

Universidade de brasília
Instituto de química
Química tecnológica

John Lucas Fernandes da Silva

Avaliação da viabilidade de determinação dos teores de THC ou CBD em óleos medicinais de *Cannabis* sativa L. por PCR, PLS e espectroscopia no infravermelho médio

Brasília - DF
2024

Universidade de brasília
Instituto de química
Química tecnológica

John Lucas Fernandes da Silva

Avaliação da viabilidade de determinação dos teores de THC ou CBD em óleos medicinais de *Cannabis* sativa L. por PCR, PLS e espectroscopia no infravermelho médio

Trabalho de conclusão de curso em química tecnológica do Instituto de Química da Universidade de Brasília, como requisito para a aquisição do título de Bacharel em Química Tecnológica.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Vasconcelos de Almeida
Coorientador: Prof. Dr. Fabricio Machado Silva

Brasília - DF
2024

Agradecimentos

À professora Fernanda, pela orientação e direcionamento ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Fabricio, coorientador, pela orientação na organização dos dados e no manuseio e compreensão dos modelos quimiométricos PCR e PLS.

Ao técnico de laboratório Gabriel pelo auxílio no manuseio do equipamento de infravermelho no procedimento experimental.

Resumo

Devido às aplicações da planta *Cannabis* sativa L. e seus canabinoides no tratamento de várias doenças, ao alto custo associado aos seus produtos e à crescente demanda, é evidente a importância de métodos de quantificação precisos e confiáveis dos canabinoides presentes na planta. Dessa maneira, este trabalho visa avaliar o desempenho dos modelos de regressão em componentes principais (Principal Component Regression – PCR) e regressão por mínimos quadrados parciais (Partial Least Squares Regression – PLS) em diluições de óleos de Cannabis com alto teor dos canabinoides THC e CBD. Os dados utilizados foram obtidos a partir das diluições com azeite de oliva e consistem em valores de absorbância em determinados números de onda, medidos por um espectrômetro de infravermelho médio com transformada de Fourier. Para a determinação do número adequado de componentes principais ou variáveis latentes nos modelos PCR e PLS, foi utilizado o método de validação cruzada. No geral, ambos os métodos resultaram em bons parâmetros estatísticos. Uma das conclusões mais relevantes é que os resultados foram altamente dependentes do conjunto dos números de onda. Como esperado, devido às características dos dois modelos, o PLS apresentou melhores resultados na maioria dos casos e foi menos dependente do tamanho da janela de números de onda usada no filtro de Savitzky-Golay em comparação ao PCR. Foram testadas diferentes combinações de correções de linha de base com a primeira e segunda derivada dos dados para ambos os modelos, sendo que a correção de linha de base de Pearson resultou em parâmetros estatísticos significativamente melhores do que as demais, mesmo considerando apenas o primeiro componente ou variável latente, na maioria dos casos.

Palavras-chave: *Cannabis*, infravermelho, Quimiometria, PCR, PLS, Canabinoides, THC, CBD.

Abstract

Due to the applications of *Cannabis* sativa L. and its cannabinoids in the treatment of various diseases, the high cost associated with its products, and the growing demand, the importance of precise and reliable quantification methods for cannabinoids is evident. Thus, this study aims to evaluate the performance of Principal Component Regression (PCR) and Partial Least Squares Regression (PLS) models in the dilution of Cannabis oils with high concentrations of THC and CBD. The data used were obtained from dilutions in olive oil and consist of absorbance values at specific wavenumbers, measured using a Fourier-transform mid-infrared spectrometer. Cross-validation was employed to determine the appropriate number of principal components or latent variables for the PCR and PLS models. Overall, both methods resulted in good statistical parameters. One of the most significant conclusions is that the results were highly dependent on the wavenumber grouping. As expected, due to the characteristics of both models, PLS showed better performance in most cases and was less dependent on wavenumber grouping compared to PCR. Different baseline correction combinations with the first and second derivative of the data were tested for both models, with Pearson baseline correction yielding significantly better statistical parameters than the other corrections, even when considering only the first component, in most cases.

Keywords: *Cannabis,* Infrared, Chemometrics, PCR, PLS, Cannabinoids, THC, CBD.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura molecular do canabidiol (CBD). 10
Figura 2 - Estrutura molecular do Δ9-tetrahidrocanabinol (Δ9-THC). 10
Figura 3 - Relação entre as matrizes Y e X pelo OLS. 13
Figura 4 - Decomposição da matriz X em T e P. 14
Figura 5 - Decomposição da matriz Y em U e Q. 16
Figura 6 - Diagrama do NIPALS com iterações. 17
Figura 7 - Equipamento MIR utilizado. 19
Figura 8 - Espectros MIR do teste 1. 21
Figura 9 - Espectros MIR do teste 2. 22
Figura 10 - Espectro MIR do azeite de oliva. 23
Figura 11 - Gráficos de validação cruzada para o PCR teste 1 com primeira derivada. 25
Figura 12 - Gráficos de concentrações preditas versus conhecidas por validação cruzada para o PCR teste 1 com primeira derivada. 26
Figura 13 - Gráficos de validação cruzada para o PCR teste 1 com segunda derivada. 28
Figura 14 - Gráficos de concentrações preditas versus conhecidas por validação cruzada para o PCR teste 1 com segunda derivada. 29
Figura 15 - Gráficos de validação cruzada para o PLS teste 1 com primeira derivada. 30
Figura 16 - Gráficos de validação cruzada para o PLS teste 1 com segunda derivada. 31
Figura 17 - Gráficos de concentrações preditas versus conhecidas por validação cruzada para o PLS teste 1 com segunda primeira. 32
Figura 18 - Gráficos de concentrações preditas versus conhecidas por validação cruzada para o PLS teste 1 com segunda derivada. 33
Figura 19 - Gráficos de validação cruzada para o PCR teste 2 com primeira derivada. 35
Figura 20 - Gráficos de validação cruzada para o PCR teste 2 com segunda derivada. 36
Figura 21 - Gráficos de concentrações preditas versus conhecidas por validação cruzada para o PCR teste 2 com primeira derivada. 37
Figura 22 - Gráficos de concentrações preditas versus conhecidas por validação cruzada para o PCR teste 2 com segunda derivada. 38
Figura 23 - Gráficos de validação cruzada para o PLS teste 2 com primeira derivada. 40
Figura 24 - Gráficos de validação cruzada para o PLS teste 2 com segunda derivada. 41
Figura 25 - Gráficos de concentrações preditas versus conhecidas por validação cruzada para o PLS teste 2 com primeira derivada. 42
Figura 26 - Gráficos de concentrações preditas versus conhecidas por validação cruzada para o PLS teste 2 com segunda derivada. 43

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO **8**
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **9**
2.1. Cannabis sativa L. 9
2.2. Métodos clássicos para análise de canabinoides 10
2.2.1. Cromatografia gasosa (GC) 10
2.2.2. Cromatografia líquida (HPLC) 11
2.3. Espectroscopia de absorção no Infravermelho 11
2.4. Quimiometria 12
2.4.1 Regressão dos mínimos quadrados ordinários (OLS) 13
2.4.2 Regressão por componentes principais (PCR) 14
2.4.3 Regressão por quadrados mínimos parciais (PLS) 16
3. MATERIAIS E MÉTODOS **18**
3.1. Amostras e equipamento 18
3.2. Aquisição dos espectros no infravermelho médio (MIR) 19
3. 2. 1. Teste 1: Diluição de óleo com alto teor de THC em azeite 19
3. 2. 2. Teste 2: Diluição de óleo com alto teor de CBD em azeite 20
3.3. Pré-processamento dos dados 20
3.3.1. Preparação dos dados do teste 1 e teste 2 20
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES **20**
4.1. Espectros do teste 1 e teste 2 20
4.2. Aplicação do PCR e PLS para o teste 1 23
4.2.1. Regressão em componentes principais (PCR) 24
4.2.2. Regressão por quadrados mínimos parciais (PLS) 30
4.3. Aplicação do PCR e PLS para o teste 2 34
4.3.1. Regressão em componentes principais (PCR) 35
4.3.2. Regressão por quadrados mínimos parciais (PLS) 39
5. CONCLUSÃO **44**
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **45**

1. INTRODUÇÃO

A *Cannabis* sativa L. é uma planta herbácea pertencente à família Cannabaceae que possui importante aplicação farmacológica. Entre os compostos produzidos pela *Cannabis* sativa L. estão os canabinoides, que são encontrados em maior concentração nas inflorescências e folhas. Eles interagem com um sistema de neurônios presente no corpo humano produzindo resultados de grande interesse farmacológico, podendo desta maneira evitar os efeitos adversos de alguns medicamentos sintéticos convencionais. Eles são classificados em endocanabinoides, fitocanabinoides e canabinoides sintéticos com mais de 140 fitocanabinoides isolados e identificados atualmente (SONG et al, 2022; LICITRA et al, 2022; PROCACCIA et al, 2022).

Devido a sua aplicação relacionada ao tratamento de várias doenças, ao alto custo associado aos seus produtos e sua crescente demanda, é evidente a importância de métodos de quantificação precisos e confiáveis dos canabinoides presentes na planta. A quantificação de canabinoides em amostras como resinas, extratos e óleos de Cannabis já foi retratada em vários trabalhos usando o método da cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de arranjo de fotodiodos (HPLC-DAD) de forma eficaz e evitando o aquecimento da amostra (SONG et al, 2022; CITTI et al, 2022).

Várias técnicas analíticas e metodologias na análise de produtos de Cannabis são amplamente utilizadas. Alguns exemplos são: testes colorimétricos, cromatografia de camada delgada (CCD), cromatografia líquida (LC), cromatografia gasosa (GC), detector de ionização em chamas (FID), espectrometria de massas (MS) e espectroscopia no infravermelho (UNODC, 2022).

Com a espectroscopia no infravermelho médio (MIR) pode-se obter informações sobre a estrutura molecular de compostos desconhecidos a partir dos seus espectros de maneira a identificar padrões realizando comparações. Uma grande vantagem desse método é a possibilidade de realizar análise rápida e versátil devido a sua capacidade de triagem de amostras em grande volume em pouco tempo. No geral, espectroscopia no infravermelho médio se apresenta como um método rápido, robusto, versátil, econômico, com um simples preparo de amostra, não destrutível, com rápida aquisição de dados e baixo custo relacionado comparado a outros métodos de análise avançados como a cromatografia. (SKOOG et al, 2002; GESKOVSKI at al, 2021)

As metodologias analíticas como o MIR podem também ser otimizadas para obter melhores resultados quando usadas em conjunto com técnicas quimiométricas. A

quimiometria é uma área de estudo que utiliza ferramentas matemáticas e estatísticas em sistemas químicos para extrair informações relevantes sobre esse sistema para auxiliar na sua compreensão. Exemplos de técnicas quimiométricas muito utilizadas são análise dos componentes principais (PCA), calibrações multivariadas e planejamento fatorial. Nas calibrações multivariadas, tem-se como objetivo relacionar matematicamente múltiplas medidas de uma amostra, como por exemplo, o sinal analítico, com uma propriedade de interesse dessa amostra, como por exemplo, a concentração de um ou mais componentes. Alguns exemplos de técnicas de calibração multivariada comumente usadas são: regressão dos mínimos quadrados ordinários (OLS), regressão em componentes principais (Principal Components Analysis - PCR), regressão por mínimos quadrados parciais (Partial Least Squares Regression – PLS).

Dessa maneira, este trabalho visa avaliar a viabilidade da determinação dos teores de THC e CBD em diluições de óleos de Cannabis dos modelos de utilizando a espectroscopia no infravermelho médio, a regressão em componentes principais (Principal Component Regression – PCR) e a regressão por mínimos quadrados parciais (Partial Least Squares Regression – PLS).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Cannabis* sativa L.

A planta *Cannabis* sativa L. esteve presente na tradição de muitas culturas pelo mundo devido a sua versatilidade e plasticidade fenotípica, resultando em importantes impactos em diversos aspectos da vida humana. A sua origem ainda é desconhecida, no entanto, alguns estudos teorizam sobre sua origem na Ásia Central ou Ásia do Sul.

A Cannabis foi tradicionalmente usada em diversas culturas. Como exemplos de seu uso, podem ser citados: propósitos medicinais, produção de fibras, cordas, papel e também como fonte de alimento (BALANT et al, 2021).

Um dos compostos mais importantes da *Cannabis* sativa L. são os canabinoides. Na medicina, os canabinoides são considerados compostos antieméticos, antiespasmódicos, analgésicos e com propriedades estimuladoras de apatite. Seus efeitos possuem aplicação medicinal em síndromes, como esclerose múltipla, síndrome de Dravet, epilepsia, fibromialgia, ansiedade, esquizofrenia, dores crônicas e câncer (LICITRA et al, 2022).

Diversos canabinóides já foram identificados atualmente. Exemplos de canabinoides presentes na planta são canabidiol (CBD) e Δ^9-tetrahidrocanabinol (Δ^9-THC), cujas estruturas moleculares estão representadas nas figuras 1 e 2, respectivamente, além de canabigerol (CBG), canabinol (CBN) e canabicromeno (CBC).

Figura 1 - Estrutura molecular do canabidiol (CBD).

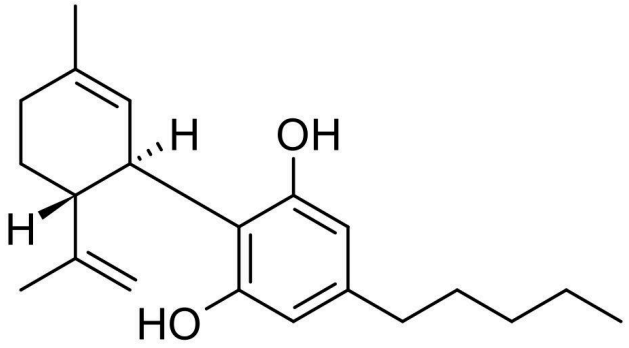
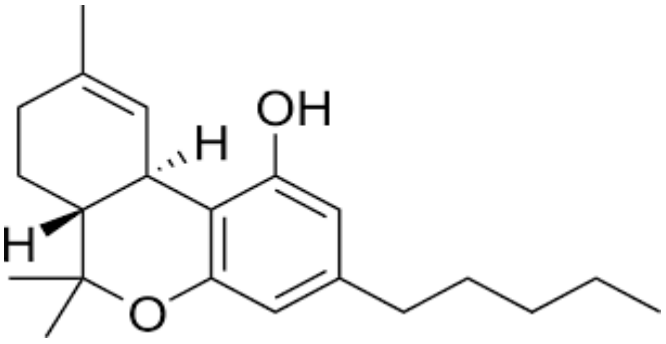


Figura 2 - Estrutura molecular do Δ^9-tetrahidrocanabinol (Δ^9-THC).



2.2. Métodos clássicos para análise de canabinoides

2.2.1. Cromatografia gasosa (GC)

Um dos métodos mais utilizado para análise de canabinoides é a cromatografia gasosa (GC) devido a sua robustez, sensibilidade e reprodutibilidade. Esse método utiliza um fluxo de gás inerte como fase móvel que realiza a eluição da amostra, sem a interação da amostra com a fase móvel. A amostra é vaporizada e injetada no topo da coluna e a fase móvel transporta o analito através da coluna cromatográfica, onde há também uma fase estacionária líquida ou sólida. Desta maneira é realizada a separação dos componentes da amostra baseada na suas propriedades físico-químicas e é gerado um cromatograma com a presença de um detector no equipamento. A GC tem suas aplicações quantitativas ampliadas quando usada de forma hifenada com outros equipamentos e métodos, como espectrometria de massas (GC/MS) e espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (GC/FTIR) (SKOOG et al, 2002).

2.2.2. Cromatografia líquida (HPLC)

Outro método muito utilizado na análise de canabinoides é a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Diferentemente da GC, a HPLC permite uma análise sem aquecimento da amostra, e assim, evitando que as formas acídicas de canabinoides sejam descarboxiladas e evitando a formação de suas contrapartes neutras (DE BACKER et al, 2009).

A HPLC funciona de maneira similar a GC, a eluição da amostra é baseada na suas características físico-químicas e com a presença de uma fase móvel líquida e uma fase estacionária sólida localizada dentro da coluna cromatográfica. A amostra é introduzida por um sistema de injeção e a presença de um detector no equipamento gera um sinal analítico em forma de cromatograma. Assim como na GC, a HPLC é comumente usada em conjunto com outros equipamentos e métodos, como o espectrômetro de massas (HPLC-MS) e o detector por arranjo de diodos (HPLC-DAD) (SKOOG et al, 2002).

2.3. Espectroscopia de absorção no Infravermelho

A espectroscopia no infravermelho é baseada na região espectral correspondente ao intervalo de aproximadamente 12800 a 10 cm^{-1} números de onda ou 0,78 a 1000 μm comprimentos de onda. Essa região é dividida em radiação no infravermelho próximo, médio e distante, baseada nas suas aplicações e instrumentações. O espectro gerado por um espectrofotômetro infravermelho são geralmente expressos como transmitância ou

absorbância no eixo da ordenada e comprimento de onda ou número de onda no eixo da abscissa.

Em uma molécula, as posições entre os átomos não estão fixadas, elas variam de acordo com as vibrações e rotações em torno das ligações da molécula. A absorção na região do infravermelho está associada a pequenas diferenças de energia entre os estados vibracionais e rotacionais. Uma molécula sofre absorção de radiação infravermelho quando a frequência vibracional natural da molécula coincide com a frequência dessa radiação infravermelho, desta maneira, acontece uma transferência de energia efetiva e a amplitude da vibração molecular varia resultando na absorção da radiação. De maneira similar, acontece o processo de interação da radiação com a rotação de moléculas.

Compostos homonucleares (como O_2, N_2 e Cl_2) não possuem variação efetiva no momento de dipolo durante sua vibração ou rotação. Como resultado, no geral, compostos desse tipo não podem absorver radiação infravermelho, com somente poucas exceções.

Os instrumentos de espectroscopia no infravermelho necessitam de uma fonte contínua de geração de radiação infravermelha. De forma geral, as fontes de infravermelho são constituídas por um sólido inerte que é aquecido eletricamente até uma certa temperatura, produzindo assim uma radiação no infravermelho na faixa desejada (infravermelho próximo, médio ou distante). Exemplos de fontes de infravermelho comumente usadas, dependendo da aplicação, são: fonte de Nernst, fonte Globar, fonte de filamento incandescente, arco de mercúrio, lâmpada de filamento de tungstênio e laser de dióxido de carbono. Após a interação da radiação com a amostra, é necessária a detecção da radiação e conversão do sinal, isso é feito pelo transdutor. No geral, os transdutores são classificados em transdutores térmicos, piroelétricos e fotocondutores.

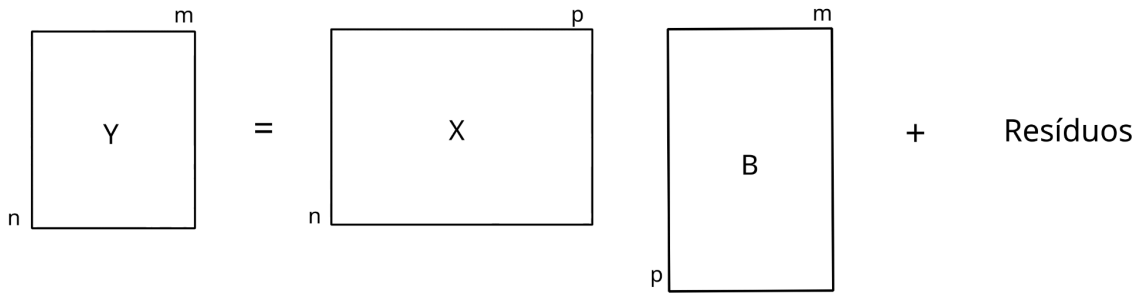
Um dos tipos de instrumentos de infravermelho mais utilizados são os espectrômetros com transformada de Fourier (FT-IR). Seu uso tão frequente é atribuído à sua confiabilidade, velocidade e conveniência (SKOOG et al, 2002). Esse tipo de instrumento possui um interferômetro, como por exemplo o interferômetro de Michelson que possui um espelho móvel e resulta em um sinal senoidal. Esse sinal é chamado de interferograma e nele é aplicada uma operação matemática chamada de transformada de Fourier. Com a aplicação da transformada de Fourier, o interferograma é convertido para o espectro infravermelho, facilitando a análise dos resultados obtidos (CIURCZAK et al, 2021).

2.4. Quimiometria

2.4.1 Regressão dos mínimos quadrados ordinários (OLS)

A regressão dos mínimos quadrados ordinários (OLS) modela uma relação linear entre a matriz **Y** das variáveis dependentes com a matriz **X** das variáveis independentes, como representado pela figura 3 e equação 1.

Figura 3 - Relação entre as matrizes Y e X pelo OLS.



Fonte: Adaptado de OTTO, 2017.

$$\mathbf{Y} = \mathbf{XB} \qquad (1)$$

A matriz **Y** é uma matriz n×m de concentrações de n amostras e m componentes ou constituintes, a matriz **X** n×p contém os valores de sinal analitico (absorbância ou transmitância) de n espectros medidos em p comprimentos de onda ou números de onda. A matriz **B** é calculada de acordo com a equação 2 e é uma matriz p×m de parâmetros de regressão. Os resíduos na figura 3 representam as diferenças entre os valores medidos e preditos, alternativamente, **Y** - **XB** (OTTO, 2017).

$$\mathbf{B} = (\mathbf{X}^T\mathbf{X})^{-1}\mathbf{X}^T\mathbf{Y} \qquad (2)$$

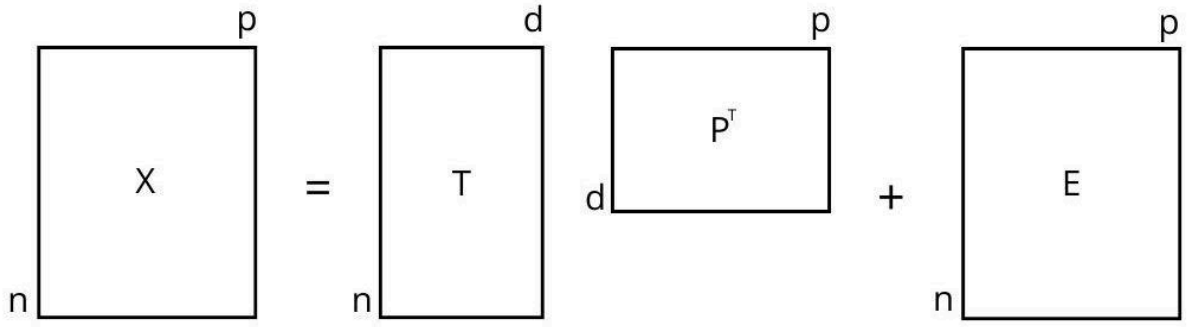
O termo $(\mathbf{X}^T\mathbf{X})^{-1}\mathbf{X}^T$ da equação 2 é comumente chamado de matriz pseudo inversa em OLS e é utilizada devido a matriz **X** ser comumente não quadrada.

2.4.2 Regressão por componentes principais (PCR)

A regressão por componentes principais (PCR) é uma combinação do OLS com a análise de componentes principais (PCA) reduzindo a multicolinearidade e diminuindo a dimensionalidade dos dados. A multicolinearidade representa uma dificuldade do modelo linear em diferenciar as variáveis independentes afetando a confiança do modelo.

Primeiramente, a matriz **X** é decomposta em scores **T** e loadings **P** como representado pela figura 4 e equação 3. O termo **E** é a matriz n×p do erro (resíduo). A matriz de scores **T** representa as informações de **X** relacionada a dimensão das linhas em termos de componentes principais. A matriz de loadings **P** representa a contribuição de cada variável original **X** para cada componente principal.

Figura 4 - Decomposição da matriz X em T e P.



Fonte: Adaptado de OTTO, 2017.

$$\mathbf{X} = \mathbf{T}\mathbf{P}^{T} + \mathbf{E} \qquad (2)$$

Os componentes principais (PCs) são novas variáveis obtidas a partir das variáveis originais. Os PCs são combinações lineares das variáveis originais de forma a capturar a maior variância dos dados permitindo a diminuição do número de dimensões dos dados originais. Cada componente principal é ortogonal entre si e são ordenados pela quantidade de variância explicada. Desta forma, o primeiro componente principal explica a maior parte dos dados quando comparados aos outros componentes. O segundo componente possui a segunda maior variância dos dados, e assim por diante. Na figura 4, o índice d representa os PCs e n, m e p possuem os mesmos significados descritos anteriormente para OLS.

Como um dos objetivos e vantagens do PCR é reduzir o número de dimensões dos dados sem perder uma quantidade significativa de informações, é de grande importância a

determinação do número adequado de PCs de modo a evitar erros nas estimativas das propriedades de interesse. Para isso uma das técnicas mais utilizadas é a de validação cruzada que consiste na divisão dos dados em conjuntos de treino e conjuntos de validação. Dessa maneira, o conjunto de treino é usado para predizer os valores do conjunto de validação, repetindo o procedimento várias vezes usando diferentes partições e calculando os valores de erro quadrático médio (MSE) para diferentes números de PCs. O número adequado de PCs é obtido quando um incremento de PCs não diminui significativamente o valor de MSE. O erro quadrático médio (MSE) está definido na equação 3 e os termos n, y e ŷ significam, respectivamente, número de dados de **Y**, valor conhecido de y, valor de y predito pelo modelo.

$$\mathrm{MSE} = \frac{1}{n} \sum_{i=n}^{n} (y_i - \hat{y}_i)^2 \tag{3}$$

De maneira similar ao OLS, a matriz de regressão **B** é calculada, mas usando o número de PCs adequado que é representado pela matriz de scores **T**, como representado na equação 4. Assim, **X** e **Y** podem ser relacionados a partir de **B** como descrito pela equação 5, analogamente ao OLS (BRERETON, 2003).

$$\mathbf{B} = (\mathbf{T}^T\mathbf{T})^{-1}\mathbf{T}^T\mathbf{Y} \tag{4}$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{TB} \tag{5}$$

A decomposição da matriz **X** em scores e loadings no PCR é comumente feita a partir do método de decomposição em valores singulares (SVD). Nesse método, a matriz **X** é decomposta em duas matrizes ortonormais **U** e **V** e uma matriz diagonal **Σ** de valores singulares como representado pela equação 6. Uma matriz ortonormal é composta por vetores ortogonais e de comprimento unitário. Com o uso do método SVD, a matriz de parâmetros de regressão **B** é como descrita pela equação 7. Dessa maneira, o PCR em conjunto com o SVD procura um conjunto de valores singulares que melhor prediz valores desconhecidos. (OTTO, 2017).

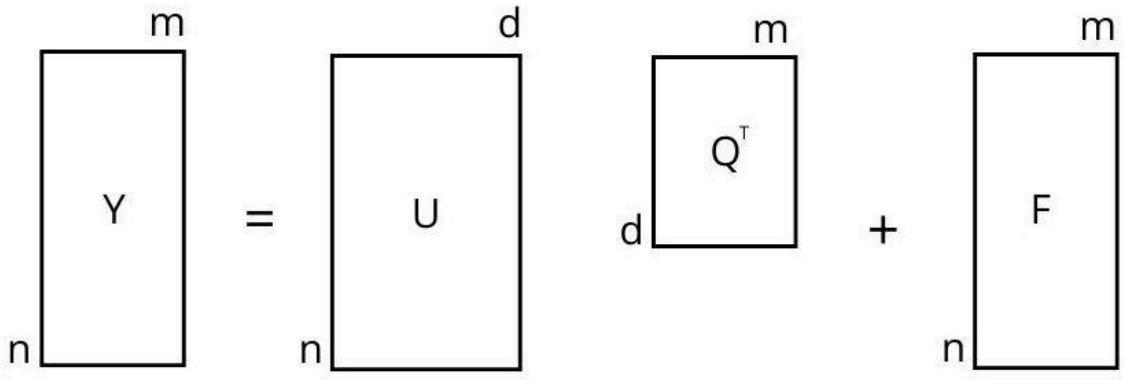
$$\mathbf{X} = \mathbf{U\Sigma V}^T \tag{6}$$

$$\mathbf{B} = \mathbf{V}(\text{diag}(1/\mathbf{\Sigma})\mathbf{U}^T\mathbf{Y} \quad (7)$$

2.4.3 Regressão por quadrados mínimos parciais (PLS)

No PLS ambas as matrizes **X** e **Y** são decompostas. Essa decomposição é feita de maneira que cada variável latente da tem covariância maximizada entre **X** e **Y**. A decomposição da matriz **X** é similar a decomposição representada pela figura 4 e equação e 2. A decomposição da matriz **Y** está representada pela figura 5 e equação 8, onde **U** é a matriz de scores de **Y**, **Q** é a matriz de loadings de **Y**, **F** é a matriz n×m do erro (resíduo) e d é o número de variáveis latentes.

Figura 5 - Decomposição da matriz Y em U e Q.

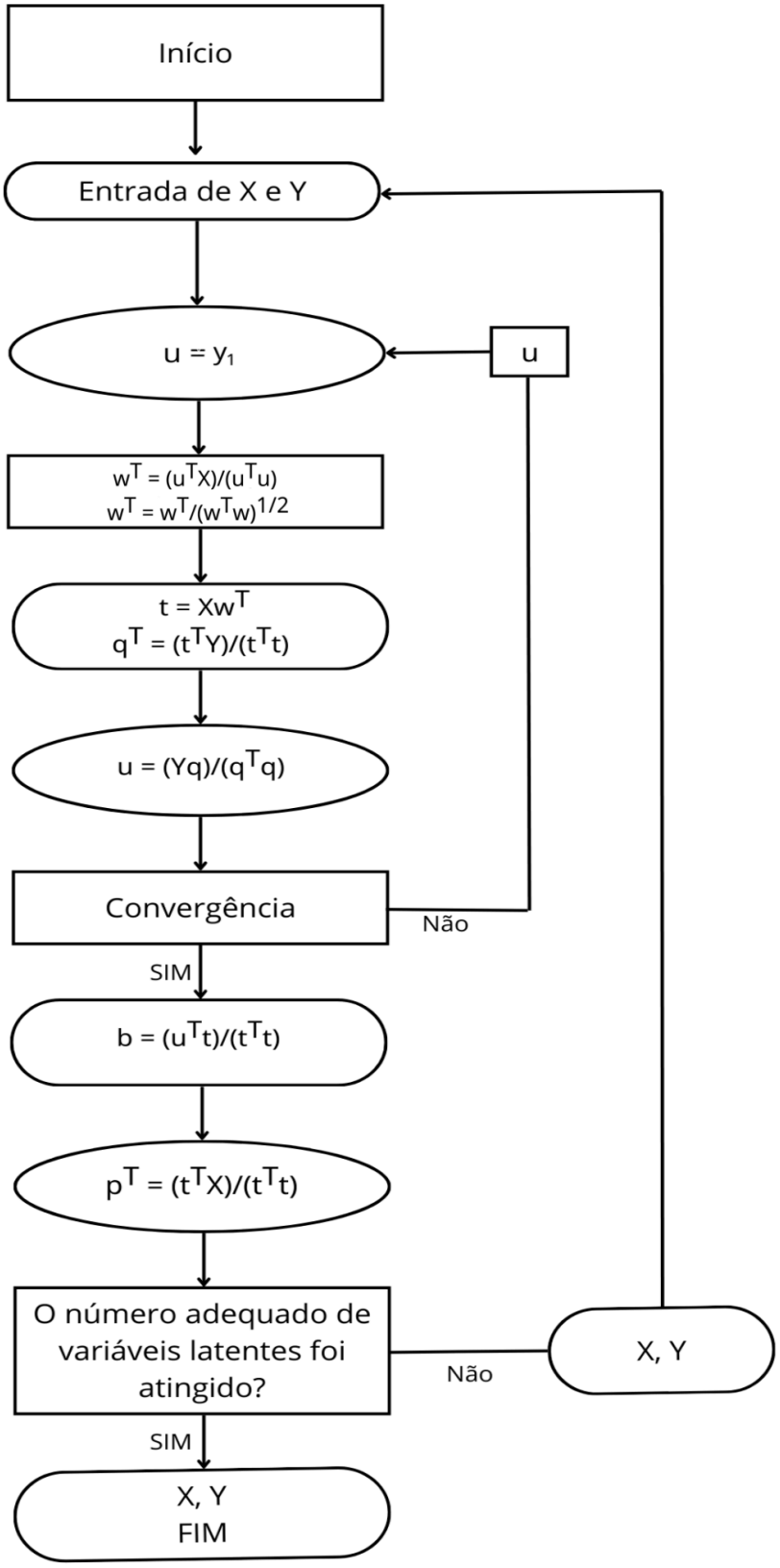


Fonte: Adaptado de OTTO, 2017.

$$\mathbf{Y} = \mathbf{U}\mathbf{Q}^T + \mathbf{F} \quad (8)$$

Um dos algoritmos mais usados em PLS para a decomposição das matrizes é o NIPALS, que utiliza um loop com iterações. Um esquema de funcionamento do NIPALS em forma de diagrama está apresentado na figura 6.

Figura 6 - Diagrama do NIPALS com iterações.



Fonte: Adaptado de CUNHA, 2023.

Primeiramente, no diagrama do NIPALS ocorre a introdução das matrizes **X** e **Y**. Em seguida, a primeira coluna da matriz **Y** é usada como primeiro vetor score $\mathbf{u}_1$. Logo após, é computado os pesos **w** da matriz **X**. Os scores **t** da matriz **X** e os loadings **q** da matriz **Y** são computados. Com esses resultados, é gerado o novo vetor score **u** de y. O ponto de convergência é atingido em seguida, e nele, o vetor **u** antigo é comparado com o vetor **u** novo e é associada a precisão computacional. Caso a convergência não seja obtida, a iteração é continuada usando o novo vetor **u** no início do procedimento. Após a convergência ser obtida, é calculado o b escalar e os loadings **p** da matriz **X**. A partir desses dados, são gerados novas matrizes **X** e **Y** que são iteradas para o início do procedimento até a obtenção do número de variáveis latentes desejado. O número de variáveis latentes adequado é comumente determinado por validação cruzada, de forma análoga ao descrito para o PCR.

Com os resultados do das iterações do algoritmo NIPALS, é calculada a matriz de parâmetros de regressão **B**, como descrito pela equação 9, onde **W** é matriz dos pesos do PLS (OTTO, 2017).

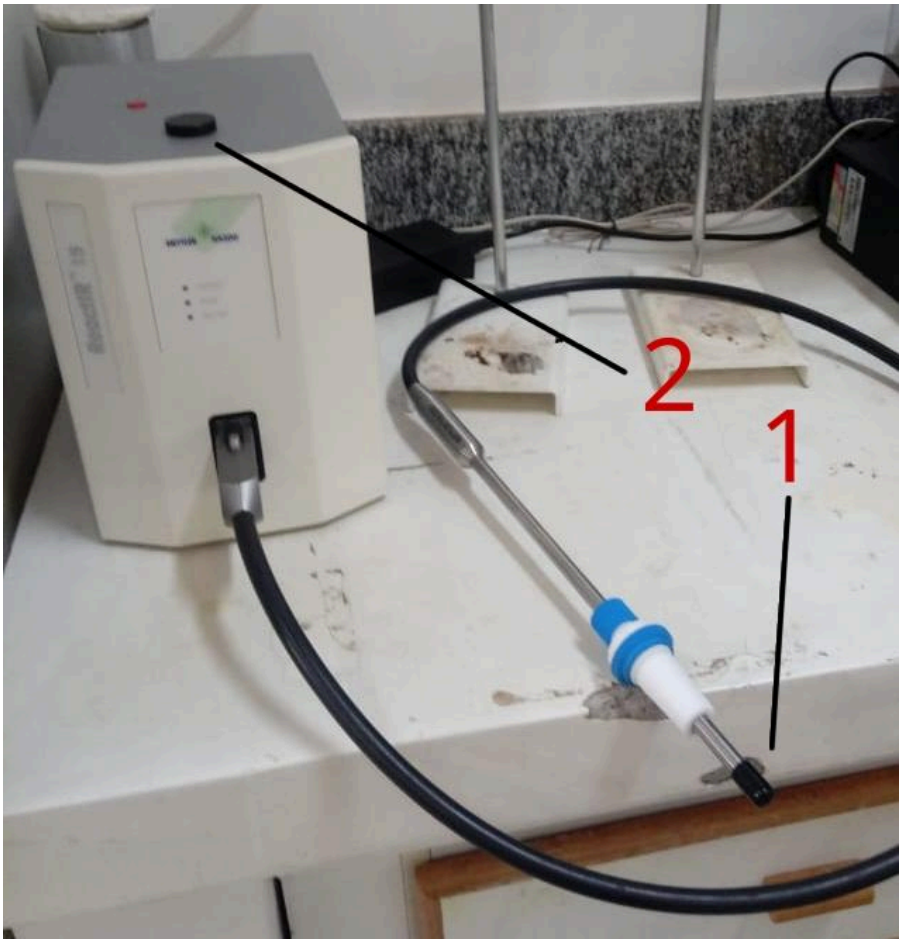
$$\mathbf{B} = \mathbf{W}(\mathbf{P}^T\mathbf{W})^{-1}\mathbf{Q}^T \tag{9}$$

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Amostras e equipamento

As amostras de óleos de Cannabis utilizadas para análise em infravermelho foram as mesma utilizadas por OLIVEIRA (2023), em seu trabalho de conclusão de curso, no qual as amostras foram fornecidas pela Associação de Apoio à Pesquisa e Pacientes da Cannabis Medicinal (APEPI-A). Os óleos de Cannabis utilizados como amostras foram os óleos Purple Wreck (alto Δ^9-THC) e o Doctor (alto CBD). Apesar de possuírem altos valores de concentração de THC ou CBD, ambos os óleos possuem também teor de outros princípios ativos em menor concentração. Para a realização do experimento foi utilizado um espectrofotômetro de infravermelho médio com sonda e transformada de Fourier (Mettler Toledo). O espectrofotômetro realizou medições de absorbâncias na faixa de 950 a 2500 cm^{-1}. Ele está apresentado na figura 7 e os índices 1 e 2 representam a sonda que entra em contato com a amostra e local de introdução de nitrogênio líquido, respectivamente.

Figura 7 - Equipamento MIR utilizado.



3.2. Aquisição dos espectros no infravermelho médio (MIR)

3. 2. 1. Teste 1: Diluição de óleo com alto teor de THC em azeite

Para o primeiro teste, foi adicionado 10 mL do óleo Purple Wreck (alto Δ^9-THC) ao espectrômetro e, ao mesmo tempo que o equipamento produziu os espectros, foram adicionadas quantidades do azeite de oliva Gallo ao óleo. O procedimento durou aproximadamente 1 hora e as quantidades de azeite adicionadas foram de aproximadamente 1 a 2 mL em intervalos de aproximadamente 6 minutos até o total de 10 mL de azeite adicionado, com agitação de 700 rpm da solução. Após o fim da adição de azeite, o equipamento continuou coletando espectros da mistura.

3. 2. 2. Teste 2: Diluição de óleo com alto teor de CBD em azeite

No segundo teste, foi feito um procedimento similar ao teste 1, mas usando o óleo com alto teor de CBD. Primeiramente, foi adicionado 10 mL do óleo Doctor (alto CBD) ao espectrômetro e, ao mesmo tempo que o equipamento produziu os espectros, foram adicionadas quantidades do azeite de oliva Andorinha ao óleo. O procedimento durou aproximadamente 1 hora e as quantidades de azeite adicionadas foram de aproximadamente 1 mL em intervalos de aproximadamente 6 minutos até o total de 10 mL de azeite adicionado, com agitação de 700 rpm da solução.

3.3. Pré-processamento dos dados

Ao final do procedimento experimental, o equipamento forneceu 11 espectros para o teste 1 e 10 espectros para o teste 2 com correções de linha de base de primeira ordem, segunda ordem, terceira ordem e de Pearson. Foram avaliados diferentes tamanhos de janela de números de onda no filtro de Savitzky-Golay e escolhidos os que apresentaram o menor erro de estimativa para usar no software de PCR e PLS.

3.3.1. Preparação dos dados do teste 1 e teste 2

Para formar o vetor **y**, foram consideradas a concentração do rótulo e as quantidades de azeite de oliva adicionadas para obter a concentração conhecida em cada ponto. A matriz **X** contém os valores de absorbância em cada número de onda (cm^{-1}).

A partir da matriz **X**, foi feito pré-processamento da primeira e segunda derivada com o intuito de maximizar variações de absorbância e em seguida foi realizada a centralização e escalamento para variância unitária, em outras palavras, foi feita a subtração da média e divisão pelo desvio padrão para cada um dos valores.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Espectros do teste 1 e teste 2

Foram obtidos do equipamento os espectros sem correção de linha de base, com correção de primeira ordem, com correção de segunda ordem, com correção de terceira ordem e pearson que estão apresentados na figura 8 para o teste 1 e figura 9 para o teste 2. Também foi obtido o espectro do azeite de oliva Gallo que está representado na figura 10.

Figura 8 - Espectros MIR do teste 1.

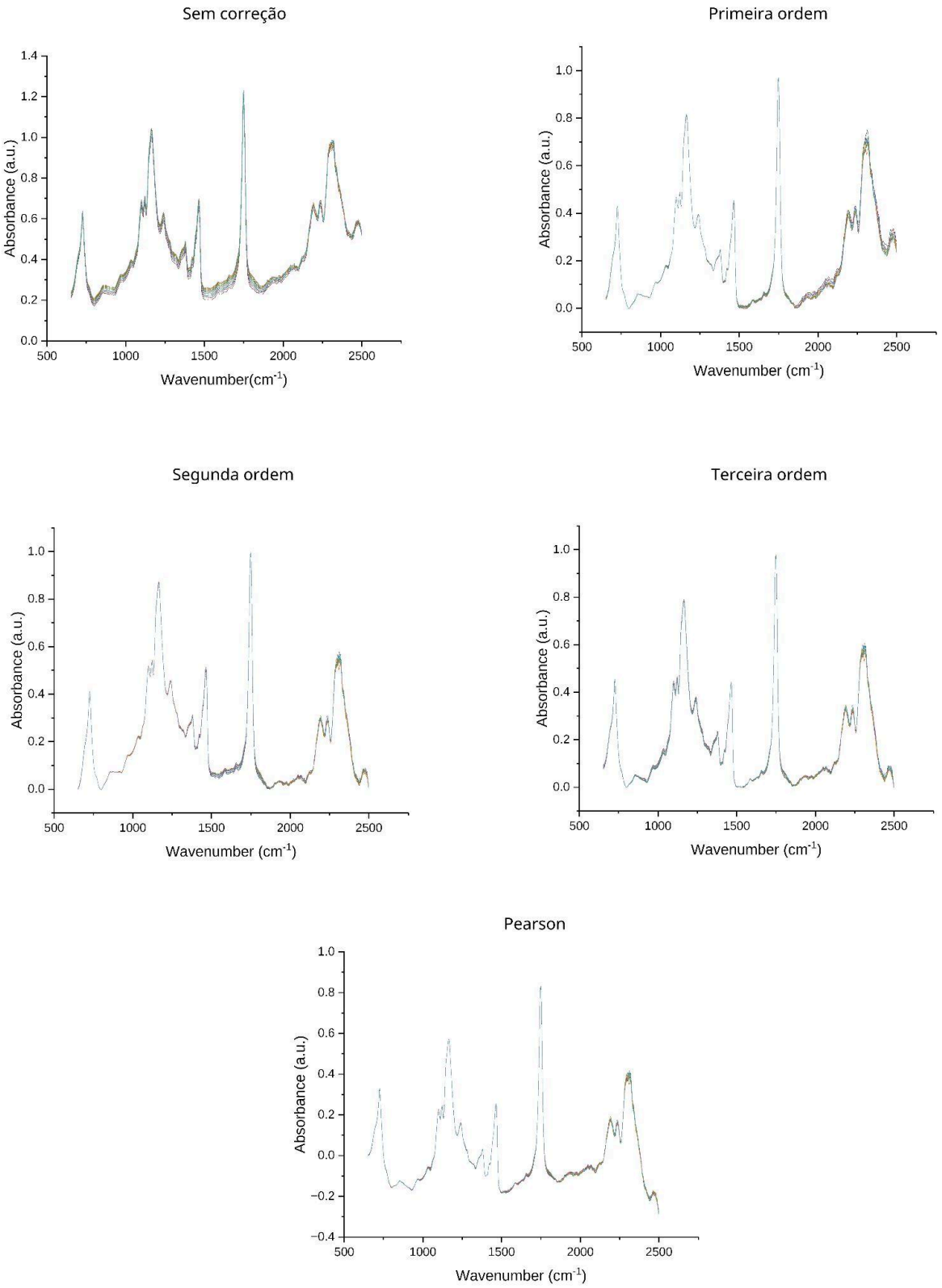


Figura 9 - Espectros MIR do teste 2.

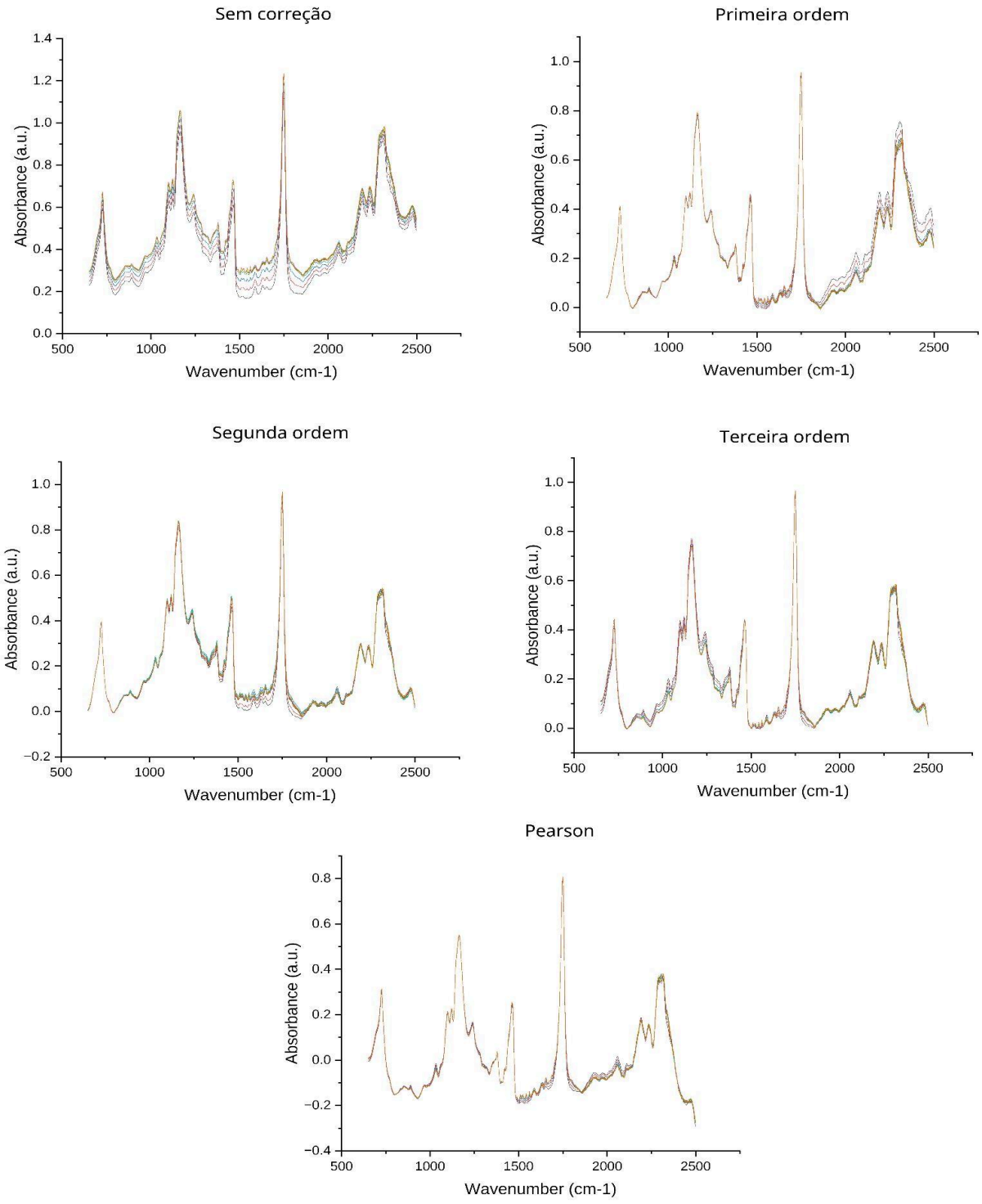
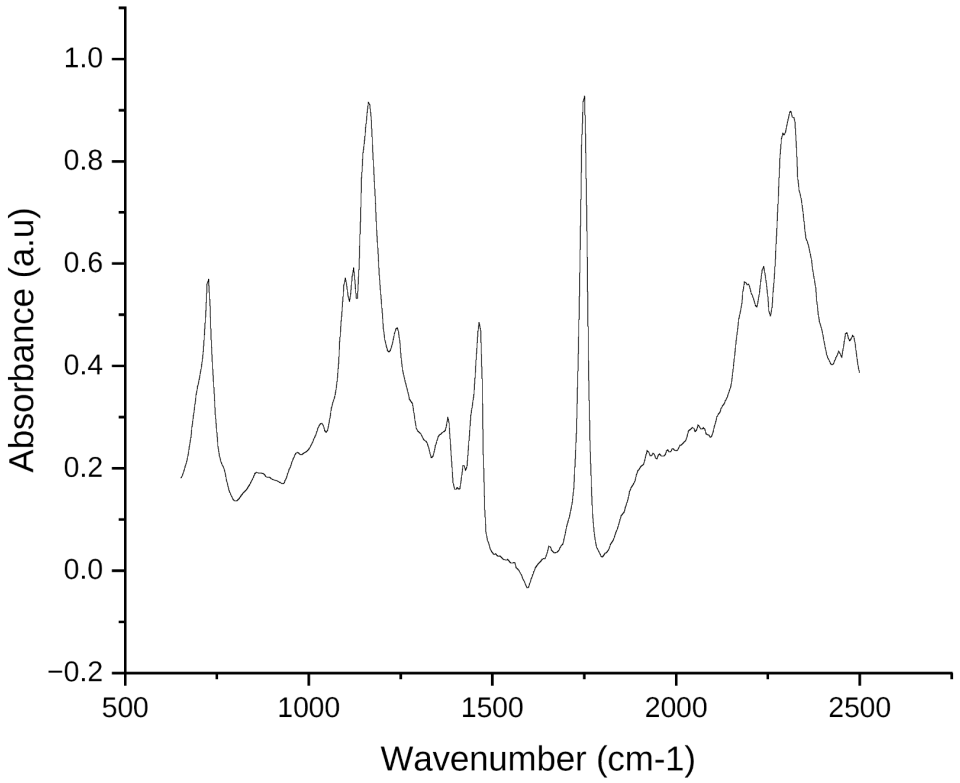


Figura 10 - Espectro MIR do azeite de oliva.



4.2. Aplicação do PCR e PLS para o teste 1

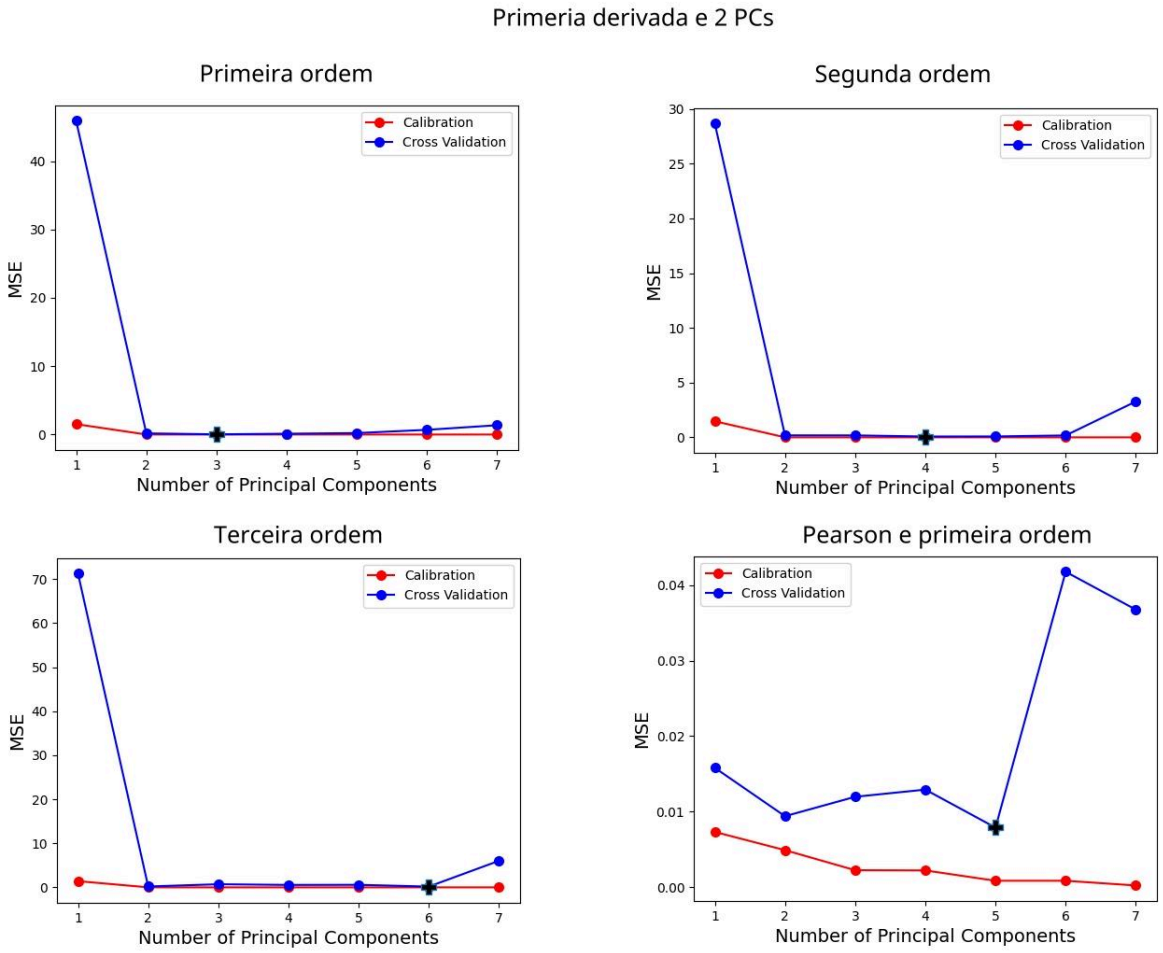
A partir da figura 8, percebe-se por inspeção visual que o espectro sem correção de linha de base demonstra que a absorbância foi aumentando em quase todos números de onda ao longo da diluição. A correção de linha de base de primeira ordem resultou em um espectro que possui uma diminuição de absorbância em certos números de onda ao longo da diluição, mas aumentou em outros números de onda. A correção de linha de base de segunda ordem não resultou em diferenças significativas comparado com a de primeira ordem, exceto pelo aumento seguido de diminuição de absorbância em certos números de onda ao longo da diluição. A correção de linha de base de terceira ordem resultou em um espectro que possui uma diminuição de absorbância em uma quantidade bem maior de números de onda ao longo da diluição comparado com as correções anteriores. A correção de linha de base de Pearson resultou em um espectro similar ao de terceira ordem, exceto por uma menor quantidade de regiões com o comportamento de diminuição de absorbância ao longo da diluição. Entre todas

as correções de linha de base, a de terceira ordem e de pearson foram as que mais se assemelhavam ao esperado pela diluição.

4.2.1. Regressão em componentes principais (PCR)

Com os dados pré-processados com a primeira derivada, foram avaliados diferentes tamanhos de janela de números de onda no filtro de Savitzky-Golay e escolhidos os que apresentaram o menor erro de estimativa. Utilizando esses dados, foram gerados os gráficos de MSE para cada número de PCs com cada correção de linha de base utilizando a validação cruzada. Esses gráficos estão apresentados na figura 11 juntamente com o número de PCs selecionado, o número com PCs com símbolo de adição é correspondente ao número de PCs sugerido pelo software.

Figura 11 - Gráficos de validação cruzada para o PCR teste 1 com primeira derivada.



Foram também gerados os gráficos de concentração de THC predita pelo modelo versus concentrações conhecidas apresentados na figura 12 e os parâmetros estatísticos apresentados na tabela 1 para cada correção de linha de base, juntamente com o número de PCs utilizados.

Figura 12 - Gráficos de concentrações preditas versus conhecidas por validação cruzada para o PCR teste 1 com primeira derivada.

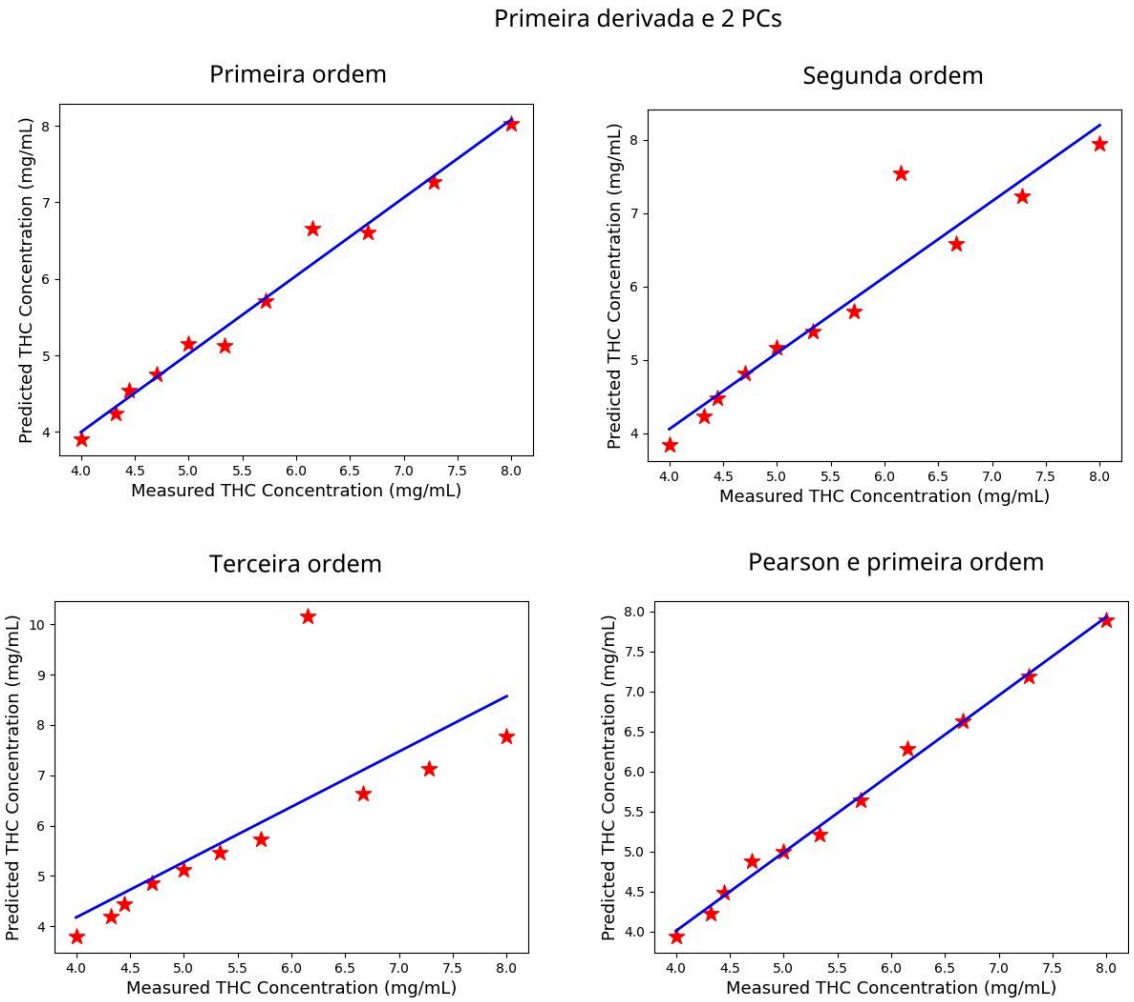


Tabela 1 - Parâmetros estatísticos para o PCR teste 1 com a primeira derivada.

Parâmetro	Primeira derivada e 1 ordem	Primeira derivada e 2 ordem	Primeira derivada e 3 ordem	Primeira derivada e Pearson e 1 ordem
R^2 da calibração	0,999	0,996	0,998	0,997
R^2 da validação cruzada	0,981	0,879	0,871	0,994
MSE da calibração	0,002	0,006	0,003	0,005
MSE da validação cruzada	0,028	0,185	0,197	0,009

Um resultado importante é que a correção de linha de base de pearson em conjunto com a correção de linha de base de primeira ordem e segunda ordem quase sempre resultaram em bons parâmetros independentemente do tamanho de janela de números de onda usado no filtro de Savitzky-Golay e mesmo com somente um componente principal, esse é um resultado muito diferente do observado com as outras correções de linha de base.

De forma análoga à primeira derivada, foi feito o mesmo procedimento com a segunda derivada e os gráficos estão apresentados nas figuras 13 e 14, e os parâmetros na tabela 2.

Figura 13 - Gráficos de validação cruzada para o PCR teste 1 com segunda derivada.

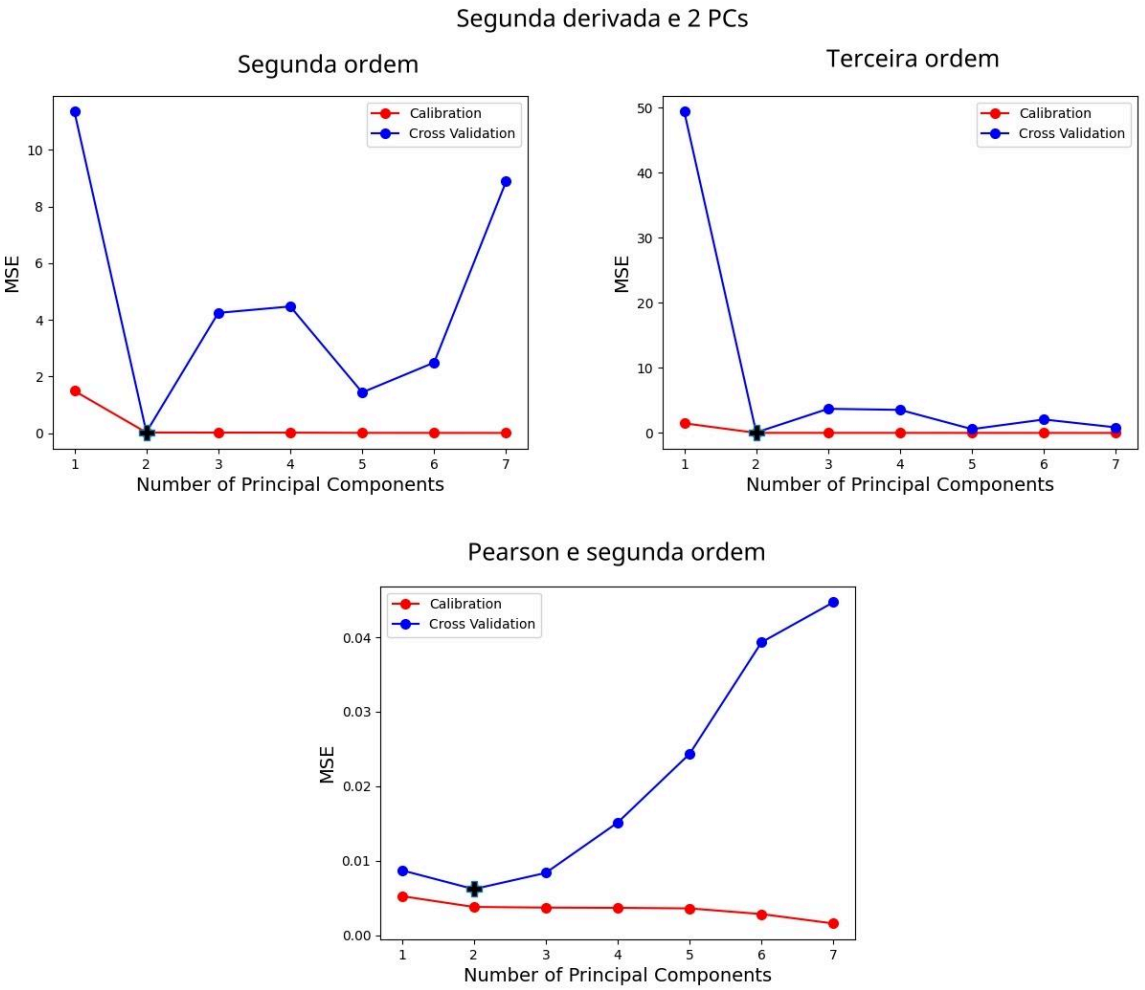


Figura 14 - Gráficos de concentrações preditas versus conhecidas por validação cruzada para o PCR teste 1 com segunda derivada.

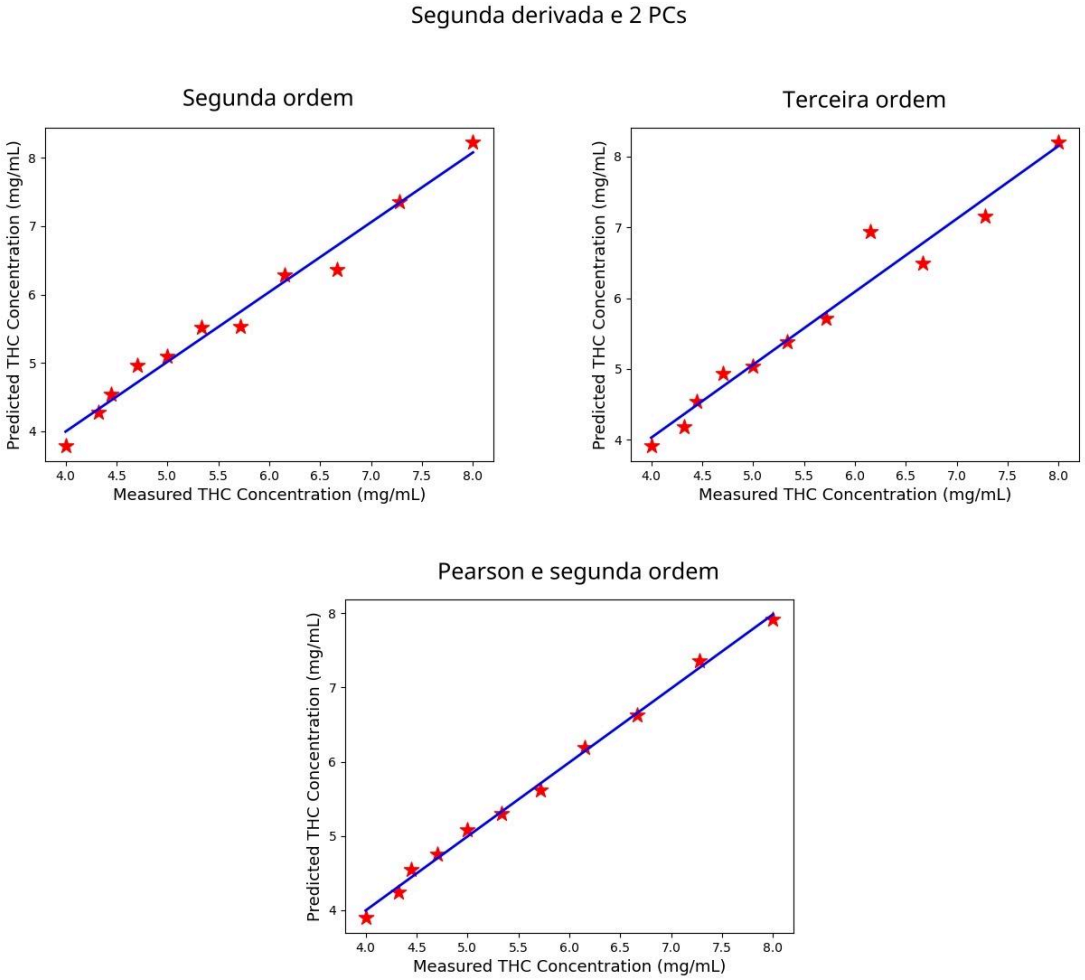


Tabela 2 - Parâmetros estatísticos para o PCR teste 1 com a segunda derivada.

Parâmetro	Segunda derivada e 2 ordem	Segunda derivada e 3 ordem	Segunda derivada e Pearson e 2 ordem
R^2 da calibração	0,987	0,992	0,998
R^2 da validação cruzada	0,978	0,953	0,996
MSE da calibração	0,020	0,012	0,004
MSE da validação cruzada	0,034	0,072	0,006

O mesmo resultado observado anteriormente para a correção de linha de base de Pearson com a correção de primeira ordem na primeira derivada ocorreu com a correção de

Pearson com a correção de segunda ordem com a segunda derivada. Os parâmetros para essa correção foram muito bons independentemente do tamanho da janela de números de onda usada no filtro de Savitzky-Golay e mesmo com somente um componente principal, para a maioria dos casos.

4.2.2. Regressão por quadrados mínimos parciais (PLS)

Da mesma maneira feita para o PCR, os gráficos de validação cruzada gerados a partir dos dados pré-processados estão apresentados na figura 15 para a primeira derivada e figura 16 para segunda derivada, juntamente com o número de PCs selecionados para cada caso.

Figura 15 - Gráficos de validação cruzada para o PLS teste 1 com primeira derivada.

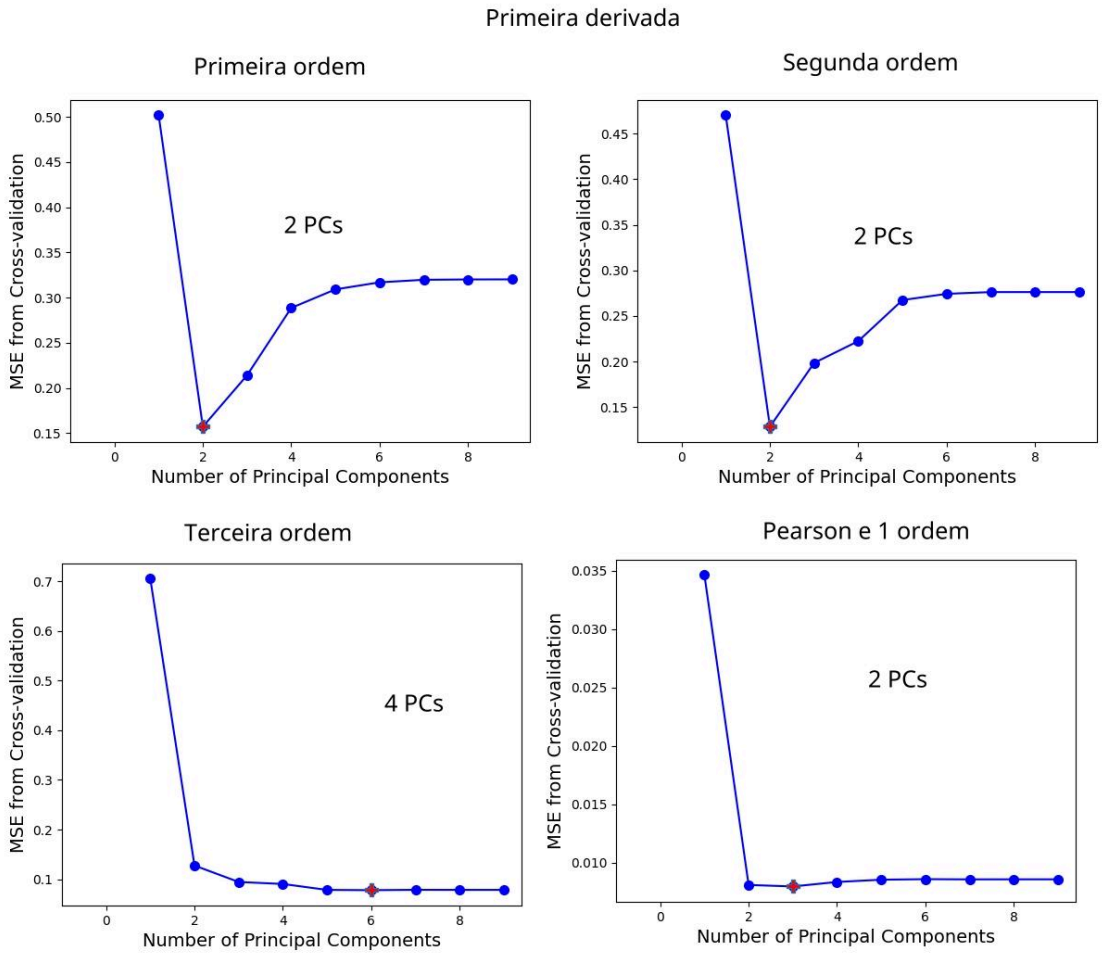
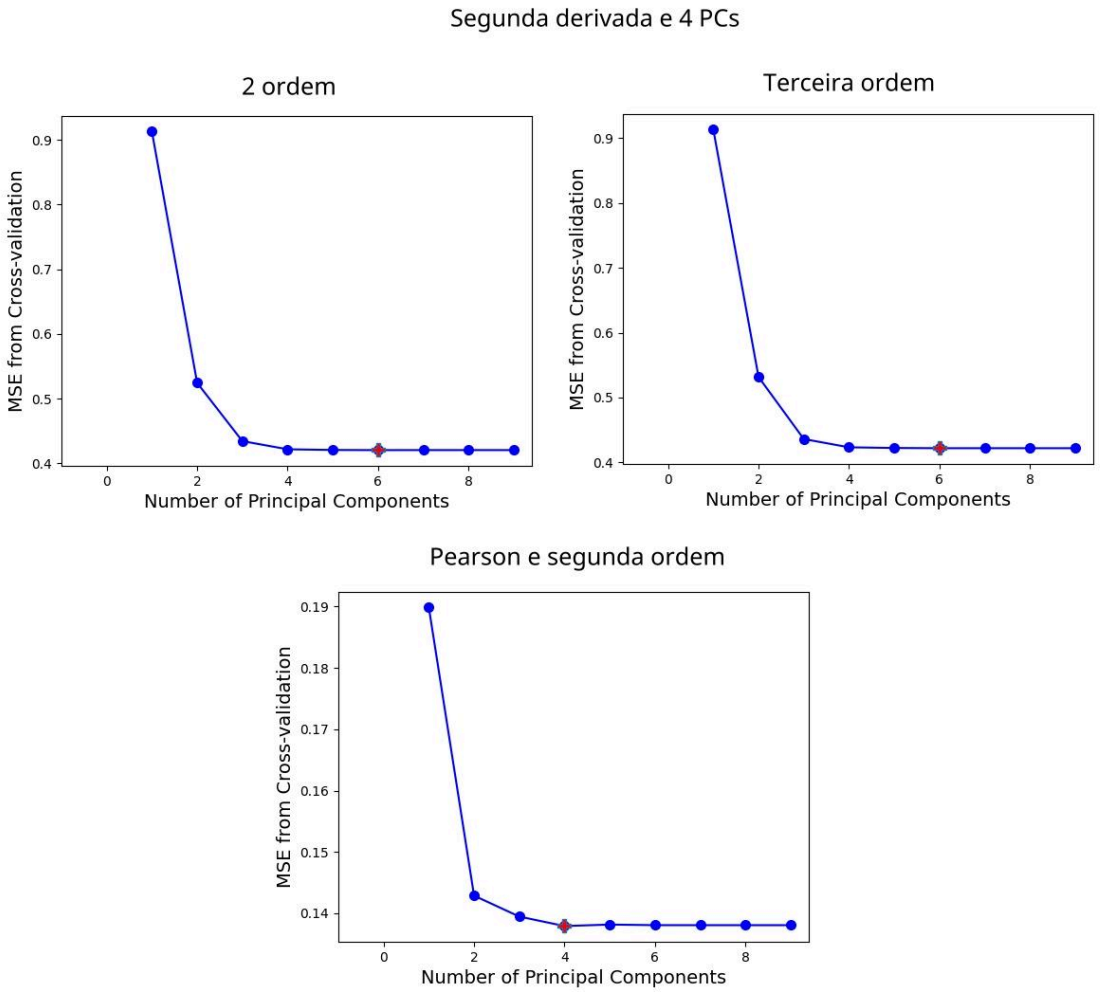


Figura 16 - Gráficos de validação cruzada para o PLS teste 1 com segunda derivada.



Os gráficos de concentração de THC predita pelo modelo versus concentrações conhecidas estão apresentados na figura 17 para primeira derivada e figura 18 para a segunda derivada e os parâmetros estatísticos apresentados na tabela 3 para a primeira derivada e tabela 4 para a segunda derivada com as correções de linha de base, juntamente com o número de PCs utilizados.

Figura 17 - Gráficos de concentrações preditas versus conhecidas por validação cruzada para o PLS teste 1 com segunda primeira.

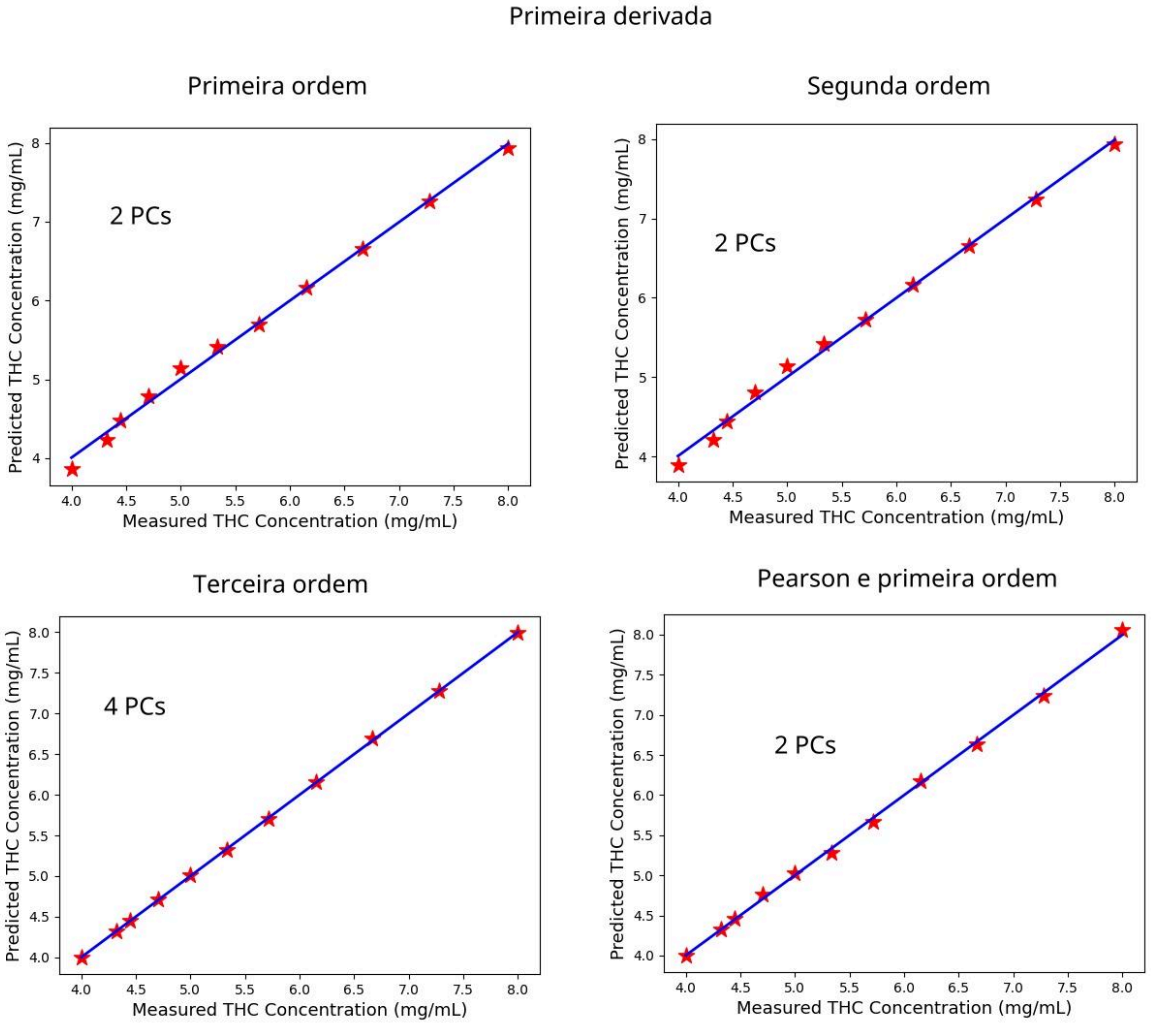


Figura 18 - Gráficos de concentrações preditas versus conhecidas por validação cruzada para o PLS teste 1 com segunda derivada.

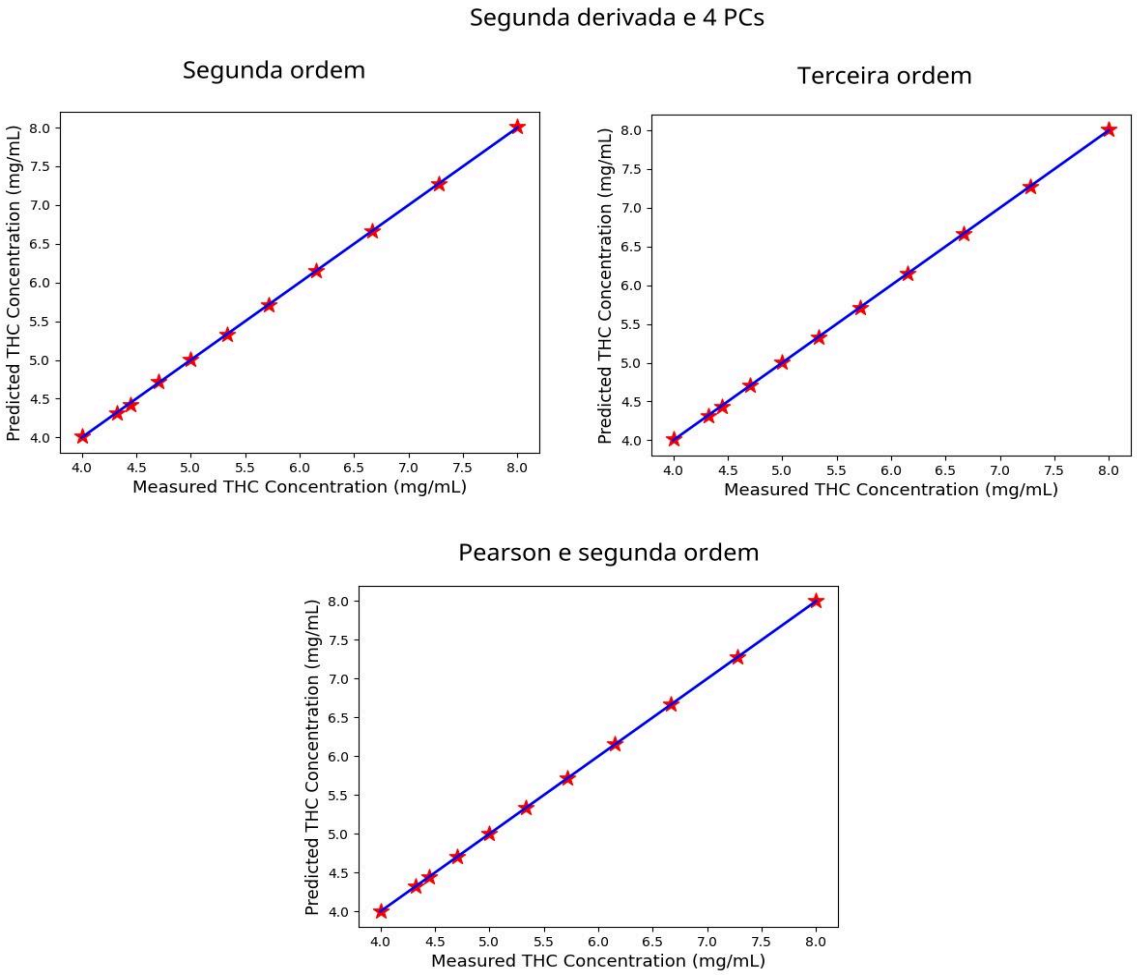


Tabela 3 - Parâmetros estatísticos para o PLS teste 1 com a primeira derivada.

Parâmetro	Primeira derivada e 1 ordem	Primeira derivada e 2 ordem	Primeira derivada e 3 ordem	Primeira derivada e Pearson e 1 ordem
R^2 da calibração	0,996	0,996	1,000	0,999
R^2 da validação cruzada	0,897	0,916	0,941	0,995
MSE da calibração	0,006	0,006	0,000	0,001
MSE da validação cruzada	0,157	0,128	0,091	0,008

Tabela 4 - Parâmetros estatísticos para o PLS teste 1 com a segunda derivada.

Parâmetro	Segunda derivada e 2 ordem	Segunda derivada e 3 ordem	Segunda derivada e Pearson e 2 ordem
R² da calibração	1,000	1,000	1,000
R² da validação cruzada	0,723	0,722	0,910
MSE da calibração	0,000	0,000	0,000
MSE da validação cruzada	0,422	0,423	0,138

Comparando as tabelas 1, 2, 3 e 4, foi observado que alguns valores de R^2 foram muito próximos de 1 e alguns valores de MSE foram muito próximos de zero, de forma que o software arredondou esses valores para 1 ou 0. Por exemplo, o valor de R² da calibração para segunda derivada e 2 ordem da tabela 4 com com 10 casas decimais foi 0,9999460218 mas o software simplesmente arredondou para 1. De maneira geral, foi observado, comparando as tabelas e gráficos, que o PLS resultou em um ajuste melhor dos dados para o teste 1.

4.3. Aplicação do PCR e PLS para o teste 2

De maneira similar ao teste 1, o espectro para o teste 2 sem correção de linha de base na figura 9 demonstrou o comportamento de aumento de absorbância em quase todos números de onda ao longo da diluição. A correção de linha de base de primeira ordem também resultou em uma diminuição de absorbância em certos números de onda ao longo da diluição. O espectro com correção de linha de base de segunda ordem gerou um comportamento irregular de aumentos e diminuições de absorbâncias na maioria dos números de onda ao longo da diluição. A correção de linha de base de terceira ordem resultou em um espectro que possui uma diminuição de absorbância em uma quantidade maior de números de onda ao longo da diluição comparado com as correções anteriores. A correção de linha de base de terceira ordem resultou em um espectro que possui uma diminuição de absorbância em uma quantidade maior de números de onda ao longo da diluição comparado com as correções anteriores.

4.3.1. Regressão em componentes principais (PCR)

Da mesma maneira feita anteriormente, os gráficos de validação cruzada gerados a partir dos dados pré-processados estão apresentados na figura 19 para a primeira derivada e figura 20 para segunda derivada, juntamente com o número de PCs selecionados.

Figura 19 - Gráficos de validação cruzada para o PCR teste 2 com primeira derivada.

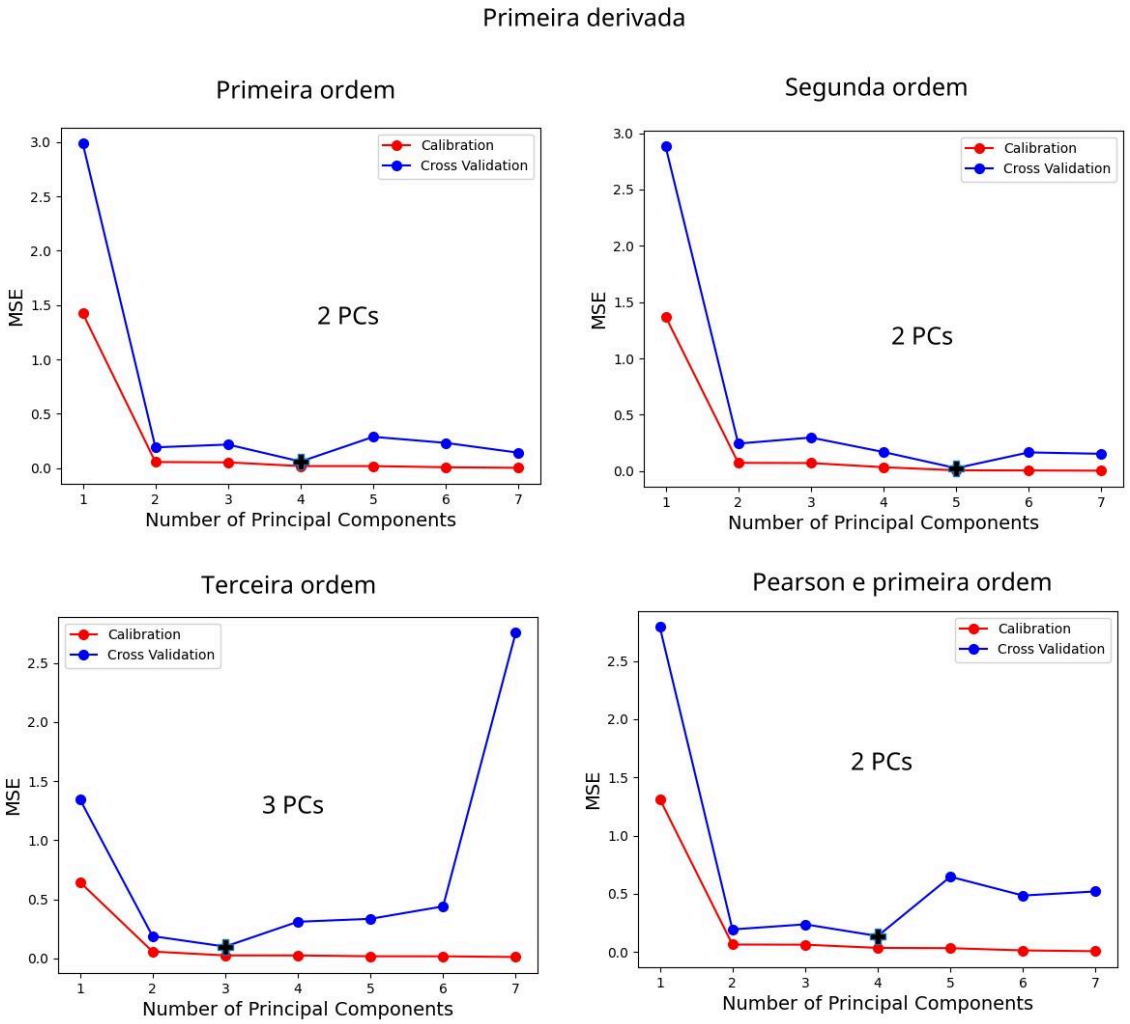
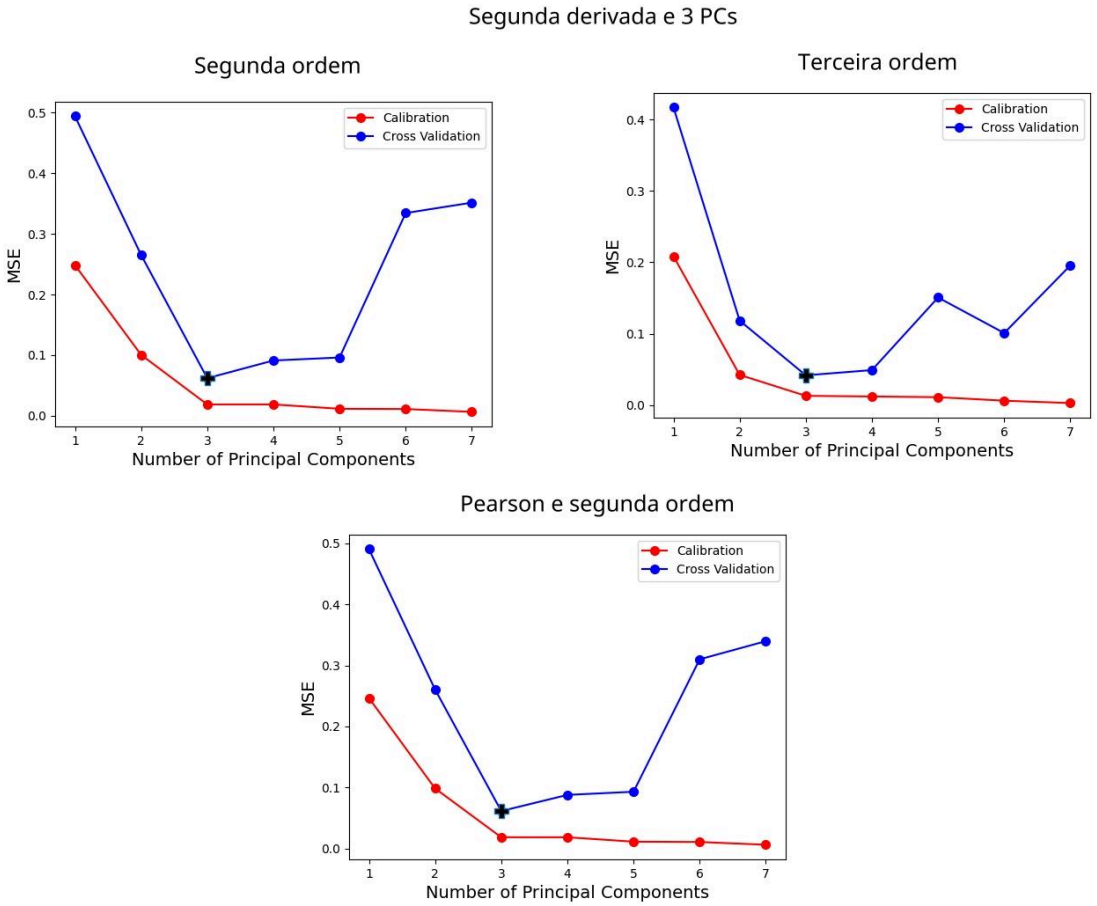


Figura 20 - Gráficos de validação cruzada para o PCR teste 2 com segunda derivada.



Os gráficos de concentração de CBD predita pelo modelo versus concentrações conhecidas estão apresentados na figura 21 para primeira derivada e figura 22 para a segunda derivada e os parâmetros estatísticos apresentados na tabela 5 para a primeira derivada e tabela 6 para a segunda derivada, juntamente com o número de PCs utilizados e correções de linha de base.

Figura 21 - Gráficos de concentrações preditas versus conhecidas por validação cruzada para o PCR teste 2 com primeira derivada.

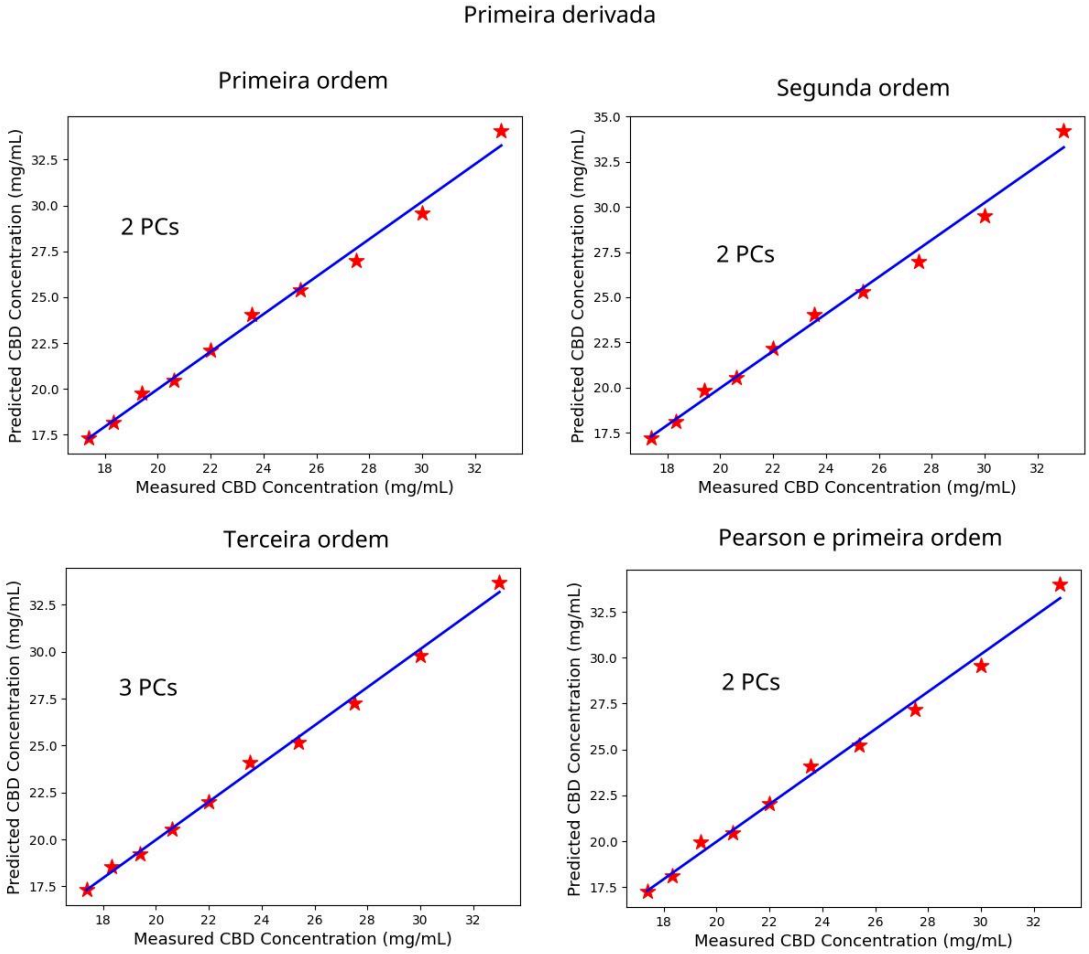


Figura 22 - Gráficos de concentrações preditas versus conhecidas por validação cruzada para o PCR teste 2 com segunda derivada.

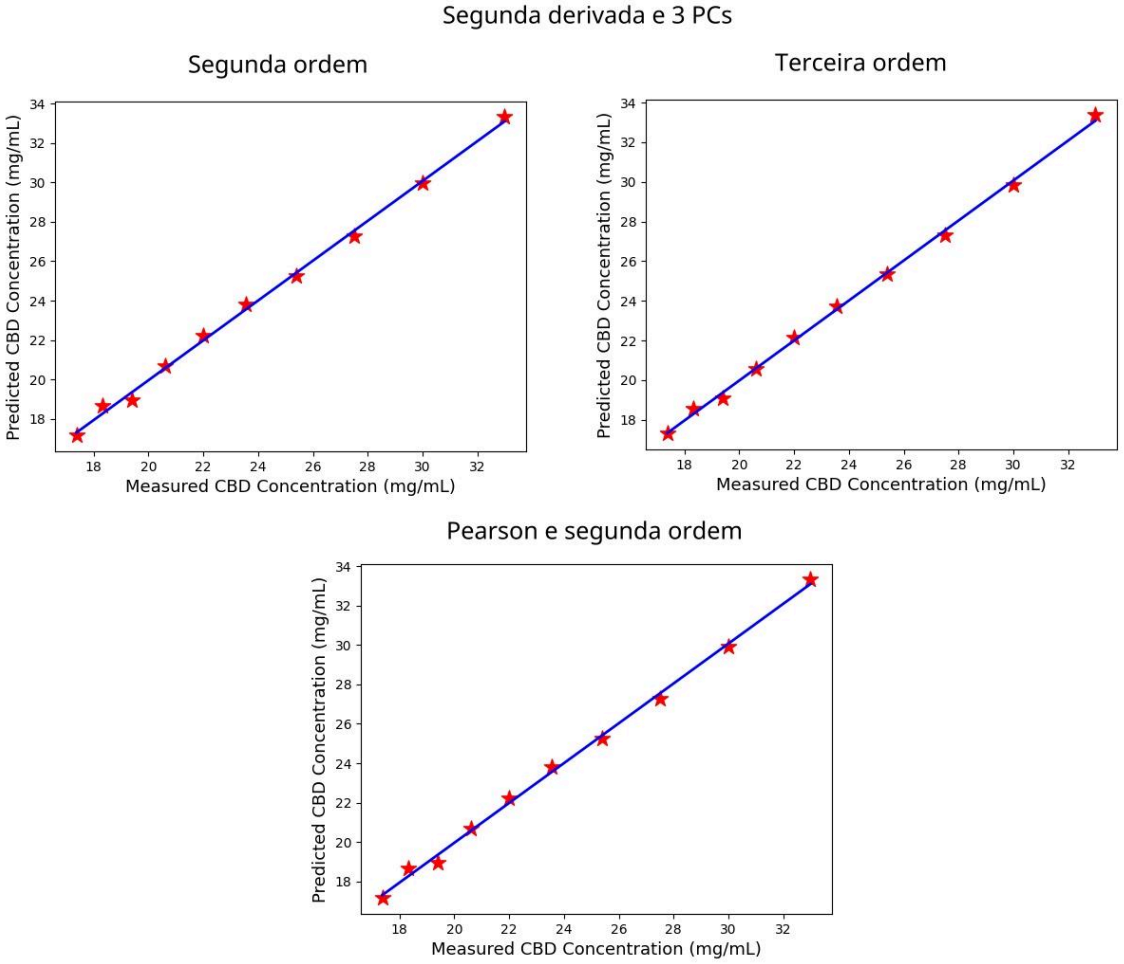


Tabela 5 - Parâmetros estatísticos para o PCR teste 2 com a primeira derivada.

Parâmetro	Primeira derivada e 1 ordem	Primeira derivada e 2 ordem	Primeira derivada e 3 ordem	Primeira derivada e Pearson e 1 ordem
R^2 da calibração	0,998	0,997	0,999	0,997
R^2 da validação cruzada	0,992	0,990	0,996	0,992
MSE da calibração	0,056	0,073	0,026	0,064
MSE da validação cruzada	0,191	0,244	0,100	0,194

Tabela 6 - Parâmetros estatísticos para o PCR teste 2 com a segunda derivada.

Parâmetro	Segunda derivada e 2 ordem	Segunda derivada e 3 ordem	Segunda derivada e Pearson e 2 ordem
R^2 da calibração	0,999	0,999	0,999
R^2 da validação cruzada	0,997	0,998	0,997
MSE da calibração	0,019	0,013	0,019
MSE da validação cruzada	0,062	0,042	0,062

Comparando os dados obtidos do PCR para os dois testes, foi concluído que o PCR ajustou os dados do teste 2 melhor que os dados do teste 1 na maioria dos casos. A correção de linha de base de Pearson em conjunto com as correções de primeira e segunda ordem resultaram novamente em bons parâmetros independentemente do tamanho de janela de números de onda usada no filtro de Savitzky-Golay.

4.3.2. Regressão por quadrados mínimos parciais (PLS)

Analogamente ao PCR, os gráficos de validação cruzada gerados para o PLS a partir dos dados pré-processados estão apresentados na figura 23 para a primeira derivada e figura 24 para segunda derivada juntamente com o número de PCs utilizados.

Figura 23 - Gráficos de validação cruzada para o PLS teste 2 com primeira derivada.

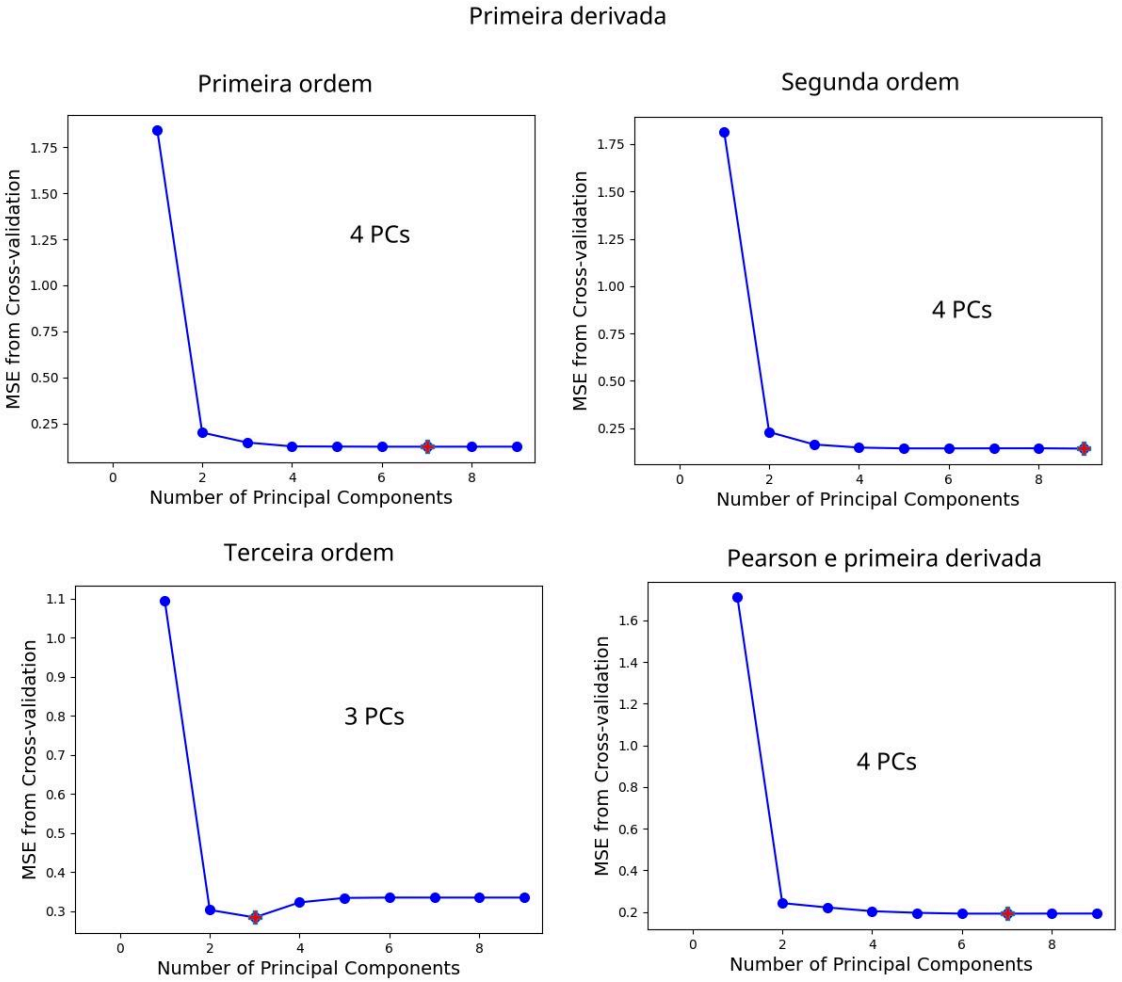
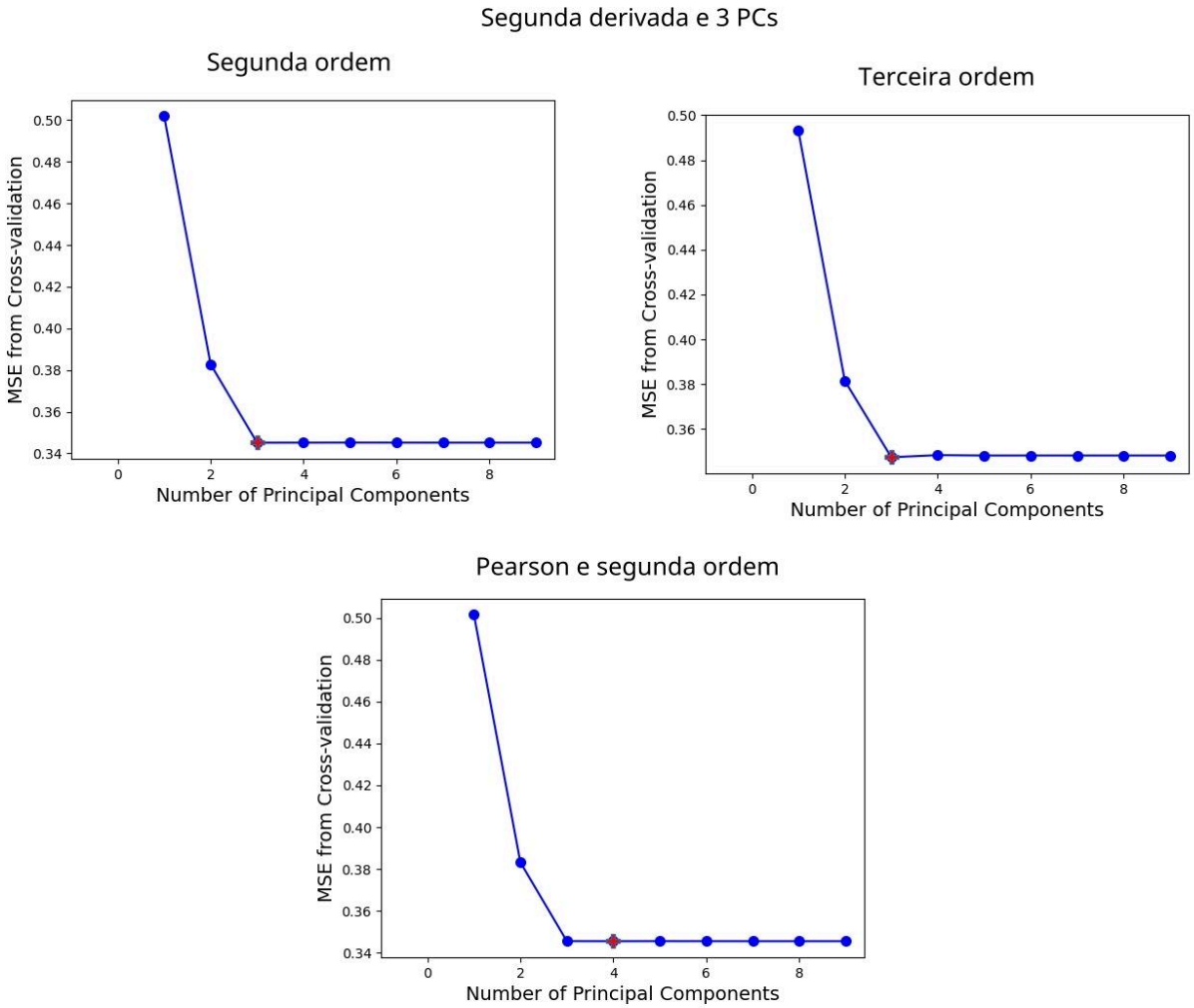


Figura 24 - Gráficos de validação cruzada para o PLS teste 2 com segunda derivada.



Os gráficos de concentração de CBD predita pelo modelo PLS versus concentrações conhecidas estão apresentados na figura 25 para primeira derivada e figura 26 para a segunda derivada e os parâmetros estatísticos apresentados na tabela 7 para a primeira derivada e tabela 8 para a segunda derivada, juntamente com cada correção de linha de base e o número de PCs utilizados.

Figura 25 - Gráficos de concentrações preditas versus conhecidas por validação cruzada para o PLS teste 2 com primeira derivada.

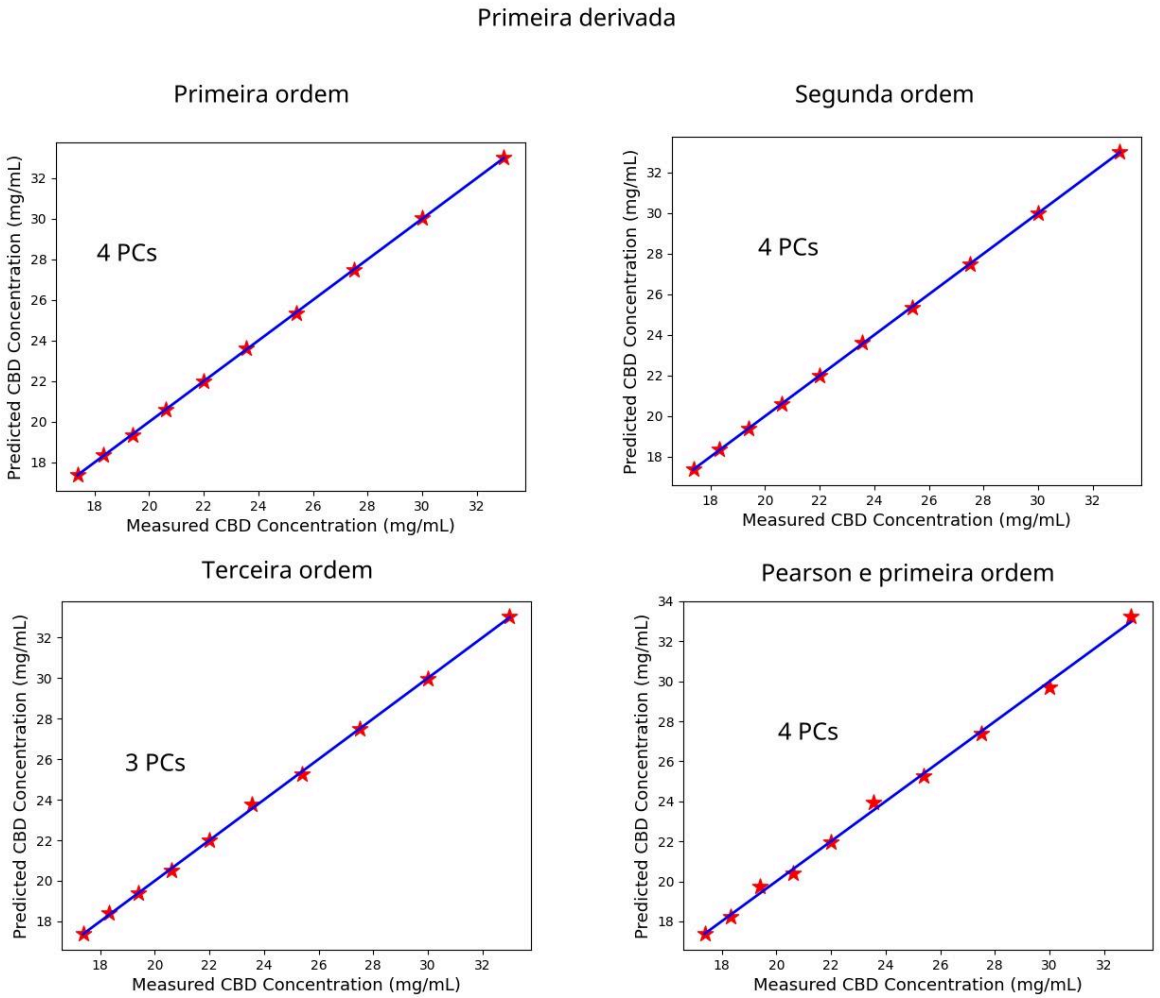


Figura 26 - Gráficos de concentrações preditas versus conhecidas por validação cruzada para o PLS teste 2 com segunda derivada.

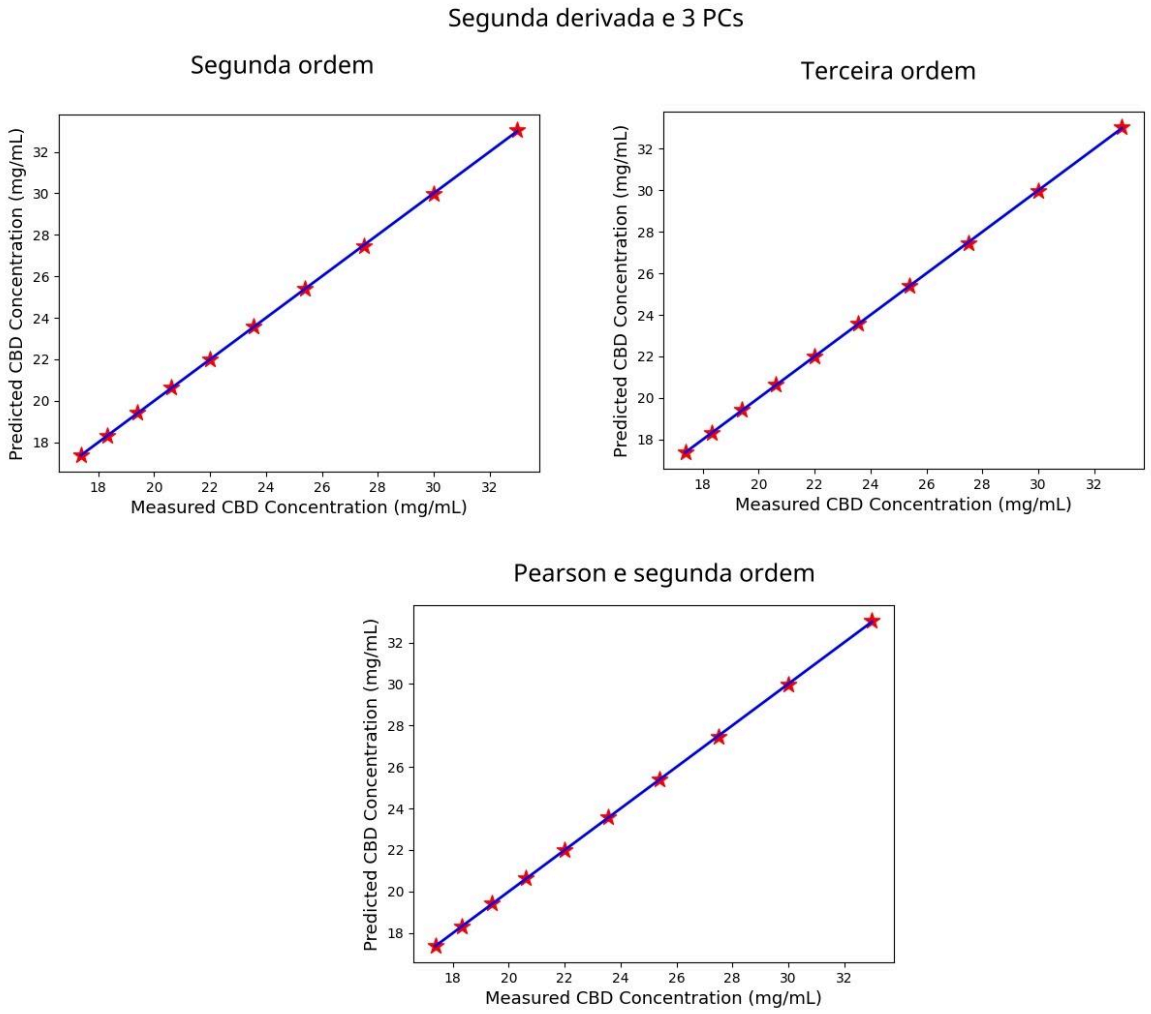


Tabela 7 - Parâmetros estatísticos para o PLS teste 2 com a primeira derivada.

Parâmetro	Primeira derivada e 1 ordem	Primeira derivada e 2 ordem	Primeira derivada e 3 ordem	Primeira derivada e Pearson e 1 ordem
R^2 da calibração	1,000	1,000	1,000	0,998
R^2 da validação cruzada	0,995	0,994	0,988	0,998
MSE da calibração	0,001	0,001	0,008	0,046
MSE da validação cruzada	0,125	0,148	0,284	0,242

Tabela 8 - Parâmetros estatísticos para o PLS teste 2 com a segunda derivada.

Parâmetro	Segunda derivada e 2 ordem	Segunda derivada e 3 ordem	Segunda derivada e Pearson e 2 ordem
R^2 da calibração	1,000	1,000	1,000
R^2 da validação cruzada	0,986	0,986	0,986
MSE da calibração	0,001	0,001	0,001
MSE da validação cruzada	0,345	0,347	0,346

Comparando os resultados obtidos, foi concluído que o PLS também resultou em um ajuste de dados melhor que o PCR para o teste 2 na maioria dos casos. A correção de linha de base de Pearson em conjunto com as correções de primeira e segunda ordem novamente resultaram em bons parâmetros independente do tamanho da janela de números de onda usada no filtro de Savitzky-Golay, comparado com as outras correções. Os parâmetros dos ajustes do PLS para os testes 1 e 2 foram similares e bem ajustados, mas os valores foram um pouco melhores para o teste 2.

5. CONCLUSÃO

Os modelos de PCR e PLS, no geral, resultaram em bons parâmetros estatísticos na diluição das amostras de óleos de Cannabis com altos teores de THC e CBD. Porém, um dos efeitos mais importantes é de que os resultados foram altamente dependentes do tamanho da janela de números de onda usada no filtro de Savitzky-Golay na maioria dos casos testados, principalmente para o PCR. Como esperado devido a natureza dos modelos, o PLS resultou em melhores ajustes dos dados do que o PCR para os dois testes na maioria das combinações entre derivadas e correções de linha de base. Ambos os modelos PCR e PLS resultaram em melhores ajustes para o teste 2 (alto CBD) do que para o teste 1 (alto THC).

Diferentemente das correções de linha de base de primeira, segunda e terceira ordem, a correção de Pearson em conjunto com a correção de primeira e segunda ordem foi bem menos dependente do tamanho da janela de números de onda usada no filtro de Savitzky-Golay e resultou em bons parâmetros mesmo considerando somente o primeiro componente principal para ambos os modelos e ambas amostras. Exceto pela correção de linha de base de Pearson e conjunto com as correções de primeira e segunda ordem e derivadas, não foram identificadas diferenças significativas entre as correções de linha de base e entre a primeira e a segunda

derivada devido a alta dependência dos resultados em relação ao tamanho da janela de números de onda no filtro de Savitzky-Golay.

Os resultados obtidos para os modelos PLS e PCR para THC e CBD podem ser usados para a quantificação de THC e CBD em amostras com esses teores desconhecidos, considerando a hipótese de que há somente azeite de oliva e THC ou CBD nas amostras de óleos de Cannabis.

Como perspectivas futuras fica recomendada a combinação do modelo PLS de dados infravermelho com cromatografia para verificar a existência e separar os componentes das amostras de óleo de Cannabis e quantificá-los considerando mais componentes além do THC e CBD na matriz **Y** dos modelos. Dessa forma, seria possível a obtenção de resultados mais representativos dos componentes das amostras.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

OTTO, Matthias; Chemometrics: Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry. 3. ed. Weinheim: Wiley-VHC, 2017.

CIURCZAK, Emil W; IGNE, Benoît; WORKMAN, Jerome; BURNS, Donald A. Handbook of Near-Infrared Analysis. 4. ed. Boca Raton: CRC Press, 2021.

SKOOG, Douglas A; HOLLER, F. James; NIEMAN, Timothy A. Princípios de Análise Instrumental. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

BRERETON, Richard G. Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant. 1. ed. Chichester: Wiley, 2003.

VARMUZA, Kurt; FILZMOSER, Peter. Introduction to Multivariate Statistical Analysis in Chemometrics. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 2009.

UNODC. Recommended Methods and Analysis of Cannabis for the Identification and Cannabis Products, 2022.

De Backer, B. et al. Innovative development and validation of an HPLC/DAD method for the qualitative and quantitative determination of major cannabinoids in cannabis plant material. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, v. 877, p. 4115-4124, 2009. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.11.004.

Balant, M.; Gras, A.; Ruz, M.; Vallès, J.; Vitales, D.; Garnatje, T. Traditional Uses of Cannabis: An Analysis of the CANNUSE Database. J. Ethnopharmacol. 2021, 279.

https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114362.

Song, L.; Carlson, S.; Valenzuela, G.; Chao, M.; Pathipaka, S. B. Development of a Validated Method for Rapid Quantification of up to Sixteen Cannabinoids Using Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Diode-Array Detector with OptionalElectrospray Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry Detection. J. Chromatogr. A 2022, 1670, 462953. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.462953.

Licitra, R.; Marchese, M.; Naef, V.; Ogi, A.; Martinelli, M.; Kiferle, C.; Fronte, B.; Santorelli, F. M. A Review on the Bioactivity of Cannabinoids on Zebrafish Models: Emphasis on Neurodevelopment. Biomedicines. 2022, pp 1–28. https://doi.org/10.3390/biomedicines10081820.

Citti, C.; Ciccarella, G.; Braghiroli, D.; Parenti, C.; Vandelli, M. A.; Cannazza, G. 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. 2016, 128, 201–209. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.05.033.

OLIVEIRA, Paulo Roberto Rocha de. Determinação da viscosidade, densidade e número de gotas por mL de óleos medicinais de cannabis. 2023. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Ciências Ambientais) - Universidade de Brasília, 2023.

CUNHA, Luiz Phelipe Medeiros. Uso de sensores virtuais MCR-ALS/PLS e modelagem fenomenológica na copolimerização de metacrilato de metila e pivalato de vinila em miniemulsão. 2023. 140 f., il. Dissertação (Mestrado em Química) — Universidade de Brasília, Brasília, 2023. http://repositorio.unb.br/handle/10482/50277

Policarpo, F. O Debate Em Torno Da Maconha No Brasil: Um Breve Panorama Das Controvérsias e Disputas Atuais. In Drogas e sociedade: estudos comparados Brasil e Portugal; Pinto, J. B., Ed.; Letra Capital Editora: Rio de Janeiro, 2019; pp 109–123.

ANVISA. Resolução Da Diretoria Colegiada RDC No 66. 2016.

PROCACCIA, Shiri; LEWITUS, Gil Moshe; FEDER, Carni L.; SHAPIRA Anna; BERMAN, Paula; MEIRI, David. Cannabis for Medical Use: Versatile Plant Rather Than a Single Drug. Front Pharmacol. 2022 Apr 25;13:894960. doi: 10.3389/fphar.2022.894960.

GESKOVSKI, Nikola; STEFKOV, Gjose; GIGOPULU, Olga; STEFOV, Stefan; HUCK, Christian W.; MAKRESKI, Petre. Mid-infrared spectroscopy as process analytical technology tool for estimation of THC and CBD content in Cannabis flowers and extracts, Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, Volume 251, 2021, 119422, ISSN 1386-1425. https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.119422.