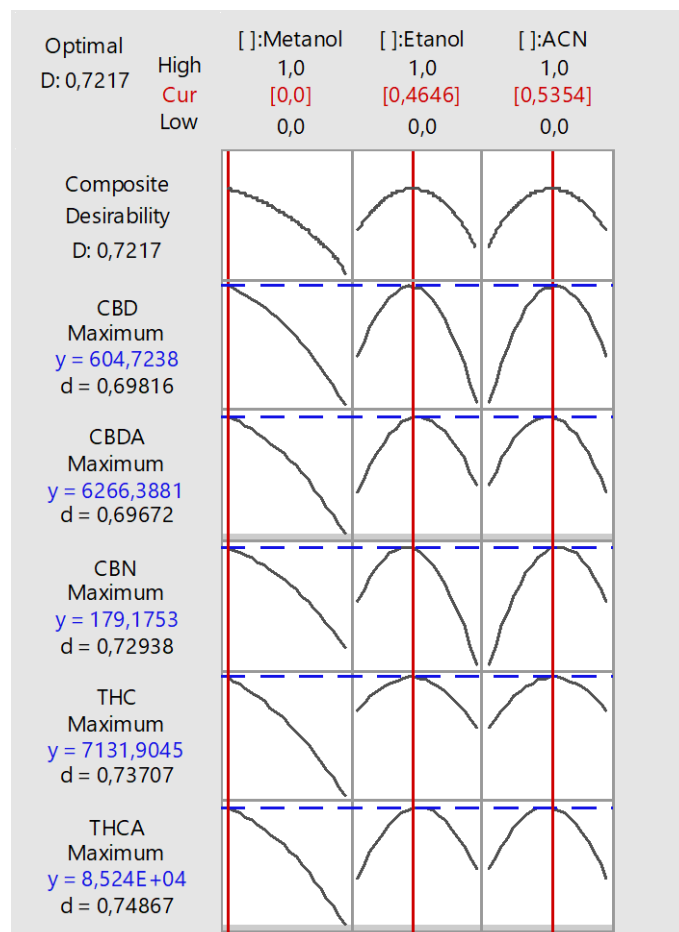


Figura 13- Resultados do desenho experimental para a determinação do solvente de extração que maximize o sinal obtido de cada canabinoide. É observável que a mistura acetonitrilo: etanol (~50:50) permite obter os melhores resultados para o total dos canabinoides em estudo.

Como exemplo representativo surge o gráfico de contorno resultante para o Δ^9 -THCA (Figura 14). Resultados similares foram obtidos para todos os compostos (consultar Figuras A1 e A2 nos anexos). O verde mais escuro representa uma maior área do pico obtida.

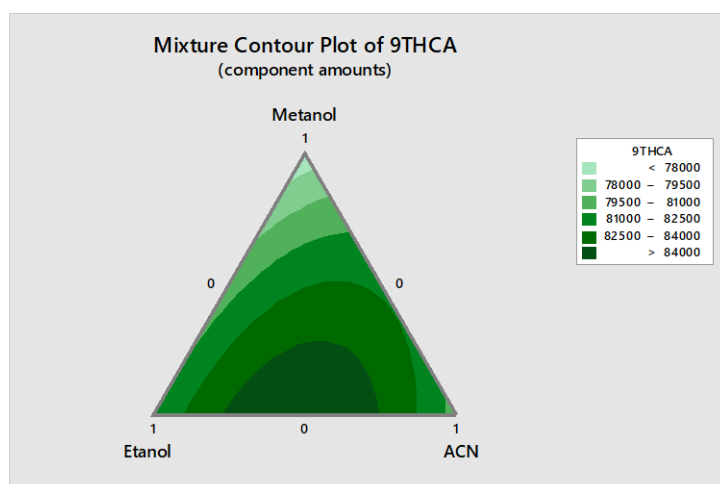


Figura 14- Contour Plot da mistura de solventes para o Δ^9 -THCA. As zonas representadas a verde mais escuro refletem a maior extração, refletindo que o uso de acetonitrilo e metanol em partes similares é ideal.

A utilização de acetonitrilo para a extração de fitocanabinoides é escassa na literatura (Olejar et al., 2022). Zivovinovic e seus colegas (2018) referem a utilização de ACN/água (1:1) como solvente, e (Gul et al., 2018) descreve o recurso a uma mistura de ACN/MeOH (80:20, v/v) para a extração dos compostos em extratos de raízes da planta. Porém, o recurso a ACN e etanol não se encontra referido na literatura, pelo que a utilização da mistura etanol:acetonitrilo (50:50, v/v), surge como algo novo na análise de fitocanabinoides em material vegetal, nomeadamente em amostras herbáceas.

3.2.2. Volume, número e tempo de extração

Após a determinação do solvente extrator, foi desenvolvido um novo desenho experimental (Tabela A3 dos anexos), tendo como fatores o volume de solvente extrator necessário para a extração, de forma a maximizar o sinal, o tempo de extração com recurso ao banho de ultrassons e ainda o número de ciclos de extração necessários.

O desenho experimental escolhido, Desenho Fatorial Completo, teve por base a necessidade de incluir dois fatores contínuos, o volume de solvente e o tempo de extração, com 2 níveis cada (3 mL e 10 mL para o volume, e 1 e 20 minutos, para o tempo) e um categórico, o número de extrações, com 3 níveis, ou seja, uma, duas ou três extrações. O resultado obtido, com base nas áreas dos picos de cada composto presente na amostra analisada, reflete-se na Figura 15.

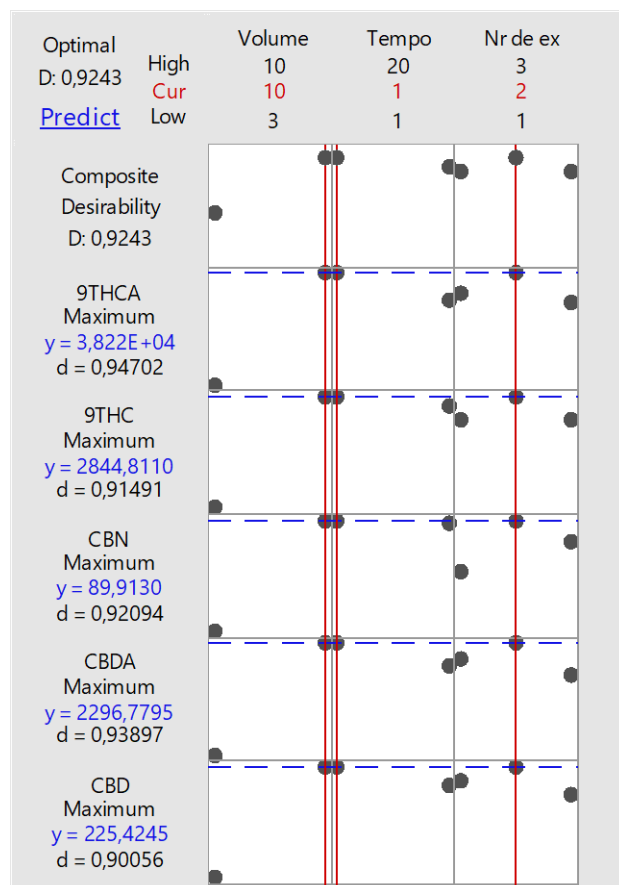


Figura 15- Resultados obtidos pelo desenho experimental para a determinação do volume necessário de solvente extrator, ciclos de extração e tempo da mesma. O volume de 10 mL resultou num sinal mais elevado para todos os canabinoides. O número de extrações bem como o tempo de extração em ultrassons não demonstra variação significativa.

Como pode ser observado na figura acima, e de acordo com os valores de significância (P-value) de cada fator e respetivas interações para cada um dos canabinoides presentes em amostra herbácea (ver Tabela A4 em anexo), o único fator relevante mostra-se ser o volume utilizado na extração para um intervalo de confiança de 95%. Assim, e com vista numa metodologia mais verde, o número de extrações necessário foi estabelecido como 1, bem como um minuto de tempo de extração.

A utilização do desenho fatorial completo revelou-se útil, apesar da impossibilidade da criação de *contour plots*. No entanto, outros desenhos como o Box-Behnken não poderiam ter sido utilizados, por não permitirem a inclusão de fatores categóricos, ou por levarem a valores negativos no fator do tempo de extração, como foi o caso do Central Composite Design (CCD).

3.2.3. Volume de solvente extrator

A determinação do volume de solvente extrator necessário para maximizar o sinal obtido para cada canabinoide em amostras herbáceas foi elaborada numa amostra real, rica em Δ^9 -THCA. Ao utilizar uma amostra real, e fazendo-o em triplicado, retira a necessidade de fortificações bem como tem em conta a matriz como um todo. Como o estudo anterior permitiu restringir que o fator determinante na extração era o volume utilizado, foram testados 5 graus de volume, de 0,5 mL a 15,0 mL, de forma a determinar o volume ideal.

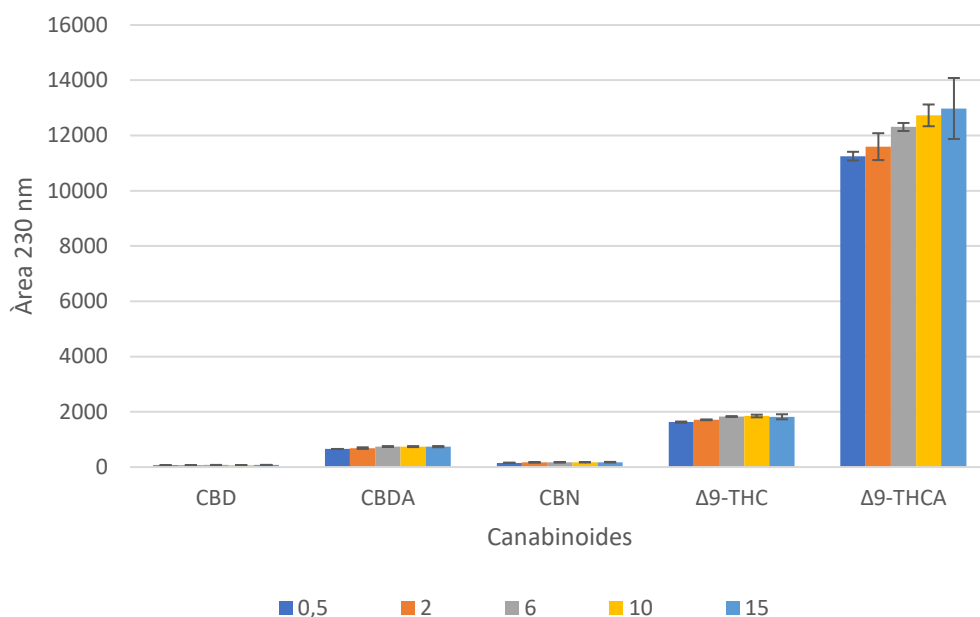


Figura 16- Áreas obtidas para cada canabinoide com os diferentes volumes de solvente extrator.

Como pode ser observado na Figura 16, e na Figura 17, elaborada com os valores normalizados pelo valor mais elevado de cada grupo, dentro de toda a gama de volumes, não existem diferenças significativas. O sinal obtido até aos 6,0 mL é ligeiramente inferior ao que é possível obter quando a extração é efetuada com um maior volume de solvente. Já entre os 10,0 e os 15,0 mL, e tendo em especial atenção as barras de erro associadas, não se verifica uma diferença entre eles que justifique o uso de um volume extra de 5,0 mL em cada extração. Assim, foi determinado o volume ótimo de 10,0 mL de solvente extrator.

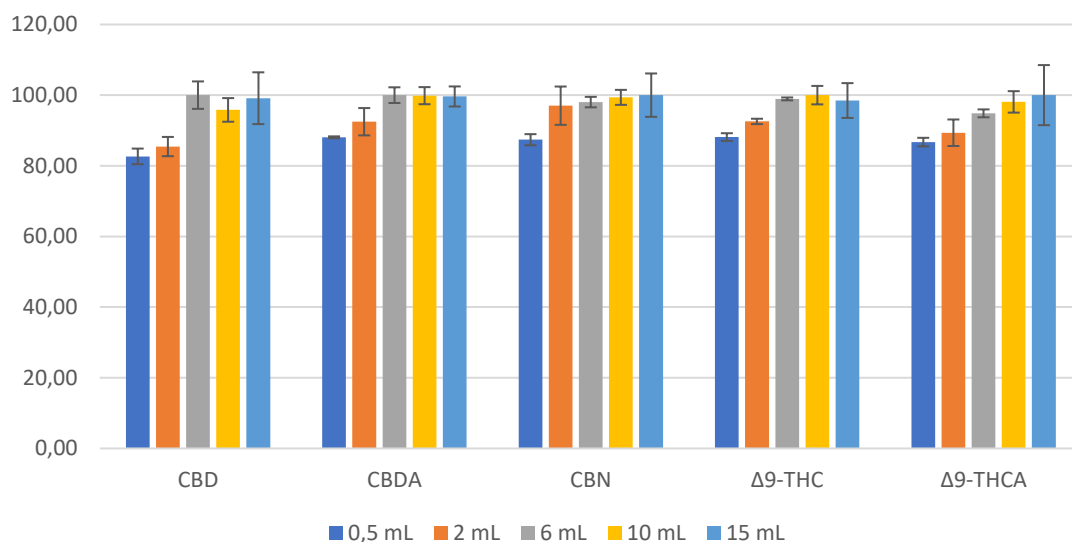


Figura 17- Áreas normalizadas pelo valor mais elevado, para cada canabinoide por cada volume de solvente utilizada na extração.

No decorrer da otimização experimental, o tratamento de dados foi efetuado com recurso à aplicação Minitab e ao Microsoft Excel. A aplicação Minitab permitiu para além de muitas outras funções, o tratamento de dados de um desenho experimental. Isto identificar tendências e descobrir relações preciosas entre os dados. A disponibilização de diferentes tipos de desenhos experimentais, tendo em conta os diferentes fatores, a influência que exerciam e o número de replicados, possibilitou uma construção otimizada do planeamento das análises experimentais necessárias para cada aspeto.

Foram ainda gerados gráficos, tabelas e imagens representativas dos resultados obtidos com recurso a ambas as aplicações, o que possibilitou a sua análise e interpretação de forma mais clara e intuitiva.

3.2.4. Óleos de canábis

Ao diluir a amostra B1 em metanol, verificou-se a ocorrência de emulsão, ficando com um aspeto baço, mesmo após vários minutos no vórtex (Figura 18). Passou-se então à extração, com recurso ao banho de ultrassons, que intensificou o aspeto baço da mistura em suspensão. Efetuou-se então uma centrifugação, 3500 rpm durante 5 minutos, retirando parte do sobrenadante, de aspeto límpido e transparente, para análise cromatográfica.



Figura 18- Amostra de óleo de canábis em metanol, após vórtex e banho de ultrassons, em duplicado.

Foi ainda testada a hipótese de 2 ciclos de extração possibilitarem melhores resultados, pelo que a amostra foi submetida a uma segunda sonicação seguida de centrifugação para posterior análise. Porém, não foram observadas diferenças, o que demonstra que uma extração é suficiente para os compostos serem extraídos.

Paralelamente, foram testados outros dois álcoois, o etanol e o isopropanol, também em duplicado. Para ambos, o resultado constou de um aspeto límpido e translúcido após a diluição e utilização do vórtex (Figura 19), não sendo necessária uma extração com a utilização destes solventes.



Figura 19- Amostra de óleo de cânabís em isopropanol (esquerda), e em etanol (direita).

Comparando as áreas dos picos obtidas por cada solvente, os resultados foram bastante similares, com o etanol a permitir um sinal ligeiramente superior. Assim, pela sua praticabilidade e maximização do sinal, o etanol foi definido como solvente a ser utilizado para diluição de amostras de óleo de cânabís, e posterior análise cromatográfica.

3.2.5. Recuperação

Como mencionado na metodologia, foi efetuado um ensaio com lúpulo como matriz de substituição, uma vez que esta planta é similar à cânabís, permitindo ter uma matriz similar, sem os elementos de estudo presentes. As fortificações foram efetuadas na matriz com os seis diferentes canabinoides, bem como de padrão interno, fenprocomona, de forma a normalizar os valores obtidos no final do processo.

Como forma de controlo e comparação com a matriz, foram também realizadas extrações sem fortificação (com e sem PI). Por fim, as fortificações foram comparadas com uma mistura padrão dos mesmos canabinoides em metanol, na mesma concentração, nas mesmas condições cromatográficas (Figura 20 exemplo a 2,0 µg/mL).

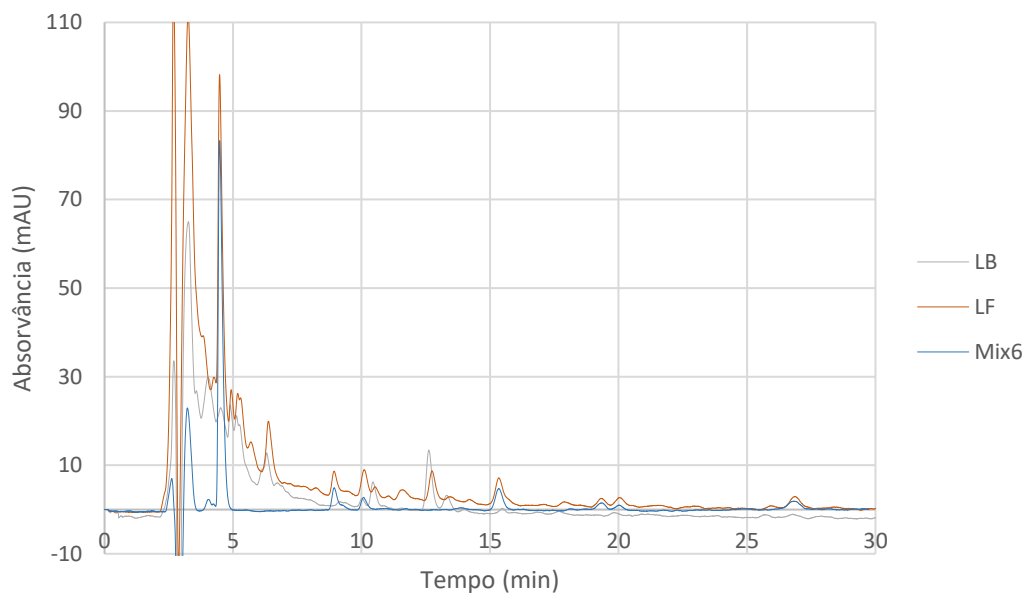


Figura 20 - Sobreposição dos cromatogramas obtidos para o Branco de Lúpulo contendo apenas PI (LB), Lúpulo Fortificado com os 6 canabinoides a 2,0 µg/mL e PI (LF) e a mistura padrão dos canabinoides a 2µg/mL e PI em metanol (Mix6). Da esquerda para a direita, surgem os picos de CBD, CBDA, CBN, Δ9-THC, Δ8-THC e Δ9-THCA.

Como os resultados obtidos da fortificação em lúpulo (LF) e da mistura padrão de canabinoides em metanol (Mix6) foram idênticos, constata-se que o processo de extração não leva a perdas significativas, podendo ser utilizado nas condições descritas. A comparação entre a matriz de lúpulo fortificada e sem fortificação, bem como com fortificada apenas com o PI (LB), permitiu concluir que não se verificam co-eluições com o mesmo nem com os canabinoides em estudo, ou seja, a matriz não afeta o procedimento de extração.

Tabela 3- Recuperação obtida para os seis canabinoides em estudo e para o padrão interno (PI).

Composto	Recuperação
PI	98,8%
CBD	102,1%
CBDA	101,9%
CBN	105,6%
Δ9-THC	105,5%
Δ8-THC	100,5%
Δ9-THCA	99,7%

Estes resultados da fortificação do lúpulo com canabinoides, quando comparados com a mistura padrão dos mesmos compostos em metanol, na mesma concentração, permitiram o cálculo da recuperação. Os valores de recuperação alcançados situaram-se ~100% para o padrão interno (PI) e para os seis canabinoides, ilustrado na Tabela 3 em linha com (Zivovinic et al., 2018), com uma margem normal de erro em processo extrativo. Os RSD obtidos entre os replicados encontraram-se dentro dos 15% estipulados.

Estes dados sugerem que o processo de extração não leva a perdas significativas de fitocanabinoides e pode ser utilizado sob as condições descritas.

3.3. Validação do método

3.3.1. Curva de calibração

A gama de trabalho foi definida de forma a evitar gastos desnecessários de solventes e padrões, e tendo em conta que as amostras de origem vegetal terão sempre de ser submetidas a uma diluição de forma a diminuir a possível interferência da matriz, bem como a não saturação do equipamento cromatográfico. Assim, foi estabelecida entre 0,5 e 25,0 µg/mL.

A sua construção foi elaborada em triplicado, sendo que cada calibrador (0,5; 2,5; 5,0; 10,0; 15,0 e 25,0 µg/mL) foi preparado individualmente de acordo com o descrito na secção dos Materiais e Métodos. Como indicado na Figura 21, os coeficientes de determinação obtidos, R^2 , tomaram valores entre 0,9978 e 0,9988 para os 6 canabinoides analisados, indicando uma ótima linearidade na gama de trabalho escolhida. Foram também efetuados testes de homocedasticidade (como exemplo, o CBD apresentou F_{calc} de 0,0044 em contraste com o F_{tab} de 19) para os resultados obtidos para cada canabinoide, verificando-se homocedasticidade para todos (Tabela A5 em anexo).

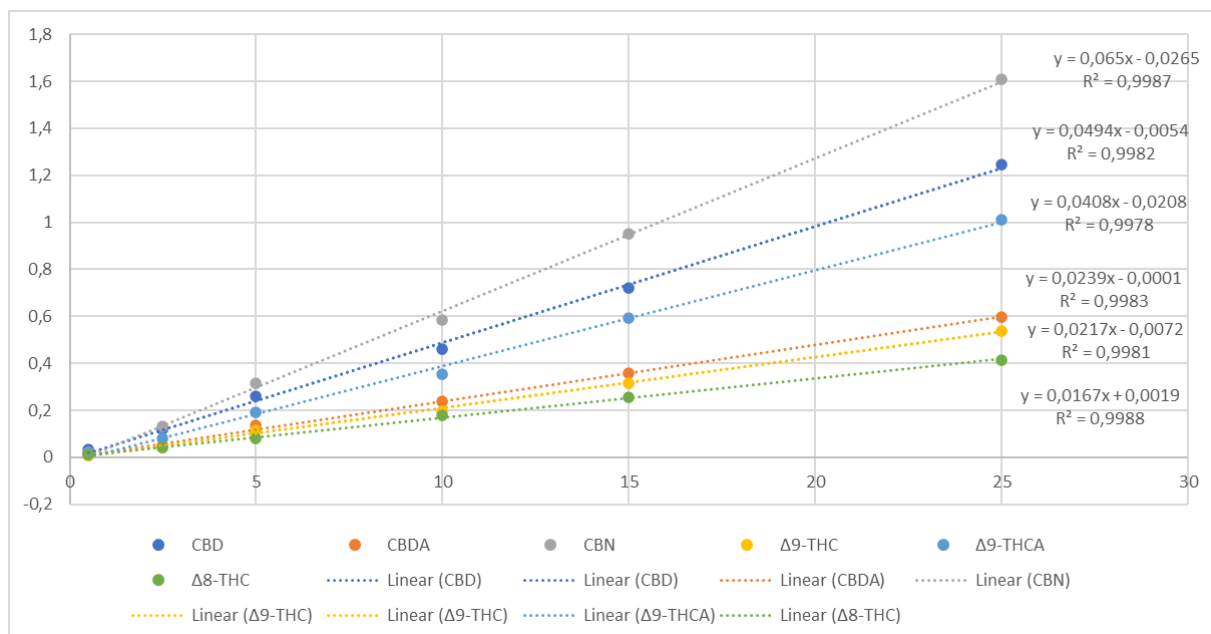


Figura 21-Retas de calibração para cada canabinoide em estudo, e respetivos coeficientes de determinação, R^2 .

Estes resultados foram ainda comprovados com a criação de gráficos de resíduos (utilizando o Δ^9 -THC como exemplo, Figura 22), que demonstraram serem constantes e independentes do resultado (restantes gráficos de resíduos em anexo, Figuras A3 a A6).

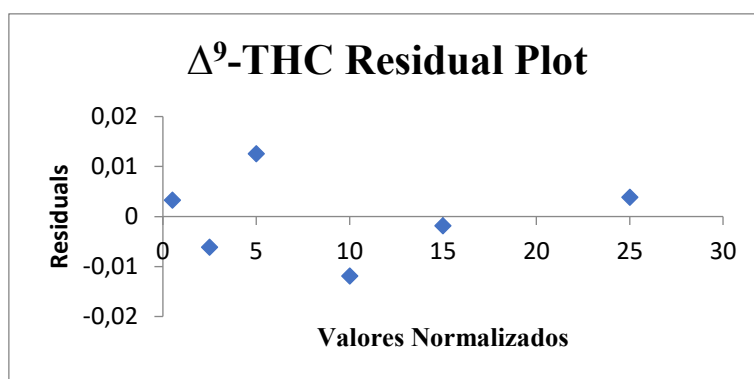


Figura 22- Gráfico de resíduos gerado para os dados normalizados do Δ^9 -THC.

Pela aplicação do teste estatístico GoF, comprovou-se a utilização dos dados obtidos, com um F calculado para os seis compostos entre 0,22 e 0,45, contrastando com os 9,55 do F tabelado, consultar Tabela A6 nos anexos.

Os resultados demonstram que na gama de trabalho selecionada, os dados obtidos foram lineares e adequados à distribuição normal, de acordo com os valores estipulados.

3.3.2. Veracidade e Precisão

A precisão e a veracidade foram avaliadas utilizando controlos positivos (CP) a três níveis de concentração, ou seja, 1,0, 12,5, e 20,0 µg/mL em pentaplicados. O desvio padrão relativo (RSD) e os valores de *bias* resultantes abaixo de ($\pm$)15% (Tabela 4) mostram que a metodologia desenvolvida cumpre os requisitos das diretrizes internacionais.

O limite de detecção (LOD) bem como o limite inferior de quantificação (LLOQ) foram determinados a nível prático, tendo obtido resultados similares entre os diversos canabinoides. O LLOQ determinado foi de 0,5 µg/mL para os 6 canabinoides. Já o LOD variou entre 0,125 µg/mL para o CBD, CBN, Δ^9 -THC e Δ^8 -THC e 0,250 µg/mL para as formas ácidas, CBDA e Δ^9 -THCA.

Tabela 4- Valores de Veracidade e Precisão intra e inter dia obtidos para três níveis de controlos positivos distintos, 1; 12,5 e 20 µg/mL, para cada canabinoide em estudo. Ensaios feitos em pentaplicado. São ainda apresentados os valores obtidos experimentalmente para o limite de detecção (LOD) e para o limite de quantificação (LLOQ).

Composto	CP (µg/mL)	Intradia		Interdias		LOD (µg/mL)	LLOQ (µg/mL)
		Veracidade (%bias)	Precisão (%RSD)	Veracidade (%bias)	Precisão (%RSD pooled)		
CBD	1,0	13,2	4,5	-13,0	4,4	0,125	0,5
	12,5	-3,9	1,9	4,0	2,6		
	20,0	-2,6	0,8	2,6	0,9		
CBDA	1,0	-5,5	6,0	5,8	6,1	0,25	0,5
	12,5	-2,7	1,8	2,8	2,0		
	20,0	-0,3	0,7	0,2	0,8		
CBN	1,0	12,8	1,4	-13,3	3,9	0,125	0,5
	12,5	-2,8	1,9	2,7	2,8		
	20,0	-3,1	0,2	3,1	0,7		
Δ^9 -THC	1,0	6,9	11,6	-6,4	11,6	0,125	0,5
	12,5	-1,1	1,9	1,1	2,0		
	20,0	-0,5	1,1	0,9	1,3		
Δ^8 -THC	1,0	-1,3	8,1	1,1	3,2	0,125	0,5
	12,5	3,6	0,9	-3,3	1,4		
	20	-0,2	0,3	0,1	0,7		
Δ^9 -THCA	1,0	11,2	6,4	-10,1	8,0	0,250	0,5
	12,5	-5,6	1,6	5,9	2,7		
	20,0	-4,3	0,2	4,5	0,9		

Os resultados obtidos encontram-se dentro dos parâmetros estipulados, e demonstram que o método é preciso e verdadeiro na detecção e quantificação dos canabinoides em estudo.

3.3.3. Estabilidade

Para garantir que todos os processos inerentes ao estudo em que foram utilizados materiais de referência, realçando o recorrente uso de controles positivos, não estavam a ser influenciados por possível degradação ou evaporação resultante da passagem do tempo ou condições de armazenamento, foram feitos ensaios de estabilidade. Durante 3 meses, a mesma mistura independente dos seis canabinoides a 10 µg/mL foi quantificada nas condições previamente descritas por HPLC-DAD.

Na Figura 23 estão representados os sinais das áreas normalizadas obtidas para cada canabinoide, por cada dia em que a mistura padrão foi analisada. É possível observar que a variação entre a primeira análise, a 19 de julho, e a última a 20 de setembro foi mínima, com um desvio padrão residual inferior a 1,8% para todos os compostos em estudo (ver Tabela A7 nos anexos).

Aferiu-se assim que a estabilidade a curto e a longo prazo, das misturas padrão elaboradas bem como da própria análise por HPLC-DAD, foi excelente, demonstrando a robustez do método construído, durante variações nos parâmetros inerentes ao método, bem como de pequenas alterações de fatores ambientais, conferindo uma confiabilidade durante o seu uso regular.

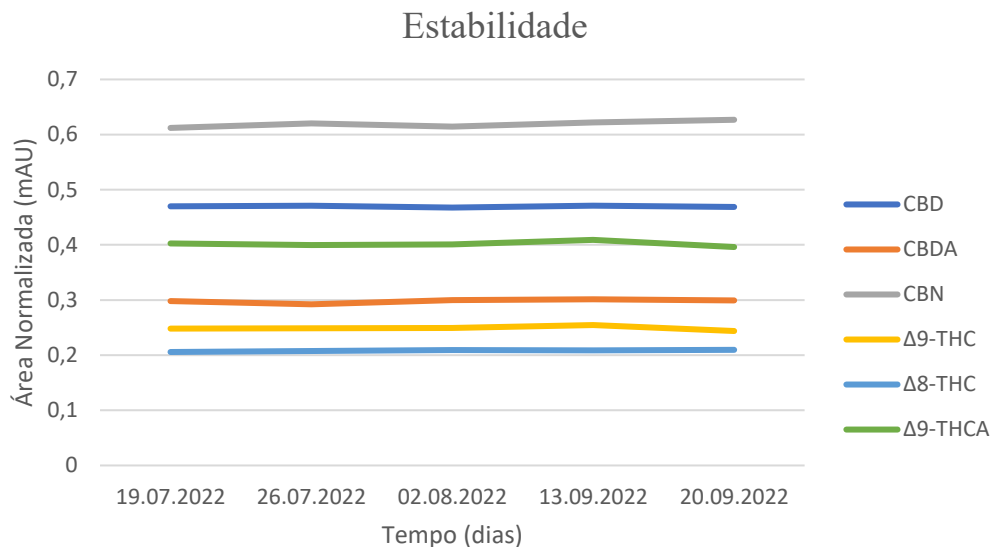


Figura 23- Ensaios para averiguação da estabilidade. Uma mistura padrão a 10 $\mu\text{g/mL}$ dos seis canabinoides em estudo, foi analisada pela metodologia desenvolvida nas datas apresentadas. Para todos os compostos, é possível verificar que não há alterações significativas nas áreas obtidas.

3.3.4. Repetibilidade

No intuito de garantir que a metodologia desenvolvida produz resultados reprodutíveis para análises provenientes da mesma matriz, foram elaborados testes de reprodutibilidade. Para tal, duas amostras de material vegetal canábico previamente analisadas foram selecionadas, uma contendo um teor mais elevado de Δ^9 -THCA e Δ^9 -THC (A11) e outra apresentando maiores níveis de CBD e CBDA (A8). Para cada uma, foram efetuadas análises em triplicado, em três dias diferentes. Os baixos valores de RSD intra e inter dia obtidos e apresentados na Tabela 5, permitem comprovar que, apesar da variabilidade comum associada à natureza complexa destas matrizes, o método, desde a amostragem à detecção cromatográfica dos canabinoides, revelou repetibilidade (precisão intra-dia) e precisão inter-dia, por ser elaborado em alíquotas similares.

Os cálculos para o RSD intradia e para o RSD *pooled* relativo foram elaborados de acordo com o descrito para a precisão. Os valores, todos eles abaixo de 6%, vão de encontro ao que foi estipulado para este parâmetro.

Tabela 5- Valores de desvio padrão residual (RSD) em percentagem, para cada canabinoide presente em cada amostra. Amostra A8, rica em CBD e CBDA; Amostra A11 rica em Δ^9 -THCA e Δ^9 -THC.

A8	Intra dia	Inter dia
	RSD%	RSD pooled %
CBD	3,5%	3,7%
CBDA	1,1%	1,4%
CBN	2,8%	2,8%
Δ^9 -THC	3,6%	3,6%
Δ^9 -THCA	3,3%	5,3%

A11	Intra dia	Inter dia
	RSD%	RSD pooled %
CBD	5,4%	5,6%
CBDA	1,8%	2,1%
Δ^9 -THC	1,3%	1,7%
Δ^9 -THCA	2,7%	3,1%

Comparando com o descrito na literatura, e dando ênfase aos valores típicos e máximos para a heterogeneidade admitidos pela ENFSI, 19% e 30% de RSD, (ENFSI, 2014), os resultados aqui expostos revelam-se ótimos, demonstrando que o método descrito é apropriado para a análise a que se destina. No entanto, mesmo com os valores de repetibilidade obtidos que revelam uma excelente precisão, salienta-se a importância de uma amostragem correta, de forma representativa da amostra a ser analisada.

3.4.Aplicação a Amostras Reais

Os ensaios em amostras herbáceas e de óleo reais foram realizados sob condições experimentais otimizadas e validadas, em duplicado. Como previamente descrito, foi adotada a adição de padrão interno, visando suprimir eventuais alterações ou perdas de volume durante o processo. A quantidade de cada canabinoide na amostra (% p/p) foi calculada utilizando o fator de diluição utilizado na sua análise bem como a quantidade pesada inicialmente. O método desenvolvido permitiu a obtenção de cromatogramas como os apresentados na Figura 24.

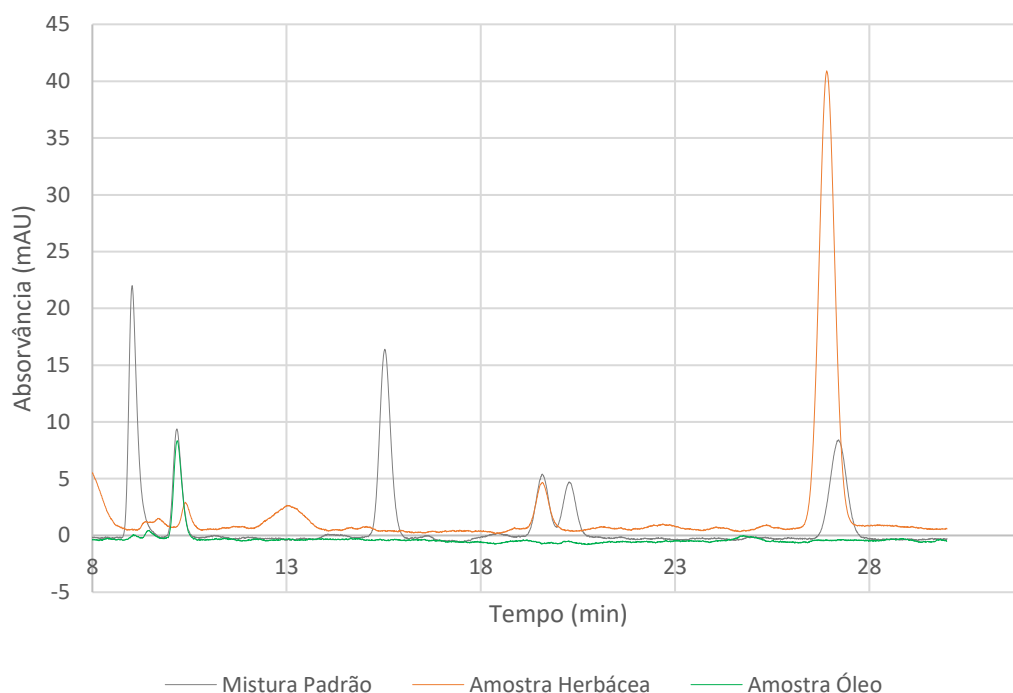


Figura 24- Sobreposição de cromatogramas obtidos por HPLC-DAD nas condições descritas. A mistura padrão contendo os 6 canabinoides a 5.0 $\mu\text{g/mL}$ (cinzento), pode ser comparada com uma amostra de cânabis herbácea (A8) rico em THCA (laranja) e ainda uma amostra de óleo de “CBD” (B1), a verde. Da esquerda para a direita, surgem os picos de CBD, CBDA, CBN, Δ^9 -THC, Δ^8 -THC e Δ^9 -THCA.

Nos cromatogramas acima, é possível observar uma amostra padrão, composta pelos 6 canabinoides em estudo, a uma concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ (linha cinzenta), uma amostra herbácea (linha laranja), e uma de óleo de cânabis (linha verde). Na figura, a amostra herbácea e a de óleo estão diluídas, com um fator de diluição de 250 e de 1000, respectivamente. É possível observar que a amostra em questão, A8, apresenta um pico bastante elevado de Δ^9 -THCA, mas em contrapartida, níveis baixos de CBDA e Δ^9 -THC. O CBD, CBN e o Δ^8 -THC não são detetáveis nestas condições.

A amostra de óleo “de CBD”, como constava no seu rótulo (Figura 2B), demonstrou ter CBDA, porém níveis residuais do composto na sua forma neutra. Não são visíveis nenhum dos outros canabinoides nesta amostra, nas condições descritas.

3.4.1. Teores de fitocanabinoides

Com base nos processos de otimização e após a validação do método construído, as amostras mencionadas foram analisadas, permitindo a deteção e quantificação dos fitocanabinoides propostos. O Δ^8 -THC apenas constou na amostra A3, com um teor de 0,06%, pelo que este canabinoide não foi incluído na Tabela 6.

Tabela 6- Amostras herbáceas (A) e de óleos (B) analisadas por HPLC-DAD e respetivos teores em cada um dos fitocanabinoides analisados pelo método desenvolvido. Indicados os casos de teores não quantificáveis, por se apresentarem abaixo do LOQ ou ainda não detetáveis, quando abaixo ao LOD.

	CBD	CBDA	CBN	Δ^9-THC	Δ^9-THCA	CBD_T	Δ^9-THC_T
A1	0,03%	2,38%	1,48%	11,81%	0,45%	2,41%	12,26%
A2	0,05%	2,22%	0,69%	2,23%	8,61%	2,27%	10,83%
A3	0,04%	0,48%	0,02%	0,81%	17,43%	0,51%	18,24%
A4	0,02%	<LOD	0,86%	0,07%	0,45%	0,02%	0,52%
A5	7,87%	2,02%	0,02%	0,19%	0,25%	9,89%	0,45%
A6	0,08%	1,38%	0,04%	1,98%	13,63%	1,46%	15,61%
A7	0,04%	0,78%	0,09%	2,26%	7,94%	0,83%	10,20%
A8	0,04%	0,74%	0,02%	6,68%	12,18%	0,78%	18,86%
A9	7,36%	2,33%	<LOD	0,20%	0,15%	9,69%	0,35%
A10	1,32%	5,69%	<LOD	0,05%	0,05%	7,01%	0,09%
A11	13,58%	1,87%	<LOD	0,21%	0,60%	15,46%	0,81%
A12	9,93%	2,68%	<LOD	0,28%	0,26%	12,61%	0,54%
A13	2,68%	1,12%	<LOD	0,11%	0,06%	3,80%	0,17%
A14	2,72%	1,85%	<LOQ	0,12%	0,06%	4,57%	0,18%
A15	3,89%	7,38%	0,03%	0,30%	0,05%	11,27%	0,35%
B1	<LOQ	2,59%	0,01%	0,11%	<LOD	2,59%	0,11%
B2	0,03%	3,78%	0,08%	0,02%	<LOD	3,82%	0,02%

Por forma a facilitar a visualização dos resultados, foram construídos as Figuras 25 a 29, que permitem a comparação entre as várias análises, bem como uma clara separação entre os seus conteúdos com base na sua forma de obtenção.

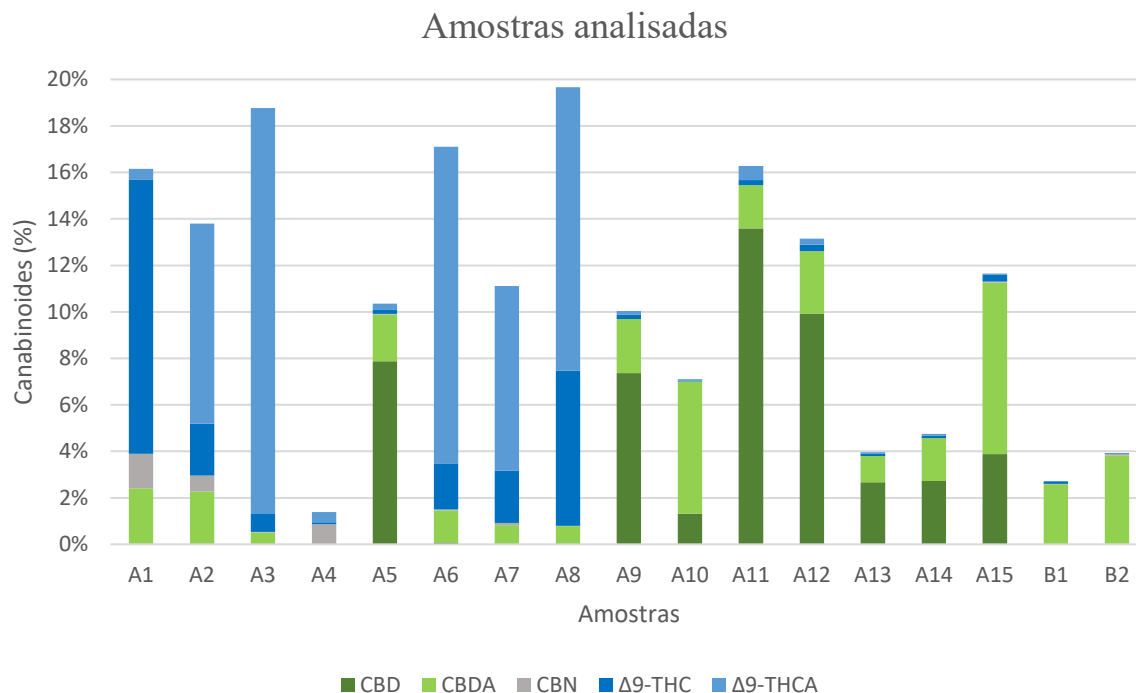


Figura 25- Amostras analisadas e respetivos teores nos canabinoides detetados em cada uma delas.

Pela Figura 25 é possível constatar que existe um conjunto de amostras ricas em Δ^9 -THC / Δ^9 -THCA, representados a azul-escuro e azul-claro, todas elas provenientes da Kosmicare, e um segundo conjunto de amostras, adquiridas em loja, ricas em CBD/CBDA, que surgem a verde-escuro e verde-claro.

Em relação aos dois óleos analisados, B1 e B2, constatou-se que os níveis de Δ^9 -THC_T, se encontravam para ambas, dentro dos limites legais estipulados pela ASAE. Já os valores indicados nos seus rótulos, 500 mg/10 mL = 5,0% (g/mL) para a amostra B1 e 1000 mg/10 mL, ou seja, 10,0% (g/mL) para a B2, não se verificaram. Em ambos os casos, o CBD surge em quantidades mínimas, sendo o CBDA o composto predominante. Ainda sim, considerando o teor em CBD_T, a amostra B1 apresenta pouco mais de metade (2,59%) do rotulado. Já na amostra B2, foi detetado um teor apenas de 3,82%, menos de metade dos 10% prometidos.

No primeiro grupo, Figura 26, constatou-se que, com exceção da amostra A1 e A4, a forma ácida do Δ^9 -THC surge em quantidade muito superior à forma neutra, o que poderá indicar que as amostras tenham sido colhidas há pouco tempo, e armazenadas em boas condições. A amostra A4, como referido anteriormente, já estava armazenada há alguns anos, o que justifica a predominância do CBN nesta amostra, uma vez que este é um derivado do Δ^9 -THC, associado ao passar do tempo, e das condições de armazenamento.

O que foi interessante nesta amostra, foi detetar ainda a presença de Δ^9 -THCA, e em maiores quantidades do que Δ^9 -THC, mas um teor em CBD_T próximo de nulo.

O intervalo de valores, neste conjunto de amostras, observado para o Δ^9 -THCA, Figura 27, compreende teores desde 0,45% (A1 e A4) a 17,43% (A3), com um valor médio de 8,67%. Em relação às formas de CBD, este canabinoide surge maioritariamente na forma ácida, num valor médio de 1,33%.

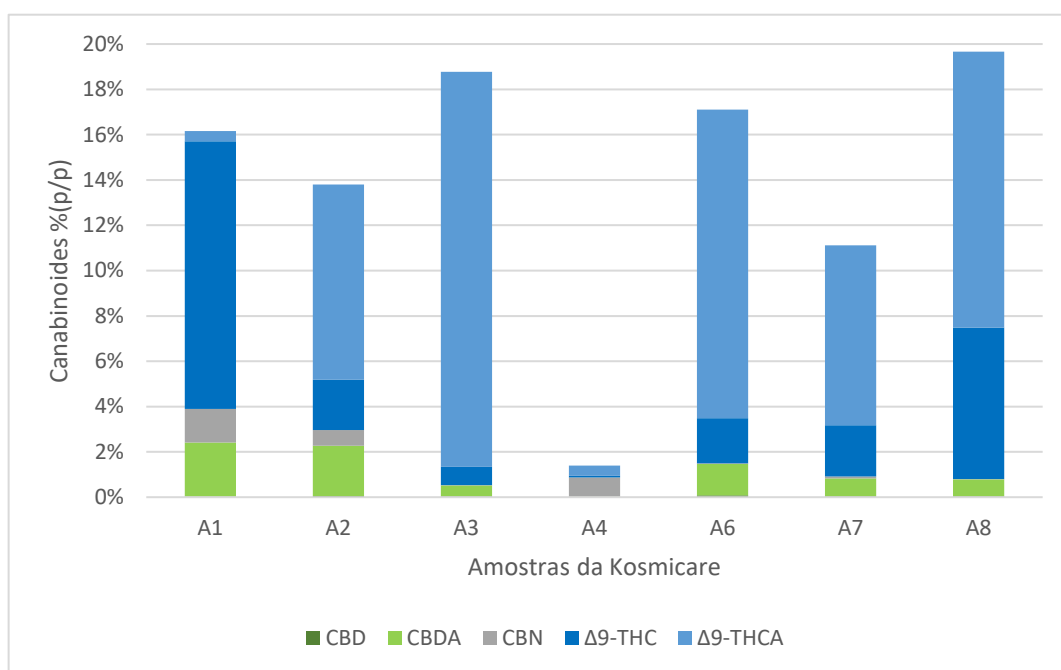


Figura 26- Amostras fornecidas pela Kosmicare, e o seu teor de canabinoides analisados.

Tendo em conta os 11% de teor médio de THC reportados no relatório europeu sobre drogas (EMCDDA, 2022), relativamente a amostras herbáceas analisadas em 2020, a quantidade de Δ^9 -THC_T que surgiu nas amostras fornecidas pela Kosmicare, com uma média de 12,36%, revela-se ligeiramente superior. É de sinalizar as amostras A3 e A8, em que o teor em Δ^9 -THC_T quantificado foi superior a 18%, demonstrando o elevado teor que as amostras podem tomar, e a heterogeneidade de valores que pode existir nestas substâncias de abuso disponíveis no mercado ilegal.

Canabinoides: Amostras Kosmicare

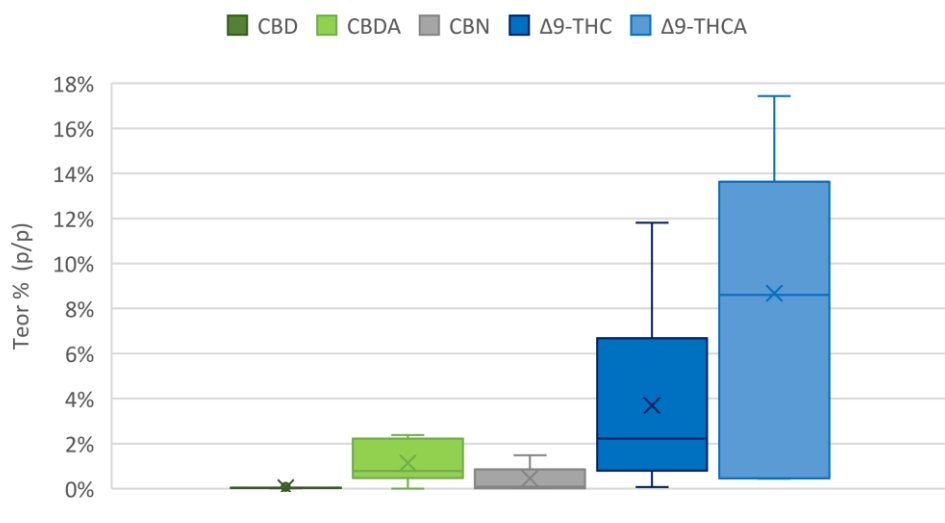


Figura 27- Canabinoides presentes nas amostras fornecidas pela Kosmicare, com os seus valores máximos e mínimos, a média representada com um X, e a mediana representada pela linha horizontal.

No segundo conjunto, remetente a amostras adquiridas em lojas, ao contrário do que se verifica nas amostras ricas em Δ^9 -THC_T, a forma ácida do canabinoide predominante, CBD, surge em menor quantidade do que a forma neutra, excetuando as amostra A10 e A15, Figura 28.

O intervalo de valores, neste conjunto de amostras, observado para o CBD, Figura 29, compreende teores desde 1,32% (A10) a 13,58% (A11), com um valor médio de 6,17%,

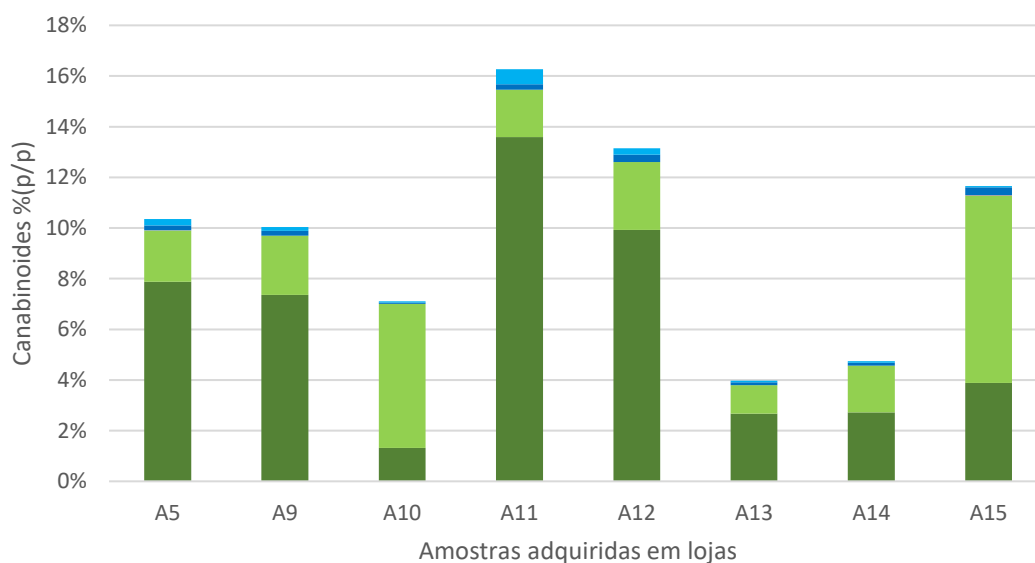


Figura 28-Amostras obtidas em lojas, e o seu teor nos canabinoides em estudo.

e mediana de 5,63%. Em relação às formas de Δ^9 -THC, o composto surge tanto na forma ácida como na neutra, num valor médio igual para ambos, de 0,18%.

Comparando a informação descrita pelos vendedores, com as quantidades determinadas neste estudo, das 8 amostras analisadas apenas as amostras A10, A13 e A14, apresentam um teor em Δ^9 -THC_T conforme o rotulado, ou seja, abaixo de 0,2%. O CBN estava abaixo do limite de detecção para a maioria das amostras obtidas em loja.

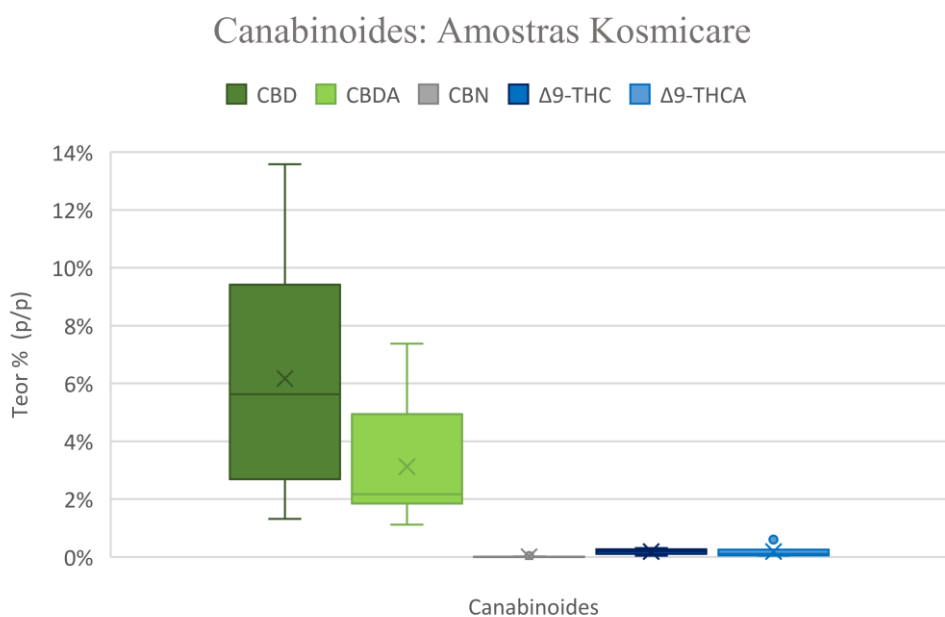


Figura 29-Canabinoides presentes nas amostras obtidas em lojas, com os seus valores máximos e mínimos, a média representada com um X, e a mediana representada pela linha horizontal.

Relativamente aos níveis de CBD estipulados nos rótulos das amostras, apenas a amostra A10 cumpre com o teor definido pelos vendedores. O nível de CBD_T da amostra A5 (9,89%) está relativamente próximo da quantidade de CBD rotulada. Já as amostras A11 e A12, apresentam nível de CBD_T superiores aos rotulados, 15,46% e 12,61%, respetivamente. De salientar que a “análise” reportada para a A12 anunciava que a sua constituição era maioritariamente CBDA, porém os níveis de CBD determinados não foram tão insignificantes como os rotulados (2,68% contra os 0,07% reportados). Para as amostras A13, A14 e A15, verificou-se o contrário. Os valores de CBD_T presentes nas amostras eram bastante inferiores aos rotulados, o que vai de acordo com os estudos de (Zivovinic et al., 2018), e assumindo que a subjetividade de expressões como

“CBD<X” leva o consumidor a querer que o teor de CBD estará próximo de X. Com valores de CBD_T de 3,80% para a amostra A13 (“CBD<14”), 4,57% na amostra A14 (“CBD<12”), e 11,27% de CBD_T para a A15, rotulada com um teor em CBD reportado entre 18 e 20%.

Embora o número de análises não seja considerado estatisticamente significativo, a diversidade de valores aqui apresentada constitui uma demonstração dos possíveis produtos que estão disponíveis ao público, tanto no mercado legal como no ilegal. Salientam-se as diferenças entre o que é divulgado e promovido nos rótulos dos produtos e sítios da internet, *versus* a constituição em canabinoides e os seus valores reais detetados e quantificados nestas amostras. Mais do que nunca, o controlo e informação ao público, bem como aos consumidores alvo, releva-se de extrema importância.

3.4.2. Botânica

A atribuição das subespécies e variedades da planta da canábis não é exequível apenas com os resultados analíticos obtidos anteriormente. Porém, utilizando os dados disponíveis, e com base no reportado de rácio THC/CBD na chave dicotómica para as 4 variedades da *C. sativa* subsp. *Indica* criada por (McPartland & Small, 2020), bem como o teor de THC descrito por (Small & Cronquist, 1976) aquando da caracterização das plantas da subespécie *sativa*, foi realizada a comparação possível.

De acordo com os autores, a variedade *indica* é caracterizada pelos maiores valores no rácio $\Delta^9\text{-THC}_T / \text{CBD}_T$, sendo estes usualmente bem superiores a 7. Com base nos resultados obtidos, apresentados na Tabela 7, as amostras A3, A4 e A8, apenas pelo critério químico, seriam consideradas da variedade *indica*. Com rácios não tão elevados, mas superiores a 7, seriam também incluídas as amostras A6 e A7.

Com um rácio rondando os 5, a amostra A1 e A2 poderia tanto ser considerada da variedade *himalayensis*, por ser perto de 7, ou da *afghanica*, por ser superior a 2, sendo um caso claro da necessidade de outros critérios para a averiguação da nomenclatura.

As restantes amostras, excetuando a A9, A12 e a A15, obtidas em lojas, poderiam ser consideradas da subespécie *sativa*, pelo teor Δ^9 -THC_T <0.3%. Ou, se os restantes critérios apontassem para a subespécie *indica*, seriam todas da variedade *asperrima*.

Tabela 7- Amostras herbáceas e respetivo valor do rácio Δ^9 -THC_T/CBD_T

Amostras	Rácio
A1	5,08
A2	4,78
A3	35,62
A4	29,76
A5	0,05
A6	10,69
A7	12,34
A8	24,15
A9	0,04
A10	0,01
A11	0,05
A12	0,04
A13	0,04
A14	0,04
A15	0,03

Reforça-se que apenas este indicador fitoquímico não seria suficiente para a atribuição da nomenclatura, pelo que seria necessário ter acesso aos aspetos morfológicos da planta completa, estudos genéticos, e ainda a possíveis relações hospedeiro-parasitas, para uma correta atribuição de subespécies e variedades. Para além deste fator, a reprodução cruzada e a hibridação tornam a caracterização destas amostras deveras complexa, e por vezes sem sentido, pela informação discordante que se gera entre os diversos aspetos necessários para a atribuição de uma nomenclatura.

3.4.3. Atribuição de Quimiotipo

Com base na fórmula descrita no ponto 2.2.7.2, foi atribuída a classificação do quimiotipo 1, da Tabela 8. Esta atribuição apenas tem sentido aplicar em amostras herbáceas, pelo

que os óleos não foram incluídos. Todas as amostras provenientes de lojas são classificadas como para fins industriais. As adquiridas através da parceria com a Kosmicare, foram todas atribuídas ao “drug type”, sendo consideradas substâncias de abuso.

Por sua vez, seguindo a classificação criada por (Mandrioli et al., 2019) que se baseia no rácio THCA/CBDA, os resultados obtidos (quimiotipo 2 na tabela), não estariam totalmente de acordo com os da primeira classificação. Exemplo disso é a amostra A1, em que a inclusão das várias formas do THC e do CBD, bem como do teor em CBN no cálculo, leva à sua classificação como substância de abuso, porém tendo apenas em conta as formas ácidas dos canabinoides, esta amostra seria considerada apta para utilização industrial. Outro exemplo da importância da consideração do THC total surge para a amostra A4, em que a ausência de CBDA leva a uma impossibilidade na atribuição, de acordo com o rácio do quimiotipo 2, apesar da amostra ser considerada, pela fórmula aplicada neste estudo, como uma substância de abuso.

Tabela 8- Atribuição do quimiotipo às amostras em estudo, com base na fórmula estipulada (quimiotipo 1), e pelo rácio THCA/CBDA, proposto por (Mandrioli et al., 2019) para a definição de quimiotipos.

Amostras	Quimiotipo	
	1	2
A1	Drug	Industrial
A2	Drug	Drug
A3	Drug	Drug
A4	Drug	N.A.
A5	Industrial	Industrial
A6	Drug	Drug
A7	Drug	Drug
A8	Drug	Drug
A9	Industrial	Industrial
A10	Industrial	Industrial
A11	Industrial	Industrial
A12	Industrial	Industrial
A13	Industrial	Industrial
A14	Industrial	Industrial
A15	Industrial	Industrial

Apesar de ser um bom indicador e proporcionar uma noção e comparação entre tipos de plantas da canábis, não pode ser utilizado para as enquadrar legalmente. Como exemplo, apresenta-se a amostra A12, que embora seja atribuída a uma planta para fins industriais, apenas tendo em conta o seu teor em Δ^9 -THC neutro (0,28%) é superior ao permitido por lei na produção de produtos para estes fins, ou seja, igual ou inferior a 0,2%. Tendo em conta a descarboxilação que ocorre no processo de fumo, e para tal considerando o teor em THC_T , esta amostra possui mais do que 2,5 vezes o estipulado por lei.

3.4.4. Enquadramento Legal

Com base no quadro legal vigente em Portugal para as plantas da canábis, todas as amostras provenientes da parceria com a Kosmicare não poderiam ser consideradas para fins industriais. No entanto, e considerando o consumo recreativo, apenas com base na quantidade total que o sujeito tenha em posse, e se este ultrapassar as 25g estipuladas para o canábis herbáceo, pode ser considerada uma prática ilegal, de acordo com a Lei n.º 30/2000 de 29 de novembro.

Pela mesma razão, muitos dos produtos referidos obtidos em loja, rotulados como “legais” e com “teores de $\text{THC} < 0,2\%$ ”, de acordo com as análises realizadas não poderiam ser considerados para fins industriais, nem estão de acordo com o estipulado pela ASAE. Por outro lado, estes produtos são vendidos como “artigos de coleção” e não são “próprios para consumo humano”, apesar da procura e oferta destes produtos depender apenas e só do mesmo, argumentando e garantindo “sensações de relaxamento” e sendo a cura para “dores e sofrimentos, stress, PTSD e náusea”.

Na hipótese de considerar as amostras obtidas em lojas, para fins industriais, será de interesse possuir informação sobre o seu conteúdo, nomeadamente o teor em THC.

No entanto, seguindo o Regulamento (UE) N.º 1307/2013 desde que as variedades das plantas não apresentem níveis de THC superiores a 0,2%, são consideradas próprias para uso industrial.

O que não fica claro, é a que se refere a expressão “níveis de THC”. Se apenas a forma neutra do Δ^9 -THC for tida em conta, fica de parte o composto de que o mesmo provém,

o Δ^9 -THCA. Este composto nas plantas consta em maior quantidade, tornando-se extremamente importante na obtenção do teor em (Δ^9 -) THC total.

É de reforçar que quando sujeito ao calor, por fumo ou sendo cozinhado, este composto descarboxila e passa a surgir na forma neutra, com os conhecidos efeitos psicoativos atribuídos. A nível prático, utilizando as amostras A4, A5 e A9 como exemplo, ter ou não em conta a forma ácida altera a sua disposição em termos legais (consultar Tabela 9, e Tabela A8 em anexo para os cálculos). Ao olhar apenas para a quantificação do Δ^9 -THC, as três amostras cumprem o critério 1, e seriam consideradas legais.

Tabela 9- Amostras e o seu cumprimento do requisito da lei. O cumprimento do critério 1 refere-se a um teor de Δ^9 -THC não superior a 0,2%, enquanto o critério 2 tem em conta o teor total de Δ^9 -THC (forma neutra e ácida).

Amostras	Critério 1	Critério 2
A1	Não	Não
A2	Não	Não
A3	Não	Não
A4	Sim	Não
A5	Sim	Não
A6	Não	Não
A7	Não	Não
A8	Não	Não
A9	Sim	Não
A10	Sim	Sim
A11	Não	Não
A12	Não	Não
A13	Sim	Sim
A14	Sim	Sim
A15	Não	Não
B1	Sim	Sim
B2	Sim	Sim

Aplicando o pensamento até aqui defendido, assumindo a relevância do Δ^9 -THCA, estas amostras, pelo seu teor em Δ^9 -THC_T, seriam consideradas amostras com níveis superiores aos previstos na lei, não cumprindo o critério 2.

A lei apresenta assim diversas lacunas, deixando margem para dúvidas e subjetividade na sua interpretação, e consequente aplicação. Os artigos disponibilizados nestas lojas, não sendo considerados alimentícios, não são responsabilidade da ASAE. No entanto, não são também provenientes de plantas de canábис para fins industriais, nem produzidos para esse fim, logo a entidade responsável pelo controlo dos artigos disponíveis no mercado, bem como da sua qualidade, não está explícita atualmente.

Revela-se de extrema importância uma clarificação na atribuição desta responsabilidade, sendo que o controlo dos diversos constituintes da planta é previsto nas convenções das nações unidas, bem como na legislação portuguesa do combate à droga, mas atualmente não se concretiza.

3.4.5. Teste colorimétrico: Fast Blue BB

Para determinar a utilidade do teste colorimétrico do sal Fast Blue BB como uma análise presuntiva de amostras, e tendo em vista a possibilidade da sua utilização de forma semi-quantitativa, foram testadas as amostras A8 e A11.

Primeiramente, ao comparar a resposta ao teste pelas amostras ricas nas formas ácidas, versus após serem sujeitas à sua descarboxilação, por aquecimento em forno, os resultados foram idênticos, demonstrando que o teste é sensível tanto para as formas neutras como as ácidas dos canabinoides em questão.

Estas amostras, previamente quantificadas pelo método cromatográfico descrito, permitiram a avaliação da resposta deste teste colorimétrico, em diferentes concentrações de THC_T (amostra A8, 18,6%), e CBD_T, (pela A11, 13,9%), pelo recurso ao lúpulo para a criação de misturas. Na Figura 30 constam as respostas ao teste com o sal Fast Blue BB (consultar o branco nos anexos, Figura A7), das amostras menos concentradas até à forma da amostra sem “corte” com lúpulo, da esquerda para a direita.

Os resultados permitem observar diferenças significativas entre teores mínimos, médios e máximos em ambos os canabinoides. Para além disso, os resultados obtidos sugerem haver uma saturação a partir dos 5%, uma vez que desde esse teor até ao máximo da

amostra sem mistura com lúpulo, a intensidade e concentração das cores parece não variar significativamente, tanto para o CBD como para o THC.

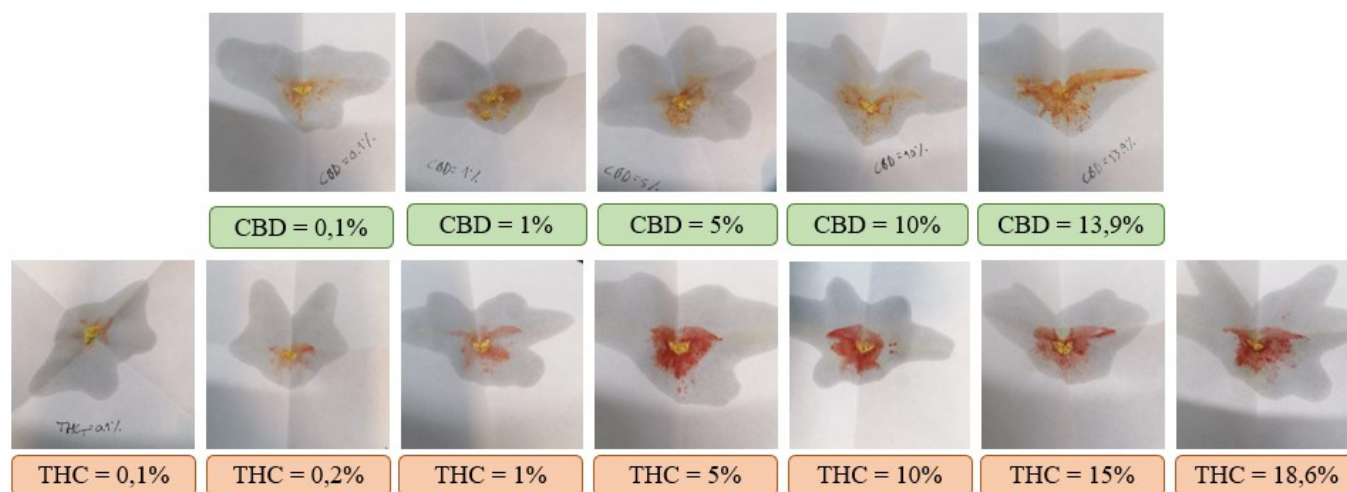


Figura 30- Resultados obtidos na aplicação do teste do sal Fast Blue BB a duas amostras, A11 e A8. Na fila superior surge a amostra A11 rica em CBD, produzindo uma cor laranja na reação, a diferentes níveis de concentração. Na fila inferior, a amostra A8 rica em THC total revela um vermelho vivo, que se vai intensificando com o correspondente aumento no teor do composto.

O teste colorimétrico do sal Fast Blue BB permitirá um estudo prévio do conteúdo da amostra, bem como informação sobre a diluição que poderá ser necessária realizar, previamente à análise por HPLC, permitindo assim estender a vida útil da coluna cromatográfica bem como de todo o equipamento.

Relativamente à sensibilidade do método, é possível observar diferenças entre o nível de THC de 0,1% e 0,2%. Este resultado levanta a possibilidade da aplicação deste teste de forma a possuir informação sobre a legalidade de uma determinada amostra. No entanto, será necessário desenvolver estudos com replicados, diversas amostras e controlo de parâmetros para a construção de uma reta de calibração aplicável nos casos previamente descritos.

Revelou-se uma opção viável, prática e de simples manuseamento, podendo ser utilizada *in loco* aquando apreensão, em campanhas e atividades de rastreio e informação da população, ou ainda como etapa preliminar, efetuada por serviços de *Drug Checking* aquando receção de uma amostra. Mais especificamente com vista ao método aqui sugerido, ter uma primeira ideia da constituição da amostra e do fator de diluição que será necessário aplicar.

4. Conclusão e Perspetivas Futuras

O controlo da canábis e dos produtos dela provenientes revela-se de extrema importância. Para tal, a determinação e quantificação dos principais canabinoides é a abordagem mais aplicada, permitindo estabelecer o quimiotipo da planta, e com ele determinar se a sua utilização para a finalidade pretendida é legal. Isto permite determinar a veracidade dos teores de canabinoides reportados nos rótulos de produtos alimentares, industriais ou “de coleção”. Pode ainda permitir averiguar a extensão da atividade farmacológica e psicotrópica dos produtos disponíveis no mercado, bem como, em conjunto com outros indicadores, levar à atribuição taxonómica da planta.

A otimização do processo de SLE, com recurso a desenhos experimentais, surge como algo inovador neste trabalho. Os resultados permitiram otimizar o processo, de forma a ser apenas necessário um ciclo de extração, com recurso a banho de ultrassons por um minuto e com 10 mL de solvente extrator. Este foi determinado como sendo ótimo pela mistura 50:50 de etanol:acetonitrilo, composição essa nunca antes descrita na literatura.

O método desenvolvido, após otimização e validação, provou ser eficiente na recuperação dos analitos alvo, eficaz para a análise dos seis fitocannabinoides, através de uma quantidade mínima de amostras reais de canábis herbáceas e de óleos da planta. Provou ser sensível, e seletivo, com ótimos valores referentes à sua precisão e veracidade. A excelente linearidade na gama de trabalho desenvolvida, de 0,5 a 25,0 µg/mL, foi demonstrada pela aplicação de testes estatísticos e análise de gráficos de resíduos, bem como cálculo do R² (>0,997 para todos os canabinoides avaliados). Foram ainda avaliadas a estabilidade dos compostos, bem como a repetibilidade, com resultados excelentes comparando com os esperados pela natureza heterogénea da matriz.

Em suma, a metodologia proposta na presente dissertação, após otimização experimental, provou ser de fácil manuseamento através de poucas etapas laboratoriais; verde, pela redução do volume utilizado de solventes, e de rápida aplicação, com ótimo desempenho analítico. Por outro lado, o HPLC-DAD provou ser uma abordagem analítica rápida e conveniente, permitindo uma quantificação precisa dos fitocannabinoides selecionados em matrizes reais.

A comparação entre as análises de amostras reais demonstrou que, para as amostras obtidas em lojas, o canabinoide predominante era o CBD, com valores compreendidos

entre 1,32% e 13,58%. Contrastando, as amostras providas da Kosmicare, eram ricas em Δ^9 -THCA, com valores bastante variados, desde 0,45% a 17,43%.

Relativamente aos teores de canabinoides indicados nos seus rótulos, tanto para as amostras dos óleos analisados, bem como para as herbáceas, apenas uma das quantificações resultou em informação concordante com a rotulada. Para os óleos, constatou-se que os níveis de Δ^9 -THCT, se encontravam dentro dos limites legais estipulados (<0,2% THC), porém nas amostras herbáceas, menos de metade se apresentaram em conformidade com a lei. Em relação aos níveis de CBD/CBDA, a maioria das amostras continha um teor muito abaixo da informação fornecida. Estes factos demonstram a necessidade do controlo dos produtos disponíveis nestas lojas, bem como a importância de serviços de prestação de análise e informação ao público em geral. O controlo de qualidade, quando exercido, terá de ser representativo dos vários lotes do produto, bem como tendo em conta a influência das condições de transporte e armazenamento na possível alteração dos teores de fitocannabinoides.

Em relação à componente taxonómica, a recolha e conservação do germoplasma (recursos genéticos de um organismo) das variedades primitivas das duas subespécies, nos seus centros de diversidade é urgentemente necessária, para a conservação da diversidade genética. No contexto atual de alterações climáticas e de necessidades vindouras imprevisíveis, a preservação em bancos de sementes surge como uma prioridade.

A nomenclatura inequívoca fornecida por McPartland e Small (2020) que foi utilizada como base nesta dissertação, pode contribuir para evitar a extinção das formas originais da planta. Considera-se de extrema relevância a atribuição de uma só nomenclatura, de forma a evitar a confusão popular e termos errados atribuídos.

Na mesma linha de pensamento, considera-se necessário o estabelecimento que permita o término da dificuldade de entendimento em contexto legal, das substâncias que se encontram sob controlo, bem como a uniformização das formas de cálculo para a determinação do que é considerado conteúdo admitido pela lei, nomeadamente a inclusão da forma ácida do Δ^9 -THC. Reforça-se o difícil acesso à informação completa sobre a legalidade do consumo, das suas condições bem como a importância de um documento único com toda a informação relativa ao tema, de forma clara e objetiva, sem margens para interpretações erróneas.

Uma vez que o teor dos canabinoides pode variar dependendo da parte da flor que é selecionada e utilizada para análise, pois diferentes partes da planta produzem diferentes teores de compostos, retém-se a necessidade da homogeneização das amostras ou seu conjunto antes de serem analisados, de forma a minimizar tais flutuações e garantir uma amostragem correta e representativa.

Apesar de nas amostras analisadas, apenas numa ter sido detetado o Δ^8 -THC, pela recente popularidade e recorrência da sua presença reportada pela literatura (Bernhard et al., 2022), e pela falta de informação acerca do composto, a sua inclusão no estudo mantém-se pertinente, até pela previsível necessidade de cuidados médicos para um número crescente de pacientes que estão sob a influência da substância. Como de forma natural surge em quantidades mínimas, no que reporta ao Δ^8 -THC, níveis incomuns deste composto detetados em amostras indicarão que poderão ter sido fortificadas com o mesmo. A literatura supramencionada, bem como a própria associação Kosmicare reportam o recente aumento na procura de serviços de análise de plantas da canábis, maioritariamente para amostras herbáceas, procura esta que pode ser apoiada pelo método desenvolvido.

Como perspetivas futuras, propõe-se a aplicação da metodologia analítica desenvolvida a outros fitocannabinoides de potencial interesse, como o CBNA, CBG e a sua forma ácida, CBC, entre outros. A análise de um maior número de amostras, de forma a ter um número estatisticamente significativo e representativo, permitiria caracterizar a realidade atual do consumo destas substâncias, auxiliando e participando na criação de dados para observatórios de consumo de substâncias de abuso. Para além disso, a análise de amostras de diferentes naturezas e formas, como resina de canábis, ou ainda produtos alimentares ou farmacêuticos contendo os compostos referidos, permanece como objetivo vindouro.

Para trabalhos futuros, propõe-se ainda, a redução da quantidade de amostra necessária para a quantificação dos compostos; aplicar o desenho experimental à otimização instrumental, de forma a compreender a influência e interação entre fatores e possivelmente aumentar a sensibilidade e a seletividade da metodologia. A realização de ensaios laboratoriais permitiria ter noção da reprodutibilidade do método desenvolvido, bem como corroborar os resultados obtidos.

Por último, a combinação da técnica cromatográfica proposta, com sistemas de deteção para além do DAD, como o detetor por espectrometria de massa, ou mesmo com

instrumentação de alta resolução (UHPLC), no sentido de aumentar ainda mais a seletividade, resolução e sensibilidade, bem como diminuir o tempo da corrida, e os limites de detecção e quantificação dos compostos analisados, são fatores a ter em conta.

Bibliografia

- Acosta, A., & Almirall, J. (2021). Differentiation between hemp-type and marijuana-type cannabis using the Fast Blue BB colorimetric test. *Forensic Chemistry*, 26, 100376. <https://doi.org/10.1016/J.FORC.2021.100376>
- Acosta, A., Li, L., Weaver, M., Capote, R., & Perr, J. (2022). Validation of a combined Fast blue BB and 4-Aminophenol colorimetric test for indication of Hemp-type and Marijuana-type cannabis, 31(April). <https://doi.org/10.1016/j.forc.2022.100448>
- Adams, R., Pease, D. C., Clark, J. H., & Baker, B. R. (1940). Structure of Cannabinol. I. Preparation of an Isomer, 3-Hydroxy-1-n-amy-6,6,9-trimethyl-6-dibenzopyran. *Journal of the American Chemical Society*, 62(8), 2197–2200. https://doi.org/10.1021/JA01865A081/ASSET/JA01865A081.FP.PNG_V03
- Aizpurua-Olaizola, O., Omar, J., Navarro, P., Olivares, M., Etxebarria, N., & Usobiaga, A. (2014). Identification and quantification of cannabinoids in Cannabis sativa L. plants by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(29), 7549–7560. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8177-x>
- Aizpurua-Olaizola, O., Soydaner, U., Öztürk, E., Schibano, D., Simsir, Y., Navarro, P., ... 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>
- Akram, N., & Umamahesh, M. (2018). A Review on High Performance Liquid Chromatography (HPLC).
- Alipour, A., Patel, P. B., Shabbir, Z., & Gabrielson, S. (2019). Review of the many faces of synthetic cannabinoid toxicities. *Mental Health Clinician*, 9(2), 93–99. <https://doi.org/10.9740/MHC.2019.03.093>
- Appendino, G. (2020). The early history of cannabinoid research. *Rendiconti Lincei. Scienze Fisiche e Naturali*, 31, 919–929. <https://doi.org/10.1007/s12210-020-00956-0>
- ASAE. (2019). Cânhamo (Cannabis sativa) e/ou CBD (canabidiol) em Alimentos. Retrieved July 7, 2022, from <https://www.asae.gov.pt/newsletter2/asaenews-n-118-dezembro-2019/canhamo-cannabis-sativa-eou-cbd-canabidiol-em-alimentos.aspx>
- Baron, E. P. (2018). Medicinal Properties of Cannabinoids, Terpenes, and Flavonoids in Cannabis, and Benefits in Migraine, Headache, and Pain: An Update on Current Evidence and Cannabis Science. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*, 58(7), 1139–1186. <https://doi.org/10.1111/HEAD.13345>
- Bergman, M. E., Davis, B., Phillips, M. A., Swiezewska, E., Surmacz, L., & Loll, B. (2019). Medically Useful Plant Terpenoids: Biosynthesis, Occurrence, and Mechanism of Action. *Molecules* 2019, Vol. 24, Page 3961, 24(21), 3961. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24213961>
- Bernhard, W., Heeb, T., & Tytgat, J. (2022). Delta-8-Tetrahydrocannabinol, an emerging NPS and other structurally related cannabinoids. *Toxicologie Analytique*

- et Clinique*, 34(3), S174. <https://doi.org/10.1016/j.toxac.2022.06.300>
- Blatt-Janmaat, K., & Qu, Y. (2021). The Biochemistry of Phytocannabinoids and Metabolic Engineering of Their Production in Heterologous Systems. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 1–19. <https://doi.org/10.3390/IJMS22052454>
- Borille, B. T., González, M., Steffens, L., Ortiz, R. S., & Limberger, R. P. (2017). Cannabis Sativa: a Systematic Review of Plant Analysis. *Drug Analytical Research*, 1(1), 1–23. <https://doi.org/10.22456/2527-2616.73676>
- Brenneisen, R. (2007). Cannabis. *Marijuana and the Cannabinoids*, 17–49. https://doi.org/10.1007/978-1-59259-947-9_2
- Calvi, L., Pentimalli, D., Panseri, S., Giupponi, L., Gelmini, F., Beretta, G., ... Giorgi, A. (2018). Comprehensive quality evaluation of medical Cannabis sativa L. inflorescence and macerated oils based on HS-SPME coupled to GC–MS and LC–HRMS (q-exactive orbitrap®) approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 150, 208–219. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2017.11.073>
- Carcieri, C., Tomasello, C., Simiele, M., De Nicolò, A., Avataneo, V., Canzoneri, L., ... D'Avolio, A. (2017). Cannabinoids concentration variability in cannabis olive oil galenic preparations. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 70(1), 143–149. <https://doi.org/10.1111/JPHP.12845>
- Cardenia, V., Gallina Toschi, T., Scappini, S., Rubino, R. C., & Rodriguez-Estrada, M. T. (2018). Development and validation of a Fast gas chromatography/mass spectrometry method for the determination of cannabinoids in Cannabis sativa L. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26(4), 1283–1292. <https://doi.org/10.1016/J.JFDA.2018.06.001>
- Casiraghi, A., Roda, G., Casagni, E., Cristina, C., Musazzi, U. M., Franzè, S., ... Gambaro, V. (2018). Extraction Method and Analysis of Cannabinoids in Cannabis Olive Oil Preparations. *Planta Medica*, 84(04), 242–249. <https://doi.org/10.1055/S-0043-123074>
- Cavalli, J., & Dutra, R. C. (2021). A closer look at cannabimimetic terpenes, polyphenols, and flavonoids: a promising road forward. *Neural Regeneration Research*, 16(7), 1433. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.301011>
- Chandra, S., Lata, H., & ElSohly, M. A. (2017). Cannabis sativa L. - botany and biotechnology. *Cannabis Sativa L. - Botany and Biotechnology*, 1–474. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-54564-6>
- Chang, R. (2010). *Chemistry*. (McGraw-Hill Education, Ed.) (10th ed.). New York.
- Charitos, I. A., Gagliano-Candela, R., Santacroce, L., & Bottalico, L. (2020). The Cannabis Spread throughout the Continents and its Therapeutic Use in History. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*, 21(3), 407–417. <https://doi.org/10.2174/1871530320666200520095900>
- Citti, C., Braghiroli, D., Vandelli, M. A., & Cannazza, G. (2018). Pharmaceutical and biomedical analysis of cannabinoids: A critical review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 147, 565–579. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.06.003>
- Clarke, E. (2011). *Clarke's analysis of drugs and poisons. Fourth edition* (4th ed.).

- Retrieved from
<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00450618.2011.620006>
- De Backer, B., Maebe, K., Verstraete, A. G., & Charlier, C. (2012). Evolution of the Content of THC and Other Major Cannabinoids in Drug-Type Cannabis Cuttings and Seedlings During Growth of Plants*. *Journal of Forensic Sciences*, 57(4), 918–922. <https://doi.org/10.1111/J.1556-4029.2012.02068.X>
- Dei Cas, M., Casagni, E., Saccardo, A., Arnoldi, S., Young, C., Scotti, S., ... Roda, G. (2020). The Italian panorama of cannabis light preparation: Determination of cannabinoids by LC-UV. *Forensic Science International*, 307, 110113. <https://doi.org/10.1016/J.FORSCIINT.2019.110113>
- Devane, W. A., Hanuš, L., Breuer, A., Pertwee, R. G., Stevenson, L. A., Griffin, G., ... Mechoulam, R. (1992). Isolation and Structure of a Brain Constituent That Binds to the Cannabinoid Receptor. *Science*, 258(5090), 1946–1949. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1470919>
- Diário da República Eletrónico. (1994). Decreto Regulamentar n.º 61/94. Retrieved September 29, 2022, from <https://dre.pt/dre/detalhe/decreto-regulamentar/61-619306>
- Diário da República Eletrónico. (1996). Portaria n.º 94/96, de 26 de Março. Retrieved July 7, 2022, from https://www.pgdlisboa.pt/leis/lei_mostra_articulado.php?artigo_id=192M0001&nid=192&tabela=leis&pagina=1&ficha=1&so_miolo=&nversao=
- Diário da República Eletrónico. (2018). Lei n. 33/2018.
- Diário da República Eletrónico. (2019). *Dec. Lei n.º 8/2019*.
- Diário da República Eletrónico. (2020a). Decreto Regulamentar n.º 2/2020, de 4 de agosto. Retrieved September 28, 2022, from <https://dre.pt/dre/detalhe/decreto-regulamentar/2-2020-139472787>
- Diário da República Eletrónico. (2020b). Despacho n.º 10953/2020. Retrieved September 28, 2022, from <https://dre.pt/dre/detalhe/despacho/10953-2020-147933321>
- Edge, T. (2003). Chapter 4 Turbulent flow chromatography in bioanalysis. *Handbook of Analytical Separations*, 4, 91–128. [https://doi.org/10.1016/S1567-7192\(03\)80005-0](https://doi.org/10.1016/S1567-7192(03)80005-0)
- ElSohly, M. A., & Slade, D. (2005). Chemical constituents of marijuana: The complex mixture of natural cannabinoids. *Life Sciences*, 78(5), 539–548. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.09.011>
- EMCDDA. (2020). *New psychoactive substances: global markets, global threats and the COVID-19 pandemic*. <https://doi.org/10.2810/921262>
- ENFSI. (2014). *Guidelines on Sampling of illicit drugs for quantitative analysis*. Retrieved from http://enfsi.eu/wp-content/uploads/2016/09/guidelines_quant_sampling_dwg_printing_vf4.pdf
- Ettre, L. S., & Hinshaw, J. V. (2008). Chapters in the evolution of chromatography. *Chapters in the Evolution of Chromatography*, 1–473.

- https://doi.org/10.1142/P529/SUPPL_FILE/P529_CHAP01.PDF
- Eurachem. (2014). *The Fitness for Purpose of Analytical Methods- A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics* (2nd ed.).
- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). (2018). *Cannabis legislation in Europe. Publications Office of the European Union, Luxembourg*. <https://doi.org/10.2810/930744>
- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). (2022). *Relatório Europeu sobre Drogas: Tendências e evoluções*. <https://doi.org/10.2810/776597>
- Fanali, S., Haddad, P. R., Poole, C. F., Schoenmakers, P., & Lloyd, D. (2013). Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation. *Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation*, 1–504. <https://doi.org/10.1016/C2010-0-68614-7>
- Fekete, S., Sadat-Noorbakhsh, V., Schelling, C., Molnár, I., Guillarme, D., Rudaz, S., & Veuthey, J. L. (2018). Implementation of a generic liquid chromatographic method development workflow: Application to the analysis of phytocannabinoids and Cannabis sativa extracts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 155, 116–124. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2018.03.059>
- Ferrer, I., & Thurman, E. M. (Earl M. (2020). Analysis of cannabis. *Comprehensive Analytical Chemistry*, 90.
- Gaoni, Y., & Mechoulam, R. (1964). Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *Journal of the American Chemical Society*, 86(8), 1646–1647. https://doi.org/10.1021/JA01062A046/ASSET/JA01062A046.FP.PNG_V03
- Garrido, R. G., Ribeiro, A. S. D., & de Moura Neto, R. S. (2013). Identificação e Vinculação Geográfica da Cannabis sativa: Ferramentas para Inteligência Policial. *Brazilian Journal of Forensic Sciences, Medical Law and Bioethics*, 2(2), 123–140. <https://doi.org/10.17063/BJFS2-2-Y2013123>
- Gul, W., Gul, S. W., Chandra, S., Lata, H., Ibrahim, E. A., & Elsohly, M. A. (2018). Detection and Quantification of Cannabinoids in Extracts of Cannabis sativa Roots Using LC-MS/MS. *Planta Medica*, 84(4), 267–271. <https://doi.org/10.1055/S-0044-100798>
- Gülck, T., & Möller, B. L. (2020). Phytocannabinoids: Origins and Biosynthesis. *Trends in Plant Science*, 25(10), 985–1004. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2020.05.005>
- 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>
- Hallmann-Mikołajczak, A. (2004). Ebers Papyrus. The book of medical knowledge of the 16th century B.C. Egyptians. *Archiwum historii i filozofii medycyny*, 67(1), 5–14.
- Hanuš, L. O., & Hod, Y. (2020). Terpenes/Terpenoids in Cannabis: Are They

- Important? *Medical Cannabis and Cannabinoids*, 3(1), 25.
<https://doi.org/10.1159/000509733>
- Hanuš, L. O., Meyer, S. M., Muñoz, E., Tagliatela-Scafati, O., & Appendino, G. (2016). Phytocannabinoids: a unified critical inventory. *Natural Product Reports*, 33(12), 1357–1392. <https://doi.org/10.1039/C6NP00074F>
- Harris, D. C. (2010). *Quantitative Chemical Analysis* (eighth). New York: W. H. Freeman and Company.
- Hartsel, J. A., Eades, J., Hickory, B., & Makriyannis, A. (2016). *Cannabis sativa and Hemp. Nutraceuticals: Efficacy, Safety and Toxicity*. Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802147-7.00053-X>
- Hillig, K. W., & Mahlberg, P. G. (2004a). A chemotaxonomic analysis of cannabinoid variation in Cannabis (Cannabaceae). *American Journal of Botany*, 91(6), 966–975. <https://doi.org/10.3732/AJB.91.6.966>
- Hillig, K. W., & Mahlberg, P. G. (2004b). A chemotaxonomic analysis of cannabinoid variation in Cannabis (Cannabaceae). *American Journal of Botany*, 91(6), 966–975. <https://doi.org/10.3732/AJB.91.6.966>
- Hou, J. P. (2012). The Development of Chinese Herbal Medicine and the Pen-ts'ao. [Http://Dx.Doi.Org/10.1142/S0147291777000192](http://Dx.Doi.Org/10.1142/S0147291777000192), 5(2), 117–122.
<https://doi.org/10.1142/S0147291777000192>
- Ibrahim, D., & Ghanem, A. (2018). Sub-2 µm Silica Particles in Chiral Separation. *New Uses of Micro and Nanomaterials*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.79063>
- Iffland, K., & Grotenhermen, F. (2017). An Update on Safety and Side Effects of Cannabidiol: A Review of Clinical Data and Relevant Animal Studies. <https://Home.Liebertpub.Com/Can>, 2(1), 139–154.
<https://doi.org/10.1089/CAN.2016.0034>
- Infarmed. (2021). Resumo das Características do Medicamento: Tilray. Retrieved September 29, 2022, from <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>
- Infarmed. (2022). Resumo das Características do Medicamento: Sativex. Retrieved September 28, 2022, from <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>
- International Cannabinoid Research Society. (2014). *24th Annual Symposium*. Baveno.
- Ji, B., Liu, S., He, X., Man, V. H., Xie, X. Q., & Wang, J. (2020). Prediction of the Binding Affinities and Selectivity for CB1 and CB2 Ligands Using Homology Modeling, Molecular Docking, Molecular Dynamics Simulations, and MM-PBSA Binding Free Energy Calculations. *ACS Chemical Neuroscience*, 11(8), 1139–1158. <https://doi.org/10.1021/ACSCHEMNEURO.9B00696>
- Jornal Oficial da União Europeia. (2013a). *REGULATION (EU) No 1307/2013*.
- Jornal Oficial da União Europeia. (2013b). *REGULATION (EU) No 1308/2013*.
- Jornal Oficial da União Europeia. (2015). REGULAMENTO (UE) 2015/ 2283 do Parlamento Europeu e do Conselho - de 25 de novembro de 2015 - relativo a novos alimentos, que altera o Regulamento (UE) n.º 1169/ 2011 do Parlamento Europeu

- e do Conselho e que revoga o Regulamento (CE) n.º 258/ 97 do Parla. *Jornal Oficial Da União Europeia*.
- Kew. (2022). Cannabaceae. Retrieved June 13, 2022, from <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:77126717-1#source-SP>
- Knight, G., Hansen, S., Connor, M., Poulsen, H., McGovern, C., & Stacey, J. (2010). The results of an experimental indoor hydroponic Cannabis growing study, using the ‘Screen of Green’ (ScrOG) method—Yield, tetrahydrocannabinol (THC) and DNA analysis. *Forensic Science International*, 202(1–3), 36–44. <https://doi.org/10.1016/J.FORSCIINT.2010.04.022>
- Lamarck, J. B., & Poiret, J. L. M. (1783). *Encyclopédie méthodique: botanique /Par m. le chevalier de Lamarck. Encyclopédie méthodique: botanique /Par m. le chevalier de Lamarck*. Paris, Liège : Panckoucke; Plomteux, . <https://doi.org/10.5962/bhl.title.824>
- Lazarjani, M. P., Young, O., Kebede, L., & Seyfoddin, A. (2021). Processing and extraction methods of medicinal cannabis: a narrative review. *Journal of Cannabis Research*, 3(1). <https://doi.org/10.1186/S42238-021-00087-9>
- Leghissa, A., Hildenbrand, Z. L., & Schug, K. A. (2017). A Review of Methods for the Chemical Characterization of Cannabis Natural Products. *Journal of Separation Science*, 41(1), 1–52. <https://doi.org/10.1002/jssc.201701003>
- Lindley, J., & Lindley, J. (1838). *Flora medica; a botanical account of all the more important plants used in medicine, in different parts of the world. Flora medica; a botanical account of all the more important plants used in medicine, in different parts of the world*. London: Longman, Orme, Brown, Green, and Longmans. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.19534>
- Linné, C. von, & Salvius, L. (1753). *Caroli Linnaei ... Species plantarum :exhibentes plantas rite cognitatas, ad genera relatas, cum differentiis specificis, nominibus trivialibus, synonymis selectis, locis natalibus, secundum systema sexuale digestas... Caroli Linnaei ... Species plantarum :exhibentes plantas rite cognitatas, ad genera relatas, cum differentiis specificis, nominibus trivialibus, synonymis selectis, locis natalibus, secundum systema sexuale digestas...* Holmiae: Impensis Laurentii Salvii. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.669>
- Lipnik-Štangelj, M., & Razinger, B. (2020). A regulatory take on cannabis and cannabinoids for medicinal use in the European Union. *Arhiv Za Higijenu Rada i Toksikologiju*, 71(1), 12–18. <https://doi.org/10.2478/aiht-2020-71-3302>
- Lumír, L., Ondřej, O., Hanuš, H., Meyer, S. M., Muñoz, E., Muñoz, M., ... Appendino, G. (2016). Phytocannabinoids: a unified critical inventory. *Natural Product Reports*, 33, 1347–1448. <https://doi.org/10.1039/c6np00074f>
- Luo, X., Reiter, M. A., D’Espaux, L., Wong, J., Denby, C. M., Lechner, A., ... Keasling, J. D. (2019). Complete biosynthesis of cannabinoids and their unnatural analogues in yeast. *Nature*, 567(7746), 123–126. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0978-9>
- Mandrioli, M., Tura, M., Scotti, S., & Gallina Toschi, T. (2019). Fast Detection of 10 Cannabinoids by RP-HPLC-UV Method in Cannabis sativa L. *Molecules*, 24(11),

2113. <https://doi.org/10.3390/molecules24112113>

- Martin-Santos, R., A. Crippa, J., Batalla, A., Bhattacharyya, S., Atakan, Z., Borgwardt, S., ... K. McGuire, P. (2012). Acute effects of a single, oral dose of d9-tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD) administration in healthy volunteers. *Current Pharmaceutical Design*, 18(32), 4966–4979. <https://doi.org/10.2174/138161212802884780>
- Martin, A. J. P., & Synge, R. L. M. (1941). A new form of chromatogram employing two liquid phases: A theory of chromatography. 2. Application to the micro-determination of the higher monoamino-acids in proteins. *Biochemical Journal*, 35(12), 1358. <https://doi.org/10.1042/BJ0351358>
- Mcpartland, J. M. (2018). Cannabis Systematics at the Levels of Family , Genus , and Species, 3, 203–212. <https://doi.org/10.1089/can.2018.0039>
- Mcpartland, J. M., & Small, E. (2020). A classification of endangered high-THC cannabis (Cannabis sativa subsp . indica) domesticates and their wild relatives, 112, 81–112. <https://doi.org/10.3897/phytokeys.144.46700>
- McPartland, J. M., & Small, E. (2020). A classification of endangered high-THC cannabis (Cannabis sativa subsp. indica) domesticates and their wild relatives: Supplementary File. *PhytoKeys*, 144, 81–112. <https://doi.org/10.3897/PHYTOKEYS.144.46700>
- Meehan-Atrash, J., & Rahman, I. (2022). Novel Δ^8 -Tetrahydrocannabinol Vaporizers Contain Unlabeled Adulterants, Unintended Byproducts of Chemical Synthesis, and Heavy Metals. *Chemical Research in Toxicology*, 35(1), 73–76. <https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMRESTOX.1C00388>
- Miller, J. M. (2009). *Chromatography : Concepts and Contrasts* (2nd ed.). New York: Wiley-Blackwell. Retrieved from <https://www.wiley.com/en-us/Chromatography%3A+Concepts+and+Contrasts%2C+2nd+Edition-p-9780470530252>
- Morimoto, S., Komatsu, K., Taura, F., & Shoyama, Y. (1997). Enzymological evidence for cannabichromenic acid biosynthesis. *Journal of Natural Products*, 60(8), 854–867. <https://doi.org/10.1021/NP970210Y/ASSET/IMAGES/LARGE/NP970210YF00004.JPEG>
- Nadal, X., del Río, C., Casano, S., Palomares, B., Ferreiro-Vera, C., Navarrete, C., ... Muñoz, E. (2017). Tetrahydrocannabinolic acid is a potent PPAR γ agonist with neuroprotective activity. *British Journal of Pharmacology*, 174(23), 4263–4276. <https://doi.org/10.1111/BPH.14019>
- 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>
- Nahar, L., Onder, A., & Sarker, S. D. (2020). A review on the recent advances in HPLC, UHPLC and UPLC analyses of naturally occurring cannabinoids (2010–2019). *Phytochemical Analysis*, 31(4), 413–457. <https://doi.org/10.1002/pca.2906>
- Namdar, D., Mazuz, M., Ion, A., & Koltai, H. (2018). Variation in the compositions of

- cannabinoid and terpenoids in *Cannabis sativa* derived from inflorescence position along the stem and extraction methods. *Industrial Crops and Products*, 113, 376–382. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2018.01.060>
- Nemeškalová, A., Hájková, K., Mikulů, L., Sýkora, D., & Kuchař, M. (2020). Combination of UV and MS/MS detection for the LC analysis of cannabidiol-rich products. *Talanta*, 219(June), 121250. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121250>
- Olejar, K. J., Hong, M., Lee, S.-Y., Kwon, T.-H., Lee, S.-U., Kinney, C. A., ... Park, S.-H. (2022). Ultrasonic-Assisted Extraction of Cannabidiolic Acid from Cannabis Biomass. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (183). <https://doi.org/10.3791/63076>
- Ordem dos Farmacêuticos. (2015). *Potencial Terapêuticos dos Canabinoides*. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD001324.pub4>
- Pavia, D. L., Lampman, G. M., Kriz, G. S., & Vyvyan, J. R. (2013). INTRODUCTION TO SPECTROSCOPY.
- Pollio, A. (2016). The Name of Cannabis: A Short Guide for Nonbotanists. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 1(1), 234. <https://doi.org/10.1089/CAN.2016.0027>
- Pourseyed 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(1). <https://doi.org/10.1186/s42238-020-00040-2>
- Pringle, H. (1997). Ice Age Communities May Be Earliest Known Net Hunters. *Science*, 277(5330), 1203–1204. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.277.5330.1203>
- Procuradoria-Geral Distrital de Lisboa. (2000). Lei n.º 30/2000, de 29 de Novembro. Retrieved July 7, 2022, from https://www.pgdlisboa.pt/leis/lei_mostra_articulado.php?nid=186&tabela=leis&so_miolo
- Procuradoria-Geral Distrital de Lisboa. (2021). Legislação do Combate à Droga. Retrieved September 29, 2022, from https://www.pgdlisboa.pt/leis/lei_mostra_articulado.php?nid=181&tabela=leis
- Rock, E. M., Sullivan, M. T., Pravato, S., Pratt, M., Limebeer, C. L., & Parker, L. A. (2020). Effect of combined doses of Δ 9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol or tetrahydrocannabinolic acid and cannabidiolic acid on acute nausea in male Sprague-Dawley rats. *Psychopharmacology*, 237(3), 901–914. <https://doi.org/10.1007/S00213-019-05428-4>
- Russo, E. (2005). Cannabis in India: ancient lore and modern medicine. *Cannabinoids as Therapeutics*, 1–22. https://doi.org/10.1007/3-7643-7358-X_1
- Russo, E. B., & Marcu, J. (2017). Cannabis Pharmacology: The Usual Suspects and a Few Promising Leads. In *Advances in Pharmacology* (Vol. 80, pp. 67–134). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2017.03.004>
- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2017). *Principles of Instrumental Analysis* (Seventh). Australia: Cengage Learning.
- Small, E., & Cronquist, A. (1976). A PRACTICAL AND NATURAL TAXONOMY

- FOR CANNABIS. *TAXON*, 25(4), 405–435. <https://doi.org/10.2307/1220524>
- Song, L., Valenzuela, G., Carlson, S., Dodson, Z., & Adisa, M. (2022). Potency testing of up to twenty cannabinoids by liquid chromatography diode array detector with optional electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 1207, 339827. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2022.339827>
- Swartz, M., & Swartz, M. (2010). HPLC DETECTORS : A BRIEF REVIEW, 6076. <https://doi.org/10.1080/10826076.2010.484356>
- Tahir, M. N., Shahbazi, F., Rondeau-Gagné, S., & Trant, J. F. (2021). The biosynthesis of the cannabinoids. *Journal of Cannabis Research* 2021 3:1, 3(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/S42238-021-00062-4>
- Tanney, C. A. S., Backer, R., Geitmann, A., & Smith, D. L. (2021). Cannabis Glandular Trichomes: A Cellular Metabolite Factory. *Frontiers in Plant Science*, 12, 1923. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2021.721986/BIBTEX>
- Taura, F., Sirikantaramas, S., Shoyama, Y., Shoyama, Y., & Morimoto, S. (2007). Phytocannabinoids in Cannabis sativa: Recent Studies on Biosynthetic Enzymes. *Chemistry & Biodiversity*, 4(8), 1649–1663. <https://doi.org/10.1002/CBDV.200790145>
- Thomsen, K. R., Lindholst, C., Thylstrup, B., Kvamme, S., Reitzel, L. A., Worm-Leonhard, M., ... Hesse, M. (2019). Changes in the composition of cannabis from 2000–2017 in Denmark: Analysis of confiscated samples of cannabis resin. *Experimental and Clinical Psychopharmacology*, 27(4), 402. <https://doi.org/10.1037/PHA0000303>
- UNODC. (2007). Multilingual Dictionary of Narcotic Drugs and Psychotropic Substances under International Control.
- UNODC. (2009a). *Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens*.
- UNODC. (2009b). *Recommended Methods for the Identification and Analysis of Cannabis and Cannabis Products*. United Nations Office on Drugs and Crime. Retrieved from <https://www.un-ilibrary.org/content/books/9789210555890>
- UNODC. (2013). *The International Drug Control Conventions*.
- UNODC. (2019). What are NPS? Retrieved January 3, 2021, from <https://www.unodc.org/LSS/Page/NPS>
- UNODC. (2022). *Recommended Methods for the IDENTIFICATION AND ANALYSIS OF CANNABIS AND CANNABIS PRODUCTS*. Vienna.
- Unschuld, P. U. (2010). *Medicine in china: A history of ideas (comparative studies of health systems and medical care)*. University of California Press. Retrieved from <https://www.ucpress.edu/book/9780520266131/medicine-in-china>
- Vasanth Rupasinghe, H. P., Davis, A., Kumar, S. K., Murray, B., & Zheljazkov, V. D. (2020). Industrial Hemp (Cannabis sativa subsp. sativa) as an Emerging Source for Value-Added Functional Food Ingredients and Nutraceuticals. *Molecules* 2020, Vol. 25, Page 4078, 25(18), 4078. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25184078>

- Vladimir-Knežević, S., Blažeković, B., Štefan, M. B., & Kindl, M. (2017). Phytochemical Aspects and Therapeutic Perspective of Cannabinoids in Cancer Treatment. *Natural Products and Cancer Drug Discovery*. <https://doi.org/10.5772/67746>
- Walsh, K. B., McKinney, A. E., & Holmes, A. E. (2021). Minor Cannabinoids: Biosynthesis, Molecular Pharmacology and Potential Therapeutic Uses. *Frontiers in Pharmacology*, 12. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2021.777804>
- Wang, M., Wang, Y. H., Avula, B., Radwan, M. M., Wanas, A. S., Mehmedic, Z., ... Khan, I. A. (2017). Quantitative Determination of Cannabinoids in Cannabis and Cannabis Products Using Ultra-High-Performance Supercritical Fluid Chromatography and Diode Array/Mass Spectrometric Detection. *Journal of Forensic Sciences*, 62(3), 602–611. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.13341>
- WHO. (2018). *Expert Committee on Drug Dependence Fortieth report*.
- Wollner, H. J., Hatchett, J. R., Levine, J., & Loewe, S. (1942). Isolation of a Physiologically Active Tetrahydrocannabinol from Cannabis Sativa Resin. *Journal of the American Chemical Society*, 64(1), 26–29. https://doi.org/10.1021/JA01253A008/ASSET/JA01253A008.FP.PNG_V03
- Wood, T. B., Spivey, W. T. N., & Easterfield, T. H. (1896). XL.—Charas. The resin of Indian hemp. *Journal of the Chemical Society, Transactions*, 69(0), 539–546. <https://doi.org/10.1039/CT8966900539>
- 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/TABLES/3>

Anexos

Otimização instrumental

Tabela A1- Resolução (Rs) obtida entre cada pico de composto analisado e o seguinte pico a surgir no cromatograma.

Composto	Rs
Phenprocoumon (PI)	
CBD	7,08
CBDA	1,89
CBN	6,63
Δ^9 -THC	4,71
Δ^8 -THC	1,01
Δ^9 -THCA	7,31

Desenho experimental: Escolha do solvente

Tabela A2 - Condições obtidas para a determinação do solvente extrator. Consta a ordem de análise, bem como a proporção de metanol, etanol e acetonitrilo (ACN) a utilizar em cada extração.

StdOrder	RunOrder	PtType	Blocks	Metanol	Etanol	ACN
1	1	1	1	1	0	0
9	2	-1	1	0,166667	0,666667	0,166667
4	3	2	1	0,5	0,5	0
8	4	-1	1	0,666667	0,166667	0,166667
7	5	0	1	0,333333	0,333333	0,333333
5	6	2	1	0,5	0	0,5
2	7	1	1	0	1	0
3	8	1	1	0	0	1
10	9	-1	1	0,166667	0,166667	0,666667
6	10	2	1	0	0,5	0,5

Contour plots



Figura A1- Contour plots obtidos para o CBD e CBDA.

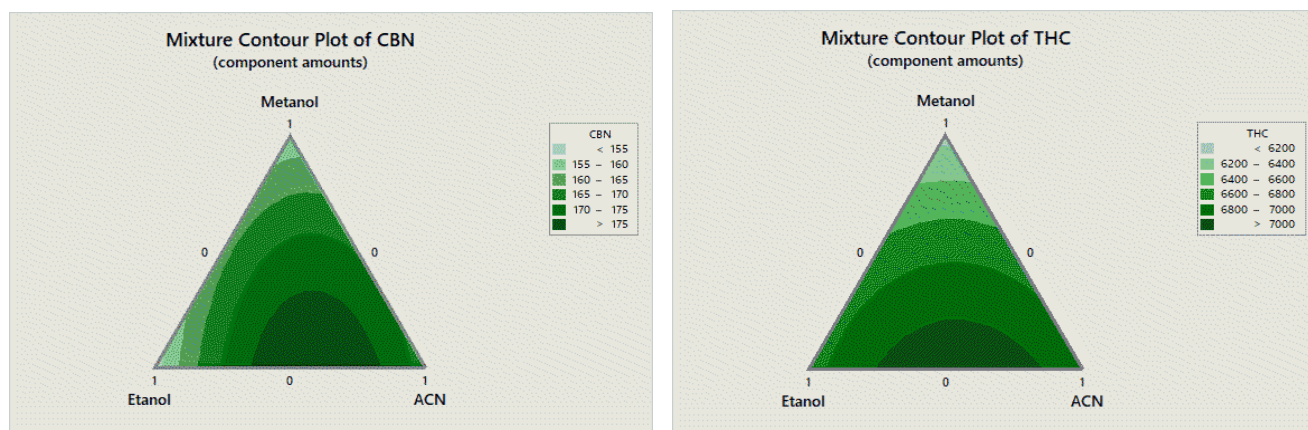


Figura A2- Countor plots obtidos para o CBN e Δ^9 -THC (THC).

Desenho experimental: Número de extrações, Volume e Tempo necessário

Tabela A3- Desenho experimental obtido, Desenho Fatorial Completo, para a determinação do volume de solvente, tempo necessário para a extração e número de extrações (N extrações).

StdOrder	RunOrder	PtType	Blocks	Volume	Tempo	N extrações
19	1	1	1	10	1	1
1	2	1	1	3	1	1
17	3	1	1	3	20	2
5	4	1	1	3	20	2
8	5	1	1	10	1	2
4	6	1	1	3	20	1
15	7	1	1	3	1	3
24	8	1	1	10	20	3
11	9	1	1	10	20	2
10	10	1	1	10	20	1
20	11	1	1	10	1	2
21	12	1	1	10	1	3
7	13	1	1	10	1	1
22	14	1	1	10	20	1
23	15	1	1	10	20	2
3	16	1	1	3	1	3
14	17	1	1	3	1	2
9	18	1	1	10	1	3
12	19	1	1	10	20	3
2	20	1	1	3	1	2
6	21	1	1	3	20	3
13	22	1	1	3	1	1
18	23	1	1	3	20	3
16	24	1	1	3	20	1

Tabela A4- Valores obtidos na análise dos resultados da otimização da extração, para cada canabinoide. Apenas o Volume apresenta um P-value inferior a 0,05, ou seja, é significativo.

General Factorial Regression: 9THC versus Volume; Tempo; Nr de extr

Factor Information

Factor	Levels	Values
Volume	2	3; 10
Tempo	2	1; 20
Nr de extr	3	1; 2; 3

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	11	432943	39358	1,01	0,492
Linear	4	400952	100238	2,56	0,092
Volume	1	381320	381320	9,76	0,009
Tempo	1	12414	12414	0,32	0,583
Nr de extr	2	7218	3609	0,09	0,912
2-Way Interactions	5	11861	2372	0,06	0,997
Volume*Tempo	1	2611	2611	0,07	0,800
Volume*Nr de extr	2	8518	4259	0,11	0,898
Tempo*Nr de extr	2	731	365	0,01	0,991
3-Way Interactions	2	20130	10065	0,26	0,777
Volume*Tempo*Nr de extr	2	20130	10065	0,26	0,777
Error	12	469054	39088		
Total	23	901996			

General Factorial Regression: CBN versus Volume; Tempo; Nr de extr

Factor Information

Factor	Levels	Values
Volume	2	3; 10
Tempo	2	1; 20
Nr de extr	3	1; 2; 3

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	11	548,59	49,872	1,00	0,494
Linear	4	452,33	113,081	2,28	0,121
Volume	1	423,87	423,873	8,54	0,013
Tempo	1	23,86	23,858	0,48	0,501
Nr de extr	2	4,60	2,298	0,05	0,955
2-Way Interactions	5	71,92	14,384	0,29	0,910
Volume*Tempo	1	1,82	1,816	0,04	0,852
Volume*Nr de extr	2	68,89	34,444	0,69	0,519
Tempo*Nr de extr	2	1,22	0,608	0,01	0,988
3-Way Interactions	2	24,34	12,172	0,25	0,786
Volume*Tempo*Nr de extr	2	24,34	12,172	0,25	0,786
Error	12	595,90	49,658		
Total	23	1144,49			

General Factorial Regression: CBDA versus Volume; Tempo; Nr de extr

Factor Information

Factor	Levels	Values
Volume	2	3; 10
Tempo	2	1; 20
Nr de extr	3	1; 2; 3

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	11	403948	36723	1,09	0,442
Linear	4	354264	88566	2,62	0,088
Volume	1	329240	329240	9,73	0,009
Tempo	1	7346	7346	0,22	0,650
Nr de extr	2	17679	8839	0,26	0,774
2-Way Interactions	5	19517	3903	0,12	0,987
Volume*Tempo	1	8644	8644	0,26	0,622
Volume*Nr de extr	2	9197	4598	0,14	0,874
Tempo*Nr de extr	2	1677	838	0,02	0,976
3-Way Interactions	2	30166	15083	0,45	0,650
Volume*Tempo*Nr de extr	2	30166	15083	0,45	0,650
Error	12	405907	33826		
Total	23	809855			

General Factorial Regression: 9THCA versus Volume; Tempo; Nr de extr

Factor Information

Factor	Levels	Values
Volume	2	3; 10
Tempo	2	1; 20
Nr de extr	3	1; 2; 3

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	11	90014217	8183111	1,12	0,420
Linear	4	79993390	19998348	2,75	0,078
Volume	1	77552074	77552074	10,66	0,007
Tempo	1	923610	923610	0,13	0,728
Nr de extr	2	1517706	758853	0,10	0,902
2-Way Interactions	5	3388945	677789	0,09	0,992
Volume*Tempo	1	1018508	1018508	0,14	0,715
Volume*Nr de extr	2	2302642	1151321	0,16	0,855
Tempo*Nr de extr	2	67795	33898	0,00	0,995
3-Way Interactions	2	6631882	3315941	0,46	0,645
Volume*Tempo*Nr de extr	2	6631882	3315941	0,46	0,645
Error	12	87336868	7278072		
Total	23	177351084			

General Factorial Regression: CBD versus Volume; Tempo; Nr de extr

Factor Information

Factor	Levels	Values
Volume	2	3; 10
Tempo	2	1; 20
Nr de extr	3	1; 2; 3

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	11	2784,88	253,17	0,98	0,511
Linear	4	2471,06	617,77	2,39	0,109
Volume	1	2394,54	2394,54	9,25	0,010
Tempo	1	6,72	6,72	0,03	0,875
Nr de extr	2	69,80	34,90	0,13	0,875
2-Way Interactions	5	155,87	31,17	0,12	0,985
Volume*Tempo	1	37,43	37,43	0,14	0,710
Volume*Nr de extr	2	87,86	43,93	0,17	0,846
Tempo*Nr de extr	2	30,58	15,29	0,06	0,943
3-Way Interactions	2	157,95	78,97	0,31	0,743
Volume*Tempo*Nr de extr	2	157,95	78,97	0,31	0,743
Error	12	3105,41	258,78		
Total	23	5890,30			

Validação do método

Tabela A5- Homocedasticidade. Ftab e Fcalc para cada canabinoide.

	Var1	Var2	Fcalc	Ftab
CBD	4,39E-07	9,89E-05	0,0044	19,00
CBDA	8,51E-07	2,12E-05	0,0401	19,00
CBN	2,44E-06	0,000361	0,0068	19,00
Δ^9 -THC	5,41E-07	2,08E-05	0,0260	19,00
Δ^8 -THC	9,21E-07	1,08E-05	0,0852	19,00
Δ^9 -THCA	7,33E-07	0,002796	0,0003	19,00

Gráficos de resíduos

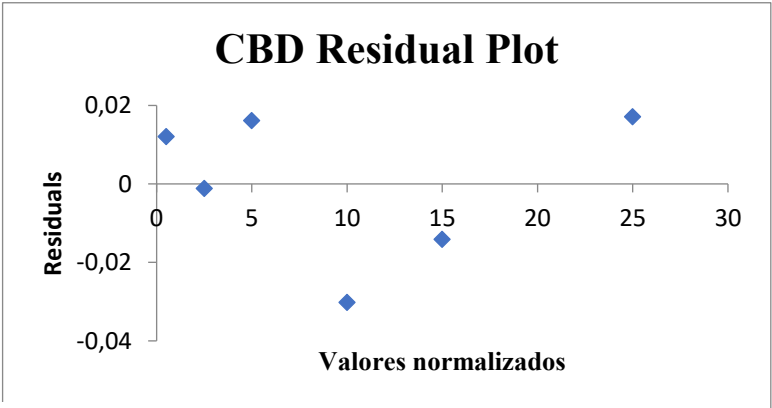


Figura A3 - Gráfico de resíduos para o CBD.

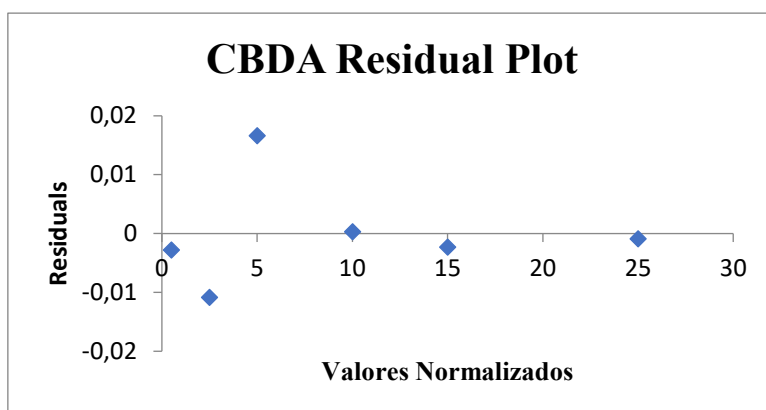


Figura A4 -Gráfico de resíduos para o CBDA.

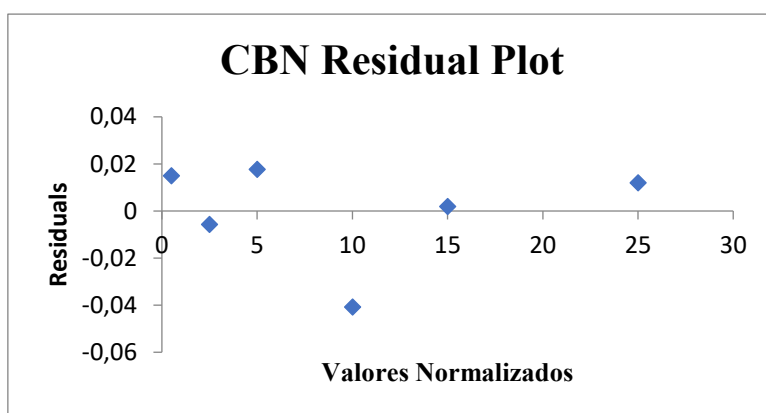


Figura A5 - Gráfico de resíduos para o CBN.

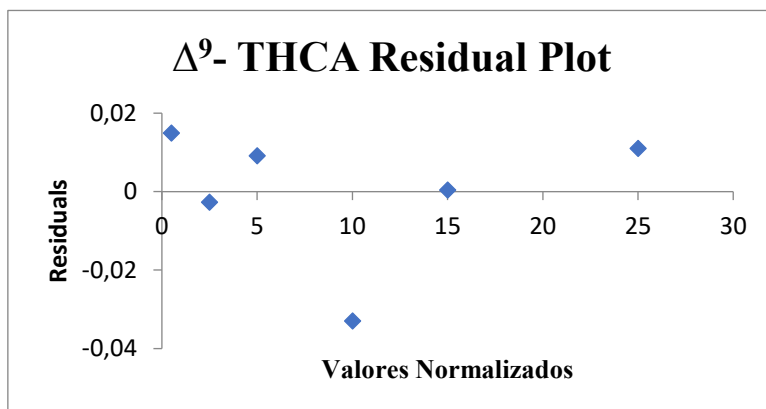


Figura A6 - Gráfico de resíduos para o Δ^9 -THCA.

Goodness-of-fit (GoF)

Tabela A6- Teste estatístico Goodness-of-fit. Constam os Fcalculados e os Ftabelados para cada composto analisado.

	Fcalc	Ftab
CBD	0,43	9,55
CBDA	0,45	9,55
CBN	0,41	9,55
Δ^9 -THC	0,40	9,55
Δ^8 -THC	0,42	9,55
Δ^9 -THCA	0,22	9,55

Tabela A7 - Estabilidade. Valores obtidos para a mistura padrão dos 6 canabinoides a 10 µg/mL, nos ensaios de estabilidade apresentados no gráfico S. O RSD apresentado foi calculado entre as áreas normalizadas do primeiro dia (19.07.2022) e último (20.09.2022)

Mix10st	19.07.2022		Mix10st	26.07.2022		Mix10st	02.08.2022
	ANormal			ANormal			ANormal
PI			PI			PI	
CBD	0,46977		CBD	0,470993		CBD	0,467644
CBDA	0,297989		CBDA	0,292251		CBDA	0,299934
CBN	0,612098		CBN	0,620498		CBN	0,614294
Δ^9 -THC	0,247971		Δ^9 -THC	0,248885		Δ^9 -THC	0,249029
Δ^8 -THC	0,205713		Δ^8 -THC	0,207789		Δ^8 -THC	0,209271
Δ^9 -THCA	0,40272		Δ^9 -THCA	0,399465		Δ^9 -THCA	0,400655

Mix10st	13.09.2022			Mix10st	20.09.2022			
	A	ANormal			A	ANormal		
PI	961,707			PI	993,186			RSD
CBD	452,825	0,470855		CBD	465,302	0,468494		0,19%
CBDA	289,787	0,301326		CBDA	296,971	0,299008		0,24%
CBN	598,337	0,622161		CBN	622,574	0,626845		1,68%
Δ^9 -THC	244,827	0,254575		Δ^9 -THC	242,149	0,24381		1,20%
Δ^8 -THC	200,963	0,208965		Δ^8 -THC	208,215	0,209644		1,34%
Δ^9 -THCA	393,376	0,409039		Δ^9 -THCA	393,418	0,396117		1,17%

Tabela A8- Atribuição do quimiotipo com base na fórmula utilizada, comparando com a fórmula sugerida por (Mandrioli et al., 2019). Amostras em que o cálculo não é possível pela não detecção de canabinoide (A4) e ainda no caso dos óleos de cânabís, consta N.A (Não Aplicável).

Amostras	CBD	CBDA	CBN	$\Delta 9$ -THC	$\Delta 9$ -THCA	THCT+CBN/CBDT		THCA/CBDA	
						Cálculo	Classificação	Cálculo	Classificação
A1	0,03%	2,38%	1,48%	11,81%	0,45%	5,690754	Drug	0,189825	Industrial
A2	0,05%	2,22%	0,69%	2,23%	8,61%	5,082508	Drug	3,87411	Drug
A3	0,04%	0,48%	0,02%	0,81%	17,43%	35,65388	Drug	36,57774	Drug
A4	0,02%	-	0,86%	0,07%	0,45%	78,38156	Drug	N.A	N.A
A5	7,87%	2,02%	0,02%	0,19%	0,25%	0,046894	Industrial	0,125082	Industrial
A6	0,08%	1,38%	0,04%	1,98%	13,63%	10,71526	Drug	9,878078	Drug
A7	0,04%	0,78%	0,09%	2,26%	7,94%	12,44659	Drug	10,15445	Drug
A8	0,04%	0,74%	0,02%	6,68%	12,18%	24,17816	Drug	16,4715	Drug
A9	7,36%	2,33%	-	0,20%	0,15%	0,036083	Industrial	0,064406	Industrial
A10	1,32%	5,69%	-	0,05%	0,05%	0,013136	Industrial	0,007957	Industrial
A11	13,58%	1,87%	-	0,21%	0,60%	0,052613	Industrial	0,320754	Industrial
A12	9,93%	2,68%	-	0,28%	0,26%	0,04266	Industrial	0,095822	Industrial
A13	2,68%	1,12%	-	0,11%	0,06%	0,044318	Industrial	0,054969	Industrial
A14	2,72%	1,85%	-	0,12%	0,06%	0,039095	Industrial	0,034271	Industrial
A15	3,89%	7,38%	0,03%	0,30%	0,05%	0,034106	Industrial	0,00638	Industrial
B1	-	2,59%	0,01%	0,11%	-	N.A	N.A	N.A	N.A
B2	0,03%	3,78%	0,08%	0,02%	-	N.A	N.A	N.A	N.A

Teste colorimétrico



Figura A7- Branco do teste colorimétrico Fast Blue BB, feito com lúpulo. Pode ser observado que não ocorreu reação, não apresentando cor.