

HELENA MARIA DE SOUSA FERREIRA E TEIXEIRA

**DETERMINAÇÃO DE CANABINÓIDES EM AMOSTRAS
BIOLÓGICAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA
RESOLUÇÃO COM ESPECTROMETRIA DE MASSA
– Aplicação em Toxicologia Forense –**

UNIVERSIDADE DE COIMBRA

FACULDADE DE MEDICINA

2008

Dissertação de Candidatura ao
Grau de Doutor em Ciências Biomédicas
apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

TABELA DE CONTEÚDOS

PREFÁCIO	I
DIVULGAÇÃO DOS RESULTADOS: PUBLICAÇÕES E PRÊMIOS CIENTÍFICOS	V
TABELA DE CONTEÚDOS	1
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	9
RESUMO – ABSTRACT	13
Parte I – REVISÃO DA LITERATURA	23
Capítulo I – <i>Canabinóides</i>	25
1 – ANTECEDENTES HISTÓRICOS	27
2 – CONSUMO DE <i>CANNABIS</i>	36
2.1 – Prevalência e Padrões de Consumo Actuais	36
2.2 – Legislação	39
3 – BOTÂNICA: <i>Cannabis sativa L.</i>	43
4 – FORMAS DE CONSUMO	46
5 – ESTRUTURA QUÍMICA E PROPRIEDADES	51
5.1 – Tipos de compostos presentes nas diferentes variedades da planta	51
5.2 – Propriedades dos Canabinóides	55
6 – PROPRIEDADES FARMACODINÂMICAS	58
6.1 – MECANISMO DE ACÇÃO	58
6.1.1 – Receptores dos canabinóides	58
6.1.2 – Canabinóides endógenos	63
6.2 – EFEITOS FARMACODINÂMICOS	67
6.2.1 – Potencialidades terapêuticas de antagonistas dos receptores dos canabinóides	77
 <i>Determinação de Canabinóides em amostras biológicas por LC-MS – Aplicação em Toxicologia Forense</i>	1

7 – TOXICOCINÉTICA	79
7.1 – Absorção	79
7.2 – Distribuição	82
7.3 – Metabolismo	84
7.4 – Eliminação	88

Capítulo II – *Canabinóides e Condução Rodoviária.* 91
Estado de Influenciado.

1 – DROGAS E CONDUÇÃO RODOVIÁRIA: A PREVALÊNCIA DOS CANABINÓIDES	93
2 – ESTADO DE INFLUENCIADO	96
2.1 – A prática da condução	96
2.2 – A influência dos canabinóides na condução	98
3 – PROJECTOS DE INVESTIGAÇÃO NA EUROPA	102

Capítulo III – *Determinação de Canabinóides em Amostras Biológicas:* 107
Saliva, Sangue e Urina.

1 – INTRODUÇÃO	109
2 – AMOSTRAS BIOLÓGICAS	111
2.1 – Saliva	111
2.2 – Sangue	116
2.3 – Urina	120
3 – DETERMINAÇÃO ANALÍTICA DE CANABINÓIDES	123
3.1 – TRIAGEM/ANÁLISE PRELIMINAR	123
3.1.1 – Análise em Saliva	124
3.1.2 – Análise em Sangue	126
3.1.3 – Análise em Urina	127

3.2 – CONFIRMAÇÃO	129
3.2.1 – Introdução	129
3.2.2 – Cromatografia Líquida de Alta Resolução/Espectrometria de Massa ...	132
3.2.2.1 – Cromatografia Líquida de Alta Resolução	132
3.2.2.2 – Espectrometria de Massa	134
<i>Ionização</i>	135
<i>Interfaces de ionização química à pressão atmosférica (APCI)</i>	137
<i>Interfaces de tipo Electrospray (ES)</i>	138
3.3 – MÉTODOS DE PREPARAÇÃO E/OU EXTRACÇÃO DAS AMOSTRAS	141
3.3.1 – Extracção Líquido-Líquido	143
3.3.2 – Extracção Sólido-Líquido	143
Parte II – DEFINIÇÃO E JUSTIFICAÇÃO DOS OBJECTIVOS	151
1 – FUNDAMENTOS GERAIS PARA A DEFINIÇÃO DOS OBJECTIVOS	153
2 – OBJECTIVOS GERAIS E OBJECTIVOS ESPECÍFICOS	157
Parte III – CONTRIBUIÇÃO PESSOAL – TRABALHO EXPERIMENTAL	163
Capítulo I – <i>Caracterização do Método Analítico para Determinação de Canabinóides em Amostras Biológicas</i>	165
1 – INTRODUÇÃO	167
2 – DEFINIÇÃO DOS PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO	168
3 – METODOLOGIA DE VALIDAÇÃO APLICADA NO ESTUDO	174
I – ESPECIFICIDADE/SELECTIVIDADE	174
II – SUPRESSÃO IÓNICA	175
III – LIMITES DE DETECÇÃO E DE QUANTIFICAÇÃO	175
IV – LINEARIDADE/RECTA DE CALIBRAÇÃO	176
V – PRECISÃO E EXACTIDÃO	176
<i>Determinação de Canabinóides em amostras biológicas por LC-MS – Aplicação em Toxicologia Forense</i>	3

VI – RECUPERAÇÃO	177
VII – ESTABILIDADE	177
<i>Estabilidade das soluções-padrão</i>	177
<i>Estabilidade dos analitos em amostras processadas</i>	177
<i>Estabilidade dos analitos após curtos períodos à temperatura de trabalho no laboratório</i>	178
<i>Estabilidade dos analitos após ciclos de congelação-descongelação</i>	178

Capítulo II – *Desenvolvimento de um Método Analítico para a Detecção e Quantificação de Canabinóides em Saliva* 179

1 – INTRODUÇÃO	181
2 – MATERIAL E MÉTODOS	183
2.1 – Substâncias estudadas	183
2.2 – Reagentes/Gases	184
2.3 – Material utilizado	184
2.4 – Sistema de LC-MS	185
3 – ENSAIOS EFECTUADOS	188
3.1 – Caracterização da metodologia analítica usada para a detecção, identificação e quantificação das substâncias em estudo	188
3.2 – Aplicação das condições analíticas finais aos padrões em fase móvel	193
3.3 – Estudo em saliva	196
3.3.1 – Selecção e preparação da amostra biológica	196
3.3.2 – Extração de canabinóides a partir da saliva por fase sólida	197
3.3.3 – Validação do Método Analítico – Resultados Obtidos	199
I – ESPECIFICIDADE/SELECTIVIDADE	199
II – SUPRESSÃO IÓNICA	201
III – LIMITES DE DETECÇÃO E DE QUANTIFICAÇÃO	201
IV – LINEARIDADE/RECTA DE CALIBRAÇÃO	201

V – PRECISÃO E EXACTIDÃO	202
VI – RECUPERAÇÃO	203
VII – ESTABILIDADE	204
4 – COMENTÁRIOS FINAIS E CONCLUSÕES	205

**Capítulo III – *Aplicação do Método Analítico Validado em Saliva
a Amostras de Casos Reais*** 209

1 – INTRODUÇÃO	211
2 – MATERIAL E MÉTODOS	212
2.1 – Enquadramento do consumo	212
2.2 – Caracterização dos indivíduos voluntários envolvidos no estudo	212
2.3 – Colheita das amostras	215
2.4 – Preparação das amostras para determinação dos canabinóides	215
3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	217
4 – COMENTÁRIOS FINAIS E CONCLUSÕES	223

**Capítulo IV – *Desenvolvimento de um Método Analítico para Detecção,
Identificação e Quantificação simultânea de Δ^9 -THC,
 Δ^9 -THC-OH e Δ^9 -THC-COOH em Saliva, Sangue e Urina*** 225

1 – INTRODUÇÃO	227
2 – MATERIAL E MÉTODOS	230
2.1 – Substâncias estudadas	230
2.2 – Reagentes/Gases	230
2.3 – Material utilizado	231
2.4 – Sistema de LC-MS	231
3 – ENSAIOS EFECTUADOS	232
3.1 – Caracterização da metodologia analítica usada para a detecção, identificação e quantificação das substâncias em estudo	232
3.2 – Aplicação das condições analíticas finais aos padrões em fase móvel	242

3.3 – Estudo em Saliva	246
3.3.1 – Selecção e Preparação da amostra biológica	246
3.3.2 – Extracção de canabinóides a partir da saliva por fase sólida	246
3.3.3 – Validação do Método Analítico – Resultados Obtidos	247
3.4 – Estudo em Urina	255
3.4.1 – Selecção e Preparação da amostra biológica	255
3.4.2 – Extracção de canabinóides a partir da urina por fase sólida	256
3.4.3 – Validação do Método Analítico – Resultados Obtidos	256
3.5 – Estudo em Sangue	268
3.5.1 – Selecção e Preparação da amostra biológica	268
3.5.2 – Extracção de canabinóides a partir do sangue por fase sólida	269
3.5.3 – Validação do Método Analítico – Resultados Obtidos	271
4 – DISCUSSÃO DOS RESULTADOS E CONCLUSÕES	283

Capítulo V – *Aplicação do Método Analítico Validado a Amostras de Casos Reais* 297

1 – INTRODUÇÃO	299
2 – MATERIAL E MÉTODOS	302
2.1 – Caracterização dos indivíduos voluntários envolvidos no estudo	302
2.2 – Enquadramento do Consumo	304
2.3 – Colheita das Amostras	304
2.4 – Determinação dos Canabinóides por LC-MS	305
2.5 – Determinação dos tempos de semi-vida de Δ^9 -THC e Δ^9 -THC-COOH	305
2.6 – Análise Estatística	305
3 – RESULTADOS	306
3.1 – Concentrações de Canabinóides em Saliva	309
3.2 – Concentrações de Canabinóides em Sangue	312
3.3 – Concentrações de Canabinóides em Urina	320
4 – DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	322
4.1 – Concentrações de Canabinóides em Saliva	322

4.2 – Concentrações de Canabinóides em Sangue	325
4.3 – Concentrações de Canabinóides em Urina	331
4.4 – Concentrações de Canabinóides em Saliva <i>versus</i> Sangue	332
4.5 – Concentrações de Canabinóides em Saliva <i>versus</i> Urina	339
4.6 – Concentrações de Canabinóides em Sangue <i>versus</i> Urina	340
5 – COMENTÁRIOS FINAIS E CONCLUSÕES	343

Capítulo VI – CONCLUSÕES 351

Parte IV – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 359