



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Beatriz Seiça Martinho

**APLICAÇÃO DA TOXICOLOGIA FORENSE NA
DETERMINAÇÃO DE XENOBIÓTICOS EM
AMOSTRAS DE SANGUE POR LC-MS/MS**

**Dissertação no âmbito do Mestrado de Medicina Legal e Ciências Forenses,
orientada pela Professora Doutora Helena Maria de Sousa Ferreira e
Teixeira e pela Dra Paula Isabel Rodrigues Roque Proença e apresentada à
Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra**

Setembro de 2022

Resumo

A *Cannabis* é a droga ilícita mais usada no mundo, integrando a maioria dos registos das infrações de posse/consumo de substâncias ilícitas. A planta é constituída por uma elevada variedade de compostos, dentro dos quais se incluem os canabinóides, podendo apresentar um forte efeito psicoativo. Estes compostos caracterizam-se por serem constituídos por mais de 21 átomos de carbono, assim como por se encontrarem, exclusivamente, na planta *Cannabis sativa*, sendo o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) o composto ativo com maior poder psicoativo.

Em toxicologia forense, é essencial ter um método rápido e eficiente que permita usar uma pequena quantidade de amostra biológica para a determinação e quantificação de baixas concentrações de canabinóides.

Assim, foi estudada a técnica de precipitação proteica com acetonitrilo de 0,1 mL de amostra de sangue, para a determinação de Δ^9 -THC, 11-hidroxi- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (11-OH-THC) e 11-nor-9-carboxi- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THCCOOH), por cromatografia líquida de alta resolução acoplada a espectrometria de massa (LC-MS/MS), em modo de scan de monitorização de reações múltiplas (MRM). Na separação cromatográfica foi utilizada uma coluna Acquity UPLC[®] HSS T₃ (100 mm x 2,1 mm, 1,8 μ m), uma fase móvel em gradiente constituída por formato de amónia aquoso 2 mM (ácido fórmico 0,1%) e metanol, com um fluxo de 0,4 mL/min, um volume de injeção de 5 μ L e um tempo de corrida de 10 min. O método foi validado de acordo com critérios e diretrizes internacionalmente aceites.

O método em modo MRM demonstrou ser seletivo e linear entre 0,5-100 ng/mL ($r^2 > 0,998$). Os limites inferiores de quantificação (LQ) corresponderam à menor concentração utilizada para as curvas de calibração. Os coeficientes de variação obtidos para a exatidão e precisão foram inferiores a 20% e reprodutibilidade obteve valores aceitáveis (z -score < 3). As recuperações médias encontram-se entre 94% e 96% para os níveis de concentração estudados (1 ng/mL, 5 ng/mL e 50 ng/mL). O efeito matriz traduz-se num efeito de intensificação iónica para todos os analitos. Não foram observados compostos interferentes significativos ou arrastamento.

O método validado fornece um procedimento sensível, eficiente e robusto para a quantificação de canabinóides no sangue por aplicação de precipitação proteica de 0,1 mL de amostras analisadas por LC-MS/MS.

Palavras-Chave: Canabinóides; LC-MS/MS; Precipitação proteica; Sangue; Validação

Abstract

Cannabis is the most used illicit drug in the world, integrating most records of offenses of possession/consumption of illicit substances. The plant contains an extensive variety of compounds, including cannabinoids, which may have a strong psychoactive effect. These compounds are characterized by being constituted of more than 21 carbon atoms, as well as being found exclusively in the *Cannabis sativa* plant, with Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) being the active compound with the highest psychoactive power. In forensic toxicology, it is essential to have a fast and efficient method that allows the use of a small amount of biological sample for the determination and quantification of dangerous amounts of cannabinoids.

Therefore, the protein precipitation technique with acetonitrile of 0,1 mL of blood samples was studied for the determination of Δ^9 -THC, 11-hydroxy- Δ^9 - tetrahydrocannabinol (11-OH-THC), 11-Nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THCCOOH), by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS), in multiple reaction monitoring (MRM) scan mode. In the chromatographic separation, an Acquity UPLC[®] HSS T₃ column (100 mm x 2,1 mm, 1,8 μ m) was used, as well as a gradient mobile phase consisting in 2 mM aqueous ammonium formate (0,1% formic acid) and methanol, a flow rate of 0,4 mL/min, an injection volume of 5 μ L and a run time of 10 min. The method was validated in accordance with internationally accepted criteria and guidelines.

The method in MRM mode, the method proved to be selective and linear between 0,5-100 ng/mL ($r^2 > 0.998$). The lower limits of quantification (LQ) corresponded to the lowest concentration used for the calibration curves. The coefficients of variation obtained for accuracy and precision were less than 20% and reproducibility obtained acceptable values ($z\text{-score} < 3$). The mean recoveries were between 94% and 96% for the studied concentration levels (1 ng/mL, 5 ng/mL and 50 ng/mL). The matrix effect translates into an ion-enhancing effect for all analytes. No significant interfering compounds or carryover were observed.

The validated method provides a sensitive, efficient and robust procedure for the quantification of cannabinoids in blood by applying protein precipitation to 0,1 mL of samples analyzed by LC-MS/MS.

Keywords: Blood; Cannabinoids; LC-MS/MS; Protein Precipitation; Validation

Agradecimentos

À Dra Paula Proença pelo apoio, pela amizade, pela transmissão da sua sabedoria e conhecimento, do seu entusiasmo pelo trabalho que demonstra diariamente e da sua dedicação ao Serviço de Química e Toxicologia Forenses. Obrigada por todo o tempo que me disponibilizou, pela sua palavra de incentivo e por toda a confiança que depositou em mim. Guardo com carinho todas as experiências e memórias que vivi ao seu lado ao longo deste último ano. O meu muito obrigada!

À Professora Doutora Helena Teixeira que esteve sempre disponível para me auxiliar em todas as fases deste processo e pela ajuda valiosa na melhoria da minha capacidade de escrita e apresentação.

A todas as pessoas do SQTF-centro, que tão bem me receberam. Agradeço, em especial, pelas boas conversas e pela simpatia diária, à Catarina e ao Fernando.

Ao Dr. João Miguel Franco por me ter dado a oportunidade de aprender neste serviço, ao lado de quem tem tanto para ensinar.

Agradeço, por fim mas não menos importante, aos meus familiares e amigos, que estiveram ao meu lado ao longo desta nova etapa da minha vida, sempre com palavras de incentivo e carinho.

Índice

Resumo	I
Abstract	II
Agradecimentos	III
Índice	IV
Índice de Figuras	VII
Índice de Tabelas	VIII
Abreviaturas	IX
Capítulo I - Introdução	1
1- Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses	1
2- Serviço de Química e Toxicologia Forenses	2
3- Canabinóides	3
3.1- Introdução	3
3.2- Legislação.....	5
3.3- Formas de consumo.....	6
3.4- Toxicocinética	6
3.4.1- Absorção	7
3.4.2- Distribuição.....	7
3.4.3- Metabolismo	8
3.4.4- Excreção	8
3.5- Mecanismo de ação	8
3.6- Efeitos Farmacodinâmicos	9
4- Metodologia Analítica	10
4.1- Tratamento de amostras	10
4.1.1- Amostras biológicas.....	10
4.1.2- Extração em fase sólida.....	11
4.1.3- Precipitação proteica	12
4.2- Cromatografia líquida de alta resolução acoplada a espectrometria de massa	13
4.2.1- Monitorização de reações múltiplas (MRM)	14
4.2.2- Modo MS/MS/MS (MS ³).....	15
4.3- Importância da validação de métodos analíticos	16
Capítulo II- Objetivo	17

Capítulo III- Trabalho Experimental	18
1- Introdução	18
2- Materiais e métodos.....	18
2.1- Materiais e reagentes.....	18
2.2- Preparação de misturas de padrões, soluções e fases móveis	19
2.2.1- Mistura padrão de canabinóides deuterados e solução de trabalho	19
2.2.2- Mistura padrão de canabinóides e soluções de trabalho	19
2.2.3- Fases móveis do sistema LC-MS/MS.....	20
2.2.3.1- Fase móvel A- Metanol e formato de amónia 2 mM em ácido fórmico 0,1% (95:5, v/v).....	20
2.2.3.2- Fase móvel B- Formato de amónia 2 mM em ácido fórmico 0,1% e metanol (95:5, v/v).....	20
2.3- Preparação das amostras	21
2.4- Análise cromatográfica	22
2.5- Parâmetros de validação.....	23
2.5.1- Especificidade/Seletividade.....	23
2.5.2- Efeito Matriz	24
2.5.3- Eficiência de extração	25
2.5.4- Arrastamento.....	25
2.5.5- Linearidade	25
2.5.6- Precisão	26
2.5.7- Exatidão	27
2.5.8- Limiares analíticos.....	27
Capítulo IV – Resultados e discussão.....	28
1- Processo de otimização do método cromatográfico.....	28
2- Estudo do padrão de fragmentação dos canabinóides.....	29
3.1- Δ^9 -THC	29
3.2- 11-OH-THC e THCCOOH.....	30
3- Comparação entre a precipitação proteica e extração em fase sólida.....	31
4- Análise dos parâmetros de validação.....	32
4.1- Especificidade/Seletividade.....	32
4.1.1- Positividade das Pools fortificadas.....	33
4.2- Efeito Matriz	34

4.3- Eficiência de extração	35
4.4- Arrastamento	36
4.5- Linearidade	36
4.6- Precisão	37
4.6.1- Precisão intermédia	37
4.6.2- Repetibilidade	39
4.6.3- Reprodutibilidade	40
4.7- Exatidão	41
4.8- Limiares analíticos	43
5- Modo MS³- Comparação entre a precipitação proteica e extração em fase sólida	45
6- Aplicação do método analítico em casos reais forenses	46
Capítulo V – Conclusão	47
Bibliografia	49
Apêndice	57

Índice de Figuras

Figura 1- <i>Cannabis sativa</i> L. (Vicente, 2017).	4
Figura 2- Estrutura molecular do Δ^9 -tetrahydrocannabinol.....	4
Figura 3- Aparelho de extração com os cartuchos colocados e aplicação das amostras no processo extrativo por extração em fase sólida.	11
Figura 4- Esquema representativo do processo extrativo por precipitação proteica.....	13
Figura 5- Esquema representativo dos três quadropolos presentes no detetor de massas e sua função em modo MRM («Powerful scan modes of QTRAP [®] System Technology», 2019).	15
Figura 6- Esquema representativo dos três quadropolos presentes no detetor de massas e sua função em modo MS ³ (retirado em https://sciex.com/resource-library).	16
Figura 7- Cromatograma de íões totais (TIC) resultante do processo de otimização dos canabinóides e respetivas estruturas moleculares a partir de uma solução de referência a 100 ng/mL.	28
Figura 8- Cromatograma de íões totais resultante da injeção de um controlo a 5 ng/mL.	29
Figura 9- A- Espetro de massa MRM representativo dos íões fragmento do Δ^9 -THC e Δ^9 -THC-d3 num controlo a 50 ng/mL; B- Cromatograma XIC do Δ^9 -THC num controlo a 50 ng/mL.	30
Figura 10- Espetro de massa MRM representativo dos íões fragmento do 11-OH-THC, THCCOOH e respetivos deuterados num controlo a 50 ng/mL. A vermelho está representado o 11-OH-THC e 11-OH-THC-d3; A azul está representado o THCCOOH e THCCOOH-d3.	30
Figura 11- A- Cromatograma XIC do 11-OH-THC num controlo a 50 ng/mL. B- Cromatograma XIC do THCCOOH num controlo a 50 ng/mL.	31
Figura 12- Cromatogramas MRM de duas amostras de sangue, obtidas por extração SPE e PP, a 5 ng/mL.	32
Figura 13- Representação gráfica do resultado obtido na avaliação da eficiência de extração para os canabinóides a três níveis de concentração.	36
Figura 14- Cromatogramas obtidos a partir de um CAL a 0,5 ng/mL, com a informação da transição do ião de quantificação, respetiva intensidade e razão S/N.	44
Figura 15- Cromatogramas MRM e MS ³ de duas amostras de sangue, obtidas por extração SPE e PP, a 5 ng/mL.	45

Índice de Tabelas

Tabela 1- Padrões utilizados no trabalho experimental descrito nesta tese.	18
Tabela 2- Reagentes utilizados no trabalho experimental descrito nesta tese.	18
Tabela 3- Preparação das restantes soluções de trabalho dos calibradores utilizados.	20
Tabela 4- Preparação das amostras.	21
Tabela 5- Tempos de retenção e parâmetros MRM dos canabinóides.	22
Tabela 6- Misturas de sangue utilizados no estudo da especificidade/ seletividade.	24
Tabela 7- Tolerância máxima para as áreas relativas das transições iónicas. (Adaptado de (TOXSAG), 2012).....	33
Tabela 8- Diferença relativa entre o TRR de cada analito nas pools fortificadas.	33
Tabela 9- Áreas relativas das transições iónicas, em percentagem, das respetivas substâncias.	34
Tabela 10- Transições iónicas selecionadas para cada analito e respetivo intervalo de tolerância de acordo com o controlo (Pool 6).	34
Tabela 11- Efeito matriz nos oitos pontos da curva de calibração (n=5).....	35
Tabela 12- Resultado do estudo da linearidade para os canabinóides.....	37
Tabela 13- Expressões matemáticas aplicadas pela ANOVA (fator único).....	37
Tabela 14- Cálculo das estimativas da precisão (Retirado de " <i>Procedimento operacional: Validação de procedimentos de ensaio</i> ", 2012).....	38
Tabela 15- Cálculo das estimativas da precisão (Adaptado de SWGTOX, 2013; AAFS Standards Board, 2019)	38
Tabela 16- Resultados da precisão intermédia obtidos para os canabinóides.	39
Tabela 17- Resultados obtidos no estudo da repetibilidade para o controlo baixo (1 ng/mL).	39
Tabela 18- Resultados obtidos no estudo da repetibilidade para o controlo médio-baixo (5 ng/mL).....	39
Tabela 19- Resultados obtidos no estudo da repetibilidade para o controlo alto (50 ng/mL).	40
Tabela 20- Resultado obtido no primeiro ensaio interlaboratorial de 2022 aplicando SPE e PP.	41
Tabela 21- Resultado obtido no segundo ensaio interlaboratorial de 2022 aplicando SPE e PP.	41
Tabela 22- Resultados obtidos na avaliação da exatidão dos canabinóides em estudo.....	42
Tabela 23- Tempos de retenção e parâmetros MS ³ dos canabinóides.....	43
Tabela 24- Avaliação de casos reais forenses por PP e SPE	46

Abreviaturas

11-OH-THC- 11-hidroxi- Δ^9 -tetrahydrocannabinol;

Δ^9 -THC- Δ^9 -tetrahydrocannabinol;

CV- Coeficiente de variação;

D3- Padrão deuterado;

EM- Efeito matriz;

ESI- Ionização por eletrospray (do inglês “electrospray ionization”);

INMLCF- Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses;

LC-MS/MS- Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa sequencial;

LD- Limite de detecção;

LIT- Armadilha de íons linear (do inglês “linear ion trap”);

LQ- Limite de quantificação;

MP- Mistura padrão;

MRM- Monitorização de reações múltiplas;

MS³- MS/MS/MS;

m/z- Razão massa/carga;

PP- Precipitação proteica;

Q1- Quadrupolo 1;

Q2- Célula de colisão;

Q3- Quadrupolo 3;

RT- Tempo de retenção (do inglês “retention time”);

S- Desvio padrão;

SIM- Monitorização de íon único (do inglês “single ion monitoring”);

S/N- Razão sinal/ruído;

SPE- Extração em fase sólida (do inglês “solid-phase extraction”);

SQTF- Serviço de Química e Toxicologia Forenses;

THCCOOH- 11-nor-9-carboxi- Δ^9 -tetrahydrocannabinol;

TRR- Tempo de retenção relativo.

Capítulo I - Introdução

1- Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses

O Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I. P. (INMLCF, I. P.), assegura, em todo o território nacional, a realização de exames e perícias médico-legais e forenses que lhe forem solicitados, nos termos da lei, de forma a cooperar com os tribunais, com o Ministério Público e com os órgãos de polícia criminal e demais serviços e entidades que intervêm no sistema de administração da justiça.

O INMLCF é uma instituição nacional de referência na área científica da Medicina Legal e de outras Ciências Forenses, daí o seu importante papel em atividades de investigação e divulgação científicas, e de colaboração com universidades em atividades de formação e de ensino. Tem sede em Coimbra e serviços descentralizados, as Delegações, no Porto, Coimbra e Lisboa, dos quais dependem e funcionam Gabinetes Médico-Legais distribuídos a nível nacional (Decreto-Lei n.º 166/2012).

O INMLCF, I. P. realiza, no âmbito das suas atribuições:

- **autópsias médico-legais**, com o objetivo de esclarecer a causa e as circunstâncias da morte, em casos de morte violenta ou de causa desconhecida, estabelecendo o diagnóstico diferencial entre morte natural, suicídio, homicídio e acidente;
- **outros exames cadavéricos**, como de antropologia forense, para fins de diagnóstico diferencial da causa da morte ou para fins de identificação;
- **exames e perícias em pessoas**, para descrição e avaliação dos danos provocados no corpo ou na saúde, no âmbito do direito penal, civil e do trabalho;
- **perícias e exames laboratoriais químicos e toxicológicos**, para determinação de álcool etílico, medicamentos, pesticidas, substâncias ilícitas, monóxido de carbono, metais e outros produtos, em amostras biológicas e não biológicas;
- **perícias e exames de identificação genéticos**, nomeadamente, os de investigação biológica de parentesco, de identificação individual, de criminalística biológica ou outros.
- **perícias e exames psiquiátricos e psicológicos**, para avaliar a imputabilidade jurídico-penal, de estados de perigosidade, da capacidade de exercício de direitos e de perturbações pós-traumáticas de índole psíquica e psicológica;
- **perícias e exames de anatomia patológica forense**, no âmbito das atividades da Delegação do INMLCF e dos Gabinetes Médico-Legais e Forenses, ou quando pedido pelos tribunais (<https://inmlcf.justica.gov.pt/>).

A cooperação entre todos estes serviços e o rigor e a competência que esta instituição espera dos demais peritos que neles trabalham, ditam a veracidade de toda a informação que dela provem.

2- Serviço de Química e Toxicologia Forenses

A Toxicologia Forense é a ciência que se dedica à deteção, confirmação e quantificação de xenobióticos para fins Médico-Legais e Forenses. Para tal, requer conhecimentos em diversas disciplinas como a bioquímica, a química, a farmacologia, a fisiologia, a biologia molecular, entre outras, a fim de compreender as propriedades dos xenobióticos, seus mecanismos de ação e efeitos lesivos (Drummer, 2005).

A toxicologia forense pode, desta forma, ser aplicada em:

- Questões criminais e investigações de morte, esclarecendo sobre uma eventual intoxicação no momento da morte;

- No âmbito do controlo rodoviário, nomeadamente na investigação de álcool etílico e/ou substâncias psicoativas, e, eventualmente, substâncias medicamentosas que possam influenciar a capacidade de condução.

- Crimes facilitados por substâncias (ilícitas ou medicamentosas), em particular em casos de agressões sexuais, a toxicologia forense desempenha um papel fundamental na determinação de possíveis xenobióticos presentes na vítima e/ou agressor (Drummer, 2005).

O uso de técnicas instrumentais e métodos analíticos de alta resolução são requeridos para a determinação e quantificação de xenobióticos e seus metabolitos em amostras complexas, como são as amostras biológicas (Drummer, 2005; Peters, Maurer, & Musshoff, 2011).

O Serviço de Química e Toxicologia Forenses do INMLCF (SQTF), é constituído por três laboratórios nacionais localizados nas três Delegações e estes encontram-se acreditados pelo Instituto Português de Acreditação, I.P., de acordo com o referencial da norma internacional NP EN ISO/IEC 17025:2005 (<https://inmlcf.justica.gov.pt/>).

Ao SQTF, compete-lhe assegurar a realização de perícias e exames laboratoriais químicos e toxicológicos no âmbito das atividades das Delegações e dos Gabinetes Médico-Legais que se encontrem na sua dependência, bem como solicitação das autoridades e entidades para o efeito competentes ou do Presidente do Conselho Diretivo.

Tendo em consideração este enquadramento, ao SQTF podem ser requeridas análises por parte:

- 1- De outros serviços do INMLCF (e.g. serviço de clínica e patologia forenses, gabinetes médico-legais);

- 2- Tribunais;
- 3- Polícia Judiciária, Polícia de Segurança Pública e Guarda Nacional Republicana;
- 4- Qualquer pessoa individual ou coletiva (Manual do Sistema de Gestão, INMLCF 2022).

NO SQTF são realizadas análises toxicológicas a substâncias voláteis como etanol e monóxido de carbono, substâncias medicamentosas, substâncias ilícitas, pesticidas ou outros compostos de interesse forense.

Para garantir a consistência, veracidade e precisão dos resultados dos seus ensaios o SQTF desenvolve ações de controlo interno e externo, específicas para cada tipo de atividade. Deste modo, o serviço encontra-se organizado em 5 equipas especializadas:

- Equipa I- Imunoensaios, reações imuno-enzimáticas.
- Equipa II- Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (GC-MS);
- Equipa III- Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massa (LC-MS);
- Equipa IV- Cromatografia Gasosa acoplada a Detetor de Ionização de Chama (GC-FID);
- Equipa V- Espectrofotometria de Ultravioleta/visível e Absorção Atómica.

A componente prática desta dissertação de mestrado foi desenvolvida na equipa III, sobre orientação da sua responsável, a Dra. Paula Proença. A esta equipa compete a análises dos seguintes procedimentos:

- Triagem de substâncias medicamentosas no sangue e urina por LC-MS/MS;
- Confirmação de medicamentos por LC-MS/MS;
- Confirmação e quantificação de benzodiazepinas no sangue por LC-MS/MS;
- Confirmação e quantificação de canabinóides no sangue por LC-MS/MS.

3- Canabinóides

3.1- Introdução

A *Cannabis* é a droga ilícita mais usada em todo o mundo, sendo os homens de idades compreendidas entre os 17 e os 34 anos os maiores utilizadores desta droga psicoativa (UNODC, 2022).

O uso da planta *Cannabis sativa* (Fig. 1) remonta à Ásia Central há milhares de anos, quer na alimentação, quer como fibra têxtil ou com funções medicinais, presumindo-se que o conhecimento das suas vastas aplicações e efeitos se tenha estendido a populações vizinhas ao longo do tempo, levando-as ao seu cultivo, dada a sua fácil adaptação a diferentes climas. Atualmente a planta *Cannabis sativa* encontra-se dispersa por todo o mundo (Thomas & EISOhly, 2016).

A *Cannabis* foi introduzida na Europa em 1842, após o estudo desta planta por parte de um médico irlandês na Índia, que constatou a sua versátil aplicação como relaxante muscular, anticonvulsivo, antiemético e analgésico. Rapidamente, também se aproveitou a sua fibra para a indústria têxtil (Robson, 2001).

Na Europa, o consumo desta planta para fins recreativos desenrolou-se nos finais do século XX, levando os países a adotarem medidas de controlo de cultivo, distribuição, venda e consumo da *Cannabis* (Degenhardt, Ferrari, & Hall, 2017).



Figura 1- *Cannabis sativa* L. (Vicente, 2017).

Atualmente, os produtos desta planta continuam a ser os mais apreendidos nos países da União Europeia, integrando a maioria dos registos das infrações de posse/consumo de substâncias ilícitas (OEDT, 2022).

A planta é constituída por uma elevada variedade de compostos, dentro dos quais se incluem os canabinóides. Atualmente, são já conhecidos mais de 120 canabinóides, podendo estes ter ou não efeito psicoativo. O termo canabinóide é dado a uma substância que é composta de mais de 21 átomos de carbono, compostos estes presentes na planta *Cannabis sativa*. São formados por três anéis: ciclohexano, tetrahidropirano e benzeno (Fig. 2). Dentro desta classe, o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) é o composto ativo com maior poder psicoativo, sendo encontrado em elevada quantidade em algumas destas plantas (Andre, Hausman, & Guerriero, 2016; Cascini & Boschi, 2017; Thomas & EISOhly, 2016). Constatou-se que tem havido um aumento gradual da concentração do composto psicoativo THC, aumentando deste modo, a preocupação em relação à saúde pública (OEDT, 2022).

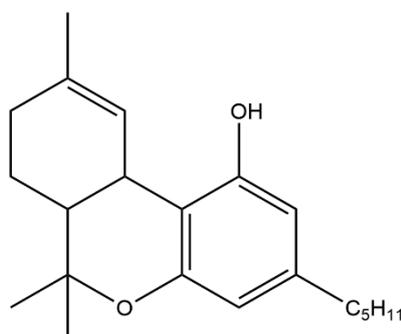


Figura 2- Estrutura molecular do Δ^9 -tetrahydrocannabinol.

3.2- Legislação

Em 1993, após alterações no Código do Processo Penal e no Código Penal, foi publicado o Decreto-Lei n.º 15/93, de 22 de janeiro, vulgarmente denominada de “Lei da Droga”. Este, por sua vez tem sofrido algumas alterações ao longo destes quase 30 anos e tem como objetivo definir o regime jurídico aplicável ao tráfico e consumo de estupefacientes e substâncias psicotrópicas.

Segundo o Artigo 21.º do Capítulo II da presente lei, é punido com pena de prisão de 4 a 12 anos quem, sem para tal se encontrar autorizado, cultivar, produzir, fabricar, extrair, preparar, oferecer, puser à venda, vender, distribuir, comprar, ceder ou por qualquer título receber, proporcionar a outrem, transportar, importar, exportar, fizer transitar ou ilicitamente detiver, fora dos casos previstos no artigo 40.º, plantas, substâncias ou preparações compreendidas nas tabelas I a III.

Na Tabela I-C do Decreto-Lei n.º 15/93 podemos, então, encontrar a referência à planta *Cannabis sativa L.*:

“Canabis - folhas e sumidades floridas ou frutificadas da planta *Cannabis sativa L.* da qual não se tenha extraído a resina, qualquer que seja a designação que se lhe dê.

Canabis, resina de - resina separada, em bruto ou purificada, obtida a partir da planta *Cannabis*.

Canabis, óleo de - óleo separado, em bruto ou purificado, obtido a partir da planta *Cannabis*.

Consideram-se inscritos nesta tabela todos os sais destes compostos, desde que a sua existência seja possível”.

No entanto, com a introdução da Lei n.º 30/2000, de 29 de novembro, o consumo de estupefacientes passa a ser descriminalizado, através de uma proibição administrativa, isto é, substituindo as penas por sanções de mera ordenação social, revogando, assim, o artigo 40.º, exceto em relação ao cultivo, e o artigo 41.º do Decreto-Lei anterior.

Esta nova lei cria os órgãos imprescindíveis à institucionalização do novo regime e distribui as competências necessárias pelos serviços e organismos do Estado envolvidos nessa problemática. O toxicodependente passa a ser encarado como um doente e não como um criminoso, sendo o Estado responsável pelo seu direito constitucional à saúde.

Do ponto de vista médico-legal, outra legislação de elevado relevo, é a Lei n.º 18/2007, de 17 de maio, que veio aprovar o regulamento da fiscalização da condução sob influência do álcool ou de substâncias psicoativas. Por sua vez, na Portaria n.º 902-B/2007, de 13 de agosto está contemplado o modo de recolha, acondicionamento e expedição das amostras biológicas destinadas às análises laboratoriais, bem como os procedimentos a aplicar na realização das análises.

3.3- Formas de consumo

Os produtos da *Cannabis* diferem entre si no seu teor em Δ^9 -THC, levando a diferentes potências do produto, geralmente dada na forma de percentagem de Δ^9 -THC. No entanto, a quantidade de droga administrada depende da quantidade de produto utilizado e da sua via de administração. Atualmente, a potência da resina ultrapassou a da erva, tendência essa que não se verificava nas plantas da antiguidade. A potência média da resina da planta nos dias de hoje encontra-se entre 17-25 % Δ^9 -THC e a da forma herbácea entre 7 a 14 % Δ^9 -THC e pressupõe-se derivado à seleção e industrialização da planta (OEDT, 2022).

A erva, conhecida como *marijuana*, trata-se de partes da planta ou misturas de partes da planta, como flores e folhas secas e trituradas com o intuito de serem fumadas. A sua potência está dependente da parte da planta utilizada (EISOHLY, Gul, & Salem, 2008; Winstock, 2012).

A resina, denominada de *haxixe*, é obtida por extração das secreções das flores e folhas da planta, que é posteriormente seca. Esta é normalmente fumada em cachimbos específicos (EISOHLY et al., 2008; Winstock, 2012).

O óleo de *haxixe*, é uma concentração da resina obtida por “lavagem” com solventes orgânicos dando origem a um fluido viscoso. Este é mais potente que o haxixe e pode ser ingerido ou inalado (EISOHLY et al., 2008; Winstock, 2012).

Atualmente, a potência da resina ultrapassou a da erva, tendência essa que não se verificava nas formas de consumo usadas há algumas décadas atrás. A potência média da resina da planta nos dias de hoje encontra-se entre 17-25 % Δ^9 -THC e a da forma herbácea entre 7 a 14 % Δ^9 -THC e pressupõe-se derivado à seleção e industrialização da planta (OEDT, 2022).

O óleo de *haxixe*, é uma concentração da resina obtida por “lavagem” com solventes orgânicos dando origem a um fluido viscoso. Este é mais potente que o haxixe e pode ser ingerido ou inalado (EISOHLY et al., 2008; Winstock, 2012).

3.4- Toxicocinética

A toxicocinética estuda o percurso do xenobiótico e seus metabolitos ao longo do organismo. Desta forma, esclarece sobre a absorção, distribuição, metabolismo e eliminação destas substâncias (Bell, 2014).

3.4.1- Absorção

A absorção dos canabinóides encontra-se influenciada pela via de administração, sendo geralmente absorvidos por via inalatória. Também podem ser administrados através da via oral, embora seja menos comum. No entanto, devido à temperatura atingida pelo produto durante o processo de fumar, parte do composto ativo é destruído, permanecendo apenas cerca de 70% do Δ^9 -THC (Grotenhermen, 2003).

No entanto, a absorção de canabinóides por esta via, bem como a sua biodisponibilidade, são bastante variáveis, uma vez que dependem de diversos fatores, tais como:

- Tempo aplicado ao fumar, isto é, da duração da inalação e retenção do fumo nos pulmões, que aumentam com a experiência;
- Tipo de produto utilizado, com maior ou menor potência, com diferentes tipos de canabinóides e presença de outros compostos químicos;
- Da combustão da mistura, que pode levar à decomposição de uma percentagem dos canabinóides presentes (Grotenhermen, 2003; Huestis, 2007).

Devido à rápida absorção do Δ^9 -THC pelos pulmões, este atinge a concentração máxima entre 3 a 10 minutos após a administração, verificando-se um efeito quase imediato aquando da exposição do Sistema Nervoso Central (SNC). A via oral leva a uma absorção inferior à obtida por via inalatória. Nesta via, a acidez estomacal, o metabolismo intestinal e o efeito de primeira passagem no fígado, diminuem bastante a biodisponibilidade do Δ^9 -THC para valores entre os 10 e 20%. A absorção, por esta via é mais lenta e variável, resultando numa concentração plasmática do Δ^9 -THC, cerca de uma hora após ingestão. No entanto, permanecem relativamente constantes durante algumas horas. Desta forma, os efeitos são mais tardios mas mais prolongados (Grotenhermen, 2003; Huestis, 2007).

3.4.2- Distribuição

Após a entrada do Δ^9 -THC no sangue, a sua distribuição para os órgãos e tecidos é feita de forma bastante rápida. O Δ^9 -THC distribui-se pelo organismo, preferencialmente acoplado a proteínas plasmáticas, sendo que apenas cerca de 3% se encontra na sua forma livre (Grotenhermen, 2003; Huestis, 2007).

As propriedades lipofílicas dos canabinóides propiciam a sua concentração e retenção em tecidos gordos e órgãos mais vascularizados. O Δ^9 -THC e seus metabolitos têm, como órgão de armazenamento, a gordura corporal bem como o baço, o que aumenta o tempo de semivida médio deste composto para 4 dias. Este facto permite que, mesmo após 7 a 14 dias

após consumo, estes ainda se encontrem no organismo, caso se trate de consumidores ocasionais ou crônicos, respetivamente (Grotenhermen, 2003; Kreuz & Axelrod, 1973).

3.4.3- Metabolismo

O Δ^9 -THC é metabolizado, na sua grande maioria, a nível hepático. A metabolização do Δ^9 -THC ocorre por reações de hidroxilação, oxidação, descarboxilação, conjugação, entre outras, catalisadas pelas enzimas dos citocromos P450, 2C9, 2C19 e 3A4, originando diversos metabolitos. Num primeiro passo, o Δ^9 -THC sofre hidroxilação, produzindo o metabolito ativo 11-hidroxi- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (11-OH-THC). Este atinge o pico máximo no sangue cerca de 13 minutos após inalação. Este metabolito, por sua vez, é oxidado, formando-se o metabolito inativo, 11-nor-9-carboxi- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THCCOOH), que após hidrólise, se conjuga com o ácido glucurónico. Esta forma conjugada é um dos produtos finais principais da biotransformação (Grotenhermen, 2003; Huestis, 2007).

3.4.4- Excreção

A excreção ocorre maioritariamente pelas fezes (65%-80%), sendo que 20% a 35% se processa através da urina. O Δ^9 -THC é excretado na forma de 11-OH-THC ou THCCOOH. Este conjugado é altamente hidrofílico, e por isso, o mais abundante na urina. O 11-OH-THC predomina nas fezes, sendo esta a maior via de excreção, embora haja uma reabsorção de cerca de 15% dos metabolitos no tubo digestivo. Esta recaptção, bem como a acumulação dos metabolitos na gordura corporal colaboram para um processo demorado de excreção total (Grotenhermen, 2003; Huestis, 2007).

3.5- Mecanismo de ação

A vasta ação dos canabinóides no Homem, está relacionada com a existência de um sistema canabinóide endógeno constituído por recetores específicos e os seus ligandos semelhantes a canabinóides. Assim, estes compostos, quando no organismo, desencadeiam diversos efeitos por ações agonistas ou antagonistas dos recetores deste sistema. Os dois recetores que constituem o sistema canabinóide endógeno são: o CB₁ (recetor central) e CB₂ (recetor periférico), ambos acoplados a proteínas G inibidoras (G_i). O Δ^9 -THC apresenta semelhante afinidade para com estes dois recetores (Grotenhermen, 2003; Huestis, 2007).

O CB₁ encontra-se também acoplado a diversos tipos de canais iónicos e tem, ainda, a capacidade de bloquear os recetores de serotonina. O CB₁ pode ser encontrado no sistema

nervoso, levando a efeitos dos canabinóides ao nível da percepção, memória, entre outros. No entanto também se encontram, em menor quantidade, em glândulas endócrinas, leucócitos, coração, fígado, tecido adiposo e nos tratos reprodutivo, urinário e gastrointestinal (Grotenhermen, 2003; Huestis, 2007).

Já os recetores CB₂ estão presentes, principalmente em células do sistema imunitário, como os leucócitos, no baço e amígdalas. Investigações sobre este recetor tem elevada importância para aplicação médica, devido às possíveis ações analgésicas, anti-inflamatórias e imunossupressoras, uma vez que, ao contrário do recetor CB₁, este, quando ativado, não desencadeia efeitos psicoativos, nem no sistema circulatório, podendo ser um fator de risco para um enfarte do miocárdio (Grotenhermen, 2003; Huestis, 2007).

3.6- Efeitos Farmacodinâmicos

Os canabinóides, dado o seu amplo mecanismo de ação, desencadeiam múltiplos efeitos no organismo, atuando em praticamente todos os sistemas biológicos. Esses efeitos podem diferir consoante a dose, via de administração, a personalidade do indivíduo bem como características comportamentais ou metabólicas deste.

Os efeitos farmacodinâmicos mais relevantes dos canabinóides verificam-se no:

- **Sistema cardiovascular-** Taquicardia, débito aumentado, aumento da necessidade de oxigénio, vasodilatação, hipotensão ortostática, hipertensão (na posição horizontal), inibição da agregação plaquetária.
- **Sistema digestivo-** Hipossalivação e boca seca, movimentos intestinais reduzidos e esvaziamento gástrico retardado.
- **Sistema hormonal-** Influência sobre a hormona luteínica, hormona folículo-estimulante, testosterona, prolactina, somatotropina, hormona estimulante da tiróide, metabolismo da glucose, contagem e motilidade espermática reduzidas, ciclo menstrual perturbado e ovulação suprimida.
- **Sistema imunitário-** Comprometimento da imunidade mediada por células e humoral, estimulação imunológica, efeitos anti-inflamatórios e antialérgicos. Diminuição da temperatura corporal.
- **Sistema Pulmonar-** Broncodilatação.
- **Sistema nervoso-** Analgesia, relaxamento muscular, estimulação do apetite, vômitos, efeitos antieméticos, neuroproteção na isquemia e hipoxia, pensamento fragmentado, criatividade aprimorada, memória perturbada, marcha instável, fala arrastada, fraqueza, deterioração ou melhora da coordenação motora, fadiga, euforia, aumento do bem-estar, disforia, ansiedade, redução da ansiedade,

despersonalização, aumento da percepção sensorial, aumento da experiência sexual, alucinações, alteração da percepção do tempo, agravamento de estados psicóticos, sono.

- **Sistema oftalmológico-** Conjuntiva avermelhada, fluxo lacrimal reduzido, diminuição da pressão intraocular.
- **Desenvolvimento fetal-** Malformações, retardo do crescimento, comprometimento do desenvolvimento cerebral fetal e pós-natal, comprometimento das funções cognitivas (Grotenhermen, 2003).

4- Metodologia Analítica

4.1- Tratamento de amostras

Ao SQTF chegam uma ampla variedade de amostras suscetíveis de ser/conter substâncias tóxicas de elevada importância legal. As amostras biológicas são as mais utilizadas para proceder a análises toxicológicas.

4.1.1- Amostras biológicas

As amostras biológicas podem englobar fluídos, células ou tecidos de origem humana ou animal que podem ser usadas para a detecção de xenobióticos. Estas podem ser: saliva, sangue, suor, urina, cabelo, fígado, conteúdo gástrico, entre outros, sendo que todas elas necessitam de ser tratadas com metodologias extrativas distintas dadas as suas características.

A amostra biológica mais comum em toxicologia forense é o sangue. O sangue é uma matriz complexa dada a sua variedade de constituintes, desde proteínas, a eritrócitos, a lípidos e minerais. Este funciona como veículo para o transporte de nutrientes, hormonas, produtos metabólicos e gases para todo o organismo. O sangue é a matriz que melhor permite correlacionar a concentração das substâncias presentes e o seu respetivo efeito no organismo. É possível detetar nesta amostra, tanto *antemortem* como *postmortem*, substâncias como medicamentos, substâncias ilícitas, pesticidas, etanol, entre outras. (Mantiniéks et al., 2021; Pélissier-Alicot, Gaulier, Champsaur, & Marquet, 2003; Pounder & Jones, 1990)

Dada a complexidade do sangue como amostra biológica, procedimentos extrativos têm de ser aplicados de forma a isolar o xenobiótico alvo, à exceção do etanol e outros voláteis. As técnicas de extração mais comuns para esta matriz são a extração líquido-líquido, a

extração em fase sólida (SPE) e a precipitação proteica (PP) (Stone, Nair, & Clarke, 2017). Neste trabalho foram comparadas as técnicas de SPE e PP para extração de canabinóides em amostras de sangue, como se abordará mais à frente.

4.1.2- Extração em fase sólida

A extração em fase sólida (SPE) tem sido uma das técnicas extrativas mais usadas no laboratório do SQTf. Esta é uma técnica que usa cartuchos de extração, os quais contêm um polímero no seu interior, para reter o(s) analito(s) alvo e, assim, separá-los da matriz (Fig. 3). Os analitos são posteriormente recuperados por eluição, por adição de solventes adequados (Poole, 2003; Stone et al., 2017).

De forma sintetizada, os passos desta técnica incluem:

- **Acondicionamento-** Adição de solventes aos cartuchos para ativação do polímero.
- **Lavagem-** Após aplicação da amostra, o cartucho é lavado com soluções de modo a retirar vestígios da matriz.
- **Secagem-** A secagem do cartucho é realizada sobre vácuo, durante vários minutos.
- **Eluição-** Adição de solvente adequado ao cartucho de modo a retirar os analitos retidos no polímero.

Todos estes passos são realizados a um fluxo lento e constante, num sistema de vácuo para cartuchos (Stone et al., 2017).

Os principais objetivos do SPE são a concentração do(s) analito(s) e remoção de interferentes da matriz (Poole, 2003; Stone et al., 2017). No entanto, apresenta algumas desvantagens, tais como o elevado custo e gasto de solventes, a maior dificuldade e tempo necessário no desenvolvimento do método de extração em comparação com outras técnicas (Stone et al., 2017).

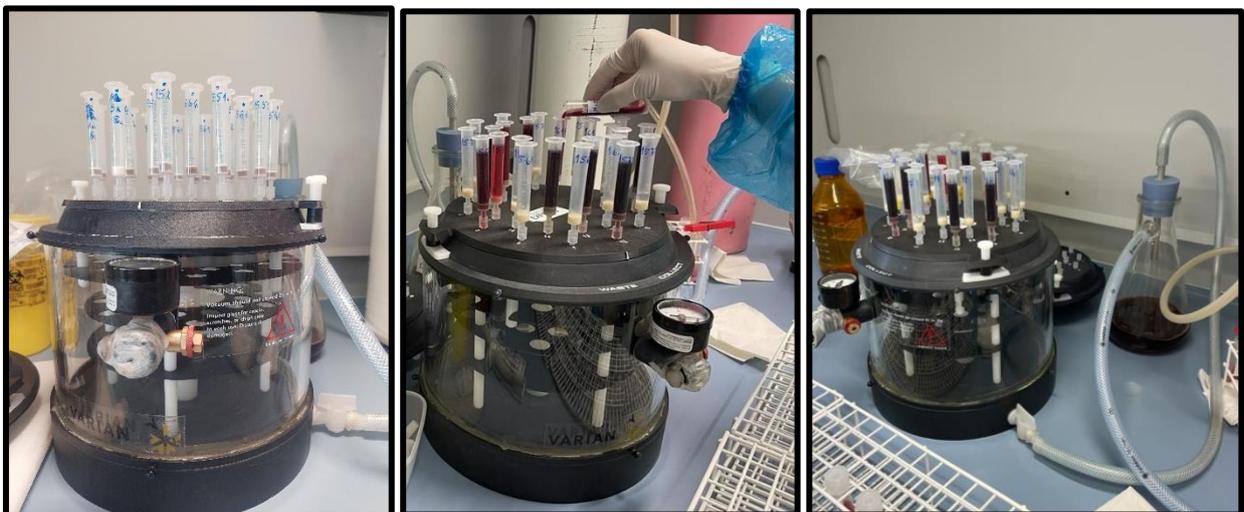


Figura 3- Aparelho de extração com os cartuchos colocados e aplicação das amostras no processo extrativo por extração em fase sólida.

O procedimento de extração por SPE é utilizado no SQTf na confirmação e quantificação de canabinóides em amostras de sangue por LC-MS/MS.

4.1.3- Precipitação proteica

A precipitação proteica (PP) é uma técnica simples e rápida, que se baseia na capacidade de determinados analitos se ligarem fortemente a proteínas como as do sangue. As proteínas são, deste modo, utilizadas para transporte de substâncias quer endógenas quer exógenas. Esta técnica baseia-se na capacidade de um solvente quebrar a ligação entre as proteínas da matriz e os analitos alvo a elas acopladas por desnaturação proteica (Bylda, Thiele, Kobold, & Volmer, 2014; Polson, Sarkar, Incledon, Raguvaran, & Grant, 2003). Os solventes utilizados promovem a agregação dos resíduos proteicos e a sua precipitação. Os analitos são, deste modo libertados e dissolvem-se no solvente (Fig. 4). Diferentes técnicas de precipitação proteica podem ser aplicadas, de acordo com o solvente utilizado (solventes orgânicos, ácidos, sais, iões metálicos, entre outros) que tem de ter conta as características de solubilidade da substância alvo e das proteínas (Polson et al., 2003).

No entanto é necessário considerar a possibilidade da presença de um maior número de interferentes, como fosfolípidos, quando comparado com outras técnicas como o SPE (Chambers, Wagrowski-Diehl, Lu, & Mazzeo, 2007; Stone et al., 2017).

Esta técnica, tendo em conta o solvente usado e a razão solvente/sangue, tem uma eficiência de precipitação proteica superior a 90%. Segundo alguns autores, que estudaram a otimização deste procedimento, o acetonitrilo revelou-se ser um adequado agente precipitante para amostras de sangue (4:1, v/v), dado que 94,9% das proteínas presentes desnaturam e precipitam, libertando o analito alvo. (Polson et al., 2003), Para além disso, referem que o acetonitrilo demonstra ser o melhor agente de precipitação, uma vez que reduz a presença de fosfolípidos na amostra em 40% quando comparado com o segundo melhor agentes de precipitação o solvente metanol (Bylda et al., 2014).

A PP é uma técnica simples, de baixo custo, muito rápida, com perda mínima de analitos, extremamente eficiente mesmo para volumes reduzidos de amostra, estando a ser aplicada, na perícia laboratorial, na extração de uma ampla gama de substâncias medicamentosas (Polson et al., 2003; Stone et al., 2017).

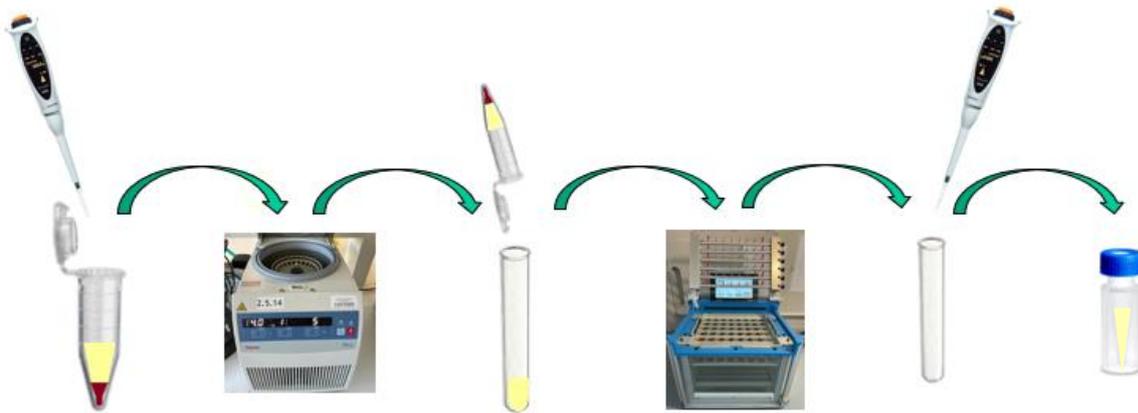


Figura 4- Esquema representativo do processo extrativo por precipitação proteica.

4.2- Cromatografia líquida de alta resolução acoplada a espectrometria de massa

A cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa sequencial (LC-MS/MS) é uma técnica com elevada sensibilidade e eficiência, tendo a capacidade de separar os analitos que estão presentes numa amostra complexa por aplicação de uma cromatografia líquida de alta resolução e proceder à sua análise com recurso a um detetor de massa (Lynch, 2017).

Esta técnica usa um fluxo constante de fase móvel em modo isocrático ou em gradiente para a separação de compostos de uma amostra injetada no sistema cromatográfico dentro de uma coluna analítica (designada por fase estacionária). Esta separação ocorre devido às diferentes afinidades de polaridade dos compostos para com a fase móvel. Ao saírem da coluna, o solvente é evaporado e os analitos são ionizados por vaporização, a elevada temperatura, utilizando, por exemplo, azoto gasoso, à entrada do detetor de massas. Neste caso, a técnica de ionização denomina-se de eletrospray (ESI), que pode ser realizada em modo positivo ou negativo. Os iões formados são, posteriormente, introduzidos no espectrómetro de massa por aplicação de um forte campo elétrico ou magnético que os transporta pelo interior do detetor, onde são separados e analisados de acordo com as suas razões massa/carga (m/z) (Agilent-Technologies, 1998; Waters, 1999).

Esta análise e deteção dos iões é atualmente realizada usando quadrupolos. Os quadrupolos podem ser usados em dois modos, monitorização de um único ião (SIM), onde se observa uma única massa específica, ou uma pequena seleção de massas específicas, o que aumenta a sensibilidade para um analito específico, ou em varrimento (scan), onde se obtém todo um espectro de massa de um intervalo desejado, o que permite detetar todos os

iões presentes de m/z incluídas no intervalo de massas selecionado. Atualmente, são utilizados sistemas de LC-MS/MS do tipo triplo quadrupolo. Nestes sistemas, são utilizados quadrupolos posicionados linearmente entre si onde o primeiro quadrupolo (Q1) separa os iões, que entram na célula de colisão (Q2 ou CID) e sofrem fragmentação, resultando na geração de iões fragmento que são separados no segundo quadrupolo (Q3) e são então detetados (Agilent-Technologies, 1998; Niessen & Tinke, 1995; Shimadzu Corporation, 2019; Waters, 1999).

No SQTf encontram-se à disposição dois equipamentos de LC-MS/MS do tipo triplo quadrupolo, um da marca Waters e outra da marca Sciex, para a realização da rotina laboratorial que consiste na deteção, confirmação e quantificação de medicamentos, benzodiazepinas e canabinóides.

Atualmente, no equipamento Acquity UPLC/TQD (Waters, Massachusetts, EUA), realizam-se os procedimentos laboratoriais para a pesquisa de benzodiazepinas e de canabinóides, em amostras de sangue. Este equipamento, também permite detetar 87 substâncias medicamentosas numa única amostra num tempo de injeção de 14 minutos. Estas substâncias dividem-se pelas suas ações farmacológicas de antidepressivo, β -bloqueante, antipsicótico, ansiolítico, antiepilético/anticonvulsivante, disfunção erétil, anti hipertensor, anti-inflamatório não esteroide, bloqueador do canal de cálcio, analgésico, estupefaciente, hipnótico e diurético.

No entanto, a aquisição do novo equipamento ExionLC AD/Qtrap 6500⁺, (AB Sciex, Framingham, Massachusetts, U.S.A) passou a permitir a deteção, confirmação e quantificação de 197 substâncias medicamentosas, incluindo benzodiazepinas, presentes numa amostra, num tempo de injeção de 14 minutos. Prevê-se que este método, no futuro, permita detetar mais de 200 substâncias, desde medicamentos, benzodiazepinas, a alguns pesticidas e algumas substâncias ilícitas de forma eficaz, rápida e sensível.

Este equipamento, além de ter um detetador do tipo triplo quadrupolo, apresenta um sistema de “linear ion trap” (LIT) sendo, deste modo, possível utilizar de forma simultânea, dois modos de scan distintos para a deteção, confirmação e quantificação de substâncias de interesse, como se explica no ponto seguinte.

4.2.1- Monitorização de reações múltiplas (MRM)

A monitorização de reações múltiplas (MRM) é um modo de varrimento de alta sensibilidade e seletividade usado para quantificar vários compostos presentes numa mistura. Este modo requer a obtenção de duas transições por analito, uma de quantificação e outra de qualificação, para que, a partir do tempo de retenção obtido (RT) e da razão entre as áreas resultantes, se verifique o critério de identificação do analito. Nesta tecnologia, o ião precursor

de interesse é selecionado no Q1, sendo posteriormente fragmentado por dissociação induzida pela colisão de um gás neutro no Q2 como por exemplo o gás argônio. Os fragmentos resultantes (íons fragmento) são analisados no Q3 (Fig. 5). (Campbell, Collings, Le Blanc, & Hager, 2018; Matraszek-Zuchowska, Wozniak, & Posyniak, 2016). A seleção e filtração dos íons que ocorre nos Q1 e Q3, auxilia na redução do ruído de fundo; no entanto, essa redução pode ser insuficiente ou não dissipar sinais interferentes provenientes da matriz a baixas concentrações do analito.

O modo de MRM é o aplicado para a confirmação e quantificação de benzodiazepinas, medicamentos e canabinóides na rotina laboratorial da equipa III em ambos os equipamentos existentes do SQTFC.

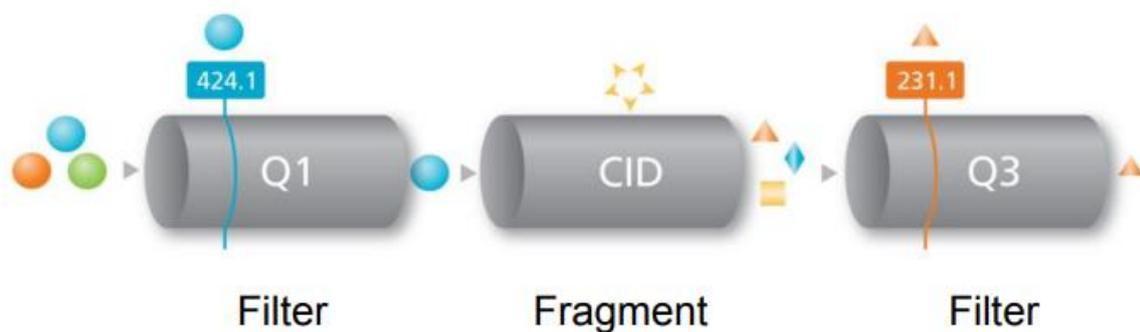


Figura 5- Esquema representativo dos três quadropolos presentes no detector de massas e sua função em modo MRM («Powerful scan modes of QTRAP® System Technology», 2019).

4.2.2- Modo MS/MS/MS (MS³)

O modo MS³ também conhecido como MRM³ é uma técnica que combina o modo de varrimento MRM e a armadilha de íons linear (LIT), aumentando, desta forma, a sensibilidade e seletividade do método para os analitos de interesse. Na prática, o íon precursor de interesse é selecionado no Q1, sendo posteriormente fragmentado por dissociação induzida pela colisão de um gás neutro na célula de colisão pressurizada Q2. Os íons fragmento entram no Q3 onde ficam retidos por alguns milissegundos. Estes sofrem nova fragmentação (íons fragmento de segunda geração) e são estes que, decorrido o tempo de acumulação, são analisados (ver figura 6). O terceiro quadrupolo funciona, então, como LIT e como detector. O varrimento dos íons fragmento de segunda geração aumenta a sensibilidade e a seletividade do método, uma vez que estes são distintos entre si e há menos interferência por parte de outros íons durante a detecção dado que apenas os íons fragmento selecionados sofrem retenção no LIT. Desta forma, íons interferentes são libertados sem análise do Q3, diminuindo consideravelmente o ruído de fundo (Campbell et al., 2018; Ma et al., 2022; Yin, Ji, Cao, Li, & Huang, 2021).

O MS³ é uma técnica ainda recente e muito pouco aplicada. Têm surgido nos últimos anos algumas investigações aplicando este modo de scan; no entanto, segundo o nosso conhecimento, a aplicação desta técnica para confirmação e quantificação de canabinóides em amostras biológicas encontra-se numa fase muito preliminar e apenas para cabelo (Franz, Skopp, Schwarz, & Musshoff, 2018; Hehet, Franz, Kunert, & Musshoff, 2022; Sørensen & Hasselstrøm, 2017; Thieme, Sachs, Sachs, & Moore, 2015).

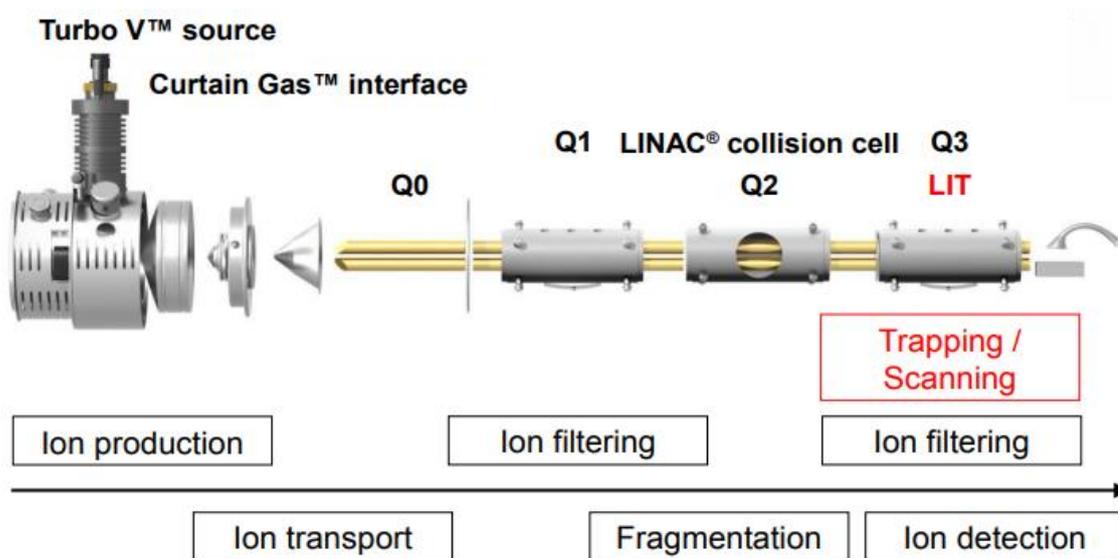


Figura 6- Esquema representativo dos três quadrupolos presentes no detetor de massas e sua função em modo MS³ (retirado em <https://sciex.com/resource-library>).

4.3- Importância da validação de métodos analíticos

A validação de um método analítico tem como finalidade assegurar a qualidade do método usado numa análise específica, assim como a fiabilidade dos resultados que dele resultam. Deste modo, a validação consiste na aplicação de um conjunto de avaliações para que se demonstre, de forma objetiva, o cumprimento dos critérios mínimos de aceitação do método, assim como identificar as suas limitações na análise específica para o qual foi desenvolvido (SWGTOX, 2013; AAFS Standards Board, 2019; Peters, Drummer, & Musshoff, 2007).

Assim, um laboratório deve sempre proceder à validação de ensaios quando desenvolve um novo método ou pretende usar um método já existente e não validado, em situações em que ocorrem alterações num método já desenvolvido ou quando se pretende demonstrar a equivalência entre um método/equipamento já validado e um novo método/equipamento. É importante salientar que os parâmetros devem ser avaliados em amostras similares àquelas onde se pretende aplicar o método, fortificando, assim, amostras brancas da matriz em estudo com os analitos de interesse (SWGTOX, 2013; AAFS Standards Board, 2019).

Capítulo II- Objetivo

O objetivo da componente prática do mestrado realizada no INMLCF no Serviço de Química e Toxicologia Forenses da Delegação do Centro para a elaboração desta dissertação divide-se da seguinte forma:

- 1ª etapa- Familiarização com a rotina laboratorial;
- 2ª etapa- Observação de todos os procedimentos de rotina realizados pela equipa III (equipa do LC-MS/MS);
- 3ª etapa- Colaboração na realização de perícias toxicológicas solicitadas à equipa III;
- 4ª etapa- Desenvolvimento e validação de um método analítico por LC-MS/MS.

Para alcançar o último objetivo, procedeu-se à validação de um método analítico de confirmação e quantificação de canabinóides em amostras de sangue, com prévia precipitação proteica utilizando uma reduzida quantidade de amostra (0,1 mL) e por LC-MS/MS.

Foram estudados todos os parâmetros de validação necessários, isto é, a seletividade, linearidade, precisão (reprodutibilidade, precisão intermédia e repetibilidade), exatidão, eficiência de extração, arrastamento (*carryover*), efeito matriz e limiares analíticos (limites de deteção e quantificação).

Após validação, este método foi aplicado em casos reais forenses. Desta forma, comparou-se os resultados obtidos por aplicação do novo método desenvolvido, com os resultados obtidos através do método já utilizado no SQTF, a extração em fase sólida de 0,5 mL de sangue.

Capítulo III- Trabalho Experimental

1- Introdução

Este trabalho surgiu com o intuito de agilizar a determinação e confirmação de canabinóides na rotina laboratorial, utilizando uma quantidade reduzida de amostra.

A parte experimental consiste na validação de um método analítico para a determinação de canabinóides em 0,1 mL de sangue utilizando precipitação proteica seguida de análise por LC-MS/MS.

2- Materiais e métodos

2.1- Materiais e reagentes

Os padrões e reagentes utilizados no decorrer do desenvolvimento e validação do método analítico para os canabinóides por precipitação proteica encontram-se nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1- Padrões utilizados no trabalho experimental descrito nesta tese.

Padrão	Concentração	Lote	Validade	Fabricante
Δ^9 -THC	1 mg/mL	FE08221804	09-23	Cerilliant
Δ^9 -THC-d3	0,1 mg/mL	FE10081801	11-23	Cerilliant
THCCOOH	1 mg/mL	FE05021702	08-22	Cerilliant
THCCOOH-d3	1 mg/mL	FE03291702	05-22	Cerilliant
11-OH-THC	1 mg/mL	FE08201801	09-21	Cerilliant
11-OH-THC-d3	0,1 mg/mL	FE01031903	01-24	Cerilliant

Tabela 2- Reagentes utilizados no trabalho experimental descrito nesta tese.

Reagente e solução	Referência	Validade	Marca	Fabricante
Água LC-MS	39253-1L	16-05-23	Riedel-de Haën	Honeywell
Acetonitrilo \geq 99.9%	34967-1L	26-09-21	Riedel-de Haën	Honeywell
Ácido Fórmico \geq 98%	1002641000	31-06-26	Supelco®	Merck
Metanol LC-MS	34966-1L	06-10-21	Riedel-de Haën	Honeywell
Formato de amónia \geq 99%	70221-25G-F	16-06-21	Sigma-Aldrich®	Merck

2.2- Preparação de misturas de padrões, soluções e fases móveis

2.2.1- Mistura padrão de canabinóides deuterados e solução de trabalho

Para a preparação da mistura padrão de canabinóides deuterados de *stock* a 10 µg/mL, coloca-se, num balão volumétrico de 5 mL, metade do volume de metanol, 500 µL dos padrões Δ^9 -THC-d3 e 11-OH-THC-d3 e 50 µL padrão THCCOOH-d3, e por fim perfaz-se o volume com metanol. Leva-se ao vórtex a agitar.

Posteriormente, prepara-se a mistura padrão de canabinóides deuterados de trabalho (PI) a 1 µg/mL (1:10, v/v). Sendo assim, num balão volumétrico de 10 mL, coloca-se 1 mL da solução preparada anteriormente e 9 mL de metanol e leva-se ao vórtex a agitar.

Foram armazenadas no congelador a aproximadamente -20 °C até a sua utilização.

2.2.2- Mistura padrão de canabinóides e soluções de trabalho

A partir dos padrões dos canabinóides, prepara-se uma solução *stock* a 10 µg/mL num balão volumétrico de 5 mL por adição de 50 µL dos padrões Δ^9 -THC, 11-OH-THC e THCCOOH, e por fim perfaz-se o volume com metanol.

Posteriormente, prepara-se uma segunda mistura padrão de canabinóides de *stock* a 1 µg/mL num balão de 10 mL por diluição 1:10 (v/v) da solução preparada anteriormente.

De seguida, prepararam-se as soluções de trabalho que foram utilizadas como calibradores (CAL) na fortificação de sangue branco para a construção de curvas de calibração.

As soluções de trabalho dos controlos (CT) às concentrações baixa, média-baixa e alta de, 1, 5 e 50 ng/mL, respetivamente, foram preparadas da mesma forma que o CAL 1, CAL 5 e CAL 50 (ver tabela 3).

Foram armazenadas no congelador a aproximadamente -20 °C até a sua utilização.

Tabela 3- Preparação das restantes soluções de trabalho dos calibradores utilizados.

Solução de trabalho final (ng/mL)	Volume da solução de stock/trabalho de partida (V)	Metanol: Água (50:50, v/v)
100	500 µL a 1 µg/mL	2000:2500 µL
80	160 µL a 1 µg/mL	840:1000 µL
50	1000 µL a 100 ng/mL	1000 µL
30	600 µL a 100 ng/mL	1400 µL
20	500 µL a 100 ng/mL	2000 µL
15	500 µL a 30 ng/mL	500 µL
10	200 µL a 100 ng/mL	1800 µL
5	200 µL a 50 ng/mL	1800 µL
3	200 µL a 30 ng/mL	1800 µL
2	200 µL a 20 ng/mL	1800 µL
1	200 µL a 10 ng/mL	1800 µL
0,5	200 µL a 5 ng/mL	1800 µL

2.2.3- Fases móveis do sistema LC-MS/MS

2.2.3.1- Fase móvel A- Metanol e formato de amónia 2 mM em ácido fórmico 0,1% (95:5, v/v)

O solvente orgânico consiste em metanol e formato de amónia 2 mM em ácido fórmico 0,1% (95:5, v/v).

Num balão volumétrico de litro, acerta-se o menisco com metanol. Posteriormente, retira-se 50 mL e adiciona-se os 50 mL do solvente formato de amónia 2 mM em ácido fórmico 0,1% preparado no ponto seguinte. Coloca-se no equipamento de ultrassons Sonorex Super RK 510 H (Bandelin, Berlim, Alemanha) durante 15 min e armazena-se no frigorífico entre 2 a 8 °C até utilização.

2.2.3.2- Fase móvel B- Formato de amónia 2 mM em ácido fórmico 0,1% e metanol (95:5, v/v)

A preparação do solvente inicia-se pela retirada de 3 mL de uma garrafa de água LC-MS de litro. Adiciona-se 2 mL de formato de amónia 1M (dissolve-se aproximadamente 3,153 g de formato de amónia ≥ 99% (70221-25G-F, Sigma-Aldrich) em 50 mL de água LC-MS) e 1 mL de ácido fórmico.

Depois de levar aos ultrassons durante 15 min, retira-se 50 mL da solução e reserva-se. Adiciona-se os 50 mL de metanol retirados no ponto anterior. Leva-se a homogeneizar em banho de ultrassons e armazena-se no frigorífico entre 2 a 8 °C até utilização.

2.3- Preparação das amostras

No decorrer da validação do novo método, foi utilizado sangue branco com a solução de preservação salina-adenina-glicose-manitol, cedido pelo Instituto Português do Sangue e Transplantação (IPST). Foi também usado, para a construção de *pools*, sangue *postmortem* periférico e da cavidade torácica recolhidos aquando da autópsia médico-legal preservados com fluoreto de potássio a 1%, e sangue *antemortem*, do ano 2021 existente no INMLCF com o agente de preservação fluoreto de potássio a 1% e Na₂-EDTA. Foi ainda usado amostras de sangue do ano 2022, quer *postmortem* quer *antemortem*, para comparar os resultados obtidos com a metodologia desenvolvida e a já existente. Todos estes sangues obtiveram resultado negativo no ensaio imuno-enzimático e noutros procedimentos de triagem por GC-MS e LC-MS/MS. Os sangues armazenados a -20°C, são colocados à temperatura ambiente num agitador horizontal entre 1 a 2 horas antes da sua utilização.

A preparação das amostras foi realizada conforme descrito na tabela seguinte (tabela 4).

Tabela 4- Preparação das amostras.

	Branco de reagentes	Amostra branca	Calibradores	Controlos	Processos
Água LC-MS	100 µL	-	-	-	-
Metanol:Água (50:50, V/V)	100 µL	100 µL	-	-	100 µL
Sangue	-	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Soluções de referência CAL	-	-	100 µL	-	-
Soluções de referência CT	-	-	-	100 µL	-
Solução de PI	30 µL	30 µL	30 µL	30 µL	30 µL

A curva de calibração foi construída com oito pontos às concentrações de 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 50 e 100 ng/mL. Foram ainda selecionados os controlos a 1 ng/mL, a 5 ng/mL e a 50 ng/mL. Posteriormente à homogeneização, adicionou-se 900 µL de acetonitrilo gelado, levou-se ao vórtex de imediato e, de seguida, a centrifugar a 14 000 rpm durante 10 min, a 5 °C na centrífuga Heraeus Fresco 21 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA). Os sobrenadantes foram vertidos para tubos de vidro e levados a evaporar em banho a 40 °C, sob uma corrente de azoto com um fluxo de 2,5 L/min, no evaporador Turbovap LV (Biotage, Uppsala, Suécia). Reconstituiu-se o extrato em 60 µL de metanol e 5 µL foram injetados no sistema cromatográfico.

2.4- Análise cromatográfica

O sistema LC-MS/MS consiste num sistema ABSciex Exion LC HPLC composto por 2 bombas binárias, um forno de colunas e um injetor automático refrigerado. A separação cromatográfica é realizada por uma coluna Waters Acquity UPLC[®] HSS T3 (100x2.1 mm, 1.8 µm) a 45 °C usando uma eluição em modo gradiente com o solvente orgânico (A) e o solvente aquoso (B) a um fluxo de 0,4 mL/min. O gradiente realiza-se do seguinte modo: 45% de fase móvel A aos 0 minutos com crescimento linear até aos 60% de fase móvel A em 4,5 min, e até aos 95% de fase móvel A em 1,5 min; permanece isocrático por 1,5 min seguido de uma diminuição até às condições iniciais em 0,05 min e tempo de equilíbrio por 1,95 min, resultando no tempo total de corrida de 10 minutos.

A espetrometria de massa do tipo triplo quadrupolo foi realizada num espetrómetro de massa ABSciex API 6500+ Qtrap, usando ionização de eletrospray em modo positivo. A deteção MS foi realizada no modo MRM. O azoto obtido a partir de um gerador de azoto (99,93%, Pneumatech, Worthington Creyssensac, Espanha) foi usado como nebulizador e gás de dessolvatação. O árgon foi usado como gás de colisão.

Os parâmetros otimizados de MS/MS foram os seguintes: Temperatura da fonte, 450°C; voltagem de pulverização de iões (IS), +5500 V; pressão na fonte do gás 1 (GS1), 40 psi; pressão na fonte do gás 2 (GS2), 60 psi; pressão de gás de dessolvatação (CUR), 25 psi; gás de colisão (CAD), médio. A Tabela 5 indica os parâmetros de MRM usados na pesquisa dos analitos. A área do pico da transição MRM mais intensa foi usada para quantificação.

O software Analyst 1.7.2 controla o sistema LC-MS/MS e o SCIEXOS Q 2.2 foi usado para processar os dados.

Tabela 5- Tempos de retenção e parâmetros MRM dos canabinóides.

Analytes	Retention Time (RT)	Q1 mass (m/z)	Q3 mass (m/z)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)	Dwell time (msec)
Δ ⁹ -THC	8.28	315.1	193.1 123.0	80	10	29	22	75
Δ ⁹ -THC-d3	8.27	318.1	196.0	80	10	29	22	15
11-THC-OH	7.29	331.1	193.1 201.1	80	10	33	22	30
11-THC-OH-d3	7.28	334.2	196.0	80	10	33	22	15
THC-COOH	7.41	345.1	299.1 193.1	80	10	27	16	30
THC-COOH-d3	7.40	348.1	302.0	80	10	27	16	15

Q1 primeiro quadrupolo, Q3 terceiro quadrupolo, DP potencial de desagregação, EP potencial de entrada, CE energia de colisão, CXP potencial de saída da célula de colisão.

2.5- Parâmetros de validação do método

2.5.1- Especificidade/Seletividade

A especificidade de um método traduz-se na obtenção de um resultado na presença do analito alvo. Já a seletividade assenta na capacidade de se conseguir identificar inequivocamente, o analito alvo, independentemente, de este se encontrar na presença ou não de outras substâncias semelhantes a si, elementos que constituem a própria matriz e/ou impurezas (Karnes, Shiu, & Shah, 1991; Peters et al., 2007; Shah et al., 2000). Desta forma, a especificidade tornou-se um conceito em desuso, uma vez que, na atualidade e em toxicologia forense, o objetivo é conseguir identificar e quantificar diversos analitos em simultâneo em matrizes complexas como o sangue. Assim, o termo mais correto a ser aplicado é a seletividade.

A avaliação deste parâmetro requer a utilização de, pelo menos, seis misturas de sangues de origens diferentes de modo a testar a falta de resposta em amostras negativas, e subsequentemente, a falta de sinais interferentes com o sinal do PI ou do analito alvo em amostras positivas (Peters et al., 2007).

Para realizar este ensaio, foram selecionados sangues *antemortem*, e *postmortem* da cavidade cardíaca e periférico. Foram construídas dez misturas (*pools*), cada uma constituída por quatro amostras negativas para canabinóides. Foram utilizadas duas alíquotas de 100 μ L de cada uma das misturas especificadas na tabela 6. A uma das alíquotas foi aplicado diretamente o procedimento de ensaio por precipitação proteica, enquanto a outra foi, previamente, fortificada com 100 μ L da solução de trabalho de canabinóides do controlo a 5 ng/mL. Preparou-se ainda uma terceira alíquota da *pool* 10 a uma concentração de 5 ng/mL dos analitos, ao qual se adicionou 100 μ L da solução de trabalho de medicamentos a 100 ng/mL, onde estão presentes 125 substâncias medicamentosas estudadas atualmente.

Tabela 6- Misturas de sangue utilizados no estudo da especificidade/ seletividade.

Designação	Tipo de sangue	Número dos processos
Pool 1	Sangue Total (<i>antemortem</i>)	0042/21; 0043/21; 0091/21; 0095/21
Pool 2	Sangue Total (<i>antemortem</i>)	0158/21; 0159/21; 0164/21; 0170/21
Pool 3	Sangue Total (<i>antemortem</i>)	0165/21; 0187/21; 0188/21; 0191/21
Pool 4	Cavidade cardíaca	0049/21; 0051/21; 0052/21; 0055/21
Pool 5	Cavidade cardíaca	0073/21; 0108/21; 0111/21; 0131/21
Pool 6	Cavidade cardíaca	0138/21; 0140/21; 0436/21; 0445/21
Pool 7	Sangue Total (<i>antemortem</i>)	0194/21; 0195/21; 0223/21; 0323/21
Pool 8	Sangue Total (<i>antemortem</i>)	0364/21; 0412/21; 0416/21; 0418/21
Pool 9	Periférico	0270/21; 0343/21; 0426/21; 0443/21
Pool 10	Periférico	0478/21; 0528/21; 0539/21; 0548/21

2.5.2- Efeito Matriz

O efeito matriz é definido como a “alteração direta ou indireta ou a interferência na resposta devido à presença de analitos não intencionais (para análise) ou outras substâncias interferentes na amostra” (Shah et al., 2000, p.1557). Este parâmetro afeta a precisão, seletividade e sensibilidade do método analítico, uma vez que, os elementos que constituem a matriz têm a capacidade de reduzir a intensidade de resposta do analito alvo ou intensificá-la (Peters, 2011; Van Eeckhaut, Lanckmans, Sarre, Smolders, & Michotte, 2009). Esta interferência também pode diferir entre diferentes lotes de matriz, por exemplo em sangue, onde todos os indivíduos são diferentes e embora haja o princípio de que todos os sangues sejam constituídos pelos mesmos elementos, as suas concentrações diferem, uma vez que, por exemplo, determinadas doenças e substâncias medicamentosas provocam alterações a este nível (Matuszewski, Constanzer, & Chavez-Eng, 2003).

Matuszewski et al., propõe que se avalie este parâmetro utilizando matrizes de cinco origens diferentes com a qual se constroem as curvas de calibração.

Para tal, em dois grupos distintos, foram construídas cinco curvas de calibração. Num primeiro grupo (A), as curvas de calibração foram construídas por fortificação de metanol, levadas a evaporar e reconstituídas em 60 µL de metanol. Este grupo não é sujeito a precipitação proteica. No outro grupo (B), utilizou-se os sangues 0042/21, 0043/21, 0436/21, 0426/21 e 0478/21 (ver tabela 6) que foram devidamente fortificados com as oito soluções de trabalho dos calibradores para construção das cinco curvas de calibração. Procedeu-se à precipitação proteica como descrito anteriormente (ver secção 2.3).

A avaliação deste parâmetro é realizada por comparação da área do sinal dos analitos entre os dois grupos, fortificação sem precipitação (A) e com precipitação (B).

2.5.3- Eficiência de extração

A eficiência de extração, também denominada de recuperação, traduz a percentagem de um analito de uma concentração conhecida que é detetada após sofrer todo o processo extrativo (Peters et al., 2007; Shah et al., 2000).

Este parâmetro é avaliado por comparação entre a quantidade detetada de um analito fortificado antes e após a extração, a uma concentração conhecida.

Para tal, foram selecionadas as concentrações dos controlos baixo, médio-baixo e alto de 1 ng/ml, 5 ng/mL e 50 ng/mL, respetivamente. Para cada um dos controlos, foram preparados, em triplicado, dois grupos de amostras em sangue branco. Num dos grupos, seguiu-se o procedimento de preparação da amostra como descrito anteriormente, enquanto no outro grupo, a fortificação foi realizada diretamente no sobrenadante após o processo de precipitação e centrifugação.

2.5.4- Arrastamento

O arrastamento pode ocorrer quando, na matriz, o analito alvo se encontra nas amostras a elevada concentração, levando à deteção deste em amostras posteriores, gerando, assim, falsos positivos.

A avaliação deste parâmetro foi realizada em simultâneo com o anterior. Para tal, foram injetadas três amostras de sangue branco após a injeção de cada uma das alíquotas do controlo alto de um dos grupos, a fim de detetar uma possível contaminação.

2.5.5- Linearidade

A linearidade, ou modelo de calibração de um método analítico, é definida como “a sua capacidade (dentro de um determinado intervalo) de obter resultados de teste que são diretamente proporcionais à concentração (quantidade) de analito na amostra” (como citado em Hartmann, Smeyers-Verbeke, Massart, & Mcdowall, 1998). Em termos práticos, traduz-se numa correlação entre a área relativa do sinal e a concentração do analito na amostra, sendo que por norma, requer uma gama mínima de seis concentrações distintas que demonstram uma tendência linear entre as duas grandezas (AAFS Standards Board, 2019).

Para avaliar este parâmetro foi preparada uma curva de calibração com 12 pontos distribuídos entre as concentrações de 0,5 a 100 ng/mL, como descrito na secção 2.3. Para tal, foram adicionadas as concentrações de 3, 15, 30 e 80 ng/mL a partir de soluções de trabalho preparadas a estas concentrações, como descrito na tabela 3.

2.5.6- Precisão

A precisão traduz a “proximidade de concordância (grau de dispersão) entre uma série de medidas obtidas por amostragem múltipla de uma mesma amostra homogénea nas condições prescritas. A precisão pode ser considerada em três níveis: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade.” (International Council for Harmonisation, 1994, p.4). Pode ser expressa na forma de variância, desvio padrão ou coeficiente de variação.

Este parâmetro é composto por:

- Precisão intermédia, que diz respeito a variações dentro do laboratório, como realização do método analítico em dias diferentes, por analistas diferentes, equipamentos diferentes, entre outros (International Council for Harmonisation, 1994). Precisão intermédia é a precisão total resultante de variadas condições, também designada de precisão intra-dias (“between-run”) ou entre-dias (“between-day”) (Peters et al., 2007).

- Repetibilidade, que traduz a precisão intra-ensaio, isto é, sob as mesmas condições de operação em um curto intervalo de tempo (International Council for Harmonisation, 1994). Também pode ser descrito como precisão entre-injeções (“within-run” ou “within-day”) (Peters et al., 2007). Trata-se da concordância dos valores obtidos entre sucessivas medições numa mesma amostra (Karnes et al., 1991).

- Reprodutibilidade, expressa a precisão entre laboratórios (estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização da metodologia) (International Council for Harmonisation, 1994). É possível avaliar a reprodutibilidade de um método a partir de ensaios interlaboratoriais, podendo comparar posteriormente os nossos resultados a nível global. Este método analítico foi utilizado em dois ensaios interlaboratoriais, ainda no decorrer da sua validação.

A precisão intermédia foi avaliada durante cinco dias consecutivos onde se preparava a curva de calibração e as três concentrações dos controlos estudados, em triplicado excetuando ao terceiro dia, de acordo com o procedimento descrito anteriormente (ver secção 2.3).

A repetibilidade foi estudada através da injeção dos controlos baixo, médio-baixo e alto, em quintuplicado.

2.5.7- Exatidão

A exatidão de um método analítico avalia o “grau de proximidade do valor determinado ao valor nominal ou verdadeiro conhecido sob condições prescritas” (Shah et al., 2000, p.1556). Desta forma, evidencia a diferença entre o resultado obtido e o verdadeiro valor (Hartmann et al., 1998; Karnes et al., 1991; Peters et al., 2007). Este parâmetro foi avaliado em conjunto com a precisão intermédia.

2.5.8- Limiares analíticos

Os limiares analíticos de um método analítico são representados pelo limite de detecção (LD) e pelo limite de quantificação (LQ).

O LD é a menor concentração do analito alvo numa amostra que pode ser detetada e diferenciada do ruído de fundo mesmo que não seja quantificável (International Council for Harmonisation, 1994; Peters et al., 2007; Shah et al., 2000).

Já o LQ, também denominado de limite inferior de quantificação, é “a menor quantidade de analito numa amostra que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão adequadas” (Shah et al., 2000, p.1556; International Council for Harmonisation, 1994, p.5). O LQ engloba, também, o limite superior de quantificação. Este representa a maior concentração do analito alvo numa amostra que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão adequadas (International Council for Harmonisation, 1994; Peters et al., 2007; Shah et al., 2000).

Em termos práticos, estes parâmetros podem ser avaliados de diversas formas, como por exemplo, a partir da curva de calibração, ou baseado na razão sinal-ruído, sendo que foi este último o utilizado neste trabalho.

A razão sinal-ruído (S/N) é medida nos pontos da curva de calibração mais baixos (0,5 e 1 ng/mL) de modo a avaliar a diferença entre a intensidade do sinal do analito alvo e a amplitude entre o ponto maior e menor do ruído de fundo, numa determinada área próxima do sinal do analito, de forma a estabelecer a concentração mínima a que o analito é detetado ou quantificável de forma confiável (SWGTOX, 2013; AAFS Standards Board, 2019; International Council for Harmonisation, 1994; Peters et al., 2007).

A intensidade do sinal de um analito a uma determinada concentração, para ser considerado LD, tem de ser três vezes maior que o ruído ($S/N \geq 3$). Já para ser considerado LQ, esta tem de ser pelo menos 10 vezes superior ao ruído ($S/N \geq 10$). É possível que, para uma determinada curva e determinado analito, o LD e o LQ sejam coincidentes.

Capítulo IV – Resultados e discussão

1- Processo de otimização do método cromatográfico

Antes de se dar início à validação, houve a necessidade de se proceder à otimização do método cromatográfico, isto é, estudar as melhores condições de potencial de desagregação (DP), de energia de colisão (CE) e de potencial de saída da célula de colisão (CXP), para o modo de *scan* MRM positivo, nas transições mencionadas na literatura para os analitos em estudo. Deste modo, foi desenvolvido um método resultante com as condições necessárias para a melhor visualização dos picos dos analitos em estudos, ou seja, mais definidos e intensos. Na figura 7, é possível observar a sobreposição de picos nos respectivos RT dos analitos, onde cada um representa valores de DP, CE e CXP distintos.

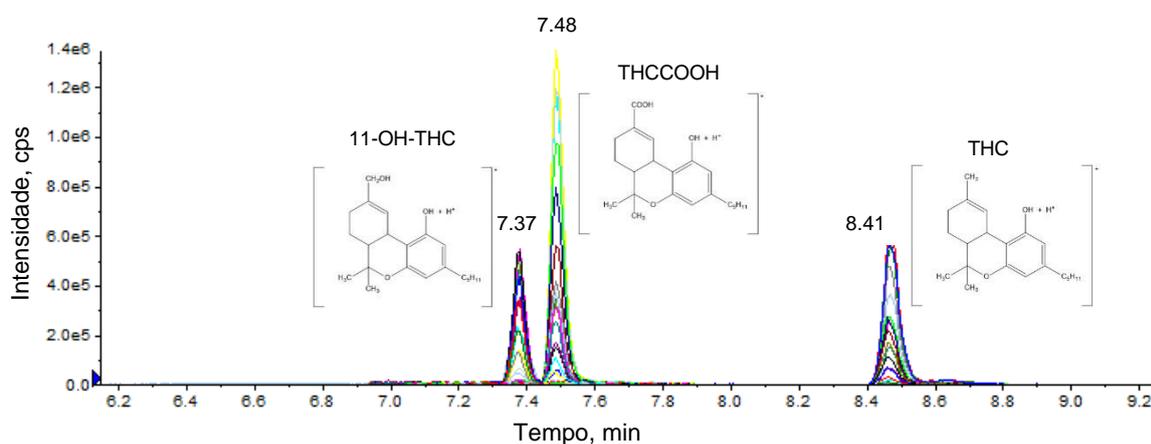


Figura 7- Cromatograma de íões totais (TIC) resultante do processo de otimização dos canabinóides e respectivas estruturas moleculares a partir de uma solução de referência a 100 ng/mL.

A partir do estudo anterior, foram selecionadas as condições que resultaram nos picos mais intensos para cada uma das transições e deste modo, contruir o método para MRM, do qual resultou a figura 8.

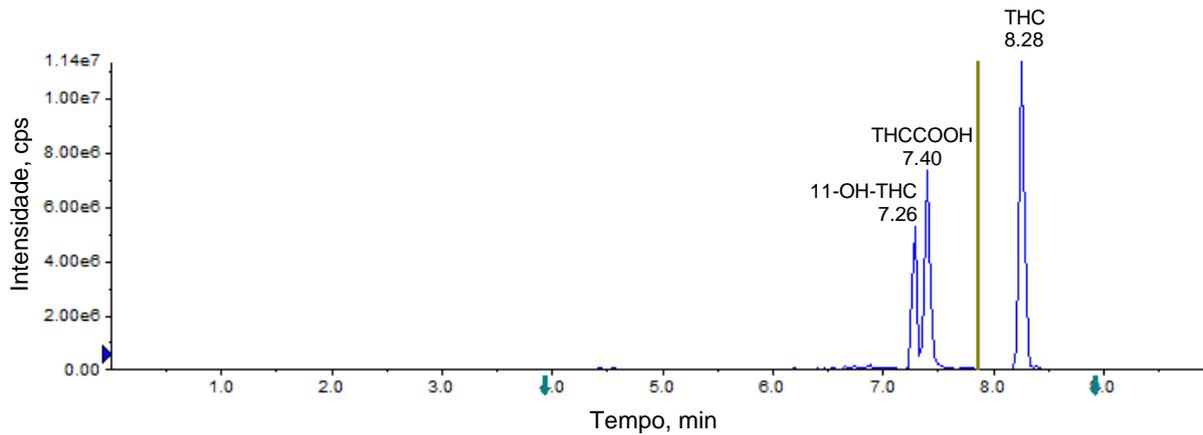


Figura 8- Cromatograma de iões totais resultante da injeção de um controlo a 5 ng/mL.

2- Estudo do padrão de fragmentação dos canabinóides

3.1- Δ^9 -THC

A obtenção de cromatogramas de iões extraídos (XIC), permite analisar os analitos com maior pormenor. A partir da figura 9, é possível observar que, o ião fragmento de maior intensidade gerado a partir do ião precursor de m/z 315,1, é o de m/z 193,1 considerando-se, assim, o fragmento quantitativo ou principal, e o de menor intensidade o de m/z 123,1 (fragmento qualitativo). Também se encontra evidenciado o Δ^9 -THC-d3 de m/z 318,1 > 196.0. A fragmentação do Δ^9 -THC, está, assim, de acordo com a literatura (Andersson, Scheidweiler, Sempio, Barnes, & Huestis, 2016; del Mar Ramirez Fernandez, De Boeck, Wood, Lopez-Rivadulla, & Samyn, 2008; Jagerdeo, Schaff, Montgomery, & LeBeau, 2009; Jamey, Szwarc, Tracqui, & Ludes, 2008; Jamwal, Topletz, Ramratnam, & Akhlaghi, 2017; König, Aebi, Lanz, Gasser, & Weinmann, 2011; Maralikova & Weinmann, 2004; Tiscione, Miller, Shan, Sprague, & Yeatman, 2016). É a presença destes três elementos no espetro, a um mesmo tempo de retenção (RT) que permitem assegurar, com toda a certeza, a presença deste analito numa dada amostra.

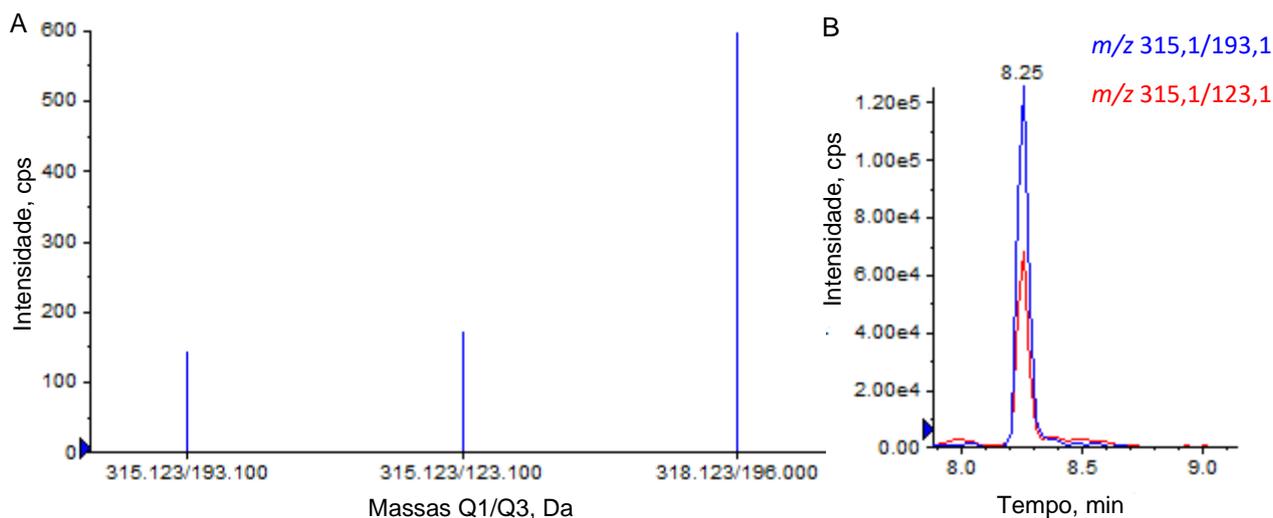


Figura 9- A- Espectro de massa MRM representativo dos íões fragmento do Δ^9 -THC e Δ^9 -THC-d3 num controlo a 50 ng/mL; B- Cromatograma XIC do Δ^9 -THC num controlo a 50 ng/mL.

3.2- 11-OH-THC e THCCOOH

Segundo a literatura, os fragmentos do 11-OH-THC são gerados a partir do ião precursor de m/z 331,1. Os fragmentos quantitativo e qualitativo são, respetivamente, os de m/z 193,1 e 201,1. Já para o THCCOOH os íões fragmento de m/z 299,1 e 193,1 são gerados a partir do ião precursor 345,1 (del Mar Ramirez Fernandez et al., 2008; Jagerdeo et al., 2009; Jamey et al., 2008; Tiscione et al., 2016). A partir da figura 10, podemos concluir que os resultados obtidos estão de acordo com a literatura.

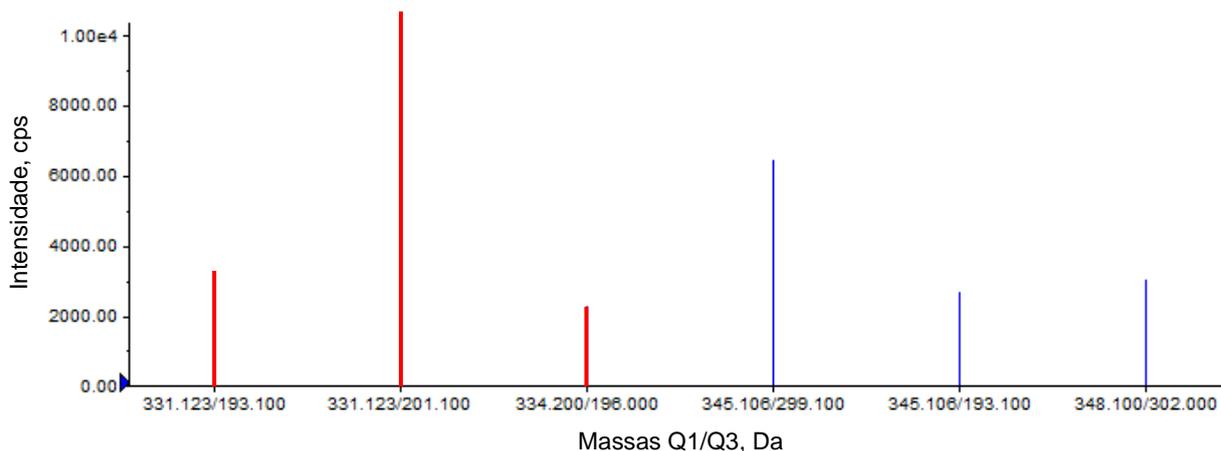


Figura 10- Espectro de massa MRM representativo dos íões fragmento do 11-OH-THC, THCCOOH e respetivos deuterados num controlo a 50 ng/mL. A vermelho está representado o 11-OH-THC e 11-OH-THC-d3; A azul está representado o THCCOOH e THCCOOH-d3.

Na figura 11, estão representados os íões fragmento dos analitos referidos anteriormente.

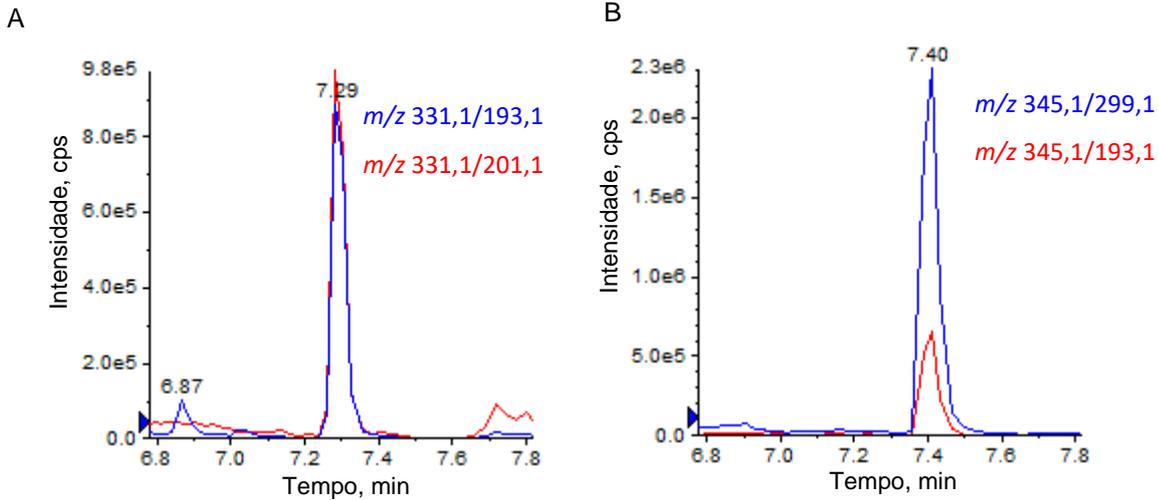


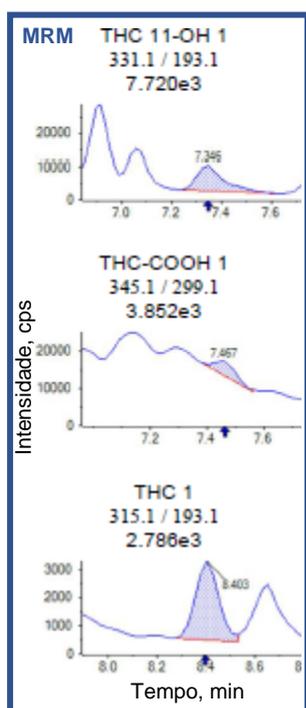
Figura 11- A- Cromatograma XIC do 11-OH-THC num controlo a 50 ng/mL. **B-** Cromatograma XIC do THCCOOH num controlo a 50 ng/mL.

3- Comparação entre a precipitação proteica e extração em fase sólida

Através do software SCIEXOS Q 2.2 é possível visualizar os cromatogramas resultantes da injeção de uma dada amostra, de forma a ter uma representação gráfica da intensidade do sinal em função do tempo. A partir da figura 12, é possível estudar as diferenças do resultado obtido de uma amostra extraída por SPE e por PP, à mesma concentração. Observa-se que, por PP, a intensidade do sinal em todos os analitos é superior ao da amostra preparada por SPE. Em termos de ruído de fundo, as maiores diferenças encontram-se no THCCOOH, onde em SPE o sinal não se encontra isolado do ruído, contrariamente ao que acontece em PP. Também no Δ^9 -THC, se verifica a existência de um sinal de ruído intenso em SPE, enquanto em PP, o cromatograma apresenta um ruído de fundo insignificante.

É de salientar a redução significativa de tempo laboratorial e de custos associados à utilização de solventes e consumíveis quando é aplicado o procedimento por precipitação proteica.

Extração em Fase Sólida



Precipitação Proteica

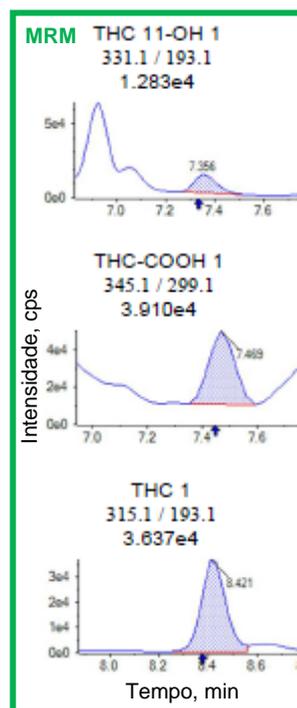


Figura 12- Cromatogramas MRM de duas amostras de sangue, obtidas por extração SPE e PP, a 5 ng/mL.

4- Análise dos parâmetros de validação

4.1- Especificidade/Seletividade

Para avaliar a negatividade/positividade das pools construídas, foram utilizados dois critérios de identificação de analitos: os critérios do tempo de retenção relativo (TRR), dado pela equação 1, e das relações iônicas das transições. O resultado de uma amostra é considerado positivo somente quando os dois critérios são cumpridos. A pool 6 fortificada, foi utilizada como controlo positivo.

$$\text{TRR} = \frac{\text{RT}_{\text{Analito}}}{\text{RT}_{\text{PI}}} \quad \text{Equação 1}$$

Segundo o critério do tempo de retenção relativo, a diferença entre o TRR do analito na amostra em pesquisa ($\text{TRR}_{\text{Amostra}}$) e na amostra controlo ($\text{TRR}_{\text{Controlo}}$) não deve exceder o 1%. A diferença relativa do TRR (ΔTRR) é dado pela equação 2.

$$\Delta\text{TRR} = \frac{\text{TRR}_{\text{Amostra}} - \text{TRR}_{\text{Controlo}}}{\text{TRR}_{\text{Controlo}}} \quad \text{Equação 2}$$

O critério das relações iônicas das transições defende que, as áreas relativas das transições de um dado analito não devem diferir mais que o valor tabelado (ver tabela 7), em

relação as áreas relativas das transições para um mesmo analito na amostra controle. O princípio de que a área do fragmento quantitativo é superior à área do fragmento qualitativo tem de ser verificada.

Tabela 7- Tolerância máxima para as áreas relativas das transições iônicas. (Adaptado de (TOXSAG), 2012)

Áreas relativas (% do pico base)	Tolerância Máxima
> 50%	± 10% (Absoluta)
25% - 50%	± 20% (Relativa)
5% - 25%	± 5% (Absoluta)
< 5%	± 50% (Relativa)

A análise das pools não fortificadas, revelou que, como seria esperado, no critério do TRR, a maior parte dos analitos nas 10 pools não satisfazem a primeira condição ($\Delta\text{TRR} < 1\%$). Ao prosseguir para a avaliação das relações iônicas das transições das pools podemos constatar, mais uma vez, que o critério não é satisfeito. Desta forma, conclui-se com segurança a negatividade das pools não fortificadas. Também os cromatogramas obtidos no software SciexOS Q 2.2, provam graficamente a ausência de falsos positivos.

4.1.1- Positividade das Pools fortificadas

As tabelas 8, 9 e 10 dizem respeito à análise das pools fortificadas, de modo a comprovarmos a sua positividade em relação aos canabinóides em estudo. É possível observar na tabela 8 que todos os analitos satisfazem o critério de TRR. Já na avaliação das relações iônicas das transições podemos constatar, mais uma vez, o cumprimento deste critério para todos os analitos, uma vez que, os resultados obtidos se enquadram dentro dos limites de tolerância admitidos (ver tabela 9 e 10).

Tabela 8- Diferença relativa entre o TRR de cada analito nas pools fortificadas.

Analito	Código das amostras de sangue								
	Pool 1	Pool 2	Pool 3	Pool 4	Pool 5	Pool 7	Pool 8	Pool 9	Pool 10
11-OH-THC	0.001	0.001	0.001	0.000	0.006	0.001	0.003	-0.001	0.003
THCCOOH	0.000	0.000	0.001	0.001	0.007	0.001	0.003	0.000	0.001
Δ^9 -THC	0.000	0.000	0.001	0.001	0.004	0.002	0.002	0.000	0.000

Tabela 9- Áreas relativas das transições iônicas, em percentagem, das respectivas substâncias.

Analito	Transição	Código das amostras de sangue									
		Pool 1	Pool 2	Pool 3	Pool 4	Pool 5	Pool 6	Pool 7	Pool 8	Pool 9	Pool 10
11-OH-THC	331.1>201.1	92.1	93.3	88.4	89.9	90.4	95.0	101.4	87.6	93.1	101.1
THCCOOH	345.1>193.1	25.4	20.5	23.4	24.6	21.1	25.5	23.4	24.3	22.2	28.3
Δ^9 -THC	315.1>123.1	50.7	47.7	50.0	45.1	54.8	48.1	50.9	47.6	48.1	47.3

Tabela 10- Transições iônicas selecionadas para cada analito e respetivo intervalo de tolerância de acordo com o controlo (Pool 6).

Analito	Transições iônicas		Tolerância (%)	
	Quantitativa	Qualitativa	Mínima	Máxima
11-OH-THC	331.1 > 193.1	331.1 > 201.1	85.5	104.5
THCCOOH	345.1 > 299.1	345.1 > 193.1	20.4	30.6
Δ^9 -THC	315.1 > 193.1	315.1 > 123.1	39.5	58.7

A pool 10 fortificada com a solução de trabalho dos medicamentos a 100 ng/mL, não revelou desvio do RT nos analitos estudados à concentração de 5 ng/mL, nem diminuição significativa da intensidade dos picos quando comparado com o resultado obtido desta pool fortificada apenas com os canabinóides.

4.2- Efeito Matriz

O efeito matriz (EM), é determinado pela comparação das áreas dos picos obtidos entre amostras fortificadas e não fortificadas. Deste modo, o EM é traduzido pela equação 3.

$$EM (\%) = \frac{B}{A} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

B é a média da área relativa do grupo B a uma dada concentração;

A é a média da área relativa do grupo A a uma dada concentração.

A área relativa é a razão entre a área do analito e a área do respetivo padrão interno.

O EM traduz-se posteriormente em supressão/intensificação iónica. A partir do resultado obtido, pode-se concluir que a matriz provoca supressão iónica, se o valor for inferior a 100%, ou intensificação iónica se o valor for superior a 100%. Estes resultados não devem diferir em mais de 30% em relação ao valor de base (100%) (Di Rago et al., 2021).

Por análise da tabela 11, podemos observar que há intensificação iônica para todos os analitos e a todos os níveis de concentração. Os resultados obtidos são satisfatórios uma vez que não excedem em $\pm 30\%$ o valor de base, excetuando para o THCCOOH e Δ^9 -THC à concentração de 0,5 ng/mL.

Tabela 11- Efeito matriz nos oitos pontos da curva de calibração (n=5).

Concentração Cal (ng/mL)	11-OH-THC	THCCOOH	Δ^9 -THC
0,5	117.1	161.2	154.9
1	113.0	128.2	117.0
2	108.7	137.2	124.6
5	126.5	128.0	128.9
10	118.8	129.0	123.1
20	125.8	129.5	127.8
50	128.2	129.0	128.7
100	129.4	129.7	128.4

4.3- Eficiência de extração

A eficiência de extração/ recuperação, foi avaliada por comparação das áreas relativas (Arel) dos três níveis de concentração obtidas quando estes são sujeitos a precipitação proteica ou não, segundo a equação 4.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{Arel_{\text{comPP}}}{Arel_{\text{semPP}}} \times 100\% \quad \text{Equação 4}$$

É possível observar pela figura 13 que, para as concentrações de 5 e 50 ng/mL se obteve os resultados mais altos, chegando mesmo a ultrapassar os 100% para o THCCOOH. Quer para o 11-OH-THC quer para o Δ^9 -THC, os valores de recuperação são muitos semelhantes para os três níveis de concentração. O valor mais baixo observado corresponde a 80,7 associado ao THCCOOH a 1 ng/mL. Os resultados obtidos neste parâmetro encontram de forma detalhada no apêndice A.

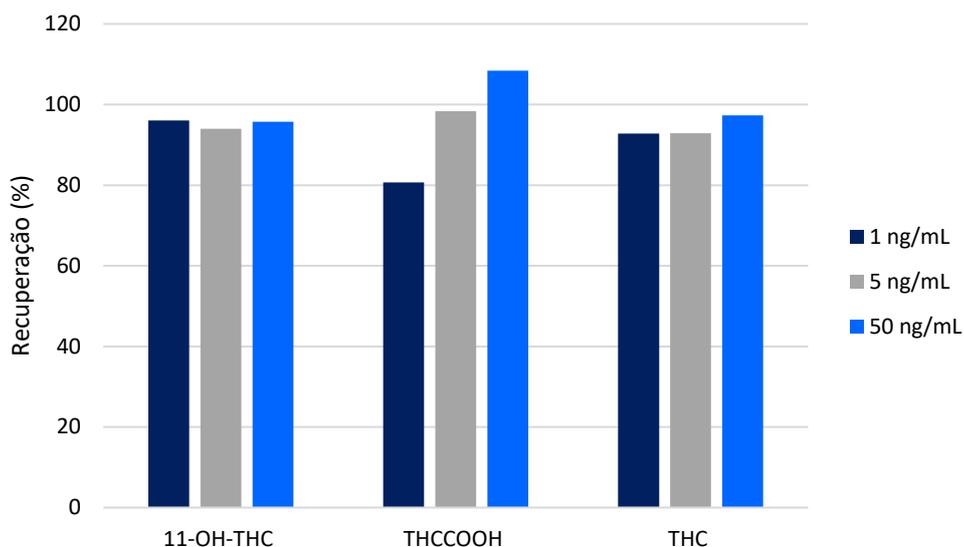


Figura 13- Representação gráfica do resultado obtido na avaliação da eficiência de extração/recuperação para os canabinóides a três níveis de concentração.

4.4- Arrastamento

Não se verificou o fenômeno de arrastamento, dada a ausência de picos aos tempos de retenção dos respectivos analitos.

4.5- Linearidade

Aos resultados obtidos no software SciexOS Q 2.2, foi aplicado o fator de ponderação $1/x$, dado o critério de homocedasticidade não ser cumprido e este ser o fator de ponderação que fornece maiores valores de coeficiente de correlação (r^2) e menor somatório dos resíduos.

No estudo da linearidade foram avaliados, para aceitação das curvas, os seguintes pontos:

- R^2 superior a 0,99;
- Intervalo de interceção da ordenada na origem a um nível de confiança de 95%;
- Análise dos gráficos dos valores residuais.

Na tabela 12, encontram-se resumidos os resultados obtidos no estudo da linearidade. A partir da avaliação deste parâmetro, pode-se constatar que o método é linear na gama de trabalho (0,5-100 ng/mL). Os r^2 das curvas de calibração encontram-se perto do seu valor máximo, sendo superiores a 0,998 para os três canabinóides estudados. O ponto de origem da curva é estatisticamente semelhante a zero. Os gráficos dos valores residuais para o THCCOOH e Δ^9 -THC revelou um ponto em que o seu desvio era superior ao dobro do erro padrão estimado no estudo da regressão das respectivas curvas, tendo sido necessária a sua

remoção. Os resultados obtidos neste parâmetro encontram de forma detalhada no apêndice B.

Tabela 12- Resultado do estudo da linearidade para os canabinóides.

Substância	Equação	R ²	Erro padrão (S _{y/x})	Intervalo de interceção da ordenada na origem		Nº de calibradores utilizados
				95% inf.	95% sup.	
11-OH-THC	y = 0,0026x + 0,0012	0.9982	0.00390	-0.00201	0.00145	12
THCCOOH	y = 0,0036x - 0,0012	0.9997	0.00243	-0.00405	0.00017	11
Δ ⁹ -THC	y = 0,0028x - 0,00002	0.9999	0.00088	-0.00109	0.00041	11

4.6- Precisão

A precisão é expressa na forma percentual do coeficiente de variação (CV). Para tal, é necessário a determinação do desvio padrão (s) e da média da resposta do sinal para cada concentração avaliada (equação 5).

$$CV(\%) = \frac{\text{Desvio padrão}}{\text{Média da resposta}} \quad \text{Equação 5}$$

O valor do CV não deve exceder os 20% para cada concentração.

4.6.1- Precisão intermédia

A avaliação dos parâmetros da precisão intermédia (intra-dias e entre-dias) pode ser realizada de forma individual para cada dia avaliado em cada concentração ou por aplicação de ferramentas estatísticas como a ANOVA (fator único), que fornece estimativas acerca da repetibilidade e da precisão intermédia. As equações aplicadas encontram-se representadas nas tabelas 13, 14 e 15.

Tabela 13- Expressões matemáticas aplicadas pela ANOVA (fator único) (Retirado de "Procedimento operacional: Validação de procedimentos de ensaio", 2012).

Fonte	Média Quadrática (MQ)	Graus de liberdade
Entre grupos	$MS_{\text{run}} = \frac{n \sum_{i=1}^p (\bar{x}_i - \bar{\bar{x}})^2}{p - 1}$	p - 1
Dentro de grupos	$MS_r = \frac{\sum_{i=1}^p \sum_{j=i}^n (x_{ij} - \bar{x}_i)^2}{p(n - 1)}$	p(n - 1)
Total		pn - 1

Onde:

p é o número de sequências de análises para cada nível de concentração;

n é o número de replicados em cada sequência;

x_{ij} representa a concentração de um replicado individual (replicado j) obtido na sequência i ;

\bar{x}_i representa a média da concentração de n replicados obtidos na sequência i ;

$\bar{\bar{x}}$ é a média de p sequências.

Tabela 14- Cálculo das estimativas da precisão (Retirado de "Procedimento operacional: Validação de procedimentos de ensaio", 2012).

Precisão	Expressão
Repetibilidade (S_r)	$S_r = \sqrt{MS_r}$
Precisão entre grupos (S_{run})	$S_{run} = \sqrt{\frac{MS_{run} - MS_r}{n}}$
Precisão intermédia (S_1)	$S_1 = \sqrt{(S_r^2) + (S_{run}^2)}$

Tabela 15- Cálculo das estimativas da precisão (Adaptado de SWGTOX, 2013; AAFS Standards Board, 2019)

Precisão	Expressão
CV Intra-dias (%)	$CV (\%) = \frac{\sqrt{MS_r}}{\bar{\bar{x}}} \times 100$
CV entre-dias (%)	$CV (\%) = \frac{\sqrt{\frac{MS_{run} + (n - 1) \times MS_r}{n}}}{\bar{\bar{x}}} \times 100$

Onde:

MS_r é o quadrado médio dentro dos grupos obtido a partir da tabela Anova;

MS_{run} é o quadrado médio entre os grupos obtido a partir da tabela Anova.

Os resultados obtidos no estudo da precisão intermédia encontram-se resumidos na tabela 16, e de forma mais detalhada no apêndice C, para as três concentrações estudadas dos analitos alvo. Os valores de concentração experimental representam a média dos resultados obtidos ao longo de cinco dias consecutivos. Os valores de CV intra-dias são inferiores a 9% e os valores de CV entre-dias encontram-se entre 4% e 16%, sendo cumprido o limite máximo de um valor de CV inferior a 20%.

Tabela 16- Resultados da precisão intermédia obtidos para os canabinóides.

Substância	Concentração		CV intra-dias (%)	CV entre-dias (%)
	Experimental	Teórica		
11-OH-THC	1	1	8,82	13,35
	4,6	5	7,84	9,94
	44,2	50	4,33	9,37
THCCOOH	1,5	1	6,78	15,77
	4,4	5	8,61	13,35
	44,0	50	6,76	8,66
Δ^9 -THC	1,1	1	5,77	9,49
	4,7	5	4,98	7,08
	47,9	50	3,00	4,63

4.6.2- Repetibilidade

A repetibilidade foi realizada a partir da avaliação dos tempos de retenção relativos (TRR) e das áreas relativas (Arel) das cinco réplicas injetadas. Determinou-se assim, a média, o desvio padrão (s) e o coeficiente de variação para os três níveis de concentração dos controlos.

Os resultados obtidos encontram-se, de forma resumida, nas seguintes tabelas:

Tabela 17- Resultados obtidos no estudo da repetibilidade para o controlo baixo (1 ng/mL).

Analito	TRR			Áreas relativas		
	Média	s	CV (%)	Média	s	CV (%)
11-OH-THC	1.001	0.001	0.1	0.003	0.000	6.7
THCCOOH	1.002	0.002	0.2	0.003	0.000	11.2
Δ^9 -THC	1.002	0.001	0.1	0.003	0.000	14.6

Tabela 18- Resultados obtidos no estudo da repetibilidade para o controlo médio-baixo (5 ng/mL).

Analito	TRR			Áreas relativas		
	Média	s	CV (%)	Média	s	CV (%)
11-OH-THC	1.000	0.000	0.0	0.009	0.001	10.9
THCCOOH	1.001	0.001	0.1	0.016	0.000	3.1
Δ^9 -THC	1.002	0.001	0.1	0.013	0.000	3.4

Tabela 19- Resultados obtidos no estudo da repetibilidade para o controlo alto (50 ng/mL).

Analito	TRR			Áreas relativas		
	Média	s	CV (%)	Média	s	CV (%)
11-OH-THC	1.001	0.001	0.1	0.113	0.006	5.6
THCCOOH	1.001	0.001	0.1	0.152	0.011	6.9
Δ^9 -THC	1.001	0.001	0.1	0.124	0.002	1.3

Para o TRR, os resultados são considerados aceitáveis se o CV foi inferior a 1%. Tal é verificado para todos os analitos. Em relação à Arel, para gamas baixas de concentração, o CV não deve exceder os 20%, enquanto para gamas altas este valor não deve atingir os 10%. Para o CT1 e CT5, podemos observar que o critério é cumprido, embora alguns valores se encontrem entre 10% e 15%. Para o controlo alto (50 ng/mL) o CV mais alto é de 6,9%.

Os resultados obtidos neste parâmetro encontram de forma detalhada no apêndice D.

4.6.3- Reprodutibilidade

O parâmetro da reprodutibilidade pode ser avaliado a partir dos ensaios interlaboratoriais, uma vez que permite comparar os resultados obtidos no SQTF aplicando o método analítico desenvolvido e analisado por LC-MS/MS.

Os resultados obtidos são avaliados segundo o *z-score* (ver equação 6), onde, valores inferiores a 2 traduzem um resultado satisfatório, entre 2 e 3 o resultado é aceitável e, quando o *z-score* é igual ou superior a 3, o resultado é insatisfatório.

$$z - score = \frac{|x - \bar{X}|}{s} \quad \text{Equação 6}$$

Onde:

x é o resultado obtido pelo SQTF-centro;

\bar{X} é a média dos resultados obtidos com a tecnologia em vigor no SQTF-centro;

s é o desvio padrão dos resultados obtidos com a tecnologia em vigor no SQTF-centro.

Nas tabelas 20 e 21 encontram-se, os resultados obtidos pelo SQTF-centro nos dois ensaios interlaboratoriais (BTMF) na avaliação de canabinóides, utilizando a tecnologia LC-MS/MS e a extração SPE. Foram avaliadas, em simultâneo, as amostras dos ensaios utilizando a precipitação proteica permitindo, assim, comparar os resultados obtidos após a receção da avaliação dos ensaios interlaboratoriais.

Pode-se constatar que aplicando o novo método desenvolvido, isto é, a precipitação proteica, quer o Δ^9 -THC, quer o 11-OH-THC apresentam, na sua maioria, resultados

aceitáveis e alguns satisfatórios. No entanto, o THCCOOH apresenta, dois valores de z-score insatisfatórios (≥ 3). De forma geral, obteve-se uma boa reprodutibilidade com esta nova metodologia analítica.

Tabela 20- Resultado obtido no primeiro ensaio interlaboratorial de 2022 aplicando SPE e PP.

BTMF 1/22		Δ^9 -THC (ng/mL)	Z-score	11-OH-THC (ng/mL)	Z-score	THCCOOH (ng/mL)	Z-score
SPE (500 μ L)	Amostra A (Soro)	7,1	2,21	3,9	1,70	154	1,18
PP (100 μ L)		7,3	2,48	4,4	2,84	205	4,18
		Valor Teórico	6		3		130
SPE (500 μ L)	Amostra B (Soro)	-	-	-	-	-	-
PP (100 μ L)		-	-	-	-	-	-
		Valor Teórico	Negativo		Negativo		Negativo

Tabela 21- Resultado obtido no segundo ensaio interlaboratorial de 2022 aplicando SPE e PP.

BTMF 2/22		Δ^9 -THC (ng/mL)	Z-score	11-OH-THC (ng/mL)	Z-score	THCCOOH (ng/mL)	Z-score
SPE (500 μ L)	Amostra A (Soro)	3,0	2,58	2,5	2,55	110	4,96
PP (100 μ L)		3,1	2,90	2,5	2,55	93	2,60
		Valor Teórico	2,0		1,5		75
SPE (500 μ L)	Amostra B (Sangue)	6,1	2,95	4,1	2,11	108	2,50
PP (100 μ L)		4,5	1,02	3,0	0,78	108	2,50
		Valor Teórico	4,0		2,5		85
SPE (500 μ L)	Amostra C (Soro)	3,1	2,31	14	2,85	193	2,14
PP (100 μ L)		3,2	2,56	11,2	0,96	183	1,47
		Valor Teórico	2,0		10,0		150,0

4.7- Exatidão

A exatidão foi avaliada a partir dos valores obtidos para a precisão intermédia. Este parâmetro é dado pela equação 7, onde o seu valor, para ser aceitável, não deve exceder os 20%, em cada concentração avaliada.

$$\text{Exatidão (\%)} = \left[\frac{\text{média da concentração obtida} - \text{concentração teórica}}{\text{concentração teórica}} \right] \times 100 \quad \text{Equação 7}$$

No entanto, é possível avaliar a exatidão de forma mais detalhada por cálculo da recuperação do método, de modo a determinar a possível existência de erros sistemáticos e estimar a incerteza associada à recuperação do método. A incerteza associada ao método é

avaliada por aplicação do teste estatístico de t student. Este permite comparar o valor experimental determinado (t_{exp}) com o valor crítico ($t_{crit} = 2,78$), para uma distribuição bilateral p-1 graus de liberdade num intervalo de confiança a 95%. O t_{exp} é calculado através da equação 8 e a recuperação do método (U_R) pela equação 9. Se $t_{exp} < t_{crit}$ significa que a recuperação do método é estatisticamente semelhante a 100%.

$$t_{exp} = \frac{|100 - \bar{R}|}{\frac{s}{\sqrt{p}}} \quad \text{Equação 8}$$

$$U_R = \frac{s}{\bar{R}} \quad \text{Equação 9}$$

Onde:

\bar{R} é a recuperação média de n replicados;

s é o desvio padrão de n replicados;

p é o número de sequências de análises para cada nível de concentração;

Na tabela 22, encontram-se resumidos os resultados obtidos para o parâmetro da exatidão.

De forma geral, os valores de t_{exp} são inferiores ao do t_{crit} (2,78) para 4 graus de liberdade, o que implica recuperações médias estatisticamente semelhantes a 100%, comprovando a inexistência de erro sistemático. No entanto, para o THCCOOH a uma concentração de 1 ng/mL, o t_{exp} é 3,61 o que indica a existência de erro sistemático a esta concentração. Tal pode dever-se à menor sensibilidade do equipamento e deste método para o THCCOOH.

Tabela 22- Resultados obtidos na avaliação da exatidão dos canabinóides em estudo.

Substância	Concentração (ng/mL)	Recuperação (%)	CV (%)	t_{exp}	Incerteza de R (%)
11-OH-THC	1	98,1	13,9	0,31	6,1
	5	91,3	9,1	2,34	3,7
	50	88,4	11,0	2,66	4,4
THCCOOH	1	143,6	18,8	3,61	12,1
	5	87,5	14,1	2,26	5,5
	50	91,5	7,9	2,65	3,2
Δ^9 -THC	1	112,6	10,3	2,44	5,2
	5	94,5	7,2	1,82	3,0
	50	95,8	4,9	2,04	2,1

4.8- Limiares analíticos

O LD e o LQ correspondem ao menor ponto da curva de calibração (0,5 ng/mL) para todos os analitos, uma vez que, a esta concentração, apresentam uma razão S/N > 10. Não se verificaram melhorias significativas tendo em consideração o método já utilizado na determinação de canabinóides em sangue por SPE (Simões, Ajenjo, & Dias, 2011).

Deste modo, foi introduzida e estudada a tecnologia MS³ que o equipamento da marca Sciex proporciona dado ser um equipamento do tipo triplo quadrupolo e *linear ion trap* (descrito no capítulo 1). A Tabela 23 mostra os parâmetros usados no modo MS³. Na figura 14, é possível observar o modo MRM e modo MS³ para o calibrador a 0,5 ng/mL.

Tabela 23- Tempos de retenção e parâmetros MS³ dos canabinóides.

Analytes	Retention Time (RT)	Q1 mass (m/z)	Q3 mass (m/z)	MS ³ ion scan (m/z)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	AF2 (V)	Excitation time (ms)
Δ^9 -THC	8.28	315.1	193.0	123.0	91	10	29	0.1	25
				137.0	91	10	29	0.1	25
11-THC-OH	7.29	331.2	193.0	123.0	66	10	33	0.1	25
				137.0	66	10	33	0.1	25
THC-COOH	7.41	345.2	193.0	123.0	100	10	35	0.1	25
				137.0	100	10	35	0.1	25

Q1 primeiro quadrupolo, Q3 terceiro quadrupolo/LIT, DP potencial de desagregação, EP potencial de entrada, CE energia de colisão, AF2 energia de excitação.

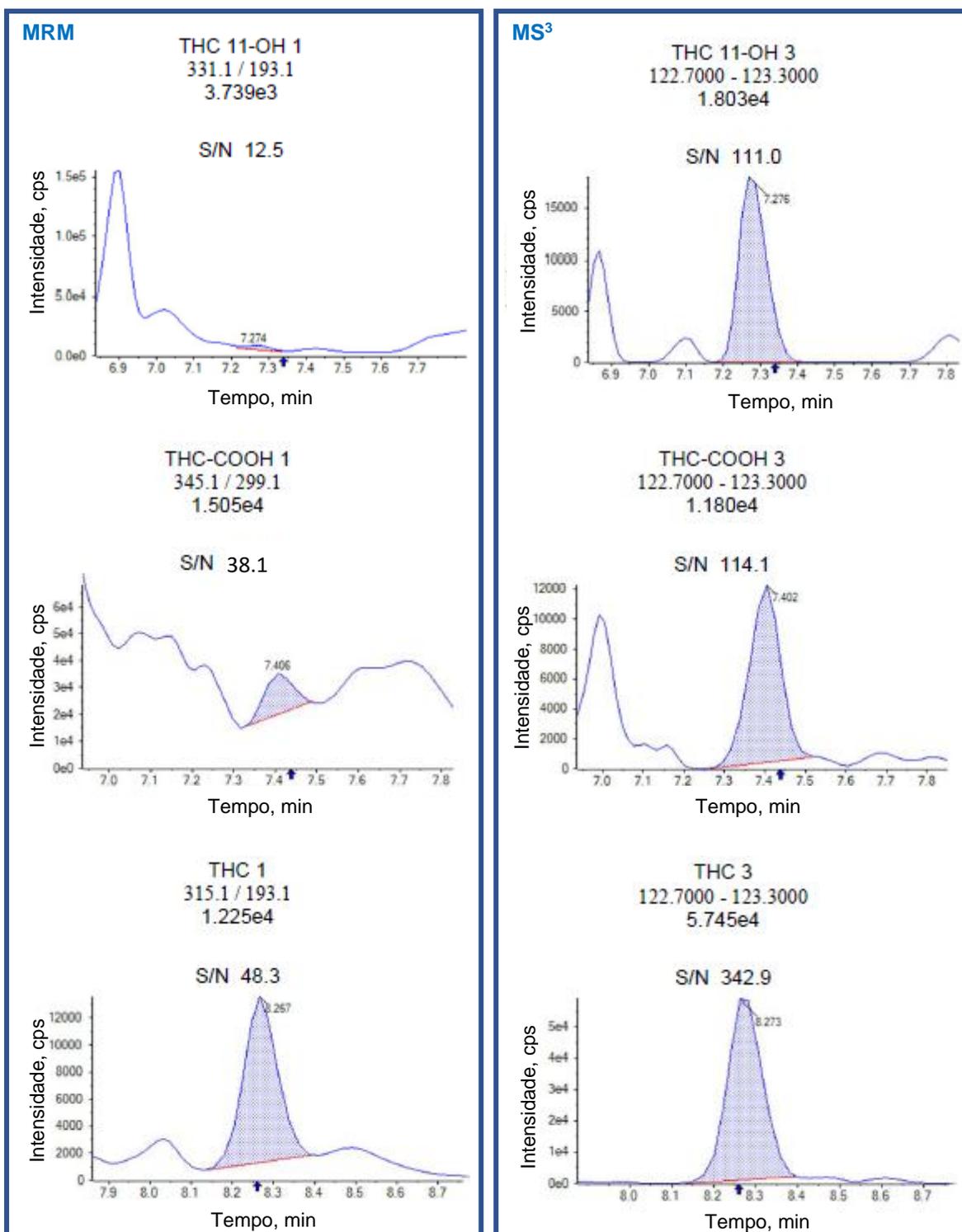


Figura 14- Cromatogramas obtidos a partir de um CAL a 0,5 ng/mL, com a informação da transição do íon de quantificação, respectiva intensidade e razão S/N.

No modo MS³, há uma redução significativa de ruído de fundo para todos os analitos, bem como uma intensificação do sinal para o Δ^9 -THC e 11-OH-THC sendo deste modo, uma ferramenta crucial na confirmação da positividade de amostras para concentrações muito baixas de canabinóides.

5- Modo MS³- Comparação entre a precipitação proteica e extração em fase sólida

Num último passo, avaliou-se o modo MS³ em amostras preparadas por SPE ou PP, à mesma concentração, de modo a observar, mais uma vez, as diferenças entre estes dois procedimentos. Como visto anteriormente, em MS³, manteve-se a tendência de uma maior intensidade do sinal em todos os analitos na amostra preparada por PP. Em termos de ruído de fundo, não se observa diferenças significativas. Isto deve-se à maior seletividade e sensibilidade deste método, que apresenta uma maior capacidade de exclusão de sinais de interferentes presentes na amostra (Fig. 15).

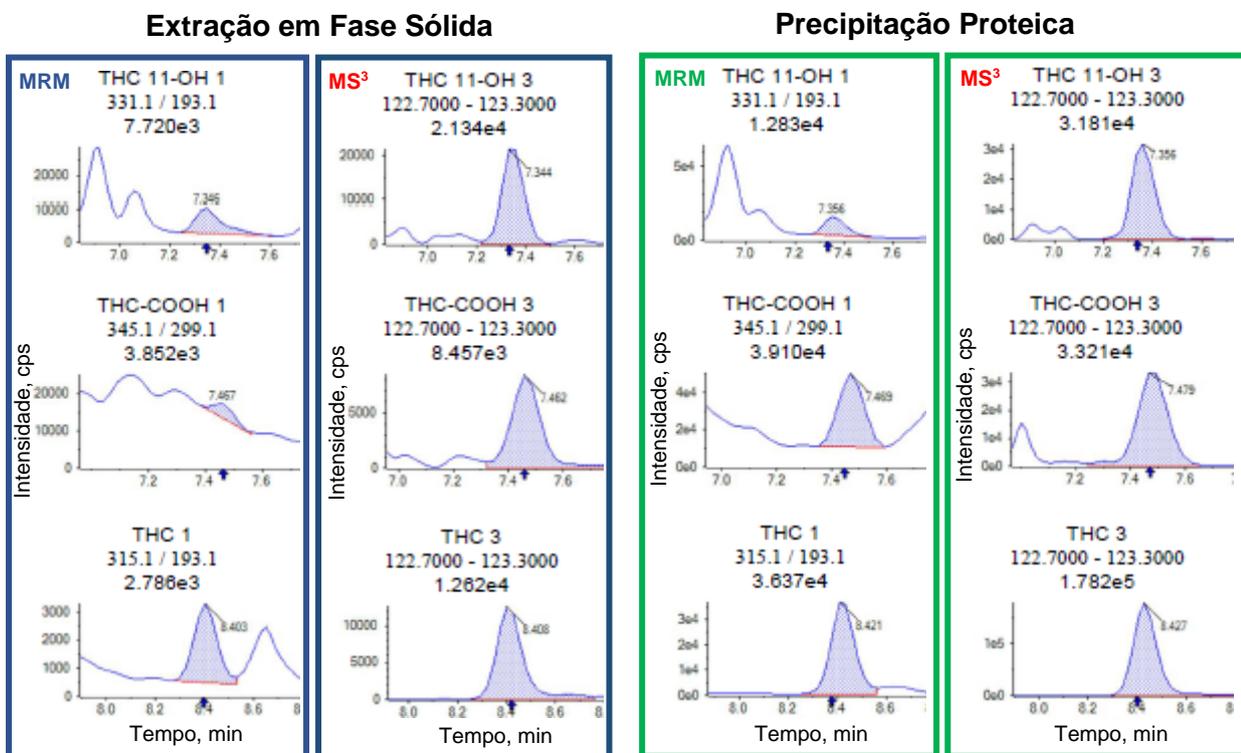


Figura 15- Cromatogramas MRM e MS³ de duas amostras de sangue, obtidas por extração SPE e PP, a 5 ng/mL.

6- Aplicação do método analítico em casos reais forenses

De modo a avaliar os resultados provenientes do novo método analítico, selecionou-se amostras reais forenses que foram preparadas de duas formas distintas, segundo o procedimento de extração em fase sólida de 0,5 mL e por precipitação proteica de 0,1 mL de sangue em ambos os modos (MRM e MS³). Pela tabela 24, observa-se que predomina um desvio de resultados inferior a 1% entre os diferentes métodos analíticos. O THCCOOH apresenta algumas oscilações entre resultados para concentrações mais elevadas do analito refletindo-se num valor de desvio maior.

Tabela 24- Avaliação de casos reais forenses por PP e SPE

Série	Processo	Substância	PP- MRM	PP- MS ³	SPE- MRM	Desvio
			Concentração média (ng/mL)	Concentração média (ng/mL)	Concentração média (ng/mL)	
20220321-5	176_22	11-OH-THC	1.6	1.6	1.3	0.1
		THCCOOH	21.1	21.7	21.3	0.3
		Δ ⁹ -THC	2.6	2.7	3.2	0.3
	194_22	11-OH-THC	7.9	6.5	7.3	0.7
		THCCOOH	229.9	259.6	264.0	18.5
		Δ ⁹ -THC	5.6	5.7	6.3	0.4
	231_22	11-OH-THC	1.3	1.3	0.9	0.2
		THCCOOH	16.7	15.4	17.0	0.9
		Δ ⁹ -THC	3.3	3.0	3.2	0.2
	244_22	11-OH-THC	8.7	9.6	10.6	1.0
		THCCOOH	34.0	30.2	40.0	5.0
		Δ ⁹ -THC	94.7	97.3	101.0	3.2
20220328-9	297_22	11-OH-THC	2.6	2.1	3.3	0.6
		THCCOOH	26.4	38.1	39.0	7.1
		Δ ⁹ -THC	5.3	7.1	6.0	0.9
	325_22	11-OH-THC	6.5	5.0	7.0	1.0
		THCCOOH	77.8	128.5	100.0	25.4
		Δ ⁹ -THC	7.5	9.4	7.9	1.0
	330_22	11-OH-THC	0.6	0.8	< 1	0.1
		THCCOOH	7.2	8.3	8.4	0.7
		Δ ⁹ -THC	0.7	1.6	< 1	0.7
	361_22	11-OH-THC	0.1	0.8	< 1	0.5
		THCCOOH	10.9	11.5	10.0	0.8
		Δ ⁹ -THC	1.8	3.1	2.1	0.7

Capítulo V – Conclusão

Face ao elevado consumo de canabinóides a nível mundial e nacional, é de extrema importância a determinação químico-toxicológica deste tipo de compostos no âmbito da Medicina Legal e das Ciências Forenses.

Este trabalho pretendeu, assim, desenvolver um método mais rápido, barato, mais sensível e mais seletivo para a determinação e quantificação de canabinóides, tendo cumprido todos os parâmetros de validação obrigatórios.

No estudo da seletividade, não foram observados quaisquer falsos positivos ou negativos, inexistindo interferentes da matriz relevantes, permitindo uma identificação inequívoca dos analitos. O efeito matriz observado traduziu-se em intensificação iónica acentuada para todos os analitos, sendo, no entanto, aceitável para amostras biológicas complexas, uma vez que os limiares analíticos e exatidão não foram afetados.

O método revelou-se eficiente, uma vez que apresentou valores médios de eficiência de extração/recuperação entre os 94% e 96% para os analitos em estudo. Constatou-se também a ausência do fenómeno de arrastamento.

O estudo da linearidade com um fator de ponderação aplicado pelo equipamento de 1/x, demonstrou que o método é linear na gama de trabalho avaliada (0,5 a 100 ng/mL).

Dentro do estudo do parâmetro da precisão, avaliou-se a precisão intermédia onde os valores do coeficiente de variação obtidos cumpriram o critério (< 20%). Pela avaliação da repetibilidade foram cumpridos dois critérios exigidos para todos os analitos estudados: o coeficiente de variação do TRR foi inferior a 1% e o coeficiente de variação das Arel não excedeu os 20%. Já a reprodutibilidade revelou resultados promissores, com a maioria dos analitos a obter valores de z-score inferiores a 3.

O método desenvolvido é exato, não sendo afetado de forma significativa, por erros sistemáticos.

A concentração mínima alvo no SQTF para quantificação dos canabinóides é de 0,5 ng/mL. Deste modo, foram considerados os limites de deteção e de quantificação nesta ordem de grandeza (0,5 ng/mL) para as três substâncias analisadas. No entanto, os resultados da validação para este parâmetro revelaram já razões S/N aceitáveis para concentrações inferiores, como, por exemplo, para o Δ^9 -THC a 0,1 ng/mL.

A aplicação deste método em casos reais forenses demonstrou que este é adequado para detetar e quantificar os canabinóides estudados em amostras de sangue, sendo útil a sua aplicação na rotina laboratorial do SQTF. No entanto, os resultados obtidos para o THCCOOH, principalmente a elevadas concentrações, leva-nos a concluir que os parâmetros cromatográficos podem ser melhorados.

Estudos posteriores a esta dissertação devem ser realizados com vista a melhorar a sensibilidade deste método para o THCCOOH. Nomeadamente, a avaliação em modo MRM em ionização de eletrospray em modo negativo e aprimoramento e validação do modo MS³, uma vez que se mostrou mais seletivo que o anterior para todos os analitos.

Bibliografia

AAFS Standards Board. (2019). Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. American Academy of Forensic Sciences: Colorado Springs, CO. Obtido de https://www.aafs.org/sites/default/files/media/documents/036_Std_e1.pdf

Agilent-Technologies. (1998). *Basics of LC/MS*. 4–8.

Andersson, M., Scheidweiler, K. B., Sempio, C., Barnes, A. J., & Huestis, M. A. (2016). Simultaneous quantification of 11 cannabinoids and metabolites in human urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry using WAX-S tips. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(23), 6461–6471. doi: <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9765-8>

Andre, C. M., Hausman, J., & Guerriero, G. (2016). Cannabis sativa : The Plant of the Thousand and One Molecules. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1–17. doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00019>

Bell, S. 8272. (2014). *Forensic Chemistry: Pearson New International Edition* (2ª edição; P. E. Limited, Ed.). Obtido de https://www.academia.edu/36629028/Forensic_Chemistry_2nd_Edition_Suzanne_Bell_Solutions_Manual_pdf

Bylda, C., Thiele, R., Kobold, U., & Volmer, D. A. (2014). Recent advances in sample preparation techniques to overcome difficulties encountered during quantitative analysis of small molecules from biofluids using LC-MS/MS. *Analyst*, 139(10), 2265–2276. doi: <https://doi.org/10.1039/c4an00094c>

Campbell, J. L., Collings, B. A., Le Blanc, J. C. Y., & Hager, J. W. (2018). A novel MS³ experiment for quantifying ions with a linear ion trap. *Canadian Journal of Chemistry*, 96(7), 653–663. doi: <https://doi.org/10.1139/cjc-2017-0734>

Cascini, F., & Boschi, I. (2017). Chapter e1 - Tetrahydrocannabinol Concentration and Genetic Characterization of Cannabis. *Handbook of Cannabis and Related Pathologies* (pp. e1–e10). doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800756-3.00003-X>

Chambers, E., Wagrowski-Diehl, D. M., Lu, Z., & Mazzeo, J. R. (2007). Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. *Journal of Chromatography B*, 852(1–2), 22–34. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.12.030>

Decreto-Lei n.º 166/2012 de 31 de julho do Ministério da Justiça., Pub. L. No. Diário da República: I série, N.º 147, 3951 (2012).

Degenhardt, L., Ferrari, A. J., & Hall, W. D. (2017). Chapter 10 - The Global Epidemiology and Disease Burden of Cannabis Use and Dependence. *Handbook of Cannabis and Related Pathologies* (pp. 89–100). doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800756-3.00011-9>

del Mar Ramirez Fernandez, M., De Boeck, G., Wood, M., Lopez-Rivadulla, M., & Samyn, N. (2008). Simultaneous analysis of THC and its metabolites in blood using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 875(2), 465–470. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.09.032>

Di Rago, M., Pantatan, S., Hargreaves, M., Wong, K., Mantinieks, D., Kotsos, A., ... Gerostamoulos, D. (2021). High Throughput Detection of 327 Drugs in Blood by LC – MS-MS with Automated Data Processing. *Journal of Analytical Toxicology*, 45(2), 154–183. <https://doi.org/10.1093/jat/bkaa057>

Drummer, O. H. (2005). Forensic toxicology. *Forensic Science and Law: Investigative Applications in Criminal, Civil and Family Justice* (Vol. 2). doi: <https://doi.org/10.4324/9781420058116-30>

EISohly, M. A., Gul, W., & Salem, M. (2008). Chapter 5 Cannabinoids analysis: analytical methods for different biological specimens. *Handbook of Analytical Separations* (Second Edi, Vol. 6, pp. 203–241). doi: [https://doi.org/10.1016/S1567-7192\(06\)06005-0](https://doi.org/10.1016/S1567-7192(06)06005-0)

Franz, T., Skopp, G., Schwarz, G., & Musshoff, F. (2018). Proof of active cannabis use comparing 11-hydroxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol with 11-nor-9-carboxy-tetrahydrocannabinol concentrations. *Drug Testing and Analysis*, 10(10), 1573–1578. doi: <https://doi.org/10.1002/dta.2415>

Grotenhermen, F. (2003). Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Cannabinoids. *Clinical Pharmacokinetics*, 42(4), 327–360. doi: <https://doi.org/10.2165/00003088-200342040-00003>

Hartmann, C., Smeyers-Verbeke, J., Massart, D. L., & Mcdowall, R. D. (1998). Validation of bioanalytical chromatographic methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 17(2), 193–218. doi: [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(97\)00198-2](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(97)00198-2)

Hehet, P., Franz, T., Kunert, N., & Musshoff, F. (2022). Fast and highly sensitive determination of tetrahydrocannabinol (THC) metabolites in hair using liquid chromatography-multistage mass spectrometry (LC–MS³). *Drug Testing and Analysis*, 1–9. doi: <https://doi.org/10.1002/dta.3330>

Huestis, M. A. (2007). Human Cannabinoid Pharmacokinetics. *Chemistry & Biodiversity*, 4(8), 1770–1804. doi: <https://doi.org/10.1002/cbdv.200790152>

Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses. (2014). Obtido a 23 de fevereiro de 2022, de <https://www.inmlcf.mj.pt/>

International Council for Harmonisation. (1994). VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY. Obtido de [https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29 Guideline.pdf](https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf)

Jagerdeo, E., Schaff, J. E., Montgomery, M. A., & LeBeau, M. A. (2009). A semi-automated solid-phase extraction liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the analysis of tetrahydrocannabinol and metabolites in whole blood. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 23, 2697–2705. doi: 10.1002/rcm.4174

Jamey, C., Szwarc, E., Tracqui, A., & Ludes, B. (2008). Determination of cannabinoids in whole blood by UPLC-MS-MS. *Journal of Analytical Toxicology*, 32(5), 349–354. doi: <https://doi.org/10.1093/jat/32.5.349>

Jamwal, R., Topletz, A. R., Ramratnam, B., & Akhlaghi, F. (2017). Ultra-high performance liquid chromatography tandem mass-spectrometry for simple and simultaneous quantification of cannabinoids. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1048, 10–18. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.02.007>

Karnes, H. T., Shiu, G., & Shah, V. P. (1991). Validation of Bioanalytical Methods. *Pharmaceutical Research*, 8(4), 421–426. doi: <https://doi.org/10.1023/A:1015882607690>

König, S., Aebi, B., Lanz, S., Gasser, M., & Weinmann, W. (2011). On-line SPE LC-MS/MS for the quantification of Δ^9 - tetrahydrocannabinol (THC) and its two major metabolites in human peripheral blood by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 400(1), 9–16. doi: <https://doi.org/10.1007/s00216-011-4708-x>

Kreuz, D. S., & Axelrod, J. (1973). Delta-9-Tetrahydrocannabinol : Localization in Body Fat. *Science*, 179(4071), 391–393. <https://doi.org/10.1126/science.179.4071.391>

Lynch, K. L. (2017). Chapter 6 - Toxicology: liquid chromatography mass spectrometry. *Mass Spectrometry for the Clinical Laboratory* (pp. 109–130). doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800871-3.00006-7>

Ma, D., Ji, Z., Cao, H., Huang, J., Zeng, L., & Yin, L. (2022). LC – MS 3 Strategy for Quantification of Carbamazepine in Human Plasma and Its Application in. *Molecules*, 27(4), 1224. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules27041224>

Mantiniéks, D., Gerostamoulos, D., Glowacki, L., Di Rago, M., Schumann, J., Woodford, N. W., & Drummer, O. H. (2021). Postmortem Drug Redistribution: A Compilation of Postmortem/Antemortem Drug Concentration Ratios. *Journal of analytical toxicology*, 45(4), 368–377. doi: <https://doi.org/10.1093/jat/bkaa107>

Maralikova, B., & Weinmann, W. (2004). Simultaneous determination of Δ^9 - tetrahydrocannabinol, 11-hydroxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol and 11 -nor-9-carboxy- Δ^9 - tetrahydrocannabinol in human plasma by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 39(5), 526–531. doi: <https://doi.org/10.1002/jms.616>

Matraszek-Zuchowska, I., Wozniak, B., & Posyniak, A. (2016). Comparison of the Multiple Reaction Monitoring and Enhanced Product Ion Scan Modes for Confirmation of Stilbenes in Bovine Urine Samples Using LC – MS / MS QTRAP ® System. *Chromatographia*, 79(15), 1003–1012. doi: <https://doi.org/10.1007/s10337-016-3121-1>

Matuszewski, B. K., Constanzer, M. L., & Chavez-Eng, C. M. (2003). Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC - MS / MS. *Analytical Chemistry*, 75(13), 3019–3030. doi: <https://doi.org/10.1021/ac020361s>

Niessen, W. M. A., & Tinke, A. P. (1995). Liquid chromatography-mass spectrometry General principles and instrumentation. *Journal of Chromatography A*, 703(1–2), 37–57. Obtido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/002196739401198N>

OEDT. (2022). *Relatório Europeu sobre Drogas 2022: Tendências e evoluções*. doi: <https://doi.org/doi:10.2810/776597>

Pélissier-Alicot, A. L., Gaulier, J. M., Champsaur, P., & Marquet, P. (2003). Mechanisms Underlying Postmortem Redistribution of Drugs: A Review. *Journal of Analytical Toxicology*, 27(8), 533–544. doi: <https://doi.org/10.1093/jat/27.8.533>

Peters, F. T. (2011). Recent advances of liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry in clinical and forensic toxicology. *Clinical Biochemistry*, 44(1), 54–65. doi: <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2010.08.008>

Peters, F. T., Drummer, O. H., & Musshoff, F. (2007). Validation of new methods. *Forensic Science International*, 165(2), 216–224. doi: <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.05.021>

Peters, F. T., Maurer, H. H., & Musshoff, F. (2011). Forensic toxicology. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 400(1), 7–8. doi: <https://doi.org/10.1007/s00216-011-4711-2>

Polson, C., Sarkar, P., Incledon, B., Raguvaran, V., & Grant, R. (2003). Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 785(2), 263–275. doi: [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(02\)00914-5](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(02)00914-5)

Poole, C. F. (2003). New trends in solid-phase extraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 22(6), 362–373. doi: [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)00605-8](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)00605-8)

Pounder, D. J., & Jones, G. R. (1990). Post-mortem drug redistribution - A toxicological nightmare. *Forensic Science International*, 45(3), 253–263. doi: [https://doi.org/10.1016/0379-0738\(90\)90182-X](https://doi.org/10.1016/0379-0738(90)90182-X)

Powerful scan modes of QTRAP® System Technology. (2019). *SCIEX Technical Note.4*

Robson, P. (2001). Therapeutic aspects of cannabis and cannabinoids. *The British Journal of Psychiatry*, 178, 107–115. doi: <https://doi.org/10.1192/bjp.178.2.107>

Serviço de Química e Toxicologia Forenses- INMLCF. (2012). *Procedimento operacional: Validação de procedimentos de ensaio* (N. PO-SQTF-C-006).

Serviço de Química e Toxicologia Forenses- INMLCF. (2022). *Manual do Sistema de Gestão*.

Shah, V. P., Midha, K. K., Findlay, J. W. A., Hill, H. M., Hulse, J. D., Mcgilveray, I. J., ... Viswanathan, C. T. (2000). Bioanalytical Method Validation — A Revisit with a Decade of Progress. *Pharmaceutical Research*, 17(12), 1551–1557. doi: <https://doi.org/10.1023/A:1007669411738>

Shimadzu Corporation. (2019). *Fundamental Guide to Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LCMS)*. Obtido de https://www.shimadzu.eu.com/sites/shimadzu.seg/files/SEG/C10G-E065A_Shimadzu_Fundamental_Guide_to_LCMS.pdf

Simões, S. S., Ajenjo, A. C., & Dias, M. J. (2011). Qualitative and quantitative analysis of THC, 11-hydroxy-THC and 11-nor-9-carboxy-THC in whole blood by ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 25(18), 2603–2610. doi: <https://doi.org/10.1002/rcm.5165>

Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX). (2013). Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. *Journal of Analytical Toxicology*, 37(7), 452–474. doi: <https://doi.org/10.1093/jat/bkt054>

Sørensen, L. K., & Hasselstrøm, J. B. (2017). Sensitive determination of cannabinoids in whole blood by LC-MS-MS after rapid removal of phospholipids by filtration. *Journal of Analytical Toxicology*, 41(5), 382–391. doi: <https://doi.org/10.1093/jat/bkx030>

Stone, J., Nair, H., & Clarke, W. (2017). Chapter 3 - Sample preparation techniques for mass spectrometry in the clinical laboratory. *Mass Spectrometry for the Clinical Laboratory* (pp. 37–62). doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800871-3.00003-1>

Thieme, D., Sachs, U., Sachs, H., & Moore, C. (2015). Significant enhancement of 11-Hydroxy-THC detection by formation of picolinic acid esters and application of liquid chromatography/multi stage mass spectrometry (LC-MS³): Application to hair and oral fluid analysis. *Drug Testing and Analysis*, 7(7), 577–585. doi: <https://doi.org/10.1002/dta.1739>

Thomas, B. F., & ElSohly, M. A. (2016). Chapter 1 - The Botany of *Cannabis sativa* L. Elsevier (Ed.), *The Analytical Chemistry of Cannabis* (pp. 1–26). doi: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804646-3.00001-1>

Tiscione, N. B., Miller, R., Shan, X., Sprague, J., & Yeatman, D. T. (2016). An efficient, robust method for the determination of cannabinoids in whole blood by LC-MS-MS. *Journal of Analytical Toxicology*, 40(8), 639–648. doi: <https://doi.org/10.1093/jat/bkw063>

TOXSAG. (2012). MS Identification Guidelines in Forensic Toxicology - An Australian Approach. *TIAFT Bulletin*, 42(2), 52–54.

UNODC. (2022). Global Overview : Drug Demand. Em *World Drug Report 2022*. Viena: United Nations publication.

Van Eeckhaut, A., Lanckmans, K., Sarre, S., Smolders, I., & Michotte, Y. (2009). Validation of bioanalytical LC – MS / MS assays : Evaluation of matrix effects. *Journal of Chromatography B*, 877(23), 2198–2207. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.01.003>

Vicente, M. M. (2017). Obtido de https://jb.utad.pt/especie/Cannabis_sativa

Waters. (1999). Mass spectrometry in the HPLC laboratory. Em *Waters Corporation*.

Winstock, A. R. (2012). 29- Psychoactive drug misuse. Em W. Pádraig, J. Stern, & M. Phelan (Eds.), *Core Psychiatry* (3.^a ed., pp. 439–462). doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-3397-1.00029-X>

Yin, L., Ji, Z., Cao, H., Li, Y., & Huang, J. (2021). Comparison of LC–MS³ and LC–MRM strategy for quantification of methotrexate in human plasma and its application in therapeutic drug monitoring. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 205, 114345. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114345>

Apêndice

A- Eficiência de Extração

B- Linearidade

C- Precisão intermédia

D- Repetibilidade

E- Exatidão

A- Eficiência de extração dos canabinóides estudados.

<u>11-OH-THC</u>		C/ ext.			S/ ext.			% RECUPERAÇÃO
Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	Arel	Área (s)	Área (PI)	Arel		
1	99652	21391827	0.0047	77302	14441222	0.0054		
1	91763	21201991	0.0043	90235	21279065	0.0042		
1	97684	22527520	0.0043	87801	20543936	0.0043		
		Média	0.0044		Média	0.0046	96.1 %	
5	305631	22131841	0.0138	236235	13300168	0.0178		
5	270635	15711480	0.0172	253177	14698853	0.0172		
5	256934	14391349	0.0179	267896	15722917	0.0170		
		Média	0.0163		Média	0.0173	94.0 %	
50	2169462	14557069	0.1490	2883395	17606120	0.1638		
50	1605123	10679054	0.1503	1483711	9635127	0.1540		
50	2024236	12753717	0.1587	1185341	7365808	0.1609		
		Média	0.1527		Média	0.1596	95.7 %	
<u>THCCOOH</u>		C/ ext.			S/ ext.			% RECUPERAÇÃO
Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	Arel	Área (s)	Área (PI)	Arel		
1	221967	44167993	0.0050	149108	22358732	0.0067		
1	192064	26377993	0.0073	318145	41425477	0.0077		
1	128855	27258412	0.0047	278329	41144200	0.0068		
		Média	0.0057		Média	0.0070	80.7 %	
5	974805	36989267	0.0264	249210	10017987	0.0249		
5	453905	20062078	0.0226	767434	31161057	0.0246		
5	415147	17264680	0.0240	822568	33233905	0.0248		
		Média	0.0243		Média	0.0248	98.3 %	
50	6658059	31687373	0.2101	7832776	36039856	0.2173		
50	3058075	11871294	0.2576	6582623	30211495	0.2179		
50	4243521	17492632	0.2426	4023517	18264806	0.2203		
		Média	0.2368		Média	0.2185	108.4 %	
<u>THC</u>		C/ ext.			S/ ext.			% RECUPERAÇÃO
Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	Arel	Área (s)	Área (PI)	Arel		
1	128980	45508785	0.0028	158241	35268060	0.0045		
1	166022	43752573	0.0038	83293	31431691	0.0026		
1	134141	41694322	0.0032	112441	32389669	0.0035		
		Média	0.0033		Média	0.0035	92.8 %	
5	418968	28599083	0.0146	425274	25356965	0.0168		
5	387427	23987023	0.0162	448312	26006011	0.0172		
5	356465	21821311	0.0163	114561	6849161	0.0167		
		Média	0.0157		Média	0.0169	92.9 %	
50	1158839	7550631	0.1535	1041914	6506801	0.1601		
50	1316732	9240020	0.1425	1388893	9175224	0.1514		
50	1042756	6275148	0.1662	1858712	11360532	0.1636		
		Média	0.1541		Média	0.1584	97.3 %	

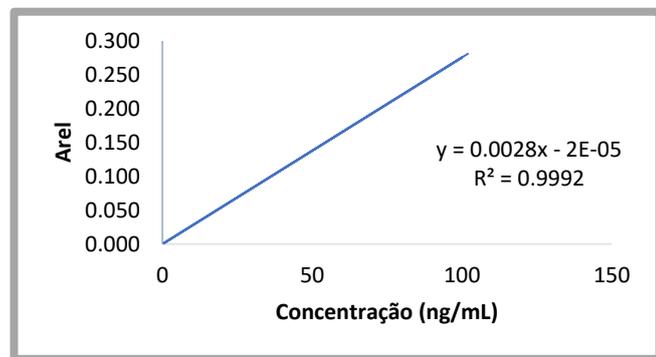
B1. Linearidade do 11-OH-THC.

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	Arel
0.5	32969	11934399	0.003
1	68626	12361456	0.006
2	87168	12475603	0.007
3	148908	16435514	0.009
5	124568	6781007	0.018
10	341763	11622252	0.029
15	356441	9440180	0.038
20	495204	9969584	0.050
30	754774	9662161	0.078
50	1456250	11145696	0.131
80	2192193	10807781	0.203
100	2858724	10610479	0.269

Conc. (ng/mL)	Arel
0.5	0.003
1	0.006
2	0.007
3	0.009
5	0.018
10	0.029
15	0.038
20	0.050
30	0.078
50	0.131
80	0.203
100	0.269

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0.999087237
Quadrado de R	0.998175306
Quadrado de R ajustado	0.997992837
Erro-padrão	0.003898335
Observações	12



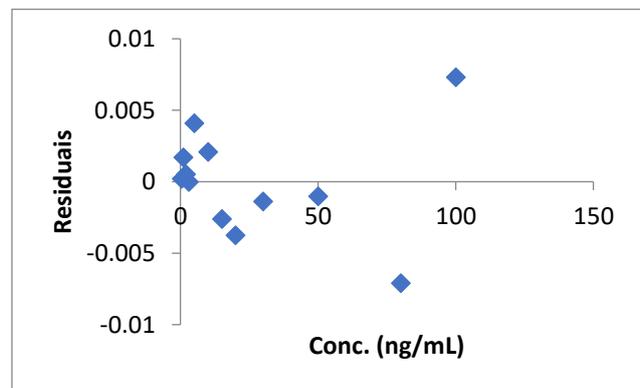
ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>
Regressão	1	0.083133341	0.083133341	5470.372	4.98174E-15
Residual	10	0.00015197	1.5197E-05		
Total	11	0.083285311			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro-padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor P</i>	<i>95% inferior</i>	<i>95% superior</i>
Interceptar	0.001247144	0.001460059	0.854173319	0.413003	-0.002006071	0.004500358
Variável X 1	0.002608634	3.52699E-05	73.96196512	4.98E-15	0.002530047	0.00268722

RESULTADO RESIDUAL

<i>Observação</i>	<i>Y previsto</i>	<i>Residuais</i>
1	0.002551461	0.000211058
2	0.003855777	0.001695802
3	0.006464411	0.000522674
4	0.009073045	-1.29388E-05
5	0.014290312	0.004079836
6	0.027333481	0.002072473
7	0.04037665	-0.002618843
8	0.053419818	-0.003748295
9	0.079506156	-0.001389704
10	0.13167883	-0.001023033
11	0.209937843	-0.007103126
12	0.262110517	0.007314096



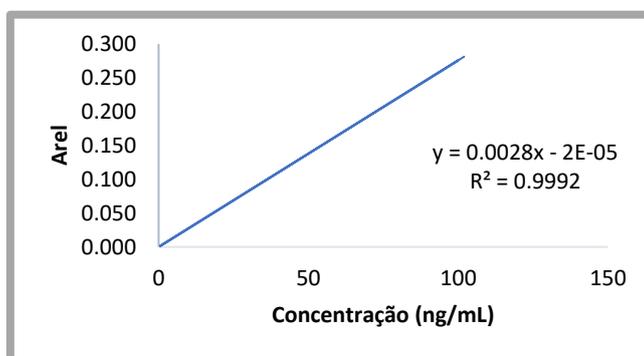
B2. Linearidade do THCCOOH.

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	Arel
0.5	121805	40676535	0.003
1	38413	33388293	0.001
2	174775	38465806	0.005
3	226197	35419812	0.006
5	333181	29281900	0.011
10	1004679	28798598	0.035
15	1794701	32721668	0.055
20	2249747	31161056	0.072
30	3138315	27187179	0.115
50	2794696	15764650	0.177
80	4500008	15805190	0.285
100	4058330	11361321	0.357

Conc. (ng/mL)	Arel
0.5	0.003
1	0.001
2	0.005
3	0.006
5	0.011
10	0.035
15	0.055
20	0.072
30	0.115
50	0.177
80	0.285
100	0.357

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0.999830621
Quadrado de R	0.999661271
Quadrado de R ajustado	0.999623635
Erro-padrão	0.002434175
Observações	11



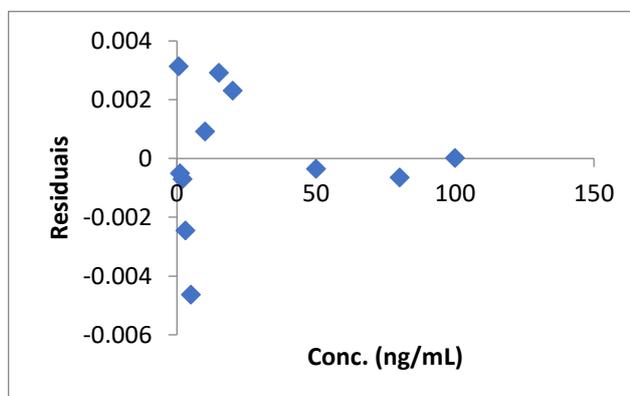
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	0.157379131	0.157379131	26560.95	6.26863E-17
Residual	9	5.33269E-05	5.92521E-06		
Total	10	0.157432457			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	-0.001939049	0.000931697	-2.081201428	0.067134	-0.004046693	0.000168596
Variável X 1	0.003591319	2.2036E-05	162.9752984	6.27E-17	0.00354147	0.003641168

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
1	-0.000143389	0.00313786
2	0.001652271	-0.000501766
3	0.00524359	-0.000699944
4	0.008834909	-0.002448743
5	0.016017548	-0.004639157
6	0.033974144	0.000912225
7	0.05193074	0.002916742
8	0.069887337	0.00231007
9	0.177626915	-0.000350823
10	0.285366493	-0.000649374
11	0.357192879	1.29102E-05



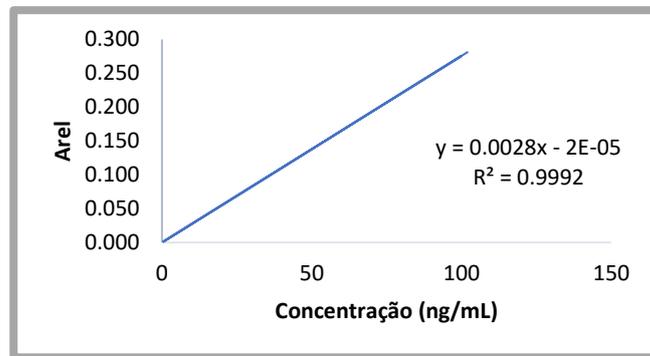
B3. Linearidade do Δ^9 -THC.

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	Arel
0.5	75788	45437149	0.002
1	84053	28641447	0.003
2	181270	32519483	0.006
3	296055	36338423	0.008
5	362139	25887822	0.014
10	1025684	36757587	0.028
15	1308533	31440257	0.042
20	1808871	32592088	0.056
30	2415409	29402445	0.082
50	2555361	18497340	0.138
80	6108787	28580342	0.214
100	7068202	25161881	0.281

Conc. (ng/mL)	Arel
0.5	0.002
1	0.003
2	0.006
3	0.008
5	0.014
10	0.028
15	0.042
20	0.056
30	0.082
50	0.138
80	0.214
100	0.281

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0.999950698
Quadrado de R	0.999901399
Quadrado de R ajustado	0.999890443
Erro-padrão	0.000883285
Observações	11



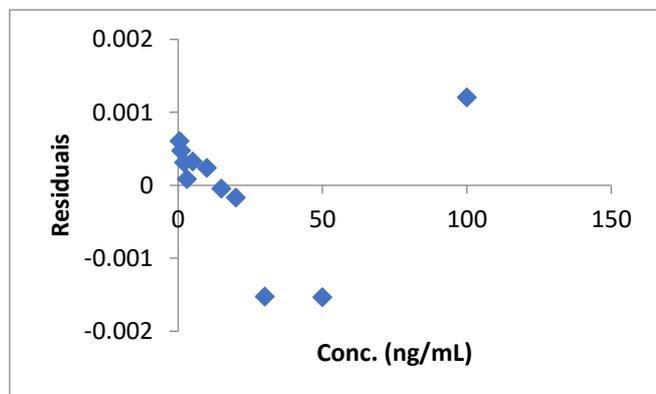
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	0.071206508	0.071206508	91267.94	2.42808E-19
Residual	9	7.02173E-06	7.80192E-07		
Total	10	0.07121353			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	-0.000342252	0.000332637	-1.028907372	0.33038	-0.001094729	0.000410224
Variável X 1	0.002800457	9.26979E-06	302.1058449	2.43E-19	0.002779487	0.002821427

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
1	0.001057976	0.000609996
2	0.002458204	0.000476448
3	0.005258661	0.000315545
4	0.008059118	8.80324E-05
5	0.013660032	0.000328731
6	0.027662316	0.000241687
7	0.0416646	-4.49333E-05
8	0.055666884	-0.000166586
9	0.083671452	-0.001521512
10	0.139680588	-0.001533096
11	0.279703428	0.001205687



C1- Avaliação dos resultados obtidos para a precisão intermédia do 11-OH-THC.

Data	1º DIA (14/03/22)	2º DIA (15/03/22)	3º DIA (16/03/22)	4º DIA (17/03/22)	5º DIA (18/03/22)
R ²	0.9996	0.9995	0.9987	0.9995	0.9978
Declive	0.0026	0.0025	0.0029	0.0026	0.0028
Y0	0.0017	-0.0014	-0.0022	-0.0006	-0.0023
Gama Baixa 1 ng					
Replicado 1	0.9	0.9	1.2	0.8	1.2
Replicado 2	0.9	0.7	1.1	0.9	1.1
Replicado 3	1.0	0.8	1.1	1.0	1.1
Média	0.9	0.8	1.1	0.9	1.1
Recuperação	91.8	83.6	112.4	89.8	112.9
Concenc. Média	1.0				
Recuperação Média	98.1				
Repetibilidade (S _r)	0.1				
Between Run (S _{run})	0.1				
Precisão intermédia	0.2				
C.V (%)	13.9				
Gama Média/Baixa 5 ng					
Replicado 1	4.7	4.9	4.2	4.9	5.1
Replicado 2	4.0	5.1	4.5	4.2	5.0
Replicado 3	3.4	4.7	4.2	4.7	4.9
Média	4.0	4.9	4.3	4.6	5.0
Recuperação	80.2	97.8	85.8	92.5	100.1
Concenc. Média	4.6				
Recuperação Média	91.3				
Repetibilidade (S _r)	0.4				
Between Run (S _{run})	0.4				
Precisão intermédia	0.5				
C.V (%)	9.1				
Gama Alta 50 ng					
Replicado 1	45.2	41.1	40.8	41.0	51.9
Replicado 2	48.3	42.7	41.7	41.1	51.9
Replicado 3	44.7	45.5	36.1	40.0	51.2
Média	46.1	43.1	39.5	40.7	51.7
Recuperação	92.2	86.2	79.1	81.4	103.4
Concenc. Média	44.2				
Recuperação Média	88.4				
Repetibilidade (S _r)	1.9				
Between Run (S _{run})	4.7				
Precisão intermédia	5.1				
C.V (%)	11.0				
C.Vpool	16.1				

C2- Avaliação dos resultados obtidos para a precisão intermédia do THCCOOH. Δ^9 -THC.

Data	1º DIA (14/03/22)	2º DIA (15/03/22)	3º DIA (16/03/22)	4º DIA (17/03/22)	5º DIA (18/03/22)
R ²	0.999	0.9982	0.9986	0.9999	0.9978
Declive	0.0037	0.0034	0.0037	0.0034	0.0035
Y0	-0.0049	-0.0056	-0.0049	-0.0013	-0.0038
Gama Baixa 1 ng					
Replicado 1	1.5	1.7	1.6	1.1	1.3
Replicado 2	1.4	1.8	1.8	1.1	1.4
Replicado 3	1.4	1.7	1.6	1.2	1.7
Média	1.5	1.7	1.7	1.1	1.5
Recuperação	145.5	172.7	167.2	114.1	145.8
Concenc. Média	1.5				
Recuperação Média	149.1				
Repetibilidade (S _r)	0.1				
Between Run (S _{run})	0.3				
Precisão intermédia	0.3				
C.V (%)	18.8				
Gama Média/Baixa 5 ng					
Replicado 1	5.1	4.8	3.8	3.8	3.6
Replicado 2	5.2	4.7	3.7	3.9	4.6
Replicado 3	5.1	4.8	3.9	3.4	5.1
Média	5.1	4.8	3.8	3.7	4.4
Recuperação	102.7	95.8	76.4	74.0	88.9
Concenc. Média	4.4				
Recuperação Média	87.5				
Repetibilidade (S _r)	0.4				
Between Run (S _{run})	0.6				
Precisão intermédia	0.7				
C.V (%)	14.1				
Gama Alta 50 ng					
Replicado 1	43.0	39.8	46.7	47.4	46.5
Replicado 2	38.8	35.6	43.7	46.0	47.5
Replicado 3	39.6	46.0	41.1	47.7	49.8
Média	40.5	40.5	43.8	47.0	47.9
Recuperação	81.0	80.9	87.6	94.1	95.9
Concenc. Média	44.0				
Recuperação Média	87.9				
Repetibilidade (S _r)	3.0				
Between Run (S _{run})	3.1				
Precisão intermédia	4.3				
C.V (%)	8.0				
C.Vpool	19.5				

C3- Avaliação dos resultados obtidos para a precisão intermédia do Δ^9 -THC.

Data	1º DIA (14/03/22)	2º DIA (15/03/22)	3º DIA (16/03/22)	4º DIA (17/03/22)	5º DIA (18/03/22)
R ²	0.9999	0.9993	0.9992	0.9997	0.9999
Declive	0.0026	0.0027	0.0029	0.0027	0.0029
Y0	0.000006	-0.0006	-0.0014	-0.0001	0.0001
Gama Baixa 1 ng					
Replicado 1	1.1	1.2	1.3	1.0	1.0
Replicado 2	1.0	1.1	1.3	1.1	1.0
Replicado 3	1.1	1.2	1.4	1.2	1.1
Média	1.1	1.2	1.3	1.1	1.0
Recuperação	106.4	116.5	131.1	106.3	102.6
Concenc. Média	1.1				
Recuperação Média	112.6				
Repetibilidade (S _r)	0.1				
Between Run (S _{run})	0.1				
Precisão intermédia	0.1				
C.V (%)	10.3				
Gama Média/Baixa 5 ng					
Replicado 1	4.3	4.8	4.8	4.9	4.2
Replicado 2	4.6	4.6	5.0	5.4	4.4
Replicado 3	4.5	5.4	4.7	5.0	4.2
Média	4.5	4.9	4.8	5.1	4.3
Recuperação	89.7	98.4	97.0	102.0	85.3
Concenc. Média	4.7				
Recuperação Média	94.5				
Repetibilidade (S _r)	0.2				
Between Run (S _{run})	0.3				
Precisão intermédia	0.4				
C.V (%)	7.1				
Gama Alta 50 ng					
Replicado 1	46.8	46.0	51.5	47.1	50.1
Replicado 2	46.6	47.6	51.3	44.6	47.1
Replicado 3	45.0	49.4	50.2	44.1	50.4
Média	46.1	47.7	51.0	45.3	49.2
Recuperação	92.3	95.3	102.0	90.6	98.4
Concenc. Média	47.9				
Recuperação Média	95.7				
Repetibilidade (S _r)	1.4				
Between Run (S _{run})	2.2				
Precisão intermédia	2.6				
C.V (%)	4.9				
C.Vpool	11.5				

D1- Avaliação dos resultados obtidos na repetibilidade do 11-OH-THC.

11-OH-THC						
	Repetib_TRR			Repetib_Áreas		
	TR (min)	TR pi (min)	TRR	Área	Área pi	A/Api
1 ng/mL	7.29	7.28	1.001	6845	2848520	0.002
	7.32	7.32	1.000	9081	3364039	0.003
	7.3	7.28	1.003	9684	3522048	0.003
	7.28	7.28	1.000	9479	3755545	0.003
	7.31	7.29	1.003	7903	3331150	0.002
		Média	1.001		Média	0.003
		Desv. pad. (s)	0.001		Desv. pad. (s)	0.000
	CV (%)	0.1		CV (%)	6.7	
5 ng/mL	7.29	7.28	1.001	39810	3966309	0.010
	7.28	7.27	1.001	24446	2716228	0.009
	7.3	7.29	1.001	24937	3041958	0.008
	7.29	7.28	1.001	32052	3455718	0.009
	7.3	7.29	1.001	22993	3039613	0.008
		Média	1.001		Média	0.009
		Desv. pad. (s)	0.000		Desv. pad. (s)	0.001
	CV (%)	0.0		CV (%)	10.9	
50 ng/mL	7.28	7.28	1.000	719970	6203951	0.116
	7.29	7.28	1.001	338099	2845462	0.119
	7.28	7.27	1.001	303193	2955846	0.103
	7.28	7.28	1.000	384561	3327980	0.116
	7.31	7.3	1.001	321191	2867133	0.112
		Média	1.001		Média	0.113
		Desv. pad. (s)	0.001		Desv. pad. (s)	0.006
	CV (%)	0.1		CV (%)	5.6	

D2- Avaliação dos resultados obtidos na repetibilidade do THCCOOH. Δ^9 -THC.

THCCOOH							
	TR (min)	Repetib_TRR		Repetib_Áreas			
		TR pi (min)	TRR	Área	Área pi	A/Api	
1 ng/mL	7.43	7.39	1.005	9939	3606588	0.003	
	7.44	7.43	1.001	21693	6512336	0.003	
	7.41	7.39	1.003	18920	7439956	0.003	
	7.4	7.39	1.001	15849	6078205	0.003	
	7.4	7.4	1.000	12074	4403869	0.003	
			Média	1.002		Média	0.003
			Desv. pad. (s)	0.002		Desv. pad. (s)	0.000
		CV (%)	0.2		CV (%)	11.2	
5 ng/mL	7.39	7.39	1.000	99268	5999067	0.017	
	7.38	7.38	1.000	115256	7322317	0.016	
	7.41	7.4	1.001	59528	3652459	0.016	
	7.4	7.39	1.001	58781	3843154	0.015	
	7.4	7.4	1.000	75275	4744556	0.016	
			Média	1.001		Média	0.016
			Desv. pad. (s)	0.001		Desv. pad. (s)	0.000
		CV (%)	0.1		CV (%)	3.1	
50 ng/mL	7.39	7.39	1.000	1023674	6098180	0.168	
	7.4	7.39	1.001	826523	5276335	0.157	
	7.39	7.39	1.000	472463	3212286	0.147	
	7.4	7.39	1.001	482642	3434344	0.141	
	7.42	7.41	1.001	514654	3468660	0.148	
			Média	1.001		Média	0.152
			Desv. pad. (s)	0.001		Desv. pad. (s)	0.011
		CV (%)	0.1		CV (%)	6.9	

D3- Avaliação dos resultados obtidos na repetibilidade do Δ^9 -THC.

THC						
	TR (min)	Repetib_TRR		Repetib_Áreas		
		TR pi (min)	TRR	Área	Área pi	A/Api
1 ng/mL	8.31	8.3	1.001	18023	7516151	0.002
	8.3	8.28	1.002	14800	6472961	0.002
	8.27	8.26	1.001	17802	7048797	0.003
	8.26	8.24	1.002	21558	6606823	0.003
	8.33	8.32	1.001	17857	6725265	0.003
		Média	1.002		Média	0.003
		Desv. pad. (s)	0.001		Desv. pad. (s)	0.000
		CV (%)	0.1		CV (%)	14.6
5 ng/mL	8.26	8.24	1.002	77835	6199050	0.013
	8.24	8.23	1.001	94773	7217660	0.013
	8.29	8.27	1.002	66246	5387894	0.012
	8.26	8.25	1.001	69660	5453701	0.013
	8.3	8.29	1.001	101747	8459202	0.012
		Média	1.002		Média	0.013
		Desv. pad. (s)	0.001		Desv. pad. (s)	0.000
		CV (%)	0.1		CV (%)	3.4
50 ng/mL	8.25	8.24	1.001	764953	6246626	0.122
	8.26	8.24	1.002	784818	6212215	0.126
	8.25	8.24	1.001	772902	6256850	0.124
	8.27	8.26	1.001	855079	6963897	0.123
	8.31	8.3	1.001	663058	5325717	0.125
		Média	1.001		Média	0.124
		Desv. pad. (s)	0.001		Desv. pad. (s)	0.002
		CV (%)	0.1		CV (%)	1.3

E1- Avaliação dos resultados obtidos para a exatidão do 11-OH-THC.

Data	1º DIA (14/03/22)	2º DIA (15/03/22)	3º DIA (16/03/22)	4º DIA (17/03/22)	5º DIA (18/03/22)
Equação	$y = 0.0026x + 0.0017$	$y = 0.0025x - 0.0014$	$y = 0.0029x - 0.0022$	$y = 0.0026x - 0.0006$	$y = 0.0028x - 0.0023$
Gama Baixa 1 ng					
Média	0.9	0.8	1.1	0.9	1.1
Recuperação	91.8	83.6	112.4	89.8	112.9
Recuper. Média	98.1				
Desvio padrão	13.64				
C.V (%)	13.9				
N	5				
Texp	0.31				
Tcrit	2.78				
Incerteza de R%	6.1				
Incerteza padrão rel.	0.062				
Gama Média 5 ng					
Média	4.0	4.9	4.3	4.6	5.0
Recuperação	80.2	97.8	85.8	92.5	100.1
Recuper. Média	91.3				
Desvio padrão	8.31				
C.V (%)	9.1				
N	5				
Texp	2.34				
Tcrit	2.78				
Incerteza de R%	3.7				
Incerteza padrão rel.	0.041				
Gama Alta 50 ng					
Média	46.1	43.1	39.5	40.7	51.7
Recuperação	92.2	86.2	79.1	81.4	103.4
Recuper. Média	88.4				
Desvio padrão	9.74				
C.V (%)	11.0				
N	5				
Texp	2.66				
Tcrit	2.78				
Incerteza de R%	4.4				
Incerteza padrão rel.	0.049				

E2- Avaliação dos resultados obtidos para a exatidão do THCCOOH.

Data	1º DIA (14/03/22)	2º DIA (15/03/22)	3º DIA (16/03/22)	4º DIA (17/03/22)	5º DIA (18/03/22)
Equação	$y = 0.0079x - 0.0086$	$y = 0.0067x - 0.0052$	$y = 0.0073x - 0.0108$	$y = 0.0071x - 0.0083$	$y = 0.0067x - 0.0079$
Gama Baixa 1 ng					
Média	1.2	1.7	1.7	1.1	1.5
Recuperação	118.3	172.7	167.2	114.1	145.8
Recuper. Média	143.6				
Desvio padrão	27.00				
C.V (%)	18.8				
N	5				
Texp	3.61				
Tcrit	2.78				
Incerteza de R%	12.1				
Incerteza padrão rel.	0.084				
Gama Média 5 ng					
Média	5.1	4.8	3.8	3.7	4.4
Recuperação	102.7	95.8	76.4	74.0	88.9
Recuper. Média	87.5				
Desvio padrão	12.33				
C.V (%)	14.1				
N	5				
Texp	2.26				
Tcrit	2.78				
Incerteza de R%	5.5				
Incerteza padrão rel.	0.063				
Gama Alta 50 ng					
Média	49.4	40.5	43.8	47.0	47.9
Recuperação	98.9	80.9	87.6	94.1	95.9
Recuper. Média	91.5				
Desvio padrão	7.19				
C.V (%)	7.9				
N	5				
Texp	2.65				
Tcrit	2.78				
Incerteza de R%	3.2				
Incerteza padrão rel.	0.035				

E3- Avaliação dos resultados obtidos para a exatidão do Δ^9 -THC.

Data	1º DIA (14/03/22)	2º DIA (15/03/22)	3º DIA (16/03/22)	4º DIA (17/03/22)	5º DIA (18/03/22)
Equação	$y = 0.0079x - 0.0086$	$y = 0.0067x - 0.0052$	$y = 0.0073x - 0.0108$	$y = 0.0071x - 0.0083$	$y = 0.0067x - 0.0079$
Gama Baixa 1 ng					
Média	1.1	1.2	1.3	1.1	1.0
Recuperação	106.4	116.5	131.1	106.3	102.6
Recuper. Média	112.6				
Desvio padrão	11.57				
C.V (%)	10.3				
N	5				
Texp	2.44				
Tcrit	2.78				
Incerteza de R%	5.2				
Incerteza padrão rel.	0.046				
Gama Média 5 ng					
Média	4.5	4.9	4.8	5.1	4.3
Recuperação	89.7	98.4	97.0	102.0	85.3
Recuper. Média	94.5				
Desvio padrão	6.80				
C.V (%)	7.2				
N	5				
Texp	1.82				
Tcrit	2.78				
Incerteza de R%	3.0				
Incerteza padrão rel.	0.032				
Gama Alta 50 ng					
Média	46.1	47.7	51.0	45.3	49.3
Recuperação	92.3	95.3	102.0	90.6	98.6
Recuper. Média	95.8				
Desvio padrão	4.66				
C.V (%)	4.9				
N	5				
Texp	2.04				
Tcrit	2.78				
Incerteza de R%	2.1				
Incerteza padrão rel.	0.022				