



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

**Aplicação de *dried blood spots* na deteção e
quantificação de canabinóides por cromatografia
de gases/espectrometria de massas em tandem**

Mariana Nogueira Caetano

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica
(2º ciclo de estudos)

Orientadora: Prof.^a Doutora Maria Eugénia Gallardo Alba
Coorientador: Doutor Mário Jorge Dinis Barroso

Covilhã, Outubro de 2016

Dedicatória

Para ti.

Agradecimentos

Agradeço à Professora Doutora Eugenia Gallardo e ao Doutor Mário Barroso pela disponibilidade e compreensão que demonstraram ao longo deste trabalho. Agradeço também a força e a oportunidade de poder trabalhar com eles, obrigado por terem acreditado em mim.

Ao Tiago por ter estado sempre por perto para ajudar, pela paciência e sobretudo pela amizade.

Aos meus amigos e colegas, mas em especial à Vera, à Teresa e à Sofia que sempre me ajudaram e apoiaram nas alturas mais complicadas, e com as quais também partilhei muitos risos, sei que sem elas não tinha chegado até aqui.

Aos meus pais que me apoiaram e estiveram do meu lado e ao meu irmão que, apesar da distância, tem sempre a palavra certa para mim.

Ao Miguel que tornou tudo mais fácil.

Resumo

A canábis é a droga ilícita mais comum e mais consumida mundialmente, como tal, é importante contribuir para o desenvolvimento de metodologias que tornem os laboratórios mais eficazes na identificação e quantificação desta substância psicoativa. O objetivo deste trabalho de investigação foi o desenvolvimento e validação de um método analítico por cromatografia de gases associada à espectrometria de massas em tandem (GS/MS-MS) e *Dried Blood Spots* (BDS) para a determinação e quantificação de delta-9-tetrahidrocanabinol, 11-hidroxi-delta-9-tetrahidrocanabinol e 11-nor-9-carboxi-delta-9-tetrahidrocanabinol em amostras de sangue. É de salientar que é a primeira vez que estes compostos são determinados por DBS e GS/MS-MS.

Os fatores que podiam influenciar o processo de extração foram avaliados: tipo de solvente de extração (metanol, acetonitrilo, diclorometano, 2-propanol, hexano e acetato de etilo), volume de solvente de extração (2 a 5 mL), tempo de extração (10 a 60 min), tempo de centrifugação (10 a 30 min) e tempo de secagem da mancha de sangue (3h a *overnight*). As condições finais são as seguintes: aplicar 100 µL de sangue em cartões Whatman® Human ID Bloodstain Card e deixar secar durante 6h; após este tempo, a mancha que contém a amostra é retirada do cartão e são adicionados 4 mL de metanol. O processo de extração é efetuado sob agitação durante 40 min. Finalizado este tempo procede-se à remoção do cartão. A amostra é centrifugada durante 20 min a 3000 rpm, e o sobrenadante evaporado e derivatizado com MSTFA/TMCS num micro-ondas a 800W durante 2 min.

O método foi validado seguindo critérios internacionalmente aceites e os parâmetros estudados incluíram linearidade, seletividade, limites de deteção (LOD) e quantificação (LLOQ), precisão e exatidão. A seletividade foi avaliada e não foram observadas interferências procedentes de substâncias endógenas ou de outras drogas eventualmente presentes nos diferentes tempos de retenção e iões dos analitos em estudo. O procedimento foi linear para o intervalo de concentrações de 1 até 30 ng/mL, com coeficientes de determinação superiores a 0,99 para todos os analitos. As precisões intra- e inter-dia foram tipicamente inferiores a 15% para todos os analitos. Os LODs foram de 1 ng/mL para todos os compostos e as recuperações variaram entre 14% e 88%.

O método validado mostrou ser aplicável à análise de amostras reais, sendo então uma ferramenta vantajosa não só no âmbito de análises de toxicologia clínica e forense, mas também em análises de despistagem de consumo de canábis.

Palavras-chave

Dried Blood Spots; Canabinóides; GC/MS-MS; Toxicologia

Abstract

Cannabis is the most common and consumed illegal drug worldwide, and therefore the development of methodologies capable of making laboratories more effective on the identification and quantification of these psychoactive substances is necessary. The goal of this research work was the development and validation of an analytic method using gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry (GC/MS-MS), using Dried Blood Spots (DBS), for the determination and quantification of delta-9-tetrahydrocannabinol, 11-hydroxi-delta-9-tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-carboxi-delta-9-tetrahydrocannabinol in blood samples. It should be noted that this is the first time that these compounds are determined by means of DBS and GC/MS-MS.

The factors which might influence the extraction were screened previously: type of solvent extraction (methanol, acetonitrile, dichloromethane, 2-propanol, hexane and ethyl acetate), volume of solvent of extraction (2 to 5 mL), time of extraction (10 to 60 min), centrifugation time (10 to 30 min) and time of dried sample spot (3 h to overnight). The final process was as follows: 100 µL of blood was applied to Whatman® Human ID Bloodstain Card and dried for 6h. After that, 4 mL of methanol was added and a slight agitation for 40 min has followed. The card was removed and the samples were centrifuged 20 min at 3000 rpm. The extract was evaporated to dryness and derivatized with MSTFA/TMCS in a microwave oven at 800 W for 2 min.

The method was validated following internationally accepted criteria, including selectivity, linearity, limits of detection (LOD) and quantification (LLOQ), precision and accuracy, stability and recovery. Selectivity was evaluated by analysis of blank samples, and no interferences from endogenous substances were observed, and other drugs eventually present had different retention times and/or could not be detected using our method's conditions. The procedure was linear for concentrations ranging from 1 to 30 ng/mL with determination coefficients higher than 0.99 for all analytes. The LODs were 1 ng/mL for all compounds and the recoveries ranged between 14 and 88 %.

The method was shown to be applicable to real samples, therefore being a powerful tool not only for clinical and forensic toxicology purposes, but also to assess the consumption of cannabis and derived products.

Keywords

Dried blood spots; Cannabinoids; GC/MS-MS; Toxicology.

Índice

Dedicatória	2
Agradecimentos.....	3
Resumo	4
Palavras-chave.....	4
Abstract.....	5
Keywords.....	5
Índice	6
Lista de Figuras.....	8
Lista de Tabelas	9
Lista de Acrónimos	10
Lista de Gráficos	12
Objetivos.....	13
1. Revisão Bibliográfica	14
1.1. Canábis: Um pouco de história.....	14
1.2. Constituição da Canábis.....	16
1.3. Mecanismo de ação	18
1.4. Toxicocinética	20
1.5. Efeitos do consumo.....	22
1.6. O uso da canábis para fins medicinais.....	25
1.7. Canabinóides sintéticos	27
1.8. Percentagem de consumo	29
1.9. Detecção de canabinóides em fluídos biológicos.....	31
1.10. Dried Blood Spots.....	32
2. Justificação do tema	35
3. Materiais e Métodos.....	36
3.1. Padrões e Reagentes	36
3.2. Preparação de soluções.....	36
Soluções Padrão.....	36
Outras soluções	37

Aplicação de *dried blood spots* na detecção e quantificação de canabinóides por cromatografia de gases/espectrometria de massas em tandem

3.3. Equipamentos.....	37
3.4. Matriz biológica	38
3.5. Dried Blood Spots (DBS).....	38
3.6. Sistema e condições cromatográficas	38
3.7. Preparação da amostra.....	39
3.8. Procedimento de extração	39
4. Resultados e Discussão	40
4.1. Identificação dos analitos	40
4.2. Otimização do método extrativo	45
4.2.1 – Escolha do solvente.....	45
4.2.2 – Quantidade de solvente.....	49
4.2.3 – Tempo de extração	51
4.2.4 – Tempo de centrifugação	53
4.2.5 – Tempo de secagem das DBS.....	56
4.3. Validação.....	58
4.3.1 – Seletividade e especificidade	59
4.3.2 – Curva de calibração e linearidade	61
4.3.3 – Limites de detecção e de quantificação	63
4.3.4 – Precisão e exatidão	66
4.3.5 – Recuperação	68
4.3.6 – Estabilidade	70
4.4. Aplicação do método a amostra real	73
5. Conclusões	75
6. Referências Bibliográficas	76
Anexos.....	83
Anexo I	83
Anexo II.....	106

Lista de Figuras

<i>Figura 1 - Início do consumo da canábida e sua expansão pelo mundo</i>	16
<i>Figura 2 - Estrutura química do Δ^9-THC e do canabinol</i>	17
<i>Figura 3 - Descrição simplificada do metabolismo do Δ^9-THC</i>	17
<i>Figura 4 - Mecanismo de inibição da libertação de neurotransmissores retrógrados</i>	19
<i>Figura 5 - Efeitos dos endocanabinóides e do Δ^9-THC nos recetores CB1</i>	20
<i>Figura 6 - Novas substâncias sintéticas encontradas no mercado</i>	29
<i>Figura 7 - Prevalência do uso da canábida a nível mundial dos 15-64 anos</i>	30
<i>Figura 8 - Comparação da recolha clássica de amostras de sangue com o uso de DBS</i>	34
<i>Figura 9 - Cromatogramas em SCAN e respetivos espectros de massa do THC (A), THC-OH (B) e THC-COOH (C) a 100 ng/mL</i>	40
<i>Figura 10 - Exemplo do product ion do THC à concentração de 100 ng/mL</i>	42
<i>Figura 11 - Cromatograma do THC, THC-OH e THC-COOH a 10 ng/mL e respetivos padrões internos a 100 ng/mL</i>	44
<i>Figura 12 - Cromatograma de uma amostra branca</i>	60
<i>Figura 13 - Cromatograma de uma amostra fortificada com os analitos de estudo a 10 ng/mL e respetivos padrões internos a 100 ng/mL</i>	61
<i>Figura 14 - Cromatograma relativo à amostra real</i>	74

Lista de Tabelas

<i>Tabela 1 - Principais tipos de canabinóides e suas propriedades</i>	17
<i>Tabela 2 - Potenciais usos benéficos da canábis</i>	25
<i>Tabela 3 - Parâmetros do método desenvolvido por GC-MS/MS</i>	39
<i>Tabela 4 - Transições monitorizadas em modo MRM (a transição utilizada para quantificação encontra-se sublinhada)</i>	43
<i>Tabela 5 - Condições finais de extração</i>	58
<i>Tabela 6 - Janelas máximas de tolerância permitidas para as abundâncias relativas dos íões monitorizados</i>	59
<i>Tabela 7 - Dados de linearidade para os compostos em estudo (n=5)</i>	63
<i>Tabela 8 - Características dos LLOQ de cada composto (n=5)</i>	64
<i>Tabela 9 - Métodos analíticos para determinação de canabinóides em amostras de sangue e derivados, usando técnicas microextrativas para a preparação da amostra</i>	66
<i>Tabela 10 - Precisão inter-dia e exatidão (n=5)</i>	67
<i>Tabela 11 - Precisão inter-dia e exatidão (n=3)</i>	68
<i>Tabela 12 - Percentagem de recuperação de cada um dos compostos em estudo, calculada para 3 níveis de concentração (n=3)</i>	69
<i>Tabela 13 - Resumo dos resultados do estudo de estabilidade de amostras processadas (n=3)</i>	71
<i>Tabela 14 - Resumo dos resultados do estudo de estabilidade de longa duração (n=3)</i>	72
<i>Tabela 15 - Resumo dos resultados do estudo da estabilidade a ciclos de congelamento e descongelamento (n=3)</i>	73

Lista de Acrónimos

11-OH-THC	11-hidroxi- Δ^9 - THC
2-AG	2-araquidonilglicerol
AEA	<i>N-arachidonylethanolamine</i> (Etanolamina de ácido araquidónico)
AVC	Acidente vascular cerebral
CB1R	Recetor 1 dos canabinóides
CB2R	Recetor 2 dos canabinóides
CBC	Canabicromeno
CBD	Canabidiol
CBN	Canabinol
CI	<i>Chemical Ionization</i> (Ionização química)
CICS	Centro de Investigação em Ciências da Saúde
CMV	Citomegalovírus
CYP	Complexo citocromo P450
DBS	<i>Dried Blood Spots</i>
DPX	<i>Disposable Pipette Extraction</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i> (Ácido Etilenodiamino Tetra-acético)
EEG	<i>Electroencephalography</i> (Eletroencefalografia)
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática)
EMCCDA	<i>European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction</i>
EMIT	<i>Enzyme Multiplied Immunoassay Technique</i> (Imunoensaios de Multiplicação Enzimática)
ERM	Erro relativo médio
FAAH	<i>Fatty Acid Amide Hydrolase</i> (Amida hidrolase de ácidos gordos)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GC	<i>Gas chromatography</i> (Cromatografia gasosa)
GS/MS-MS	<i>Gas Chromatography coupled with Tandem Mass Spectrometry</i> (Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa em tandem)
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> (Vírus da imunodeficiência humana)
HPTLC	<i>High Performance Thin Layer Chromatography</i> (Cromatografia em camada fina de alta precisão)
HTLV	<i>Human T lymphotropic Virus</i> (Linfotrópico de Células T Humanas)
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
LC	<i>Liquid Chromatography</i> (Cromatografia líquida)
LC-MS/MS	<i>Liquid Chromatography coupled with Tandem Mass Spectrometry</i> (Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em tandem)
LLOQ	Limite inferior de quantificação

Aplicação de *dried blood spots* na detecção e quantificação de canabinóides por cromatografia de gases/espectrometria de massas em tandem

LOD	<i>Limit Of Detection</i> (Limite de detecção)
LSD	<i>Lysergic acid Diethylamide</i> (Dietilamida do ácido lisérgico)
MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i> (Ionização/dessorção a laser assistida por matriz)
MEPS	<i>Microextraction by Packed Sorbent</i> (Microextração em seringa empacotada)
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i> (Monitorização de reações múltiplas)
MS	<i>Mass spectrometry</i> (Espectrometria de massa)
MS/MS	<i>Tandem Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de massa em tandem)
MSTFA	N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida
PCP	<i>Phencyclidine</i> (Fenciclidina)
REM	<i>Rapid Eye Movement</i>
SAMHSA	<i>Substance Abuse and Mental Health Services Administration</i>
SICAD	Serviço de intervenção nos comportamentos aditivos e nas dependências
SLE	<i>Supported Liquid Extraction</i>
SPMEM	<i>Solid Phase Microextraction Membrane</i> (Microextração por membrana em fase sólida)
THC	Delta-9-tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC)
THC-COOH	11-nor-9-carboxi-delta-9-tetrahydrocannabinol
THC-OH	11-hidroxi-delta-9-tetrahydrocannabinol
TLC	<i>Thin-layer chromatography</i> (Cromatografia em camada fina)
TMCS	Trimetilclorosilano
TrR	Tempo de retenção relativo
UBI	Universidade da Beira Interior
Δ^8 - THC	Δ^8 - tetrahydrocannabinol

Lista de Gráficos

Gráfico 1 - Média e desvio-padrão da área de THC/área de THC-d ₃ para os vários solventes estudados	46
Gráfico 2 - Média e desvio-padrão da área de THC-OH/área de THC-OH-d ₃ para os vários solventes estudados	47
Gráfico 3 - Média e desvio-padrão da área de THC-COOH/área de THC-COOH-d ₃ para os vários solventes estudados	48
Gráfico 4 - Média e desvio-padrão da área de THC/área de THC-d ₃ para os vários volumes de solvente utilizados	50
Gráfico 5 - Média e desvio-padrão da área de THC-OH/área de THC-OH-d ₃ para os vários volumes de solvente utilizados	50
Gráfico 6 - Média e desvio-padrão da área de THC-COOH/área de THC-COOH-d ₃ para os vários volumes de solvente utilizados	51
Gráfico 7 - Média e desvio-padrão da área de THC/área de THC-d ₃ para os vários tempos de extração utilizados	52
Gráfico 8 - Média e desvio-padrão da área de THC-OH/área de THC-OH-d ₃ para os vários tempos de extração utilizados	52
Gráfico 9 - Média e desvio-padrão da área de THC-COOH/área de THC-COOH-d ₃ para os vários tempos de extração utilizados	53
Gráfico 10 - Média e desvio-padrão da área de THC/área de THC-d ₃ para os vários tempos de centrifugação utilizados	54
Gráfico 11 - Média e desvio-padrão da área de THC-OH/área de THC-OH-d ₃ para os vários tempos de centrifugação utilizados	54
Gráfico 12 - Média e desvio-padrão da área de THC-COOH/área de THC-COOH-d ₃ para os vários tempos de centrifugação utilizados	55
Gráfico 13 - Média e desvio-padrão da área de THC/área de THC-d ₃ para os vários tempos de secagem das DBS	56
Gráfico 14 - Média e desvio-padrão da área de THC-OH/área de THC-OH-d ₃ para os vários tempos de secagem das DBS	57
Gráfico 15 - Média e desvio-padrão da área de THC-COOH/área de THC-COOH-d ₃ para os vários tempos de secagem das DBS	57

Objetivos

O objetivo deste trabalho experimental prende-se com a otimização e desenvolvimento de novas metodologias analíticas para a detecção e quantificação do delta-9-tetrahydrocannabinol (THC), 11-hidroxi-delta-9-tetrahydrocannabinol (11-OH-THC) e 11-nor-9-carboxi-delta-9-tetrahydrocannabinol (THC-COOH) em amostras de sangue com recurso à análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa em tandem (GC-MS/MS) e aos *Dried Blood Spots* (DBS).

Para a realização deste trabalho e obtenção do objetivo proposto foram estabelecidas as seguintes tarefas:

- Desenvolvimento e otimização de um método cromatográfico que permita a detecção específica de THC, 11-OH-THC e THC-COOH.
- Otimização de uma técnica de preparação de amostra baseada nos DBS para a determinação destes analitos e posterior validação segundo normas internacionalmente aceites, nomeadamente da *Food and Drug Administration* (FDA) e da *International Conference on Harmonisation* (ICH).
- Aplicação da metodologia desenvolvida a amostras reais, verificando assim a sua adequabilidade à rotina laboratorial.

1. Revisão Bibliográfica

1.1. Canábis: Um pouco de história

A planta da canábis possui duas subespécies principais, *Cannabis indica* e *Cannabis sativa*, que podem ser diferenciadas pelas suas características físicas e teor de THC. A linhagem *indica* é caracterizada por plantas de baixa envergadura, folhas amplas de um verde acentuado e um maior teor de canabidiol que a *sativa*. A linhagem *sativa* caracteriza-se por plantas mais altas, com folhas finas de cor verde pálido e um teor de THC mais elevado, que pode ser encontrado nas suas folhas secas, sementes, caules, flores (sensimilla) e óleo, o que faz com que seja a espécie preferencial dos consumidores (Atakan, 2012; Greydanus, *et al.*, 2013).

As primeiras evidências do uso da canábis remontam à China, onde descobertas históricas e arqueológicas associaram a sua utilização ao fabrico de fibras desde a era de 4000 A.C. A introdução da canábis para fins medicinais, na China, foi descrita como a mais antiga farmacopeia do mundo, sendo ainda hoje usada por muitos como laxante (Zuardi, 2006). No Egito, universalmente reconhecido como uma das civilizações ancestrais mais avançada em termos medicinais, também foram encontrados registos do uso desta planta para os mais variados tratamentos, quer a nível ocular e do sistema reprodutor feminino quer por possuírem propriedades antibióticas e anti-helmínticas ou pelo seu potencial como inseticida (Russo, 2007).

Foi, no entanto, na Índia que o uso da canábis se mostrou mais acentuado, tanto a nível medicinal como recreacional, onde os seus efeitos psicoativos eram bem conhecidos. A sua preparação podia ser feita de três maneiras distintas com diferentes graus de intensidade, mas em todas se encontravam presentes canabinóides ativos. No Tibete a canábis era conhecida por facilitar a meditação, estando possivelmente a sua utilização associada, entre outras razões, ao facto de ser uma planta relativamente abundante naquela região (Zuardi, 2006). A canábis chegou ao Brasil através da troca de escravos vindos de África, tendo sido depois aí incorporada essencialmente para tratamentos de reumatismo e dor de dentes, espalhando-se rapidamente pelo hemisfério (Russo, 2007). Durante este período, a canábis, era cultivada na Europa apenas para o fabrico de fibras. A manufatura de papel com base nesta planta foi depois introduzida pelos muçulmanos em 1150, primeiramente em Espanha e depois na Itália. Remontam também a esta época os livros encontrados onde se estabelece de forma clara a distinção entre a planta do tipo macho e fêmea, como descrito anteriormente num ideograma Chinês (Zuardi, 2006).

Aplicação de *dried blood spots* na detecção e quantificação de canabinóides por cromatografia de gases/espectrometria de massas em tandem

No entanto, a introdução propriamente dita da canábis na medicina ocidental só se deu no século XIX pelos trabalhos de William B. O'Shaughnessy e Jacques-Joseph Moreau. O'Shaughnessy, após um estudo da literatura da planta e avaliação dos seus efeitos em animais e mais tarde pacientes com diferentes patologias, publicou um livro onde descreve várias experiências bem-sucedidas usando canábis para o tratamento de doenças reumáticas, convulsões e espasmos musculares provocados pelo tétano e pela raiva. Moreau avaliou os efeitos da planta a nível das funções cognitivas para assim compreender a génese das doenças mentais (Zuardi, 2006). O uso medicinal da canábis espalhou-se da França e Inglaterra para toda a Europa e depois para a América do Norte (Figura 1).

Em 1860 realizou-se na América a primeira conferência clínica e na segunda metade do século XIX tinham sido publicados mais de 100 artigos científicos na Europa e nos Estados Unidos abordando o tema do valor terapêutico da canábis. No entanto, nas primeiras décadas do século XX, o uso para fins medicinais desta planta no Ocidente diminuiu significativamente. Tal pode ter acontecido pela dificuldade em replicar os efeitos desta planta, bem como pelo facto do seu princípio ativo continuar por isolar, e também porque por essa altura já teriam surgido outros tratamentos com eficácia conhecida e considerados como uma alternativa melhor. Surgiram também muitas restrições legais, que limitaram o uso médico e experimental da canábis, pelo que esta foi removida da farmacopeia Americana em 1941 (Zuardi, 2006).

Na segunda metade do século XX, a canábis atingiu novamente uma grande importância social, mas desta vez devido ao seu consumo para fins recreativos. O primeiro composto a ser isolado de forma pura foi o canabinol, e logo se assumiu que seria o principal componente da planta e o responsável pelos seus efeitos psicoativos. O segundo foi o canabidiol em 1963 por Mechoulam e Shvo (Zuardi, 2006; Atakan, 2012). Só em 1964 a estrutura química do Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) foi identificada por Gaoni e Mechoulam, o que contribuiu para a proliferação de estudos sobre os constituintes desta planta. O contínuo crescimento do consumo da canábis, causador do aumento da sua importância social, juntamente com um melhor conhecimento da sua composição química, contribuíram para a intensificação da sua importância científica em 1965. Com este crescimento de interesse pela canábis, os seus efeitos terapêuticos e os seus riscos estão novamente a ser estudados, desta vez usando métodos mais precisos (Zuardi, 2006).

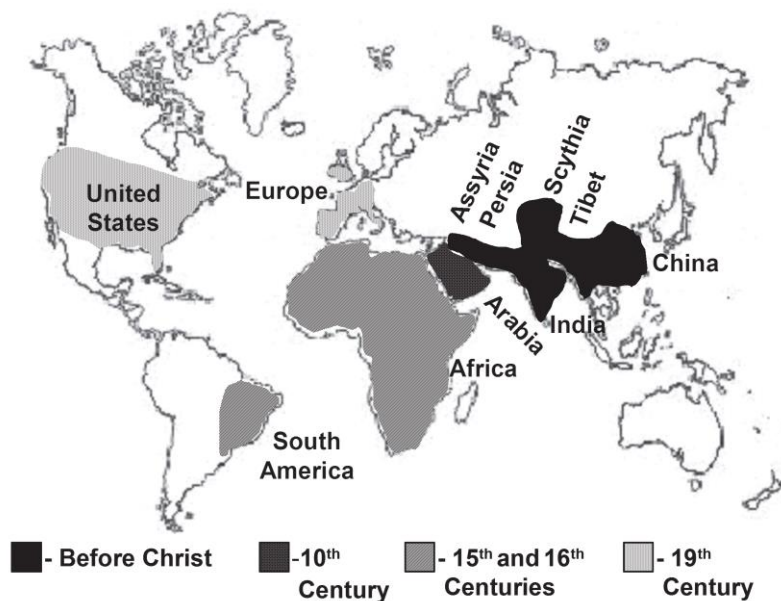


Figura 1- Início do consumo da canábis e sua expansão pelo mundo (Zuardi, 2006)

1.2. Constituição da Canábis

A canábis é uma planta que contém mais de 421 químicos, dos quais mais de 60 são canabinóides (Sharma, *et al.*, 2012; Huestis, 2007). Durante o seu consumo, mais de 2000 compostos são produzidos por pirólise, podendo os mesmos ser incluídos em diferentes classes químicas, tais como compostos azotados, aminoácidos, hidrocarbonetos, açúcares, terpenos e ácidos gordos simples. São estes que conferem as propriedades toxicológicas e farmacológicas únicas encontradas nesta planta. De entre todos os canabinóides presentes (Tabela 1), o Δ^9 -THC é considerado como o mais psicoativo, contribuindo para o comportamento tóxico da canábis (Sharma, *et al.*, 2012). Este tem uma estrutura tricíclica de 21 carbonos, sem azoto e com dois centros quirais, numa configuração *trans* (Figura 2); é um óleo viscoso e volátil, com elevada solubilidade lipídica e um pka de 10,6. O Δ^9 -THC está presente na canábis como uma mistura de ácidos monocarboxílicos, facilmente descarboxilada quando aquecida e que se decompõe quando exposta ao ar, calor ou luz e que se liga ao vidro ou plástico sem grande dificuldade, sendo por isso, normalmente armazenado em solventes orgânicos básicos ou em recipientes de vidro de sílica e âmbar para evitar perdas durante os procedimentos analíticos (Sharma, *et al.*, 2012).

Tabela 1 - Principais tipos de canabinóides e suas propriedades (Sharma, et al., 2012; Greydanus, et al., 2013)

Componentes Psicoativos	
Nome	Efeitos
Δ^9 - tetrahydrocannabinol (Δ^9 - THC)	Principal componente psicoativo; causador dos efeitos psicológicos e comportamentais.
Δ^8 - tetrahydrocannabinol (Δ^8 - THC)	Menos psicoativo que o Δ^9 -THC.
Canabinol (CBN)	Metabolito do THC, menos poderoso que o Δ^9 -THC.
11-hidroxi- Δ^9 - THC (11-OH-THC)	Também responsável pelos efeitos psicológicos da canábis.
Anandamida (araquidoniletanolamida)	Imita a atividade do Δ^9 -THC e outros canabinóides que interagem com os seus recetores.
Componentes Não-psicoativos	
Canabidiol (CBD)	Pouco psicoativo com ação anticonvulsivante, isômero do THC.
Canabicromeno (CBC)	Não psicoativo.
Ácido (-) Δ^8 - THC-11-oico	Não psicoativo com atividade analgésica.

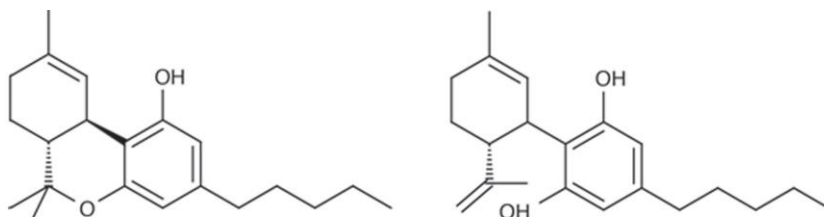


Figura 2 - Estrutura química do Δ^9 -THC e do canabidiol (Atakan, 2012)

A via metabólica do Δ^9 -THC e dos seus metabolitos primários ativo e inativo, respetivamente, encontra-se representada de forma simplificada na figura 3.

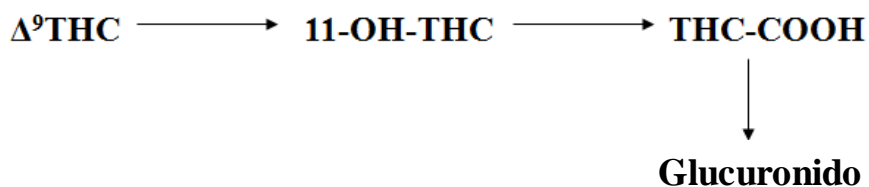


Figura 3 - Descrição simplificada do metabolismo do Δ^9 -THC (Sharma, et al., 2012)

1.3. Mecanismo de ação

Duas hipóteses foram propostas para explicar o mecanismo *in vivo* da ação do Δ^9 -THC. De acordo com a primeira, o Δ^9 -THC, excretado como um glucuronido, atua via interações não específicas com membranas celulares e dos organelos do cérebro suportando um mecanismo de perturbação da membrana. A segunda hipótese sugere que o Δ^9 -THC interage com recetores específicos. Delinear um mecanismo único de ação não é fácil, uma vez que análises moleculares demonstraram que o Δ^9 -THC interage com diversos alvos intracelulares, incluindo os recetores dos opióides e das benzodiazepinas, a via de síntese das prostaglandinas e o metabolismo das proteínas e dos ácidos nucleicos. Para além disso, os canabinóides podem inibir o metabolismo de macromoléculas, dependendo da dose em que se encontrem no organismo, já que possuem uma vasta gama de efeitos nos sistemas enzimáticos, na secreção hormonal e nos neurotransmissores (Sharma, *et al.*, 2012).

Outro ponto importante nos estudos desenvolvidos na área dos canabinóides, foi então a identificação de locais específicos de ligação do Δ^9 -THC no cérebro, que foi seguida pela clonagem do recetor 1 dos canabinóides (CB1R). Este sistema foi denominado “sistema recetor dos canabinóides”, devido à ligação de afinidade do Δ^9 -THC a estes recetores como agonista parcial. Pouco tempo depois foi descoberto um segundo recetor, logicamente denominado CB2R. Sensivelmente na mesma altura foi confirmada a existência de um sistema endocanabinóide, por Devane e colaboradores, seguindo-se a extração de uma molécula, a etanolamina de ácido araquidónico (AEA), que se liga a estes recetores. A este agonista endocanabinóide foi dado então o nome de anandamida. Mechoulam e colaboradores isolaram 3 anos mais tarde o segundo neurotransmissor endocanabinóide, o 2-araquidonilglicerol (2-AG). Descobertas mais recentes demonstraram que o Δ^9 -THC, como agonista parcial se assemelha à anandamida na sua afinidade para o CB1, embora tenha uma menor eficácia (Atakan, 2012; Console-Bram, *et al.*, 2012).

Os recetores CB1 estão localizados maioritariamente no cérebro, mais concretamente na substância nigra, nos núcleos da base, no sistema límbico, no hipocampo e no cerebelo, mas são também expressos no sistema nervoso periférico, no fígado, na tiróide, no útero, nos ossos e no tecido testicular. Concentram-se particularmente em regiões associadas à cognição, memória, ansiedade, perceção sensorial da dor, coordenação motora e função endócrina.

Os recetores CB2 são maioritariamente expressos em células imunitárias, no baço e no sistema gastrointestinal e alguns estendem-se pelo cérebro e sistema nervoso periférico. Pensa-se que estes recetores poderão desempenhar um papel na ação imunossupressora atribuída aos canabinóides. Curiosamente, ambos os recetores são também encontrados na placenta, tendo sido demonstrado que desempenham um papel na regulação da atividade do transportador da serotonina. Estudos mais recentes revelaram que o sistema endocanabinóide

também desempenha um papel significativo em diversos mecanismos da reprodução humana (Atakan, 2012; Sharma, *et al.*, 2012).

No cérebro, os CB1Rs são encontrados nos terminais dos neurónios centrais e periféricos. A libertação de endocanabinóides, como a AEA e a 2-AG, dos locais pós-sinápticos para a fenda sináptica, ocorre por resposta ao aumento do cálcio intracelular. Estes atuam depois como neurotransmissores retrógrados a nível dos CB1Rs, para manter a homeostase e prevenir a atividade neuronal excessiva. São depois rapidamente removidos do espaço extracelular pelos transportadores dos endocanabinóides, geralmente referidos como transportadores de membrana das anandamidas (Atakan, 2012). Portanto, o mecanismo de inibição da libertação neurotransmissores retrógrados consiste primeiramente num estímulo seguido da despolarização da membrana pós-sináptica e consequente entrada de iões de cálcio no neurónio, e também na síntese de endocanabinóides AEA e 2-AG que é iniciada e estes são libertados na fenda sináptica (1); os endocanabinóides ligam-se ao recetor CB1 na membrana pré-sináptica (2) e há redução da libertação de neurotransmissores inibitórios (3); os endocanabinóides não ligados são capturados por proteínas transportadoras e degradados pela amida hidrolase de ácidos gordos (FAAH) (Figura 4) (Zubrzycki, *et al.*, 2014).

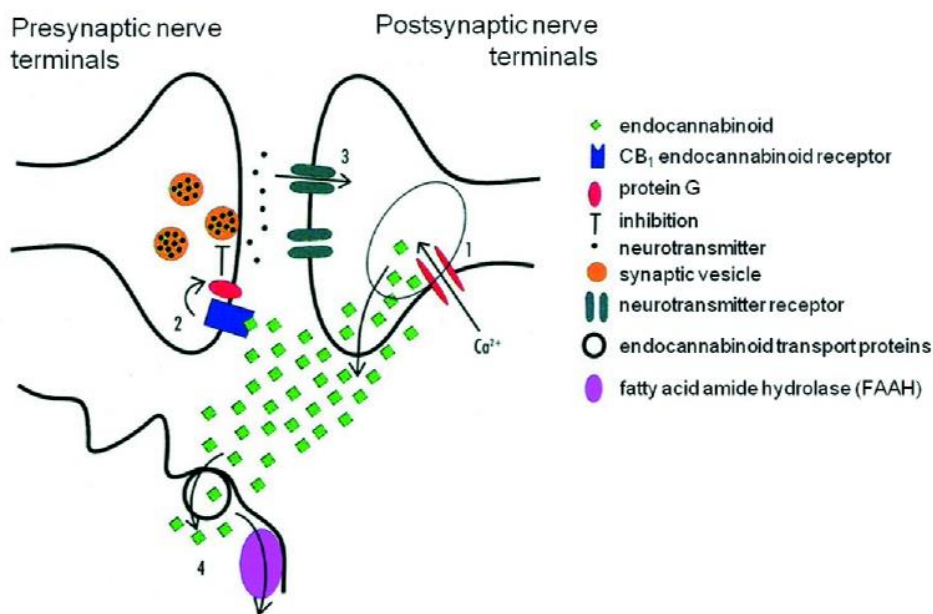


Figura 4 - Mecanismo de inibição da libertação de neurotransmissores retrógrados
(Zubrzycki, *et al.*, 2014)

Quando o Δ^9 -THC é introduzido no organismo vai ligar-se ao CB1R e vai ter uma ação menos seletiva na inibição da libertação de neurotransmissores normalmente modulados pelos endocanabinóides, como AEA e 2-AG (Figura 5). No entanto, as funcionalidades do C1BR continuam por clarificar devido às suas interações complexas com outros neurotransmissores

e sistemas, já que tanto os recetores C1B como os C2B fazem parte da superfamília de recetores acoplados à proteína G (GPCRs) (Atakan, 2012; Zubrzycki, *et al.*, 2014).

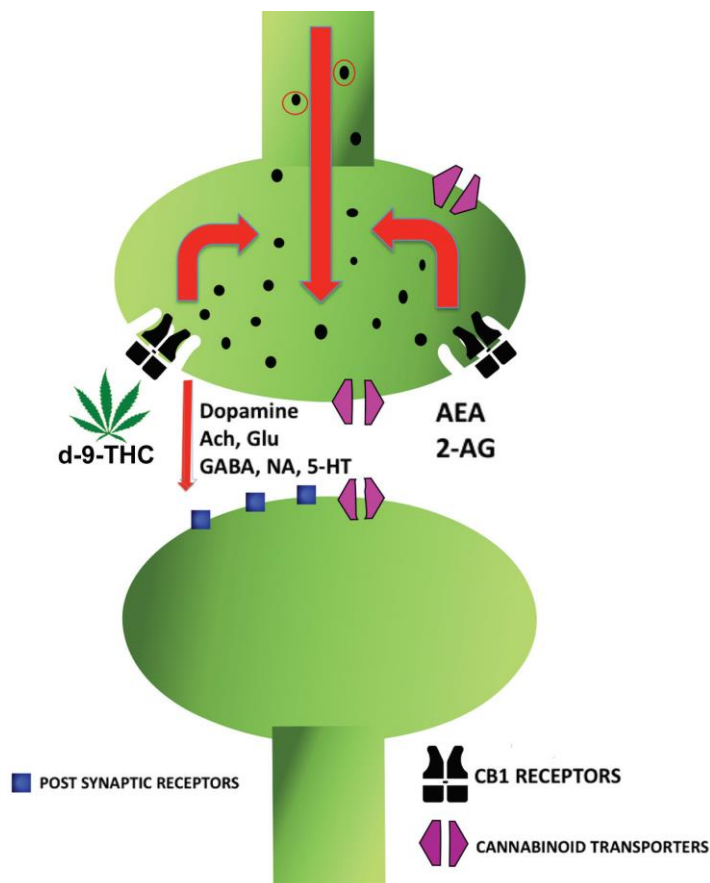


Figura 5 - Efeitos dos endocanabinóides e do Δ^9 -THC nos recetores CB1 (Atakan, 2012)

1.4. Toxicocinética

O Δ^9 -THC, um componente altamente lipofílico, distribui-se no tecido adiposo, fígado, pulmões e baço. Da sua hidroxilação, como já referido anteriormente, resulta o composto psicoativo 11-hidroxi- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (11-OH-THC) e mais tarde, por oxidação, o composto inativo 11-nor-9-carboxi- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC-COOH). Este último é o composto que maior interesse tem para propósitos diagnósticos, sendo excretado na urina maioritariamente como um conjugado do ácido glucurónico. O Δ^9 -THC é rapidamente absorvido a nível pulmonar após inalação e rapidamente atinge uma elevada concentração no sangue, aproximadamente 90% do THC do sangue circula no plasma e o resto nas hemácias (Sharma, *et al.*, 2012).

Aplicação de *dried blood spots* na detecção e quantificação de canabinóides por cromatografia de gases/espectrometria de massas em tandem

A via de administração de uma droga, bem como a sua fórmula, determinam a sua taxa de absorção, e a principal via de administração da canábida é a pulmonar (esta droga é maioritariamente fumada). Tal acontece porque esta via promove um método rápido e eficaz de distribuição dos pulmões para o cérebro, contribuindo para o seu elevado potencial de abuso. Após inalação, Δ^9 -THC é detetado no plasma em poucos segundos após a expiração, e o pico de concentração plasmática é observado entre 3-10 minutos depois, no entanto, a biodisponibilidade do Δ^9 -THC varia de acordo com a profundidade de inalação, a duração da expiração e o tempo que se sustém a respiração (Huestis, 2007; Sharma, *et al.*, 2012).

Considerando que aproximadamente 30% do THC são degradados por pirólise, pressupõe-se que a sua biodisponibilidade seja de ± 23 -27% para utilizadores comuns e de ± 10 -14% para utilizadores ocasionais. A concentração plasmática máxima do Δ^9 -THC é observada aproximadamente 8 minutos após o seu consumo por via pulmonar, enquanto que para o 11-OH-THC e para o THC-COOH, este pico é atingido aos 15 e aos 81 minutos respetivamente (Sharma, *et al.*, 2012).

Uma das desvantagens do consumo de canabinóides por via pulmonar recai sobre os efeitos prejudiciais do fumo, como tal, fumar não é geralmente recomendado em aplicações terapêuticas. Desta forma, a via oral é também comum quando se trata do consumo desta droga e, em adição, o seu uso abusivo é também recorrente. Em comparação com a via de administração pulmonar, a absorção sistémica é relativamente lenta após ingestão oral, resultando numa concentração plasmática máxima do Δ^9 -THC num espaço de 1-2 horas que, em certos casos, pode ser atrasada por mais algumas horas (estão descritos casos em que se observou mais que um pico plasmático). Pensa-se que a redução da biodisponibilidade oral do Δ^9 -THC de 4-12% possa estar relacionada com o metabolismo hepático elevado. No entanto, uma concentração bastante mais alta de 11-OH-THC é produzida após ingestão, comparativamente com a que se encontra quando a canábida é consumida por inalação. Outras vias de absorção desta droga, para além das acima mencionadas, incluem as vias sublingual, retal, transcutânea e intravenosa (Huestis, 2007; Sharma, *et al.*, 2012).

Após ser absorvido, o Δ^9 -THC penetra rapidamente nos tecidos gordos e altamente vascularizados, incluindo cérebro e músculos, resultando numa rápida diminuição da sua concentração plasmática. Esta distribuição a nível tecidual é seguida por uma lenta redistribuição do Δ^9 -THC dos depósitos de gordura novamente para a corrente sanguínea. É de notar que os níveis deste composto se mantêm no organismo por um longo período de tempo, após o seu consumo. De facto, o tempo de meia vida do Δ^9 -THC para utilizadores não frequentes é geralmente de 1,3 dias, enquanto é de 5-13 dias para utilizadores frequentes. Relativamente aos níveis de THC-COOH, fumando 16-34 mg de Δ^9 -THC, este pode ser detetado no plasma durante 2-7 dias, outros estudos demonstraram que, partindo de uma concentração inicial de 14-49 ng/mL, o THC-COOH podia ser detetado no soro num espaço de 3,5 a 74,3 horas (Huestis, 2007; Sharma, *et al.*, 2012).

O Δ^9 -THC é metabolizado no fígado por hidroxilação e oxidação microssomal, catalisadas por enzimas do complexo citocromo P450 (CYP) (Sharma, *et al.*, 2012). A fase I do metabolismo hepático da canábis envolve reações de oxidação do THC incluindo hidroxilação alifática e alílica, oxidação de álcoois a cetonas e ácidos, β -oxidação, e degradação da cadeia lateral pentil. Já na fase II a conjugação com o ácido glucurónico é comum. Ou seja, a hidroxilação do THC no C(9) pela enzima hepática CYP 450, leva à produção do metabolito 11-OH-THC. As CYP 2C9, 2C19 e 3A4 estão envolvidas na oxidação do THC. Como já referido anteriormente, a oxidação do composto psicoativo, 11-OH-THC, produz então o metabolito inativo THC-COOH, sendo este último, juntamente com o seu conjugado com o ácido glucurónico, os principais produtos finais da metabolização do THC. A concentração de THC-COOH aumenta gradualmente, e 30-45 minutos após consumo por via pulmonar é maior que a concentração de THC no organismo. A fase II do metabolismo do THC-COOH envolve a adição de ácido glucurónico e, menos comumente, de sulfato, glutatião, aminoácidos e ácidos gordos, por via do grupo 11-COOH. A adição de um grupo glucuronido aumenta a solubilidade aquosa facilitando a excreção, mas a filtração renal destes metabolitos polares é baixa devido à sua elevada ligação às proteínas. Não foram descritas diferenças metabólicas significativas entre homens e mulheres. Após a fase de distribuição inicial, o passo limitante no metabolismo do THC é a sua redistribuição dos depósitos lipídicos para o sangue (Huestis, 2007).

Cerca de 80-90% do THC é excretado num prazo de 5 dias, maioritariamente sob a forma de metabolitos hidroxilados e carboxilados. Mais de 65% é excretado nas fezes e os restantes são excretados por via urinária. Numerosos metabolitos acídicos são encontrados na urina e, como mencionado anteriormente, grande parte encontra-se conjugada com o ácido glucurónico, aumentando assim a sua solubilidade aquosa. De entre os principais metabolitos, o THCCOOH é o conjugado do ácido glucurónico primário na urina, enquanto o 11-OH-THC é a forma predominante encontrada nas fezes. Uma vez que, o Δ^9 -THC é extremamente solúvel em lípidos, vai ser reabsorvido nos túbulos, levando a uma reduzida excreção renal do composto não modificado. A lenta libertação do THC de locais de armazenamento lipídicos e a circulação entero-hepática significativa contribuem para um longo tempo de meia-vida do THC no plasma sanguíneo (Huestis, 2007; Sharma, *et al.*, 2012).

1.5. Efeitos do consumo

A canábis é tipicamente fumada quase como se fosse tabaco, no entanto, pode também ser consumida oralmente em diversos alimentos, chás ou cápsulas, sendo estas últimas mais específicas para a denominada canábis medicinal. As maneiras mais comuns de tratamento da canábis para consumo envolvem, para os cigarros, o corte e secagem da planta *C. sativa*, e para o haxixe, a extração de um exsudado obtido da parte superior e inferior das

folhas da planta. A *sensimilla* é nada mais nada menos que uma planta fêmea que cresceu sem sementes, produzindo uma flor com elevado teor de THC (Greydanus, *et al.*, 2013).

A canábis é considerada uma droga popular, facilmente obtida em todo o mundo. São inúmeros os movimentos realizados com o objetivo de promover a sua legalização, com base nas diversas pesquisas que promovem os seus benefícios medicinais, associados à falsa impressão de que é uma droga segura. E apesar de evidências indicarem que o seu uso está relacionado com inúmeras consequências neurobiológicas, psicossociais e para a saúde, é uma droga muito usada pelos jovens (Greydanus, *et al.*, 2013; Karila, *et al.*, 2014).

A concentração do Δ^9 -THC depende da forma em que a canábis se encontra, e é proporcional à sua toxicidade no organismo (Karila, *et al.*, 2014). Os seus efeitos comportamentais mais comuns incluem sentimentos de euforia, vontade de rir ou falar continuamente, apatia, intensificação de experiências sensoriais comuns, relaxamento, alteração da percepção temporal, diminuição da concentração, comprometimento da aprendizagem, ligeira perda da coordenação motora e aumento do tempo de reação. Em certos casos foram também descritas alterações na memória e disposição, como pânico e paranóia. Os efeitos psicológicos incluem maioritariamente mudança repentina do batimento cardíaco, que em poucos minutos pode aumentar entre 20-50%, e da pressão arterial diastólica, derrames conjuntivais, boca e garganta seca, aumento do apetite, vasodilatação e diminuição da frequência respiratória (Clark, *et al.*, 2011; Sharma, *et al.*, 2012; Karila, *et al.*, 2014).

Um das primeiras dificuldades associadas ao consumo da canábis é a determinação absoluta da dosagem ingerida, uma vez que, a concentração de THC varia dependendo da planta em si e da maneira como o seu crescimento se processa. Nos Estados Unidos e na Europa estimava-se que a concentração de THC presente na canábis rondasse de 1% a 4%, no entanto, atualmente estima-se que esse valor esteja perto dos 7%. Os canabinóides aparentam ter o mesmo efeito que o álcool, a cocaína e os opióides a nível do sistema de recompensa. Vários estudos apresentam atualmente evidências associadas ao uso contínuo da canábis, referindo que 1 em 9 pessoas que consomem esta droga regularmente desenvolvem dependência (Clark, *et al.*, 2011; Sharma, *et al.*, 2012).

Os efeitos associados à dependência desta droga incluem inquietação, insónia, ansiedade, agressão, anorexia, tremores musculares e efeitos autonómicos (Cook, *et al.*, 2015). Em elevadas doses, a canábis pode causar psicose tóxica em pessoas que não apresentam nenhum distúrbio mental, desenvolvendo sintomas a curto prazo como despersonalização, desrealização, sonhos vivos, desorientação, delírios, alucinações, paranóia, agitação psicomotora, pânico irracional e instabilidade emocional (Karila, *et al.*, 2014). É então provável que a exposição a esta droga, associada à interação com outros fatores conhecidos e desconhecidos (genéticos e ambientais), seja um fator contributivo para o desenvolvimento de doenças do foro psicológico (Sharma, *et al.*, 2012).

Outro assunto abordado no âmbito do consumo da canábis e relativamente ao seu efeito no organismo é a associação com a condução rodoviária, no entanto, pouco haverá a dizer uma vez que, como foi referido anteriormente, esta droga prejudica o desempenho cognitivo de quem a consome, bem como as aptidões necessárias para que seja realizada uma condução segura (Karila, *et al.*, 2014; Greydanus, *et al.*, 2013).

Mais de 50% dos utilizadores recorrentes aparentam apresentar um certo descontrolo relativamente ao uso da canábis e, sintomas como irritabilidade, ansiedade, desejo e perturbação do sono, foram descritos em 61-96% de consumidores durante o período de abstinência (Sharma, *et al.*, 2012).

A interação da canábis com outras drogas de abuso não foi ainda estudada detalhadamente, apesar de ser relativamente frequente. Esta é geralmente consumida combinada com álcool, aumentando os seus efeitos sedativos, acontecendo o mesmo quando associada a benzodiazepinas; pelo contrário, pode também ser misturada com outras drogas que amplificam o seu efeito eufórico, como é o caso da nicotina, cocaína, opióides e outros alucinogénios como a dietilamida do ácido lisérgico (LSD), onde foi demonstrado não apresentar tolerância cruzada com o Δ^9 -THC. Pode também ser misturada com a fenciclidina (PCP), mergulhando um cigarro contendo canábis nesta droga previamente dissolvida num solvente orgânico (formaldeído), e após secagem é então fumado. Mais comum ainda é o consumo de canábis e tabaco; de facto, diversos estudos apontam um diverso número de razões para que esta situação aconteça, como fatores genéticos partilhados, o facto de ambos envolverem o ato de fumar propriamente dito e os sintomas de abstinência que em ambos se observam (Sharma, *et al.*, 2012; Greydanus, *et al.*, 2013).

Outro fator a considerar relativamente à canábis é a exposição indireta por parte dos fumadores passivos. Deve ter-se em conta que de aproximadamente 50% do Δ^9 -THC não é degradado pelo processo de pirólise durante o seu consumo, dessa percentagem uma porção maioritária (16-53%) afeta o fumador, enquanto que a restante (6-53%) é libertada para o ar sob a forma de vapor. Portanto um indivíduo que se encontre perto de um fumador vai estar sujeito à inalação de Δ^9 -THC involuntariamente, apesar de a quantidade absorvida por este estar dependente de diversas condições externas, como o ambiente, a duração da exposição, a quantidade de Δ^9 -THC e o número de cigarros fumados (Sharma, *et al.*, 2012).

Ainda relativamente à exposição indireta, foi realizado um interessante estudo no Paquistão, onde os metabolitos maioritários da canábis foram encontrados no leite de vacas que pastavam em zonas onde a canábis crescia naturalmente no meio da vegetação. Consequentemente, as crianças que foram alimentadas com esse leite apresentaram também metabolitos na urina, sugerindo um consumo passivo através deste alimento (Sharma, *et al.*, 2012).

O Δ^9 -THC é eliminado no leite materno, portanto, uma criança que esteja a ser amamentada poderá ingerir cerca de 0,8%, dependendo da quantidade ingerida pela mãe.

Outro ponto que deve ser considerado é o efeito que a canábis exerce sobre a quantidade e a qualidade do leite materno, podendo impedir a lactação por inibição da produção da prolactina, que tem ação direta na glândula mamária. Inúmeros dados clínicos e farmacocinéticos indicam que o uso da canábis é desaconselhado durante a amamentação por ser perigoso para a criança. O Δ^9 -THC acumula-se no leite materno e vai ser excretado na urina dos recém-nascidos durante as suas primeiras 2-3 semanas. Portanto, se as mães consumirem canábis, os filhos que estão a ser amamentados podem apresentar efeitos psicológicos como sedação ou redução do tónus muscular, entre outros efeitos adversos (Garry, *et al.*, 2009; Sharma, *et al.*, 2012).

1.6. O uso da canábis para fins medicinais

As conclusões sobre os efeitos benignos ou malignos do uso da canábis influenciam as políticas de cada país em matéria da sua legalização ou criminalização, sendo esta afetada também pelo uso de produtos da canábis para fins medicinais, uma vez que diversos benefícios têm sido associados ao consumo desta droga (Tabela 2).

Tabela 2 - Potenciais usos benéficos da canábis (Greydanus, *et al.*, 2013)

Benefícios	
Inflamação	Anorexia (HIV)
Dor (crónica e neuropática)	Doença de Huntington
Diarreia (Doença de Crohn)	Inflamações Intestinais
Distonia	Aterosclerose
Esclerose Múltipla	Redução do Enfarte Cerebral
Artrite Reumatoide	Stress Pós-traumático
Glaucoma	Lesões na Reperusão Cardíaca
Vômito (quimioterapia)	Carcinoma Prostático
Epilepsia	

O interesse que envolve as propriedades aditivas e psicomiméticas do THC tem um papel ativo no estudo dos seus potenciais benefícios na área medicinal. Outro fator que despoletou as investigações relacionadas com o uso desta planta foi também a compreensão crescente do sistema de sinalização dos endocanabinóides, que recentemente tem sido estudado como tratamento para certas doenças neuropsiquiátricas. Um outro ponto de

interesse é a possível aplicação dos canabinóides (fitocannabinóides) na melhoria de dores neuropáticas, na hipertensão, e em neuroproteção pós acidente vascular cerebral (AVC), esclerose múltipla, epilepsia, cancro, entre outras. Relativamente às doenças oncológicas, diversos estudos identificaram que os canabinóides podem inibir a sua proliferação, a angiogénese e o processo de metástase. Produtos contendo uma ação anti-inflamatória muito semelhante à dos canabinóides mostraram ser úteis na cura de feridas precisamente pelos efeitos que possuem, estando em estudo o uso de CBD como uma nova classe de anti-inflamatórios para doenças intestinais (Greydanus, *et al.*, 2013).

Um número considerável de produtos à base da canábida é fabricado por companhias farmacêuticas, como é o caso do *Sativex*[®] (THC+CBD), *Marinol*[®] (dronabinol; THC) e *Cesamet*[®] (THC), sendo os dois últimos aprovados para uso em casos de anorexia-caquexia, bem como para náuseas e vômitos. O dronabinol está indicado para o tratamento de glaucomas, por diminuir a pressão intraocular ou aliviar o vômito induzido pela quimioterapia (Greydanus, *et al.*, 2013).

Apesar dos consumidores da canábida apresentarem uma diminuição da ansiedade, precisam de ser feitos estudos mais específicos para se identificar concretamente qual dos canabinóides poderá ser mais seguro do ponto de vista terapêutico, atribuindo-se, no entanto, possíveis aplicações para distúrbios de ansiedade social, *stress* pós-traumático, pânico e desordens obsessivo-compulsivas (Greydanus, *et al.*, 2013).

Diversos estudos sugerem também que os fitocannabinóides, CBD, poderão ter um efeito benéfico considerável no bloqueio de memórias negativas ou medos associados a *stress* pós-traumático, por um processo denominado bloqueio da reconsolidação (Stern, *et al.*, 2012). Outros compararam as taxas de mortalidade entre adultos com esquizofrenia e outros distúrbios do foro psicológico, e concluíram que esta era menor entre aqueles que consumiam canábida (Kolliakou, *et al.*, 2012). Já as investigações que envolvem comparações entre os diferentes modos de consumo desta droga, por via pulmonar, oral ou vaporização, com objetivo de avaliar qual a melhor opção para a saúde, ainda permanecem em estudo (Grant, *et al.*, 2012). Foi também observado que, em doentes com esclerose múltipla, a canábida reduz significativamente a espasticidade e a frequência de espasmos, melhorando a qualidade do sono, quando comparada com o uso de placebos (Grotenhermen, *et al.*, 2012; Cook, *et al.*, 2015).

Um interesse particular no uso da canábida para fins medicinais, recai sobre o desenvolvimento de recetores CB1 e CB2 que atuem fora da barreira hematoencefálica. O objetivo de tal modificação nestes recetores baseia-se no conhecimento de que os efeitos indesejados desta droga são causados pela ativação de CB1Rs localizados no interior do cérebro, já os efeitos benéficos, como o alívio da dor, ocorrem fora do sistema nervoso central. O interesse nos recetores CB2 incide sobretudo na sua ligação a certos tipos de cancro e anomalias cardiovasculares, inflamatórias e imunológicas. Apesar da eficiência

comprovada do uso da canábis nomeadamente na sua aplicação para náuseas e vômitos, esta não demonstrou ser mais eficaz que qualquer outro medicamento seguro (Cook, *et al.*, 2015). Por outro lado, os efeitos negativos do consumo desta droga não parecem ser aceites por muitos autores, no entanto a maioria afirma que existem riscos significativos dependendo da dose ingerida. Associado ao consumo crónico da canábis podemos destacar como efeitos colaterais o aumento de peso causado pela fome incontável e reduzida atividade física, a supressão do movimento REM e diminuição da atividade eletroencefalográfica (EEG), e o fumo pode causar irritação da conjuntiva, da nasofaringe e dos brônquios, levando a tosse crónica, olhos vermelhos, sinusite, faringite e bronquite. Identificar estes efeitos adversos da canábis nem sempre é simples pois estudar uma droga ilícita pode ser problemático, tal como é complicado separar os seus efeitos de outras drogas que usualmente são consumidas simultaneamente com a canábis, maioritariamente o tabaco e o álcool (Greydanus, *et al.*, 2013).

1.7. Canabinóides sintéticos

Um número considerável de drogas sintéticas começou a estar disponível no século XXI, e evidentemente também a canábis foi envolvida nesta tendência (Figura 6). Estes canabinóides sintéticos são muito similares ao THC encontrado na planta *C. sativa* e produzem efeitos similares aos do consumo da canábis propriamente dita, uma vez que, estes se ligam aos mesmos recetores dos endocanabinóides cerebrais e órgãos periféricos (Fattore, *et al.*, 2011). Estas misturas à base de ervas começaram a ser observadas desde 2008 em diversos produtos vendidos pela internet e outros pontos de venda mais focados na venda de material para consumo da canábis e outras drogas. As designações e as marcas incluem nomes mais exóticos como *Aroma*, *Yucatan Fire*, *Spice Gold*, entre outras. Apesar de estarem disponíveis, serem consideradas legais em alguns países e serem anunciadas como seguras (por não se assemelharem à estrutura do THC), são potencialmente perigosas podendo ser até 10 vezes mais potentes que o Δ^9 -THC (Funada, 2010). Numa tentativa de evitar colocar à venda um produto identificado especificamente como ilegal, os comerciantes mudam os canabinóides sintéticos segundo a legislação que vai surgindo, portanto assim que um canabinóide sintético é banido, outros diferentes são produzidos para ocupar o seu lugar, podendo até ser designados como incenso, produto ervanário ou até mesmo como ambientadores, mas o seu potencial e reações adversas mantém-se. Parte da sua potencial perigosidade recai sobre o facto de conterem muitos químicos adicionados e muitas vezes desconhecidos que fazem parte do seu processo de fabrico. Contudo, alguns dos produtos encontrados na internet não têm impurezas em quantidades significativas e os efeitos adversos estão relacionados com os próprios canabinóides sintéticos (Greydanus, *et al.*, 2013).

Aplicação de *dried blood spots* na detecção e quantificação de canabinóides por cromatografia de gases/espectrometria de massas em tandem

Os canabinóides sintéticos representam o maior grupo de substâncias atualmente monitorizadas na Europa pela European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). Pouco se sabe acerca do comportamento destas substâncias e os seus efeitos tóxicos para o homem, no entanto o seu uso está associado a diversas intoxicações graves e mortes. Pensa-se que os canabinóides sintéticos, para além da sua elevada potência, possam ter também longos tempos de semi-vida que prolongam o seu efeito psicoativo. Em adição algumas destas substâncias aparentam ter efeitos noutras funções fisiológicas, para além dos apresentados pelos recetores dos canabinóides (EMCDDA, 2016).

Os diferentes canabinóides sintéticos são na sua maioria fabricados na China, em pós separados, e só depois enviados para a Europa onde são posteriormente misturados entre si, usando solventes como a acetona ou o metanol, e misturados com a planta, e o produto resultante é seco, embalado e vendido (EMCDDA, 2016).

Existem diferenças significativas na prevalência do uso de canabinóides sintéticos entre a Europa e os Estados Unidos. Nos Estados Unidos sugere-se que o uso destas substâncias pode estar em declínio pois segundo inquéritos, que avaliavam o seu consumo nos últimos 12 meses, efetuados a estudantes com 17 e 18 anos, a sua prevalência foi de 11,3% em 2012, 7,9% em 2013 e 5,8% em 2014. Relativamente à Europa, inquéritos realizados no Reino Unido a habitantes com idades compreendidas entre os 16-64 anos, apenas se obtiveram prevalências de 0,2% em 2010/2011 e de 0,1% em 2011/2012. Em Espanha, dos 27503 estudantes inqueridos com idades compreendidas entre os 14-18, 1,4% já tinha experimentado estas substâncias, 1,0% tinha consumido nos últimos 12 meses e 0,6% no último mês, em 2013 para um estudo mais geral que englobava habitantes entre os 15-64 anos a prevalência foi de 0,5%, 0,1% e 0% respetivamente. Em Alemanha, após um levantamento de todos os inquéritos que avaliavam o consumo de canabinóides sintéticos em estudantes entre os 15-18 anos demonstrou que as prevalências anuais entre 2009 a 2014 foram respetivamente 7%, 9%, 7%, 7%, 5% e 6% (EMCDDA, 2016).

Os efeitos adversos associados aos canabinóides sintéticos dependem das suas propriedades intrínsecas, da forma como são metabolizados e dos produtos que resultam da sua degradação. Estes riscos podem ainda ser potencializados se durante o fabrico destas substâncias a distribuição for desigual, podendo resultar em produtos altamente concentrados em canabinóides e outros onde a quantidade é mais reduzida. Os sintomas mais frequentemente descritos em intoxicações por canabinóides sintéticos são agitação, náuseas e batimento cardíaco excessivamente acelerado, os menos comuns e mais acentuados incluem AVC, ataque cardíaco, degradação do tecido muscular, danos renais e vômitos graves ou prologados (EMCDDA, 2016).

Aplicação de *dried blood spots* na detecção e quantificação de canabinóides por cromatografia de gases/espectrometria de massas em tandem

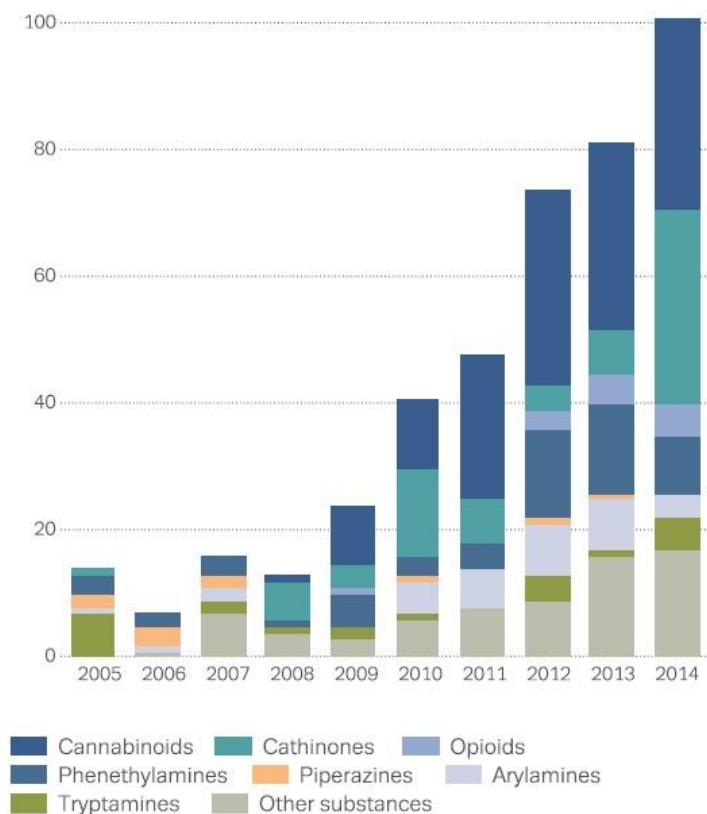


Figura 6 - Novas substâncias sintéticas encontradas no mercado (Mounteney, *et al.*, 2015).

1.8. Percentagem de consumo

A avaliação da prevalência da canábis e a análise da sua taxa de consumo pode ser determinada de diversas formas, através de inquéritos distribuídos pela população, da análise das águas residuais (esgotos) e da venda de papel utilizado para fazer os cigarros. São muitos os estudos que apontam a canábis como a droga ilícita mais consumida no mundo e constitui aproximadamente três-quartos da utilização de drogas ilegais nos Estados Unidos. A nível da Europa, estudos realizados em 35 países apontam que o consumo desta droga varia entre 3% e 45%, com uma média de 19% (Greydanus, *et al.*, 2013) (Figura 7).

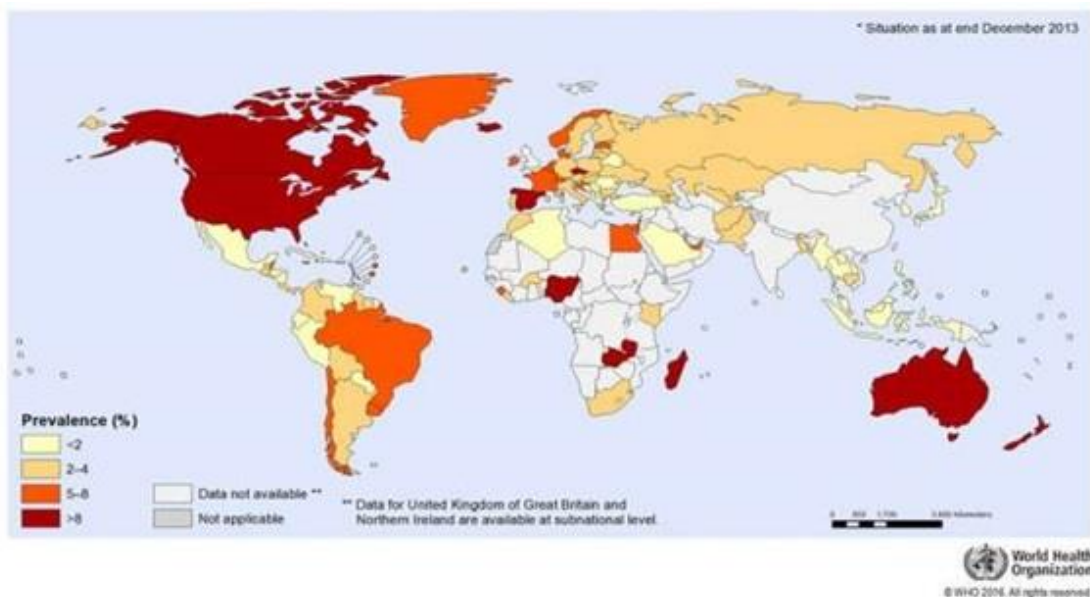


Figura 7 - Prevalência do uso da cannabis a nível mundial dos 15-64 anos (WHO, 2013)

Em Portugal, a promoção da redução do consumo de substâncias psicoativas, a prevenção dos comportamentos aditivos e a diminuição das dependências são levadas a cabo pelo Serviço de Intervenção nos Comportamentos Aditivos e nas Dependências (SICAD). Este tem responsabilidade direta na implementação e coordenação de intervenções que visem a redução da procura de drogas, e na recolha, análise e divulgação de informações sobre o uso destas drogas. O primeiro inquérito geral à população sobre o uso de drogas foi realizado em 2001, numa amostra de 15000 Portugueses, o segundo em 2007 com a participação de 12202 pessoas e o terceiro em 2012 que contou com uma amostra de 5355 habitantes, todos com idades compreendidas entre os 15-64 anos. Embora a cannabis permaneça a substância ilícita usada mais frequentemente, seguida do ecstasy e da cocaína, o último estudo realizado indica que o uso desta substância pode estar em declínio comparativamente ao ano de 2007. Em 2012 cerca de 9,4% das pessoas dos 15-64 anos já tinham experimentado cannabis, 2,7% tinham consumido esta droga nos últimos 12 meses e 1,7% no mês anterior, enquanto em 2007 estes valores tinham sido de 11,7%, 3,6% e 2,4% respetivamente. Todos os estudos confirmaram que os indivíduos do sexo masculino consomem substâncias ilícitas de forma mais frequente que as mulheres, no entanto algumas indicações mostram que as mulheres apresentam uma maior taxa de continuidade para a cannabis do que os homens (EMCDDA, 2016).

Para além destes inquéritos, foram feitos outros estudos especificamente para jovens de 15 e 16 anos. Assim em 2011, 16% já tinham experimentado cannabis (13% em 2007, 15% em 2003; 8% em 1999), 16% tinham consumido esta droga nos últimos 12 meses (10% em 2007; 13% em 2003; 9% em 1999) e 9% no mês anterior (6% em 2007; 8% em 2003; 5% em 1999). Com base nos dados populacionais gerais recolhidos em 2012, foi estimado que aproximadamente 0,5% dos indivíduos entre 15-64 anos consomem cannabis diariamente ou quase diariamente, e

as escalas de dependência grave, incluídas nestes inquéritos, sugerem que cerca de 0,7% podem ser considerados consumidores de alto risco. Portugal continua a ser um ponto importante no tráfico internacional de drogas, chegando a maioria das substâncias ilícitas por rotas marítimas, enquanto as terrestres e aéreas são menos usadas. A maioria das drogas apreendidas em Portugal são destinadas ao mercado local e a canábis que é exportada vem preferencialmente da Espanha e de Marrocos (EMCDDA, 2016).

1.9. Detecção de canabinóides em fluídos biológicos

Comparativamente a outras drogas de abuso, a análise de canabinóides pode apresentar uma certa dificuldade, pois como referido anteriormente estes compostos são altamente lipofílicos e por isso não se encontram em concentrações elevadas nos fluídos corporais; no entanto, a sua deteção é necessária para estudos farmacocinéticos, tratamentos, análise de drogas em locais de trabalho e investigações em acidentes de viação e laborais. A deteção de canabinóides pode então ser feita em amostras de fluido oral (Andås, *et al.*, 2014), sangue e derivados (Schwope, *et al.*, 2011), urina (Lowe, *et al.*, 2009), cabelo (Taylor, *et al.*, 2016) e unhas (Kim, *et al.*, 2008), e são necessários procedimentos de extração com diversos passos para separar estes compostos de proteínas e lípidos endógenos. Também é necessário ter cuidado para se evitarem baixas recuperações devido à sua elevada afinidade para os recipientes de vidro e plástico (Kneisel, *et al.*, 2013). A urina é a amostra de preferência pelas altas concentrações e pela maior janela de deteção dos metabolitos e pela facilidade de recolha (Sharma, *et al.*, 2012). No entanto, são as amostras de sangue as que fornecem mais informação, devido à possível correlação entre as concentrações detetadas e os sinais observados no indivíduo (Wong, *et al.*, 2005).

As técnicas analíticas mais usadas para analisar canabinóides incluem imunoensaios (EMIT[®], ELISA, fluorescência polarizada e radioimunoensaios) (Lin, *et al.*, 2013; Spinelli, *et al.*, 2015; Fraser, *et al.*, 2002; Huestis, *et al.*, 2004) e técnicas cromatográficas como cromatografia em camada fina (TLC) (Galand, *et al.*, 2004), cromatografia em camada fina de alta pressão (HPTLC) (Sharma, *et al.*, 2010), cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa quadrupolo simples ou em tandem (Choi, *et al.*, 2009; Chiarotti, *et al.*, 2000) e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa quadrupolo simples ou em tandem (Concheiro, *et al.*, 2016; Mercolini, *et al.*, 2013). Para além da dificuldade em controlar a concentração exata consumida, a sensibilidade e especificidade de cada ensaio, a via de administração, a quantidade de canabinóides absorvidos, a taxa de gordura, o metabolismo e a excreção corporais, o grau de diluição e o tempo de colheita da amostra, também vão influenciar a detetabilidade do Δ^9 -THC e dos seus metabolitos (Sharma, *et al.*, 2012).

Atualmente, o valor recomendado pela *Substance Abuse and Mental Health Services Administration* (SAMHSA) para a concentração máxima de canabinóides em urina é de 50 ng/mL para utilizadores comuns ou consumidores recentes; concentrações abaixo deste valor podem ser associadas a uso ocasional, exposição indireta ou ex-consumidores que ainda possuem quantidades residuais no organismo. Neste último caso é onde reside a maior dificuldade para determinar se um resultado positivo representa um novo episódio de uso da droga ou se o indivíduo continua a excretar canabinóides acumulados, uma vez que esta droga tem um longo tempo de meia-vida nos seres humanos (Sharma, *et al.*, 2012; Huestis, 2007).

1.10. Dried Blood Spots

Já passou mais de um século desde que o novo método de recolha de sangue baseado no uso de uma matriz seca, foi descrito pela primeira vez por Ivar Bang (Bang, 1913), desde então o interesse na tecnologia das manchas de sangue seco, do inglês *Dried Blood Spots* (DBS), tem-se expandido continuamente.

Em 1963, Robert Guthrie usou esta técnica para desenvolver o rastreio neonatal sistemático para uma doença metabólica, a fenilcetonúria (Guthrie, *et al.*, 1963). Embora os DBS sejam quase exclusivos deste tipo de análise, muitos estudos apontam o seu potencial de aplicação em biologia e química clínica e análise de pequenas moléculas e lípidos (Lehmann, *et al.*, 2013).

A limitação mais evidente encontrada no seu manuseamento recai sobretudo no volume de amostra ser relativamente pequeno, o que acaba por ser também uma vantagem, mas faz com que sejam necessários métodos mais sensíveis para o seu estudo, sendo este requisito atenuado pelos avanços tecnológicos da microfluídica, dos sistemas de deteção genómicos/imunológicos *multiplex* e da espectrometria de massa (Lehmann, *et al.*, 2013). O tampão de eluição usado para extração dos analitos dos cartões que contêm as DBS tem impacto na eficiência da extração, e deve ser avaliado tendo em conta o analito que se pretende estudar, e o tempo que as manchas devem estar em contacto com o mesmo (Wagner, *et al.*, 2014). Existem vários tampões descritos na literatura que podem ser utilizados dependendo do que se pretenda analisar, os mais comuns são os salino/fosfato, geralmente combinados com detergentes, transportadores de proteínas e quelantes, como o ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), e os solventes orgânicos, como metanol, acetonitrilo e etanol (Lehmann, *et al.*, 2013).

De entre as diversas vantagens de usar as DBS destacam-se a quantidade mínima de sangue necessária para análise (Figura 8), o facto de permitir o teste de vários analitos (ácidos nucleicos, proteínas, lípidos ou pequenas moléculas orgânicas e não orgânicas) e, comparativamente com os testes sanguíneos convencionais, estes oferecerem melhorias

práticas, clínicas e financeiras (Parker, *et al.*, 1999; Lehmann, *et al.*, 2013). Ou seja, primeiramente, a recolha de sangue para os cartões é simples de executar e relativamente indolor, pode mesmo ser feita em casa pelo próprio doente sem serem necessárias estruturas especializadas, como laboratórios, é também menos invasiva uma vez que não é necessária venopuntura, sendo mais cómoda para doentes que precisem de efetuar diversos testes, que tenham algum tipo de alteração ou dano nas veias ou mesmo para crianças, pois diminui a quantidade de sangue que precisa de ser retirado (Lehmann, *et al.*, 2013). Uma outra vantagem comprovada do uso dos DBS é o facto de que a secagem das manchas danifica a cápside dos vírus (HIV, Citomegalovírus (CMV), Linfotrófico das células T humanas (HTLV) e Hepatite C), reduzindo assim a possibilidade de qualquer risco de contaminação accidental por quem manuseia estas manchas (Parker, *et al.*, 1999; Lehmann, *et al.*, 2013). Facilita também o transporte de amostras por correio caso seja necessário, possibilitando assim a análise de comunidades mais isoladas ou que se situem mais longe dos laboratórios, contribuindo também, do ponto de vista económico, para uma redução nos custos uma vez que não é necessária uma equipa ou transporte especializado (Judd, *et al.*, 2003). Pelas dimensões reduzidas dos cartões, estes têm também uma capacidade de armazenamento mais simples não ocupando muito espaço quer em laboratórios, quer em bancos biológicos, claro que se deve ter em conta que as manchas nunca devem ficar em contacto direto entre si pelo risco de contaminação das amostras (McDade, *et al.*, 2007; Mei, *et al.*, 2001). Estudos de estabilidade dos DBS demonstraram também que estes podem ser estáveis à temperatura ambiente por um período de aproximadamente 7 dias (Garcia, *et al.*, 2008).

Relativamente às desvantagens, as mais importantes serão talvez na natureza da amostra biológica em si, pois o sangue é analisado como um todo, ou seja, não há distinção entre o plasma e o soro. Como o sangue é hemolisado na sua totalidade, pode haver interferências causadas pela hemoglobina ou pela libertação do conteúdo intracelular. No processo de secagem as células sanguíneas são alteradas, pode ocorrer desnaturação das proteínas e alteração da atividade enzimática e algumas células que permaneçam na amostra podem alterar a composição global de proteínas e consequentemente modificar a concentração de certos analitos (Lehmann, *et al.*, 2013; Wagner, *et al.*, 2014).

Aplicação de *dried blood spots* na detecção e quantificação de canabinóides por cromatografia de gases/espectrometria de massas em tandem

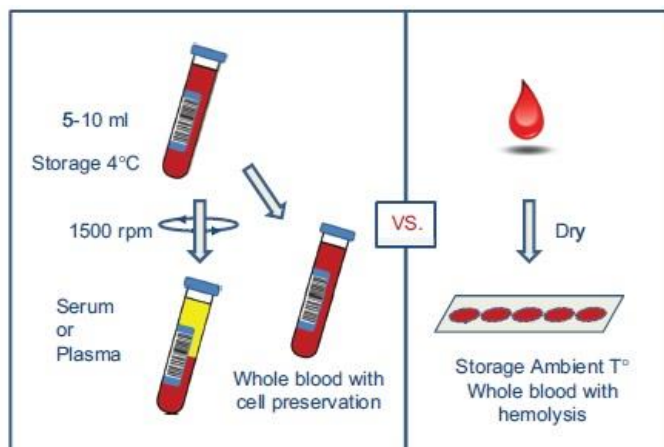


Figura 8 - Comparação da recolha clássica de amostras de sangue com o uso de DBS (Lehmann, et al., 2013)

De todas as técnicas analíticas referidas anteriormente para análise de canabinóides, uma das mais usadas para as DBS é a espectrometria de massa (MS). A sua primeira aplicação remonta ao trabalho de Mee, Korth e Halpern (1977), onde usaram ionização química (CI) para quantificar ácidos gordos livres (Mee, et al., 1977). Quase dez anos depois, Nishio demonstrou o potencial clínico da MS acoplada à cromatografia gasosa (GC), para diagnosticar a adrenoleucodistrofia a partir de DBS (Nishio, et al., 1986). Nos anos 80, a GC-MS era geralmente considerada como a técnica de escolha para a análise de compostos pequenos e voláteis em química clínica, maioritariamente para diagnosticar doenças metabólicas, uma vez que a GC fornecia o poder de separação e a MS a sensibilidade, seletividade e informação estrutural. Mais tarde, a espectrometria de massa em tandem (MS/MS), acabou por impulsionar os maiores avanços significativos no diagnóstico clínico, ou seja, numa única análise era possível monitorizar vários biomarcadores mais rapidamente. Nos últimos 5 anos também a indústria farmacêutica demonstrou interesse em estudos de farmacocinética e toxicocinética no desenvolvimento de drogas. A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em tandem, (LC-MS/MS) tem sido estabelecida como a técnica de escolha para quantificação de drogas e metabolitos em fluidos biológicos, como plasma ou urina. No entanto, problemas de sensibilidade associados aos baixos níveis de concentração destas no sangue e o reduzido volume de amostra dos DBS fizeram com que fosse menos utilizada mais recentemente. A sensibilidade dos espectrómetros de massa atuais é adequada para uma análise de rotina de xenobióticos em DBS, sendo mesmo usados para a monitorização terapêutica de fármacos em alguns hospitais. Portanto, num curto período de tempo, muitas soluções metodológicas e instrumentais, especialmente dedicadas aos DBS, têm sido desenvolvidas com recurso à MS (Wagner, et al., 2014).

2. Justificação do tema

A canábis é considerada uma droga popular, facilmente obtida em todo o mundo. São inúmeros os movimentos realizados com o objetivo de promover a sua legalização, com base nas diversas pesquisas que promovem os seus benefícios medicinais, associados à falsa impressão de que é uma droga segura.

Conclusões sobre os efeitos benignos ou malignos do uso da canábis influenciam as políticas de cada país em matéria da sua legalização ou criminalização. Apesar de evidências indicarem que o seu uso está relacionado com inúmeras consequências neurobiológicas e psicossociais, é uma droga muito usada pelos jovens.

Portanto é usual os laboratórios serem notificados pelas autoridades para que seja avaliado o possível consumo desta substância por parte de um indivíduo, sendo desta forma essencial melhorar a efetividade de um laboratório, contribuindo com novas metodologias.

A análise de amostras biológicas por técnicas cromatográficas exige, na maioria dos casos, um tratamento prévio da amostra, uma etapa que consome muito tempo e recursos. Torna-se então importante o desenvolvimento de novos métodos que visem a sua melhoria e execução.

Os DBS destacam-se pela quantidade mínima de sangue necessária para análise, pelo facto de permitir o teste de vários analitos e por oferecerem melhorias práticas, clinicas e financeiras.

Por todos os motivos referidos anteriormente foi planeado um projeto de investigação para deteção e quantificação dos principais canabinóides (THC, 11-OH-THC e THC-COOH) em amostras de sangue com recurso à análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa em tandem (GC-MS/MS) e aos *Dried Blood Spots* (DBS).

3. Materiais e Métodos

3.1. Padrões e Reagentes

- Água desionizada Milli-Q;
- Metanol LiChrosolv®, Merck (Alemanha);
- Acetonitrilo PROLABO®, VWR (Portugal);
- Propan-2-ol (LC-MS grade), Fisher Chemical, Enzymatic (Portugal)
- Acetato de etilo (analytical grade), VWR International
- Diclorometano (analytical grade), Fisher Chemical, Enzymatic (Portugal)
- n-Hexano (analytical grade), Fisher Chemical, Enzymatic (Portugal)
- N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida (MSTFA), Macherey-Nagel (Alemanha);
- Trimetilclorosilano (TMCS), Macherey-Nagel (Alemanha);
- Delta-9-tetrahydrocannabinol-d₃ a 1 mg/mL em metanol, LGC Promochem (Espanha);
- 11-Hidroxi-delta-9-tetrahydrocannabinol-d₃ a 100 µg/mL em metanol, LGC Promochem (Espanha);
- 11-nor-9-carboxi-delta-9-tetrahydrocannabinol-d₃ a 10 µg/mL em metanol, LGC Promochem (Espanha);
- Delta-9-tetrahydrocannabinol a 10 µg/mL em metanol, LGC Promochem (Espanha);
- 11-Hidroxi-delta-9-tetrahydrocannabinol a 10 µg/mL em metanol, LGC Promochem (Espanha);
- 11-nor-9-carboxi-delta-9-tetrahydrocannabinol 10 µg/mL em metanol, LGC Promochem (Espanha);

Os padrões analíticos dos canabinóides e respetivos deuterados foram gentilmente oferecidos pelo Instituto de Medicina Legal Luís Concheiro, Universidade de Santiago de Compostela (Espanha).

3.2. Preparação de soluções

Soluções Padrão

As soluções padrão de trabalho foram preparadas por diluições sucessivas com metanol a partir das soluções *stock* acima mencionadas.

Aplicação de *dried blood spots* na deteção e quantificação de canabinóides por cromatografia de gases/espectrometria de massas em tandem

Foram preparadas soluções individuais a 10 µg/mL e soluções contendo uma mistura de todos os analitos às concentrações de 50 e 100 ng/mL.

Relativamente aos padrões internos, para o THC-d₃ e THC-COOH-d₃, foram preparadas por diluições sucessivas com metanol soluções de trabalho individuais de concentração 1 µg/mL. Para além destas foram também preparadas duas soluções de mistura de padrões internos às concentrações de 10 e 100 ng/mL.

Todas as soluções foram armazenadas a 4 °C ao abrigo da luz.

Outras soluções

Reagente de derivatização

Foram misturados os reagentes de forma a se obter uma concentração de 5% de TMCS em MSTFA. A solução foi protegida da luz e armazenada a 4 °C.

Solução de acetonitrilo e metanol (5:5)

Para preparar um volume final de 250 mL desta solução, foram adicionados 125 mL de acetonitrilo e 125 mL de metanol.

Solução de hexano e acetato de etilo (9:1)

De forma muito semelhante, para um volume final de 250 mL desta solução, foram adicionados 225 mL de hexano e 25 mL de acetato de etilo.

3.3. Equipamentos

- Micropipetas automáticas Gilson, volumes máximos 20, 200 e 1000 µL (VWR International, Carnaxide, Portugal);
- Vórtex mixer 230V, Labnet International (VWR Internaional, Carnaxide, Portugal);
- Câmara de refrigeração (a 4 °C), Dagard Ibérica (Odivelas, Portugal);
- Bomba de vácuo da GAST - modelo DOA-P505-BN;
- Câmara de congelação da Electrolux - modelo Inspire;
- Agitador rotativo - modelo Movil-Rod da J.P. Selecta;
- Centrifuga Heraeus Multifuge IS-R, Thermo Scientific (Osterode, Alemanha);
- Evaporador TurboVap® LV, Biotage (Via Athena, Portugal)

3.4. Matriz biológica

A matriz utilizada no presente trabalho foi sangue humano proveniente do excedente do Centro Hospitalar Cova da Beira, E.P.E. (Covilhã). Estas amostras foram armazenadas a -21 °C até à sua utilização.

3.5. Dried Blood Spots (DBS)

Foram usados cartões Whatman™ Human ID Bloodstain Card BFC180 (VWR, Portugal) para o tratamento da amostra, tendo sido mantidos sempre bem-acondicionados entre utilizações.

3.6. Sistema e condições cromatográficas

Para este estudo foi utilizado um sistema de cromatografia gasosa HP7890A (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha), equipado com um detetor de espectrometria de massa tripló quadropolo modelo 7000B (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha). O sistema encontra-se acoplado a um injetor automático modelo MPS2 autosampler da Gerstel (Mülheim an der Ruhr, Alemanha). Foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida (30m x 0.25-mm I.D., 0.25- μ m) com 5% de fenilmetilsiloxano (J & W Scientific, Folsom, EUA).

Para que um método cromatográfico seja eficiente é necessário que as condições cromatográficas utilizadas no ensaio sejam adequadas. De forma a obter uma boa separação dos analitos, foi estabelecida como temperatura inicial do forno 120 °C durante 1,85 minutos, seguindo-se um aumento de 20 °C por minuto durante 9 minutos até se atingir a temperatura final de 300 °C, mantida durante 9,10 minutos. O tempo de corrida foi de 19,95 minutos e foram ainda estabelecidas as temperaturas de 250 °C para o injetor e de 280 °C para o detetor.

O volume de injeção de amostra foi de 2 μ L em modo *splitless* e foi utilizado hélio como gás de arraste a um fluxo constante de 0,8 mL/min. Ao nível do espectrómetro de massa foi estabelecido um fluxo de 1,5 mL/min de hélio e de 2,5 mL/min de azoto na célula de colisão em modo de impacto eletrónico, com uma corrente de trabalho de 35 μ A e energia de 70 eV.

Os dados foram adquiridos com o sistema a operar em modo MRM (*multiple reaction monitoring*) com auxílio do programa *MassHunter WorkStation Acquisition Software* (Agilent Technologies). Foram escolhidas as transições que melhor identificavam e caracterizavam cada um dos analitos. A tabela 3 recolhe os parâmetros do método MRM utilizado, encontrando-se sublinhado o ião quantificador utilizado para cada composto.

Tabela 3 - Parâmetros do método desenvolvido por GC-MS/MS.

Tempo do segmento (min)	Composto	Tempo de retenção (min)	lão precursor (m/z)	lão produto (m/z)	Energia de Colisão (eV)	Dwell time (ms)
Dwell	THC	10,78	313,9	179,4	15	50
			313,9	<u>219,3</u>	15	
	313,9		273,2	15		
	THC-d ₃		374,0	374,0	5	50
11,00	THC-OH	11,84	369,3	239,0	20	50
			369,3	289,3	20	
			369,3	<u>298,4</u>	20	
	THC-OH-d ₃		374,0	374,0	5	50
12,00	THC-COOH	12,58	369,3	265,3	5	50
			369,3	<u>355,3</u>	5	
			471,2	297,3	20	
	THC-COOH-d ₃		374,0	374,0	5	50

3.7. Preparação da amostra

O uso dos *Dried Blood Spots* simplificou a preparação da amostra, uma vez que bastou proceder-se ao descongelamento do sangue e preparar uma *pool* contendo a amostra à qual foram adicionados os padrões às concentrações desejadas, aplicar diretamente 100 µL nos cartões Whatman® Human ID Bloodstain Card e deixar secar à temperatura ambiente, num local sem luz e humidade.

3.8. Procedimento de extração

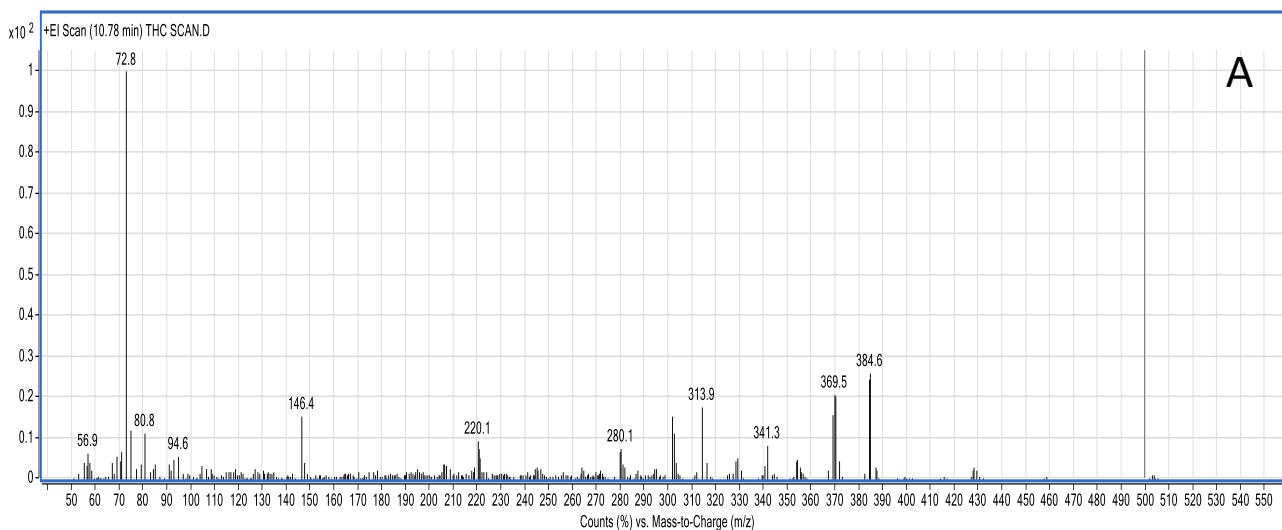
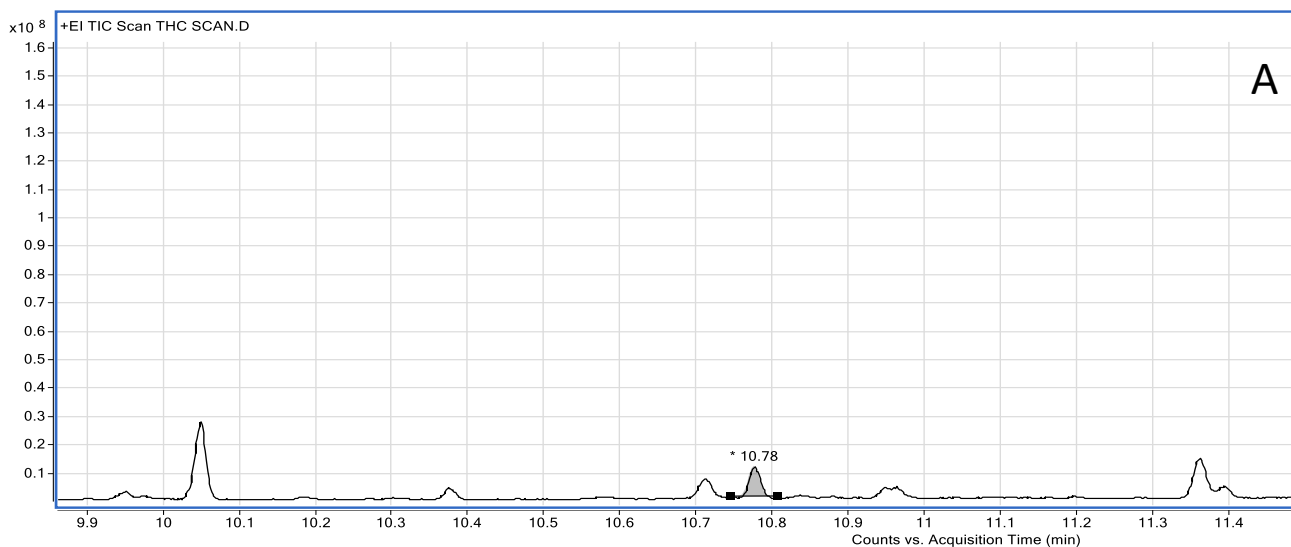
Após secagem das manchas, adicionaram-se 4 mL de metanol e 10 µL de padrão interno a 100 ng/mL, seguido de agitação por movimentos de rotação/inversão durante 40 minutos.

Procedeu-se a uma centrifugação de 20 minutos a 3000 rpm e o sobrenadante foi evaporado no TurboVap® LV e foram adicionados 50 µL de reagente de derivatização (MSTFA com 5% de TMCS). O processo de derivatização foi realizado num micro-ondas a 800W durante 2 minutos.

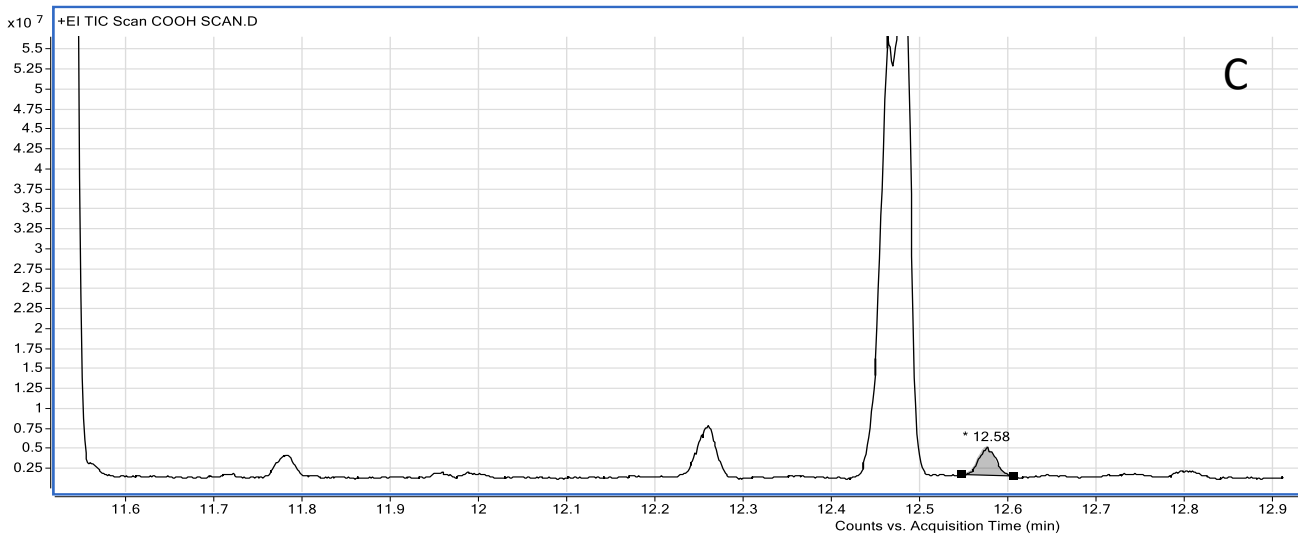
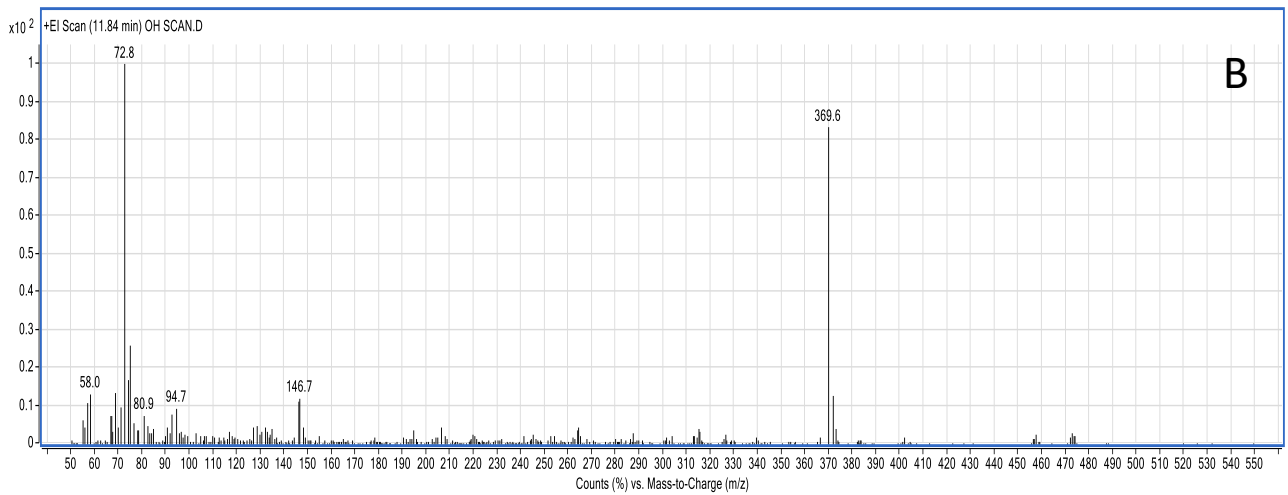
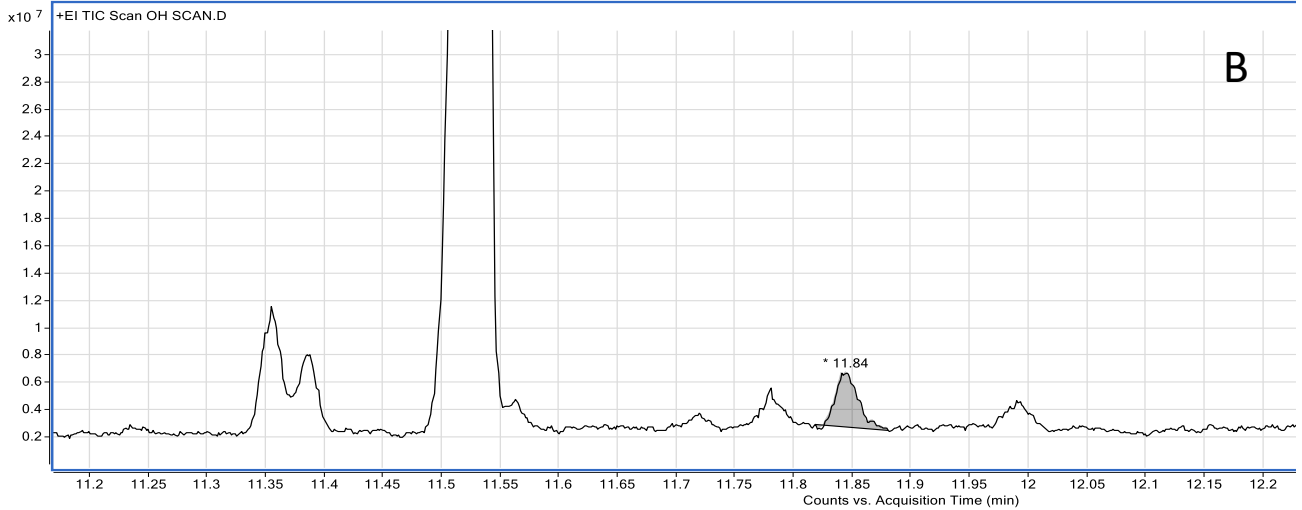
4. Resultados e Discussão

4.1. Identificação dos analitos

Após serem definidos os parâmetros cromatográficos a utilizar, como o fluxo do gás de arraste e o programa de temperaturas, passou-se à identificação qualitativa dos compostos. Os padrões analíticos foram injetados no sistema cromatográfico em modo de varrimento contínuo (modo *scan*), para se detetar e identificar os iões característicos de cada molécula. Seguidamente, comparando os espectros de massa obtidos em modo *scan* (Figura 9) com os existentes na biblioteca de espectros para o THC, THC-OH e THC-COOH, foram identificados os analitos nos cromatogramas e conhecidos os respetivos tempos de retenção no nosso sistema.



Aplicação de *dried blood spots* na detecção e quantificação de canabinóides por cromatografia de gases/espectrometria de massas em tandem



Aplicação de *dried blood spots* na detecção e quantificação de canabinóides por cromatografia de gases/espectrometria de massas em tandem

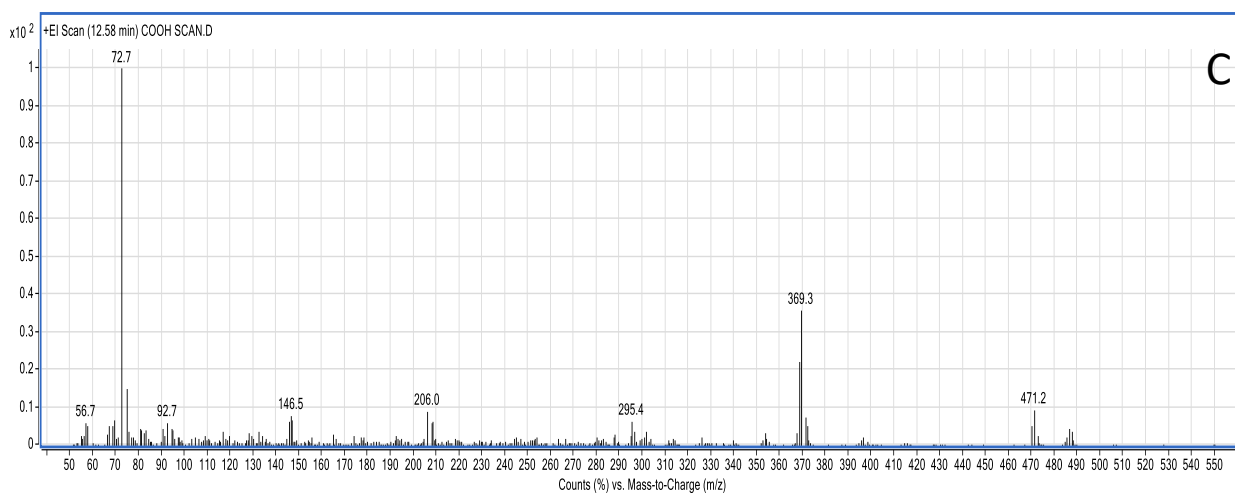


Figura 9- Cromatogramas em SCAN e respectivos espectros de massa do THC (A), THC-OH (B) e THC-COOH (C) a 100 ng/mL

A partir do espectro de massa obtido para cada composto, tendo em conta a abundância relativa de cada ião, foi escolhido um ião precursor para cada analito e procedeu-se à sua fragmentação, em modo *product ion* (PI), para diferentes energias de colisão (10; 15; 20 e 30 eV) (Figura 10).

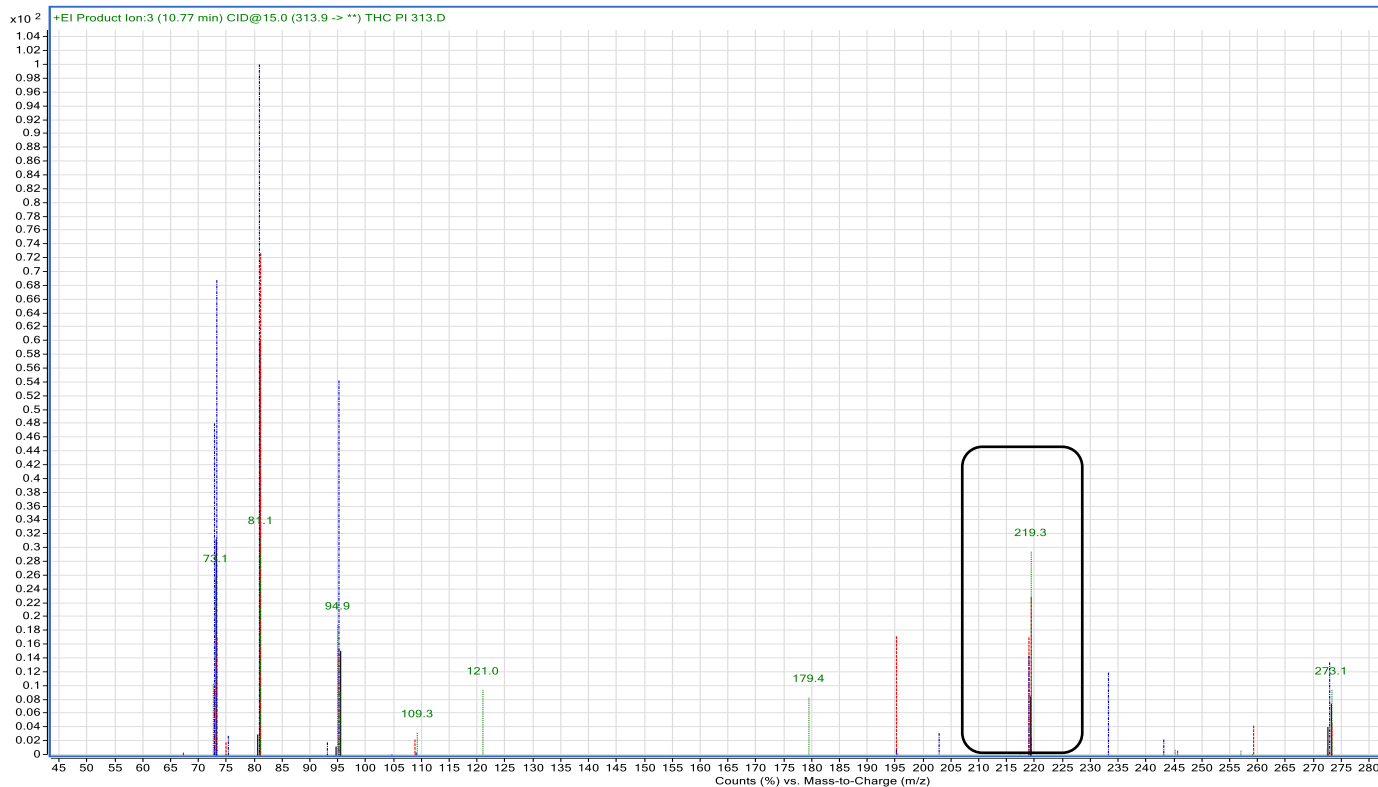


Figura 10- Exemplo do product ion do THC à concentração de 100 ng/mL

Da fragmentação dos iões precursores sob várias energias de colisão foram obtidos espectros de massas (em modo PI) contendo os diferentes iões filho, bem como as respectivas abundâncias relativas, e foram selecionadas para cada analito as transições que melhor representavam os seguintes critérios:

- Bom sinal cromatográfico;
- Cromatograma com poucos interferentes;
- Ausência de contribuições cruzadas com os outros analitos em estudo.

O processo de construção do método cromatográfico anteriormente descrito foi repetido para os análogos deuterados dos compostos, usados como padrões internos para controlo de todo o processo extrativo e analítico.

As transições mais adequadas para cada um dos compostos em estudo foram selecionadas, e os segmentos de análise a utilizar em modo de operação de monitorização de múltiplas reações (MRM) foram definidos, pois o estabelecimento de segmentos contribui para um aumento da precisão do instrumento na análise das amostras.

A tabela 4 resume o método criado em MRM e usado no decorrer deste estudo. As transições assinaladas representam o ião escolhido para quantificação dos compostos.

Tabela 4 - Transições monitorizadas em modo MRM (a transição utilizada para quantificação encontra-se sublinhada)

Tempo do segmento (min)	Composto	Tempo de retenção (min)	lão precursor (m/z)	lão produto (m/z)	Energia de Colisão (eV)	Dwell time (ms)	
Dwell	THC	10,78	313,9	179,4	15	50	
			313,9	<u>219,3</u>	15		
	THC-d ₃		313,9	273,2	15		
11,00	THC-OH	11,84	374,0	374,0	5	50	
				369,3	239,0		20
			369,3	289,3	20		
	THC-OH-d ₃		369,3	<u>298,4</u>	20		
12,00	THC-COOH	12,58	374,0	374,0	5	50	
				369,3	265,3		5
				369,3	<u>355,3</u>		5
			471,2	297,3	20		
	THC-COOH-d ₃		374,0	374,0	5	50	

Pela semelhança estrutural entre os compostos e os padrões internos utilizados, não foi possível eliminar todas as contribuições cruzadas entre estes, mesmo escolhendo as

Aplicação de *dried blood spots* na detecção e quantificação de canabinóides por cromatografia de gases/espectrometria de massas em tandem

transições mais adequadas. Observou-se que quando se injetavam apenas os padrões internos havia sinal nas transições correspondentes aos compostos, mas o contrário não ocorreu. Foram injetadas no equipamento soluções de misturas de deuterados a diferentes concentrações e após análise dos cromatogramas optou-se por se trabalhar inicialmente com os padrões internos a 100 ng/mL, uma concentração que permitia a sua detecção sem dificuldade apesar de poderem ocorrer algumas contribuições ao nível das transições dos compostos.

Trabalhou-se em modo *splitless*, pois não existiam diferenças significativas entre os cromatogramas, aumentando-se assim a sensibilidade do método.

Na figura 11 é apresentado o cromatograma obtido por análise de uma amostra fortificada com os compostos de estudo a 10 ng/mL e padrões internos a 100 ng/mL, utilizando o método cromatográfico anteriormente descrito.

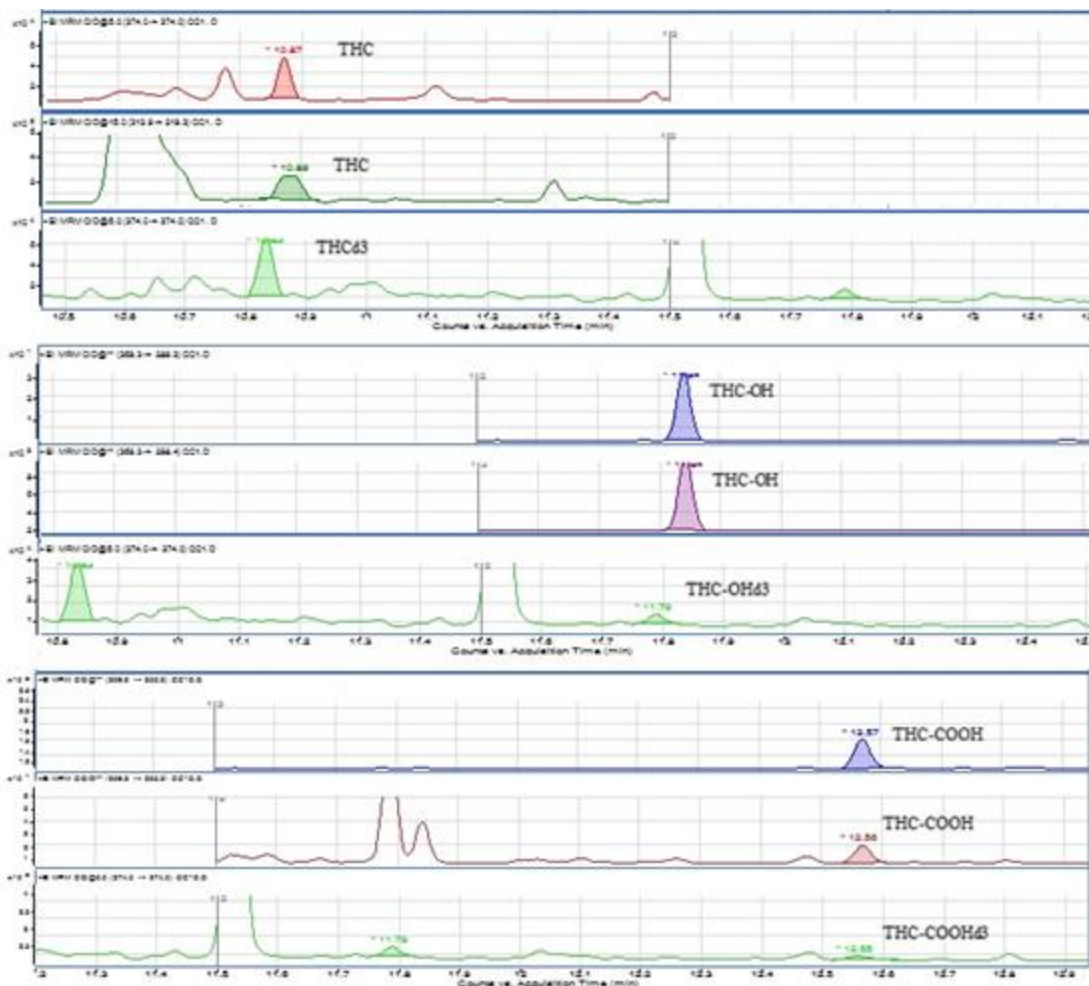


Figura 11 - Cromatograma do THC, THC-OH e THC-COOH a 10 ng/mL e respetivos padrões internos a 100 ng/mL

4.2. Otimização do método extrativo

Os DBS são um método de amostragem alternativo que recentemente tem ganho elevada importância em diversas áreas da farmacologia, epidemiologia e antropologia, pelo reduzido volume de sangue necessário, facilidade de recolha e tratamento da amostra.

A reprodutibilidade do processo extrativo e a análise de um analito através dos DBS é a chave para que um método seja reprodutível, específico e com detecção apropriada. Portanto, o volume de sangue colocado nos cartões, o uso de um solvente apropriado num volume apropriado, de forma a que o volume de sangue adicionado seja inferior a 5% do volume total após adição do solvente, bem como o tempo de secagem e a estabilidade da amostra à temperatura ambiente e após congelação, são parâmetros a ter em conta e que devem ser analisados uma vez que variam dependendo do analito em estudo (Evans, *et al.*, 2015; Tanna, *et al.*, 2011; Lenk & Sandkvist, *et al.*, 2015; Lenk & Hansson, *et al.*, 2015).

Com o intuito de minimizar a quantidade de interferentes e potencializar a eficácia do processo analítico, os diferentes parâmetros que podem influenciar o processo de extração foram otimizados.

4.2.1 - Escolha do solvente

Na seleção do tipo de solvente de extração deverá ter-se em consideração não só a necessidade de serem recuperados todos os compostos em estudo, como também com qual se obtém maior sinal cromatográfico. Após uma breve revisão bibliográfica foram selecionados metanol, acetonitrilo, diclorometano, 2-propanol, hexano e acetato de etilo. Foram ainda testadas combinações de solventes, metanol e acetonitrilo (5:5) e hexano e acetato de etilo (9:1). Para além disso, em paralelo com a escolha do solvente, também foi avaliada a quantidade de sangue que deveria ser colocado em cada mancha DBS (50 ou 100 μ L).

Cada uma das extrações foi efetuada em triplicado, no entanto para o metanol uma das amostras foi descartada porque originou problemas durante o processo de extração. Os resultados foram expressos em termos de média e desvio padrão da razão área do ião quantificador de cada composto/área do padrão interno (gráficos 1-3).

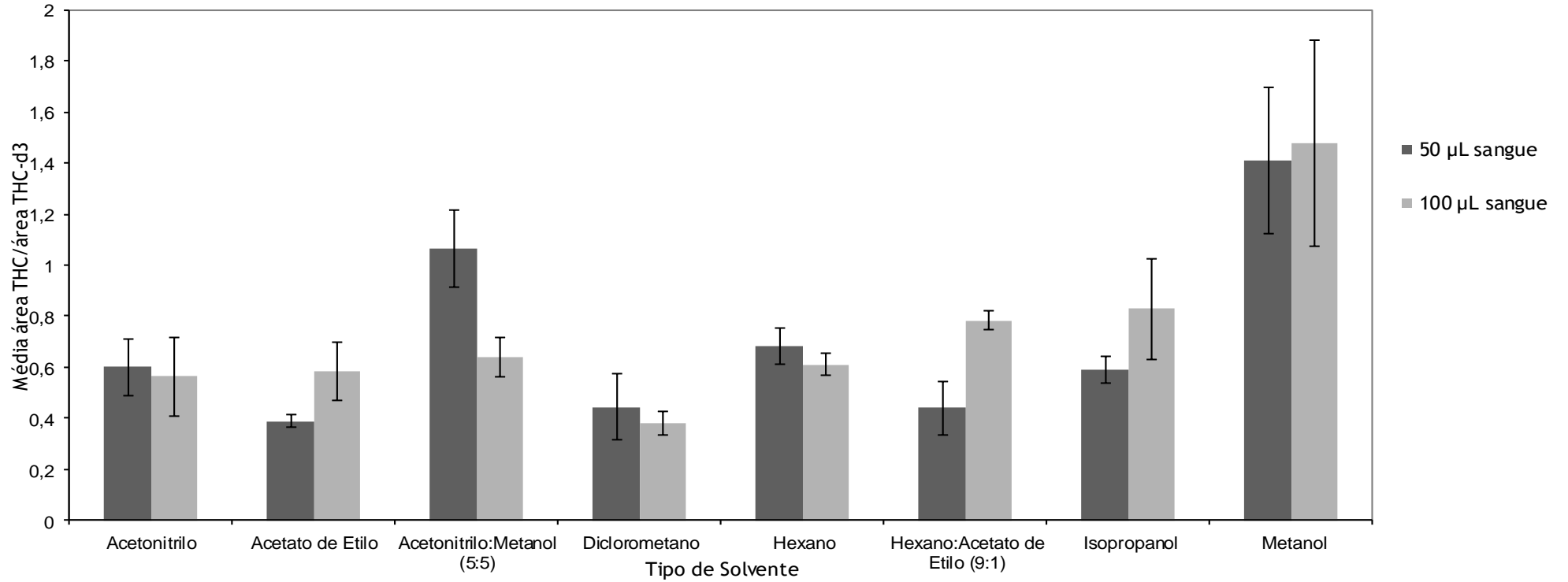


Gráfico 1 - Média e desvio-padrão da área de THC/área de THC-d3 para os vários solventes estudados

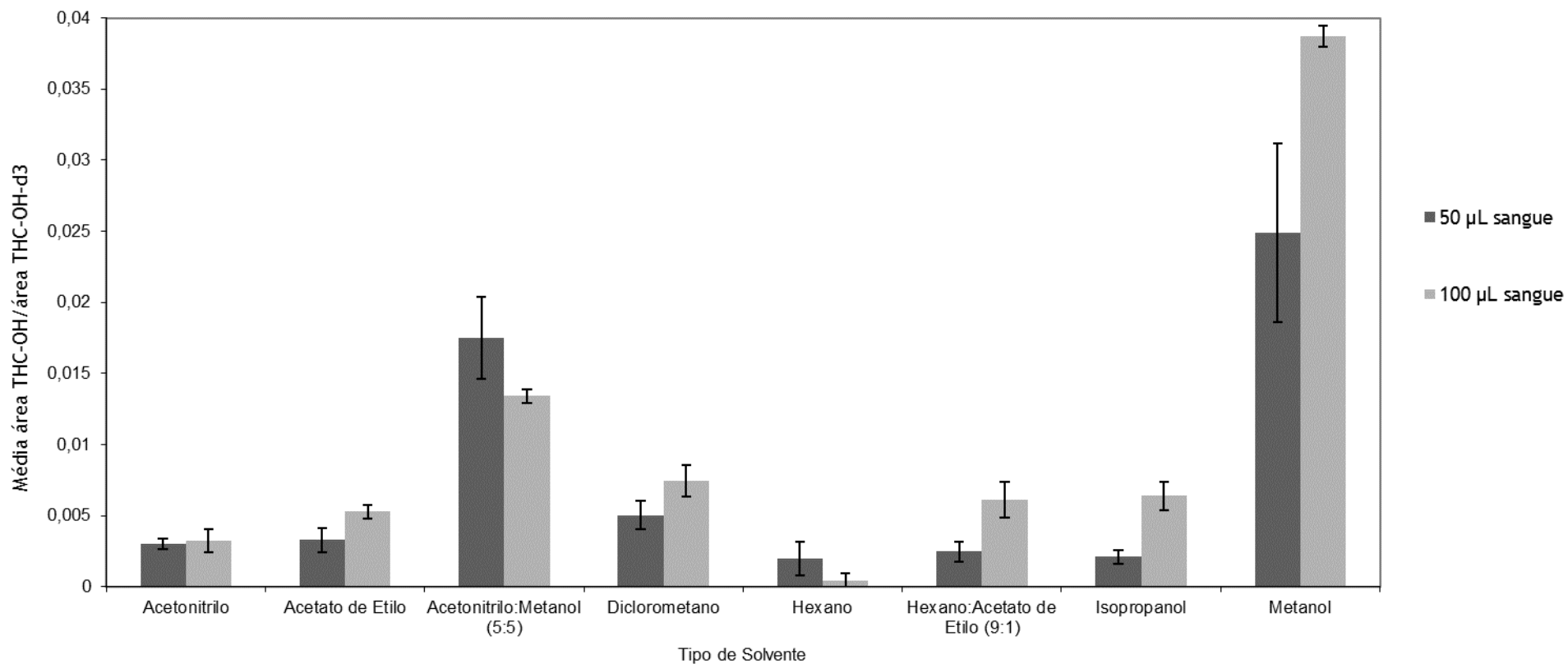


Gráfico 2 - Média e desvio-padrão da área de THC-OH/área de THC-OH-d3 para os vários solventes estudados

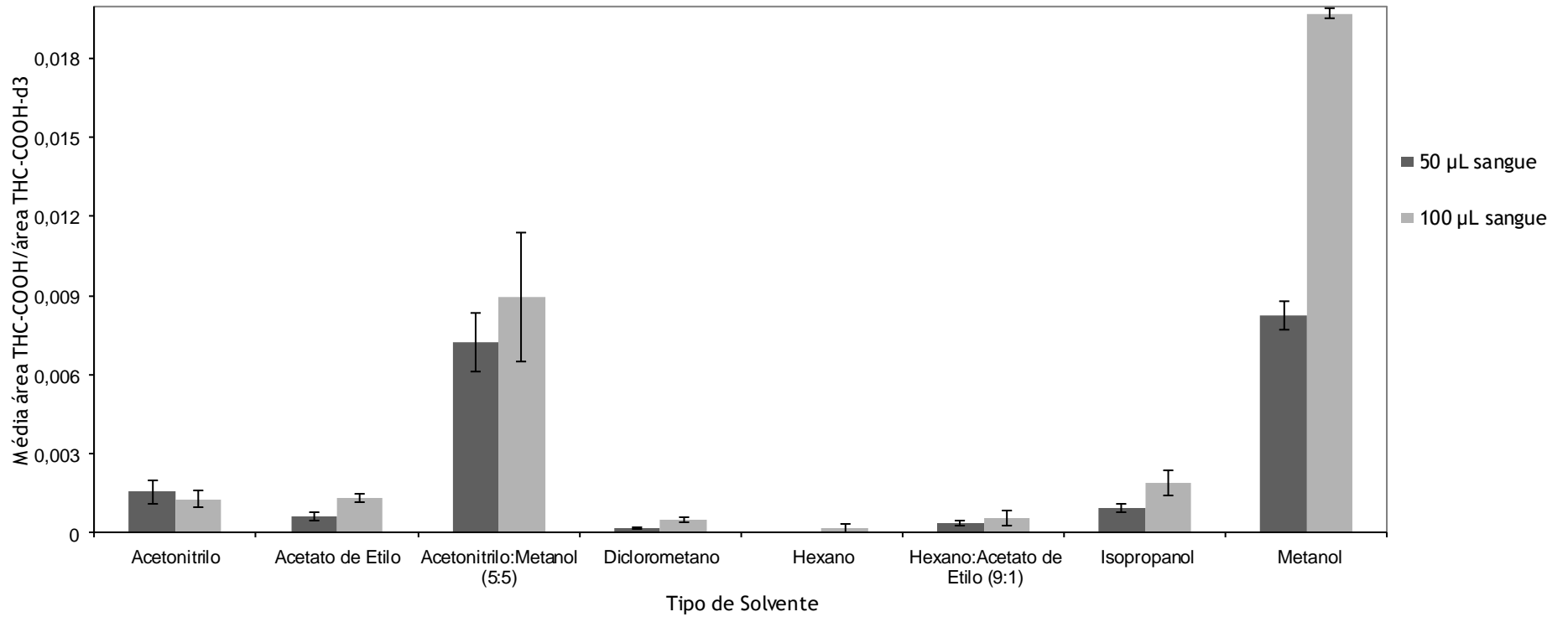


Gráfico 3 - Média e desvio-padrão da área de THC-COOH/área de THC-COOH-d₃ para os vários solventes estudados

Por análise dos gráficos anteriores (1-3) podemos concluir que o metanol foi o melhor solvente extrativo para os três compostos (THC, THC-OH e THC-COOH). A solução de acetonitrilo e metanol (5:5) também apresentou bons resultados para os três, mas mais evidenciada no THC. Como se pode verificar nos anteriores gráficos também foi avaliado o volume de amostra. Os melhores resultados foram para o metanol em manchas de 100 μL para todos os compostos, no entanto para o THC o volume de sangue de 50 μL também originou resultados aceitáveis.

De forma a confirmar estas conclusões, foram aplicados métodos estatísticos (ANOVA, Teste T e Teste F) de comparação de variáveis de forma a verificar se existem ou não diferenças estatisticamente significativas entre o metanol em manchas de sangue de 100 μL e o metanol em manchas de sangue a 50 μL .

Da análise estatística (ver Anexo I) é possível concluir que a diferença entre manchas de sangue de 100 μL e o metanol em manchas de sangue a 50 μL para o THC não é estatisticamente significativa. Já em relação ao THC-OH e THC-COOH, a diferença entre os dois volumes possui relevância estatística.

Após esta análise foi então estabelecido o metanol como solvente extrativo a utilizar no decurso do trabalho e uma quantidade de sangue aplicado nos DBS de 100 μL .

4.2.2 - Quantidade de solvente

O segundo parâmetro otimizado nesta técnica foi a quantidade de volume de solvente adequado à extração dos compostos pretendidos. Foram selecionados então os volumes de 2, 3, 4 e 5 mL de metanol.

Cada uma das extrações foi efetuada em triplicado, tendo os resultados sido expressados em termos de média e desvio padrão da razão área do ião quantificador do composto em estudo/área do padrão interno (gráficos 4-6).

Aplicação de *dried blood spots* na detecção e quantificação de canabinóides por cromatografia de gases/espectrometria de massas em tandem

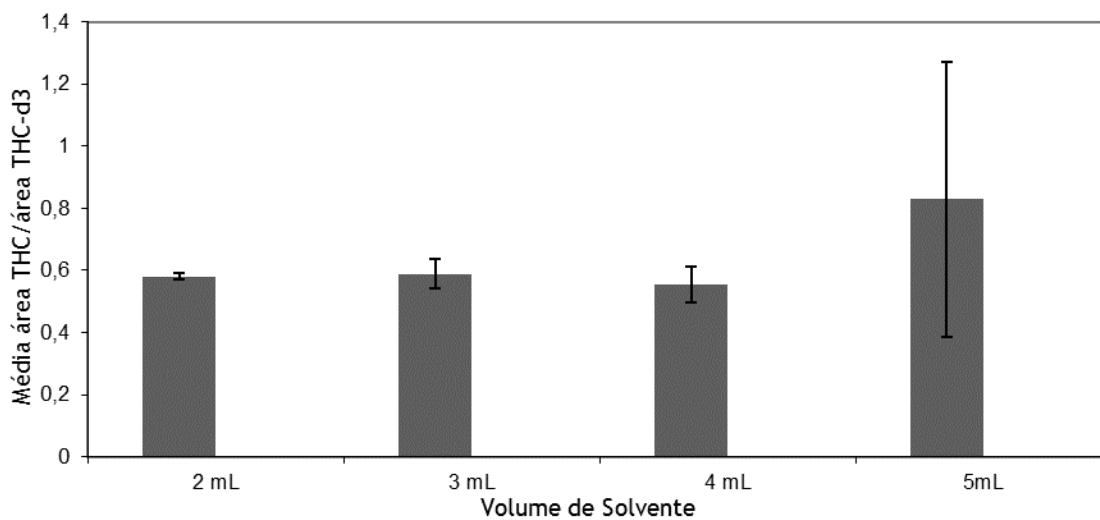


Gráfico 4 - Média e desvio-padrão da área de THC/área de THC-d₃ para os vários volumes de solvente utilizados

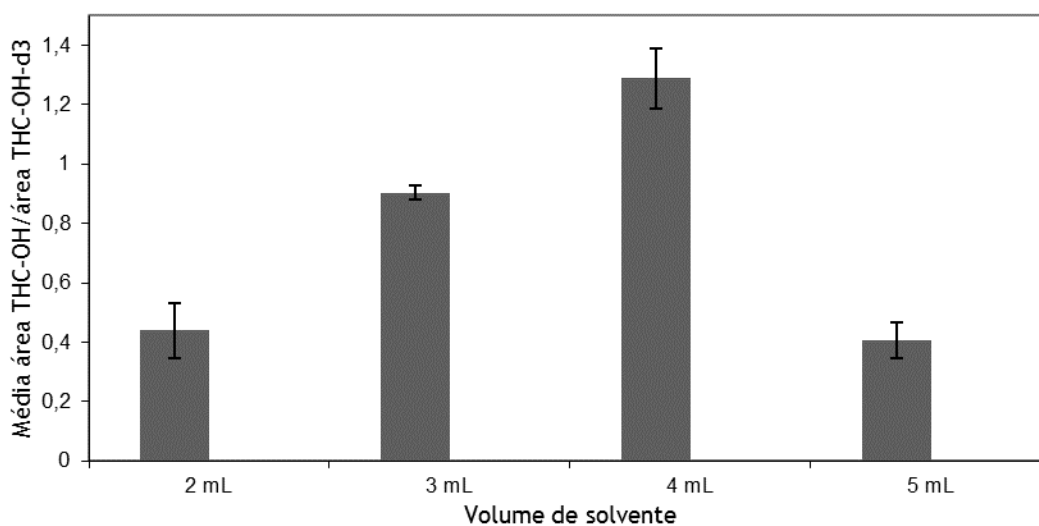


Gráfico 5 - Média e desvio-padrão da área de THC-OH/área de THC-OH-d₃ para os vários volumes de solvente utilizados

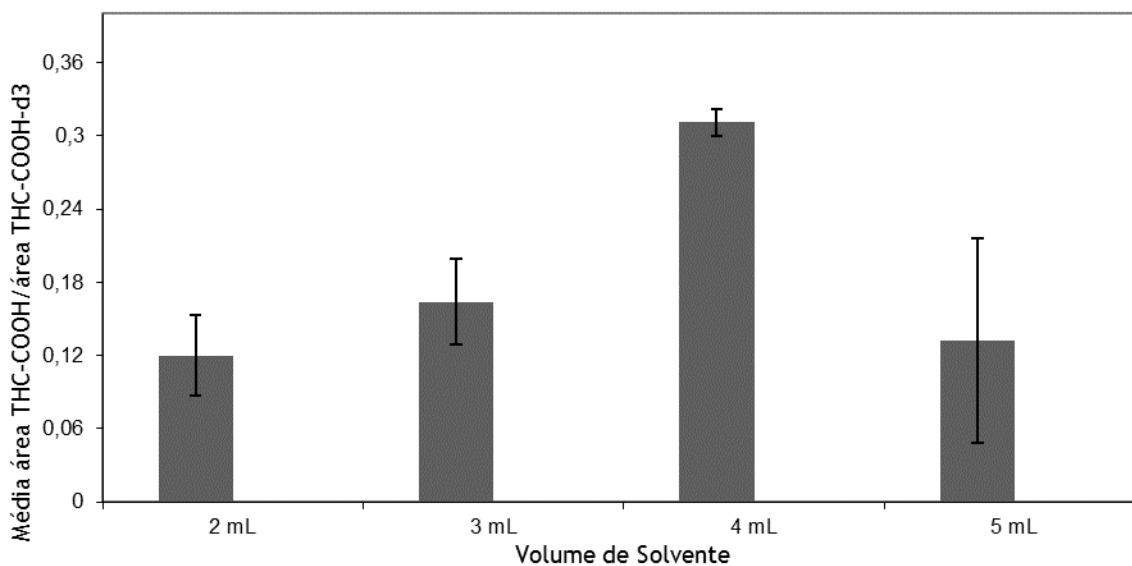


Gráfico 6 - Média e desvio-padrão da área de THC-COOH/área de THC-COOH-d₃ para os vários volumes de solvente utilizados

Por análise dos gráficos anteriores (gráficos 4-6) podemos concluir que o volume de 4 mL foi o mais adequado para o THC-OH e THC-COOH. Relativamente ao THC, este apresentou bom sinal tanto para os 3 mL como para os 4 mL de metanol.

Para confirmar estas conclusões, foram aplicados métodos estatísticos (ANOVA, Teste T e Teste F) de comparação de variáveis de forma a verificar se existem ou não diferenças estatisticamente significativas entre os volumes de 3 e 4 mL.

Da análise estatística (ver Anexo I) é possível concluir que a diferença entre os volumes de metanol a 3 e 4 mL para o THC-COOH não é estatisticamente significativa. Já em relação ao THC-OH e THC, a diferença entre os dois volumes possui relevância estatística.

Após esta análise foram então estabelecidos os 4 mL de metanol a utilizar no decurso do trabalho.

4.2.3 - Tempo de extração

A extração do composto é feita no agitador rotativo a uma velocidade constante e é um parâmetro que deve também ser avaliado, para que se obtenha o máximo de composto durante a lavagem. Os tempos de agitação utilizados foram 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos.

Cada uma das extrações foi efetuada em triplicado, tendo-se expressado os resultados em termos de média e desvio padrão da razão área do ião quantificador do composto em estudo /área do padrão interno (gráficos 7-9).

Aplicação de *dried blood spots* na detecção e quantificação de canabinóides por cromatografia de gases/espectrometria de massas em tandem

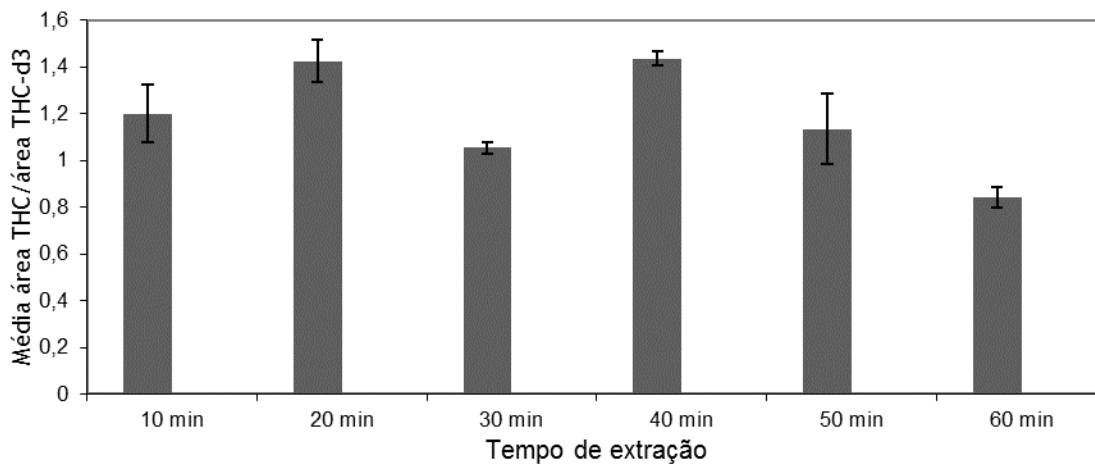


Gráfico 7 - Média e desvio-padrão da área de THC/área de THC-d₃ para os vários tempos de extração utilizados

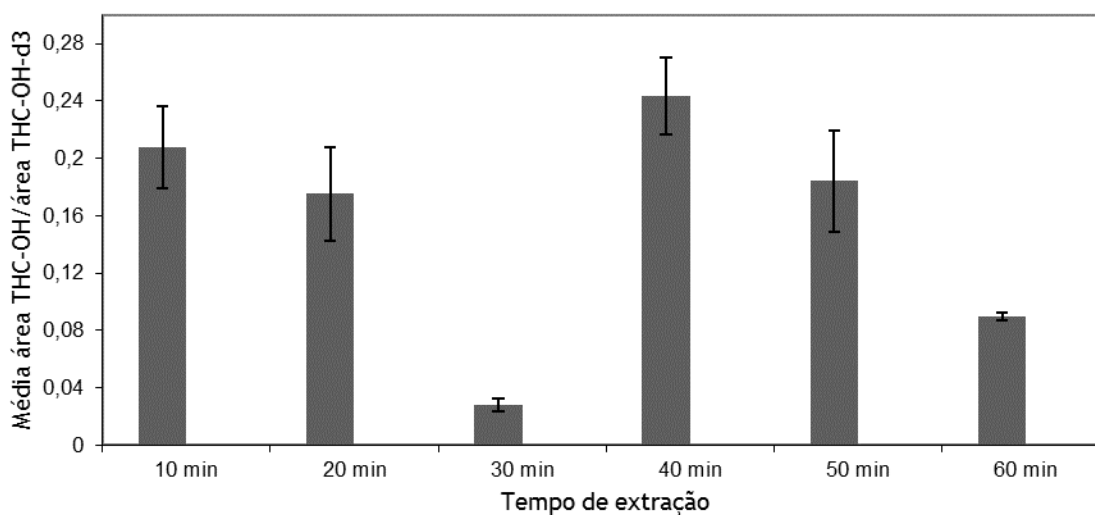


Gráfico 8 - Média e desvio-padrão da área de THC-OH/área de THC-OH-d₃ para os vários tempos de extração utilizados

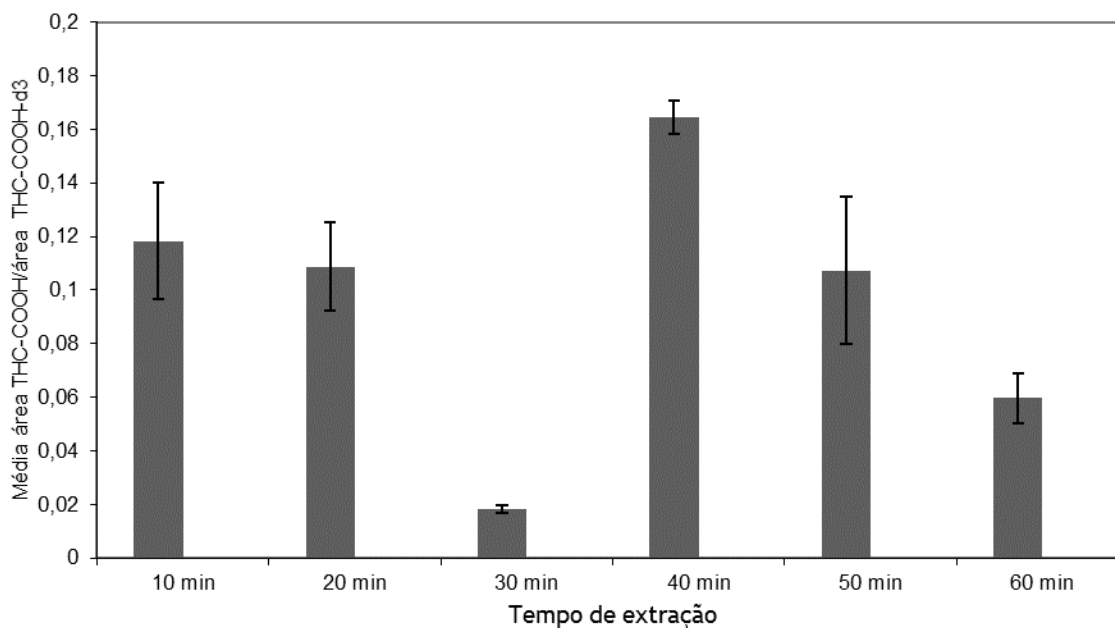


Gráfico 9- Média e desvio-padrão da área de THC-COOH/área de THC-COOH-d₃ para os vários tempos de extração utilizados

Por análise dos gráficos anteriores (gráficos 7-9) podemos concluir que o tempo de 40 minutos foi o mais adequado para os três compostos). O tempo de extração de 20 minutos também apresentou bons resultados para os três compostos, principalmente para o THC.

De forma a confirmar estas conclusões, foram aplicados métodos estatísticos (ANOVA, Teste T e Teste F) de comparação de variáveis de forma a verificar se existem ou não diferenças estatisticamente significativas entre os tempos de 20 e 40 minutos.

Da análise estatística (ver Anexo I) é possível concluir que a diferença os tempos de extração de 20 e 40 minutos para o THC-OH e THC-COOH não é estatisticamente significativa. Já em relação ao THC, a diferença entre os dois volumes possui relevância estatística.

Após esta análise foram então estabelecidos os 40 minutos de tempo de extração a utilizar no decurso do trabalho.

4.2.4 - Tempo de centrifugação

Um outro parâmetro otimizado nesta técnica foi o tempo de centrifugação, que se efetua após a extração de 40 minutos com metanol, para eliminar parte dos interferentes presentes na amostra. Foram selecionados para esta parte os tempos 10, 20 e 30 minutos de centrifugação.

Aplicação de *dried blood spots* na detecção e quantificação de canabinóides por cromatografia de gases/espectrometria de massas em tandem

Cada uma das extrações foi efetuada em triplicado, tendo-se expressado os resultados em termos de média e desvio padrão da razão área do ião quantificador do composto em estudo/área do padrão interno (gráficos 10-12).

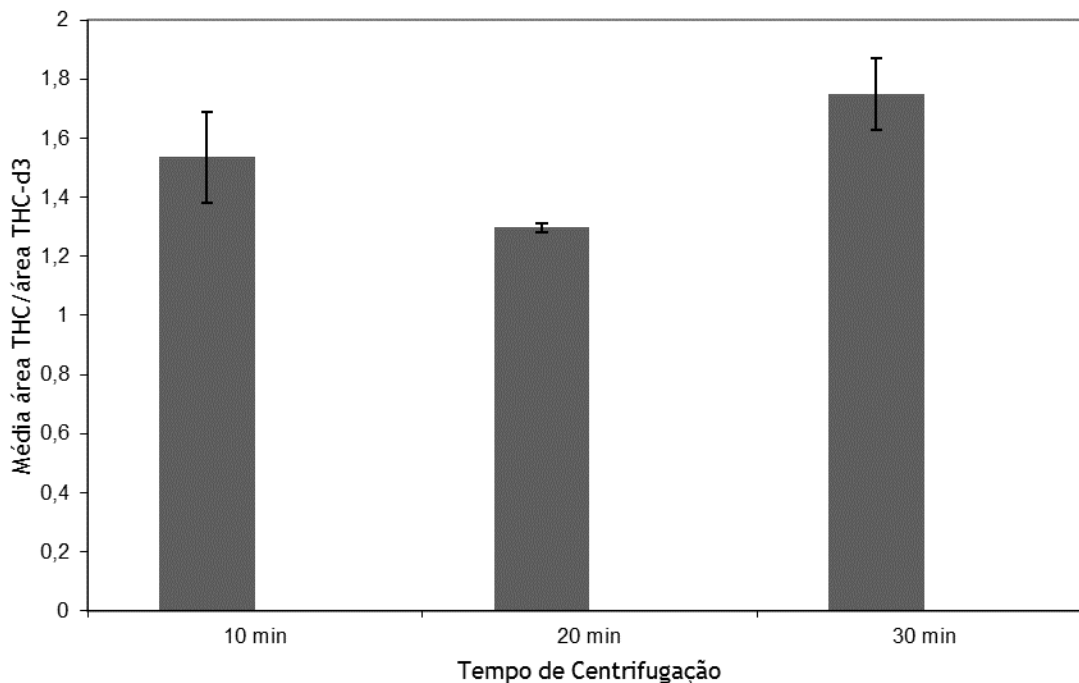


Gráfico 10 - Média e desvio-padrão da área de THC/área de THC-d₃ para os vários tempos de centrifugação utilizados

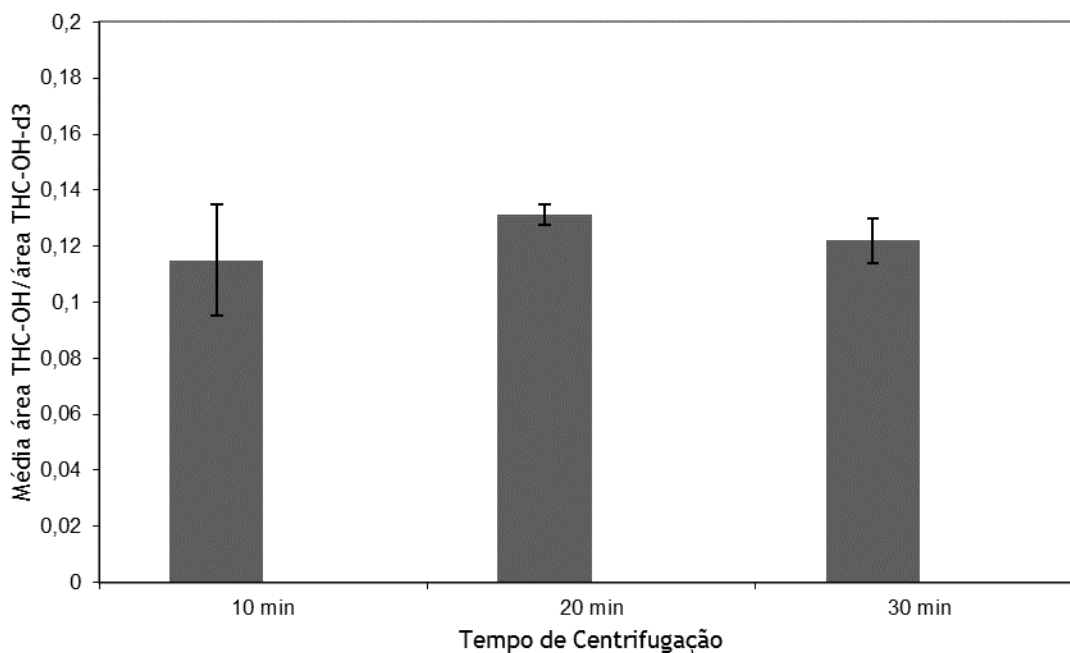


Gráfico 11 - Média e desvio-padrão da área de THC-OH/área de THC-OH-d₃ para os vários tempos de centrifugação utilizados

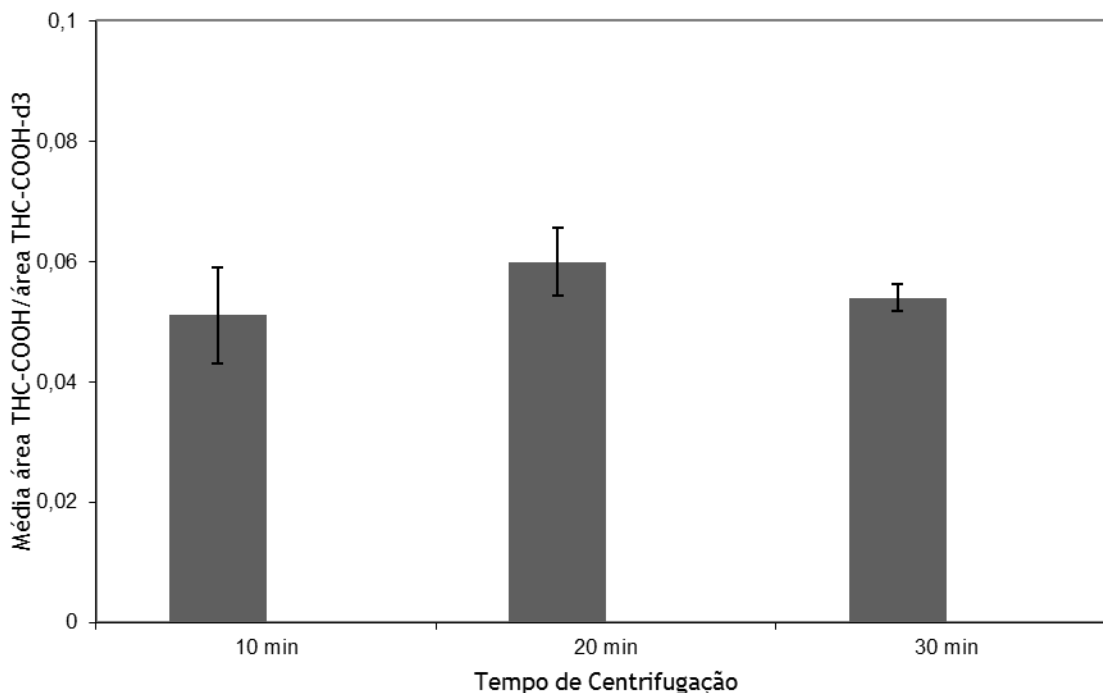


Gráfico 12 - Média e desvio-padrão da área de THC-COOH/área de THC-COOH-d₃ para os vários tempos de centrifugação utilizados

Por análise dos gráficos anteriores (gráficos 10-12) podemos concluir que o tempo de 20 minutos foi o mais adequado para o THC-OH e THC-COOH e o segundo melhor o de 30 minutos. Relativamente ao THC, as centrifugações de 30 minutos apresentaram melhores resultados.

De forma a confirmar estas conclusões, foram aplicados métodos estatísticos (ANOVA, Teste T e Teste F) de comparação de variáveis de forma a verificar se existem ou não diferenças estatisticamente significativas entre os tempos de 20 e 30 minutos.

Da análise estatística (ver Anexo I) é possível concluir que a diferença entre os tempos de centrifugação de 20 e 30 minutos para o THC e THC-COOH não é estatisticamente significativa. Já em relação ao THC-OH, a diferença entre os dois volumes possui relevância estatística.

Após esta análise foram então estabelecidos os 20 minutos como tempo de centrifugação a utilizar no decurso do trabalho.

4.2.5 - Tempo de secagem das DBS

O tempo de secagem das manchas DBS foi também otimizado para garantir uma secagem completa da amostra e melhorar a extração do composto. Após uma breve revisão bibliográfica foram selecionadas 3 horas, 6 horas e *overnight* (ON).

Cada uma das extrações foi efetuada em quadruplicado, tendo-se expressado os resultados em termos de média e desvio padrão da razão área do ião quantificador do composto em estudo/área do padrão interno (gráficos 13-15).

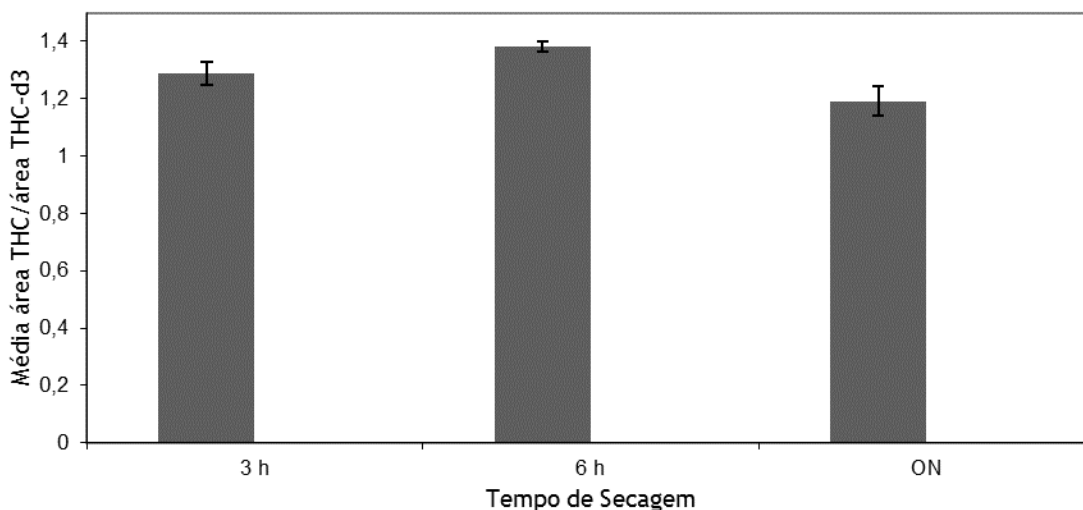


Gráfico 13 - Média e desvio-padrão da área de THC/área de THC-d₃ para os vários tempos de secagem das DBS

Aplicação de *dried blood spots* na detecção e quantificação de canabinóides por cromatografia de gases/espectrometria de massas em tandem

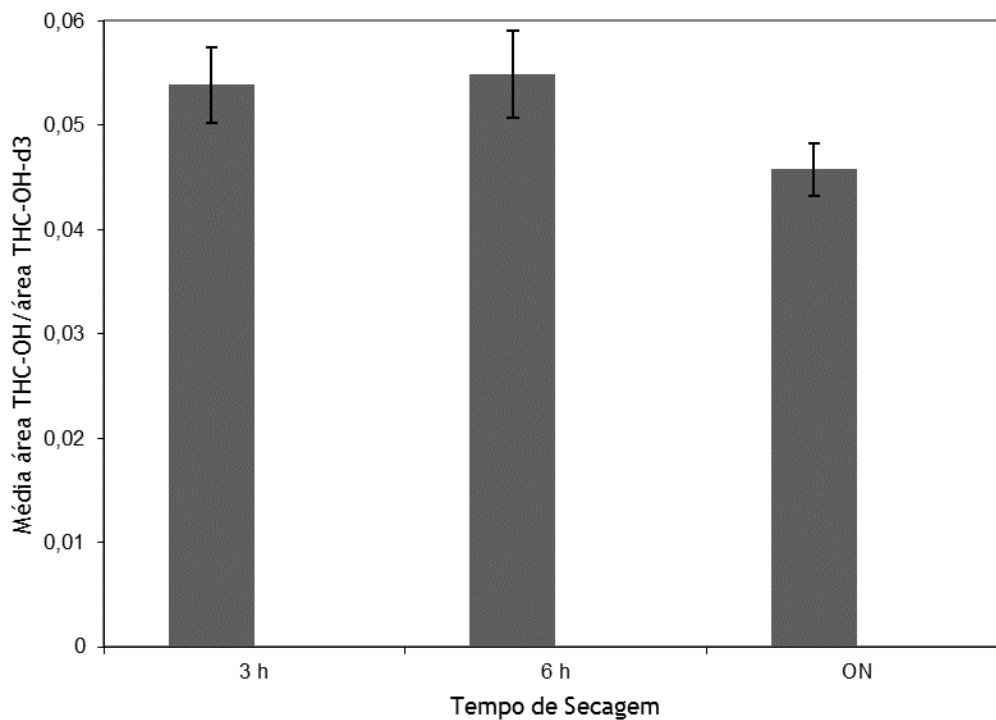


Gráfico 14 - Média e desvio-padrão da área de THC-OH/área de THC-OH-d₃ para os vários tempos de secagem das DBS

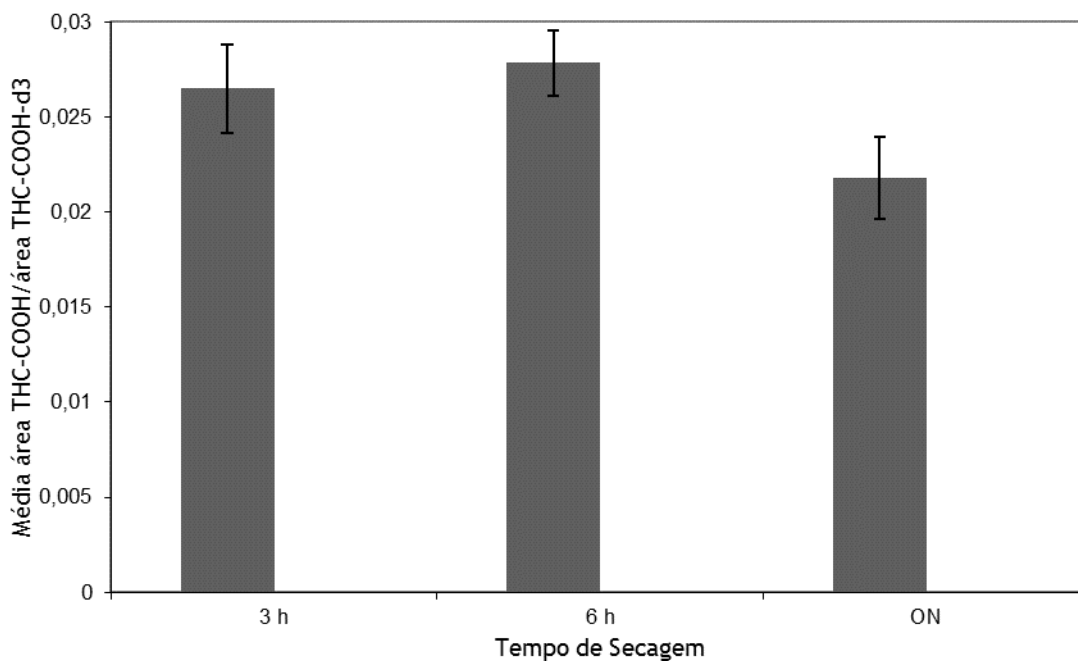


Gráfico 15 - Média e desvio-padrão da área de THC-COOH/área de THC-COOH-d₃ para os vários tempos de secagem das DBS

Por análise dos gráficos anteriores (gráficos 13-15) podemos concluir que, o tempo 6 horas foi o mais adequado para os três compostos (THC, THC-OH e THC-COOH) e o segundo melhor o de 3 horas.

De forma a confirmar estas conclusões, foram aplicados métodos estatísticos (ANOVA, Teste T e Teste F) de comparação de variáveis de forma a verificar se existem ou não diferenças estatisticamente significativas entre os tempos de 3 e 6 horas.

Da análise estatística (ver Anexo I) é possível concluir que a diferença o tempo de secagem das DBS de 3 e 6 horas para o THC e THC-COOH, não é estatisticamente significativa. Já em relação ao THC-OH, a diferença entre os dois volumes possui relevância estatística.

Após esta análise foram então estabelecidas as 6 horas como tempo de secagem das DBS a utilizar no decurso do trabalho.

Tendo em conta todos os resultados anteriormente mencionados, apresentam-se na tabela 5 as condições finais do método extrativo a serem usadas no processo de validação.

Tabela 5 - Condições finais de extração

Solvente	Metanol
Volume de sangue (DBS)	100 µL
Volume de solvente	4 mL
Tempo de extração	40 minutos
Tempo de centrifugação	20 minutos
Tempo de secagem (DBS)	6 horas

4.3. Validação

A validação de um determinado método é um processo pelo qual se demonstra que um método particular para a determinação quantitativa de analitos numa determinada amostra biológica é de confiança, reprodutível (FDA, 2001) e se adapta perfeitamente ao fim pretendido.

Assim, pretende-se demonstrar pela validação que o método que aqui se apresenta se ajusta ao propósito para o qual foi criado, a quantificação de THC, THC-OH e THC-COOH em amostras de sangue seco (DBS) e análise por GC-MS/MS.

Para isso foram então avaliados os parâmetros que a instituições como a *Food and Drug Administration* (FDA) (FDA, 2001) e a *International Conference on Harmonisation* (ICH) (ICH, 2005) consideram fundamentais, visando assim garantir a exatidão e precisão, seletividade, linearidade, recuperação, limites e estabilidade (FDA, 2001; ICH, 2005) do método.

4.3.1 - Seletividade e especificidade

A seletividade pode descrever-se como a capacidade de um método analítico para diferenciar e quantificar de forma inequívoca os analitos de interesse na presença de outros componentes da amostra (FDA, 2001).

Para além de se avaliar a existência de uma possível interferência endógena, é importante monitorizar as intensidades relativas de cada composto e por isso existe uma necessidade de se estabelecer quais os critérios de aceitação admitidos para as abundâncias relativas dos seus sinais iónicos. A abundância relativa de um ião diagnóstico, expressa como percentagem da intensidade do pico base, é determinada por integração da área do pico cromatográfico selecionado, normalizada ao pico base (WADA, 2010). A tabela 6 descreve as janelas máximas de tolerância permitidas para as abundâncias relativas dos iões monitorizados de forma a garantir uma confiança adequada na sua identificação.

Tabela 6 - Janelas máximas de tolerância permitidas para as abundâncias relativas dos iões monitorizados (Nunes, 2010)

Abundância relativa (% do pico base)	Janela máxima de tolerância permitida
> 50%	±10% (intervalo absoluto)
25% a 50%	±20% (intervalo relativo)
5% a <25%	±5% (intervalo absoluto)
<5%	±50% (intervalo relativo)

Aplicação de *dried blood spots* na detecção e quantificação de canabinóides por cromatografia de gases/espectrometria de massas em tandem

A razão entre a magnitude da resposta do instrumento para o íão de diagnóstico menos intenso e a magnitude da resposta ao ruído da linha base (razão sinal/ruído) deve ser superior a 3:1 (WADA, 2010).

Os critérios de confirmação qualitativa podem incluir ainda a avaliação do tempo de retenção relativo do composto (TrR), onde o tempo de retenção do pico de interesse é medido relativamente ao tempo de retenção de um composto de referência cromatográfica (padrão interno). O TrR do composto em análise não deve diferir mais de $\pm 1\%$ daquele do padrão interno (WADA, 2010).

Todo o sangue utilizado foi previamente analisado para garantir que este não continha THC, THC-OH e THC-COOH. Para avaliar a seletividade do método proposto foram preparadas *pools* (n=3) de sangue fortificado e sangue não contendo os padrões e por análise dos cromatogramas verificou-se que no tempo de retenção dos compostos e dos padrões internos não havia resposta no cromatograma (Figuras 12 e 13).

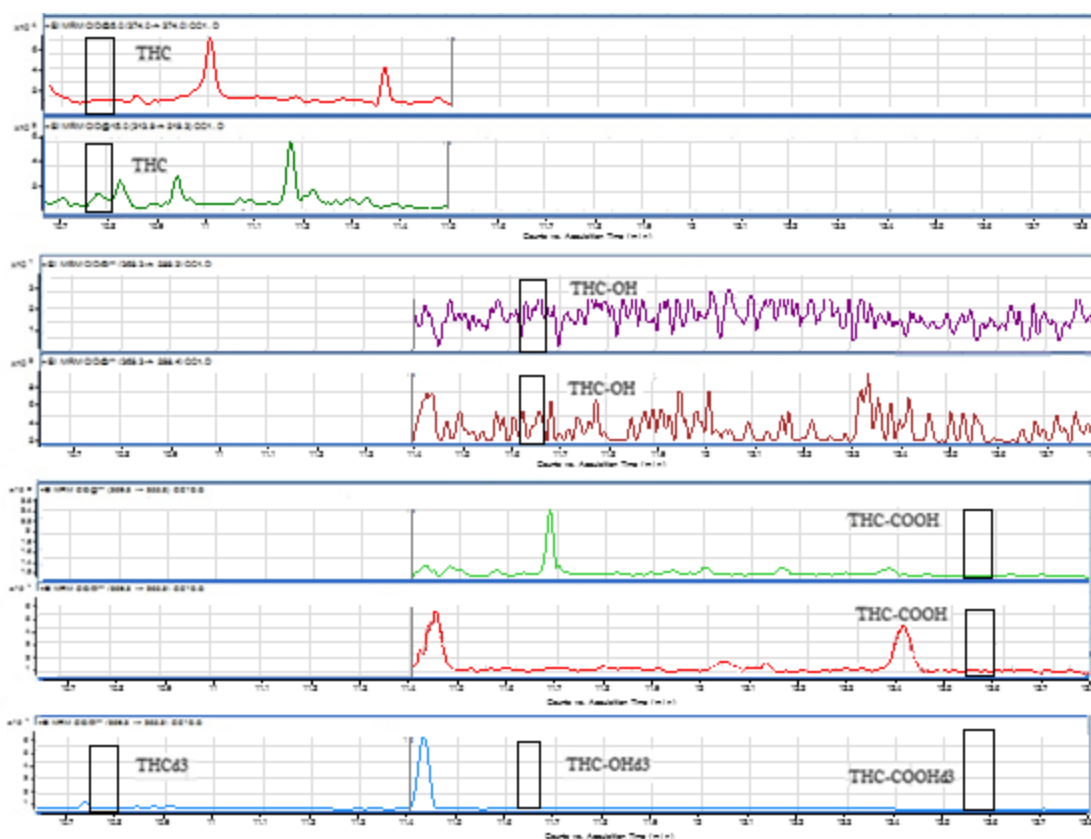


Figura 12 - Cromatograma de uma amostra branca

Aplicação de *dried blood spots* na detecção e quantificação de canabinóides por cromatografia de gases/espectrometria de massas em tandem

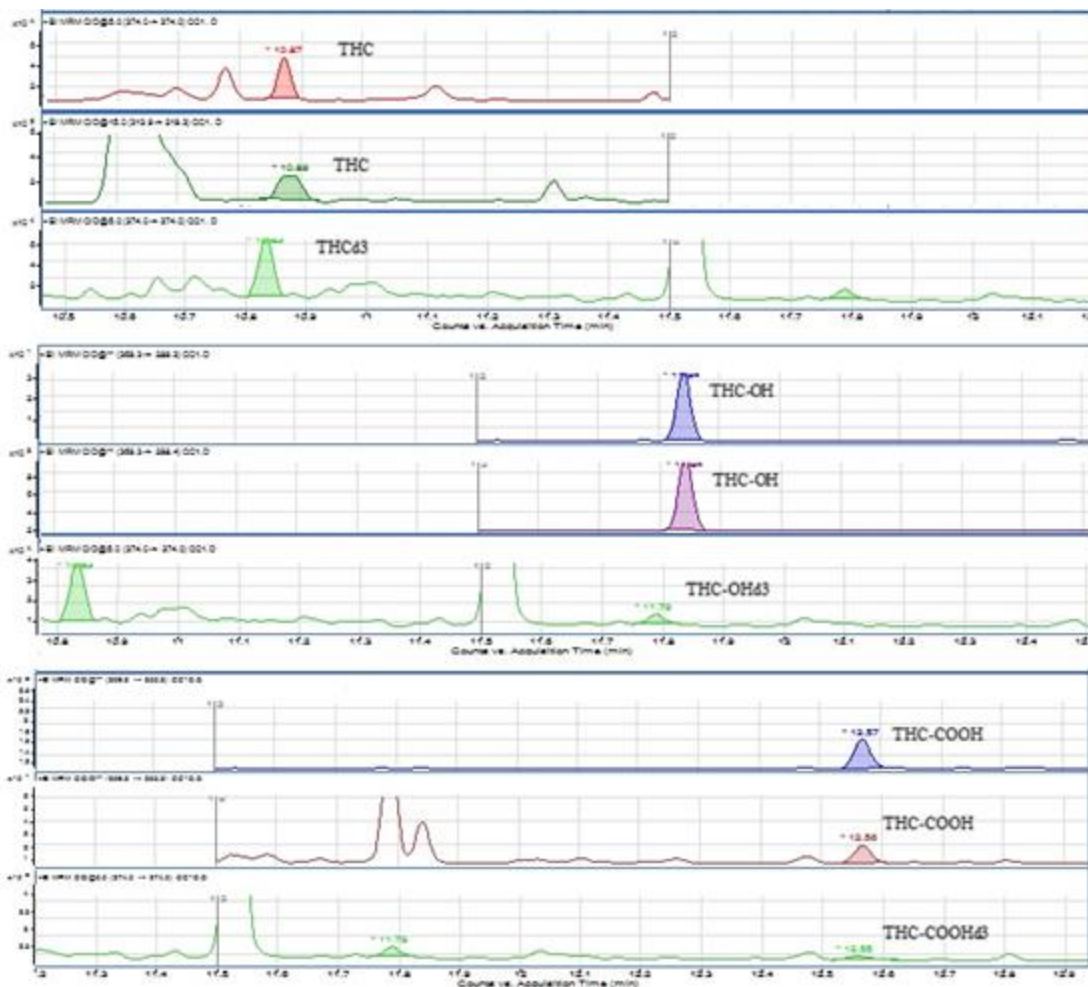


Figura 13 - Cromatograma de uma amostra fortificada com os analitos de estudo a 10 ng/mL e respetivos padrões internos a 100 ng/mL

Relativamente ao estudo da especificidade do método em questão, este foi avaliado pela análise de outras drogas que poderiam eventualmente estar presentes numa amostra biológica. As drogas utilizadas foram cocaína, opio (mistura contendo fentanil, papaverina, hidromorfona, naltrexona e 6-MAM), anfetaminas e uma mistura de ketamina, metoxetamina e piperazinas. Após análise dos cromatogramas concluiu-se que o método era específico para o THC, THC-OH e THC-COOH, pois no tempo de retenção dos mesmos não havia resposta no cromatograma para as outras drogas.

4.3.2 - Curva de calibração e linearidade

A linearidade de um método corresponde à capacidade de este fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, dentro de uma determinada faixa de concentrações (Nunes, 2010).

O intervalo de linearidade de um método é definido pelos valores para os quais se demonstrou ser possível a determinação dos valores do analito com precisão e exatidão requeridas para o método (Chiaradia, 2009).

A obtenção da linearidade é feita com recurso a amostras de analito padronizadas e é formulada como uma função matemática - Curva de calibração - (Nunes, 2010) que pode ser descrita pela equação 1:

$$y = mx + b \quad (1)$$

Onde:

- y é a resposta medida pelo detetor;
- x é a concentração do analito;
- m é o declive da Curva de Calibração;
- b é a interseção com o eixo dos yy.

Uma curva de calibração descreve a relação entre o valor da resposta experimental, e a concentração teórica dos analitos na amostra (FDA, 2001). Pode também ser definida como a função que descreve a resposta do detetor numa determinada gama de concentrações, tendo como finalidade prever a concentração do analito numa amostra de concentração desconhecida.

Para a construção da curva de calibração é necessário ter em conta o intervalo antecipado de valores analíticos espectáveis e a natureza da relação entre o analito/resposta do estudo (FDA, 2001), pois estes dois fatores são decisivos na escolha das concentrações e número de padrões a utilizar para a construção da curva.

Com o objetivo de obter as curvas de calibração, as amostras brancas foram fortificadas com todos os analitos em estudo (n=5), e foram preparadas e analisadas pelo processo anteriormente descrito. Prepararam-se 6 calibradores distribuídos uniformemente numa gama de concentrações entre 1 e 30 ng/mL. As concentrações estudadas foram 1; 5; 10; 15; 25 e 30 ng/mL. A exatidão dos dados, ao longo do intervalo de concentrações descritas, foi estudada em termos de erro relativo médio (ERM) ou *BIAS* (equação 2).

$$BIAS = \frac{\text{Concentração calculada} - \text{Concentração teórica}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad (2)$$

Ao estudar a linearidade assume-se que a variância é constante ao longo do trabalho. Só que, em grande parte dos casos, por estarmos perante intervalos de concentrações amplos, é de esperar que a variância em cada ponto da reta seja diferente, portanto a condição de

homogeneidade de variâncias, designada por homoscedasticidade, não é cumprida. Logo, as concentrações mais elevadas tendem a influenciar mais a reta de calibração, resultando na perda de exatidão, especialmente nos seus pontos mais baixos (Francisco, 2008).

Assim sendo, neste trabalho foi utilizado o modelo de regressão linear ponderada, pela forma simples e efetiva de harmonizar as discrepâncias entre as variâncias dos diferentes pontos que constituem a reta (Francico, 2008).

Dos fatores de ponderação estudados $(\frac{1}{x}; \frac{1}{x^2}; \frac{1}{y}; \frac{1}{y^2}; \frac{1}{\sqrt{x}}; \frac{1}{\sqrt{y}})$ foi determinado o mais adequado para cada analito, tendo em conta o BIAS para as várias concentrações estudadas.

Os melhores valores de BIAS foram obtidos com a ponderação $\frac{1}{x}$ para todos os compostos (THC, THC-OH e THC-COOH). Os resultados do estudo da linearidade encontram-se sumariados na tabela 7.

Tabela 7 - Dados de linearidade para os compostos em estudo (n=5)

Composto	Regressão	Gama de trabalho (ng/mL)	Linearidade (média ± SD)		R ² (média ± SD)
			Declive	Ordenada na origem	
THC	$\frac{1}{x}$	1-30	0,00075 ± 0,00100	0,02084 ± 0,02172	0,99710 ± 0,00175
THC-OH	$\frac{1}{x}$	1-30	0,00178 ± 0,00075	0,06723 ± 0,02930	0,99683 ± 0,00236
THC-COOH	$\frac{1}{x}$	1-30	0,00155 ± 0,00030	0,03668 ± 0,01345	0,99605 ± 0,00286

Foram obtidos valores de coeficientes de determinação acima de 0,99 para todos os analitos. Por forma a completar o estudo de linearidade, foram analisadas diariamente 3 amostras controlo (QC) em triplicado de baixa (2 ng/mL), média (8 ng/mL) e alta (20 g/mL) concentração.

4.3.3 - Limites de deteção e de quantificação

À concentração mínima de um analito, que um determinado método analítico pode diferenciar de modo confiável do ruído de fundo, sob as condições experimentais estabelecidas, atribui-se a designação de LOD, ou limite de deteção (FDA, 2001). Isto é, é a concentração mínima de analito visivelmente distinto de um branco e não tem que ser

Aplicação de dried blood spots na detecção e quantificação de canabinóides por cromatografia de gases/espectrometria de massas em tandem

necessariamente quantificada. A ICH indica que a determinação da relação sinal-ruído pode ser avaliada por comparação do sinal de amostras de concentrações mais baixas e conhecidas com amostras não contendo o analito, ou seja brancos, estabelecendo-se dessa forma a concentração mínima à qual o analito pode ser detetado. Esta relação é geralmente descrita por um rácio de 3:1, no entanto, o rácio de 2:1 é também considerado aceitável (ICH, 2005).

Já o limite inferior de quantificação (LLOQ) é definido pela quantidade mínima de analito na amostra que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão adequadas (FAD, 2001).

Ainda segundo a FDA, para a aceitação do padrão mais baixo da curva de calibração como limite de detecção, as seguintes condições devem estar reunidas (FAD, 2001):

- A resposta ao analito deve ser identificável, discreta e reprodutível com uma precisão de $\pm 20\%$ e exatidão entre 80 - 120%.

Para os LLOQ, considerou-se como a concentração mais baixa das curvas de calibração de cada composto, de acordo com as condições anteriormente referidas. Apresenta-se na tabela 8 um resumo das características dos LLOQ de cada composto.

Tabela 8 - Características dos LLOQ de cada composto (n=5)

Composto	LLOQ (ng/mL)	C.V (%)	BIAS (%)
THC	1	18,9	-6,4
THC-OH	1	0,29	2,8
THC-COOH	1	0,31	-0,76

Os limites de quantificação foram de 1 ng/mL para todos os compostos.

Relativamente ao LOD, como referido anteriormente, este define-se como a menor quantidade de analito detetável numa amostra, não sendo necessária a sua quantificação como um valor exato (FDA, 2001). No presente estudo, este parâmetro não foi avaliado de forma sistemática pelo que foi assumido como LOD a mesma concentração obtida para o LLOQ, ou seja, 1 ng/mL.

Na bibliografia disponível não se encontraram publicados trabalhos que apresentem a junção de DBS com GC-MS/MS como técnica analítica para análise dos compostos estudados neste trabalho. Efetuando uma pesquisa na literatura científica sobre todos os trabalhos publicados encontrados que abordavam a quantificação de THC, THC-OH e THC-COOH, as amostras mais frequentemente usadas eram plasma, cabelo ou soro, mas os DBS avaliam o sangue total. O LOD aceite normalmente para o método cromatográfico usado associado aos compostos avaliados, é de 0,5 ng/mL, em trabalhos como o desenvolvido por Röhrich, *et al.*, 2010, que quantificaram THC, THC-OH e THC-COOH em sangue e urina usando duas técnicas de imunoensaios para preparação das amostras, Cedia Dau e Inspec, e GC/MS. os LODs obtidos nesse trabalho foram de 0,5 ng/mL para THC e THC-OH e de 5 ng/mL para o THC-COOH (Röhrich, *et al.*, 2010). Já no método cromatográfico utilizado por Purschke, *et al.*, 2016, onde foi quantificado THC, THC-OH e THC-COOH em soro, usando extração líquido-líquido e GC/MS, obtiveram LODs de 0,3 µg/mL para THC, 0,1 µg/mL para THC-OH e de 0,3 µg/mL (Purschke, *et al.*, 2016). É de salientar que estes autores usaram volumes de amostra de sangue e soro muito superiores (400 µL e 1000 µL, respetivamente) ao volume utilizado no presente trabalho (100µL). Ainda relativamente á técnicas miniaturizadas, Rosado, *et al.*, 2016 conseguiu-se quantificar e detetar os compostos em estudo a concentrações de 0,1 ng/mL usando 250 µL de plasma por Microextração em fase sólida (MEPS) e GC/MS-MS (Rosado, *et al.*, 2016). Na tabela 9 encontram-se resumidos alguns métodos analíticos com recurso a técnicas miniaturizadas (as mais próximas aos DBS tendo em conta o volume de amostra) na base de dados pública Pubmed (base de dados bibliográficos da National Library of Medicine), limitada a artigos científicos publicados entre janeiro de 2000 e agosto de 2016. Foram utilizadas as seguintes palavras-chave: “tetrahydrocannabinol and microextraction” e “cannabinoids and microextraction” (Tabela 9).

Tabela 9 - Métodos analíticos para determinação de canabinóides em amostras de sangue e derivados, usando técnicas microextrativas para a preparação da amostra

Analito(s)	Amostra (volume)	Técnica de extração	Método analítico - sistema de detecção	LLOQ	Recuperação (%)	Referência
THC CBD	Sangue (1,2 g)	SPMEM	LC-MS	n.d.	n.d.	Yang <i>et al.</i> (2006)
THC THC-OH THC-COOH	Sangue (250 µl)	MEPS	GC-MS/MS	0,1 ng/mL	53-78 57-66 62-65	Rosado <i>et al.</i> (2016)
THC THC-OH THC-COOH	Sangue (200 µl)	DPX	LC-MS/MS	0,5 µg/L	59,9-58,7 78,6-79,5 71,3-72,1	Scheidweiler <i>et al.</i> (2016)
THC	Sangue (100 µl)	SLE	LC-MS	1 ng/mL	80	Rositano <i>et al.</i> (2016)

CBD, canabidiol; LC (liquid chromatography), cromatografia líquida; MS (mass spectrometry), espectrometria de massas; GC (gas chromatography), cromatografia gasosa; MEPS (microextraction by packed sorbent), microextração em seringa empacotada; MS/MS (tandem mass spectrometry), espectrometria de massas em tandem; DPX (disposable pipette extraction); n.d., não definido; SLE (supported liquid extraction); SPMEM (solid phase microextraction membrane), microextração por membrana em fase sólida; THC, delta-9- tetrahydrocannabinol; THC-COOH, 11-Nor-9 carboxi-delta-9-tetrahydrocannabinol; THC-OH, 11-hidroxi-delta-9-tetrahydrocannabinol.

Embora não se tenha conseguido chegar à concentração mínima de 0,5 ng/mL descrita na literatura, a concentração de 1 ng/mL está ainda dentro do aceitável, tal pode ter acontecido pela quantidade de interferentes existentes na mancha de sangue total que não se conseguem remover, fazendo com que as concentrações mais baixas os cromatogramas apresentem algum ruído.

4.3.4 - Precisão e exatidão

A precisão de um método analítico expressa o grau de concordância entre as medições individuais de um analito, quando o procedimento é aplicado de forma repetida a múltiplas alíquotas de um único volume homogêneo da matriz (FDA, 2001; ICH 2005). No decorrer da validação foram estudadas a precisão intra-dia e a precisão inter-dia.

A repetibilidade, representa o grau de concordância entre resultados de medições sucessivas de diversas amostras efetuadas obedecendo às mesmas condições (Ex: operador, dia, equipamento e laboratório). Normalmente avalia-se a precisão intra-dia, já que o estudo é efectuado num mesmo dia. Já a avaliação da reprodutibilidade envolve a variação de certas condições previamente definidas, tais como; diferentes dias, analistas ou equipamentos. Por

razões práticas, é normal variar-se apenas o dia de análise, avaliando-se a precisão inter-dia. A precisão é expressa habitualmente em termo de coeficiente de variação (CV; %).

A exatidão de um método descreve o grau de proximidade entre as médias dos resultados obtidos, com o método e o verdadeiro valor de concentração dos analitos na amostra. É determinada pela análise de réplicas de amostras que contêm quantidade conhecidas do analito. O resultado da exatidão é apresentado em termos de erro relativo médio (ERM) ou BIAS (FDA, 2001).

A precisão deve ser avaliada usando no mínimo cinco réplicas por concentração, com um mínimo de três concentrações na gama das concentrações usadas na linearidade da amostra (FDA, 2001). Deste modo, para análise da precisão intra-dia e exatidão, foram fortificadas amostras de sangue humano com todos os analitos em estudo a concentrações de 1, 10 e 30 ng/mL (amostras controlo). Para cada uma das concentrações foram efetuadas cinco réplicas, procedendo-se em seguida à extração e avaliação da concordância entre as medições efetuadas no mesmo dia. Os resultados encontram-se expressos na tabela 10.

Tabela 10 - Precisão intra-dia e exatidão (n=5)

Composto	Concentração (ng/mL)	C.V (%)	BIAS (%)
THC	1	8,1	-6,40
	10	6,70	-1,77
	30	7,13	3,44
THC-OH	1	0,29	2,84
	10	3,36	8,27
	30	5,21	3,29
THC-COOH	1	0,31	-0,76
	10	5,53	-0,21
	30	4,27	-1,53

Os coeficientes de variação obtidos na análise intra-dia encontram-se abaixo de 10% para todas as concentrações testadas nos três compostos (THC, THC-OH e THC-COOH). Em relação à exatidão, os valores de *BIAS* encontram-se todos dentro do intervalo de $\pm 15\%$ da concentração nominal, que é o intervalo de valores que a FDA (ICH, 2005) considera como aceitáveis no estudo da exatidão.

Para análise da precisão inter-dia e exatidão, foram preparadas e analisadas num espaço de 7 dias, amostras de sangue humano fortificado com os analitos em estudo a concentrações de 2, 8 e 20 ng/mL (amostras controlo). Para cada uma das concentrações foram efetuadas três réplicas. Os resultados encontram-se expressos na tabela 11.

Tabela 11 - Precisão inter-dia e exatidão (n=3)

Composto	Concentração (ng/mL)	C.V (%)	BIAS (%)
THC	2	5,5	7,59
	8	1,77	7,44
	20	3,38	1,51
THC-OH	2	0,55	-5,34
	8	2,5	5,49
	20	0,42	8,88
THC-COOH	2	0,44	4,12
	8	0,49	-13,11
	20	1,43	14,14

Os coeficientes de variação obtidos na análise intra-dia encontram-se abaixo de 8% para todas as concentrações testadas nos três compostos (THC, THC-OH e THC-COOH). Em relação à exatidão, os valores de *BIAS* encontram-se todos dentro do intervalo de $\pm 15\%$ da concentração nominal, que é o intervalo de valores que a FDA (ICH, 2005) considera como aceitáveis no estudo da exatidão.

4.3.5 - Recuperação

A recuperação de um analito a partir de uma amostra, ou rendimento de extração, descreve a relação em percentagem entre a resposta obtida pelo detetor na análise de uma quantidade de analito adicionado e extraído da matriz biológica e a resposta obtida para a quantidade de analito teoricamente presente na matriz, servindo desta forma para avaliar a eficiência de extração de um método analítico (FDA, 2001).

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{\text{Área do pico do analito sujeito a extração}}{\text{Área do pico do analito não sujeito a extração}} \times 100 \quad (3)$$

Aplicação de *dried blood spots* na detecção e quantificação de canabinóides por cromatografia de gases/espectrometria de massas em tandem

Para calcular a recuperação foram fortificadas, com os analitos em estudo, três amostras de sangue humano às concentrações de 1, 10 e 30 ng/mL, seguindo-se a extração e posterior adição dos padrões internos. Para as amostras correspondentes a 100% de recuperação, a análise foi efetuada em extratos de matriz aos quais só posteriormente foram adicionados os compostos e padrões internos. Em ambos os casos cada uma das concentrações foi preparada e analisada em triplicado, e os resultados deste estudo encontram-se na tabela 12.

Tabela 12 - Percentagem de recuperação de cada um dos compostos em estudo, calculada para 3 níveis de concentração (n=3).

Concentração (ng/mL)	Recuperação (% ± SD %)		
	THC	THC-OH	THC-COOH
1	86,37 ± 2,92	14,52 ± 0,07	21,49 ± 1,42
10	87,18 ± 4,72	33,91 ± 0,95	38,46 ± 2,74
30	88,59 ± 0,66	31,32 ± 1,54	50,17 ± 1,43

Segundo a FDA, a recuperação define-se como a eficiência de um método analítico, dentro dos limites da variabilidade. Esta não necessita de ser 100%, mas a extensão da recuperação de um analito e do padrão interno deve ser consistente, precisa e reprodutível (FDA, 2001). Das recuperações obtidas destacam-se as do THC, entre 86 e 88%, por serem bastante mais elevadas que as dos restantes compostos, que tiveram recuperações de 21 a 50% para o THC-COOH e 14 a 31% para o THC-OH, tendo este último registado as recuperações mais baixas. É difícil estimar ao certo as médias das recuperações quando se usam DBS, no entanto estas podem ser comparadas com outros trabalhos, como o de Lawson, *et al.*, 2012, que analisaram cafeína em DBS, por LC-MS, e obtiveram recuperações que se situavam entre 44 e 47% (Lawson, *et al.*, 2012). Meesters, *et al.*, 2011, analisaram nevirapina e o seu análogo isotópico também em DBS, por ionização/dessorção a laser assistida por matriz (MALDI), e neste caso as recuperações variaram entre os 11 e os 107% (Meesters, *et al.*, 2011). Page-Sharp, *et al.*, 2016, estudaram mais recentemente a ceftriaxona em DBS, por LC-MS/MS, e obtiveram recuperações que se situaram entre os 79 e os 87% (Page-Sharp, *et al.*).

É de salientar que este é o primeiro estudo que aborda a quantificação do THC, THC-OH e THC-COOH com recurso às DBS, pelo que não é possível efetuar uma comparação concreta

relativamente ao uso das mesmas na determinação destes compostos, uma vez que a recuperação é influenciada pelos compostos que são extraídos.

4.3.6 - Estabilidade

A estabilidade de um composto numa amostra biológica pode ser afetada por inúmeros fatores, entre os quais propriedades físico-químicas dos analitos, as condições de armazenamento, as propriedades da matriz e o tipo de embalagem (FDA, 2001).

No presente trabalho foram avaliadas no decorrer da validação a estabilidade em amostras processadas, a estabilidade de longa duração e ainda a estabilidade a ciclos de congelação/descongelação.

4.3.6.1 - Estabilidade em amostras processadas

A estabilidade em amostras processadas foi estudada com recurso a três concentrações de 2, 8 e 20 ng/mL (triplicado para cada uma das concentrações). Após todo o procedimento extrativo, os extratos foram guardados a 4 °C durante vinte e quatro horas e re-injetados após esse tempo.

Os resultados obtidos por análise destas amostras foram então avaliados e comparados (em termos de CV e BIAS) com os resultados obtidos pela análise de amostras nas mesmas concentrações, mas extraídas e injetadas no sistema cromatográfico no mesmo dia. Foi considerado como critério de aceitação, o mesmo critério utilizado para o cálculo da precisão e exatidão, isto é os valores de CV ($\leq 15\%$) e BIAS (dentro do intervalo de $\pm 15\%$ da concentração nominal), que é o intervalo de valores que a FDA ^[20] considera como aceitáveis no estudo da exatidão e precisão.

Neste caso, os coeficientes de variação obtidos foram inferiores a 14% e os BIAS situaram-se num intervalo de $\pm 15\%$ para todos os compostos nas três concentrações testadas. Podemos assim afirmar que estes são estáveis em amostras processadas pelo menos durante um período de vinte e quatro horas. Os resultados encontram-se na tabela 13.

Tabela 13 - Resumo dos resultados do estudo de estabilidade de amostras processadas (n=3)

Composto	Concentração (ng/mL)	C.V (%)	BIAS (%)
THC	2	14,1	-2,93
	8	1,59	11,65
	20	2,98	-10,85
THC-OH	2	0,20	7,86
	8	0,53	7,45
	20	1,25	-5,97
THC-COOH	2	1,73	-4,76
	8	0,41	14,49
	20	3,53	8,15

4.3.6.2 - Estabilidade de longa duração

O estudo da estabilidade dos compostos nas manchas DBS, foi feito a três concentrações 2, 8 e 20 ng/mL (triplicado para cada uma das concentrações). As amostras colocadas nos cartões DBS foram deixadas dentro de uma gaveta à temperatura ambiente e sem contacto com a luz, guardadas durante uma semana, após esse tempo, os compostos foram extraídos e analisados.

Os resultados provenientes da análise destas amostras foram então comparados, em termos de coeficiente de variação e BIAS, com os resultados obtidos na análise de amostras processadas no mesmo dia. Os coeficientes de variação obtidos foram inferiores a 6% e os BIAS situaram-se num intervalo de ± 13 para as várias concentrações estudadas, pelo que podemos afirmar que os compostos são estáveis nas DBS à temperatura ambiente e num local sem luz, pelo menos durante uma semana. Os resultados encontram-se resumidos na tabela 14.

Tabela 14 - Resumo dos resultados do estudo de estabilidade de longa duração (n=3)

Composto	Concentração (ng/mL)	C.V (%)	BIAS (%)
THC	2	5,94	-13,14
	8	3,02	2,32
	20	4,95	-12,87
THC-OH	2	0,47	-4,30
	8	2,34	6,51
	20	5,63	-7,56
THC-COOH	2	0,27	-7,01
	8	1,46	-5,84
	20	5,71	4,49

4.3.6.3 - Estabilidade a ciclos de congelação/descongelação

A determinação da estabilidade a ciclos de congelação/descongelação foi estudada para três concentrações 2, 8 e 20 ng/mL (triplicado para cada uma das concentrações). Estas amostras foram submetidas a três ciclos de congelação/descongelação, com um intervalo mínimo de 12 horas entre cada ciclo, seguidamente procedeu-se à extração dos compostos.

Os coeficientes de variação obtidos foram inferiores a 8% e os BIAS situaram-se num intervalo de ± 15 para as várias concentrações estudadas, pelo que podemos afirmar que os compostos são estáveis a pelo menos três ciclos de congelação/descongelação. Os resultados encontram-se na tabela 15.

Tabela 15 - Resumo dos resultados do estudo da estabilidade a ciclos de congelação e descongelação (n=3).

Composto	Concentração (ng/mL)	C.V (%)	BIAS (%)
THC	2	8,15	14,60
	8	3,69	8,28
	20	7,81	-2,68
THC-OH	2	1,49	-12,74
	8	2,92	4,32
	20	3,32	10,42
THC-COOH	2	1,06	-13,80
	8	4,61	-7,07
	20	2,37	11,69

4.3.6.4 - Estabilidade ambiente de armazenamento do sangue fortificado

Para análise final de estabilidade, foram ainda preparadas amostras de concentração 2, 8 e 20 ng/mL (triplicado para cada uma das concentrações). Após fortificação do sangue, este foi deixado na bancada por um período de vinte e quatro horas, para analisar a perda do composto quando o sangue é esquecido fora do congelador.

Após análise dos cromatogramas, não se encontrou praticamente nenhum sinal dos três compostos em questão, o que significa que estes se podem ter degradado nestas condições de armazenamento.

4.4. Aplicação do método a amostra real

Uma parte integrante e fundamental do processo de validação é a aplicação do método em estudo a amostras reais para detecção e quantificação dos analitos de interesse.

Pela dificuldade em arranjar voluntários, foi obtida apenas uma amostra real para se avaliar se um determinado indivíduo tinha consumido este tipo de droga de abuso. O sangue recolhido foi testado em triplicado pelo método em questão, no entanto com resultado negativo. Deste modo, chegou-se à conclusão que o indivíduo não teria consumido canábis recentemente, ou não era consumidor. Na figura 14 é apresentado o cromatograma obtido pela análise dessa amostra e está indicado o lugar onde o composto deveria aparecer.

Aplicação de *dried blood spots* na detecção e quantificação de canabinóides por cromatografia de gases/espectrometria de massas em tandem

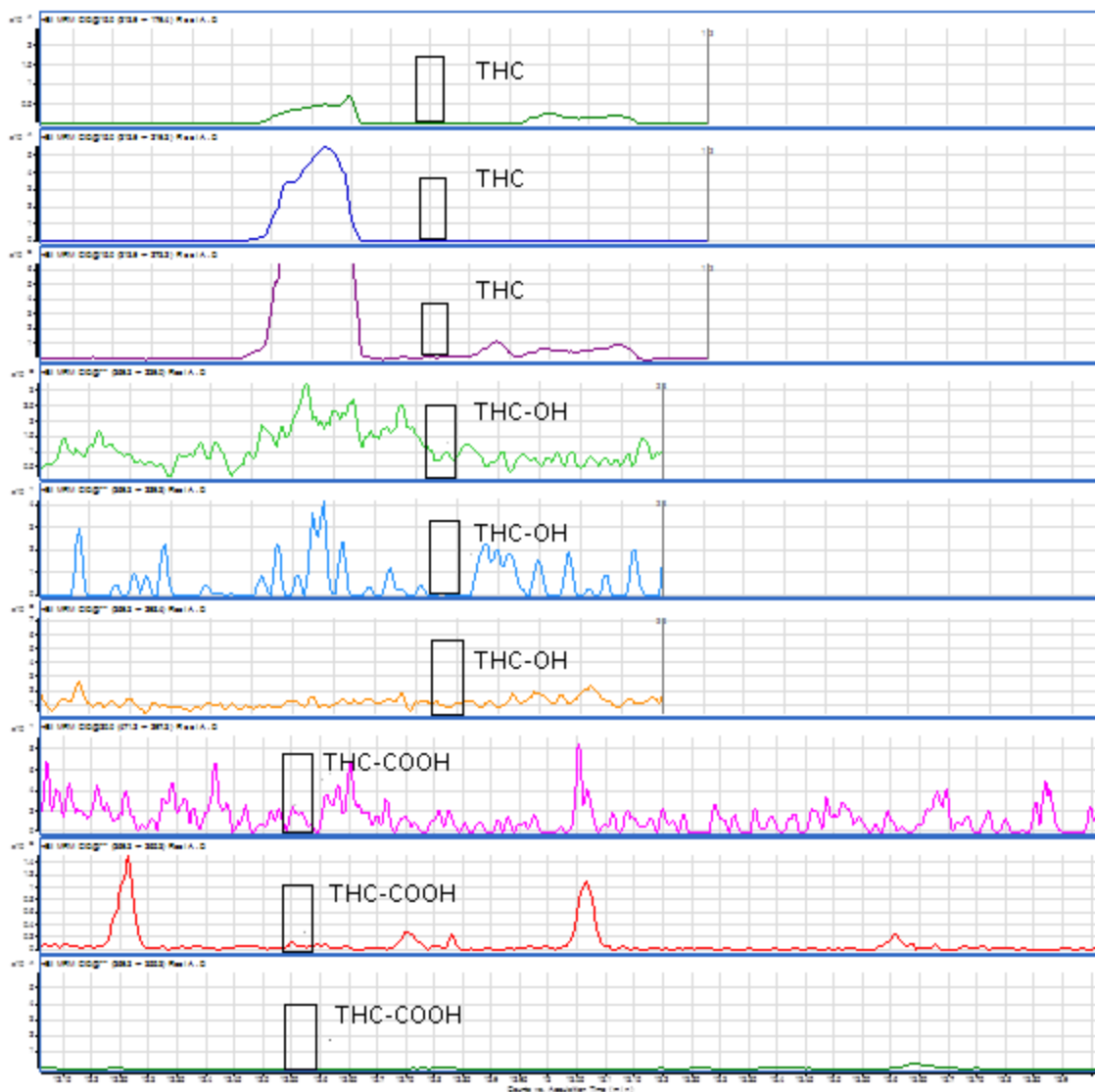


Figura 14 - Cromatograma relativo à amostra real.

5. Conclusões

1. O método analítico apresentado baseia-se no uso de amostragem por *dried blood spots* (DBS) associada à análise por cromatografia gasosa acoplada de um detetor de espectrometria de massa em tandem, para a determinação quantitativa e qualitativa de delta-9-tetrahydrocannabinol, 11-hidroxi- delta-9-tetrahydrocannabinol e 11-nor-9-carboxi-delta-9-tetrahydrocannabinol em amostras de sangue humano.
2. A metodologia apresentada demonstrou ser seletiva, sensível, precisa, exata e linear dentro do intervalo de concentrações estudado, segundo os critérios internacionalmente aceites (FDA e ICH) para validação de métodos bioanalíticos.
3. Os principais fatores suscetíveis de influenciar o processo de extração foram otimizados para assim maximizar a recuperação e obter limites de detecção e quantificação adequados.
4. O método analítico proposto é sensível, obtendo-se limites de detecção de 1 ng/mL para todos os compostos analisados utilizando apenas 100 µL de amostra.
5. Esta técnica revelou ser uma alternativa a considerar para quantificação de analitos, uma vez que o tratamento da amostra é relativamente simples graças ao uso de DBS, bastando colocar o sangue fortificado na mancha e deixar secar, e a quantidade de amostra usada é baixo (100 µL).
6. A grande desvantagem encontrada associada a este método prende-se com o tempo de secagem das manchas (6h), que tornam a técnica mais morosa que o habitual.
7. Com os resultados apresentados, podemos afirmar que a metodologia proposta pode tornar-se uma ferramenta vantajosa tanto no âmbito de análise de toxicologia clínica e forense, como em análise de despiste de consumo de canábis e derivados.
8. É também importante salientar que este é o primeiro estudo que permite identificar e quantificar estes compostos usando amostragem por DBS.

6. Referências Bibliográficas

- Andås HT, Krabseth HM, Enger A, Marcussen BN, Haneborg AM, Christophersen AS, et al. Detection time for THC in oral fluid after frequent cannabis smoking. *Ther Drug Monit.* 2014;36(6):808-14.
- Atakan Z. Cannabis, a complex plant: different compounds and different effects on individuals. *Ther Adv Psychopharmacol.* 2012;2(6):241-54.
- Bang I. Ein verfahren zur mikrobestimmung von blutbestandteilen. *Biochem Ztschr.* 1913;49:19-39
- Chiaradia MC. Desenvolvimento, Validação e Aplicação de Métodos para Análise Multiresidual de Agrotóxicos em suco de laranja e tangerina utilizando CLAE-DAD, CL-EM-EM e CLUE-DAD, in [Tese de Doutorado]. 2009, Universidade Estadual de Campinas.
- Chiarotti M, Costamagna L. Analysis of 11-nor-9-carboxy-delta(9)-tetrahydrocannabinol in biological samples by gas chromatography tandem mass spectrometry (GC/MS-MS). *Forensic Sci Int.* 2000;114(1):1-6.
- Choi H, Baeck S, Kim E, Lee S, Jang M, Lee J, et al. Analysis of cannabis in oral fluid specimens by GC-MS with automatic SPE. *Sci Justice.* 2009;49(4):242-6.
- Clark PA, Capuzzi K, Fick C. Medical marijuana: medical necessity versus political agenda. *Med Sci Monit.* 2011;17(12):RA249-61.
- Concheiro M, Lendoiro E, de Castro A, González-Colmenero E, Concheiro-Guisan A, Peñas-Silva P, et al. Bioanalysis for cocaine, opiates, methadone, and amphetamines exposure detection during pregnancy. *Drug Test Anal.* 2016. doi: 10.1002/dta.2087
- Console-Bram L, Marcu J, Abood ME. Cannabinoid receptors: nomenclature and pharmacological principles. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2012;38(1):4-15.
- Cook J, Lloyd-Jones DM, Ogden E, Bonomo Y. Medical use of cannabis: an addiction medicine perspective. *Intern Med J.* 2015;45(6):677-80.
- De Almeida Francisco AM. Estudo da Lamotrigina em Doentes Epilépticos Submetidos a Monitorização Vídeo-Electroencefalográfica, in [Tese de Doutorado]. 2008, Universidade de Coimbra.
- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. Portugal country overview [Online].2016. Disponível em: <http://www.emcdda.europa.eu/countries/portugal>.

Aplicação de *dried blood spots* na detecção e quantificação de canabinóides por cromatografia de gases/espectrometria de massas em tandem

- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. Synthetic cannabinoids and 'Spice' drug profile. [Online].2016. Disponível em: <http://www.emcdda.europa.eu/publications/drug-profiles/synthetic-cannabinoids>.
- Evans C, Arnold M, Bryan P, Duggan J, James CA, Li W, et al. Implementing dried blood spot sampling for clinical pharmacokinetic determinations: considerations from the IQ Consortium Microsampling Working Group. *AAPS J.* 2015;17(2):292-300.
- Fattore L, Fratta W. Beyond THC: The New Generation of Cannabinoid Designer Drugs. *Front Behav Neurosci.* 2011;5:60.
- Food and Drug Administration. Guidance for industry - Bionalytical Method Validation. [Online]. 2001. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070107.pdf>.
- Fraser AD, Worth D. Monitoring urinary excretion of cannabinoids by fluorescence-polarization immunoassay: a cannabinoid-to-creatinine ratio study. *Ther Drug Monit.* 2002;24(6):746-50.
- Funada M. [Pharmacological properties and dependence liabilities of synthetic cannabinoids]. *Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi.* 2010;45(3):167-74.
- Galand N, Ernouf D, Montigny F, Dollet J, Pothier J. Separation and identification of cannabis components by different planar chromatography techniques (TLC, AMD, OPLC). *J Chromatogr Sci.* 2004;42(3):130-4.
- Garcia Boy R, Henseler J, Mattern R, Skopp G. Determination of morphine and 6-acetylmorphine in blood with use of dried blood spots. *Ther Drug Monit.* 2008;30(6):733-9.
- Garry A, Rigourd V, Amirouche A, Fauroux V, Aubry S, Serreau R. Cannabis and breastfeeding. *J Toxicol.* 2009;2009:596149.
- Grant I, Atkinson JH, Gouaux B, Wilsey B. Medical marijuana: clearing away the smoke. *Open Neurol J.* 2012;6:18-25.
- Greydanus DE, Hawver EK, Greydanus MM, Merrick J. Marijuana: current concepts(†). *Front Public Health.* 2013;1:42.
- Grotenhermen F, Müller-Vahl K. The therapeutic potential of cannabis and cannabinoids. *Dtsch Arztebl Int.* 2012;109(29-30):495-501.
- Guthrie R, Susi A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics.* 1963;32:338-43.
- Huestis MA. Human cannabinoid pharmacokinetics. *Chem Biodivers.* 2007;4(8):1770-804.

Aplicação de *dried blood spots* na detecção e quantificação de canabinóides por cromatografia de gases/espectrometria de massas em tandem

- Huestis MA, Cone EJ. Relationship of Delta 9-tetrahydrocannabinol concentrations in oral fluid and plasma after controlled administration of smoked cannabis. *J Anal Toxicol.* 2004;28(6):394-9.
- International Conference on Harmonization. Validation of Analytical Procedures: Methodology ICH Q2 B. [Online]. 2005. Disponível em: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf.
- Judd A, Parry J, Hickman M, McDonald T, Jordan L, Lewis K, et al. Evaluation of a modified commercial assay in detecting antibody to hepatitis C virus in oral fluids and dried blood spots. *J Med Virol.* 2003;71(1):49-55.
- Karila L, Roux P, Rolland B, Benyamina A, Reynaud M, Aubin HJ, et al. Acute and long-term effects of cannabis use: A review. *Current Pharmaceutical Design.* 2014; 20(25), 4112-4118
- Kim JY, Cheong JC, Kim MK, Lee JI, In MK. Simultaneous determination of amphetamine-type stimulants and cannabinoids in fingernails by gas chromatography-mass spectrometry. *Arch Pharm Res.* 2008;31(6):805-13.
- Kneisel S, Speck M, Moosmann B, Auwärter V. Stability of 11 prevalent synthetic cannabinoids in authentic neat oral fluid samples: glass versus polypropylene containers at different temperatures. *Drug Test Anal.* 2013;5(7):602-6.
- Kolliakou A, Ismail K, Atakan Z. Why do psychotic patients use cannabis? Case series. *Curr Pharm Des.* 2012;18(32):4950-9.
- Lawson G, Patel P, Mulla H, Tanna S. Dried blood spot sampling with LC-MS analysis for routine therapeutic caffeine monitoring in neonates. *ISRN Chromatography.* 2012; 828719, 7 pages.
- Lehmann S, Delaby C, Vialaret J, Ducos J, Hirtz C. Current and future use of "dried blood spot" analyses in clinical chemistry. *Clin Chem Lab Med.* 2013;51(10):1897-909.
- Lenk G, Hansson J, Beck O, Roxhed N. The effect of drying on the homogeneity of DBS. *Bioanalysis.* 2015;7(16):1977-85.
- Lenk G, Sandkvist S, Pohanka A, Stemme G, Beck O, Roxhed N. A disposable sampling device to collect volume-measured DBS directly from a fingerprick onto DBS paper. *Bioanalysis.* 2015;7(16):2085-94.
- Lin CN, Strathmann FG. Elevated urine zinc concentration reduces the detection of methamphetamine, cocaine, THC and opiates in urine by EMIT. *J Anal Toxicol.* 2013;37(9):665-9.

Aplicação de *dried blood spots* na detecção e quantificação de canabinóides por cromatografia de gases/espectrometria de massas em tandem

- Lowe RH, Abraham TT, Darwin WD, Hering R, Cadet JL, Huestis MA. Extended urinary Delta9-tetrahydrocannabinol excretion in chronic cannabis users precludes use as a biomarker of new drug exposure. *Drug Alcohol Depend.* 2009;105(1-2):24-32.
- McDade TW, Williams S, Snodgrass JJ. What a drop can do: dried blood spots as a minimally invasive method for integrating biomarkers into population-based research. *Demography.* 2007;44(4):899-925.
- Mee JM, Korth J, Halpern B, James LB. Rapid and quantitative blood amino acid analysis by chemical ionization mass spectrometry. *Biomed Mass Spectrom.* 1977;4(3):178-81.
- Meesters R, Hooff G, van Huizen N, Gruters R, Luijckx T. Impact of internal standard addition on dried blood spot analysis in bioanalytical method development. *Bioanalysis.* 2011;3(20):2357-64.
- Mei JV, Alexander JR, Adam BW, Hannon WH. Use of filter paper for the collection and analysis of human whole blood specimens. *J Nutr.* 2001;131(5):1631S-6S.
- Mercolini L, Mandrioli R, Protti M, Conti M, Serpelloni G, Raggi MA. Monitoring of chronic Cannabis abuse: an LC-MS/MS method for hair analysis. *J Pharm Biomed Anal.* 2013;76:119-25.
- Mounteney J, Griffiths P, Sedefov R, Noor A, Vicente J, Simon R. The drug situation in Europe: an overview of data available on illicit drugs and new psychoactive substances from European monitoring in 2015. *Addiction.* 2016;111(1):34-48.
- Nishio H, Kodama S, Yokoyama S, Matsuo T, Mio T, Sumino K. A simple method to diagnose adrenoleukodystrophy using a dried blood spot on filter paper. *Clin Chim Acta.* 1986;159(1):77-82.
- Nunes AM. Validação de Métodos Analíticos. [Online]. 2010. Disponível em: http://www.cpact.embrapa.br/eventos/2010/met/palestras/26/261010_PALESTRA3_ADRIANE_NUNES.pdf.
- Page-Sharp M, Nunn T, Salman S, Moore BR, Batty KT, Davis TM, et al. Validation and Application of a Dried Blood Spot Ceftriaxone Assay. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(1):14-23.
- Parker SP, Cubitt WD. The use of the dried blood spot sample in epidemiological studies. *J Clin Pathol.* 1999;52(9):633-9.
- Purschke K, Heintz S, Lerch O, Erdmann F, Veit F. Development and validation of an automated liquid-liquid extraction GC/MS method for the determination of THC, 11-OH-THC, and free THC-carboxylic acid (THC-COOH) from blood serum. *Anal Bioanal Chem.* 2016;408(16):4379-88.

- Röhrich J, Schimmel I, Zörntlein S, Becker J, Drobnik S, Kaufmann T, et al. Concentrations of delta9-tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-carboxytetrahydrocannabinol in blood and urine after passive exposure to Cannabis smoke in a coffee shop. *J Anal Toxicol*. 2010;34(4):196-203.
- Rosado T, Fernandes L, Barroso M, Gallardo E. Sensitive determination of THC and main metabolites in human plasma by means of microextraction in packed sorbent and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2016.
- Rositano J, Harpas P, Kostakis C, Scott T. Supported liquid extraction (SLE) for the analysis of methylamphetamine, methylenedioxymethylamphetamine and delta-9-tetrahydrocannabinol in oral fluid and blood of drivers. *Forensic Sci Int*. 2016;265:125-30.
- Russo EB. History of cannabis and its preparations in saga, science, and sobriquet. *Chem Biodivers*. 2007;4(8):1614-48.
- Scheidweiler KB, Newmeyer MN, Barnes AJ, Huestis MA. 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*. 2016;1453:34-42.
- Schwoppe DM, Karschner EL, Gorelick DA, Huestis MA. Identification of recent cannabis use: whole-blood and plasma free and glucuronidated cannabinoid pharmacokinetics following controlled smoked cannabis administration. *Clin Chem*. 2011;57(10):1406-14.
- Sharma P, Bharath MM, Murthy P. Qualitative high performance thin layer chromatography (HPTLC) analysis of cannabinoids in urine samples of Cannabis abusers. *Indian J Med Res*. 2010;132:201-8.
- Sharma P, Murthy P, Bharath MM. Chemistry, metabolism, and toxicology of cannabis: clinical implications. *Iran J Psychiatry*. 2012;7(4):149-56.
- Spinelli E, Barnes AJ, Young S, Castaneto MS, Martin TM, Klette KL, et al. Performance characteristics of an ELISA screening assay for urinary synthetic cannabinoids. *Drug Test Anal*. 2015;7(6):467-74.
- Stern CA, Gazarini L, Takahashi RN, Guimarães FS, Bertoglio LJ. On disruption of fear memory by reconsolidation blockade: evidence from cannabidiol treatment. *Neuropsychopharmacology*. 2012;37(9):2132-42.
- Tanna S, Lawson G. Analytical methods used in conjunction with dried blood spots. *Anal Methods*. 2011;3, 1709–1718

Aplicação de *dried blood spots* na detecção e quantificação de canabinóides por cromatografia de gases/espectrometria de massas em tandem

- Taylor M, Lees R, Henderson G, Lingford-Hughes A, Macleod J, Sullivan J, et al. Comparison of cannabinoids in hair with self-reported cannabis consumption in heavy, light and non-cannabis users. *Drug Alcohol Rev.* 2016.
- World Anti-doping Agency (WADA). Identification Criteria for Qualitative Assays Incorporating Column Chromatography and Mass Spectrometry. [Online]. 2010. Disponível em: [http://www.wadaama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-ISLaboratories/ Technical_Documents/WADA_TD2010IDCRv1.0_Identification Criteria for Qualitative Assays_May08_2010_EN.doc.pdf](http://www.wadaama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-ISLaboratories/Technical_Documents/WADA_TD2010IDCRv1.0_Identification_Criteria_for_Qualitative_Assays_May08_2010_EN.doc.pdf).
- Wagner M, Tonoli D, Varesio E, Hopfgartner G. The use of mass spectrometry to analyze dried blood spots. *Mass Spectrom Rev.* 2014;35(3):361-438.
- Wong RC, Tse HY, eds. *Drugs of Abuse: Body Fluid Testing*. Totowa, NJ: Human Press. 2005
- World Health Organization [Online].2013. Disponível em: http://www.who.int/substance_abuse/publications/figure_3_1.jpg
- Yang R, Xie W. Determination of cannabinoids in biological samples using a new solid phase micro-extraction membrane and liquid chromatography-mass spectrometry. *Forensic Sci Int.* 2006;162(1-3):135-9.
- Zuardi AW. History of cannabis as a medicine: a review. *Rev Bras Psiquiatr.* 2006;28(2):153-7.
- Zubrzycki M, Liebold A, Janecka A, Zubrzycka M. A new face of endocannabinoids in pharmacotherapy. Part I: protective role of endocannabinoids in hypertension and myocardial infarction. *J Physiol Pharmacol.* 2014;65(2):171-81.

Anexos

Anexo I

Análise ANOVA: Comparação do solvente metanol para um volume de sangue de 100 e 50 µL

- THC

	Área composto/ Área padrão interno	Área média
Metanol (100 µL)	1,190	1,476
	1,761	
Metanol (50 µL)	1,207	1,409
	1,611	

SUMÁRIO

	Contagem	Soma	Média	Variância
Coluna 1	2	2,952081305	1,476040652	0,163217359
Coluna 2	2	2,819806783	1,409903392	0,081669238

Aplicação de *dried blood spots* na detecção e quantificação de canabinóides por cromatografia de gases/espectrometria de massas em tandem

Teste F: duas amostras para variâncias

	Variável 1	Variável 2
Média	1,4755	1,409
Variância	0,1630205	0,081608
Observações	2	2
gl	1	1
F	1,9976044	
P(F<=f) uni-caudal	0,3920064	
F crítico uni-caudal	161,44764	

Teste T: duas amostras com variâncias iguais

	Variável 1	Variável 2
Média	1,4755	1,409
Variância	0,163021	0,081608
Observações	2	2
Variância agrupada	0,122314	
Hipótese de diferença de média	0	
gl	2	
Stat t	0,190144	
P(T<=t) uni-caudal	0,433373	
t crítico uni-caudal	2,919986	
P(T<=t) bi-caudal	0,866747	
t crítico bi-caudal	4,302653	

O método não é estatisticamente diferente

Aplicação de *dried blood spots* na detecção e quantificação de canabinóides por cromatografia de gases/espectrometria de massas em tandem

- THC-OH

	Área composto/ Área padrão interno	Área média
Metanol (100 µL)	0,039	0,039
	0,038	
Metanol (50 µL)	0,020	0,025
	0,029	

SUMÁRIO

	Contagem	Soma	Média	Variância
Coluna 1	2	0,0774008	0,038700393	5,384E-07
Coluna 2	2	0,0497579	0,024878929	3,97877E-05

Teste F: duas amostras para variâncias

	Variável 1	Variável 2
Média	0,0387004	0,024879
Variância	5,384E-07	3,98E-05
Observações	2	2
gl	1	1
F	0,0135318	
P(F<=f) uni-caudal	0,0737243	
F crítico uni-caudal	0,006194	

Aplicação de *dried blood spots* na detecção e quantificação de canabinóides por cromatografia de gases/espectrometria de massas em tandem

Teste T: duas amostras com variâncias desiguais

	Variável 1	Variável 2
Média	0,0387	0,024879
Variância	5,38E-07	3,98E-05
Observações	2	2
Hipótese de diferença de média	0	
gl	1	
Stat t	3,078051	
P(T<=t) uni-caudal	0,099989	
t crítico uni-caudal	6,313752	
P(T<=t) bi-caudal	0,199978	
t crítico bi-caudal	12,7062	

O método é estatisticamente diferente

- THC-COOH

	Área composto/ Área padrão interno	Área média
Metanol (100 µL)	0,020 0,020	0,020
Metanol (50 µL)	0,009 0,008	0,008

SUMÁRIO

	Contagem	Soma	Média	Variância
Coluna 1	2	0,0393973	0,019698646	3,77641E-08
Coluna 2	2	0,0165191	0,008259572	2,98259E-07

Aplicação de *dried blood spots* na detecção e quantificação de canabinóides por cromatografia de gases/espectrometria de massas em tandem

Teste F: duas amostras para variâncias

	Variável 1	Variável 2
Média	0,0196986	0,00826
Variância	3,776E-08	2,98E-07
Observações	2	2
gl	1	1
F	0,1266151	
P(F<=f) uni-caudal	0,2176343	
F crítico uni-caudal	0,006194	

Teste T: duas amostras com variâncias desiguais

	Variável 1	Variável 2
Média	0,019699	0,00826
Variância	3,78E-08	2,98E-07
Observações	2	2
Hipótese de diferença de média	0	
gl	1	
Stat t	27,90751	
P(T<=t) uni-caudal	0,011401	
t crítico uni-caudal	6,313752	
P(T<=t) bi-caudal	0,022802	
t crítico bi-caudal	12,7062	

O método é estatisticamente diferente

Aplicação de *dried blood spots* na detecção e quantificação de canabinóides por cromatografia de gases/espectrometria de massas em tandem

Análise ANOVA: Comparação do volume de metanol para extração (3 e 4 mL)

- THC

	Área composto/ Área padrão interno	Área média
Metanol (3 mL)	0,554	0,590
	0,572	
	0,642	
Metanol (4 mL)	0,524	0,555
	0,518	
	0,621	

SUMÁRIO

	Contagem	Soma	Média	Variância
Coluna 1	3	1,769	0,589542011	0,002197995
Coluna 2	3	1,664	0,554672017	0,003331022

Teste F: duas amostras para variâncias

	Variável 1	Variável 2
Média	0,589542	0,554672
Variância	0,002198	0,003331
Observações	3	3
gl	2	2
F	0,6598561	
P(F<=f) uni-caudal	0,3975381	
F crítico uni-caudal	0,0526316	

Aplicação de *dried blood spots* na detecção e quantificação de canabinóides por cromatografia de gases/espectrometria de massas em tandem

Teste T: duas amostras com variâncias desiguais

	Variável 1	Variável 2
Média	0,589542	0,554672
Variância	0,002198	0,003331
Observações	3	3
Hipótese de diferença de média	0	
gl	4	
Stat t	0,812248	
P(T<=t) uni-caudal	0,231111	
t crítico uni-caudal	2,131847	
P(T<=t) bi-caudal	0,462222	
t crítico bi-caudal	2,776445	

O método é estatisticamente diferente

- THC-OH

	Área composto/ Área padrão interno	Área média
	0,933	
Metanol (3 mL)	0,886	0,904
	0,893	
	1,403	
Metanol (4 mL)	1,249	1,288
	1,213	

Aplicação de *dried blood spots* na detecção e quantificação de canabinóides por cromatografia de gases/espectrometria de massas em tandem

SUMÁRIO

	Contagem	Soma	Média	Variância
Coluna 1	3	2,712	0,903998004	0,000623975
Coluna 2	3	3,865	1,288261846	0,010250805

Teste F: duas amostras para variâncias

	Variável 1	Variável 2
Média	0,903998	1,288262
Variância	0,000624	0,010251
Observações	3	3
gl	2	2
F	0,0608708	
P(F<=f) uni-caudal	0,0573782	
F crítico uni-caudal	0,0526316	

Teste T: duas amostras com variâncias desiguais

	Variável 1	Variável 2
Média	0,903998	1,288262
Variância	0,000624	0,010251
Observações	3	3
Hipótese de diferença de média	0	
gl	2	
Stat t	-6,38234	
P(T<=t) uni-caudal	0,01184	
t crítico uni-caudal	2,919986	
P(T<=t) bi-caudal	0,023681	
t crítico bi-caudal	4,302653	

O método é estatisticamente diferente

Aplicação de *dried blood spots* na detecção e quantificação de canabinóides por cromatografia de gases/espectrometria de massas em tandem

- THC-COOH

	Área composto/ Área padrão interno	Área média
	0,187	
Metanol (3 mL)	0,181	0,164
	0,123	
	0,298	
Metanol (4 mL)	0,316	0,311
	0,319	

SUMÁRIO

	Contagem	Soma	Média	Variância
Coluna 1	3	0,491	0,163778644	0,001233151
Coluna 2	3	0,934	0,311184551	0,000126070

Teste F: duas amostras para variâncias

	Variável 1	Variável 2
Média	0,1637786	0,311185
Variância	0,0012332	0,000126
Observações	3	3
gl	2	2
F	9,7814804	
P(F<=f) uni-caudal	0,0927516	
F crítico uni-caudal	19	

Aplicação de *dried blood spots* na detecção e quantificação de canabinóides por cromatografia de gases/espectrometria de massas em tandem

Teste T: duas amostras com variâncias iguais

	Variável 1	Variável 2
Média	0,163779	0,311185
Variância	0,001233	0,000126
Observações	3	3
Variância agrupada	0,00068	
Hipótese de diferença de média	0	
gl	4	
Stat t	-6,92517	
P(T<=t) uni-caudal	0,001141	
t crítico uni-caudal	2,131847	
P(T<=t) bi-caudal	0,002282	
t crítico bi-caudal	2,776445	

O método não é estatisticamente diferente

Análise ANOVA: Comparação do tempo de extração de 20 e 40 min

- THC

	Área composto/ Área padrão interno	Área média
	10,482	
20 min	17,962	13,696
	12,641	
	0,465	
40 min	0,350	0,358
	0,257	

Aplicação de *dried blood spots* na detecção e quantificação de canabinóides por cromatografia de gases/espectrometria de massas em tandem

SUMÁRIO

	Contagem	Soma	Média	Variância
Coluna 1	3	41,087	13,695566695	14,82064668
Coluna 2	3	1,073	0,357508478	0,010859504

Teste F: duas amostras para variâncias

	Variável 1	Variável 2
Média	13,695567	0,357508
Variância	14,820647	0,01086
Observações	3	3
gl	2	2
F	1364,7627	
P(F<=f) uni-caudal	0,0007322	
F crítico uni-caudal	19	

Teste T: duas amostras com variâncias desiguais

	Variável 1	Variável 2
Média	13,69557	0,357508
Variância	14,82065	0,01086
Observações	3	3
Hipótese de diferença de média	0	
gl	2	
Stat t	5,998748	
P(T<=t) uni-caudal	0,013341	
t crítico uni-caudal	2,919986	
P(T<=t) bi-caudal	0,026682	
t crítico bi-caudal	4,302653	

O método é estatisticamente diferente

Aplicação de *dried blood spots* na detecção e quantificação de canabinóides por cromatografia de gases/espectrometria de massas em tandem

- THC-OH

	Área composto/ Área padrão interno	Área média
	0,192	
20 min	0,138	0,175
	0,195	
	0,236	
40 min	0,221	0,243
	0,273	

SUMÁRIO

	Contagem	Soma	Média	Variância
Coluna 1	3	0,525	0,175117524	0,001058685
Coluna 2	3	0,730	0,243347540	0,000732390

Aplicação de *dried blood spots* na detecção e quantificação de canabinóides por cromatografia de gases/espectrometria de massas em tandem

Teste F: duas amostras para variâncias

	Variável 1	Variável 2
Média	0,1751175	0,243348
Variância	0,0010587	0,000732
Observações	3	3
gl	2	2
F	1,4455212	
P(F<=f) uni-caudal	0,4089108	
F crítico uni-caudal	19	

Teste T: duas amostras com variâncias iguais

	Variável 1	Variável 2
Média	0,175118	0,243348
Variância	0,001059	0,000732
Observações	3	3
Variância agrupada	0,000896	
Hipótese de diferença de média	0	
gl	4	
Stat t	-2,79241	
P(T<=t) uni-caudal	0,024595	
t crítico uni-caudal	2,131847	
P(T<=t) bi-caudal	0,049191	
t crítico bi-caudal	2,776445	

O método não é estatisticamente diferente

- THC-COOH

	Área composto/ Área padrão interno	Área média
	0,108	
20 min	0,093	0,109
	0,125	
	0,161	
40 min	0,160	0,164
	0,171	

Aplicação de *dried blood spots* na detecção e quantificação de canabinóides por cromatografia de gases/espectrometria de massas em tandem

SUMÁRIO

	Contagem	Soma	Média	Variância
Coluna 1	3	0,326	0,108763017	0,000277402
Coluna 2	3	0,493	0,164317688	0,000037517

Teste F: duas amostras para variâncias

	Variável 1	Variável 2
Média	0,108763	0,164318
Variância	0,0002774	3,75E-05
Observações	3	3
gl	2	2
F	7,3941165	
P(F<=f) uni-caudal	0,1191311	
F crítico uni-caudal	19	

Teste T: duas amostras com variâncias iguais

	Variável 1	Variável 2
Média	0,108763	0,164318
Variância	0,000277	3,75E-05
Observações	3	3
Variância agrupada	0,000157	
Hipótese de diferença de média	0	
gl	4	
Stat t	-5,42228	
P(T<=t) uni-caudal	0,002804	
t crítico uni-caudal	2,131847	
P(T<=t) bi-caudal	0,005609	
t crítico bi-caudal	2,776445	

O método não é estatisticamente diferente

Aplicação de *dried blood spots* na detecção e quantificação de canabinóides por cromatografia de gases/espectrometria de massas em tandem

Análise ANOVA: Comparação do tempo de centrifugação de 20 e 30 min

- THC

	Área composto/ Área padrão interno	Área média
20 min	1,289	1,297
	1,288	
	1,314	
30 min	1,608	1,748
	1,838	
	1,798	

SUMÁRIO

	Contagem	Soma	Média	Variância
Coluna 1	3	3,891	1,296892797	0,000234169
Coluna 2	3	5,245	1,748263453	0,015015820

Teste F: duas amostras para variâncias

	Variável 1	Variável 2
Média	1,2968928	1,748263
Variância	0,0002342	0,015016
Observações	3	3
gl	2	2
F	0,0155948	
P(F<=f) uni-caudal	0,0153554	
F crítico uni-caudal	0,0526316	

Aplicação de *dried blood spots* na detecção e quantificação de canabinóides por cromatografia de gases/espectrometria de massas em tandem

Teste T: duas amostras com variâncias iguais

	Variável 1	Variável 2
Média	1,296893	1,748263
Variância	0,000234	0,015016
Observações	3	3
Variância agrupada	0,007625	
Hipótese de diferença de média	0	
gl	4	
Stat t	-6,33081	
P(T<=t) uni-caudal	0,001593	
t crítico uni-caudal	2,131847	
P(T<=t) bi-caudal	0,003187	
t crítico bi-caudal	2,776445	

O método não é estatisticamente diferente

- THC-OH

	Área composto/ Área padrão interno	Área média
	0,131	
20 min	0,135	0,131
	0,127	
	0,128	
30 min	0,124	0,122
	0,113	

SUMÁRIO

	Contagem	Soma	Média	Variância
Coluna 1	3	0,394	0,131371016	1,27625E-05
Coluna 2	3	0,366	0,121943088	0,000063861

Aplicação de *dried blood spots* na detecção e quantificação de canabinóides por cromatografia de gases/espectrometria de massas em tandem

Teste F: duas amostras para variâncias

	Variável 1	Variável 2
Média	0,131371	0,121943
Variância	1,276E-05	6,39E-05
Observações	3	3
gl	2	2
F	0,1998475	
P(F<=f) uni-caudal	0,1665607	
F crítico uni-caudal	0,0526316	

Teste T: duas amostras com variâncias desiguais

	Variável 1	Variável 2
Média	0,131371	0,121943
Variância	1,28E-05	6,39E-05
Observações	3	3
Hipótese de diferença de média	0	
gl	3	
Stat t	1,865501	
P(T<=t) uni-caudal	0,07948	
t crítico uni-caudal	2,353363	
P(T<=t) bi-caudal	0,15896	
t crítico bi-caudal	3,182446	

O método é estatisticamente diferente

- THC-COOH

	Área composto/ Área padrão interno	Área média
	0,061	
20 min	0,054	0,060
	0,064	
	0,056	
30 min	0,054	0,054
	0,052	

Aplicação de *dried blood spots* na detecção e quantificação de canabinóides por cromatografia de gases/espectrometria de massas em tandem

SUMÁRIO

	Contagem	Soma	Média	Variância
Coluna 1	3	0,180	0,059906497	3,1799E-05
Coluna 2	3	0,162	0,053986033	0,000005181

Teste F: duas amostras para variâncias

	Variável 1	Variável 2
Média	0,0599065	0,053986
Variância	3,18E-05	5,18E-06
Observações	3	3
gl	2	2
F	6,1375242	
P(F<=f) uni-caudal	0,1401046	
F crítico uni-caudal	19	

Teste T: duas amostras com variâncias iguais

	Variável 1	Variável 2
Média	0,059906	0,053986
Variância	3,18E-05	5,18E-06
Observações	3	3
Variância agrupada	1,85E-05	
Hipótese de diferença de média	0	
gl	4	
Stat t	1,68629	
P(T<=t) uni-caudal	0,083509	
t crítico uni-caudal	2,131847	
P(T<=t) bi-caudal	0,167018	
t crítico bi-caudal	2,776445	

O método não é estatisticamente diferente

Aplicação de *dried blood spots* na detecção e quantificação de canabinóides por cromatografia de gases/espectrometria de massas em tandem

Análise ANOVA: Comparação do tempo de secagem das DBS durante 3 e 6 horas

- THC

	Área composto/ Área padrão interno	Área média
3 h	1,231	1,290
	1,313	
	1,297	
	1,318	
6 h	1,381	1,381
	1,357	
	1,383	
	1,402	

SUMÁRIO

	Contagem	Soma	Média	Variância
Coluna 1	4	5,159	1,289827175	0,001636273
Coluna 2	4	5,523	1,380811436	0,000338567

Teste F: duas amostras para variâncias

	Variável 1	Variável 2
Média	1,2898272	1,380811
Variância	0,0016363	0,000339
Observações	4	4
gl	3	3
F	4,8329309	
P(F<=f) uni-caudal	0,1141071	
F crítico uni-caudal	9,2766282	

Aplicação de *dried blood spots* na detecção e quantificação de canabinóides por cromatografia de gases/espectrometria de massas em tandem

Teste T: duas amostras com variâncias iguais

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	1,289827	1,380811
Variância	0,001636	0,000339
Observações	4	4
Variância agrupada	0,000987	
Hipótese de diferença de média	0	
gl	6	
Stat t	-4,09478	
P(T<=t) uni-caudal	0,003197	
t crítico uni-caudal	1,94318	
P(T<=t) bi-caudal	0,006395	
t crítico bi-caudal	2,446912	

O método não é estatisticamente diferente

Aplicação de *dried blood spots* na detecção e quantificação de canabinóides por cromatografia de gases/espectrometria de massas em tandem

- THC-OH

	Área composto/ Área padrão interno	Área média
3 h	0,055	0,054
	0,058	
	0,050	
	0,051	
6 h	0,052	0,055
	0,051	
	0,060	
	0,056	

SUMÁRIO

	Contagem	Soma	Média	Variância
Coluna 1	4	0,215	0,053863462	1,2876E-05
Coluna 2	4	0,219	0,054873748	0,000017714

Teste F: duas amostras para variâncias

	Variável 1	Variável 2
Média	0,0538635	0,054874
Variância	1,288E-05	1,77E-05
Observações	4	4
gl	3	3
F	0,726888	
P(F<=f) uni-caudal	0,3997382	
F crítico uni-caudal	0,1077978	

Aplicação de *dried blood spots* na deteção e quantificação de canabinóides por cromatografia de gases/espectrometria de massas em tandem

Teste T: duas amostras com variâncias desiguais

	Variável 1	Variável 2
Média	0,053863	0,054874
Variância	1,29E-05	1,77E-05
Observações	4	4
Hipótese de diferença de média	0	
gl	6	
Stat t	-0,36533	
P(T<=t) uni-caudal	0,363699	
t crítico uni-caudal	1,94318	
P(T<=t) bi-caudal	0,727398	
t crítico bi-caudal	2,446912	

O método é estatisticamente diferente

- THC-COOH

	Área composto/ Área padrão interno	Área média
	0,026	
3 h	0,030	0,026
	0,024	
	0,026	
	0,026	
6 h	0,026	0,028
	0,030	
	0,029	

Aplicação de *dried blood spots* na detecção e quantificação de canabinóides por cromatografia de gases/espectrometria de massas em tandem

SUMÁRIO

	Contagem	Soma	Média	Variância
Coluna 1	4	0,106	0,026492917	5,32971E-06
Coluna 2	4	0,111	0,027840561	0,000003033

Teste F: duas amostras para variâncias

	Variável 1	Variável 2
Média	0,0264929	0,027841
Variância	5,33E-06	3,03E-06
Observações	4	4
gl	3	3
F	1,7572971	
P(F<=f) uni-caudal	0,3273749	
F crítico uni-caudal	9,2766282	

Teste T: duas amostras com variâncias iguais

	Variável 1	Variável 2
Média	0,026493	0,027841
Variância	5,33E-06	3,03E-06
Observações	4	4
Variância agrupada	4,18E-06	
Hipótese de diferença de média	0	
gl	6	
Stat t	-0,93204	
P(T<=t) uni-caudal	0,193642	
t crítico uni-caudal	1,94318	
P(T<=t) bi-caudal	0,387284	
t crítico bi-caudal	2,446912	

O método não é estatisticamente diferente

Anexo II

O trabalho experimental foi apresentado no congresso *2016 IALM Intersocietal Symposium*, 21-24 Junho de 2016, Veneza (Italia)

ANALYTICAL APPROACH TO DETERMINE CANNABINOIDS USING DRIED BLOOD SPOTS AND GAS CHROMATOGRAPHY-TANDEM MASS SPECTROMETRY

Caetano M., Rosado T., Barroso M., Gallardo E.