



**Universidade de Aveiro**  
**Ano 2019/2020**

Departamento de Química

**Joana Gomes  
Ferreira**

**Avaliação de casos positivos para canabinóides,  
incluindo CBD**

**Evaluation of positive cases for cannabinoids,  
including CBD**



Universidade de Aveiro  
Ano 2019/2020

Departamento de Química

**Joana Gomes  
Ferreira**

**Avaliação de casos positivos para canabinóides,  
incluindo CBD**

**Evaluation of positive cases for cannabinoids,  
including CBD**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, especialização em Bioquímica Clínica, realizada sob orientação científica do Doutor André Alexandre Lobo Lopes de Castro, Especialista Superior de Medicina Legal do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P. Delegação do Norte, e do Professor Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues, Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.



Dedico este trabalho aos meus pais e à minha irmã. Por todo o vosso apoio incondicional.

## **O júri**

Presidente

**Doutora Rita Maria Pinto Ferreira**

Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Doutor André Alexandre Lobo Lopes de Castro**

Especialista Superior de Medicina Legal do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P. Delegação do Norte

**Doutora Helena Maria de Sousa Ferreira e Teixeira**

Professora Auxiliar Convidada da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

## **Agradecimentos**

O desenvolvimento deste trabalho foi, sem sombra de dúvidas, o maior desafio da minha vida. Como sempre, tive a sorte de ter comigo pessoas que tornaram este ano mais tranquilo, às quais que não posso deixar de agradecer.

Agradeço a toda a equipa do SQTF-N por toda a disponibilidade e entreaajuda demonstrada desde o início.

Agradeço especialmente à Engenheira Sónia Tarelho e ao Doutor André Castro pelo empenho, disponibilidade, compreensão, ensinamentos e confiança, mesmo quando eu própria não a tive. Vou guardar com carinho todos os vossos conselhos.

Agradeço também ao Professor Pedro Domingues pela exigência, paciência e disponibilidade que foram determinantes para a conclusão deste trabalho.

Obrigada aos meus pais por sempre acreditarem em mim e por me terem dado todo o apoio que necessitei.

Por fim, obrigada à minha irmã. Por seres a minha fã número 1 e por nunca teres duvidado de mim, a tua “machine”.

## Palavras-Chave

Canabidiol,  $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol, 11-hidroxi- $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol, 11-nor-9-carboxi- $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol, Patologia Forense, Clínica Forense, Fiscalização pela Autoridade de Segurança Rodoviária, Análise Estatística, Análise Descritiva

## Resumo

O Canabidiol (CBD) e o  $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol ( $\Delta$ 9-THC) são duas moléculas lipofílicas da classe dos fitocannabinóides presentes na planta *Cannabis sativa*. Alegadamente, o CBD é a molécula da planta com mais propriedades terapêuticas, um tema atual e de grande controvérsia, não sendo, no entanto, uma substância ilícita com efeitos psicoativos. Por outro lado, o  $\Delta$ 9-THC, apesar de também apresentar potencial terapêutico, provoca efeitos psicoativos. Recentemente, em Portugal e noutros países, ficaram disponíveis no mercado produtos e medicamentos à base de CBD e/ou de  $\Delta$ 9-THC. Desta forma, são necessários estudos que explorem certos fatores, parâmetros e substâncias que possam interagir com ambas as moléculas ou influenciar as concentrações destas. Neste trabalho, após uma revisão bibliográfica relevante para a temática, foram analisadas descritivamente e estatisticamente amostras com concentrações de CBD, de  $\Delta$ 9-THC e dos seus dois principais metabolitos, o 11-hidroxi- $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol (11-OH-THC) e o 11-nor-9-carboxi- $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol (THC-COOH). Na estatística foram explorados alguns parâmetros como a idade, a presença ou ausência de substâncias medicamentosas e acidentes de viação fatais e não fatais. Paralelamente, verificaram-se possíveis correlações entre os cannabinóides presentes nas amostras *post mortem*, de clínica forense e da fiscalização pela autoridade de segurança rodoviária. Na análise descritiva, as amostras de cannabinóides foram divididas em três grupos dependendo da sua natureza, nomeadamente amostras *post mortem*, amostras de clínica forense e amostras de fiscalização rodoviária. Estas amostras foram interpretadas num contexto forense e, em algumas situações, foram formuladas possíveis interações entre os cannabinóides e outras substâncias presentes nas amostras. Estatisticamente, não houve diferenças significativas entre a idade dos consumidores e a concentração de cannabinóides no sangue de amostras *post mortem*. Contudo, o  $\Delta$ 9-THC apresentou diferenças significativas entre a presença e a ausência de substâncias medicamentosas e também entre os grupos de casos em que os acidentes de viação foram fatais e não fatais. Além disso, nas amostras *post mortem*, apenas estiveram correlacionados os cannabinóides  $\Delta$ 9-THC e 11-OH-THC e 11-OH-THC e THC-COOH, nas amostras relativas à clínica forense os cannabinóides CBD e 11-OH-THC e CBD e THC-COOH e, finalmente, nas amostras de autoridade de segurança rodoviária apenas os cannabinóides  $\Delta$ 9-THC e THC-COOH. Em relação à análise descritiva, foram desenvolvidas várias hipóteses, nomeadamente a possível inibição das enzimas do Citocromo P450 quando o CBD e o  $\Delta$ 9-THC são consumidos simultaneamente com o midazolam, o diazepam e a fluvoxamina, o consumo de cânabis agravar a progressão de doenças como a Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA) e a tuberculose e o consumo isolado de cânabis rico em  $\Delta$ 9-THC, o consumo simultâneo de cânabis e de álcool e o consumo também simultâneo de cânabis, álcool e cocaína instigar acidentes de viação. Também foram colocadas as hipóteses da improbabilidade do consumo de 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) inibir o metabolismo de cannabinóides e vice-versa, o consumo de cânabis rico em  $\Delta$ 9-THC por uma criança de 1 ano ser accidental e por fim, que o consumo de cânabis rico em CBD também por parte de uma criança de 2 anos ser contínuo e com propósitos meramente terapêuticos. Concluindo, este estudo permitiu gerar hipóteses a ser testadas em estudos no futuro, uma vez que no nosso estudo o tamanho total das amostras é baixo e não significativo.

## Keywords

Cannabidiol,  $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol, 11-hydroxy- $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol, 11-nor-9-carboxy- $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol, Forensic Pathology, Forensic Clinic, Fiscalization by the Road Safety Authority, Statistical Analysis, Descriptive Analysis

## Abstract

Cannabidiol (CBD) and  $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol ( $\Delta$ 9-THC) are two lipophilic molecules of the phytocannabinoid class present in the *Cannabis sativa* plant. Allegedly, CBD is the plant molecule with the most therapeutic properties, a current and highly controversial topic, however, it is not an illicit substance with psychoactive effects. On the other hand,  $\Delta$ 9-THC, despite also having therapeutic potential, causes psychoactive effects. Recently, in Portugal and in other countries, CBD and / or  $\Delta$ 9-THC products and medicines became available on the market. Thus, studies are needed to explore certain factors, parameters and substances that can interact with both molecules or influence their concentrations. In this work, after a literature review relevant to the topic, samples with concentrations of CBD,  $\Delta$ 9-THC and its two main metabolites, 11-hydroxy- $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol (11-OH-THC) and 11-nor-9-carboxy- $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol (THC-COOH) were descriptively and statistically analyzed. In the statistics, some parameters were explored, such as age, the presence or absence of medicated substances and fatal and non-fatal road accidents. In parallel, there were verify possible correlations between the cannabinoids present in the *post mortem* samples, from the forensic clinic and from the fiscalization by the road safety authority. In the descriptive analysis, the cannabinoid samples were divided into three groups depending on their nature, namely *post mortem* samples, samples from forensic clinic and samples from road enforcement. These samples were evaluated in a forensic context and, in some situations, possible interactions between cannabinoids and other substances present in the samples were formulated. Statistically, there were no significant differences between the age of consumers and the concentration of cannabinoids in the blood of *post mortem* samples. However,  $\Delta$ 9-THC showed significant differences between the presence and absence of medicinal substances and also between groups of cases in which road accidents were fatal and non-fatal. In addition, in the *post mortem* samples, only the cannabinoids  $\Delta$ 9-THC and 11-OH-THC and 11-OH-THC and THC-COOH were correlated, in the samples related to the forensic clinic the cannabinoids CBD and 11-OH-THC and CBD and THC-COOH and, finally, in the road safety authority samples only cannabinoids  $\Delta$ 9-THC and THC-COOH. Regarding the descriptive analysis, several hypotheses have been developed, namely the possible inhibition of Cytochrome P450 enzymes when CBD and  $\Delta$ 9-THC are consumed simultaneously with midazolam, diazepam and fluvoxamine, the consumption of cannabis aggravate the progression of diseases as the Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) and tuberculosis and the isolated consumption of cannabis rich in  $\Delta$ 9-THC, the simultaneous consumption of cannabis and alcohol and the simultaneous consumption of cannabis, alcohol and cocaine to instigate road accidents. The hypothesis of the improbability of the consumption of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) to inhibit the metabolism of cannabinoids and vice versa, the consumption of cannabis rich in  $\Delta$ 9-THC by a 1 year old child was accidental and, finally, that the consumption of cannabis rich in CBD by a 2 year old child is continuous and for purely therapeutic purposes. In conclusion, this study allowed us to generate hypotheses to be tested in future studies, since in our study the total sample size is low and not significant.

## Lista de abreviaturas

<b><math>\Delta</math>9-THC</b>	$\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol
<b>2-AG</b>	2-araquidonoilglicerol
<b>5-HT<sub>1A</sub></b>	5-hidroxitriptamina 1A
<b>6<math>\alpha</math>-OH-CBD</b>	6 $\alpha$ -hidroxicanabidiol
<b>6<math>\beta</math>-OH-CBD</b>	6 $\beta$ -hidroxicanabidiol
<b>7-OH-CBD</b>	7-hidroxicanabidiol
<b>11-OH-THC</b>	11-hidroxi- $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol
<b>AEA</b>	Anandamida
<b>APCI</b>	Ionização Química por Pressão Atmosférica
<b>AVC</b>	Acidente Vascular Cerebral
<b>BSTFA</b>	N, O-bissililtrifluoroacetamida
<b>CB1</b>	Recetor Canabinóide tipo 1
<b>CB2</b>	Recetor Canabinóide tipo 2
<b>CBC</b>	Canabicromeno
<b>CBCA</b>	Ácido Canabicroménico
<b>CBD</b>	Canabidiol
<b>CBDA</b>	Ácido Canabidiólico
<b>CBG</b>	Canabigerol
<b>CBGA</b>	Ácido Canabigerólico
<b>CBN</b>	Canabinol
<b>CBNA</b>	Ácido Canabinólico
<b>CBDV</b>	Canabidivarina
<b>CYP1A2</b>	Citocromo P450 1A2
<b>CYP2C9</b>	Citocromo P450 2C9
<b>CYP2C19</b>	Citocromo P450 2C19
<b>CYP2B6</b>	Citocromo P450 2B6
<b>CYP2D6</b>	Citocromo P450 2D6
<b>CYP3A4</b>	Citocromo P450 3A4
<b>CYP3A5</b>	Citocromo P450 3A5
<b>CYP450</b>	Citocromo P450
<b>DAD</b>	<i>Diode Array Detector</i>
<b>ECS</b>	Sistema Endocannabinóide

<b>EI</b>	Impacto Eletrónico
<b>ESI</b>	Ionização por <i>Electrospray</i>
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>FAAH</b>	Hidrolase de Amidas de Ácidos Gordos
<b>FID</b>	Detetor de Ionização de Chama
<b>GC</b>	Cromatografia Gasosa
<b>GC-FID</b>	Cromatografia Gasosa associada a Deteção por Ionização de Chama
<b>GC-MS</b>	Cromatografia Gasosa associada a Deteção por Espectrometria de Massa
<b>GC-MS/MS</b>	Cromatografia Gasosa associada a Deteção por Espectrometria de Massa em <i>tandem</i>
<b><sup>1</sup>H NMR</b>	Ressonância Magnética Nuclear de Protões
<b>HPLC</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<b>HPLC-MS</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência associada a Deteção por Espectrometria de Massa
<b>HS-GS/FID</b>	<i>Headspace Gas Chromatography with Flame Ionization Detection</i>
<b>INMLCF, I.P</b>	Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, Instituto Público
<b>IMS</b>	Espectrometria por Mobilidade Iónica
<b>LC</b>	Cromatografia Líquida
<b>LC-MS</b>	Cromatografia Líquida associada a Deteção por Espectrometria de Massa
<b>LLE</b>	Extração Líquido-Líquido
<b>MAGL</b>	Lipase de Monoacilglicerol
<b>MDA</b>	3,4-metilenodioxianfetamina
<b>MDMA</b>	3,4-metilenodioximetanfetamina
<b>MS</b>	Espectrometria de Massa
<b>MS/MS</b>	Espectrometria de Massa em <i>tandem</i>
<b>MSTFA</b>	N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida
<b>QQQ</b>	Triplo Quadrupolo
<b>SFE</b>	Extração por Fluídos Supercríticos
<b>SIDA</b>	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
<b>SLE</b>	Extração Sólido-Líquido
<b>SPE</b>	Extração em Fase Sólida
<b>SQTF-N</b>	Serviço de Química e Toxicologia Forenses, Delegação do Norte
<b>THCA</b>	Ácido Tetrahydrocannabinólico

<b>THC-COOH</b>	11-nor-9-carboxi- $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol
<b>THCV</b>	Tetrahydrocannabivarina
<b>TMCS</b>	Trimetilclorosilano
<b>TRPV1</b>	<i>Transient Receptor Potential Vanilloid 1</i>
<b>UGT1A4</b>	UDP-glucuronosiltransferase 1A4
<b>UGT2B7</b>	UDP-glucuronosiltransferase 2B7
<b>UGT2B15</b>	UDP-glucuronosiltransferase 2B15
<b>UHPLC</b>	Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência
<b>UHPSFC</b>	Cromatografia por Fluidos Supercríticos de Ultra Alta Eficiência
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>VIH</b>	Vírus da Imunodeficiência Humana
<b>QQQ</b>	Triplo Quadrupolo

## Índice

Índice de Tabelas .....	i
Índice de Figuras .....	ii
1. Introdução .....	1
1.1. Toxicologia Forense .....	1
1.1. <i>Cannabis sativa</i> .....	3
1.2.1. Metabolismo do canabidiol (CBD) e do $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol ( $\Delta$ 9-THC) ....	5
1.2.2. Utilização terapêutica de canabinóides e efeitos adversos .....	10
1.2.3. Contexto regulatório e legal das substâncias .....	13
1.3. Consumo simultâneo de canábis e de substâncias medicamentosas .....	14
1.4. Canábis na condução .....	17
1.5. Determinação analítica do CBD e de outros fitocannabinóides .....	19
1.5.1. Métodos de extração .....	20
1.5.2. Métodos analíticos .....	22
1.5.2.1. Derivatização de canabinóides ácidos para análise utilizando GC/MS..	24
1.6. Objetivos .....	25
2. Métodos .....	27
3. Resultados e Discussão .....	29
3.1. Análise estatística .....	29
3.1.1. Influência da idade na concentração de canabinóides no sangue .....	29
3.1.2. Influência do consumo de medicamentos na concentração de canabinóides no sangue .....	31
3.1.3. Influência da concentração de canabinóides no sangue e acidentes fatais. ....	35
3.1.4. Avaliação das concentrações de canabinóides e seus metabolitos no sangue em amostras <i>post mortem</i> .....	37
3.1.5. Avaliação das concentrações de canabinóides e seus metabolitos no sangue em amostras de clínica forense .....	40
3.1.6. Avaliação das concentrações de canabinóides e seus metabolitos no sangue em amostras da autoridade de segurança rodoviária .....	42
3.2. Análise descritiva .....	46
3.2.1. Consumo de canábis em amostras <i>post mortem</i> .....	46
3.2.1.1. Amostras com presença de substâncias medicamentosas .....	48
3.2.1.2. Amostras de indivíduos com patologias associadas .....	51
3.2.2. Consumo de canábis e o seu impacto em acidentes de viação .....	54

3.2.2.1. Acidentes de viação fatal .....	55
3.2.2.2. Acidentes de viação não fatal .....	56
3.2.3. Consumo de canábis em amostras de clínica forense.....	59
4. Conclusão .....	65
5. Bibliografia .....	69

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b> Visão geral de métodos analíticos validados para a quantificação de CBD e outros fitocanabinóides em várias matrizes, nos últimos 6 anos.....	21
<b>Tabela 2</b> Descrição da idade, do género, das concentrações dos canabinóides CBD, THC, 11-OH-THC e THC-COOH e etanol, origem da amostra, da causa de morte, de substâncias medicamentosas e patologias de indivíduos, em amostras recolhidas de patologia forense, de clínica forense e da autoridade de segurança rodoviária de casos referentes a 2019 e incluídos neste estudo .....	28
<b>Tabela 3:</b> Estatística descritiva dos canabinóides CBD, THC, 11-OH-THC e THC-COOH, segundo a idade dos indivíduos, em amostras <i>post mortem</i> .....	30
<b>Tabela 4:</b> Estatística descritiva dos canabinóides CBD, THC, 11-OH-THC e THC-COOH, segundo a presença ou ausência de pelo menos uma substância medicamentosa, em amostras recolhidas <i>post mortem</i> .....	32
<b>Tabela 5:</b> Estatística descritiva dos canabinóides CBD, THC, 11-OH-THC e THC-COOH, segundo a fatalidade do acidente, em amostras recolhidas <i>post mortem</i> e da autoridade de segurança rodoviária.....	36
<b>Tabela 6:</b> Estatística descritiva dos canabinóides CBD, THC, 11-OH-THC e THC-COOH em 16 amostras recolhidas <i>post mortem</i> .....	38
<b>Tabela 7:</b> Estatística descritiva dos canabinóides CBD, THC, 11-OH-THC e THC-COOH em 5 amostras de clínica forense .....	41
<b>Tabela 8:</b> Estatística descritiva dos canabinóides CBD, THC, 11-OH-THC e THC-COOH em 3 amostras da autoridade de segurança rodoviária.....	43
<b>Tabela 9:</b> Descrição da idade, do género, das concentrações dos canabinóides CBD, THC, 11-OH-THC e THC-COOH e etanol, da causa de morte e de substâncias medicamentosas, segundo casos positivos para substâncias medicamentosas, em amostras recolhidas <i>post mortem</i> .....	49
<b>Tabela 10:</b> Descrição da idade, do género, das concentrações dos canabinóides CBD, THC, 11-OH-THC e THC-COOH e etanol e patologias dos indivíduos, em amostras recolhidas <i>post mortem</i> .....	53
<b>Tabela 11:</b> Descrição da idade, do género e das concentrações dos canabinóides CBD, THC, 11-OH-THC e THC-COOH e etanol, em acidentes de viação fatais, em amostras recolhidas <i>post mortem</i> .....	55

**Tabela 12:** Descrição da idade, do género, das concentrações dos canabinóides CBD, THC, 11-OH-THC e THC-COOH e etanol e de outras substâncias psicotrópicas, em amostras originárias de fiscalização da autoridade de segurança rodoviária ..... 57

**Tabela 13:** Descrição da idade, do género, das concentrações dos canabinóides CBD, THC, 11-OH-THC e THC-COOH e etanol e de outras substâncias psicotrópicas, em amostras pertencentes à clínica forense ..... 60

## Índice de Figuras

<b>Figura 1:</b> Vias biossintéticas dos canabinóides THCA, CBDA, CBGA, THC, CBD e CBD a partir do canabinóide CBGA nos tecidos da <i>Cannabis sativa</i> (Adaptada de 13)	4
<b>Figura 2:</b> Vias metabólicas do CBD pelas isoformas do CYP450 e os seus principais metabolitos (Adaptada de 27).....	6
<b>Figura 3:</b> Vias metabólicas do $\Delta^9$ -THC pelas isoformas do CYP450 e os seus principais metabolitos (Adaptada de 21) .....	7
<b>Figura 4:</b> Representação do teste t de student para 14 amostras <i>post mortem</i> das variáveis CBD (a), THC (b), 11-OH-THC (c) e THC-COOH (d), segundo a idade .....	30
<b>Figura 5:</b> Representação do teste t de student das 16 amostras <i>post mortem</i> das variáveis CBD (a), THC (b), 11-OH-THC (c) e THC-COOH (d), segundo a presença ou ausência de pelo menos uma substância medicamentosa .....	33
<b>Figura 6:</b> Representação do teste Mann-Whitney para CBD (a) e do teste t de student para THC (b), 11-OH-THC (c) e THC-COOH (d) das 6 amostras <i>post mortem</i> e das 3 amostras da autoridade de segurança rodoviária, segundo a fatalidade do acidente	36
<b>Figura 7:</b> Representação do teste correlação de Pearson das 16 amostras <i>post mortem</i> das variáveis 11-OH-THC e THC-COOH (a), das variáveis 11-OH-THC e THC (b), das variáveis THC e CBD (c), das variáveis THC-COOH e CBD (d), das variáveis 11-OH-THC e CBD (e) e das variáveis THC-COOH e THC (f).....	39
<b>Figura 8:</b> Representação do teste correlação de Pearson das 5 amostras clínica forense das variáveis CBD e 11-OH-THC (a), das variáveis CBD e 11-OH-THC (b), das variáveis THC e CBD (c), das variáveis THC-COOH e 11-OH-THC (d), das variáveis THC-COOH e THC (e) e das variáveis 11-OH-THC e THC (f).....	41
<b>Figura 9:</b> Representação do teste correlação de Pearson das 3 amostras da autoridade de segurança rodoviária das variáveis THC-COOH e THC (a), das variáveis THC e 11-OH-THC (b), das variáveis THC-COOH e 11-OH-THC (c) e do teste de correlação de Spearman das variáveis THC-COOH e CBD (d), das variáveis THC e CBD (e) e das variáveis 11-OH-THC e CBD (f) .....	44



## 1. Introdução

### 1.1. Toxicologia Forense

A toxicologia é a ciência que estuda os efeitos, maioritariamente nocivos, das substâncias químicas nos sistemas vivos, envolvendo as áreas da farmacologia, da bioquímica, da química, da fisiologia, da patologia e da genética.<sup>1,2</sup> A toxicologia é classificada em 3 categorias, nomeadamente, a toxicologia ambiental, a toxicologia clínica e a toxicologia forense. A toxicologia ambiental estuda os efeitos nocivos de produtos químicos encontrados na atmosfera, na cadeia alimentar ou em ambientes recreativos. Em contrapartida, a toxicologia clínica estuda os efeitos nocivos de produtos químicos administrados intencionalmente em organismos vivos com o objetivo de alcançar um efeito específico.<sup>2</sup> A toxicologia forense atenta-se com os aspetos médico-legais dos efeitos danosos de produtos químicos ou de venenos.

A toxicologia forense tem três aplicações distintas, nomeadamente a toxicologia no local do trabalho, no contexto da alteração do desempenho humano e no contexto *post mortem*.<sup>2,3</sup> A título de exemplo, a toxicologia no local de trabalho nos Estados Unidos da América tem um teste obrigatório para controlo do estado de influenciado e para novas contratações sendo, portanto, utilizado como critério de admissão num emprego. O desempenho humano relaciona as alterações das ações de uma pessoa com a substância que ingere, isto é, a mudança da condução ou prática de crimes sob o efeito de álcool ou de drogas ou incremento de capacidades físicas no desporto. No contexto *post mortem*, o teste toxicológico é um processo de rotina na autópsia médico-legal.<sup>3</sup>

A Lei 19/2013 define os estatutos do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, Instituto Público (INMLCF,I.P) incluindo o Serviço de Química e Toxicologia Forenses (SQTF), ao qual compete assegurar a realização de perícias e exames laboratoriais químicos e toxicológicos no âmbito das atividades do INMLCF,I.P e dos gabinetes que se encontrem na sua dependência, bem como a solicitação dos tribunais da respetiva circunscrição médico-legal.<sup>4</sup> O SQTF determina, confirma e quantifica substâncias com interesse forense, incluindo drogas de abuso, medicamentos, pesticidas e substâncias voláteis.

A interpretação dos resultados obtidos é fulcral para a compreensão e para a contextualização de cada caso.<sup>1</sup> Assim, a dose e o tipo de substância, a frequência de exposição e o organismo em questão determinam se a substância é inofensiva ou letal. Paralelamente, a identificação de uma substância numa amostra biológica, desconhecida ou não, pode ser complexa e tem várias etapas, entre as quais a extração, a separação e a

identificação do composto.<sup>2</sup> De notar que, quando conhecidos, a presença de metabolitos auxilia a identificação, uma vez que podem ser indicativos do metabolismo da substância em estudo.

Sobre o cadáver poderão ser requisitadas perícias toxicológicas no caso de suspeita de morte por intoxicação.<sup>3</sup> Tal deve-se ao facto de que, quando ocorre a morte, o metabolismo cessa e, por isso, os resultados toxicológicos são indicativos do estado de influenciado na hora da morte. No entanto, algumas substâncias são instáveis no ambiente *post mortem* e requerem interpretação cuidadosa do seu significado.<sup>5</sup> O processo redistributivo pode afetar a concentração de drogas de abuso em casos *post mortem* devido à difusão das substâncias de uma concentração mais alta para uma concentração mais baixa após a rutura das membranas celulares e, por isso, pode alterar significativamente a concentração das drogas, particularmente nas drogas com alta solubilidade lipídica. Deste modo, para determinar a concentração de drogas em matrizes biológicas é importante conhecer a estabilidade da substância nesses tecidos.<sup>5</sup>

Uma boa gestão das amostras deve garantir que os procedimentos de colheita, de embalagem, de selagem, de rotulagem, de armazenamento, de preservação, de transporte e de receção pelo laboratório forense são adequados, garantindo que as amostras não são perdidas, danificadas ou contaminadas pelo pessoal que as manipula, de modo a garantir resultados confiáveis e a conformidade da cadeia de custódia.<sup>6</sup> Assim que uma amostra chega a um laboratório forense, o primeiro teste a realizar é um teste de rastreio, baseado em imunoensaios ou técnicas cromatográficas.<sup>3</sup> Se os resultados do teste forem negativos, os resultados são libertados. Caso contrário, as amostras são sujeitas a testes confirmatórios desenvolvidos para cada classe de drogas. Para estes testes, os métodos mais usados são baseados na Cromatografia Gasosa associada a Detecção por Espectrometria de Massa (GC-MS) e na Cromatografia Líquida associada a Detecção por Espectrometria de Massa (LC-MS).<sup>3</sup>

Os tópicos seguintes pretendem avaliar o estado da arte relativamente às moléculas da planta de canábис, os seus efeitos terapêuticos e adversos, nomeadamente dos canabinóides e terpenos, o metabolismo de Canabidiol (CBD) e de  $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol ( $\Delta$ 9-THC), as consequências terapêuticas e metabólicas do consumo simultâneo de canábис e substâncias medicamentosas, a influência do consumo de canábис na condução e as técnicas recentemente descritas para análises de canabinóides, através de uma revisão bibliográfica.

## 1.2. *Cannabis sativa*

A *Cannabis* é um gênero de planta herbácea que inclui as espécies *Cannabis sativa*, a *Cannabis indica* e a *Cannabis ruderalis*, que pertencem à família *Cannabaceae*.<sup>7</sup> Destas plantas, a mais usada, tanto para fins recreativos como para fins medicinais, é a *Cannabis sativa*.

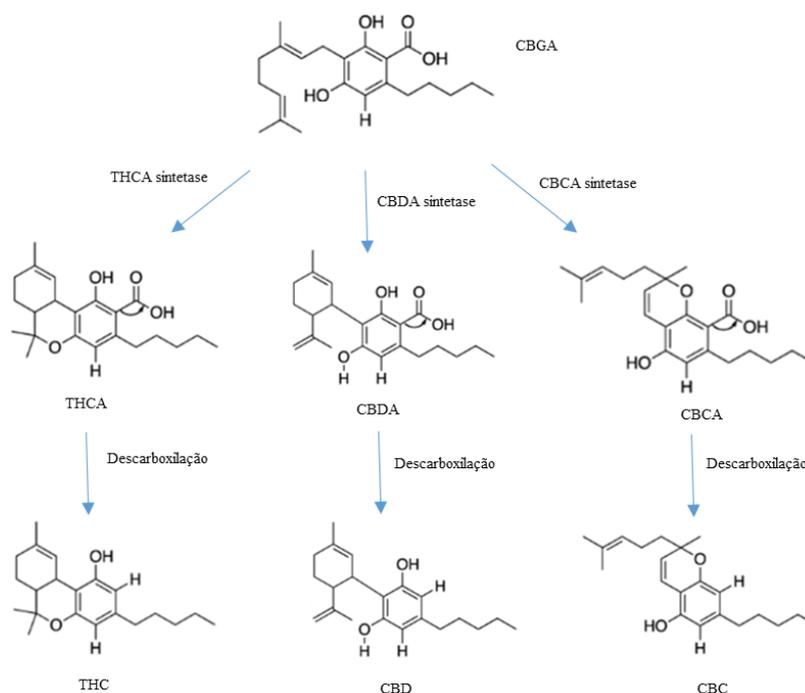
A *Cannabis sativa* contém várias classes de compostos entre as quais os canabinóides, terpenos, flavonoides, alcaloides, aminoácidos, ácidos gordos, hidrocarbonetos, fenóis, proteínas, glicoproteínas, açúcares, álcoois, aldeídos, cetonas e ácidos simples.<sup>7,8</sup> Os extratos de resina, o cânhamo, os óleos, as folhas secas e as flores são usados para propósitos medicinais e recreativos.<sup>7,9</sup> A presença e a abundância das várias substâncias na corrente sanguínea depende da variedade da canábis, do extrato e da via de administração.<sup>8</sup>

De todas as moléculas constituintes da *Cannabis sativa*, salientam-se os terpenos e os canabinóides, uma vez que são das classes mais abundantes na planta e as mais estudadas nos últimos anos para fins terapêuticos. Os terpenos presentes nos óleos essenciais da planta *Cannabis sativa* são hidrocarbonetos aromáticos orgânicos,<sup>10</sup> biologicamente ativos e, em combinação com canabinóides, parecem modificar as respostas fisiológicas à marijuana (tornam a absorção mais rápida ou mais lenta e aumentam ou diminuem a duração do efeito).<sup>11,12</sup> Já foram identificados mais de 200 terpenos diferentes nesta planta.<sup>11</sup> Estes encontram-se numa concentração de 1 a 10%, sendo os mais estudados o  $\beta$ -mirceno, o limoneno, o linalol, o pineno e o  $\beta$ -cariofileno. Os terpenos mencionados anteriormente demonstraram possuir no humano propriedades antimicrobianas, antioxidantes, anticancerígenas, anestésicas, anti-inflamatórias, anti-histamínicas, anti-tumorais, entre outras.<sup>10</sup> Além disso, os terpenos são moléculas com boa tolerância, sem efeitos adversos consideráveis, com baixa toxicidade e alta biodisponibilidade. A interação entre os fitocannabinóides e os terpenos pode produzir ação sinérgica com elevado potencial terapêutico para tratar a dor, a inflamação, a ansiedade, a epilepsia e as infecções bacterianas e fungicidas.<sup>13</sup> Além disso, os terpenos já são amplamente utilizados na indústria alimentar e cosmética e ultimamente também têm sido incorporados em alguns medicamentos tradicionais.<sup>10,11</sup>

Na planta *Cannabis sativa* foram encontrados cerca de 400 canabinóides, sendo o  $\Delta$ 9-THC o principal composto com efeito psicoativo.<sup>14</sup> No conteúdo total de canabinóides no extrato, 90% corresponde a  $\Delta$ 9-THC e a CBD sendo que os restantes 10% dos compostos também podem contribuir para o efeito terapêutico de CBD/ $\Delta$ 9-THC.<sup>15</sup>

Contudo, a quantidade de canabinóides na planta pode mudar significativamente dependendo das condições climáticas, do local de cultivo, da variabilidade genética e do tempo de colheita.<sup>16</sup>

Na via biossintética dos canabinóides nos tecidos da *Cannabis sativa*, os canabinóides são sintetizados na forma ácida (carboxílica).<sup>17</sup> O Ácido Canabigerólico (CBGA) é o primeiro canabinóide a ser sintetizado pela planta e, por isso, é o precursor biossintético de outros canabinóides pela *Cannabis sativa*. Efectivamente, o Ácido Tetrahydrocanabinólico (THCA), o Ácido Canabidiólico (CBDA) e o Ácido Canabicroménico (CBCA) são sintetizados a partir de CBGA, seguindo diferentes vias (figura 1).<sup>17,18</sup> Os canabinóides ácidos perdem o seu grupo carboxílico quando são aquecidos a mais de 200°C (fumo, vapor, cozinha), ou quando são sujeitos a secagem, resultando em canabinóides neutros como o CBD,  $\Delta^9$ -THC e o Canabicromeno (CBC).<sup>16</sup> Os canabinóides podem ser assim consumidos na forma neutra e na forma ácida,<sup>16</sup> sendo que na forma ácida são inativos, uma vez que o CBDA e o THCA não são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica.<sup>19</sup>



**Figura 1:** Vias biossintéticas dos canabinóides THCA, CBDA, CBGA, THC, CBD e CBC a partir do canabinóide CBGA nos tecidos da *Cannabis sativa* (Adaptada de <sup>13</sup>).

Os canabinóides são as moléculas com mais interesse e especificidade na ação terapêutica da *Cannabis sativa*.<sup>17</sup> Alguns canabinóides como o CBC, o Canabigerol

(CBG), o Canabinol (CBN), a Canabidivarina (CBDV) e a Tetrahydrocanabivarina (THCV) foram alvo de estudo para fins terapêuticos.<sup>8,20</sup> O CBG é um agonista do recetor TRPV1 (*do inglês, Transient Receptor Potential Vanilloid 1*), um inibidor da recaptação da Anandamida (AEA) e tem propriedades antibacterianas e anti-proliferativas.<sup>16</sup> O CBN é um agonista parcial do Recetor Canabinóide Tipo 1 (CB1) e do Recetor Canabinóide Tipo 2 (CB2) com principal atividade anti-convulsivante e com propriedades analgésicas. Além disso, o CBN é um produto da oxidação do  $\Delta^9$ -THC<sup>21</sup>, uma vez o THCA é convertido em Ácido Canabinólico (CBNA) por exposição ao ar, que por sua vez sofre descarboxilação, originando CBN.<sup>16</sup> O CBC tem propriedades anti-inflamatórias, analgésicas, antimicrobianas e anti-proliferativas. O CBC, a THCV, o CBG e a CBDV também são estimulantes do crescimento ósseo.<sup>20</sup>

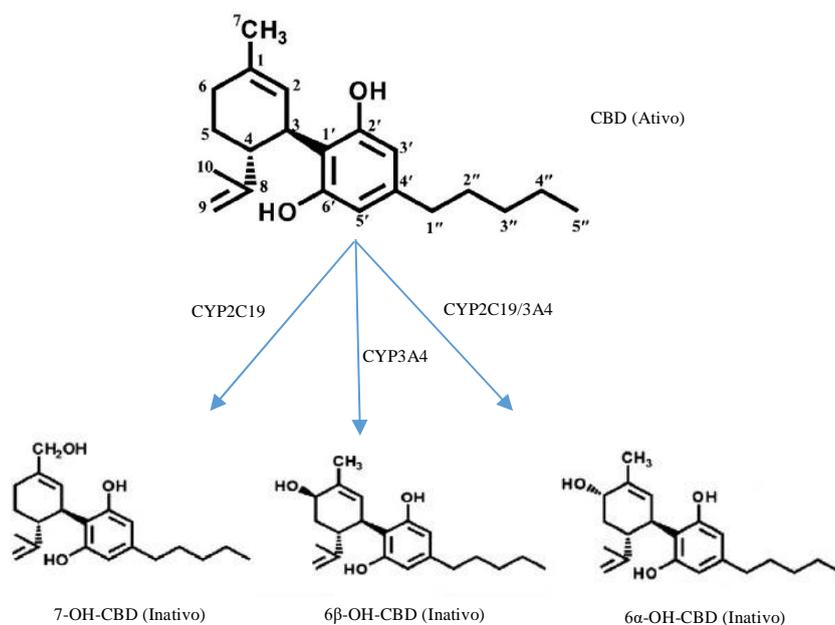
Apesar dos terpenos e dos fitocanabinóides serem as moléculas mais abundantes na planta *Cannabis sativa*, a concentração de fitocanabinóides é significativamente maior do que a de terpenos, sendo o  $\Delta^9$ -THC e o CBD os principais fitocanabinóides presentes nesta planta. Contudo, como veremos mais à frente, os terpenos e os canabinóides partilham várias propriedades terapêuticas e, como já referido, estes dois grupos de moléculas podem ter ação sinérgica. Desta forma, caso a ação sinérgica seja comprovada, poderá existir um potencial desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos com base nestas duas classes de moléculas.

### **1.2.1. Metabolismo do canabidiol (CBD) e do $\Delta^9$ -tetrahydrocanabinol ( $\Delta^9$ -THC)**

O estudo da farmacocinética e da farmacodinâmica dos canabinóides é complexo devido às baixas concentrações dos analitos, ao metabolismo rápido e extensivo e à dificuldade de separar a substância de interesse das matrizes biológicas.<sup>21</sup> Contudo, alguns estudos estão a ser realizados para avaliar a otimização da farmacocinética de medicamentos com base em CBD e em  $\Delta^9$ -THC de modo a maximizar os efeitos terapêuticos e a minimizar os efeitos psicoativos.<sup>22,23,24</sup> Embora os estudos sobre esta matéria sejam insuficientes, pensa-se que o tempo de meia vida do  $\Delta^9$ -THC seja de 30 minutos, e para o CBD seja de  $31 \pm 4$  horas.<sup>8</sup>

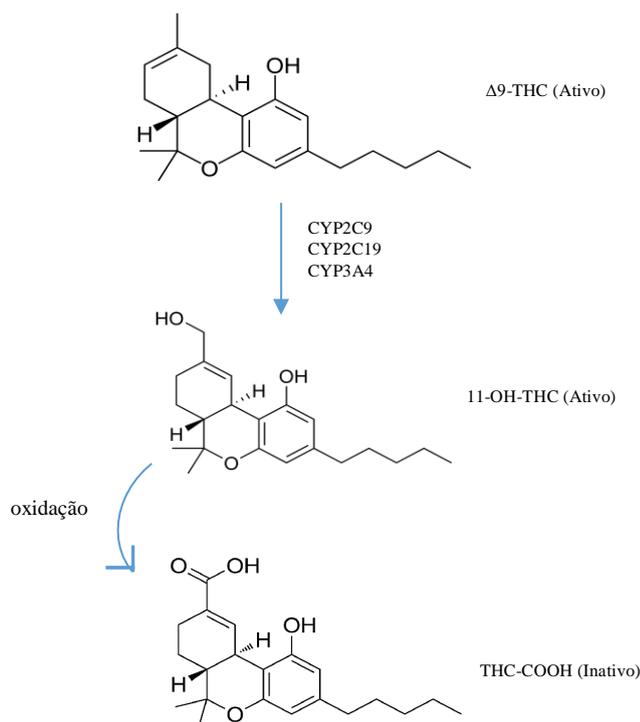
O conhecimento sobre a metabolização do CBD e do  $\Delta^9$ -THC é escasso, mas estudos apontam para a sua metabolização, maioritariamente no fígado, por enzimas do Citocromo P450 (CYP450).<sup>25</sup> Julga-se que a reação metabólica principal do CBD (figura 2) é a hidroxilação e a descarboxilação nas posições 6 e 7 que são catalisadas principalmente pelas isoformas Citocromo P450 2C19 (CYP2C19) e o Citocromo P450

3A4 (CYP3A4) do CYP450<sup>26</sup> sendo o 6 $\alpha$ -hidroxicanabidiol (6 $\alpha$ -OH-CBD), o 6 $\beta$ -hidroxicanabidiol (6 $\beta$ -OH-CBD) e o 7-hidroxicanabidiol (7-OH-CBD) os principais metabolitos.<sup>27</sup>



**Figura 2:** Vias metabólicas do CBD pelas isoformas do CYP450 e os seus principais metabolitos (Adaptada de <sup>27</sup>).

Paralelamente, o  $\Delta$ 9-THC, embora seja metabolizado principalmente no fígado, também pode ser metabolizado no cérebro.<sup>21</sup> Porém, após administração prolongada de  $\Delta$ 9-THC, o THC-COOH é armazenado na gordura corporal por longos períodos de tempo, sendo mais tarde libertado gradualmente para a corrente sanguínea.<sup>21,25</sup> O  $\Delta$ 9-THC pode sofrer hidroxilação (figura 3) pelas isoformas Citocromo P450 2C9 (CYP2C9), CYP2C19 e CYP3A4 do CYP450, formando vários metabolitos, sendo o principal o ativo 11-hidroxi- $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol (11-OH-THC). Este metabolito é depois oxidado no metabolito inativo 11-nor-9-carboxi- $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol (THC-COOH).<sup>21</sup> Uma vez que a informação acerca do metabolismo dos restantes canabinóides é pouca, pensa-se ser similar ao do  $\Delta$ 9-THC e do CBD com o envolvimento do CYP450.<sup>8</sup> A retenção prolongada de THC-COOH no tecido adiposo é responsável pela deteção prolongada de THC-COOH na urina (que pode ser detetada 3 semanas após administração em consumidores crónicos) sendo este o maior produto final da metabolização de  $\Delta$ 9-THC na maioria das espécies, incluindo os humanos.<sup>25</sup>



**Figura 3:** Vias metabólicas do  $\Delta 9$ -THC pelas isoformas do CYP450 e os seus principais metabolitos (Adaptada de <sup>21</sup>).

Apesar do CBD ser metabolizado pelo CYP450, há indícios desta molécula ser também um inibidor potente deste citocromo.<sup>21</sup> Assim, quando administrado em conjunto com o  $\Delta 9$ -THC em concentrações suficientes, o CBD inibe o metabolismo de hidroxilação de  $\Delta 9$ -THC em 11-OH-THC. Este fenómeno, aliado ao facto de o CBD e o  $\Delta 9$ -THC competirem pelos mesmos recetores, que irá ser discutido mais à frente, torna o efeito de  $\Delta 9$ -THC mais prolongado.<sup>21,25</sup> O CBD, além de influenciar a eliminação de outros canabinóides, também pode influenciar outras substâncias cuja metabolização seja por via do CYP450.<sup>12</sup>

Curiosamente, na presença de ácido gástrico artificial, o CBD degradou-se e ciclizou, formando-se  $\Delta 9$ -THC.<sup>28</sup> Da mesma forma, em animais, foi detetada presença de  $\Delta 9$ -THC após administração oral de apenas CBD.<sup>29</sup> Contudo, nos estudos em humanos não foi detetado  $\Delta 9$ -THC no plasma depois da administração de CBD.<sup>30,31</sup> Deste modo, pensa-se que este fenómeno não acontecerá em humanos pois não há uma enzima conhecida que catalise o processo.<sup>29</sup> Porém, os estudos em humanos são recentes e insuficientes para conclusões mais definitivas sobre esta matéria sendo necessários mais estudos. Se estudos futuros comprovarem que é possível a deteção de  $\Delta 9$ -THC após a administração de apenas CBD em humanos, este contexto poderá influenciar o desenvolvimento de terapias com administração conjunta de  $\Delta 9$ -THC e de CBD.<sup>25</sup>

Os efeitos comportamentais e metabólicos da interação entre o  $\Delta 9$ -THC e o CBD são influenciados pela dose e pela via de administração. As vias de administração mais utilizadas para fins recreativos e fins terapêuticos são a via pulmonar e oral, respetivamente.<sup>9</sup> Fumar é a via preferida pelos consumidores de canábis porque, além de ser distribuído rapidamente, atingindo o cérebro em menos de 1 minuto,<sup>9</sup> pode ser doseado para o efeito desejado.<sup>21</sup> Nesta via de administração, o pico máximo de concentração de  $\Delta 9$ -THC é atingido em segundos no sangue, mas como é distribuído rapidamente pelos tecidos, a eliminação é mais rápida comparativamente à administração oral.<sup>25</sup> Assim, espera-se que os efeitos agudos do  $\Delta 9$ -THC administrados por via pulmonar sejam sentidos de imediato. Complementarmente, os canabinóides, quando administrados por via oral, sofrem metabolismo de 1ª passagem e apresentam uma taxa de eliminação mais lenta.<sup>21,12,25</sup> Por isso, as taxas de absorção dos canabinóides e a biodisponibilidade são mais baixas por estas vias do que pelas restantes (pulmonar, intravenosa, subcutânea, retal)<sup>21</sup> e conseqüentemente o pico máximo de concentração de  $\Delta 9$ -THC é mais tardio e menor. Porém, o metabolismo de 1ª passagem origina quantidades significativas de 11-OH-THC, sendo este metabolito igualmente ativo e com propriedades psicoativas.<sup>12</sup> Além disso, na administração oral, o pico máximo de concentração de  $\Delta 9$ -THC é mais elevado na administração conjunta de CBD e de  $\Delta 9$ -THC do que na administração de  $\Delta 9$ -THC apenas.<sup>25</sup> Isto porque o CBD inibe o metabolismo de  $\Delta 9$ -THC, resultando em níveis mais elevados de  $\Delta 9$ -THC no cérebro e no sangue. Este fenómeno está ausente quando a administração é por via pulmonar. Tendo todos estes factos em consideração, o canábis administrado por via oral parece ser o mais indicado para fins medicinais e o mais seguro uma vez que o pico máximo de concentração dos canabinóides é mais tardio e menor em comparação a outras vias de administração.<sup>12</sup>

O Sistema Endocanabinóide (ECS) consiste em recetores canabinóides, em endocanabinóides e em enzimas presentes no cérebro e no sistema imunitário<sup>32</sup> que, interagindo entre si, têm a habilidade de modular vários processos fisiológicos, como a libertação de neurotransmissores no sistema nervoso central e sistema nervoso periférico, a perceção da dor, as funções cardiovasculares e gastrointestinais, entre outros, assim como funções de controlo cognitivo, de memória, de dor, do sono e de imunidade.<sup>9</sup> No corpo humano encontramos os endocanabinóides (ou canabinóides endógenos), sendo os mais estudados a AEA e a 2-araquidonoilglicerol (2-AG),<sup>33</sup> cuja metabolização se dá através das enzimas FAAH (Hidrolase de Amidas de Ácidos Gordos) e MAGL (Lípase

de Monoacilgliceróis), respetivamente. No entanto, os canabinóides consumidos para fins terapêuticos podem ter origem na planta de canábis (fitocannabinóides como o CBD e o  $\Delta$ 9-THC<sup>25</sup>) ou podem ser sintetizados em laboratórios (cannabinóides sintéticos).<sup>9,25</sup> Em relação aos endocannabinóides, os cannabinóides sintéticos têm uma estrutura química diferente e os fitocannabinóides são quimicamente semelhantes.<sup>9</sup> Contudo, os cannabinóides sintéticos e os fitocannabinóides, nomeadamente o CBD e o  $\Delta$ 9-THC, podem ligar-se aos recetores cannabinóides e produzir efeitos semelhantes aos endocannabinóides. A interação entre estas moléculas e os seus respetivos recetores cannabinóides leva à libertação de neurotransmissores.<sup>25</sup> Muitas plantas, além da canábis, modulam diretamente ou indiretamente a atividade do ECS.<sup>33</sup> Assim, o ECS é um potencial alvo da farmacoterapia, tendo como alvo os recetores cannabinóides com ligandos cannabinóides seletivos ou utilizando compostos que previnam a degradação de endocannabinóides (inibidores da FAAH ou inibidores da MAGL).<sup>20</sup>

Existem vários recetores cannabinóides descritos, mas os quatro mais estudados para fins terapêuticos e pertencentes ao ECS são o Recetor Canabinóide Tipo 1 (CB1), o Recetor Canabinóide Tipo 2 (CB2), o Recetor TRPV1 (*do inglês, Transient Receptor Potential Vanilloid 1*) e o Recetor da 5-hidroxitriptamina 1A (5-HT<sub>1A</sub>).<sup>34</sup> A Anandamida (AEA) é um neurotransmissor ligante do recetor CB1, sendo agonista do recetor TRPV1. Por outro lado, a 2-araquidonoilglicerol (2-AG) é um agonista total dos recetores CB1, CB2 e TRPV1.<sup>20</sup> Uma vez que, o recetor CB1 está envolvido na modulação do apetite, do humor, da sedação e da sensação de dor, enquanto que o recetor CB2 responde a condições inflamatórias,<sup>12</sup> a interação da AEA e da 2-AG com os recetores cannabinóides tem propriedades ansiolíticas, analgésicas, entre outras.<sup>33</sup> Como já referido anteriormente, o CBD e o  $\Delta$ 9-THC podem ligar-se aos recetores cannabinóides e há indícios que o  $\Delta$ 9-THC é agonista parcial de CB1 e de CB2.<sup>25</sup> Assim pensa-se que a ligação do  $\Delta$ 9-THC ao recetor CB2 resulta numa diminuição da libertação de fatores pró-inflamatórios<sup>35</sup> e que a ligação do  $\Delta$ 9-THC ao recetor CB1, além de ser a principal responsável pelos efeitos psicoativos,<sup>25</sup> resulta numa estimulação simpática e na vasoconstrição, provocando o aumento do ritmo cardíaco, arritmias, enfartes do miocárdio e acidentes vasculares cerebrais (AVC).<sup>12</sup> Por outro lado, o CBD pode atenuar os comportamentos e os efeitos metabólicos provocados pelo  $\Delta$ 9-THC.<sup>25</sup> Alguns estudos sugerem que o CBD é um antagonista não competitivo de CB1 e agonista inverso de CB2.<sup>26</sup> Caso esta hipótese se verifique verdadeira, quando o CBD se liga aos recetores CB1 e CB2, a ligação é fraca e não os ativa, mas interfere com a ligação do  $\Delta$ 9-THC, impedindo o seu efeito psicoativo,<sup>36</sup>

reduzindo alguns dos efeitos adversos como a ansiedade e a taquicardia e as citocinas envolvidas na resposta inflamatória.<sup>12,35</sup> Além disso, uma vez que o CBD inibe a recaptação e a degradação enzimática do neurotransmissor AEA (aumentando assim a sua concentração sérica), além de contribuir para os efeitos terapêuticos da AEA, impede a interação  $\Delta 9$ -THC-recetor uma vez que o  $\Delta 9$ -THC e a AEA competem pelos mesmos recetores. Deste modo, o CBD pode desempenhar um papel protetor contra o dano no cérebro provocado pelo uso de canábis rico em  $\Delta 9$ -THC e por isso poderá ser útil no tratamento da dependência e do vício<sup>34</sup> e benéfico no tratamento da epilepsia e da dor.<sup>12</sup>

Como já descrito, o metabolismo do CBD e do  $\Delta 9$ -THC é essencialmente por enzimas do CYP450. Além disso, o CBD e o  $\Delta 9$ -THC competem pelos mesmos recetores canabinóides que modulam vários processos fisiológicos. Desta forma, o consumo simultâneo destes canabinóides pode resultar em diferentes efeitos metabólicos e terapêuticos dependendo da concentração de cada um.

### **1.2.2. Utilização terapêutica de canabinóides e efeitos adversos**

Legislativamente em alguns países, nomeadamente Portugal, os canabinóides apenas podem ser usados como tratamento adicional quando os tratamentos convencionais falham na resposta terapêutica ou quando estão a provocar efeitos adversos relevantes.<sup>9,37</sup> Num estudo realizado com o CBD e a amisulprida (antipsicótico usado na esquizofrenia), ambos se mostraram eficazes e seguros, mas o CBD teve menos efeitos adversos.<sup>34</sup> A título de exemplo, o CBD foi eficaz na redução da frequência de convulsões em crianças com o síndrome de Dravet e Lennox-Gastaut, em combinação com medicamentos antiepiléticos.<sup>9,34</sup> Porém, as crianças reportaram na administração conjunta de CBD e antiepilético, efeitos adversos mais frequentes do que na administração conjunta de placebo com antiepilético, tornando esta combinação apenas eficaz no aumento da resposta terapêutica.<sup>34</sup> Embora existam alguns estudos com sucesso na utilização de medicamentos à base de CBD ou combinação de CBD com um medicamento convencional, o Sativex é o único medicamento à base de canábis autorizado pelo Infarmed em Portugal e é usado para o tratamento de espasmos musculares e dor neuropática causados pela esclerose múltipla.<sup>9</sup> Este medicamento contém 6-7% de terpenos<sup>12</sup> e é constituído por  $\Delta 9$ -THC e CBD ativos com uma proporção de 1:1.<sup>9</sup> Num estudo realizado por Indorato F. *et al.*, em que foi calculada a concentração de  $\Delta 9$ -THC em relação à dose e ao tempo de tratamento, concluiu-se que é improvável que o Sativex seja usado como droga de abuso devido à baixa concentração de  $\Delta 9$ -THC

no medicamento e na corrente sanguínea (concentração não é suficiente para provocar efeitos psicoativos).<sup>36</sup>

Alegadamente, o CBD tem propriedades analgésicas, anti-inflamatórias, antioxidantes, antipsicóticas, ansiolíticas, anticonvulsivas e efeitos citotóxicos em células cancerígenas, podendo ser caracterizado como não psicoativo, pois não é associado a reforço, a desejo e à compulsividade de abuso.<sup>28</sup> Estas propriedades podem oferecer uma abordagem farmacológica para neuroproteção e, por isso, um potencial terapêutico para doenças como esquizofrenia e Parkinson, sendo que existem estudos em humanos em que o CBD foi eficaz no tratamento sintomático destas doenças.<sup>34</sup> Além disso, o CBD tem múltiplos efeitos quimiopreventivos em linhas de células do carcinoma colorretal ao proteger o DNA do dano oxidativo, aumentando a concentração de endocanabinóides. Apesar do consumo de  $\Delta 9$ -THC estar associado a depressão, a desordens bipolares e com hiperatividade dopaminérgica encontrada na psicose, o CBD tem atividade agonista no recetor 5-HT<sub>1A</sub>, o que aumenta o neurotransmissor 5-hidroxitriptamina/glutamato, contribuindo para uma ação antidepressiva.<sup>32,34</sup> A administração de CBD também mostrou diminuir a ansiedade e a dor crónica quando comparado com a administração de placebo.<sup>34</sup>

Alguns estudos sugerem abordagens terapêuticas com a administração de apenas  $\Delta 9$ -THC.<sup>9,21</sup> O  $\Delta 9$ -THC produz efeitos psicoativos como a euforia e o relaxamento, mas pode ser usado como medicamento para controlar a náusea, o vômito, o apetite e o sono, bem como ser usado em cápsulas orais de  $\Delta 9$ -THC como estimulante de apetite em pacientes com SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) (p.e. o medicamento Marinol).<sup>9</sup> O  $\Delta 9$ -THC e outros canabinóides agonistas dos recetores canabinóides mostraram reduzir a náusea e o vômito na quimioterapia com níveis de eficácia semelhantes a medicamentos antieméticos.<sup>21</sup> Além disso, o  $\Delta 9$ -THC tem efeitos sedativos, o que pode contribuir para melhorar a qualidade do sono.<sup>32</sup> Contudo foi provado causar habituação quando o tratamento é prolongado e a longo prazo há uma diminuição da qualidade do sono. Apesar do  $\Delta 9$ -THC ter sido eficaz no tratamento de certos sintomas, há vários indícios de efeitos adversos relevantes e desenvolvimento de dependência.<sup>12,34</sup> Uma vez que o CBD, além de ter várias propriedades terapêuticas, ameniza os efeitos psicoativos e os efeitos metabólicos provocados pelo  $\Delta 9$ -THC, estas duas moléculas podem, em conjunto, ser uma abordagem terapêutica relevante.

Atualmente, existe um grande interesse no potencial uso médico de CBD e de  $\Delta 9$ -THC. Alguns estudos clínicos relataram efeitos adversos e toxicidade após ingestão de

CBD e/ou de  $\Delta 9$ -THC.<sup>34</sup> Assim, a complexidade farmacológica do CBD e do  $\Delta 9$ -THC oferece um tremendo potencial terapêutico, mas também potencial para efeitos adversos e interações com outros medicamentos. Um estudo realizado para avaliar a melhoria dos sintomas da epilepsia e das desordens psiquiátricas com uso de CBD reportou interações droga-droga (interações CBD - medicamento convencional), anomalias hepáticas, diarreia, fadiga, vômitos e sonolência.<sup>34</sup> Em outros estudos constatou-se que os pacientes a receber medicamentos constituídos maioritariamente por  $\Delta 9$ -THC ou medicamentos com combinação de CBD e de  $\Delta 9$ -THC foram mais prováveis de reportar um efeito adverso do que os pacientes a receber o placebo.<sup>9</sup> Entre estes efeitos incluem-se tonturas, boca seca, desorientação, náusea, euforia e confusão, sendo sentidos igualmente em terapias de curto e longo prazo. Os efeitos adversos mais graves, como desordens psiquiátricas, desordens no sistema nervoso, desordens sanguíneas e desordens no tecido muscular esquelético e no tecido conjuntivo foram raros.<sup>9</sup> A sonolência e a sedação foram os efeitos adversos mais comuns reportados no uso de CBD.<sup>9,34</sup> Em animais, após a toma de CBD, foram reportados sinais e sintomas como a toxicidade, a mortalidade fetal, a inibição do sistema nervoso central, a neurotoxicidade, a redução da espermatogénese, a alteração do peso dos órgãos e a hipotensão.<sup>12</sup> Porém, as doses administradas foram superiores às recomendadas para a farmacoterapia em humanos. O uso de canábis, em particular com concentração sanguínea de  $\Delta 9$ -THC elevada e para análogos potentes do recetor CB1, causa risco de problemas cardiovasculares, nomeadamente AVC e artrite vascular, emergências médicas graves e morte súbita.<sup>12</sup> A via de administração, a dose de CBD e de  $\Delta 9$ -THC e as interações droga-droga (principalmente as que são metabolizadas no fígado) influenciam a eficácia do CBD, os efeitos adversos e a toxicidade.<sup>34</sup> Em Portugal, e à exceção do Sativex, os produtos de CBD são vendidos como suplementos alimentares. Consequentemente, não são controlados pelo Infarmed, quer na potência do CBD, quer no conteúdo de outros constituintes. Como qualquer medicamento, o CBD não é apropriado para todas as pessoas e para todas as patologias e os seus efeitos adversos e interações droga-droga devem ser tidos em consideração na prescrição e toma de produtos de CBD.

O uso de canabinóides tem sido proposto para o cuidado paliativo de pacientes com cancro para o controlo da dor, estimulador do apetite, redução da ansiedade e melhoria do sono.<sup>9,32</sup> Porém, são necessários mais ensaios clínicos controlados para especificar as doses de CBD que, de forma confiável, produzam os efeitos terapêuticos desejados com um mínimo de efeitos adversos e uma mínima interação com outros

medicamentos. Também são necessários estudos farmacológicos para uma melhor definição das doses e interações com outros medicamentos.<sup>9,32</sup>

Concretamente, a ação do CBD na administração conjunta com medicamentos convencionais prescritos no tratamento de determinada patologia não é, ainda, consensual. Especificando, existem dúvidas sobre se a melhoria dos sintomas se deve ao CBD, à interação droga-droga ou apenas ao medicamento convencional. Os efeitos, quer comportamentais, quer metabólicos, da interação entre o  $\Delta$ 9-THC e o CBD também são insuficientemente compreendidos e ainda existem dúvidas sobre se a melhor terapêutica é apenas com CBD ou numa combinação de CBD com  $\Delta$ 9-THC.

### 1.2.3. Contexto regulatório e legal das substâncias

Em sequência do decreto-lei nº 15/93, e respetivas atualizações, que rege o combate à produção, comércio, tráfico e consumo de substâncias ilícitas<sup>37</sup>, foram decretadas e publicadas as regras específicas inerentes à utilização de medicamentos, preparações e substâncias à base da planta da canábida para fins medicinais, nomeadamente a sua prescrição e a sua dispensa em farmácias.<sup>38,39</sup> A Lei nº 33/2018 aprova e estabelece que é ao Infarmed que compete “*regular e supervisionar as atividades de cultivo, produção, extração e fabrico, comércio por grosso, distribuição às farmácias, importação e exportação, trânsito, aquisição, venda e entrega de medicamentos, preparações e substâncias à base da planta de canábida destinadas a uso humano para fins medicinais*”.<sup>38</sup> Além disso, frisa que a prescrição de “*medicamentos, preparações e substâncias à base da planta de canábida apenas pode ser feita se os tratamentos convencionais com medicamentos autorizados não estiverem a produzir os efeitos esperados ou se estiverem a provocar efeitos adversos relevantes e que compete ao governo, através das entidades competentes, promover junto dos médicos e de outros profissionais de saúde, informação sobre as aplicações da planta de canábida para fins medicinais*”. O decreto-lei nº 8/2019 vem no seguimento da Lei anterior e estabelece que “*a colocação no mercado de preparações ou substâncias à base de canábida para fins medicinais está sujeita a uma autorização de colocação no mercado pelo Infarmed*” e que é esta entidade que define a lista das indicações terapêuticas consideradas apropriadas.<sup>39</sup> Por fim, “*os medicamentos, preparações e substâncias à base da planta de canábida prescritos para fins medicinais são dispensados em farmácias, mediante apresentação da prescrição médica*”.

Apesar de já existir regulamentação publicada, esta ainda não foi totalmente aplicada. A 1 de fevereiro de 2018, o Infarmed aprovou uma lista com sete indicações terapêuticas apropriadas para as preparações e substâncias à base da planta da canábis e associadas a várias doenças. Porém, como já referido anteriormente, o único medicamento até ao momento autorizado no mercado português é o Sativex. Os produtos de canábis nas lojas de conveniência, como já referido, são vendidos como suplementos alimentares e por isso são controlados pela Autoridade de Segurança Alimentar e Económica e não pelo Infarmed. Paralelamente, a maioria é vendida sem o controlo rigoroso relativamente à potência do CBD e no conteúdo de outros constituintes a que o contexto de medicamento obrigaria.

### **1.3. Consumo simultâneo de canábis e de substâncias medicamentosas**

O consumo de canábis tem sido associado com o consumo de outras substâncias medicamentosas de forma a potenciar os efeitos destas ou como substituto de medicamentos previamente prescritos.<sup>40</sup> No geral, os canabinóides são bem tolerados podendo, no entanto, ocorrer interações droga-droga.<sup>41</sup> As interações medicamentosas mais descritas são farmacocinéticas, afetando enzimas do metabolismo de drogas. Como já descrito, o metabolismo principal do  $\Delta$ 9-THC e CBD é por via de enzimas do CYP450.<sup>25</sup> Deste modo, o consumo simultâneo de canábis e de substâncias medicamentosas com metabolismo por via do CYP450 pode causar inibição desta enzima e, por isso, aumentar a biodisponibilidade das substâncias. Neste trabalho o foco incidirá na utilização de canábis com 3 classes de substâncias, nomeadamente benzodiazepinas, antidepressivos e antiepiléticos.

As propriedades hipnóticas e ansiolíticas tornam as benzodiazepinas eficazes no tratamento de desordens da ansiedade e insónias.<sup>42</sup> Existem várias benzodiazepinas disponíveis no mercado, sendo que, neste trabalho, serão destacadas três, nomeadamente o midazolam, o diazepam e o lorazepam. O midazolam é uma benzodiazepina usada principalmente para sedações em pequenos procedimentos cirúrgicos, indução da anestesia geral e sedação em unidades de terapia intensiva, podendo também ser utilizado como anti-convulsivo.<sup>43</sup> Esta benzodiazepina é metabolizada pelo Citocromo P450 3A5 (CYP3A5) e principalmente por CYP3A4.<sup>43</sup> O diazepam é uma benzodiazepina com vários usos clínicos, incluindo o controlo da ansiedade, insónia, espasmos musculares, convulsões e abstinência alcoólica.<sup>44</sup> O diazepam é também útil como tratamento adjuvante no alívio de espasmos agudos dos músculos esqueléticos<sup>44</sup>, sendo

principalmente metabolizado pelo CYP2C19 e pelo CYP3A4.<sup>43</sup> Por fim, o lorazepam é uma benzodiazepina usada para aliviar os sintomas de ansiedade.<sup>45</sup> O metabolismo do lorazepam é principalmente por glucuronidação, sendo a UDP-glucuronosiltransferase 2B15 (UGT2B15) a principal enzima responsável. Esta substância não é um substrato de CYP450 nem indutor ou inibidor desta enzima. Os efeitos adversos mais comuns do consumo de benzodiazepinas incluem ataxia, tontura, sonolência, fadiga muscular e reações lentas. As complicações com o uso prolongado desta substância incluem falta de concentração, dependência, tolerância e overdose.<sup>42</sup> Um estudo teve como objetivo investigar a redução do uso de benzodiazepinas em pacientes com canábis medicinal prescrito. Entre os 146 pacientes que começaram a terapia com canábis medicinal, 45,2% tiveram sucesso a interromperem a terapia pré-existente de benzodiazepinas. O conteúdo de  $\Delta$ 9-THC e CBD no canábis usado não diferenciou entre os pacientes que continuaram relativamente aos que descontinuaram as benzodiazepinas. Assim, este estudo apoia e sugere a exploração do interesse terapêutico do canábis medicinal.<sup>46</sup> As benzodiazepinas e os canabinóides, principalmente o CBD, partilham alguns efeitos terapêuticos como propriedades ansiolíticas e anticonvulsivas.<sup>28,43,44</sup> Desta forma, é possível que estas duas substâncias se complementem no combate a algumas patologias ou então, como descrito no estudo anterior, a possibilidade do canábis medicinal ser uma alternativa às benzodiazepinas. Contudo, o metabolismo do midazolam, do diazepam, do  $\Delta$ 9-THC e do CBD envolvem as enzimas CYP2C19 e CYP3A4<sup>21,26,43</sup> e, sendo o CBD e o  $\Delta$ 9-THC, em determinadas concentrações, inibidores destas enzimas<sup>21,47</sup>, o consumo simultâneo destas substâncias com canábis rico em  $\Delta$ 9-THC e/ou CBD pode interferir com a eficácia destas enzimas. De salientar que, quando a concentração de  $\Delta$ 9-THC é superior a 15% em relação à concentração de CBD, o canábis é considerado rico em  $\Delta$ 9-THC.<sup>48</sup>

As evidências sugerem que o consumo de canábis pode aumentar o risco de transtornos mentais.<sup>49</sup> Contudo, o canábis é um recurso bastante utilizado para gerir sintomas da depressão.<sup>40</sup> Por sua vez, os antidepressivos são uma classe de medicamentos utilizados para tratar principalmente distúrbios depressivos, mas também transtornos de ansiedade e insónias, uma vez que provocam sonolência.<sup>50</sup> Os efeitos adversos mais comuns são boca seca, náuseas, tonturas e tensão baixa, mas também podem provocar aumento da frequência cardíaca, tremores e retenção urinária. Em animais, o  $\Delta$ 9-THC e o CBD mostraram ter efeitos antidepressivos.<sup>51</sup> Num estudo com 1429 consumidores de canábis medicinal, mais de 50% reportou usar canábis medicinal para combater a depressão.<sup>52</sup> Deste modo, assim como nas benzodiazepinas, o consumo simultâneo de

canábis com antidepressivos pode aumentar a resposta terapêutica e o consumo de canábis medicinal poderá eventualmente ser um substituto dos antidepressivos. O antidepressivo que vai ser evidenciado neste trabalho é a fluvoxamina que é utilizada para o tratamento da depressão e do transtorno obsessivo-compulsivo.<sup>53</sup> Este antidepressivo é um inibidor das enzimas CYP1A2, CYP3A4<sup>53</sup>, CYP2C19<sup>54</sup> e CYP2C9<sup>47</sup> que, por sua vez são as enzimas responsáveis pela metabolização do  $\Delta$ 9-THC e do CBD.<sup>21,26</sup> Desta forma, o consumo simultâneo de canábis rico em  $\Delta$ 9-THC e/ou CBD pode trazer benefícios terapêuticos, mas, mais uma vez, interferir com a eficácia da metabolização dos canabinóides e da fluvoxamina.

A epilepsia é o nome de um distúrbio cerebral caracterizado por uma predisposição duradoura para gerar crises epiléticas e pelas alterações neurobiológicas, cognitivas, psicológicas e consequências sociais dessa condição.<sup>55</sup> Um ataque epilético é uma ocorrência transitória de sinais e/ou sintomas devido a alterações excessivas da atividade neuronal no cérebro. A definição de epilepsia requer a ocorrência de pelo menos um ataque epilético. Um antiepilético é utilizado para prevenir crises epiléticas e convulsivas, mas também pode ser prescrito na terapêutica de transtornos bipolares.<sup>56</sup> Os efeitos colaterais mais comuns são dor de cabeça, visão dupla ou turva, erupção cutânea, distúrbio de sono, tonturas, cansaço e mudanças de humor. A resistência a medicamentos antiepiléticos, que afeta cerca de 25% dos pacientes epiléticos, provoca um aumento no número de convulsões.<sup>57</sup> Como consequência do mau controle sobre crises epiléticas, os pacientes apresentam um risco aumentado de morte precoce, trauma e alterações psicossociais enquanto que a sua qualidade de vida é diminuída. A detecção precoce da resistência a medicamentos antiepiléticos é crucial para estabelecer possíveis alternativas de tratamento, como a politerapia, que tem o objetivo de encontrar combinações de antiepiléticos que aumentem a eficácia do tratamento e diminuam os efeitos adversos.<sup>57</sup> Uma vez que o CBD tem propriedades anticonvulsivas<sup>28</sup> pode ser útil incorporar esta substância em novos tratamentos e auxiliar no combate à resistência a medicamentos antiepiléticos. A lamotrigina, que vai ser evidenciada neste trabalho, é um medicamento antiepilético que tem sido amplamente utilizada para o controle de convulsões em adultos e em crianças em monoterapia ou em combinação com outros antiepiléticos.<sup>58</sup> A lamotrigina é catalisada pela UDP-glucuronosiltransferase 2B7 (UGT2B7) e pela UDP-glucuronosiltransferase 1A4 (UGT1A4) não sendo um substrato de CYP450 nem indutor ou inibidor desta enzima.<sup>58</sup> Porém, o CBD mostrou ter efeitos inibitórios na enzima UGT2B7.<sup>59</sup> Deste modo, apesar do CBD e da lamotrigina terem ambas propriedades

anticonvulsivas, o seu consumo simultâneo pode aumentar a biodisponibilidade da lamotrigina, e, assim, potenciar os seus efeitos adversos.

As substâncias estudadas, nomeadamente o midazolam, o diazepam, a lorazepam, a fluvoxamina e a lamotrigina têm efeitos terapêuticos semelhantes ao CBD e  $\Delta 9$ -THC. Porém, as enzimas responsáveis pelo metabolismo de todas estas substâncias são essencialmente as mesmas. Tendo o CBD, o  $\Delta 9$ -THC e a fluvoxamina propriedades inibitórias, o consumo simultâneo de canábis com as substâncias medicamentosas referidas anteriormente pode causar inibição do metabolismo, o que poderá aumentar a biodisponibilidade das substâncias, os seus efeitos adversos e a sua toxicidade.

#### 1.4. Canábis na condução

As alterações de vários aspetos cognitivos e funções psicomotoras, particularmente o tempo de reação, a coordenação neuromotora, a tomada de decisão e a concentração, acompanhar as linhas da estrada, o aumento da variabilidade da posição na estrada, a impulsividade e a diminuição da capacidade de manter um progresso constante enquanto segue outro carro são as mais afetadas com a administração de  $\Delta 9$ -THC<sup>60</sup> e o comprometimento destas ações estão relacionados com a dose.<sup>61</sup> Todos estes comportamentos mencionados interferem com a condução e, por isso, o nível de  $\Delta 9$ -THC no sangue está correlacionado com a eficácia da condução.

Além da relação entre o  $\Delta 9$ -THC e a condução, o CBD, em certas doses, tem propriedades sedativas o que pode causar dificuldades na condução.<sup>62</sup> A título de exemplo, desde a implementação do canábis medicinal em 2000, o estado do Colorado (EUA) observou um aumento do número de casos de condução sob influência de canábis.<sup>62</sup> Além disso, o número de acidentes fatais com condutores positivos para canabinóides também aumentou nos estados com canábis medicinal legalizado enquanto que não houve mudança no número de acidentes em estados com canábis medicinal ilegal. Curiosamente, em pacientes positivos para canabinóides, os pacientes feridos tendem a ser mais novos do que os pacientes não feridos.<sup>61</sup> Um outro estudo foi realizado para comparar os efeitos na condução sob influência de canábis rico em  $\Delta 9$ -THC (11%  $\Delta 9$ -THC e <1% CBD) e canábis com concentrações equivalentes de  $\Delta 9$ -THC/CBD (11%  $\Delta 9$ -THC e 11% CBD).<sup>63</sup> Este estudo concluiu que o canábis com  $\Delta 9$ -TCH/CBD aparentemente não é menos prejudicial na condução do que o canábis rico em  $\Delta 9$ -THC. Ou seja, o canábis com  $\Delta 9$ -THC/CBD causa efeitos semelhantes de comprometimento da condução e da cognição, como redução da confiança e capacidade reduzida de seguir um

carro. Além disso, o pico máximo de  $\Delta 9$ -THC no plasma foi mais elevado no canábis com concentrações equivalentes de  $\Delta 9$ -THC/CBD do que no canábis rico em  $\Delta 9$ -THC, o que sugere que o CBD pode aumentar a concentração de  $\Delta 9$ -THC no sangue. Estes resultados são particularmente significativos para indivíduos que consomem canábis medicinal ou recreativo contendo  $\Delta 9$ -THC e CBD.<sup>63</sup> Assim, apesar do  $\Delta 9$ -THC ser a molécula mais apontada na planta de *Cannabis sativa* como prejudicial em vários processos na condução de veículos motorizados, as propriedades sedativas do CBD não isentam esta molécula de interferir na capacidade de condução dos consumidores de canábis.

O álcool, combinado com outras drogas, provoca um maior declínio no desempenho psicomotor do que quando a substância é utilizada sozinha.<sup>61</sup> Consequentemente, a probabilidade de um acidente de viação com interação entre álcool e canábis é 4,4 vezes superior à probabilidade de um acidente com o consumo das duas substâncias separadamente. No estudo realizado por Cherpitel *et al.*, o risco de provocar um acidente de viação foi apenas significativo para consumo de álcool combinado com canábis ou para consumo de apenas álcool, não sendo, portanto, elevado para consumo de apenas canábis.<sup>61</sup> O canábis foi também a droga com maior probabilidade de ser consumida em conjunto com álcool com 52% dos pacientes feridos que consumiram canábis relatando consumir álcool em simultâneo. Há, portanto, uma probabilidade de os feridos positivos para canábis terem sofrido um acidente devido ao excesso de consumo de álcool e não tanto devido ao consumo de canábis. Um outro estudo concluiu que em acidentes de viação, durante 19 meses na cidade de São Paulo, Brasil, o álcool foi a substância mais consumida, seguida da cocaína e da canábis.<sup>64</sup> A percentagem de prevalência de canábis foi sempre inferior à do álcool e da cocaína, porém também expressiva. O canábis prevaleceu relativamente a outras drogas em 19,6 % dos casos de acidente de viação, em 19,2% dos casos de homicídios, em 2,3% dos casos de suicídio e em 28,6% dos casos de envenenamento. Ao contrário do esperado, a prevalência de acidentes de viação foi superior com o consumo apenas de canábis do que na combinação de álcool e de canábis.<sup>64</sup> Os dois estudos contrariam-se, o que mostra que ainda há dúvidas sobre a real influência da ingestão de canábis e álcool separadamente ou ingestão conjunta destas substâncias e o risco de um acidente de viação. Porém, apesar de ainda não ser bem definido se o risco de acidente é superior no consumo conjunto de álcool e canábis ou no consumo destas substâncias separadamente, podemos concluir que a ingestão de álcool

e/ou consumo de canábis afetam a capacidade de condução de um indivíduo e, por isso, eleva o risco de um acidente por parte destes.

Deste modo, o  $\Delta^9$ -THC e o álcool são duas substâncias que influenciam categoricamente a capacidade de condução. O CBD, devido às suas propriedades sedativas, é uma molécula que poderá também ter influência na condução, sendo necessários mais estudos para o confirmar.

### **1.5. Determinação analítica do CBD e de outros fitocanabinóides**

As amostras biológicas mais utilizadas em laboratórios forenses para verificar o uso passado ou presente de drogas ilícitas, incluindo os canabinóides, são a urina, o sangue (sangue total, plasma e soro) e o cabelo<sup>65</sup>. Normalmente é realizado um rastreio através de um teste de imunoensaio para a presença de canabinóides e apenas os resultados positivos devem ser confirmados por GC/MS (Cromatografia Gasosa associada a Detecção por Espectrometria de Massa) ou LC/MS (Cromatografia Líquida associada a Detecção por Espectrometria de Massa)<sup>66</sup>. Os anticorpos utilizados atualmente nos ensaios imunoquímicos normalmente reagem com o THC-COOH caso a amostra seja a urina<sup>67</sup> e com o THCA caso a amostra seja sangue, podendo ter reação cruzada com o  $\Delta^9$ -THC e outros metabolitos.<sup>68</sup> Porém, não há muitos estudos sobre o desenvolvimento de ensaios imunoquímicos para o CBDA ou o CBD. Todavia, num estudo realizado por Tanaka, verificou-se que o anticorpo monoclonal MAb-4A4 reagiu contra o THCA e teve reação cruzada com o  $\Delta^9$ -THC, o CBDA e o CBD, tornando este anticorpo potencialmente útil para a determinação destes canabinóides.<sup>68</sup>

Os fitocanabinóides encontram-se em matrizes complexas e, por isso, normalmente é necessário um tratamento da amostra preliminar à análise cromatográfica.<sup>66</sup> Assim, quando a amostra é urina, é necessária uma hidrólise, e no caso de a amostra ser sangue é necessário proceder à sua desproteinização. De seguida, efetua-se uma extração dos analitos a partir da matriz biológica, geralmente por Extração Líquido-Líquido (LLE) ou Extração em Fase Sólida (SPE), e derivatização, caso a análise cromatográfica seja por GC/MS.<sup>66</sup> As técnicas mais utilizadas para a separação e a quantificação de canabinóides em amostras de planta, sangue e urina são a Cromatografia Gasosa (GC) combinada com Detecção de Ionização de Chama (FID) ou com Espectrometria de Massa (MS), e a Cromatografia Líquida (LC) com deteção por Ultravioleta (UV) ou por MS.<sup>16</sup> Em 2009, o Gabinete das Nações Unidas Contra a Droga e Crime reportou o GC/MS e o GC/FID (Cromatografia Gasosa associada a Detecção por

Ionização de Chama) como os métodos recomendados para a análise de canabinóides em produtos de canábis.<sup>19</sup> A título de exemplo, outros métodos alternativos para a determinação de canabinóides na planta de canábis são o UHPSFC (Cromatografia por Fluídos Supercríticos de Ultra Alta Eficiência) com detecção UV ou MS, <sup>1</sup>H NMR (Ressonância Magnética Nuclear de Protões) e IMS (Espectrometria por Mobilidade Iônica) com detecção MS.<sup>69</sup> Na Tabela 1 estão reportados os métodos analíticos validados para quantificação de CBD e outros fitocannabinóides em várias matrizes, nos últimos 6 anos.

### 1.5.1 Métodos de extração

A extração separa da forma mais seletiva e completa possível as substâncias de interesse de uma matriz complexa, dissolvendo-as num solvente adequado para o efeito.<sup>70</sup> Na escolha do método de extração deve-se avaliar a eficiência, a estabilidade da amostra e os custos envolvidos. Como já referido, os canabinóides são lipofílicos e, por isso, encontram-se no plasma ligados a lipoproteínas.<sup>65</sup> Assim, como referido anteriormente, para a detecção de fitocannabinóides e dos seus metabolitos em matrizes como o sangue, o suor e o cabelo é necessário um passo de desproteinização que pode ser realizado com ácido fórmico em metanol ou com acetoneitrato gelado. Quando a amostra é cabelo, são necessários passos extra pré-extração nomeadamente uma lavagem para eliminar possíveis contaminações externas e um passo de digestão para libertar os analitos da matriz.<sup>65</sup>

A etapa de extração dos canabinóides nas matrizes biológicas precisa de ser altamente reprodutível, eficiente, seletiva e deve eliminar possíveis interferências da matriz,<sup>65</sup> sendo a SPE (Extração em Fase Sólida) e a LLE (Extração Líquido-Líquido) os métodos mais utilizados de momento nos laboratórios forenses em amostras de sangue e urina.<sup>71</sup> No método de extração SPE, os compostos alvo são absorvidos/retidos sobre um material estacionário de fase sólida, permitindo que os compostos fiquem fortemente concentrados, sendo por isso particularmente adequado para amostras de fluídos biológicos onde as concentrações de canabinóides são baixas.<sup>71</sup> O método de extração LLE é baseado na separação de compostos tendo como princípio as suas diferentes solubilidades. Contudo, tem maior dificuldade em quantificar canabinóides em baixas concentrações.<sup>65</sup> Além disso, a SPE é um método que permite uma mais fácil automação e uma maior capacidade de purificação comparativamente a LLE.<sup>65,18,71</sup> Nos artigos consultados, onde as matrizes foram plasma e cabelo, o método de extração mais

**Tabela 1** Visão geral de métodos analíticos validados para quantificação de CBD e outros fitocanabinóides em várias matrizes, nos últimos 6 anos.

Ref	Matriz	Técnica	Extração	Derivatização	Analitos	Ano
69	Planta	HPLC-DAD	---	Não realizado	$\Delta$ 9-THC, CBD, CBN, THCA, CBDA	2019
72	Planta	fast-HPLC-DAD	SLE	Não realizado	$\Delta$ 9-THC, CBD, CBN, THCA	2018
73	Planta	HPLC-MS/MS	SFE	Não realizado	THCA, THC, CBD, THCV, CBG, CBN	2014
74	Planta	GC-MS	---	BSTFA	$\Delta$ 9-THC, CBD, CBDA, THCA, CBN	2018
75	Planta	HPLC-DAD	---	Não realizado	$\Delta$ 9-THC, CBD, CBDA, THCA, CBN	2018
76	Planta	HPLC-UV	SFE	Não realizado	$\Delta$ 9-THC, CBD, CBDA, THCA, CBN	2016
17	Planta	UHPLC-MS	---	Não realizado	CBDA, CBGA, CBG, CBD, THCV, CBN, $\Delta$ 9-THC, $\Delta$ 8-THC, CBC, THCA	2017
19	Resina	UHPLC-DAD	SFE	Não realizado	$\Delta$ 9-THC, CBD, CBDA, THCA, CBN, CBC	2019
16	Cânhamo	fast-GC-MS	---	MSTFA-TMCS	$\Delta$ 9-THC, CBD, CBDA, THCA, CBN, THCV, CBG, CBC, CBGA, $\Delta$ 8-THC	2018
77	Plasma	GC-MS/MS	LLE	MSTFA	$\Delta$ 9-THC, THC-COOH, 11-OH-THC, CBD	2017
78	Plasma	UHPLC-MS/MS	---	Não realizado	$\Delta$ 9-THC, 11-OH-THC, THC-COOH, CBD	2017
79	Cabelo	GC-MS/MS	LLE	MSTFA	$\Delta$ 9-THC, 11-OH-THC, CBN, CBD	2018
18	Sangue total	LC-MS/MS	SPE	Não realizado	$\Delta$ 9-THC, 11-OH-THC, THC-COOH, CBD, CBN, CBG, THCV, THCV-COOH	2016
80	Sangue total	LC-MS/MS	SPE	Não realizado	$\Delta$ 9-THC, 11-OH-THC, THC-COOH, CBD, CBN, CBG, THCV	2019
81	Sangue total	LC-MS/MS	---	Não realizado	$\Delta$ 9-THC, 11-OH-THC, THC-COOH, CBD	2018
82	Sangue total	LC-MS/MS	---	Não realizado	$\Delta$ 9-THC, 11-OH-THC, THC-COOH, CBD, CBN, THCA	2017

"---" - Não divulgado; SLE-Extração Sólido-Líquido; SFE-Extração de Fluidos Supercríticos; LLE- Extração Líquido-Líquido; SPE-Extração em Fase Sólida; MSTFA- N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida; BSTFA- N,O-bissililtrifluoroacetamida; TMCS-Trimetilclorosilano.

escolhido foi a LLE, que se mostrou eficaz na separação dos diferentes fitocanabinóides.<sup>77,79</sup> Na matriz de sangue total, o método de extração escolhido foi a SPE.<sup>18,80</sup>

Na extração de fitocanabinóides em plantas, como as amostras são sólidas, a maioria dos autores dos artigos referidos na Tabela 1 optou pelo método de Extração por Fluídos Supercríticos (SFE)<sup>19,73,76</sup> e, apenas num artigo, os autores optaram pelo método de Extração Sólido-Líquido (SLE).<sup>72</sup> De facto, a SFE é um método de extração eficiente para extrair fitocanabinóides e terpenos da inflorescência do canábis e para separar terpenos de fitocanabinóides, pois envolve o uso de um solvente apropriado com alta afinidade por fitocanabinóides.<sup>65</sup> Assim, tendo por base a bibliografia, os métodos revistos e a baixa concentração de canabinóides em matrizes biológicas, a SPE e a SFE são os métodos mais eficientes para a extração de fitocanabinóides em amostras de fluídos biológicos e de plantas, respetivamente.

### **1.5.2 Métodos analíticos**

Na escolha do método analítico deve-se ter em consideração a quantidade de amostra disponível, as possíveis interferências e contaminações, a exatidão e a precisão do método, o tempo, o custo e a finalidade da análise.<sup>83</sup> O método analítico deve permitir que as substâncias-alvo e os seus metabolitos sejam separados, identificados e quantificados, sendo o GC e o LC os métodos de separação cromatográficos mais utilizados em química analítica.

Os terpenos são moléculas que apenas podem ser analisadas em amostras de plantas.<sup>76</sup> No entanto, o método LC não permite a determinação de terpenos nos extratos de plantas devido à alta volatilidade da molécula (LC é um método mais indicado para compostos com alta polaridade e baixa volatilidade)<sup>76</sup> sendo, por isso, maioritariamente analisados por GC.<sup>84</sup> Em relação aos canabinóides, apesar da maioria ter características estruturais muito semelhantes, existem várias fases estacionárias disponíveis para GC que são capazes de separar a maioria desses compostos.<sup>65,72</sup>

Outro método bastante utilizado para a separação de canabinóides é a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).<sup>65</sup> O HPLC oferece versatilidade com uma mínima preparação da amostra sendo um método sensível, específico e de fácil operação.<sup>2</sup> Contudo, um dos maiores desafios da análise por LC são os componentes que podem co-eluir com o analito, tendo sido os fosfolípidos identificados como os principais componentes, num fenómeno denominado efeitos da matriz (ausentes na análise por

GC).<sup>84</sup> Deste modo, os efeitos da matriz dificultam o desenvolvimento e validação dos métodos envolvendo análises por LC com principal impacto na exatidão, na precisão e na robustez. Existe ainda o método baseado na Ultra Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (UHPLC), com o mesmo princípio que o método HPLC, que tem sido utilizado para melhorar a separação de canabinóides e reduzir o tempo de análise.<sup>19,17</sup>

Existem vários detetores que podem ser acoplados aos métodos cromatográficos GC e LC.<sup>19</sup> Contudo, o detetor MS, o detetor UV, o detetor FID e, em algumas situações, o detetor DAD (*do inglês, Diode Array Detector*) são os detetores mais utilizados quando se utilizam os métodos cromatográficos acima descritos para a detecção de canabinóides em amostras biológicas. Comparativamente à detecção por DAD, a MS é um método mais sensível, pois tem a vantagem de detetar e de quantificar os canabinóides que se encontram em baixas concentrações como o CBG e o CBC e, enquanto que o MS pode ser acoplado a GC e a LC, o DAD só pode ser acoplado a LC.<sup>19</sup> Além disso, a MS melhora a seletividade da análise devido à elevada sensibilidade e elevado poder de resolução com resultados precisos, sensíveis e exatos.<sup>19,71</sup> O detetor UV, que só pode ser acoplado a LC, é um método mais simples e barato.<sup>84</sup> Contudo, em relação aos sistemas MS, o UV é menos específico. O detetor UV tem outras desvantagens, relacionadas com a baixa especificidade e, por isso, é pouco usado para amostras de fluidos corporais, uma vez que não permite discriminar os canabinóides neutros como o CBG e o CBD.<sup>65</sup> Apesar das desvantagens em relação à MS, o detetor UV e o detetor DAD são os mais escolhidos pelos autores da Tabela 1 para a análise com LC de canabinóides em plantas, onde a quantidade de canabinóides é elevada.<sup>19,17,72,69,75</sup> Tal ocorre porque o detetor UV e o detetor DAD têm custo reduzido e baixa manutenção do equipamento comparativamente à MS, sendo assim as escolhas para uma simples análise de rotina em amostras de planta, especialmente de resina.<sup>65</sup> Por fim, o detetor FID, que apenas pode ser acoplado a GC, tem uma resposta quantitativa mais precisa que a MS e é utilizada na detecção de canabinóides em plantas. Porém, a MS permite uma maior especificidade que o FID e a sensibilidade da GC-FID é significativamente menor do que a sensibilidade em GC-MS.<sup>65</sup> Como se pode constatar na Tabela 1, o detetor mais utilizado para amostras de fluidos corporais foi o MS pelos motivos acima descritos.

Nos métodos analíticos existem algumas formas de diminuir o tempo ou aumentar a eficácia da análise.<sup>16</sup> Uma das técnicas por vezes aplicadas são as medições rápidas “*fast*”. Nas medições *fast* como o *fast*-GC-MS e o *fast*-HPLC-DAD, o tempo de análise diminui drasticamente, com a possível separação eficaz dos compostos canabinóides em

menos de 5 minutos, sem comprometer os critérios de validação como a sensibilidade, a resolução, a repetibilidade e a reprodutibilidade.<sup>16,72</sup> Outra via para o aumento da eficácia da análise é o uso de Espectrometria de Massa em *tandem* (MS/MS) que aumenta a especificidade na determinação de canabinóides quando os analitos são extraídos de uma matriz complexa.<sup>84</sup> Uma das geometrias de analisadores possíveis para a análise por MS/MS é a detecção com um Triplo Quadrupolo (QQQ), que faz uso de dois quadrupolos e de uma câmara de colisão.<sup>73</sup> Esta geometria tem excelente sensibilidade e seletividade na quantificação de analitos. Todavia, é recomendado o uso de padrão interno quando há detecção por MS.<sup>71</sup> Para detecções mais sensíveis de canabinóides e de forma a minimizar os efeitos da matriz e obter dados mais precisos, são propostos como padrões internos os canabinóides deuterados, como por exemplo o  $\Delta^9$ -THC-D<sub>3</sub>.

As técnicas de GC-MS/MS e LC-MS/MS foram as mais escolhidas nos artigos revistos para a análise de amostras de fluídos corporais. Por outro lado, vários autores defendem que o melhor método para a determinação qualificativa e quantitativa de canabinóides em plantas e amostras biológicas é o GC-MS e o GC-MS/MS.<sup>85</sup> Nestas técnicas a ionização normalmente é por Impacto Eletrónico (EI) e gera espectros de massa que podem ser comparados com bases de dados espectrais para identificação, fornecendo dados mais úteis para a identificação e a quantificação de canabinóides em várias matrizes. Além disso, foram desenvolvidos novos métodos de derivatização, novos métodos de ionização, como detetor ultravioleta a vácuo e detetor infravermelho, e modelos matemáticos para otimização do método resultando num domínio de análises de canabinóides por GC-MS na última década.<sup>85</sup> Na técnica do LC-MS a ionização é por *Electrospray* (ESI) ou por Ionização Química à Pressão Atmosférica (APCI) e apenas são gerados iões moleculares sem outros fragmentos úteis para a caracterização dos compostos (ao contrário do GC/MS).<sup>16</sup> Para isso é obrigatoriamente necessário um instrumento com capacidade de análise MS/MS, sendo o equipamento mais caro.<sup>84</sup> Por outro lado, no GC-MS tem de existir um maior cuidado com os compostos termicamente instáveis como o THCA e o CBDA<sup>72</sup>, como descreveremos no subcapítulo 1.5.2.1. Assim, alguns laboratórios tendem a preferir a análise de canabinóides por LC, pois a derivatização pode ser evitada.<sup>84</sup>

#### **1.5.2.1. Derivatização de canabinóides ácidos para análise utilizando GC-MS**

A derivatização é uma reação química que modifica os compostos-alvo, de modo a melhorar as suas propriedades cromatográficas e/ou a eficiência de separação, de forma

a facilitar a separação cromatográfica e a respetiva quantificação.<sup>86</sup> É um processo que tem como objetivo aumentar a volatilidade (apenas quando é utilizado a técnica GC) e a estabilidade térmica, otimizar a recuperação e melhorar a separação dos analitos, sendo, no entanto, dispendioso e demorado. Se o detetor escolhido for o MS, a derivatização pode também modificar o padrão de fragmentação, tornando-o mais específico da molécula e facilitar a ionização.

As amostras de canábis, quando são introduzidas no GC, sofrem uma descarboxilação, devido às altas temperaturas na porta de injeção necessárias para a vaporização das amostras e, conseqüentemente, apenas os canabinóides descarboxilados podem ser medidos diretamente por técnicas de GC.<sup>71</sup> Para determinar os ácidos presentes numa amostra com análise por GC/MS é necessário uma etapa de derivatização, para prevenir a descarboxilação anterior. Desta forma, os grupos funcionais como o -COOH e o -OH podem ser derivatizados, de forma a aumentar a estabilidade térmica e a volatilidade dos canabinóides e dos seus metabolitos.<sup>72,71</sup> Adicionalmente, o aumento da volatilidade dos compostos melhora a forma do pico durante a análise GC/MS.<sup>84</sup> Na derivatização para análise por GC, normalmente é usado como agente a N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida (MSTFA) ou o N,O-bissililtrifluoroacetamida (BSTFA)/MSTFA combinado com o Trimetilclorosilano (TMCS) ou com o acetato de etilo.<sup>16</sup> Recorrendo à Tabela 1, podemos confirmar que foi realizado um passo de derivatização em todas as análises por GC/MS.<sup>16,21,77,79,74</sup> A derivatização é, por isso, essencial em GC/MS para possível deteção de canabinóides ácidos e assim, por exemplo, distinguir medicamentos com  $\Delta^9$ -THC (com apenas  $\Delta^9$ -THC puro) e canábis recreativo (contêm  $\Delta^9$ -THC, THCA e outros canabinóides).

A derivatização também pode ser utilizada nas análises LC/MS ou HPLC/MS para melhorar a detetabilidade de um composto, introduzindo um grupo com maior afinidade eletrónica, que pode produzir um aumento na eficiência e seletividade de ionização por MS, facilitar a compreensão da estrutura, melhorar a separação cromatográfica e permitir uma análise mais sensível.<sup>71,87</sup> Além disso, os reagentes da derivatização também produzem moléculas derivatizadas com um espectro de massa muito característico, que pode ser relevante para posterior identificação.<sup>71</sup>

## 1.6. Objetivos

Nos últimos anos, o interesse por parte dos investigadores no canábis medicinal aumentou. As evidências científicas, embora limitadas, de que o CBD tem propriedades

terapêuticas tem interessado não apenas só cientistas, como empresários e políticos. Na bibliografia é relatado o uso eficaz de medicamentos à base de CBD e à base de CBD e  $\Delta$ 9-THC no alívio de sintomas de diversas patologias. A projeção do canábis medicinal no mercado, o seu potencial terapêutico e consequente aumento do consumo humano conduzem o CBD a um contexto de atenção redobrada por parte de todos os intervenientes do setor. Assim, torna-se necessário que existam estudos que englobem amostras com a presença de CBD.

Devido à pandemia provocada pelo novo coronavírus SARS-CoV-2 e a problemas técnicos com aparelhos de cromatografia, não foi possível realizar o trabalho prático que estava previsto. Desta forma, este trabalho baseia-se na análise estatística e descritiva de amostras cujas quantificações foram realizadas pelos profissionais INMLCF, I.P do departamento de toxicologia forense, realizadas em 2019. As amostras analisadas pertencem a amostras *post mortem*, a amostras provenientes de ações de fiscalização rodoviária e de clínica forense. As técnicas de confirmação qualitativa e quantificação das diferentes substâncias no sangue utilizadas neste estudo são variadas, nomeadamente HS/GC-FID (*do inglês, Headspace Gas Chromatography with Flame Ionization Detection*) para o etanol, LC-MS/MS e GC-MS para as substâncias medicamentosas, GC-MS/MS para os canabinóides e GC-MS para outras drogas de abuso como a benzoilecgonina, a MDA (3,4-metilenodioxianfetamina) e a MDMA (3,4-metilenodioximetanfetamina).

Face ao interesse de canábis para fins terapêuticos, existem estudos que relacionam o canábis com diversos fatores como a idade, o sexo, a incidência de acidentes de viação, o consumo de substâncias medicamentosas, entre outros. Contudo, a maioria destes estudos não inclui a deteção do CBD, apenas tem em consideração a presença de  $\Delta$ 9-THC e, por vezes, dos seus metabolitos. Desta forma, este trabalho tem dois objetivos principais, nomeadamente uma análise estatística e uma análise descritiva dos resultados de amostras com a presença dos canabinóides CBD,  $\Delta$ 9-THC, 11-OH-THC e THC-COOH e a sua relação com diversos fatores como a idade, o consumo de substâncias medicamentosas, incidência ou agravamento de outras patologias, outras drogas de abuso, acidentes fatais e acidentes não fatais, amostras *post mortem* e amostras de clínica forense. O terceiro objetivo é gerar hipóteses a ser testadas em estudos posteriores em que as amostras possam ser mais representativas e significativas.

## 2. Métodos

Neste trabalho vão ser apresentados e discutidos vários casos referentes a processos com origem na patologia forense (amostras *post mortem*), na clínica forense e na fiscalização em contexto de segurança rodoviária. O objetivo é realizar uma análise dos dados e uma descrição e interpretação sumarizada dos dados com resultados positivos para os canabinóides CBD,  $\Delta^9$ -THC, 11-OH-THC e THC-COOH. Os dados para este estudo foram recolhidos da base de dados do INMLCF, I.P, mais concretamente na Unidade Funcional da Delegação do Norte do Serviço de Química e Toxicologia Forenses. Estes dados são relativos a 2019 e todas as amostras deste estudo são positivas para CBD, THC, 11-OH-THC e THC-COOH, sendo que a quantificação de CBD foi um requisito obrigatório. Além disso, também foram fornecidas determinações e quantificações de outras substâncias em todos os sujeitos. Estas incluíram substâncias como cocaína, metanfetamina, benzodiazepinas, antidepressivos, antiepiléticos e etanol. Paralelamente, também foram facultados alguns dados como causa de morte, quando possível, o sexo e idade do individuo e patologias associadas, tais como a SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) e a tuberculose. Os casos de patologia forense são 16, os de clínica forense são 5 e de autoridade de segurança rodoviária são 3 (tabela 2).

Os dados foram analisados pelo programa PAST versão 4.02 para Windows.<sup>88</sup> A normalidade da distribuição de variáveis contínuas foi testada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os valores de concentração determinados em todas as análises foram normalizados na escala logarítmica antes da análise estatística. As variáveis com distribuição normal e as variáveis com distribuição não normal foram apresentadas com as respetivas médias, desvio-padrão, variância, mediana e intervalo interquartil. As médias de duas variáveis com distribuição normal foram comparadas pelo teste paramétrico t de student enquanto que o teste não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para comparar médias de dois grupos em que pelo menos um dos grupos não seguia distribuição normal. Também foram realizados testes de correlação, em que aos grupos das variáveis que seguem distribuição normal foi aplicado um teste de correlação de Pearson e foi aplicado um teste de correlação de Spearman quando pelo menos um dos grupos de variáveis envolvida não seguia distribuição normal. O nível alfa escolhido para definir significância estatística foi de 0,05.

**Tabela 2** Descrição da idade, do género, das concentrações dos canabinóides CBD, THC, 11-OH-THC e THC-COOH e etanol, origem da amostra, da causa de morte, de substâncias medicamentosas e patologias de indivíduos, em amostras recolhidas de patologia forense, de clínica forense e da autoridade de segurança rodoviária de casos referentes a 2019 e incluídos neste estudo.

Idade (anos)	28	52	D	20	50	39	49	44	22	59	34	28	D	52	62	47	28	1	1	2	2	35	26	52
Género	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	F	M	M	F	F	M	F	M
CBD (ng/mL)	1.1	2.7	1.5	2.3	1	1.9	5.9	1.5	2.4	1.1	1.7	1.81	1.7	4.4	1.1	2.1	1	-	1.5	17	10	1.7	1.6	1.6
$\Delta^9$ -THC (ng/mL)	13	14	8.6	6.4	6.5	8.2	19	12	17	12	16	16	7.9	12	9.4	15	3.6	3	11	-	-	8.4	7.2	6.1
11-OH-THC (ng/mL)	1.1	1.8	1.1	-	-	1.7	2.3	9.3	2.9	-	6.2	2.4	-	4.1	-	3	4.5	2.3	1.9	-	-	3.1	1.3	5.8
THC-COOH (ng/mL)	9.3	27	29	12	55	26	25	91	39	17	68	57	27	21	33	40	63	386	129	-	2	44	66	101
Etanol (g/L)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	1.81	1.99	1.99	0.1	N	N	N	N	-	-	-	1.81	-	1.04
Origem da amostra	PF	PF	PF	PF	PF	PF	PF	PF	PF	PF	CF	CF	CF	CF	CF	ASR	ASR	ASR						
Causa de morte	Na	Na	S	S	MS	LT	D	Na	LT	LT	LT	LT	LT	Na	D	LT	---	---	---	---	---	---	---	---
Outras substâncias	Mid	Dia	Dia	Lor	Lam	Flu	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	MD MA	N	N	N	N	N	N	B
Patologias	---	---	---	---	---	---	SIDA	T	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

"---" Informação desconhecida/inexistente; "--" não foi requerido; N-negativo; S-suicídio; Na-natural; B-benzoilecgonina; MS-morte súbita; LT- lesão traumática; Mid-midazolam; Dia-diazepam; Lor-lorazepam; Lam-Lamotrigina; Flu-fluvoxamina; T-tuberculose; SIDA-síndrome da imunodeficiência adquirida; MDMA-3,4-metilenodioximetanfetamina; PF-patologia forense; CF-clínica forense; ASR-autoridade de segurança rodoviária

### 3. Resultados e discussão

#### 3.1. Análise estatística

##### 3.1.1. Influência da idade na concentração de canabinóides no sangue

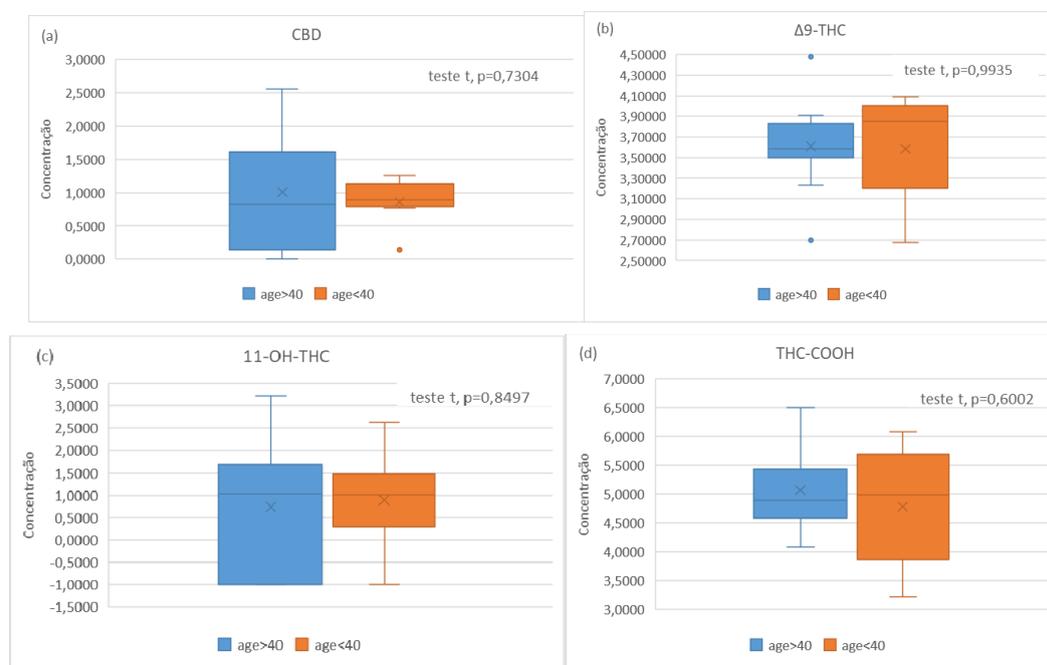
O uso, o abuso e a dependência de substâncias ilícitas não se limitam a um grupo de idade específico, sendo o envelhecimento muitas vezes caracterizado por problemas sociais, psicológicos e de saúde, que por sua vez são fatores de risco para abuso e dependência de drogas.<sup>89</sup> A prevalência de abuso ou dependência de drogas ilícitas em pessoas com 50 anos ou mais é baixo. No entanto, o uso de canábis recreativo é de 4% na faixa etária de 50 a 64 anos em comparação com 0,7% no grupo com mais de 65 anos. Deste modo, a questão de abuso de substâncias ilícitas é um problema menos implantado em idades mais avançadas, do que em indivíduos com menor idade, uma vez que a maioria dos consumidores de canábis recreativo se situam numa faixa etária mais nova.<sup>89,90</sup> Contudo, apesar de menos significativo, o consumo de canábis por parte de pessoas mais velhas existe e é maior do que o consumo de outras substâncias ilícitas.<sup>89</sup> A aprovação da legislação do canábis medicinal e a despenalização do canábis recreativo pode ter consequências na taxa de prevalência do consumo entre os adultos mais velhos. Assim, embora o consumo de canábis entre os adultos de maior faixa etária não seja muito significativo, estes podem usar o canábis para lidar com possíveis efeitos adversos de doenças associadas com o avanço da idade.<sup>89</sup> Em Portugal, segundo um inquérito nacional referente ao consumo de canábis pela população portuguesa entre os anos 2016 e 2017, 9.7% dos inquiridos com idades compreendidas entre os 15 e os 74 anos assumiram que consumiram canábis pelo menos uma vez na vida.<sup>91</sup> Nos 12 meses anteriores (entre 2016 e 2017) 8% dos inquiridos entre os 15 e os 44 anos consumiu canábis. Na faixa etária dos 45 a 54 anos esse consumo foi de 1.3%, dos 55 aos 64 anos foi de 0.5% e dos 65 a 74 anos foi de 0.2%. Além disso, a faixa etária com maior percentagem de consumo de canábis ao longo da vida foi dos 25 aos 34 anos. Por outro lado, a faixa etária dos 65 aos 74 anos foi a mais baixa.<sup>91</sup> Assim, na literatura é reportado que o abuso de substâncias ilícitas é menor quanto maior for a idade do indivíduo. Contudo, pouco artigos relacionam a idade com a concentração de canabinóides.<sup>92</sup> Deste modo, decidimos investigar se, na nossa amostra, a idade do indivíduo estava correlacionada com a concentração dos canabinóides no sangue. Para isso foram escolhidas as amostras de patologia forense, uma vez que é a categoria com maior volume de amostra. Uma vez que a média das idades dos indivíduos de patologia forense é de  $41,9 \pm 13,5$  anos (tabela 3) foi decidido formar dois grupos, um com amostras de indivíduos com mais de 40 anos e outro com amostras de

indivíduos com menos de 40 anos para cada um dos canabinóides em estudo (CBD, THC, 11-OH-THC e THC-COOH). Das 16 amostras disponíveis de patologia forense foram utilizadas 14, das quais 8 pertencem ao grupo de idade maior que 40 anos e 6 pertencem ao grupo com idade inferior a 40 anos. Das 16 amostras foram excluídos 2 indivíduos da análise pois a sua idade era desconhecida. Os dados de cada grupo de estudo e das variáveis em análise estão sumarizados na tabela 3.

**Tabela 3:** Estatística descritiva dos canabinóides CBD, THC, 11-OH-THC e THC-COOH, segundo a idade dos indivíduos, em amostras *post mortem*.

	CBD (>40)	CBD (<40)	THC (>40)	THC (<40)	OH (>40)	OH (<40)	COOH (>40)	COOH (<40)
N	8	6	8	6	8	6	8	6
Min	0.0009	0.1382	2.7005	2.6781	-0.9964	-0.9964	4.0875	3.2172
Max	2.5607	1.2632	4.2479	4.0875	3.2172	2.6323	6.5078	6.0875
Média	1.0081	0.8586	3.5813	3.5836	0.7374	0.8899	5.0668	4.7847
Variância	0.9396	0.1627	0.2141	0.3469	2.5428	1.5463	0.6204	1.3899
Des.padrão	0.9693	0.4034	0.4628	0.5889	1.5946	1.2435	0.7877	1.1789
Mediana	0.8279	0.8913	3.5849	3.8502	1.0250	1.0145	4.8996	4.9929
Q1	0.1382	0.6089	3.3207	2.9463	-0.9964	-0.1454	4.4552	3.4930
Q3	1.9614	1.2172	3.8820	4.0219	1.9230	1.8102	5.6665	5.8965

Na figura 4 encontram-se representados os gráficos das respetivas análises estatísticas dos dados da tabela 3.



**Figura 4:** Representação do teste t de student para 14 amostras *post mortem* das variáveis CBD (a), THC (b), 11-OH-THC (c) e THC-COOH (d), segundo a idade.

Como podemos confirmar na figura 4, o p-value de todos os testes t de student é superior a 0.05, o que significa que não existem diferenças significativas entre as médias dos 2 grupos e, por isso, aceita-se a hipótese nula. Assim, podemos concluir que, na nossa amostra, a idade não teve influência na concentração destes canabinóides no sangue de amostras *post mortem*. Um estudo realizado por *Jones et al.* comparou a idade de indivíduos apreendidos por conduzir sob influência de drogas com a concentração de  $\Delta 9$ -THC no sangue durante 10 anos.<sup>92</sup> Os autores concluíram que, naquele estudo, a idade não estava correlacionada com a concentração de  $\Delta 9$ -THC no sangue. O nosso estudo está em conformidade com o estudo anterior. Note-se que, em ambos há uma forte predominância masculina nos indivíduos estudados. Contudo, a idade média dos consumidores de canábis no estudo por *Jones et al.* é de  $33 \pm 9,4$  anos e no nosso é de  $41,9 \pm 13,5$  anos. Paralelamente, existe uma diferença bastante considerável entre o número total de amostras. Além disso, as amostras desse estudo são em indivíduos vivos enquanto que as nossas amostras são *post mortem*. Deste modo, apesar dos resultados do nosso estudo estar em conformidade com o estudo citado, não é possível retirar conclusões mais definitivas tendo em consideração as diferenças nomeadas acima.

### **3.1.2 Influência do consumo de medicamentos na concentração de canabinóides no sangue**

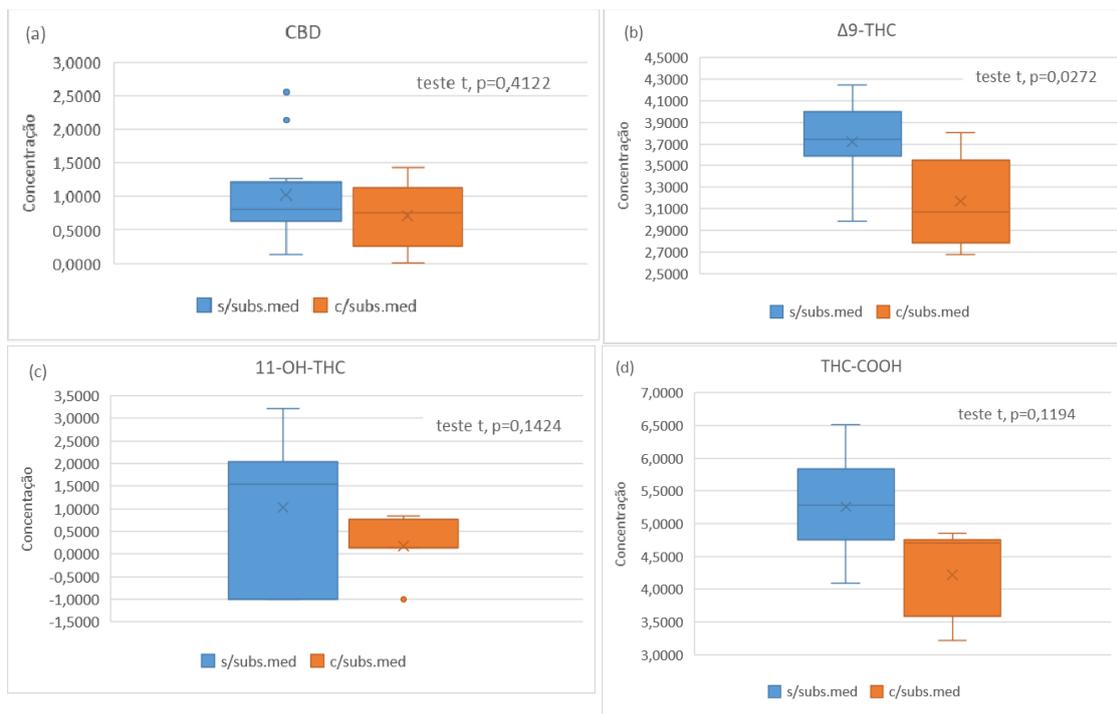
As enzimas do CYP450 são essenciais para o metabolismo de muitos medicamentos.<sup>54</sup> Estas enzimas podem ser inibidas ou induzidas por drogas, resultando em interações medicamentosas clinicamente significativas que podem causar reações adversas imprevistas ou falhas terapêuticas, sendo assim as drogas referidas como inibidores ou indutores. Deste modo, os inibidores bloqueiam a atividade metabólica de uma ou mais enzimas do CYP450 e, por sua vez, os indutores aumentam a atividade das enzimas, aumentando a sua síntese enzimática.<sup>54</sup> Como referido anteriormente no capítulo “Introdução”, as enzimas responsáveis pelo metabolismo do midazolam, do diazepam, do CBD e do  $\Delta 9$ -THC são essencialmente as mesmas, o CYP2C19, o CYP3A4<sup>21,26,43</sup>. O CBD, o  $\Delta 9$ -THC e a fluvoxamina têm propriedades inibitórias nas enzimas CYP2C19, CYP3A4, CYP2C9<sup>47,53,54</sup> e o CBD também mostrou ter efeitos inibitórios na enzima UGT2B7<sup>59</sup>, que catalisa a lamotrigina.<sup>58</sup> Deste modo, se o CBD e a fluvoxamina estiverem em concentrações suficientes, podem inibir o metabolismo do  $\Delta 9$ -THC em 11-OH-THC e em THC-COOH, o CBD pode diminuir a metabolização da lamotrigina e o  $\Delta 9$ -THC inibir o metabolismo do diazepam e do midazolam.

Apesar de ainda não ser consensual na comunidade científica, alguns estudos indicam relação direta entre o consumo de canábis e o consumo de antidepressivos e de benzodiazepinas, como o realizado por Rognli *et al.*<sup>49</sup> Neste estudo, os dados foram recolhidos a 2602 pessoas durante 14 anos e os autores concluíram que o consumo de canábis em idades precoces esteve associado a prescrições posteriores de estabilizadores de humor (nomeadamente benzodiazepinas) e antidepressivos e o risco de prescrição destes medicamentos é 5 vezes superior em indivíduos que consumam canábis.<sup>49</sup> Visto que nas amostras de patologia forense vários resultados apresentam um valor positivo para uma substância medicamentosa, nomeadamente benzodiazepinas (diazepam, midazolam e lorazepam), antidepressivos (fluvoxamina) e anti-epiléticos (lamotrigina), esta análise estatística teve como objetivo responder à questão: estará a concentração de canabinóides no sangue relacionada com a presença ou ausência destes medicamentos? Para isso, foram concebidos dois grupos, nomeadamente um com resultados positivos para pelo menos uma substância medicamentosa (diazepam, midazolam, lorazepam, fluvoxamina e lamotrigina) e outro com resultados negativos para qualquer substância medicamentosa. Desta forma foram utilizadas as 16 amostras disponíveis de patologia forense, entre as quais 10 não tinham qualquer vestígio quantificável de uma substância medicamentosa e 6 tinham pelo menos uma. Os dados de cada grupo de estudo e das variáveis em análise estão sumarizados na seguinte tabela 4.

**Tabela 4:** Estatística descritiva dos canabinóides CBD, THC, 11-OH-THC e THC-COOH, segundo a presença ou ausência de pelo menos uma substância medicamentosa, em amostras recolhidas *post mortem*.

	CBD (s/)	CBD (c/)	THC (s/)	THC (c/)	OH (s/)	OH (c/)	COOH (s/)	COOH (c/)
N	10	6	10	6	10	6	10	6
Mín	0.1383	0.0009	2.9819	2.6781	-0.9964	-0.9964	4.0875	3.2172
Max	2.5607	1.4331	4.2479	3.8074	3.2172	0.8483	6.5078	5.7814
Média	1.0282	0.7143	3.7212	3.1711	1.0482	-0.0170	5.1958	4.4828
Variância	0.6204	0.3313	0.1603	0.2345	2.3696	0.6656	0.5936	0.8712
Des.padrão	0.7877	0.5756	0.4003	0.4842	1.5394	0.8159	0.7704	0.9334
Mediana	0.8111	0.7558	3.7459	3.0699	1.3997	0.1382	5.1649	4.7276
Q1	0.4736	0.1039	3.4969	2.6949	-0.9964	-0.9964	4.5809	3.4930
Q3	1.4818	1.2596	4.0219	3.7272	2.1848	0.7865	5.8965	5.0888

Na figura 5 encontram-se representados os gráficos das respetivas análises estatísticas dos dados da tabela 4.



**Figura 5:** Representação do teste t de student das 16 amostras *post mortem* das variáveis CBD (a), THC (b), 11-OH-THC (c) e THC-COOH (d), segundo a presença ou ausência de pelo menos uma substância medicamentosa.

Os testes t de student das variáveis CBD, 11-OH-THC e THC-COOH têm um p-value superior a 0.05 e, por isso, não há diferenças significativas entre as concentrações destes canabinóides e a presença ou ausência de substâncias medicamentosas. No entanto, o teste t de student da variável Δ9-THC tem um p-value inferior a 0.05, o que significa que a média das concentrações de Δ9-THC é diferente nos dois grupos. Como podemos verificar na figura 5, os valores de concentração de Δ9-THC são muito diferentes nos dois grupos, sendo superiores no grupo sem substâncias medicamentosas. Além disso, os valores de mediana de ambos não é muito próxima. Como já descrito, as substâncias medicamentosas em estudo são as benzodiazepinas que ajudam no combate à ansiedade e insônias<sup>42</sup>, os antidepressivos que ajudam majoritariamente a combater distúrbios depressivos<sup>50</sup> e os anti-epiléticos que ajudam a combater crises epiléticas e convulsivas.<sup>56</sup> Muitas pessoas reportaram usar canábis recreativo para lidar com a ansiedade.<sup>93</sup> Contudo, utilizadores frequentes de canábis têm alta prevalência em transtornos de ansiedade e pacientes com transtornos de ansiedade têm altas taxas de consumo de canábis. Assim, embora os indivíduos relatem redução de ansiedade como motivação para o consumo de canábis, a ansiedade é dos efeitos adversos mais comuns da canábis.<sup>94</sup> O Δ9-THC parece diminuir a ansiedade em doses baixas e aumentar a ansiedade em doses elevadas.<sup>95</sup> Num

estudo em que os participantes foram acompanhados durante 3 anos, os resultados sugerem que o consumo de canábis rico em  $\Delta 9$ -THC não está associado a depressão ou ansiedade.<sup>96</sup> Em outro estudo também com o acompanhamento de 3 anos, os resultados mais uma vez não apoiam a associação entre o consumo de canábis e a incidência de depressão.<sup>97</sup> Por fim, também foi sugerido que o consumo de canábis recreativo na adolescência está associado a um aumento do risco de desenvolver depressões em idade adulta<sup>98</sup> mas não aumenta a probabilidade de desenvolver ansiedade.<sup>99</sup> Deste modo, como já referido, ainda não é claro na comunidade científica se o consumo de canábis aumenta ou não o risco de depressão e ansiedade. Não foram encontrados estudos que suportem uma possível associação entre o consumo de canábis rico em  $\Delta 9$ -THC e o desenvolvimento de epilepsia e vice-versa. Estudos recentes apenas mostram que o consumo de canábis rico em CBD resulta numa redução significativa na frequência de convulsões.<sup>100</sup> Assim, uma vez que o grupo sem substâncias medicamentosas teve concentrações superiores de  $\Delta 9$ -THC em relação ao grupo com substâncias medicamentosas, o consumo de canábis por parte dos indivíduos deste estudo pode não estar correlacionado com o consumo dessas substâncias.

Se a fluvoxamina e o CBD estivessem em concentrações suficientes, inibiriam o citocromo P450<sup>21,53</sup>, o que por sua vez se refletiria numa concentração de  $\Delta 9$ -THC mais elevada no grupo com substâncias medicamentosas, pois haveria menor metabolização desta substância. Uma vez que as concentrações de  $\Delta 9$ -THC foram mais elevadas no grupo sem substâncias medicamentosas, podemos supor que a fluvoxamina e o CBD não tiveram influência no citocromo P450 e conseqüentemente na concentração dos canabinóides. Por outro lado, se houvesse medicamentos indutores, haveria maior atividade da enzima<sup>54</sup> e, por isso, maior metabolização e, deste modo, menor concentração de  $\Delta 9$ -THC no grupo de substâncias medicamentosas. Contudo, nas substâncias medicamentosas deste estudo não há indutores do citocromo P450.

Assim, existem diferenças significativas entre o grupo com presença de substâncias medicamentosas e o grupo com ausência dessas substâncias para a variável  $\Delta 9$ -THC. Apesar de várias pessoas consumirem canábis recreativo para lidar com a ansiedade e depressão, o grupo sem substâncias medicamentosas teve concentrações superiores de  $\Delta 9$ -THC em relação ao grupo com substâncias medicamentosas. Estes resultados não estão portanto em sintonia com a literatura. Tal pode ser devido ao facto de o número de amostras mais uma vez ser baixo (apenas 16) e serem *post mortem*, ao

contrário das amostras dos estudos acima referidos em que o número de amostras é bastante representativo e a recolha de dados é em indivíduos vivos.

### **3.1.3. Influência da concentração de canabinóides no sangue e acidentes fatais**

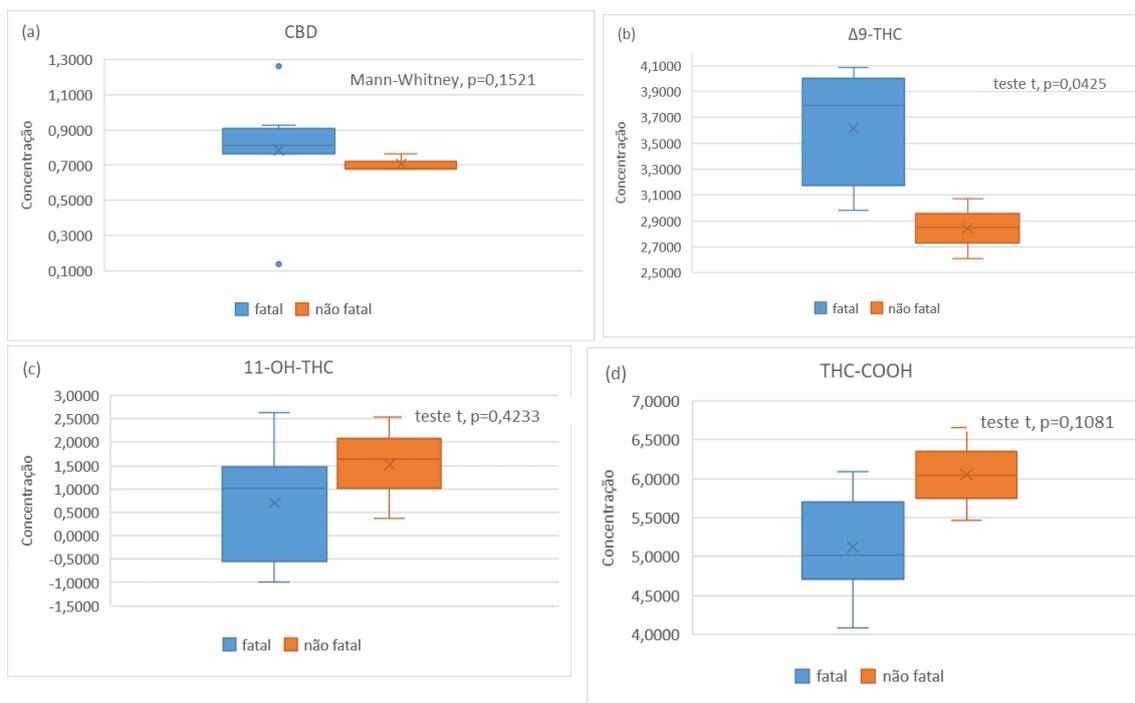
O canábis, como visto no capítulo Introdução, tem efeitos adversos como a sonolência e a sedação<sup>34</sup>, diminui a atenção na condução, aumenta o tempo de reação e reduz o controlo da direção.<sup>101</sup> Estes efeitos influenciam a condução de veículos motorizados. Num estudo realizado por Bédard *et al.* indivíduos que testaram positivo para canábis, mas negativo para álcool tiveram 29% de risco excedente para um acidente, comparativamente com condutores que testaram negativo para canábis.<sup>102</sup> Por outro lado, a proporção de acidentes fatais que seriam evitados se nenhum condutor dirigisse sob influência de canábis é estimada em 4,2%.<sup>101</sup> Deste modo, o canábis é um potencial fator de risco em acidentes fatais. Assim, visto que na literatura é sugerido que o consumo de canábis aumenta o risco de acidente de viação, o objetivo deste estudo foi verificar a existência de diferenças significativas entre as concentrações de canabinóides no sangue e a possível fatalidade do acidente.

Para averiguar se existem diferenças significativas entre as concentrações de canabinóides no sangue e a fatalidade do acidente foram concebidos dois grupos. O primeiro grupo que engloba 6 amostras diz respeito a indivíduos envolvidos em acidentes de viação fatais (amostras de patologia forense) e o segundo grupo que engloba 3 amostras diz respeito a indivíduos envolvidos em acidentes de viação não fatais (amostras de autoridade de segurança rodoviária) totalizando assim 9 amostras. Os dados de cada grupo de estudo e das variáveis em análise estão sumarizados na seguinte tabela 5.

**Tabela 5:** Estatística descritiva dos canabinóides CBD, THC, 11-OH-THC e THC-COOH, segundo a fatalidade do acidente, em amostras recolhidas *post mortem* e da autoridade de segurança rodoviária.

	CBD (fatal)	CBD (ñ fatal)	THC (fatal)	THC (ñ fatal)	OH (fatal)	OH (ñ fatal)	COOH (fatal)	COOH (ñ fatal)
N	6	3	6	3	6	3	6	3
Min	0.1382	0.6781	2.9819	2.6088	-0.9964	0.3785	4.0875	5.4594
Max	1.2632	0.7655	4.0875	3.0704	2.6323	2.5361	6.0875	6.6582
Média	0.7859	0.7072	3.6149	2.8424	0.7008	1.5156	5.1248	6.0540
Variância	0.1345	0.0025	0.2514	0.0533	2.1020	1.1739	0.5694	0.3593
Des.padrão	0.3668	0.0505	0.5014	0.2308	1.4498	1.0835	0.7546	0.5994
Mediana	0.8111	0.6781	3.7925	2.8479	1.0145	1.6322	5.0201	6.0444
Q1	0.6089	0.6781	3.0222	2.6088	-0.9964	0.3785	4.5472	5.4594
Q3	1.0105	0.7655	4.0219	3.0704	1.8102	2.5361	5.8965	6.6582

Na figura 6 encontram-se representados os gráficos das respetivas análises estatísticas dos dados da tabela 5.



**Figura 6:** Representação do teste Mann-Whitney para CBD (a) e do teste t de student para THC (b), 11-OH-THC (c) e THC-COOH (d) das 6 amostras *post mortem* e das 3 amostras da autoridade de segurança rodoviária, segundo a fatalidade do acidente.

O teste de Mann-Whitney para o CBD e o teste de t de student para o 11-OH-THC e para o THC-COOH têm um p-value superior a 0.05 e, por isso, não há diferenças significativas entre as concentrações destes canabinóides e o acidente ser fatal ou não fatal. No entanto, o teste t de student para o  $\Delta 9$ -THC tem um p-value inferior a 0.05, o

que significa que existem diferenças significativas na concentração deste canabinóide e a fatalidade do acidente. Num estudo realizado por Andrews *et al.*, o  $\Delta 9$ -THC foi detetado com mais frequência e com valores mais elevados em casos de acidentes fatais do que acidentes não fatais enquanto que o 11-OH-THC, o THC-COOH e o CBD não tiveram diferenças significativas entre os tipos de acidentes, mas tiveram tendência para valores mais elevados nos acidentes fatais.<sup>103</sup> Os resultados da nossa análise estatística suportam o estudo anterior na medida em que o  $\Delta 9$ -THC foi a única variável com diferenças significativas em acidentes fatais e acidentes não fatais. Além disso, vários estudos indicam que o  $\Delta 9$ -THC tem efeitos psicoativos que influenciam diretamente a condução<sup>61</sup>, o que sustenta a hipótese de que os níveis deste canabinóide no sangue influenciam a gravidade do acidente e, possivelmente, a sua fatalidade. Assim, podemos concluir que nestas amostras da autoridade de segurança rodoviária e amostras *post mortem* existem diferenças significativas entre as concentrações de  $\Delta 9$ -THC no sangue e a fatalidade do acidente, sendo que as concentrações deste canabinóide foram mais elevadas em acidentes fatais do que não fatais. Porém estas conclusões não devem ser generalizadas uma vez que, no nosso estudo, o número de amostras é baixo.

#### **3.1.4. Avaliação das concentrações de canabinóides e seus metabolitos no sangue em amostras *post mortem***

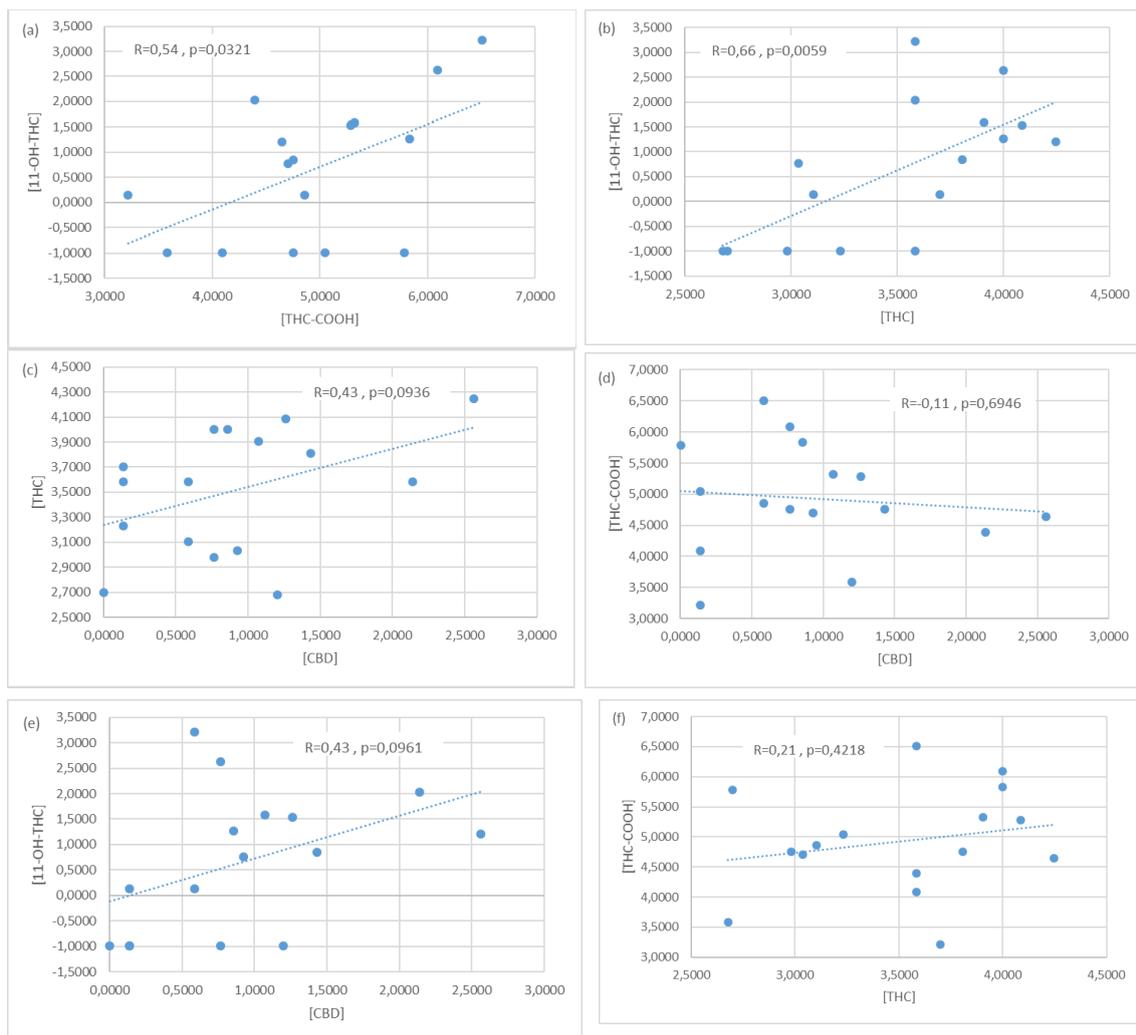
Por vezes, mudanças consideráveis ocorrem nas concentrações de numerosas drogas após a morte.<sup>104</sup> Algumas concentrações aumentam, outras diminuem e outras não se alteram. O metabolismo de drogas pode ocorrer *post mortem* como resultado de invasão bacteriana ou metabolismo contínuo como resultado de atividade enzimática.<sup>104</sup> A redistribuição *post mortem*, na qual as concentrações de drogas em amostras de sangue de várias áreas do corpo mudam durante o intervalo *post mortem*, foi observado para muitas substâncias, incluindo a canábis.<sup>105</sup> Esta redistribuição baseia-se na transferência de substâncias após a morte a favor do gradiente de concentração, ocorrendo assim alterações nas concentrações destas.<sup>103</sup> Por outras palavras, as substâncias são transferidas, após a morte, de áreas de alta concentração para áreas de baixa concentração, resultando em variações da concentração das substâncias, dificultando significativamente a interpretação dos resultados analíticos, uma vez que pode não ser a concentração exata em relação à altura da morte. A amplitude da redistribuição *post mortem* de uma droga depende da ligação desta às proteínas e da sua lipofilicidade.<sup>105</sup> Como referido no capítulo Introdução, os canabinóides são lipofílicos.<sup>25</sup>

Assim, como o THC-COOH é armazenado na gordura corporal e como tem um alto volume de distribuição devido à sua lipofilicidade, as concentrações deste canabinóide podem sofrer grandes variações em amostras *post mortem*.<sup>106</sup> Num estudo realizado por Holland *et al.*, de 19 amostras de sangue *post mortem*, 10 foram quantificáveis para o  $\Delta$ 9-THC e o 11-OH-THC e 19 para o THC-COOH.<sup>107</sup> Noutro estudo realizado por Lemos *et al.*, de 30 amostras de sangue periférico, o  $\Delta$ 9-THC e o THC-COOH foram detetados nas 30 e o 11-OH-THC apenas detetada em 6.<sup>108</sup> Não temos conhecimento de estudos que correlacionem estes canabinóides em amostras *post mortem*. Deste modo, o objetivo desta análise estatística é discutir se existe correlação entre as concentrações de canabinóides no sangue (CBD,  $\Delta$ 9-THC, 11-OH-THC e THC-COOH) em amostras de patologia forense. Para analisar se os canabinóides CBD,  $\Delta$ 9-THC, 11-OH-THC e THC-COOH estão correlacionados em amostras de patologia forense, foram realizados testes de correlação entre as variáveis. Esta análise estatística foi realizada para todas as 16 amostras de patologia forense disponíveis (tabela 6).

**Tabela 6:** Estatística descritiva dos canabinóides CBD, THC, 11-OH-THC e THC-COOH em 16 amostras recolhidas *post mortem*.

	CBD	THC	OH	COOH
N	16	16	16	16
Min	0.0009	2.6781	-0.9964	3.2173
Max	2.5607	4.2479	3.2172	6.5078
Média	0.9105	3.5149	0.6488	4.9285
Variância	0.5073	0.2499	1.9273	0.7737
Des.padrão	0.7123	0.4999	1.3883	0.8796
Mediana	0.8111	3.5849	0.8071	4.8064
Q1	0.2500	3.0528	-0.9964	4.4552
Q3	1.2478	3.9767	1.5728	5.6665

Na figura 7 encontram-se representados os gráficos dos respetivos testes de correlação dos dados da tabela 6.



**Figura 7:** Representação do teste correlação de Pearson das 16 amostras *post mortem* das variáveis 11-OH-THC e THC-COOH (a), das variáveis 11-OH-THC e THC (b), das variáveis THC e CBD (c), das variáveis THC-COOH e CBD (d), das variáveis 11-OH-THC e CBD (e) e das variáveis THC-COOH e THC (f).

Como podemos verificar na figura 7, apenas as variáveis  $\Delta 9$ -THC e 11-OH-THC e as variáveis 11-OH-THC e THC-COOH estão correlacionadas, uma vez que o p-value é inferior a 0.05. Além disso, a correlação entre estas variáveis são correlações positivas. Porém, uma vez que o coeficiente de correlação entre elas não é muito elevado (0.54 e 0.66) considera-se uma correlação média. Uma vez que o  $\Delta 9$ -THC sofre hidroxilação pelas isoformas do CYP450 formando vários metabolitos, sendo o principal o 11-OH-THC e este metabolito é depois oxidado no metabolito THC-COOH<sup>21</sup>, o  $\Delta 9$ -THC influencia diretamente a concentração de 11-OH-THC que, por sua vez, influencia

diretamente a concentração de THC-COOH. Assim, quanto maior a concentração de  $\Delta^9$ -THC, maior a concentração de 11-OH-THC, o que gera maior concentração de THC-COOH, daí estes canabinóides estarem correlacionados entre si. O CBD só influencia indiretamente a concentração de  $\Delta^9$ -THC se estiver em concentrações suficientes para inibir as isoformas do CYP450.<sup>21</sup> Uma vez que não existiu correlação entre o CBD e o  $\Delta^9$ -THC, podemos supor que o CBD não estaria em concentrações suficientes nas amostras para influenciar a concentração dos restantes canabinóides. Assim, podemos concluir que nestas amostras *post mortem* apenas existiu correlação entre as variáveis  $\Delta^9$ -THC e 11-OH-THC e as variáveis 11-OH-THC e THC-COOH, sendo esta correlação positiva média e, por isso, quando uma variável aumenta, a outra variável terá tendência a subir também.

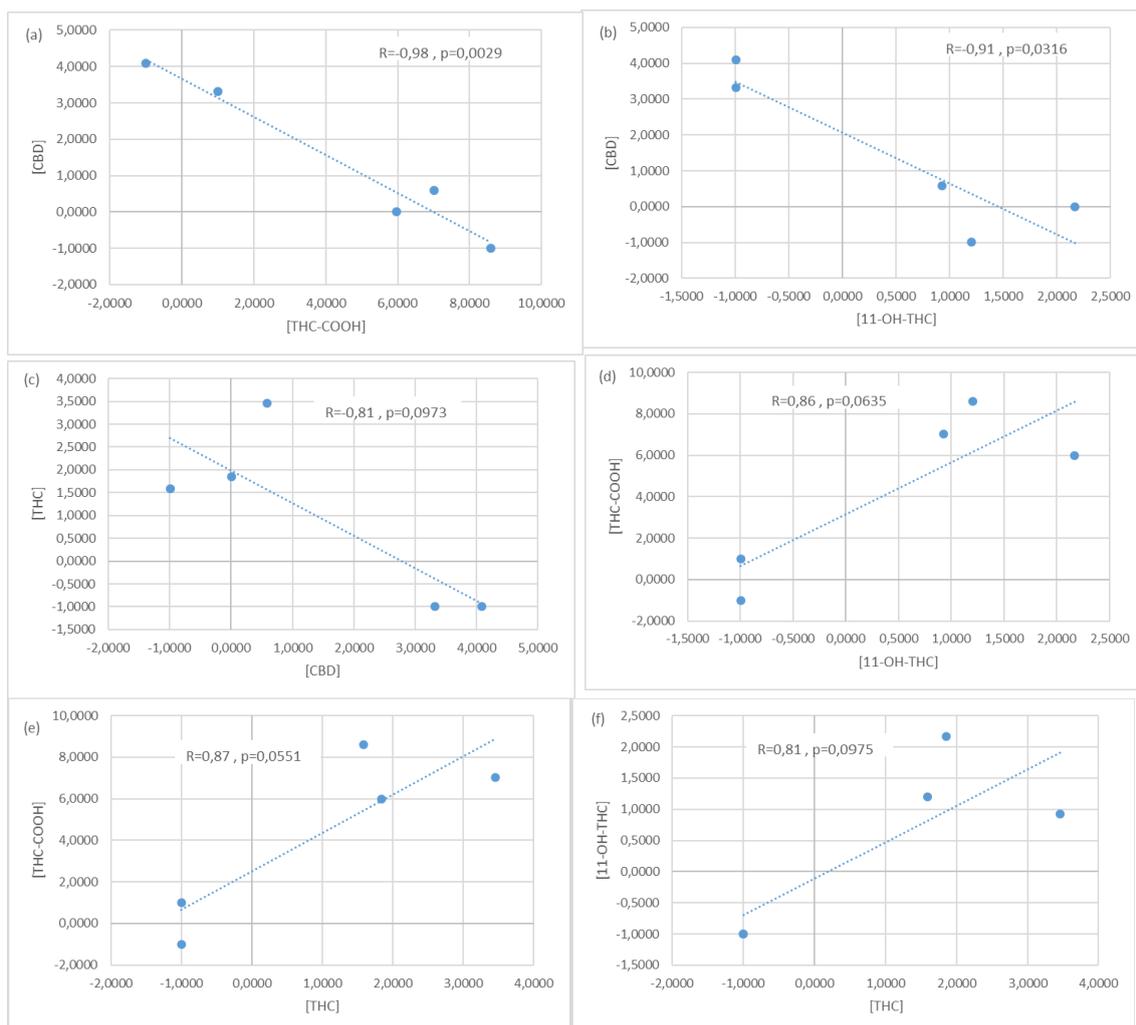
### **3.1.5. Avaliação das concentrações de canabinóides e seus metabolitos no sangue em amostras de clínica forense**

A farmacocinética de canabinóides e os efeitos observados dependem da dose administrada, da sua composição e da via de administração que deve ser adaptada para cada pessoa. A biodisponibilidade do  $\Delta^9$ -THC após a inalação varia entre 10 a 35% e a biodisponibilidade do CBD e do  $\Delta^9$ -THC via oral é de cerca de 6%.<sup>109</sup> Como referido no capítulo Introdução, embora os estudos sobre esta matéria sejam insuficientes, pensa-se que o tempo de meia vida do  $\Delta^9$ -THC seja inferior a 30 minutos e para o CBD seja de  $31 \pm 4$  horas quando a via de administração é a inalação.<sup>8</sup> Por outro lado, por via oral e administração contínua, o tempo de meia vida do CBD varia entre 2 e 5 dias. Com o uso crónico, o THC-COOH pode acumular-se nos tecidos adiposos. A libertação e a redistribuição no contexto, por exemplo, de perda de peso, pode resultar na persistência da atividade canabinóide por várias semanas após a última administração. Assim, o THC-COOH pode ser mensurável no sangue mais de 24 horas desde o último consumo de  $\Delta^9$ -THC.<sup>109</sup> Na clínica forense, por vezes é dada pelo consumidor a informação da hora do último consumo e via de administração.<sup>110</sup> Deste modo, é possível auferir mais informações sobre o consumidor, nomeadamente se é um consumidor crónico ou não, que em outras circunstâncias seria mais complicado. O objetivo desta análise foi estudar se existe correlação entre as concentrações de canabinóides no sangue (CBD,  $\Delta^9$ -THC, 11-OH-THC e THC-COOH) em amostras de clínica forense. Desta forma foi realizada análise estatística para as 5 amostras de clínica forense disponíveis (tabela 7).

**Tabela 7:** Estatística descritiva dos canabinóides CBD, THC, 11-OH-THC e THC-COOH em 5 amostras de clínica forense.

	CBD	THC	OH	COOH
N	5	5	5	5
Min	-0.9964	-0.9964	-0.9964	-0.9964
Max	4.0875	3.4594	2.1699	8.5925
Média	1.3998	0.9799	0.4609	4.3169
Variância	4.8202	3.7698	1.9833	16.8824
Des.padrão	2.1954	1.9416	1.4083	4.1088
Mediana	0.5849	1.5849	0.9259	5.9773
Q1	-0.4978	-0.9964	-0.9964	0.0018
Q3	3.7047	2.6537	1.6858	7.8018

Na figura 8 encontram-se representados os gráficos dos respetivos testes de correlação dos dados da tabela 7.



**Figura 8:** Representação do teste correlação de Pearson das 5 amostras de clínica forense das variáveis CBD e 11-OH-THC (a), das variáveis CBD e 11-OH-THC (b), das variáveis THC e CBD (c), das variáveis THC-COOH e 11-OH-THC (d), das variáveis THC-COOH e THC (e) e das variáveis 11-OH-THC e THC (f).

Como se pode verificar na figura 8, no caso das amostras de clínica forense, as variáveis CBD e 11-OH-THC e as variáveis CBD e THC-COOH estão correlacionadas enquanto que as restantes não estão. Ao contrário dos resultados anteriores, estas variáveis têm uma correlação negativa e considerada forte uma vez que os coeficientes de correlação são negativos e perto de 1. Isto significa que quando uma variável aumenta, a outra diminui. No sangue, depois de indivíduos fumarem cigarros ricos em CBD e pobres em  $\Delta$ 9-THC num curto espaço de tempo, 1.1 h e 4h depois não foram detetados no sangue os metabolitos 11-OH-THC e THC-COOH para fumadores passivos. O 11-OH-THC foi detetado em fumadores crónicos, porém em valores muito baixos.<sup>111,112</sup> Assim, podemos deduzir que o CBD não tem influência direta nas concentrações de 11-OH-THC e THC-COOH. Como referido anteriormente, como ambas as moléculas são metabolizadas pelas mesmas isoformas do CYP450, o CBD em concentrações suficientes pode influenciar indiretamente a metabolização de  $\Delta$ 9-THC.<sup>21,12</sup> Assim, como existiu correlação entre o CBD e os metabolitos de  $\Delta$ 9-THC (11-OH-THC e THC-COOH), pode significar que nestas amostras de clínica forense o CBD estava em concentrações suficientes para inibir o citocromo e, por isso, intervir na metabolização do  $\Delta$ 9-THC. Assim, neste caso, quanto maior a concentração de CBD, menor concentração dos metabolitos de  $\Delta$ 9-THC e vice-versa. Contudo, esta conclusão é meramente especulatória, uma vez que o número total de amostras é baixo e, por isso, não representativo.

### **3.1.6. Avaliação das concentrações de canabinóides e seus metabolitos no sangue em amostras da autoridade de segurança rodoviária**

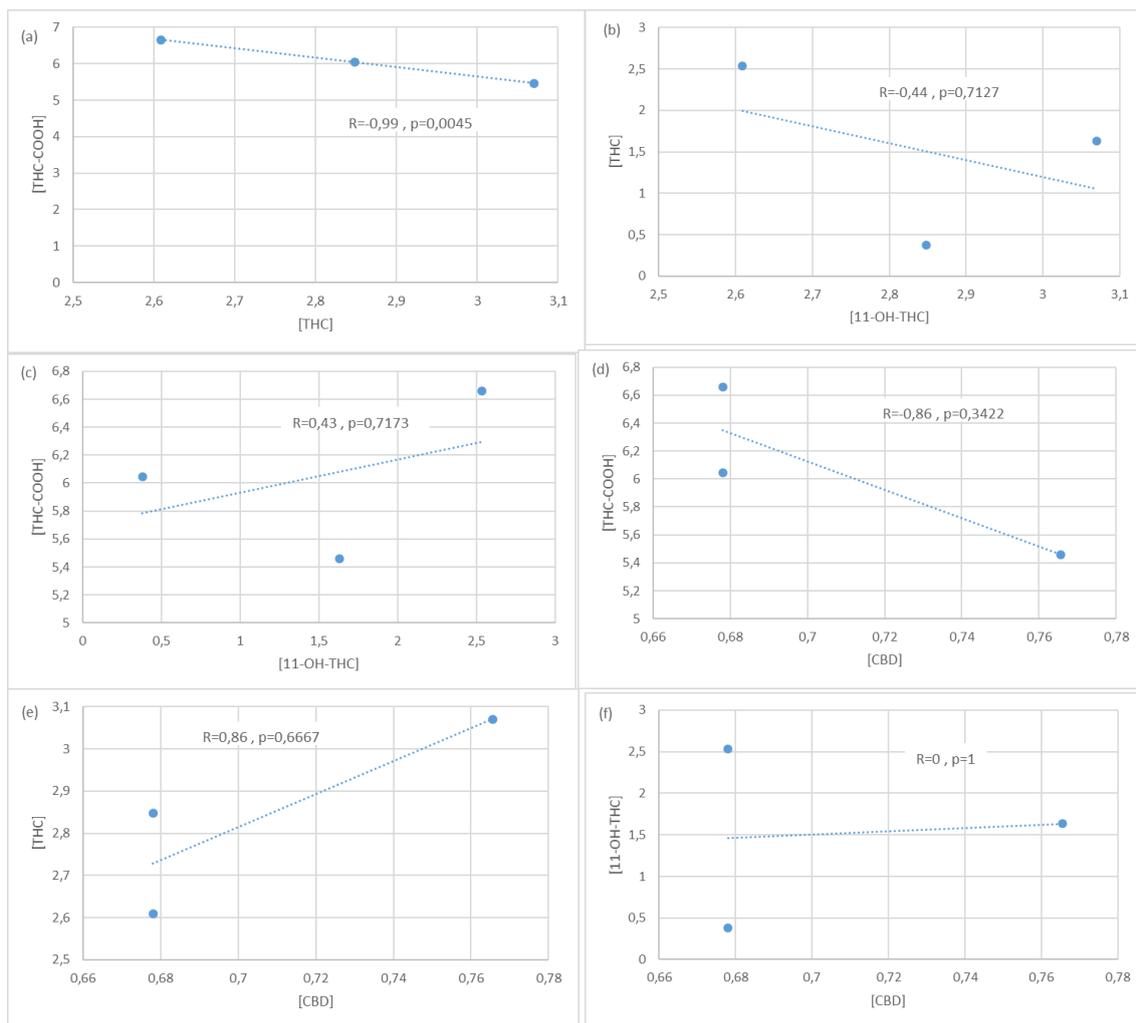
Nos casos de condução sob influência de drogas, o intervalo de tempo entre o acidente e a colheita pode chegar a 5h, o suficiente para reduzir significativamente a concentração de drogas com farmacocinética rápida, como é o caso dos canabinóides.<sup>113</sup> As concentrações sanguíneas de  $\Delta$ 9-THC atingem um pico antes de acabar de fumar (em 10 minutos) e diminuem rapidamente (permanecendo detetáveis por 4 a 8 horas) devido à distribuição pelos tecidos imediatamente após inalação, incluindo o cérebro.<sup>62</sup> Este fenómeno permite que os fumadores experimentem efeitos quase imediatos, uma vez que os efeitos sentidos por  $\Delta$ 9-THC estão diretamente relacionados às concentrações cerebrais e não às concentrações sanguíneas. Assim, as concentrações dos canabinóides no sangue podem corresponder a valores baixos, apesar de os exceder bastante durante a condução, o que complica a interpretação de canabinóides no sangue.<sup>60,62</sup> Por outro lado, no canábis administrado por via oral, o pico de  $\Delta$ 9-THC no cérebro, e por isso os seus

efeitos, ocorrem 2 a 3 horas após a ingestão.<sup>113</sup> Hipoteticamente, se 1 hora após consumo oral de  $\Delta$ 9-THC o condutor tem um acidente pode ser testado apenas 3 a 4 horas após o acidente e ser positivo para canabinóides apesar de não estar sob influência de drogas no momento do acidente. A canábida é a droga ilícita mais detetada em condutores.<sup>62</sup> Num estudo com 150.010 condutores, 3387 testaram positivo para  $\Delta$ 9-THC.<sup>114</sup> Noutro estudo em que 280 casos foram positivos para uma substância ilícita, 184 foram positivas para  $\Delta$ 9-THC.<sup>113</sup> Assim, os estudos levados a cabo por investigadores em indivíduos vivos envolvidos num acidente de viação, apenas deteta e/ou quantifica os canabinóides presentes. Não temos conhecimento de estudos que correlacionem as concentrações dos canabinóides, incluindo o CBD, com acidentes de viação não fatais. Este estudo teve assim como objetivo verificar se existe correlação entre as concentrações de canabinóides no sangue (CBD,  $\Delta$ 9-THC, 11-OH-THC e THC-COOH) em amostras de autoridade de segurança rodoviária (acidentes não fatais). Para isso, foi realizada uma análise estatística para as 3 amostras da autoridade de segurança rodoviária disponíveis (tabela 8).

**Tabela 8:** Estatística descritiva dos canabinóides CBD, THC, 11-OH-THC e THC-COOH em 3 amostras da autoridade de segurança rodoviária.

	CBD	THC	OH	COOH
N	3	3	3	3
Min	0.6781	2.6088	0.3785	5.4594
Max	0.7655	3.0704	2.5361	6.6582
Média	0.7072	2.8424	1.5156	6.0540
Variância	0.0025	0.0539	1.1739	0.3593
Des.padrão	0.0505	0.2308	1.0835	0.5994
Mediana	0.6781	2.8479	1.6323	6.0444
Q1	0.6781	2.6088	0.3783	5.4594
Q3	0.7655	3.0704	2.5361	6.6582

Na figura 9 encontram-se representados os gráficos dos respetivos testes de correlação dos dados da tabela 8.



**Figura 9:** Representação do teste correlação de Pearson das 3 amostras da autoridade de segurança rodoviária das variáveis THC-COOH e THC (a), das variáveis THC e 11-OH-THC (b), das variáveis THC-COOH e 11-OH-THC (c) e do teste de correlação de Spearman das variáveis THC-COOH e CBD (d), das variáveis THC e CBD (e) e das variáveis 11-OH-THC e CBD (f).

Como se verifica na figura 9, nas amostras da autoridade de segurança rodoviária apenas as variáveis  $\Delta 9$ -THC e THC-COOH estão correlacionadas. A correlação entre estas variáveis é positiva e muito forte uma vez que o coeficiente de correlação é um valor positivo e próximo de 1. Isto significa que quando uma variável aumenta, é esperado um aumento simultâneo da outra variável. O intervalo de tempo entre o acidente e a colheita da amostra pode demorar 5 horas.<sup>113</sup> O  $\Delta 9$ -THC permanece detetável 4 a 8 horas e o THC-COOH é detetável horas ou dias após consumo de  $\Delta 9$ -THC.<sup>60</sup> Assim, nessas 5 horas, tanto o  $\Delta 9$ -THC como o THC-COOH são detetáveis.<sup>113</sup> O  $\Delta 9$ -THC é uma droga com farmacocinética rápida e, por isso, a sua concentração diminui rapidamente e a concentração dos seus metabolitos aumenta ao mesmo ritmo.<sup>113</sup> Uma vez que o THC-

COOH é o principal produto da biotransformação do  $\Delta^9$ -THC,<sup>21</sup> quanto maior é a concentração de  $\Delta^9$ -THC, maior a taxa do seu metabolismo e, por isso, maior se torna a concentração de THC-COOH. Assim, neste caso, quanto maior a concentração de  $\Delta^9$ -THC, maior a concentração do metabolito THC-COOH. Uma vez que o 11-OH-THC também é metabolito de  $\Delta^9$ -THC, seria expectável que também houvesse correlação positiva entre o  $\Delta^9$ -THC e este metabolito. Contudo, nesta análise estatística não foi verificada correlação entre estes dois canabinóides e esta ocorrência pode ser devido ao número total de amostras ser muito baixo (apenas 3).

Os casos disponíveis para estas análises estatísticas foram apenas 24. Assim, visto que este número não é significativo, todas as conclusões retiradas deste trabalho devem ser cuidadosamente interpretadas. Na análise da influência da idade na concentração de canabinóides no sangue não existiram diferenças significativas no consumo de canábis entre indivíduos com mais de 40 anos e indivíduos com menos de 40 anos, o que está em conformidade com a bibliografia. Contudo, as diferenças entre o nosso estudo e estudos anteriores são bastante significativas, pelo que não é possível retirar conclusões mais definitivas. Em relação à análise da influência do consumo de medicamentos na concentração de canabinóides no sangue, apenas existiram diferenças significativas entre o grupo com substâncias medicamentosas e o grupo com ausência dessas substâncias para a variável  $\Delta^9$ -THC. Além disso, verificou-se que concentrações de  $\Delta^9$ -THC são superiores no grupo sem substâncias medicamentosas em relação ao grupo com substâncias medicamentosas. Nesta análise, estas inconformidades podem ser explicadas pelo número baixo de amostras e por estas serem amostras *post mortem*, ao contrário das amostras dos estudos anteriores. Em relação à análise da influência da concentração de canabinóides no sangue e acidentes fatais, os resultados estiveram em conformidade com a bibliografia, uma vez que existem diferenças significativas entre as concentrações de  $\Delta^9$ -THC no sangue e a fatalidade do acidente. Porém, mais uma vez, estas conclusões não devem ser generalizadas pois o número de amostras é baixo. As últimas 3 análises dizem respeito a testes de correlação. Não temos conhecimento de estudos que correlacionem o CBD, o  $\Delta^9$ -THC, o 11-OH-THC e o THC-COOH com amostras *post mortem*, amostras de clínica forense e amostras de acidentes de viação não fatais. Assim, as conclusões retiradas são muito subjetivas pois o número de amostras é mais uma vez baixo e não significativo e, por isso, é sugerida cautela na interpretação dos resultados. Contudo, podemos concluir que, nas amostras *post mortem*, apenas existiu correlação entre as variáveis  $\Delta^9$ -THC e 11-OH-THC e as variáveis 11-OH-THC e THC-COOH,

sendo esta correlação positiva média e, por isso, quando uma variável aumenta, a outra variável tem tendência a subir também. Além disso, também podemos concluir que existiu correlação entre o CBD e os metabolitos de  $\Delta$ 9-THC (11-OH-THC e THC-COOH), nas amostras de clínica forense. Sendo a correlação forte negativa, quanto maior a concentração de CBD, menor a concentração dos metabolitos de  $\Delta$ 9-THC e vice-versa. Por fim, podemos concluir que nas amostras de acidentes de viação não fatais existiu correlação entre o  $\Delta$ 9-THC e o THC-COOH sendo a correlação positiva e, por isso, quanto maior a concentração de  $\Delta$ 9-THC, maior a concentração do metabolito THC-COOH. Este estudo permitiu gerar hipóteses importantes que deverão ser testadas em estudos posteriores, com uma amostra mais representativa.

## 3.2. Análise descritiva

### 3.2.1. Consumo de canábis em amostras *post mortem*

Como já referido, as concentrações sanguíneas de canabinóides *post mortem* podem diferir das concentrações sanguíneas no momento da morte devido à redistribuição *post mortem*.<sup>103</sup> Além disso, o sangue pode ser recolhido de diferentes partes do corpo e cada área pode ter diferentes concentrações da substância-alvo.<sup>3</sup> Quando a habituação e a tolerância se desenvolvem, os medicamentos/substâncias podem ter concentrações nos seus fluidos e tecidos biológicos em níveis mais elevados que nos níveis letais publicados para consumidores não crónicos, daí por vezes algumas pessoas falecerem após o primeiro episódio de toma de uma dose teoricamente não letal.<sup>115</sup> Assim, as conclusões retiradas sobre amostras sanguíneas de canabinóides *post mortem* podem diferenciar-se das conclusões que se retirariam se as amostras fossem recolhidas no indivíduo vivo e também podem ser distintas conforme se trate de um consumidor crónico ou de um consumidor não crónico.

A avaliação, documentação e interpretação de lesões e cicatrizes sofridas como resultado de um trauma ou violência é um dos princípios de qualquer patologista forense.<sup>110</sup> Assim, o papel fundamental da maioria dos patologistas forenses é o exame a um corpo morto, frequentemente conhecido como autópsia.<sup>115</sup> De forma a obter amostras para análise toxicológica, a rotina de autópsia é alterada de acordo com a via de administração. Contudo, como todas as mortes por substâncias tóxicas, a interpretação dos resultados analíticos pode apresentar dificuldades consideráveis.<sup>116</sup> Além disso, pode ainda existir um longo atraso entre a administração da droga e a morte do indivíduo durante o qual as concentrações de drogas no sangue e na urina podem diminuir ou até

desaparecer.<sup>115</sup> Uma vez que os medicamentos/substâncias ilícitas se decompõem rapidamente no organismo, os metabolitos podem ser os únicos produtos reconhecíveis da sua administração. A determinação da causa de morte em casos de intoxicação de drogas, quer drogas prescritas ou drogas recreativas, é desafiante.<sup>117</sup> Deste modo, existem dificuldades significativas na interpretação da análise toxicológica em amostras *post mortem* e por isso tem de se ter em consideração, se possível, a via de administração da substância assim como o lapso de tempo entre a hora da morte e a hora da última administração.

É consensual na comunidade científica de que a toma isolada de canábis não será diretamente responsável pela morte do indivíduo, num contexto de overdose.<sup>115</sup> Contudo, apesar de não existirem vítimas mortais correlacionadas diretamente com o consumo de canábis, alguns casos de morte súbita e de emergências médicas graves foram relacionados com análises positivas para a presença de canabinóides no sangue.<sup>12</sup> O número destes casos tem uma tendência particularmente ascendente em países onde o canábis recreativo e/ou medicinal foi legalizado ou países onde foi estabelecida uma legislação para despenalização da canábis, como é o caso de Portugal. A título de exemplo, no Colorado, um dos primeiros estados nos EUA a legalizar o uso medicinal e recreativo de canábis, as visitas às emergências médicas relacionadas com esta substância aumentaram mais de 50% desde a sua legalização.<sup>61</sup> Em estados onde apenas o canábis medicinal é legal também houve um aumento de emergências médicas relativas a esta substância, cerca de 55 % no Havai, 49 % em Nova Jérсия e 32% no Arizona. As mortes causadas por ingestão, injeção ou inalação de drogas estão inseridas em quatro categorias, entre elas homicídio, suicídio, acidente e indeterminado.<sup>115</sup> A última categoria é utilizada quando a decisão quanto à etiologia médico-legal não pode ser inequivocamente definida. Em geral, a categoria acidental é composta por mortes causadas por abuso de drogas.

Alguns estudos sugerem que o consumo de canábis está associado a um aumento de risco de suicídio.<sup>118</sup> Além disso, as pessoas que já consumiram canábis têm maior probabilidade de estarem envolvidas em acidentes rodoviários fatais, de desenvolverem SIDA e cancro de pulmão, do que as pessoas que nunca consumiram. O consumo de canábis pode também aumentar o risco de mortalidade por hipertensão e quanto maior for a duração do consumo maior o risco.<sup>119</sup> Num estudo realizado por Mukamal *et al.*, em que foi investigado o risco de mortalidade para consumidores de canábis em adultos hospitalizados com enfarte do miocárdio, concluíram que o risco de mortalidade é mais elevado em indivíduos que já consumiram canábis do que aqueles que não

consumiram.<sup>120</sup> Uma vez que o canábis não é descrito como causa de overdose, o seu impacto na mortalidade é pouco explorado pelos investigadores.<sup>118</sup> Assim, apesar do canábis, como já referido, ter alta prevalência de consumo em muitas sociedades, há falta de estudos controlados com a relação entre o consumo e a mortalidade. Contudo este capítulo não tem como objetivo relacionar diretamente a mortalidade com o consumo de canábis pois não foram fornecidos dados suficientes para esse exercício. O propósito é de explorar o consumo de canábis em amostras *post mortem*, se esse consumo pode estar relacionado de alguma forma com o consumo das substâncias medicamentosas e vice-versa e se o consumo simultâneo destas substâncias tem alguns benefícios terapêuticos. Além disso, também investiga a hipótese de uma possível interferência dos canabinóides CBD e  $\Delta 9$ -THC no metabolismo das substâncias medicamentosas, a hipótese de um possível consumo de canábis para alívio dos sintomas de patologias como a SIDA e tuberculose e também como potencial fator de risco de desenvolvimento destas doenças.

#### **3.2.1.1. Amostras com presença de substâncias medicamentosas**

Como já referido, o CBD tem propriedades analgésicas, antipsicóticas, ansiolíticas e anticonvulsivas e o  $\Delta 9$ -THC tem propriedades sedativas, o que torna o canábis medicinal, apesar de polémico, um recurso com muito potencial para o tratamento eficaz de pacientes que sofrem de várias condições médicas.<sup>49</sup> As benzodiazepinas são uma classe de medicamentos comumente usados para tratar uma variedade de condições neurológicas<sup>42</sup>, os antidepressivos utilizados para tratar principalmente transtornos depressivos<sup>50</sup> e os anti-epiléticos para prevenir crises epiléticas e convulsivas.<sup>56</sup> Desta forma, o canábis e as substâncias medicamentosas descritas anteriormente têm efeitos terapêuticos semelhantes.

O suicídio é uma das principais causas de morte do mundo com aproximadamente 1 milhão de mortes por ano.<sup>121</sup> O risco de suicídio com canabinóides no sangue é 4 vezes maior em dependentes de canábis do que na população geral.<sup>121</sup> Num estudo com 1436 casos de suicídio em que a idade média era de 36,5 anos e 81,5% dos casos eram homens, a substância ilícita mais comum detetada no sangue em casos de suicídio por não overdose foi a canábis.<sup>121</sup> O  $\Delta 9$ -THC foi detetado em 8,4 % dos casos de suicídio por homens e 5,3% de casos de suicídio por mulheres o que, nestes casos, indica influência ativa da substância no momento da morte. Concluiu-se também que os homens foram significativamente mais propensos a evidenciar pelo menos uma substância ilícita e a apresentar uma combinação de canábis e álcool. Como já referido, a canábis é a droga

ilícita mais comumente detetada em casos de suicídio por não overdose e essa probabilidade aumenta em indivíduos dependentes de canábis.<sup>121</sup> Uma grande proporção de pacientes com uma doença psicótica é exposta a antidepressivos e a benzodiazepinas<sup>122</sup> sendo estas últimas também associadas com o aumento do risco de suicídio.<sup>123</sup> Além disso, a taxa de mortalidade é superior em pacientes que são sujeitos a terapias com combinação de antipsicóticos e benzodiazepinas do que pacientes sujeitos apenas a terapia com antipsicóticos.<sup>124</sup> Assim, é provável que exista uma correlação entre os níveis sanguíneos de canabinóides e de benzodiazepinas e o suicídio.

Neste estudo, das 16 amostras referentes à Patologia Forense selecionou-se as 6 que foram positivas para pelo menos uma substância medicamentosa, entre as quais, midazolam, diazepam, lorazepam, lamotrigina e fluvoxamina (tabela 9) para averiguar se o consumo de canábis pode estar relacionado de alguma forma com o consumo das substâncias medicamentosas e vice-versa. Além disso, também foi explorada a hipótese de uma possível interferência dos canabinóides CBD e  $\Delta^9$ -THC no metabolismo das substâncias medicamentosas a seguir descritas. De salientar que, no conceito médico-legal, considera-se morte natural todas as mortes cuja causa não foram situações de morte violenta, nomeadamente homicídio, suicídio e acidente.

**Tabela 9:** Descrição da idade, do género, das concentrações dos canabinóides CBD, THC, 11-OH-THC e THC-COOH e etanol, da causa de morte e de substâncias medicamentosas, segundo casos positivos para substâncias medicamentosas, em amostras recolhidas *post mortem*.

Idade	28 anos	52 anos	Desconhecida	20 anos	50 anos	39 anos
Género	Masculino	Masculino	Masculino	Masculino	Masculino	Masculino
CBD (ng/mL)	1.1	2.7	1.5	2.3	1	1.9
$\Delta^9$ -THC (ng/mL)	13	14	8.6	6.4	6.5	8.2
11-OH-THC (ng/mL)	1.1	1.8	1.1	-	-	1.7
THC-COOH (ng/mL)	9.3	27	29	12	55	26
Etanol (g/L)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Causa de morte	Morte natural	Morte natural	Suicídio	Suicídio	Morte súbita	Lesão traumática
Outras substâncias	Midazolam	Diazepam	Diazepam	Lorazepam	Lamotrigina	Fluvoxamina

Como descrito no capítulo “Introdução”, quando a concentração de  $\Delta 9$ -THC é superior a 15% em relação à concentração de CBD, o canábis é considerado rico em  $\Delta 9$ -THC.<sup>48</sup> Em todos os casos a concentração de CBD é muito mais baixa do que a de  $\Delta 9$ -THC (>15%) o que sugere consumo de canábis rico em  $\Delta 9$ -THC. Os resultados também foram positivos para midazolam, diazepam, lorazepam (benzodiazepinas), lamotrigina (antiepilético) e fluvoxamina (antidepressivo). Como já referido, estudos sugerem que o CBD é uma molécula importante da *Cannabis sativa* com um amplo espectro de ações farmacológicas benéficas em distúrbios psiquiátricos, incluindo propriedades ansiolíticas, antipsicóticas, anticonvulsivas, analgésicas, neuroprotetoras e antidepressivas.<sup>28,32,34</sup> O CBD também terá efeitos benéficos em pacientes com esquizofrenia e o tratamento de CBD adjuvante à medicação antipsicótica é associado a efeitos significativos nas melhoras dos sintomas da doença assim como melhorias no desempenho cognitivo.<sup>125</sup> Como já descrito, o  $\Delta 9$ -THC tem efeitos sedativos, o que pode contribuir para melhorar a qualidade do sono. As moléculas de  $\Delta 9$ -THC e CBD têm sido defendidas como coadjuvantes no alívio de sintomas da epilepsia, porém, uma vez que o  $\Delta 9$ -THC provoca efeitos psicoativos, a utilização de CBD é apontada como mais viável.<sup>126</sup> Assim, o CBD tem um mecanismo de ação que o torna uma opção desejável para pacientes com epilepsia que falharam a resposta à terapêutica padrão. Além disso, alguns estudos clínicos demonstraram que a administração do CBD induz efeitos antidepressivos em vários modelos animais.<sup>127</sup> Os resultados acima descritos na tabela 9 resultam de um consumo recreativo de canábis rico em  $\Delta 9$ -THC. Deste modo, apesar do CBD ser uma molécula indicada para o tratamento da epilepsia e da depressão e existirem evidências de que o  $\Delta 9$ -THC pode induzir o sono, o consumo de canábis por estes indivíduos foi apenas num contexto ilícito e não teve a intenção de coadjuvar as substâncias medicamentosas acima descritas de forma a exponenciar o tratamento e aliviar alguns dos sintomas das suas patologias.

A CYP3A4 é a enzima mais abundante no fígado e no intestino e oxida a grande maioria dos produtos farmacêuticos.<sup>128</sup> Esta enzima tem a capacidade de acomodar simultaneamente várias moléculas no local ativo, o que poderia levar a ligações cooperativas e interações medicamentosas. Sendo, como já referido, o diazepam metabolizado pelo CYP2C19 e pelo CYP3A4, o midazolam pelo CYP3A4<sup>43</sup> e o  $\Delta 9$ -THC ter efeitos inibitórios nestas enzimas<sup>47</sup>, é possível, visto que o canábis consumido é rico em  $\Delta 9$ -THC, que esta molécula tenha interferido na metabolização do midazolam e do diazepam, aumentando as suas biodisponibilidades e conseqüentemente a sua toxicidade

e os seus efeitos adversos. O CBD tem efeitos inibitórios em UGT2B7<sup>59</sup>, a mesma enzima que metaboliza a lamotrigina.<sup>58</sup> Por outro lado, o CBD pode inibir o CYP450, se em concentrações suficientes.<sup>21</sup> Além disso, estudos com substâncias medicamentosas metabolizadas por CYP3A4 e por CYP2C19, quando co-administradas com CBD, a sua concentração no sangue aumentou 60%.<sup>59</sup> Porém, como já referido, o CBD encontra-se em concentrações mais baixas do que o  $\Delta$ 9-THC e, por isso, é improvável que tenha interferido na metabolização da lamotrigina, do diazepam e do midazolam. Como já descrito, o metabolismo do lorazepam ocorre principalmente pela enzima UGT2B15.<sup>45</sup> Não existem evidências de que o CBD e o  $\Delta$ 9-THC inibam ou induzam a UGT2B15 e, por isso, é improvável que estas moléculas interfiram com a metabolização do lorazepam. Uma vez que o CBD e o  $\Delta$ 9-THC são metabolizados pelo CYP3A4, pelo CYP2C19 e pelo CYP2C9<sup>21,26</sup>, a fluvoxamina pode inibir as suas metabolizações, uma vez que, como já descrito, a fluvoxamina é um inibidor destas enzimas.<sup>54,53,47</sup> Desta forma a fluvoxamina pode aumentar a biodisponibilidade do CBD e do  $\Delta$ 9-THC e com isso aumentar a sua toxicidade e o risco de efeitos adversos.<sup>47,59</sup> Isto também significa que as concentrações destes canabinóides na amostra recolhida podem estar muito mais elevadas e, por consequência, as concentrações dos metabolitos 11-OH-THC e THC-COOH mais baixas do que numa situação em que não há inibição da enzima. Assim, no caso do individuo ser consumidor de fluvoxamina torna-se difícil sugerir se é um consumidor crónico ou passivo.

Deste modo, uma vez que o consumo de canábis foi rico em  $\Delta$ 9-THC por parte dos indivíduos representados na tabela 9, estes sujeitos não obtiveram do canábis um coadjuvante para as benzodiazepinas, antidepressivos e antiepiléticos. Além disso, as concentrações de CBD nas amostras descritas na tabela acima referida são baixas e, por isso, é improvável que esta molécula tenha intervindo na metabolização do  $\Delta$ 9-THC ou de outras substâncias medicamentosas. Contudo, a fluvoxamina, em concentrações suficientes, pode ter inibido a metabolização do  $\Delta$ 9-THC e do CBD e o  $\Delta$ 9-THC inibido a metabolização do midazolam e do diazepam.

### **3.2.1.2. Amostras de indivíduos com patologias associadas**

A SIDA é uma doença infectocontagiosa causada pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH) que é principalmente transmitido através de relações sexuais desprotegidas, mas também por transfusões de sangue, por agulhas contaminadas com o vírus e de mãe para filho.<sup>129</sup> Em 2016, 36.7 milhões de pessoas entre elas 2.1 milhões de

crianças estavam infetadas pelo HIV. Esta infeção afeta qualitativamente e quantitativamente os linfócitos auxiliares CD4<sup>+</sup>. O mecanismo que causa a falha em reconstruir esses linfócitos não é totalmente elucidado, porém aumenta o risco de infeções oportunistas, ou seja, num doente com as defesas muito diminuídas, uma simples infeção pode tornar-se fatal. O tratamento habitual para a SIDA é terapia antirretroviral.<sup>130</sup> Alguns estudos comprovam que substâncias ricas em Δ9-THC ajudam a combater alguns sintomas associados à SIDA, como a falta de apetite.<sup>9,131</sup> Além disso, como os recetores canabinóides CB2 são expressos nas células do sistema imunológico e o Δ9-THC é ligante desses recetores, o uso crónico de Δ9-THC pode diminuir a progressão da doença.<sup>132</sup> Contudo, ainda são necessários mais estudos. Assim, a ingestão de canábis rico em Δ9-THC pode auxiliar o combate a alguns sintomas da doença. Porém, devem ser tidos em consideração os vários efeitos adversos relativos ao consumo de canábis rico nesta molécula, descrito no capítulo Introdução.

A tuberculose é causada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis* e continua a ser a principal causa de morte por uma doença infecciosa entre adultos em todo o mundo com mais de 10 milhões de pessoas que adoecem de tuberculose a cada ano.<sup>129</sup> A bactéria *Mycobacterium tuberculosis* e os humanos coexistem há milhares de anos e, embora se estime que 1.7 biliões de pessoas estejam infetadas com a bactéria, apenas algumas dessas pessoas irão desenvolver tuberculose ativa. Além disso, as pessoas com baixos níveis socioeconómicos correm alto risco de se tornarem doentes de tuberculose.<sup>133</sup> Esta doença afeta principalmente os pulmões e a infeção ativa é mais comum em fumadores e pessoas com VIH/SIDA, sendo a bactéria transmitida por via aérea, como por exemplo espirros e tosse.<sup>129,134</sup> A tuberculose resistente a medicamentos também é uma grande ameaça aos esforços do controlo da doença.<sup>133,134</sup> Uma vez que a inalação é a via preferencial pelos utilizadores de canábis<sup>9</sup>, o seu consumo pode afetar a progressão da infeção ativa de tuberculose. Na tabela seguinte estão representados os 2 casos dos indivíduos pertencentes à patologia forense cujos relatórios referiram patologias como a SIDA e a tuberculose e cujos resultados foram positivos para canabinóides. Desta forma foi explorada a hipótese de possível consumo de canábis para alívio dos sintomas destas patologias e como potencial fator de risco de desenvolvimento destas doenças.

**Tabela 10:** Descrição da idade, do género, das concentrações dos canabinóides CBD, THC, 11-OH-THC e THC-COOH e etanol e patologias dos indivíduos, em amostras recolhidas *post mortem*.

Idade	49 anos	44 anos
Género	Masculino	Masculino
CBD (ng/mL)	5.9	1.5
THC (ng/mL)	19	12
11-OH-THC (ng/mL)	2.3	9.3
THC-COOH (ng/mL)	25	91
Etanol (g/L)	Negativo	Negativo
Causa de morte	Desconhecida	Natural
Patologias	SIDA	Tuberculose

As concentrações de  $\Delta^9$ -THC são superiores às concentrações de CBD e, por isso, é possível tratar-se de consumidores de canábis rico em  $\Delta^9$ -THC. Uma das informações relevantes sobre o indivíduo de 49 anos é que sofria de SIDA, não estando especificado se foi relevante na causa de morte. Apesar do uso de terapia antirretroviral altamente ativa, estima-se que a prevalência de perda de peso devido à SIDA esteja entre 14% a 38%.<sup>135</sup> Para combater essa perda de peso foi desenvolvido o medicamento Marinol, cujo ingrediente ativo é o dronabinol, uma molécula sintética de  $\Delta^9$ -THC, que está associado ao estímulo do apetite em pacientes com SIDA e para controlo da náusea e vômitos em pacientes em quimioterapia.<sup>9</sup> Os pacientes com SIDA são um dos maiores grupos que usam canabinóides medicinalmente.<sup>131</sup> Além disso, uma quantidade considerável de pacientes com SIDA fuma marijuana. Se este indivíduo tivesse consumido dronabinol ou alguma substância idêntica como combate a um dos sintomas da sua doença, a concentração de CBD não estaria tão elevada. Assim, é provável que apenas tenha consumido alguma substância rica em  $\Delta^9$ -THC mas com vestígios de CBD.

O uso ilícito de drogas agrava a pandemia de tuberculose e complica o controlo da doença. Como referido anteriormente, a tuberculose é causada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis* que afeta os pulmões e às vezes espalha-se por outras partes do corpo.<sup>136</sup> A canábis foi identificada como possível fator de risco em alguns surtos de tuberculose uma vez que a inalação de canábis pode ser importante na transmissão da doença se, por exemplo, os sujeitos compartilharem canas de água de canábis ou os cigarros. Estes comportamentos podem oferecer um ambiente propício para a eficácia da transmissão de tuberculose. Além disso, as evidências suportam que fumadores crónicos de canábis têm associado sintomas de bronquite crónica e inflamação das vias aéreas que podem diminuir as defesas naturais dos pulmões contra infeções.<sup>137</sup> Assim, apesar de não

ser especificado se a tuberculose esteve na origem da causa da morte, se o indivíduo de 44 anos era um consumidor crónico de canábis, é provável que o consumo de canabinóides tenha agravado ainda mais a sua condição. Se, por ventura, o consumo foi isolado, então o consumo de canábis não afetou a progressão da doença.

Como descrito anteriormente, existe um grupo considerável de pessoas com SIDA que fuma marijuana regularmente. Deste modo, devido às infeções oportunistas e às inúmeras formas de consumir canábis, como fumar, inalar e via intravenosa, o canábis pode prejudicar ainda mais a sua patologia. Da mesma forma, a tuberculose afeta maioritariamente os pulmões. Considerando que fumar é a via preferencial para o consumo de canábis, a sua utilização, à semelhança do caso anterior, pode afetar a progressão da doença.

O canábis consumido nas amostras discutidas neste subcapítulo é maioritariamente constituído por  $\Delta 9$ -THC. Apesar do  $\Delta 9$ -THC provocar efeitos psicoativos, também tem propriedades terapêuticas que poderiam coadjuvar as benzodiazepinas e antidepressivos e aliviar alguns dos sintomas provocados pela SIDA. Contudo, o seu consumo por estes indivíduos é meramente recreativo e, por isso, não obtiveram do canábis um coadjuvante para as benzodiazepinas, antidepressivos e auxiliar no alívio de sintomas para as suas patologias. Além disso, a utilização de CBD é apontada como mais viável. Por fim, devido às infeções oportunistas e do consumo de canábis ser maioritariamente por fumar, o seu consumo pode prejudicar ainda mais a patologia dos sujeitos e afetar a progressão da doença.

### **3.2.2. Consumo de canábis e o seu impacto em acidentes de viação**

Como referido no capítulo Introdução, o consumo de canábis rico em  $\Delta 9$ -THC influencia a capacidade de condução e aumenta o risco de acidente de viação.<sup>60</sup> Apesar da concentração sanguínea do  $\Delta 9$ -THC não estar diretamente correlacionada com as concentrações cerebrais responsáveis pelos efeitos adversos comportamentais e cognitivos, as amostras de sangue, comparativamente a fluidos orais, são as vias mais eficazes para avaliar condutores sob influência recente de canábis.<sup>60</sup> De forma a avaliar a influência do consumo de canábis na condução, e tendo em conta o tempo de deteção e o tempo de colheita, foi sugerida por bibliografia consultada uma concentração mínima de condenação de 2 ng/mL para o  $\Delta 9$ -THC.<sup>103,113</sup> Isto porque valores de  $\Delta 9$ -THC superiores a 1 ng/mL geram um elevado risco de acidente<sup>5</sup> e o nível mínimo de 2 ng/mL para o  $\Delta 9$ -THC na estrada é justificado por evidências científicas que mostram correlação entre

tarefas críticas na condução, como o tempo de reação e o desempenho cognitivo, com a concentração de  $\Delta 9$ -THC no sangue acima desse valor.<sup>113</sup> De forma a suportar um valor mínimo de 2 ng/mL, foi realizado um estudo para verificar quanto tempo depois de fumar um cigarro rico em  $\Delta 9$ -THC (13,5 mg) a concentração sanguínea se reduz a 2 ng/mL.<sup>113</sup> Os autores verificaram que, 120 minutos depois, a concentração de  $\Delta 9$ -THC encontrava-se a 2 ng/mL para fumadores leves e para os fumadores crônicos atingirem esse valor foram necessários 150 a 180 minutos. Como já referido, além da influência do consumo de canábis, principalmente rico em  $\Delta 9$ -THC, também existem evidências do consumo concomitante de canábis e álcool aumentar o risco de acidente de viação.<sup>61</sup> Assim, este capítulo tem como objetivo relacionar a probabilidade do consumo simultâneo de álcool e de canábis e o consumo isolado de canábis com o risco de acidentes de viação fatais e não fatais.

### 3.2.2.1. Acidentes de viação fatal

Alguns estudos suportam a hipótese de que, quando o álcool e o canábis são consumidos em simultâneo, o risco de acidente de viação é superior do que quando estas substâncias são consumidas separadamente.<sup>61</sup> Assim, de forma a colocar a hipótese de uma possível relação entre o consumo simultâneo de álcool e canábis e acidentes de viação fatais foram estudadas 5 amostras *post mortem* (tabela 11) em que 3 resultados foram positivos para álcool e canabinóides e 2 resultados positivos apenas para canabinóides.

**Tabela 11:** Descrição da idade, do género e das concentrações dos canabinóides CBD, THC, 11-OH-THC e THC-COOH e etanol, em acidentes de viação fatais, em amostras recolhidas *post mortem*.

Idade	22 anos	59 anos	34 anos	28 anos	Desconhecida
Género	Masculino	Masculino	Masculino	Masculino	Masculino
CBD (ng/mL)	2.4	1.1	1.7	1.81	1.7
THC (ng/mL)	17	12	16	16	7.9
11-OH-THC (ng/mL)	2.9	-	6.2	2.4	-
THC-COOH (ng/mL)	39	17	68	57	27
Etanol (g/L)	Negativo	Negativo	1.81	1.99	1.99

Em todos estes casos é provável a utilização de canábis rico em  $\Delta 9$ -THC, uma vez que a diferença entre as concentrações de CBD e de  $\Delta 9$ -THC é considerável ( $\Delta 9$ -THC > 15%).<sup>48</sup> Segundo o estudo realizado por Cherpitel *et al.*, o consumo de uma

substância ilícita, nomeadamente de canábis, aumenta o risco de acidente de viação.<sup>61</sup> Assim, há a possibilidade de implicação dos canabinóides na causa de morte dos indivíduos de 22 e 59 anos, uma vez que eram os condutores dos veículos. Segundo a lei portuguesa “considera-se sob influência de álcool o condutor que apresente uma taxa de álcool no sangue igual ou superior a 0,5 g/l” e “o condutor em regime probatório e o condutor de veículo de socorro ou de serviço urgente, de transporte coletivo de crianças e jovens até aos 16 anos, de táxi, de automóvel pesado de passageiros ou de mercadorias ou de transporte de mercadorias perigosas que apresente uma taxa de álcool no sangue igual ou superior a 0,2 g/l”.<sup>138</sup> As concentrações sanguíneas de etanol nos 3 últimos casos são superiores a 0.5 g/L e os indivíduos de 34 e 28 anos eram os condutores do veículo. Além disso, as concentrações de etanol e de canabinóides no sangue, nomeadamente de  $\Delta 9$ -THC, são elevadas e a combinação de álcool e canábis aumenta significativamente o risco de sofrer acidentes de viação. Deste modo, é muito provável que a combinação destas duas substâncias esteja envolvida na causa dos acidentes e, conseqüentemente, na morte destes indivíduos. Em relação ao indivíduo de idade desconhecida, apesar da concentração de etanol ser muito superior a 0.5 g/L, este não era o condutor do veículo e, por isso, não podemos especular se as concentrações de canabinóides e de etanol tiveram algum impacto na sua morte. Uma vez que, nos quatro casos discutidos anteriormente foram detetadas no sangue concentrações de apenas  $\Delta 9$ -THC e  $\Delta 9$ -THC em conjunto com etanol numa concentração superior a 0,5 g/L e a presença destas substâncias em conjunto e separadamente elevam o risco de acidente, podemos concluir que é possível que tenham instigado os acidentes de viação que, nestes casos, foram fatais.

#### **3.2.2.2. Acidentes de viação não fatal**

Como já referido, o  $\Delta 9$ -THC afeta vários aspetos essenciais da condução e, por isso, o risco de acidente de viação torna-se elevado quando o  $\Delta 9$ -THC está presente no sangue.<sup>60</sup> Desta forma selecionaram-se as 3 amostras disponíveis referentes aos casos da autoridade de segurança rodoviária (tabela 12) que foram positivas para canabinóides, álcool e outra substância ilícita (cocaína). O objetivo foi avaliar uma possível relação entre o consumo isolado de canábis, o consumo simultâneo de álcool, canábis e cocaína e o risco de acidente de viação. Também foi explorada uma possível interferência dos canabinóides CBD e  $\Delta 9$ -THC no metabolismo da cocaína.

**Tabela 12:** Descrição da idade, do género, das concentrações dos canabinóides CBD, THC, 11-OH-THC e THC-COOH, etanol e de outras substâncias psicotrópicas, em amostras originárias de fiscalização da autoridade de segurança rodoviária.

Idade	35 anos	26 anos	52 anos
Género	Masculino	Feminino	Masculino
CBD (ng/mL)	1.7	1.6	1.6
THC (ng/mL)	8.4	7.2	6.1
11-OH-THC (ng/mL)	3.1	1.3	5.8
THC-COOH (ng/mL)	44	66	101
Etanol (g/L)	1.81	-	1.04
Outras substâncias	Negativo	Negativo	Benzoilecgonina

“-“ não foi solicitado

Como descrito anteriormente, as concentrações de  $\Delta 9$ -THC acima de 2 ng/mL causam um grande comprometimento da condução e um elevado risco de acidente.<sup>113</sup> Assim, visto que todas as concentrações de  $\Delta 9$ -THC são superiores a 2 ng/mL e que todos os casos se referem a intervenientes em acidentes de viação, é muito provável que o consumo de cânabis rico em  $\Delta 9$ -THC tenha implicação no acidente. Apesar de ainda não ser bem definido se o risco de lesão é superior no consumo conjunto de álcool e cânabis ou no consumo destas substâncias separadamente, algumas evidências mostram que os condutores positivos para álcool e para cânabis apresentam maiores probabilidades de cometer um erro que condutores positivos apenas para álcool ou apenas para cânabis.<sup>60</sup> No caso dos indivíduos de 35 e 52 anos, a concentração de etanol é muito superior a 0,5 g/L, e embora os três indivíduos sejam intervenientes num acidente de viação, o risco de cometer um erro na condução pode ser superior nos casos com presença de etanol do que no caso com ausência da substância. Além disso, nos três casos, a concentração de CBD é muito inferior à concentração de  $\Delta 9$ -THC, o que sugere que estes indivíduos consumiram cânabis rico em  $\Delta 9$ -THC e pobre em CBD. Relativamente ao 3º caso, o indivíduo de 52 anos, foi também detetado benzoilecgonina, um metabolito da cocaína. Muitos dos indivíduos com suscetibilidade ao consumo de cânabis também têm suscetibilidade ao consumo de cocaína e, por isso, a maior parte dos consumidores de cocaína também consomem cânabis.<sup>139</sup> Porém, o facto de muitos consumidores de drogas pesadas terem consumido anteriormente drogas leves não implica necessariamente que o consumo de drogas leves cause o consumo de drogas pesadas. Uma explicação alternativa

é que o consumo de ambas as drogas está correlacionado com certas características que tornam alguns indivíduos mais suscetíveis ao consumo de drogas leves e pesadas.<sup>139</sup> Assim, é muito provável que se trate também de um consumidor de canábis rico em  $\Delta 9$ -THC, uma vez que a concentração de  $\Delta 9$ -THC é superior à concentração de CBD e porque os resultados foram positivos para o consumo de cocaína e de álcool.

A cocaína é a segunda droga mais consumida no mundo, sendo apenas superada pelo canábis.<sup>140</sup> Inicialmente a administração da cocaína provoca sensação de euforia, agitação, hiperatividade, insônia, perda de apetite e sensação de fadiga.<sup>140</sup> O consumo de canábis pode minimizar alguns destes efeitos devido às suas propriedades sedativas, porém não encontramos evidências na literatura que suportem esta hipótese. Após o efeito agudo, a cocaína pode provocar depressão, cansaço e disforia, sendo a maioria dos efeitos sentidos no sistema cardiovascular, resultando num aumento da pressão arterial e frequência cardíaca, palpitações, arritmias e enfartes do miocárdio.<sup>140</sup> Uma vez que, o consumo de canábis rico em  $\Delta 9$ -THC está associado a vários problemas cardiovasculares<sup>12</sup>, a coadministração de canábis e cocaína poderá potencializar esses problemas. Como já referido nos casos anteriores, o consumo de canábis potencia o risco de acidente de viação e o consumo conjunto de canábis e de álcool também.<sup>61</sup> Além disso, a cocaína, quando consumida com álcool forma um novo metabolito, o cocaetileno, que tem efeitos 3 a 5 vezes mais longos e duradouros que a cocaína consumida isoladamente.<sup>140</sup> Uma questão que se coloca inevitavelmente é se o consumo de canábis influencia o metabolismo da cocaína. A cocaína é metabolizada principalmente em benzoilecgonina por carboxilesterases e, devido ao tempo de meia vida da cocaína ser cerca de 60 minutos, a benzoilecgonina é o principal indicador biológico utilizado para monitorizar o consumo da droga.<sup>140</sup> A norcocaina é outro metabolito da cocaína, sendo produzido em pequenas quantidades por desmetilação no fígado, principalmente pela enzima CYP3A4.<sup>141</sup> Assim, a coadministração de cocaína com inibidores do CYP3A4 poderá resultar na toxicidade por cocaína. Uma vez que, neste caso, suspeita-se que se trate de um consumidor de canábis rico em  $\Delta 9$ -THC e esta molécula mostrou ter efeitos inibitórios em CYP3A4<sup>47</sup>, a co-administração destas duas substâncias, apesar da norcocaina ser produzida em pequenas quantidades, deve ser cuidadosa para não por em causa a toxicidade da cocaína devido à inibição do seu metabolismo.

Assim, nos dois primeiros casos discutidos, o consumo de  $\Delta 9$ -THC e o consumo de  $\Delta 9$ -THC e álcool pode ter influenciado o estado psicomotor dos indivíduos e, conseqüentemente, ter elevado o risco de acidente. Por outro lado, o consumo triplo de

canábis, álcool e cocaína amplifica o risco de acidente para valores elevadíssimos e, por isso, é altamente provável que a combinação destas três substâncias tenha interferido na origem da causa do acidente sofrido pelo indivíduo de 52 anos.

Nos casos discutidos tanto em acidentes fatais como acidentes não fatais, podemos concluir que é possível que tanto a interação entre o canábis e o álcool como o consumo de canábis e o consumo triplo de canábis, álcool e cocaína tenham instigado os acidentes de viação que, em alguns casos foram fatais e noutros não. Contudo, não foi possível diferenciar o risco de o acidente ser fatal ou não com o consumo de canábis, álcool e cocaína pois as amostras disponíveis são insuficientes para fazer esse exercício.

### **3.2.3. Consumo de canábis em amostras de clínica forense**

Um patologista forense normalmente não interage com indivíduos vivos e um clínico forense não interage com o falecido.<sup>110</sup> O clínico tem diversas funções como a avaliação da intoxicação e abstinência de álcool e de drogas, a documentação e interpretação com precisão das lesões, a colheita de amostras forenses conforme apropriado, após discussão com os investigados e os investigadores e finalmente a realização de exames do estado mental. O número de pessoas que passam pelo sistema de justiça com problemas de uso indevido de substâncias está a aumentar e é essencial que os clínicos forenses estejam cientes das tendências atuais das drogas para praticar com competência nesse campo.<sup>110</sup> Assim, é necessário obter uma história do uso recente de drogas para estabelecer se o indivíduo é utilizador crónico ou passivo. Também é necessário que o clínico saiba o histórico do uso indevido de substância como o período e a frequência de utilização, a quantidade consumida num dia “típico” e nas últimas 24 horas, a via de administração, a hora da última dose e medicamentos prescritos. Além disso, o exame deve procurar sinais de intoxicação, abstinência ou uso prévio de drogas.<sup>110</sup>

Num inquérito nacional ao consumo de substâncias psicoativas em 2016/17, a canábis foi a substância psicoativa ilícita com maior prevalência, cerca de 11%, um valor superior ao anterior inquérito de 2012 (9.4%).<sup>91</sup> Além disso, as razões consideradas mais importantes associadas ao consumo de canábis rico em  $\Delta$ 9-THC foram sentir os efeitos psicoativos, a curiosidade/experimentação e ajudar a relaxar, sendo estas razões as mesmas desde 2001. A aprovação da legislação do canábis medicinal e a despenalização do canábis recreativo pode ter consequências na taxa de prevalência do consumo. Assim, é relevante perceber em que ponto Portugal se encontra clinicamente com o consumo de

canábis. Na tabela seguinte estão representados os 3 casos disponíveis de indivíduos pertencentes à clínica forense. O objetivo foi avaliar a administração de canábis em crianças, sendo suspeita uma administração acidental e sendo factual uma administração contínua com fins assumidamente terapêuticos. Além disso, nestes dois casos, foi recolhido sangue em dois momentos distintos e, por isso, pode ser possível retirar conclusões mais assertivas. Por fim, foi discutida a hipótese de influência do consumo simultâneo de canábis e MDMA no metabolismo deste último e também discutido os possíveis efeitos secundários que provêm deste consumo conjunto.

**Tabela 13:** Descrição da idade, do género, das concentrações dos canabinóides CBD, THC, 11-OH-THC e THC-COOH e etanol e de outras substâncias psicotrópicas, em amostras pertencentes à clínica forense.

Idade	28 anos	1 ano		2 anos	
	Género	Feminino	Masculino	Feminino	
		1º momento	2º momento	1º momento	2º momento
CBD (ng/mL)	1	-	1.5	17	10
$\Delta$ 9-THC (ng/mL)	3.6	3	11	-	-
11-OH-THC (ng/mL)	4.5	2.3	1.9	-	-
THC-COOH (ng/mL)	63	386	129	-	2
Etanol (g/L)	Negativo	Negativo	-	-	-
Outras substâncias	MDA;MDMA	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

“-“ não foi solicitado

O  $\Delta$ 9-THC e os restantes canabinóides são rapidamente distribuídos para a gordura e para o músculo devido à baixa solubilidade destas moléculas, resultando num declínio rápido da concentração de canabinóides no sangue.<sup>5</sup> O tempo de meia vida de distribuição do  $\Delta$ 9-THC pelos tecidos é menor que 1h e concentrações superiores a 10 ng/mL de  $\Delta$ 9-THC no sangue 1h depois de um consumo moderado a alto é raro. Nos dois primeiros casos, a concentração de  $\Delta$ 9-THC é superior à concentração de CBD, o que

indica consumo de canábis rico em  $\Delta 9$ -THC. A dependência crónica de uma droga pode ser definida como o consumo que se tornou habitual e compulsivo.<sup>142</sup> Assim, em relação ao caso da criança do sexo masculino de 1 ano não há a suspeita de consumo crónico, mas sim de um único consumo de um grande volume de canabinóides. Para confirmar as suspeitas procedeu-se à recolha de sangue em dois momentos, nomeadamente após a chegada ao hospital e quase 13 horas depois da colheita inicial. Como podemos verificar no 1º momento a concentração de  $\Delta 9$ -THC é inferior a 10 ng/mL, o que corrobora a bibliografia.<sup>5</sup> Porém, esta afirmação pode ser questionável pois, além de o metabolismo nas crianças ser maioritariamente mais lento, foram encontradas diferenças importantes no metabolismo da droga entre pacientes pediátricos e pacientes adultos, nomeadamente envolvendo a enzima CYP3A4.<sup>143</sup> Após o consumo de  $\Delta 9$ -THC, os canabinóides são retidos no músculo e na gordura e posteriormente libertados gradualmente<sup>25</sup>, o que fundamenta o facto de o  $\Delta 9$ -THC estar mais elevado no 2º momento do que no 1º, assim como as concentrações de 11-OH-THC e de THC-COOH ainda se encontrarem elevadas algum tempo após o consumo único de canábis rico em  $\Delta 9$ -THC.

Assim como no caso anterior, no caso da criança do sexo feminino de 2 anos também foi requerido um 2º momento onde o THC-COOH no sangue revelou um valor baixo. Além disso, nos dois momentos não foram detetados canabinóides na urina, sendo que o CBD é maioritariamente excretado inalterado pelas fezes.<sup>21</sup> Por outro lado, a concentração de CBD é elevada nos dois momentos, o que indica que o canábis consumido era pobre em  $\Delta 9$ -THC e rico em CBD. Além disso, no relatório é fornecida a informação de que este caso se trata de uma administração contínua de um óleo de CBD com objetivos assumidamente terapêuticos. Assim, estas informações indicam que se trata de um consumidor crónico pois, além da informação adicional no relatório, entre a recolha de amostra do 1º momento e a recolha de amostra do 2º momento passaram 7 meses e, por isso, para a concentração de CBD ser elevada nos dois momentos é porque o consumo de canábis é contínuo. Nos estudos em humanos não foi detetado  $\Delta 9$ -THC no plasma depois da administração de apenas CBD<sup>30,31</sup>, porém foi detetado em animais<sup>29</sup> e em estudos *in vitro*.<sup>28</sup> Deste modo, apesar de nestas análises não ter sido detetado  $\Delta 9$ -THC após a administração maioritariamente de CBD, em análises futuras ao sangue desta criança pode ser detetado. Assim, até existirem estudos que confirmem ou desmintam categoricamente a possível ciclização de CBD em  $\Delta 9$ -THC *in vivo*, é necessária cautela na administração de CBD e aconselhado, em análises futuras, analisar além do CBD, possíveis concentrações de  $\Delta 9$ -THC e dos seus metabolitos.

No caso da mulher de 28 anos, também foi detetado MDMA e o seu metabolito principal, a MDA. A MDMA (ecstasy) é um derivado da metanfetamina que provoca, euforia intensa, aumento da energia e do estado de alerta, diminuição do cansaço, da necessidade de dormir e do apetite, entre outros.<sup>140</sup> A toxicidade aguda inclui tremores, palpitações, arritmias cardíacas, colapso cardiovascular, edema pulmonar, entre outros. Após consumo crónico de MDMA foram reportadas consequências severas como enfarte do miocárdio, derrame, cardiomiopatia, ansiedade, depressão e morte. A maioria dos consumidores recreativos de MDMA, cerca de 90-98%, também consomem canábis.<sup>144</sup> O MDMA é um estimulante poderoso do SNC enquanto que o canábis é um relaxante. Assim, a sua coadministração pode representar efeitos opostos em 3 áreas psicológicas, nomeadamente a excitação, a temperatura corporal e o stress oxidativo. Ou seja, o MDMA provoca euforia, é hipertérmico e aumenta o stress oxidativo, enquanto que o CBD é sedativo, hipotérmico e antioxidante.<sup>144</sup> Portanto, o consumo de canábis pode modular as reações agudas e subagudas à MDMA, reduzir a hipertermia aguda e melhorar o stress oxidativo induzido por MDMA. O canábis pode assim fornecer algum grau de neuroprotecção contra os efeitos nocivos do ecstasy.<sup>144</sup> Contudo, as propriedades hipotérmicas e antioxidantes que são importantes para minimizar os efeitos da MDMA são características do CBD e não do  $\Delta$ 9-THC, já que apenas os efeitos sedativos são comuns a estas moléculas.<sup>144</sup> Assim, só o canábis rico em CBD poderá oferecer algum grau de neuroprotecção celular contra os efeitos estimulantes poderosos do MDMA. Visto que canábis consumido era rico em  $\Delta$ 9-THC, o consumo de canábis em nada contraria os efeitos causados pelo MDMA. Aliás, os efeitos cardiovasculares são comuns ao MDMA e ao  $\Delta$ 9-THC e, por isso, o consumo de canábis pode intensificar estes problemas. Deste modo, a contribuição geral da canábis, neste caso, é predominantemente negativa.

Uma questão que se coloca é se o consumo de canábis influencia no metabolismo do MDMA. A desmetilação da MDMA no metabolito ativo MDA ocorre principalmente pela enzima CYP2D6 e, com contribuições menores, pelas enzimas do Citocromo 2B6 (CYP2B6), CYP1A2 e CYP3A4 sendo, por isso, provavelmente a inibição do CYP2D6 a principal causa de maior toxicidade do MDMA.<sup>141</sup> Assim, apesar do  $\Delta$ 9-THC ter efeitos inibitórios na enzima CYP3A4<sup>47</sup>, o canábis não estará diretamente envolvido na inibição do metabolismo do MDMA.

Podemos concluir que no caso da criança de 1 ano é provável que se trate de um caso isolado, ou seja, uma única administração de canábis rico em  $\Delta$ 9-THC. Por outro lado, no caso da criança de 2 anos, trata-se de uma consumidora crónica com

administração contínua de um óleo de CBD com objetivos assumidamente terapêuticos. Por fim, no caso da mulher de 28 anos, além de CBD e de  $\Delta$ 9-THC, também foi detetado no sangue MDMA e o seu principal metabolito e, por isso, é possível que se trate de uma consumidora assídua de canábis e de MDMA. Além disso, nada indica que o consumo de canábis por parte desta mulher interfira no metabolismo de MDMA. Por outro lado, visto que o canábis consumido era rico em  $\Delta$ 9-THC, o consumo simultâneo destas substâncias tem efeitos negativos.

Os derivados da planta *Cannabis sativa* são as substâncias psicoativas recreativas ilícitas de maior consumo mundial, sendo o CBD e o  $\Delta$ 9-THC os fitocanabinóides com eficácia científica comprovada. Neste capítulo foi apresentado e discutido um conjunto de casos de indivíduos que tinham presente no sangue CBD e  $\Delta$ 9-THC e, na maioria das vezes, também 11-OH-THC e THC-COOH. As conclusões deste estudo são que todos os casos, à exceção de um, são de consumo recreativo ou acidental de canábis rico em  $\Delta$ 9-THC. Nos casos referentes a amostras com a presença de substâncias medicamentosas, como o consumo é recreativo, não há intenção de coadjuvar o consumo de canábis com estas substâncias. Contudo, o  $\Delta$ 9-THC pode ter interferido na metabolização do diazepam e do midazolam e a fluvoxamina pode ter inibido a metabolização do CBD e do  $\Delta$ 9-THC, aumentando as suas biodisponibilidades e, por isso, o risco de toxicidade e efeitos adversos. A SIDA é uma doença na qual é frequente o consumo recreativo de canábis. O seu consumo, no entanto, pode originar infeções oportunistas. A tuberculose é uma doença que afeta maioritariamente os pulmões e sendo a via inalada a preferencial pelos consumidores de canábis, este consumo pode afetar a progressão da doença. Nos casos discutidos de acidentes de viação, é fortemente sugerido pela bibliografia que a presença de  $\Delta$ 9-THC no sangue interfere com a qualidade da condução. Além disso, também surgiram casos com a presença de álcool e cocaína que também são substâncias que comprometem a condução. Deste modo, sendo que em todos os casos discutidos, o canábis consumido era rico em  $\Delta$ 9-THC e em alguns casos havia também presença de outras substâncias, então é possível que o consumo destas por parte dos indivíduos tenha contribuído para os acidentes de viação, que nuns casos foi fatal e noutros não. Por fim, nos casos de clínica forense, existem casos de consumo assumidamente terapêutico de CBD e acidental de  $\Delta$ 9-THC por duas crianças e consumo recreativo de  $\Delta$ 9-THC e de MDMA por uma mulher adulta. Estes casos de clínica forense são um pouco atípicos pois dois deles referem-se a crianças. Deste modo não foi possível realizar um paralelismo

entre estes casos e o consumo de canábis em Portugal. Apenas existe um caso de consumo de canábis em idade adulta o que não é suficiente para retirar conclusões significativas.

Como referido no capítulo Introdução, até ao momento, nos estudos realizados em humanos não houve deteção de  $\Delta 9$ -THC no plasma após administração oral de apenas CBD.<sup>30,31</sup> Porém estes estudos são ainda insuficientes. Se futuramente se confirmar *in vivo* e em humanos a conversão de CBD em  $\Delta 9$ -THC, torna-se possível a deteção de  $\Delta 9$ -THC após a administração de apenas CBD, o que levará à necessidade de uma reavaliação da maioria dos casos deste estudo em que se suspeita de consumo de canábis rico em  $\Delta 9$ -THC, pois a concentração de  $\Delta 9$ -THC é superior a 15% em relação à concentração de CBD.

#### 4. Conclusão

O canábis é a substância psicoativa mais consumida do mundo. Além disso, o consumo de canábis na forma medicinal está a aumentar em todo o mundo e Portugal, em 2018, aprovou uma legislação específica que regulamenta o uso de canábis para fins terapêuticos. A utilização terapêutica dos princípios ativos do  $\Delta 9$ -THC e do CBD é indiscutível e estas moléculas são atualmente alvos de estudos pré-clínicos e clínicos. Assim, torna-se essencial estudar a influência de certos fatores como a idade, o consumo de substâncias medicamentosas, acidentes de viação com o consumo de canábis e o seu possível impacto na saúde, na morte e qualidade de vida dos consumidores.

Este trabalho teve dois objetivos principais, nomeadamente uma análise estatística e uma análise descritiva dos resultados de amostras com a presença dos canabinóides CBD,  $\Delta 9$ -THC, 11-OH-THC e THC-COOH e a sua relação com diversos parâmetros, circunstâncias e substâncias e o terceiro objetivo de criar hipóteses para serem exploradas em estudos no futuro. Desta forma, este estudo foi dividido em 2 partes, a análise estatística e a análise descritiva. Para isso foram utilizados dados de 2019 fornecidos pelo INMLCF, I.P de 24 amostras positivas para os canabinóides CBD,  $\Delta 9$ -THC, 11-OH-THC e THC-COOH. Para a análise estatística, inicialmente verificou-se a normalidade da distribuição de variáveis contínuas pelo teste de Shapiro-Wilk. De seguida, dependendo da distribuição das amostras, as médias de duas variáveis foram comparadas pelo teste paramétrico t de student e pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. Além disso, em alguns grupos das variáveis foi aplicado o teste de correlação de Pearson e o teste de correlação de Spearman, dependendo mais uma vez se a distribuição das amostras é normal ou não. Para este estudo foram analisadas possíveis influências da idade e do consumo de substâncias medicamentosas na concentração de canabinóides no sangue assim como avaliada a concentração de canabinóides e os seus metabolitos no sangue em várias amostras.

Os resultados do estudo da influência da idade na concentração de canabinóides no sangue não foram significativos, ou seja, não encontramos diferenças significativas entre a concentração de canabinóides no sangue e a idade dos indivíduos. Estes resultados estão de acordo com a bibliografia. Contudo, existem diferenças bastante significativas, como a natureza e o número das amostras e, por isso, não é possível retirar conclusões mais assertivas. Por outro lado, existem apenas diferenças significativas entre a concentração de  $\Delta 9$ -THC no sangue e a presença ou ausência de substâncias medicamentosas, o que vai está de acordo com o facto de o consumo de canábis estar de

alguma forma associado a depressão e ansiedade. Contudo, no nosso estudo, o grupo de amostras sem a presença de substâncias medicamentosas tem concentrações superiores de  $\Delta 9$ -THC, o que não é suportado pela bibliografia. O facto de o número de amostras ser muito baixo, e tratando-se de amostras *post mortem*, pode explicar a desigualdade dos resultados desta análise com os resultados encontrados na bibliografia. Demonstrou-se, porém, que há diferenças significativas entre o  $\Delta 9$ -THC e a fatalidade do acidente e que a concentração de  $\Delta 9$ -THC é mais elevada nos grupos de acidentes fatais do que nos grupos de acidentes não fatais, como é sugerido na bibliografia.

Relativamente aos testes de correlação, não existem estudos que correlacionem o CBD, o  $\Delta 9$ -THC, o 11-OH-THC e o THC-COOH com amostras *post mortem*, amostras de clínica forense e amostras de acidentes de viação não fatais. As variáveis  $\Delta 9$ -THC e 11-OH-THC e as variáveis 11-OH-THC e THC-COOH estão correlacionadas nas amostras *post mortem*, uma correlação positiva média. Uma vez que o  $\Delta 9$ -THC é metabolizado em 11-OH-THC, que posteriormente é metabolizado em THC-COOH, estes resultados estão em conformidade com a bibliografia. Em relação às amostras de clínica forense, existe correlação negativa forte entre o CBD e os metabolitos de  $\Delta 9$ -THC (11-OH-THC e THC-COOH). Estes resultados podem ser fundamentados pelo facto de que o CBD, em concentrações suficientes, inibe o metabolismo de  $\Delta 9$ -THC, diminuindo, assim, a concentração dos seus metabolitos. Porém, não é possível concluir se essa inibição ocorreu por dados insuficientes. Por fim, nas amostras da autoridade de segurança rodoviária, apenas as variáveis  $\Delta 9$ -THC e THC-COOH estão correlacionadas numa correlação positiva forte. Mais uma vez, visto que o THC-COOH é metabolito de  $\Delta 9$ -THC, este resultado está de acordo com a bibliografia.

Como já referido, também se realizaram análises descritivas dos resultados. Desta forma, não foi necessário qualquer tratamento dos dados, apenas foram divididos em alguns grupos de estudo. Foram assim formados 3 grupos principais, nomeadamente amostras *post mortem*, amostras de indivíduos envolvidos em acidentes de viação e amostras de clínica forense. As amostras *post mortem* foram ainda subdivididas em amostras com a presença de substâncias medicamentosas (benzodiazepinas, antidepressivos e antiépiléticos) e amostras de indivíduos com patologias associadas (SIDA e tuberculose) e as amostras pertencentes a acidentes de viação também foram subdivididas em amostras de acidentes fatais e acidentes não fatais.

Relativamente às amostras *post mortem* com presença de substâncias medicamentosas, existem evidências na literatura de que o CBD pode ajudar na

terapêutica dos sintomas da depressão e da epilepsia e o  $\Delta 9$ -THC na indução do sono. Porém, o canábis, nas amostras estudadas, foi consumido num contexto ilícito e era rico em  $\Delta 9$ -THC. Por isso, não existiu a intenção de coadjuvar o canábis com as ditas substâncias medicamentosas. Da mesma forma, nas amostras *post mortem* de indivíduos com patologias associadas, o canábis consumido também o foi num contexto ilícito e era rico em  $\Delta 9$ -THC. Assim, mais uma vez, não existiu a intenção destes indivíduos em consumir canábis com fins terapêuticos, apesar de existirem evidências de que a molécula  $\Delta 9$ -THC auxilia no combate a alguns sintomas da SIDA. Além disso, visto que fumar é a via preferencial para o consumo de canábis, a sua utilização pode afetar a progressão da tuberculose, uma vez que esta doença afeta maioritariamente os pulmões. Devido às infeções oportunistas, o consumo de canábis também pode causar sérios problemas a doentes com SIDA.

Nos casos referentes a acidentes de viação fatais e não fatais, existem fortes evidências científicas de que o  $\Delta 9$ -THC, o álcool e a cocaína influenciam vários aspetos na condução. Visto que o CBD tem propriedades sedativas, também é sugerido que o seu consumo provoque dificuldades na condução. Assim, uma vez que todas as amostras destes grupos são positivas para  $\Delta 9$ -THC e CBD e algumas positivas para álcool e cocaína, podemos concluir que é possível que tanto a interação entre o canábis e o álcool como o consumo de canábis e o consumo triplo de canábis, álcool e cocaína tenham promovido e elevado o risco de acidentes de viação, que em alguns casos foram fatais e noutros não. Porém, a falta de algumas informações, como a via de administração, o tempo desde o último consumo e o número de amostras disponíveis impossibilitam diferenciar o risco de o acidente ser fatal ou não com o consumo de canábis, de álcool e de cocaína.

Por fim, nas 3 amostras de clínica forense, duas pertencem a crianças. Como é altamente improvável o consumo recreativo por estas, é provável que no caso onde o canábis consumido era rico em  $\Delta 9$ -THC se trate de um caso isolado e acidental. Por outro lado, no caso da criança em que o consumo de canábis era rico em CBD, há a informação de administração contínua de um óleo de CBD com objetivos assumidamente terapêuticos. Em relação ao último caso, além de CBD e de  $\Delta 9$ -THC, também foi detetado no sangue MDMA e o seu principal metabolito. Visto que a maioria dos consumidores recreativos de MDMA, também consomem canábis, é possível que se trate de uma consumidora assídua de canábis e de MDMA.

Apesar de alguns resultados destas análises estatísticas e análises descritivas estarem em conformidade com a bibliografia, uma vez que o número de amostras é muito baixo e a natureza das amostras não ser a mesma nos estudos realizados anteriormente, as conclusões retiradas são muito subjetivas e, por isso, é sugerido cautela na interpretação destes resultados. Num trabalho futuro é sugerido estudos com maior número de amostras, consideração por mais variáveis como o sexo, o estatuto económico e académico, entre outros e mais informações como a via de administração, o tempo desde o último consumo e a frequência de utilização das substâncias.

## 5. Bibliografia

1. Timbrell, JA. (2019). *Principles of Biochemical Toxicology*. Londres: Informa Healthcare.
2. Langman LJ, Kapur BM. (2006). Toxicology: Then and now. *Clin Biochem*, 39(5), 498-510.
3. Smith MP, Bluth MH. (2016). Forensic Toxicology: An Introduction. *Clin Lab Med*, 36(4), 753-759.
4. Lei 19/2013 do Ministério da Justiça. Diário da República no 14/2013, Série I de 21 de Janeiro de 2013 [Internet]. Disponível em <https://data.dre.pt/eli/port/19/2013/01/21/p/dre/pt/html> acessado a 30/10/2019.
5. Drummer OH. (2004). Postmortem toxicology of drugs of abuse. *Forensic Sci Int*, 142(2), 101-113.
6. Redrup MJ, Igarashi H, Schaeffgen J, Lin J, Geisler L, M'Baret MB, Ramachandran S, Cardoso T, Hillewaert V. (2016). Commentary Sample Management: Recommendation for Best Practices and Harmonization from the Global Bioanalysis Consortium Harmonization Team. *The AAPS Journal*, 18(2), 290-293.
7. Asati A, Sahoo H, Sahu S, Dwivedi A. (2017). Phytochemical and pharmacological profile of Cannabis sativa L. *Drugs*, 2(2), 37-45.
8. Foster BC, Abramovici H, Harris CS. (2019). Cannabis and Cannabinoids: Kinetics and Interactions. *Am J Med*, 132(11), 1266-1270.
9. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. (2018). *Medical use of cannabis and cannabinoids: questions and answers for policymaking*. Luxembourg.
10. Nuutinen T. Medicinal properties of terpenes found in Cannabis sativa and Humulus lupulus. (2018). *Eur J Med Chem*, 157, 198-228.
11. Byars T, Theisen E, Bolton DL. (2019). Using Cannabis to Treat Cancer-Related Pain. *Semin Oncol Nurs*, 35(3), 300-309.
12. Drummer OH, Gerostamoulos D, Woodford NW. (2019). Cannabis as a cause of death: A review. *Forensic Sci Int*, 298, 298-306.
13. Russo EB. (2011). Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *Br J Clin Pharmacol*, 163, 1344-1364.
14. Havig SM, Høiseth G, Strand MC, Kariner RA, Brochmann GW, Strand DH, Bachs L, Vindenes L. (2017). THC and CBD in blood samples and seizures in

- Norway: Does CBD affect THC-induced impairment in apprehended subjects?  
*Forensic Sci Int*, 276, 12-17.
15. Stott CG, White L, Wright S, Wilbraham D, Guy GW. (2013). A phase I study to assess the single and multiple dose pharmacokinetics of THC/CBD oromucosal spray. *Eur J Clin Pharmacol*, 69(5), 1135-1147.
  16. Cardenia V, Gallina Toschi T, Scappini S, Rubino RC, Rodriguez-Estrada MT. (2018). Development and validation of a Fast gas chromatography/mass spectrometry method for the determination of cannabinoids in Cannabis sativa L. *J Food Drug Anal*, 26(4), 1283-1292.
  17. Wang YH, Avula B, Elsohly MA, Radwan MM, Wang M, Wanas AS, Mehmedic Z, Khan IA. (2018). Quantitative Determination of  $\Delta^9$ -THC, CBG, CBD, Their Acid Precursors and Five Other Neutral Cannabinoids by UHPLC-UV-MS. *Planta Med*, 84(4), 260-266.
  18. Scheidweiler KB, Newmeyer MN, Barnes AJ, Huestis MA. (2016). Quantification of cannabinoids and their free and glucuronide metabolites in whole blood by disposable pipette extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1453, 34-42.
  19. Elkins AC, Deseo MA, Rochfort S, Ezernieks V, Spangenberg G. (2019). Development of a validated method for the qualitative and quantitative analysis of cannabinoids in plant biomass and medicinal cannabis resin extracts obtained by super-critical fluid extraction. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*, 1109, 76-83.
  20. Izzo AA, Borrelli F, Capasso R, Di Marzo V, Mechoulam R. (2009). Non-psychoactive plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. *Trends Pharmacol Sci*, 30(10), 515-527.
  21. Huestis MA. (2007). Human cannabinoid pharmacokinetics. *Chem Biodivers*, 4(8), 1770-1804.
  22. Cbme E, Guy GW. (2003). A Phase I , Open Label , Four-Way Crossover Study to Compare the Pharmacokinetic Profiles of a Single Dose of 20 mg of a Cannabis Based Medicine Extract (CBME) Administered on 3 Different Areas of the Buccal Mucosa and to Investigate the Pharmacokinetics of CBME per Oral in Healthy Male and Female Volunteers. *Journal of Cannabis Therapeutics*, 3(4), 79-120.
  23. Zhornitsky S, Potvin S. (2012). Cannabidiol in Humans - The Quest for Therapeutic Targets. *Pharmaceuticals*, 529-552.

24. Klumpers LE, Beumer TL, Hasselt JGC Van, Lipplan A, Karger LB, Kleinloog AD, Freijer JJ, Kam ML, Gerven JMA Van. (2012). Novel  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol formulation Namisol® has beneficial pharmacokinetics and promising pharmacodynamic effects. *Br J Clin Pharmacol*, 74(1), 42-53.
25. Hložek T, Uttl L, Kadeřábek L, Balíková M, Lhotková E, Horsley RR, Nováková P, Šíchová K, Štefková K, Tylš F, Kuchař M, Páleníček T. (2017). Pharmacokinetic and behavioural profile of THC, CBD, and THC+CBD combination after pulmonary, oral, and subcutaneous administration in rats and confirmation of conversion in vivo of CBD to THC. *Eur Neuropsychopharmacol*, 27(12), 1223-1237.
26. Watanabe K, Usami N, Osada S, Narimatsu S, Yamamoto I, Yoshimura H. (2019). Cannabidiol metabolism revisited: tentative identification of novel decarbonylated metabolites of cannabidiol formed by human liver microsomes and recombinant cytochrome P450 3A4. *Forensic Toxicol*, 37(2), 449-455.
27. Jiang R, Yamaori S, Takeda S, Yamamoto I, Watanabe K. (2011). Identification of cytochrome P450 enzymes responsible for metabolism of cannabidiol by human liver microsomes. *Life Sci*, 89(5-6), 165-170.
28. Russo EB. (2017). Cannabidiol Claims and Misconceptions. *Trends Pharmacol Sci*, 38(3), 198-201.
29. Watanabe K, Itokawa Y, Yamaori S, Funahashi T, Kimura T, Kaji T, Usami N, Yamamoto I. (2007). Conversion of cannabidiol to  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol and related cannabinoids in artificial gastric juice, and their pharmacological effects in mice. *Forensic Toxicol*, 16-21.
30. Crippa JA, Batalla A, Bhattacharyya S, Atakan Z, Borgwardt S, Allen P. (2012). Acute Effects of a Single, Oral dose of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC) and Cannabidiol (CBD) Administration in Healthy Volunteers. *Curr Pharm Des*, 18, 4966-4979.
31. Crippa AS, Zuardi AW, Hallak JE, Miyazawa B, Bernardo SA, Donaduzzi CM, Guzzi S, Favreto WA, Campos A, Queiroz ME, Guimarães FS, Zimmermann PM, Rechia LM, Tondo VJ, Brum L. (2020). Oral Cannabidiol Does Not Convert to  $\Delta^8$ -THC or  $\Delta^9$ -THC in Humans: A Pharmacokinetic Study in Healthy Subjects. *Cannabis Cannabinoid Res*, 5(1), 89-98.
32. Rong C, Lee Y, Carmona NE, Cha DS, Raguett RM, Rosenblat JD, Mansur RB, Ho RC, McIntyre RS. (2017) Cannabidiol in medical marijuana: Research vistas

- and potential opportunities. *Pharmacol Res*, 121, 213-218.
33. Russo EB. (2016). Beyond Cannabis: Plants and the Endocannabinoid System. *Trends Pharmacol Sci*, 37(7), 594-605.
  34. Huestis MA, Solimini R, Pichini S, Pacifici R, Carlier J, Busardò FP. (2019). Cannabidiol Adverse Effects and Toxicity. *Curr Neuropharmacol*, 17(10), 974-989.
  35. Yang L, Li F, Han Y, Jia B, Ding Y. (2015). Cannabinoid Receptor CB2 Is Involved in Tetrahydrocannabinol-Induced Anti-Inflammation against Lipopolysaccharide in MG-63 Cells. *Mediators Inflamm*, 1-12.
  36. Indorato F, Liberto A, Ledda C, Romano G, Barbera N. (2016). The therapeutic use of cannabinoids: Forensic aspects. *Forensic Sci Int*, 265, 200-203.
  37. Decreto-Lei no 15/93 do Ministério da Justiça. Diário da República no 18/1993, Série I-A de 22 de Janeiro de 1993 [Internet]. Disponível em <https://data.dre.pt/eli/dec-lei/15/1993/01/22/p/dre/pt/html>, acessado a 13/11/2019.
  38. Decreto-Lei no 33/2018 do Ministério da Justiça. Diário da República no 93/2018, Série I de 15 de Maio de 2018 [Internet]. Disponível em <https://data.dre.pt/eli/dec-lei/33/2018/05/15/p/dre/pt/html>, acessado a 2/10/2019.
  39. Decreto-Lei no 8/2019 do Ministério da Justiça. Diário da República no 10/2019, Série I de 15 de Janeiro de 2019 [Internet]. Disponível em <https://data.dre.pt/eli/dec-lei/8/2019/01/15/p/dre/pt/html>, acessado a 4/10/2019.
  40. Sarris J, Sinclair J, Karamacoska D, Davidson M, Firth J. (2020). Medicinal cannabis for psychiatric disorders: a clinically-focused systematic review. *BMC Psychiatric*, 1-14.
  41. Alsherbiny MA. (2019). Medicinal Cannabis - Potential Drug Interactions. *Medicines*, 1-12.
  42. Uzun S, Kozumplik O, Jakovljevi M, Sedi B. (2010). Side Effects of Treatment with Benzodiazepines. *Psychiatria Danubina*, 22(1), 90-93.
  43. Schüttler J, Schwilden H. (2008). *Modern Anesthetics: Handbook of Experimental Pharmacology*. Berlin: Springer.
  44. Dean L. (2016). Diazepam Therapy and CYP2C19 Genotype. *Medical Genetics Summaries*, 1-5.
  45. Ching NR, Alzghari AK, Alzghari SK. (2018). The Relationship of UGT2B15 Pharmacogenetics and Lorazepam for Anxiety Disclosures. *Curreus*, 10(8), 13-15.
  46. Purcell C, Davis A, Moolman N, Taylor SM. (2019). Reduction of Benzodiazepine

- Use in Patients Prescribed Medical Cannabis. *Cannabis Cannabinoid Res*, 4(3), 214-218.
47. Brown JD. (2020). Potential Adverse Drug Events with Tetrahydrocannabinol ( THC ) Due to Drug - Drug Interactions. *J. Clin. Med*, 9(4), 919-930.
  48. Cash MC, Cunnane K, Fan C, Romero EA. (2020). Mapping cannabis potency in medical and recreational programs in the United States. *PLoS One*, 15(3), 1-22.
  49. Eb R, Jg B, Cannabis VST, Rognli EB, Soest T Von. (2020). Cannabis use in early adulthood is prospectively associated with prescriptions of antipsychotics, mood stabilizers, and antidepressants. *Acta Psychiatrica Scand*, 149-156.
  50. Khawam EA. (2006). Side effects of antidepressants : An overview. *Cleve Clin J Med*, 73(4), 351-361.
  51. El-alfy AT, Ivey K, Robinson K, Ahmed S, Radwan M, Slade D, Khan I, ElSohly M, Ross S. (2010). Antidepressant-like effect of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol and other cannabinoids isolated from *Cannabis sativa* L. *Pharmacol Biochem Behav*, 95(4), 434-442.
  52. Sexton M, Cuttler C, Finnell JS, Mischley LK. (2016). A Cross-Sectional Survey of Medical Cannabis Users : Patterns of Use and Perceived Efficacy. *Cannabis Cannabinoid Res*, 131-138.
  53. Weger VA De, Goel S, Moos R Von, Schellens JHM. (2018). A drug - drug interaction study to assess the effect of the CYP1A2 inhibitor fluvoxamine on the pharmacokinetics of dovitinib ( TKI258 ) in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol*, 81(1), 73-80.
  54. Lynch T, Price A, Virginia E. (2007). The Effect of Cytochrome P450 Metabolism on Drug Response, Interactions, and Adverse Effects. *Am Fam Physician*, 76(3), 391-396.
  55. Fisher RS, Boas WVE, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, Engel J. (2005). Epileptic Seizures and Epilepsy: Definitions Proposed by the International League Against Epilepsy ( ILAE ) and the International Bureau for Epilepsy ( IBE ). *Epilepsia*, 46(4), 470-472.
  56. Cramer JA, Wheless J. (2014). Adverse effects of antiepileptic drugs: a brief overview of important issues. *Expert Rev. Neurother*, 10(6), 885-891.
  57. Rein AG, Haba VV, Pedraza AJD. (2015). Drug-resistant epilepsy: Definition and treatment alternatives. *Neurología*, 30(7), 439-446.
  58. Milosheska D, Lorber B, Kastelic M, Grabnar I. (2016). Pharmacokinetics of

- lamotrigine and its metabolite N-2-glucuronide: Influence of polymorphism of UDP- glucuronosyltransferases and drug transporters. *Br J Clin Pharmacol*, 82, 399-411.
59. Brown JD. (2019). Potential Adverse Drug Events and Drug – Drug Interactions with Medical and Consumer Cannabidiol ( CBD ) Use. *J Clin Med*, 8(9), 939-953.
  60. Bondallaz P, Favrat B, Chtioui H, Fornari E, Maeder P, Giroud C. (2016). Cannabis and its effects on driving skills. *Forensic Sci Int*, 268,92-102.
  61. Cherpitel CJ, Ye Y, Stockwell T, Vallance K, Chow C, Brubacher JR. (2018). Risk of Injury from Alcohol, Marijuana and other Drug Use Among Emergency Department Patients. *Drug Alcohol Depend*, 121-127.
  62. Hartman RL, Brown TL, Milavetz G, Spurgin A, Gorelick DA, Goffrey GR, Huestis MA. (2016). Effect of Blood Collection Time on Measured  $\Delta$ 9-Tetrahydrocannabinol Concentrations: Implications for Driving Interpretation and Drug Policy. *Clin Chem*, 377, 367-377.
  63. Arkell TR, Lintzeris N, Kevin RC, Ramaekers JG, Vandrey R, Irwin C, Haber PS, McGregor IS. (2019). Cannabidiol ( CBD ) content in vaporized cannabis does not prevent tetrahydrocannabinol ( THC )- induced impairment of driving and cognition. *Psychopharmacology*, 2713-2724.
  64. Andreuccetti G, Cherpitel CJ, Carvalho HB, Leyton V, Miziara ID. (2018). Alcohol in combination with illicit drugs among fatal injuries in Sao Paulo , Brazil: An epidemiological study on the association between acute substance use and injury. *Int J Care Injure*, 49, 2186-2192.
  65. Citti C, Braghiroli D, Vandelli MA, Cannazza G. (2018). Pharmaceutical and biomedical analysis of cannabinoids: A critical review. *J Pharm Biomed Anal*, 147, 565-579.
  66. Stefanelli F, Pesci FG, Giusiani M, Chericoni S. (2018). A novel fast method for aqueous derivatization of THC, OH-THC and THC-COOH in human whole blood and urine samples for routine forensic analyses. *Biomed Chromatogr*, 32(4), 1-10.
  67. Benowitz N, Nardone N, St.Helen G, Addo N, Jacob P, Liakoni E, Jain S, Hooshfar S, Lynch K. (2019). Quantitative biochemical screening for marijuana use and concordance with tobacco use in urban adolescents. *Drug Alcohol Depend*, 205, 107-113.
  68. Tanaka H. (2011). Immunochemical Approach Using Monoclonal Antibody against  $\Delta$ 9-Tetrahydrocannabinolic Acid (THCA) to Discern Cannabis Plants and

- to Investigate New Drug Candidates. *Curr Drug Discov Technol*, 8(1), 3-15.
69. 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 Sci Int*, 299, 142-150.
  70. Prabu SL, Suriyaprakash NK. (2012). Extraction of Drug from the Biological Matrix: A Review. Naik GR (Ed.), *Applied Biological Engineering- Principles and Practice* (pp. 479-506). Intech.
  71. Raharjo TJ, Verpoorte R. (2004). Methods for the analysis of cannabinoids in biological materials: A review. *Phytochem Anal*, 15, 79-94.
  72. Burnier C, Esseiva P, Roussel C. (2019). Quantification of THC in Cannabis plants by fast-HPLC-DAD: A promising method for routine analyses. *Talanta*, 192, 135-141.
  73. 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. *Anal Bioanal Chem*, 406(29), 7549-7560.
  74. Ciolino LA, Ranieri TL, Taylor AM. (2018). Commercial cannabis consumer products part 1 : GC – MS qualitative analysis of cannabis cannabinoids. *Forensic Sci Int*, 289, 429-437.
  75. Ciolino LA, Ranieri TL, Taylor AM. (2018). Commercial cannabis consumer products part 2: HPLC-DAD quantitative analysis of cannabis cannabinoids. *Forensic Sci Int*, 289, 438-447.
  76. Citti C, Ciccarella G, Braghiroli D, Parenti C, Vandelli MA, Cannazza G. (2016). Medicinal cannabis: Principal cannabinoids concentration and their stability evaluated by a high performance liquid chromatography coupled to diode array and quadrupole time of flight mass spectrometry method. *J Pharm Biomed Anal*, 128, 201-209.
  77. Andrenyak DM, Moody DE, Slawson MH, O’Leary DS, Haney M. (2017). Determination of  $\Delta$ -9-tetrahydrocannabinol (THC), 11-hydroxy-THC, 11-nor-9-carboxy-THC and cannabidiol in human plasma using gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol*, 41, 277-288.
  78. Jamwal R, Topletz AR, Ramratnam B, Akhlaghi F. (2017). Ultra-high performance liquid chromatography tandem mass-spectrometry for simple and simultaneous quantification of cannabinoids. *J Chromatogr B*, 1048, 10-18.

79. Angeli I, Casati S, Ravelli A, Minoli M, Orioli M. (2018). A novel single-step GC–MS/MS method for cannabinoids and 11-OH-THC metabolite analysis in hair. *J Pharm Biomed Anal*, 155, 1-6.
80. Hubbard JA, Smith BE, Sobolesky PM, Kim S, Hoffman MA, Stone J, Huetis MA Grelotti DJ, Grant I, Marcotte TS, Fitzgerald RL. (2019). Validation of a liquid chromatography tandem mass spectrometry ( LC-MS / MS ) method to detect cannabinoids in whole blood and breath. *Clin Chem Lab Med*, 58(5), 673-681.
81. Palazzoli F, Citti C, Licata M, Vilella A, Manca L, Zoli M, Vandelli MA, Forni F, Cannazza G. (2018). Development of a simple and sensitive liquid chromatography triple quadrupole mass spectrometry (LC – MS / MS) method for the determination of cannabidiol (CBD), 9 -tetrahydrocannabinol (THC) and its metabolites in rat whole blood after oral administration of a single high dose of CBD. *J Pharm Biomed Anal*, 150, 25-32.
82. Sørensen LK, Hasselstrøm JB. (2017). Sensitive Determination of Cannabinoids in Whole Blood by LC – MS-MS After Rapid Removal of Phospholipids by Filtration. *J Anal Toxicol*, 382-391.
83. Harvey D. (2000). *Modern Analytical Chemistry*. McGraw-Hill.
84. Leghissa A, Hildenbrand ZL, Schug KA. (2018). A review of methods for the chemical characterization of cannabis natural products. *J Sep Sci*, 41(1), 398-415.
85. Nahar L, Guo M, Sarker SD. (2019). Gas chromatographic analysis of naturally occurring cannabinoids: A review of literature published during the past decade. *Phytochem Anal*, 1-12.
86. Lin DL, Wang SM, Wu CH, Chen BG, Liu RH. (2016). Chemical derivatization for forensic drug analysis by GC- and LC-MS. *Forensic Sci Rev*, 28(1), 17-35.
87. Qi BL, Liu P, Wang QY, Cai WJ, Yuan BF, Feng YQ. (2014). Derivatization for liquid chromatography-mass spectrometry. *Trends Anal Chem*, 59, 121-132.
88. Hammer O, Harper DA, Ryan PD. (2001). PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4(1), 1-280.
89. Koechl B, Unger A, Fischer G. (2013). Age-related aspects of addiction. *Gerontology*, 58(6), 540-544.
90. Kuerbis A, Sacco P, Blazer DG, Moore AA. (2014). Substance Abuse Among Older Adults. *Clin Geriatr Med*, 30(3), 629-654.
91. Balsa C, Vital C, Urbano C. (2018). *IV Inquérito Nacional Ao Consumo de*

- Substâncias Psicoativas Na População Geral, Portugal 2016/2017*. Faculdade de Ciências Sociais e Humanas, Universidade de Lisboa.
92. Jones AW, Holmgren A, Kugelberg FC. (2008). Driving under the influence of cannabis: a 10-year study of age and gender differences in the concentrations of tetrahydrocannabinol in blood. *Addiction*, 452-461.
  93. Stoner SA. (2017). *Effects of Marijuana on Mental Health: Anxiety Disorders*. Univerddidade de Washington.
  94. Crippa A, Waldo A, Martı R. (2009). Cannabis and anxiety : A critical review of the evidence. *Hum Psychopharmacol*, 27(4), 512-523
  95. Childs E, Lutz JA, Wit H. (2017). Dose-related of delta-9-THC on emotional responses to acute psychosocial stress. *Drug Alcohol Depend*, 136-144.
  96. Danielsson A, Lundin A, Agardh E, Allebeck P, Forsell Y. (2016). Cannabis use, depression and anxiety: A 3-year prospective population-based study. *J Affect Disord*, 193, 103-108.
  97. Feingold D, Weiser M, Rehm J, Levran S. (2015). The association between cannabis use and mood disorders: A longitudinal study. *J Affect Disord*, 172, 211-218.
  98. Ware M, Marmorstein N, Cipriani A, Dendukuri N, Mayo N. (2019). Association of Cannabis Use in Adolescence and Risk of Depression, Anxiety, and Suicidality in Young Adulthood: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Psychiatry*, 76(4), 426-434.
  99. Gage SH, Hickman M, Heron J, Munafò MR, Lewis G, Macleod J, Zammit S. (2015). Associations of Cannabis and Cigarette Use with Depression and Anxiety at Age 18: Findings from the Avon Longitudinal Study of Parents and Children. *PLoS One*, 1-13.
  100. Zaheer S, Kumar D, Khan MT, Giyanwani PR, Kiran FNU. (2018). Epilepsy and Cannabis : A Literature Review Methodology. *Cureus*, 10(9), 3-9.
  101. Martin J, Gadegbeku B, Wu D, Viallon V, Laumon B. (2017). Cannabis , alcohol and fatal road accidents. *PLoS One*, 12(11), 1-16.
  102. Bédard M, Dubois S, Weaver B. (2007). The Impact of Cannabis on Driving. *Can J Public Health*, 98(1), 6-11.
  103. Andrews R, Murphy KG, Nahar L, Paterson S. (2015). Cannabinoid Concentrations Detected in Fatal Road Traffic Collision Victims Compared with a Population of Other Postmortem Cases. *Clin Chem*, 61(10), 1256-1264.

104. Kennedy MC. (2010). Post-mortem drug concentrations. *Intern Med J*, 40, 183-187.
105. Rodda KE, Drummer OH. (2006). The redistribution of selected psychiatric drugs in post-mortem cases. *Forensic Sci Int*, 164, 235-239.
106. Allan AR. (2008). Post-mortem toxicology of commonly-abused drugs. *Diagnostic Histopathol*, 15(1), 33-41.
107. Holland MG, Schwoppe DM, Stoppacher R, Gillen SB, Huestis MA. (2011). Postmortem redistribution of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC), 11-hydroxy-THC (11-OH-THC), and 11-nor-9-carboxy-THC (THCCOOH). *Forensic Sci Int*, 212(1-3), 247-251.
108. Lemos NP, Ingle EA. (2011). Cannabinoids in Postmortem Toxicology. *J Anal Toxicol*, 35, 394-401.
109. Lucas CCJ, Medical H, Bag L, Lambton N, Lucas CJ, Schneider J. (2018). The pharmacokinetics and the pharmacodynamics of cannabinoids. *Br J Clin Pharmacol*, 84(11), 2477:2482.
110. Stark MM. (2000) *Clinic Forensic Medicine*. Humana Press.
111. Hädener M, Gelmi TJ, Martin-fabritius M, Weinmann W. (2019). Cannabinoid concentrations in confiscated cannabis samples and in whole blood and urine after smoking CBD-rich cannabis as a "tobacco substitute". *Int J Legal Med*, 133(3), 821-832.
112. Meier U, Dussy F, Scheurer E, Mercer-chalmers-bender K, Hangartner S. (2018). Cannabinoid concentrations in blood and urine after smoking cannabidiol joints. *Forensic Sci Int*, 291, 62-67.
113. Ferrari D, Manca M, Premaschi S, Ban G, Locatelli M. (2018). Toxicological investigation in blood samples from suspected impaired driving cases in the Milan area: Possible loss of evidence due to late blood sampling. *Forensic Sci Int*, 288, 211-217.
114. Dubois S, Mullen N, Weaver B, Be M. (2015). The combined effects of alcohol and cannabis on driving : Impact on crash risk. *Forensic Sci Int*, 248, 94-100.
115. Saukko P, Knight B. (2004). *Knight's Forensic Pathology*. Londres: Hodder Arnold.
116. Dix J. (2000) *Color Atlas of Forensic Pathology*. CRC Press.
117. Stone DM, Holland KM, Bartholow B, Logan JE, McIntosh W, Trudeau A, Rockett I. (2017). Deciphering Suicide and Other Manners of Death Associated

- with Drug Intoxication: A Centers for Disease Control and Prevention Consultation Meeting Summary. *Am J Public Health*, 107(8), 1233-1239.
118. Calabria B, Degenhardt L, Hall W, Lynskey M. (2010). Does cannabis use increase the risk of death? Systematic review of epidemiological evidence on adverse effects of cannabis use. *Drug Alcohol Rev*, 29(3), 318-330.
  119. Yankey BA, Rothenberg R, Strasser S, Ramsey-white K, Okosun IS. (2017). Effect of marijuana use on cardiovascular and cerebrovascular mortality: A study using the National Health and Nutrition Examination Survey linked mortality file. *Eur J Prev Cardiol*, 24(17), 1833-1840.
  120. Mukamal KJ, Maclure M, James ME, Mittleman MA. (2008). An exploratory prospective study of marijuana use and mortality following acute myocardial infarction. *Am Heart J*, 155(3), 465-470.
  121. Darke S, Duflou J, Torok M. (2009). Toxicology and Circumstances of Completed Suicide by Means Other than Overdose. *J Forensic Sci*, 54(2), 490-494.
  122. Tiihonen J, Mittendorfer-rutz E, Minna T, Alexanderson K, Tanskanen A. (2016). Mortality and Cumulative Exposure to Antipsychotics, Antidepressants, and Benzodiazepines in Patients With Schizophrenia: An Observational Follow-Up Study. *Am J Psychiatry*, 173(6), 600-606.
  123. Dodds TJ. (2017). Prescribed benzodiazepines and suicide risk: A review of the literature. *Prim Care Companion CNS Disord*, 19(2), 1-6.
  124. Tiihonen J, Suokas JT, Suvisaari JM, Korhonen P. (2012) Polypharmacy With Antipsychotics, Antidepressants, or Benzodiazepines and Mortality in Schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*, 69(5), 476-483.
  125. Mcguire P, Robson P, Cubala WJ, Vasile D, Morrison PD, Barron R, Taylor A, Wright S. (2018). Cannabidiol (CBD) as an Adjunctive Therapy in Schizophrenia: A Multicenter Randomized Controlled Trial. *Am J Psychiatry*, 175(3), 225-231.
  126. Gaston TE, Szaflarski JP. (2018). Cannabis for the Treatment of Epilepsy: an Update. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 18(11), 1-9.
  127. Sales AJ, Crestani CC, Guimarães FS, Joca SRL. (2018). Antidepressant-like effect induced by Cannabidiol is dependent on brain serotonin levels. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 255-261.
  128. Sevrioukova IF, Poulos TL. (2016). Structural basis for regiospecific midazolam oxidation by human cytochrome P450 3A4. *PNAS*, 114(3), 486-491.
  129. Csete J, Kamarulzaman A, Kazatchkine M, Altice F, Balicki M, Buxton J, Cepeda

- J, Comfort M, Goosky E, Goulão J, Hart C, Horton R, Kerr T, Lajous AM, Lewis S, Martin N, Mejía D, Mathiesson D, Obot I, Ogunrombi A, Sherman S, Stone J, Vallath N, Vickerman P, Zábanský T, Beyer C. (2016). Public health and international drug policy. *Lancet*, 1427-1480.
130. Golucci APB, Marson FAL, Valente MFF, Branco MM, Prado CC, Nogueira RJN. (2019). Influence of AIDS antiretroviral therapy on the growth. *J Pediatr*, 95(1), 7-17.
131. Badowoski ME, Yanful PK. (2018). Dronabinol oral solution in the management of anorexia and weight loss in AIDS and cancer. *Ther Clin Risk Manag*, 643-651.
132. Molina PE, Winsauer P, Zhang P, Walker E, Birke L, Amedee A, Stouwe CV, Troxclair D, McGoey R, Varner K, Byerley L, LaMotte L. (2011). Cannabinoid Administration Attenuates the Progression of Simian Immunodeficiency Virus. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 27(6), 585-592.
133. Furin J, Cox H, Pai M. (2019). Tuberculosis. *Lancet*, 1642-1656.
134. World Health Organization. (2014). *Global tuberculosis report 2014*.
135. Perez SE. (2016). Clinical utility of dronabinol in the treatment of weight loss associated with HIV and AIDS. *HIV AIDS (Auckl)*, 37-45.
136. Kiboi NG, Nebere SN, Karanja JK. (2016). Immunological Interactions of Tuberculosis with Drugs and Substance Use : A Systematic Review and Update. *J Pulm Respir Med*, 6(2), 326-332.
137. French CE, Coope CM, Mcguinness LA, Beck CR, Newitt S, Ahyow L, Hickman M, Oliver I. (2019). Cannabis use and the risk of tuberculosis: a systematic review. *BCM Public Health*, 19(1), 1-13.
138. Decreto-lei no 72/2013 do Ministério da Justiça. Diário da República no 169/2013, Série I de 3 de Setembro de 2013 [Internet]. Disponível em <https://data.dre.pt/eli/lei/72/2013/09/03/p/dre/pt/html>, acedido a 23/3/2020.
139. Ours JC Van. (2003). Is cannabis a stepping-stone for cocaine?. *J Health Econ*, 22(4), 539-554.
140. Lizasoain I, Moro M, Lorenzo P. (2002). Cocaína: aspectos farmacológicos. *Addicciones*, 14(1), 57-64.
141. Pal D, Mitra AK. (2006). MDR- and CYP3A4-Mediated Drug - Drug Interactions. *J Neuroimmune Pharmacol*, 1(3), 323-339.
142. Haden M, Kendall P, Mathias R. (2005). *A Public Health Approach To Drug Control in Canada*. Health Officers Council of British Columbia.

143. Benedetti MS, Baltes EL. (2003). Drug metabolism and disposition in children. *Fundam Clin Pharmacol*, 17(3), 281-299.
144. Parrott AC, Milani RM, Daumann J. (2007). Cannabis and Ecstasy/MDMA (3,4-methylenedioxymethamphetamine ): an analysis of their neuropsychobiological interactions in recreational users. *J Neural Trasm*, 959-968.