

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Monitoramento do uso de canábis por condutores de veículo automotor:
desenvolvimento de método bioanalítico compatível com a rotina laboratorial
da perícia no Brasil

EMMANUELE VIANNA BAGGIO

Porto Alegre, 2017

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Monitoramento do uso de canábis por condutores de veículo automotor:
desenvolvimento de método bioanalítico compatível com a rotina laboratorial da
perícia no Brasil

Dissertação apresentada por
Emmanuele Vianna Baggio para
obtenção do grau de mestre em
Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Renata Pereira Limberger

Porto Alegre, 2017

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 16.08.2017, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Andreas S. L. Mendez
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dra. Juliana Nichterwitz Scherer
Centro de Pesquisas em Álcool e Drogas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Dra. Kristiane Mariotti
Departamento de Polícia Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Baggio, Emmanuele Vianna
Monitoramento do uso de canábis por condutores de veículo automotor: desenvolvimento de método bioanalítico compatível com a rotina laboratorial da perícia no Brasil / Emmanuele Vianna Baggio. -- 2017. 88 f.
Orientador: Renata Pereira Limberger.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. THC. 2. Canábis. 3. Fluido oral. 4. Sangue total. 5. Trânsito. I. Limberger, Renata Pereira, orient. II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido sob a orientação da Profa. Dra. Renata Pereira Limberger, no Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, o qual disponibilizou os equipamentos e os materiais necessários para a realização dos experimentos práticos.

AGRADECIMENTOS

Meu muito obrigada a todos que me incentivaram a iniciar e, principalmente, a concluir esta etapa.

Aos colegas do LABTOXICO, do LAPPS e do IGP que me ajudaram durante a realização deste trabalho.

À professora Renata, pela orientação.

E a ele, meu amado filho, Leonardo, tão pequeno e tão motivador.

RESUMO

A *Cannabis sativa* L. é a droga de abuso de uso proscrito mais consumida no mundo. O consumo desta droga por condutores de veículo automotor está associado com o aumento do risco de acidentes de trânsito, com o aumento da gravidade e com o aumento das taxas de mortalidade. O objetivo deste trabalho foi propor métodos analíticos aplicáveis à rotina laboratorial forense para monitoramento do consumo de canábis por condutores. Para tanto, foi utilizada como metodologia a extração líquido-líquido seguida de análise por cromatografia em fase gasosa acoplada a detector de massas para pesquisa de canabinoides em matrizes biológicas como sangue total (ST) e fluido oral (FO). A análise de 11-nor-9-carbóxi-delta9-THC (THC-COOH) em amostras de ST por cromatografia gasosa envolve a derivatização desta molécula e, conseqüentemente, do THC extraído desta matriz (quando presente), uma vez que ambos estão presentes no mesmo extrato, constituindo mais uma etapa analítica e que requer maior controle das condições de reação. Por outro lado, a detecção de THC em FO pode ser realizada sem a realização desta etapa, o que constitui uma vantagem analítica. A determinação de THC-COOH e THC em ST não demonstrou repetibilidade, o que inviabilizou as análises qualitativas e quantitativas nesta matriz. A detecção de THC em FO se mostrou uma análise simples e passível de validação, porém com limite de detecção (200ng/mL) acima do recomendado pelas guias forenses internacionais (2 ng/mL). A metodologia analítica desenvolvida se mostrou compatível com aplicação na análise confirmatória em casos de intoxicação aguda pelo consumo de canábis, demonstrando a necessidade de utilização de técnicas de concentração de amostras como extração em fase sólida ou microextração em fase sólida, para obtenção de menores limites de detecção, podendo assim ser aplicado na rotina laboratorial para o monitoramento do uso frequente de canábis, e não apenas em casos de intoxicação aguda. Além disso, foi realizada uma abordagem sobre a interpretação da detecção de THC em diferentes matrizes biológicas.

Palavras-chave: THC; Carbóxi-THC; CG/EM; Sangue total; Fluido oral; Trânsito.

ABSTRACT

Title: Monitoring the use of cannabis by motor vehicle drivers: development of a bioanalytical method compatible with the laboratorial routine of the Brazilian forensic expertise

Cannabis sativa L. is the illegal drug of abuse most consumed in the world. The consumption of this drug by motor vehicle drivers is associated with an increased risk of traffic accidents, increased severity and increased mortality rates. The objective of this work was to propose analytical methods applicable to forensic laboratories to verify the consumption of cannabis by drivers. Liquid-liquid extraction followed by gas chromatography (GC) coupled to mass spectrometry (MS) detector has been applied to cannabinoid analysis in biological samples such as whole blood (WB) and oral fluid (OF). The analysis of 11-nor-9-carboxy-delta9-THC (THC-COOH) in WB by GC required the derivatization of this molecule and also involved the derivatization of THC since both were extracted from the same sample. The derivatization constitutes another analytical step, which requires greater control of the reaction conditions. Fortunately, the detection of only THC in OF can be done without performing this step. The determination of THC-COOH and THC in WB did not demonstrate repeatability, which impaired the qualitative and quantitative analyzes in this matrix. The detection of THC in OF proved to be a simple analysis, that could be validated, but the limit of detection (200ng/mL) was higher than the recommended by the international forensic guides (2 ng/mL). The chromatographic method developed was compatible with the application of a confirmatory analysis in acute cannabis intoxication, demonstrating the need to use techniques of samples concentration such as SPE or SPME, in order to obtain lower limits of detection, thus being able to be applied in the laboratory routine for the monitoring of the frequent use of cannabis, and not only in cases of acute intoxication. In addition, it was made an approach of THC detection in different biological matrices.

Key-words: THC; Carboxy-THC; GC/MS; Whole blood; Oral fluid; Traffic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química dos canabinoides de interesse forense.	288
Figura 2. Esquema básico da biossíntese vegetal dos principais canabinoides C ₂₁ presentes na <i>Cannabis sativa</i> L.	299
Figura 3. Distribuição de delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) em diferentes tecidos do corpo humano em função do tempo decorrido.	32
Figura 4. Biotransformação do THC.	32
Figura 5. Média das concentrações plasmáticas de THC, 11-hidróxi-tetrahydrocannabinol (THC-OH) e 11-nor-9-carbóxi-tetrahydrocannabinol (THC-COOH) durante e após uso oral de um cigarro de canábis contendo 34 mg de THC por 6 indivíduos.	34
Figura 6. Abundância relativa dos canabinóides em matrizes biológicas.	35
Figura 7. Fluxograma analítico recomendado para análises forenses.	44
Figura 8. Mecanismo de reação da derivatização com BSTFA + 1% TMCS (<i>N,O</i> -Bis(trimetilsilil)trifluoracetamida com 1% trimetilclorosilano.	49
Figura 9. Estruturas do THC e THC-COOH e de seus derivados trimetilsilil (TMS)..	59
Figura 10. Curva de calibração realizada com padrão de THC derivatizado (THC-TMS)	60
Figura 11. Curva de calibração realizada com padrão de THC-COOH derivatizado (THC-COOH - 2TMS).	60
Figura 12. Cromatograma, espectro de massas e proposta de fragmentação do THC TMS.	66
Figura 13. Cromatograma, espectro de massas e proposta de fragmentação do THC-COOH - 2TMS.	67
Figura 14. Cromatograma e espectro de massas do padrão de <i>d</i> ₃ -THC-COOH-2TMS.	68
Figura 15. Cromatograma de íons totais (1) Fenantreno e (2) THC por Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas.	69
Figura 16. Estrutura e espectro de massas no modo <i>selected ion monitoring</i> (SIM) do Fenantreno (1) e do THC (2), juntamente com o modelo de fragmentação proposto para as moléculas.	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diferenças na velocidade de absorção, biodisponibilidade e no tempo de efeito subjetivo entre as vias oral e pulmonar após utilização de canábis.	31
Tabela 2. Relação de métodos para determinação de THC e THC-COOH em análise toxicológica de matrizes biológicas por CG/EM.	46
Tabela 3. Testes de derivatização realizados com BSTFA 1% TMCS.	57
Tabela 4. Condições de derivatização	58
Tabela 5. Testes de extração de THC e THC-COOH em sangue (volumes em microlitros).....	62
Tabela 6. <i>Cut-off</i> de THC e THC-COOH recomendados pela guia de Walsh (2008).	65
Tabela 7. Fragmentos e tempo de retenção dos analitos pesquisados em sangue total derivatizados	65
Tabela 8. Fragmentos e tempo de retenção dos analitos pesquisados em fluido oral (FO).	69
Tabela 9. Seletividade do método cromatográfico.	71
Tabela 10. Janela de detecção para drogas em diferentes matrizes biológicas	75

ABREVIATURAS E SIGLAS

AAFS	Academia Americana de Ciências Forenses
CBD	Canabidiol
CBG	Canabigerol
CBGA	Ácido Canabigerólico
CBN	Canabinol
CG/EM	Cromatografia em Fase Gasosa Acoplada A Detector De Massas
CG/EM/EM	Cromatografia em Fase Gasosa Acoplada A Detector De Massa-Massa
CL/EM	Cromatografia em Fase Líquida Acoplada A Detector De Massas
CL/EM/EM	Cromatografia em Fase Líquida Acoplada A Detector De Massa-Massa
CTB	Código De Trânsito Brasileiro
DUID	<i>Driving Under The Influence Of Drugs</i>
ELL	Extração Líquido-Líquido
FO	Fluido Oral
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
SIM	<i>Selected Ion Monitoring</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SOFT	Sociedade Forense de Toxicologia
SPA	Substâncias Psicoativas
SPE	Extração em Fase Sólida

SPME	Microextração em fase sólida
ST	Sangue total
THC	Delta-9-tetrahydrocannabinol
THC-COOH	11-nor-9-carbóxi-delta-9-tetrahydrocannabinol
THC-OH	11-hidróxi-delta-9-tetrahydrocannabinol
THCV	Δ^9 -tetrahydrocannabivarina
Δ^9 -THCA	Ácido Δ^9 -tetrahydrocannabinólico
Δ^9 -THCAS	Ácido Δ^9 -tetrahydrocannabinólica sintase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. OBJETIVOS	255
2.1 Objetivo geral	255
2.2 Objetivos específicos	255
3. REFERENCIAL TEÓRICO	277
3.1 Ocorrência na natureza e composição química da <i>Cannabis sativa</i>	277
3.2 Propriedades físico-químicas do delta-9-tetrahydrocannabinol (THC).....	299
3.3 Farmacocinética.....	30
3.4 Farmacodinâmica.....	355
3.5 Fisiologia do sangue	377
3.6 Fisiologia do fluido oral	388
3.7 Canábis e trânsito	41
3.8 Metodologias analíticas para detecção e quantificação de THC e 11-nor-9-carbóxi-delta-9-tetrahydrocannabinol (THC- COOH) em matrizes biológicas	433
3.8.1 Cromatografia gasosa com detector de massas (CG/EM)	488
3.8.2 Derivatização	488
3.8.3 Extração líquido-líquido (ELL)	499
4. MATERIAIS E MÉTODOS	51
4.1 Materiais	51
4.1.1 Reagentes	51
4.1.2 Padrões analíticos	51
4.1.3 Amostras	51
4.1.4 Equipamentos.....	52
4.2 Métodos	52
4.2.1 Preparo de amostras	52
4.2.1.1 Derivatização	53

4.2.1.2	Extração líquido-líquido.....	53
4.2.1.2.1	Sangue Total	53
4.2.1.2.2	Fluido oral	53
4.2.2	Método cromatográfico	53
4.2.2.1	Análise de THC e THC-COOH em sangue total	54
4.2.2.2	Análise de THC em fluido oral.....	545
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	577
5.1	Preparo de amostra	577
5.1.1	Pesquisa de THC e THC-COOH em sangue.....	577
5.1.1.1	Derivatização	577
5.1.1.2	Extração de THC e THC-COOH de amostras de sangue	61
5.1.2	Pesquisa de THC em fluido oral	644
5.2	Análises em amostras de sangue	644
5.2.1	Desenvolvimento do método cromatográfico.....	644
5.3	Análises em amostras de fluido oral	688
5.4	Aplicabilidade das diferentes matrizes biológicas no monitoramento do consumo de SPA no trânsito	733
	CONCLUSÕES	777
	PERSPECTIVAS.....	799
	REFERÊNCIAS.....	81

1. INTRODUÇÃO

A canábis (*Cannabis sativa L.*) e o álcool estão entre as drogas de abuso mais consumidas no mundo, e são também as mais prevalentes em casos de acidentes de trânsito com maior gravidade (DOWNEY, 2013; UNODC, 2016). O Brasil está entre os países com maior número de mortes em acidentes de trânsito (BRAZIL, 2015). Considerando o impacto no desempenho dos condutores e o risco de acidentes, torna-se necessário o monitoramento do consumo dessas drogas e de outras substâncias psicoativas (SPA) em matrizes biológicas, tornando possível relacionar o seu uso à redução da habilidade de dirigir com segurança.

Estudos convergem para o fato de que a canábis reduz a habilidade de dirigir de forma dose-dependente (HUESTIS, 2007; ARMENTANO, 2012; KUYPERS, 2012; WOLFF, 2013; HUESTIS, 2015), comprometendo a capacidade de julgamento de tempo e de distância e diminuindo o tempo de reação, bem como a coordenação motora necessária à direção, aumentando exponencialmente o risco de acidente de trânsito (WOLFF, 2013).

Apesar das especificações de penalidades administrativas e criminais definidas no Código de Trânsito Brasileiro (CTB) relativas ao consumo de SPA por condutores de veículos desde 1997 (BRASIL, 1998; BRASIL, 2008; BRASIL, 2012), o monitoramento mais efetivo que se tem no Brasil é para o etanol. Atualmente, o consumo de outras SPA por condutores não é monitorado na rotina de abordagem dos órgãos fiscalizadores de trânsito, não havendo dados representativos da incidência de outras SPA, além do álcool.

As estatísticas disponíveis provêm de estudos nacionais ligados principalmente a universidades e hospitais e têm evidenciado prevalência no consumo de delta-9-tetrahydrocannabinol (THC), especialmente em acidentes de maior gravidade e com vítimas fatais (REIS, 2006; MARIOTTI, 2013; CARVALHO, 2016; PELIÇÃO, 2016).

O consumo concomitante de álcool e canábis prejudica ainda mais a habilidade de dirigir (KUYPERS, 2012; DOWNEY, 2013), principalmente à

noite (DOWNEY, 2013), sendo difícil determinar como cada droga afeta a capacidade de dirigir, tendo em vista que muitas vezes há o uso associado de mais de um tipo de droga (NIDA, 2016).

Como procedimentos analíticos, as guias internacionais da Sociedade Forense de Toxicologia/Academia Americana de Ciências Forenses (SOFT/AFFS, 2006) e de Walsh e colaboradores (2008) recomendam que estes devem ser realizados pelo menos em duas etapas. Inicialmente, através de testes preliminares de triagem, seguidos por métodos confirmatórios que utilizem técnicas com diferente princípio químico do método de triagem, mais específicas e de maior sensibilidade, como cromatografia em fase gasosa ou cromatografia em fase líquida acopladas a detector de massas (CG/EM e CL-EM, respectivamente) (SOFT/AFFS, 2006; WALSH, 2008) ou massa-massa (CG/EM/EM e CL-EM/EM).

A identificação de condutores apresentando os sinais notórios de intoxicação por canábis na abordagem policial, como comportamento suspeito, vermelhidão da conjuntiva, alteração da expressão facial ou fala arrastada, por exemplo, deve servir de alerta para que os agentes de trânsito avaliem sua sobriedade. Havendo suspeita do consumo de SPA, é fundamental que o condutor tenha suas amostras biológicas coletadas o mais breve possível e que estas sejam enviadas para o laboratório para seguir o fluxo de análise de triagem (imunoensaio - ELISA) e confirmatória (CG/EM ou LC/EM).

O monitoramento do consumo de canábis pode ser feito através da detecção de THC na forma inalterada e/ou de seus metabólitos 11-nor-9-carbóxi-delta9-THC (THC-COOH) e 11-hidróxi-THC (THC-OH) em matrizes biológicas (HUESTIS, 2007). Segundo Walsh e colaboradores (2008), as matrizes de escolha para o monitoramento de SPA no trânsito são sangue total (ST), FO e urina, nesta ordem de prioridade. É possível relacionar a presença destas substâncias em matrizes biológicas com a temporalidade do consumo de canábis e com o prejuízo da habilidade de dirigir, especialmente quando se faz o seu monitoramento nas diferentes matrizes.

A guia da SOFT/AFFS de 2006 e as diretrizes para pesquisa de drogas

no trânsito (WALSH et al., 2008) preconizam como padrão-ouro a análise de drogas em ST para monitoramento do consumo recente de drogas, devido ao potencial de interpretação dos efeitos das drogas no momento da coleta (SOFT/AAFS, 2006; WALSH et al., 2008). Entretanto, Walsh e colaboradores sugerem como matriz alternativa o FO e, na impossibilidade de coleta desta, a urina. Quando se trata de abordagem no trânsito a coleta de FO é de grande aplicabilidade, visto que esta matriz pode ser facilmente obtida de forma não-invasiva. Além disso, há acúmulo de substâncias na forma inalterada na saliva, de forma que a detecção de drogas em FO revela que houve consumo recente. Esta informação de uso recente é essencial para a fundamentação de um processo criminal, uma vez que o CTB preconiza que é proibitivo dirigir sob efeito de SPA, de forma que a constatação de uso pretérito não configura crime de trânsito.

Por uma questão de princípio científico, ético e legal, a fim de evitar resultados falso-positivos ou falso-negativos, todos os resultados positivos obtidos nas etapas de triagem devem ser confirmados através do emprego de outra técnica mais específica, bem como 5% dos resultados negativos (SOFT/AFFS, 2006; WALSH e colaboradores, 2008), o que justifica a necessidade de métodos analíticos compatíveis com a rotina laboratorial.

Frente ao exposto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar uma metodologia de baixo custo e tempo de extração, reprodutível e compatível com a rotina laboratorial e com a demanda pericial, por CG/EM, visto que esta tecnologia está disponível na maioria dos laboratórios forenses, sendo de grande aplicabilidade no cenário nacional.

É importante esclarecer que o enfoque deste trabalho é sobre a canábis droga, e que não diz respeito à questão de legalização da canábis, abordando seus efeitos sobre a habilidade de dirigir, independente da finalidade e das características de uso.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estabelecer e validar método analítico quantitativo para análise de THC-COOH em ST e de THC em amostras de ST e FO por CG/EM, compatível com a aplicação na rotina de laboratórios forenses.

2.2 Objetivos específicos

- Estabelecer e validar um método de extração líquido-líquido (ELL) para THC e THC-COOH em ST.
- Estabelecer e validar um método de ELL para THC em FO.
- Estabelecer e validar um método simples, rápido e sensível para a análise quantitativa de THC e THC-COOH em ST por CG/EM.
- Estabelecer e validar um método simples, rápido e sensível para a análise quantitativa de THC em FO CG/EM.
- Comparar a aplicabilidade de análises confirmatórias de THC em FO e ST na rotina laboratorial para monitoramento do consumo recente de canábis por condutores de veículos automotores.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Ocorrência na natureza e composição química da *Cannabis sativa* L.

A canábis é a droga de abuso ilícita mais consumida no mundo (UNODC, 2016), e seu uso recreacional e têxtil é historicamente milenar (BALBINO, 2014). Cientificamente identificada como *Cannabis sativa* Linnaeus, esta planta pertence à família *Cannabaceae* e geralmente atinge a altura de 1 a 3 metros, podendo chegar a 6 metros (UNODC, 2009). Cresce livremente em temperaturas e regiões tropicais (RANG e DALE, 2016). Suas principais preparações são feitas com as folhas e flores (maconha, marihuana) e com a resina extraída das inflorescências (haxixe) (PASSAGLI, 2013).

Quimicamente, já foram identificados inúmeros compostos na canábis, sendo os terpenofenóis, contendo 21 átomos de carbono, os mais importantes do ponto de vista forense, existentes exclusivamente na *C. sativa* (PASSAGLI, 2013; RADWAN, 2015). Estes terpenofenóis são conhecidos como canabinoides, sendo os principais o THC, o canabinol (CBN) e o canabidiol (CBD) (PASSAGLI, 2013; BALBINO, 2014). As estruturas dos principais canabinoides estão representadas na Figura 1.

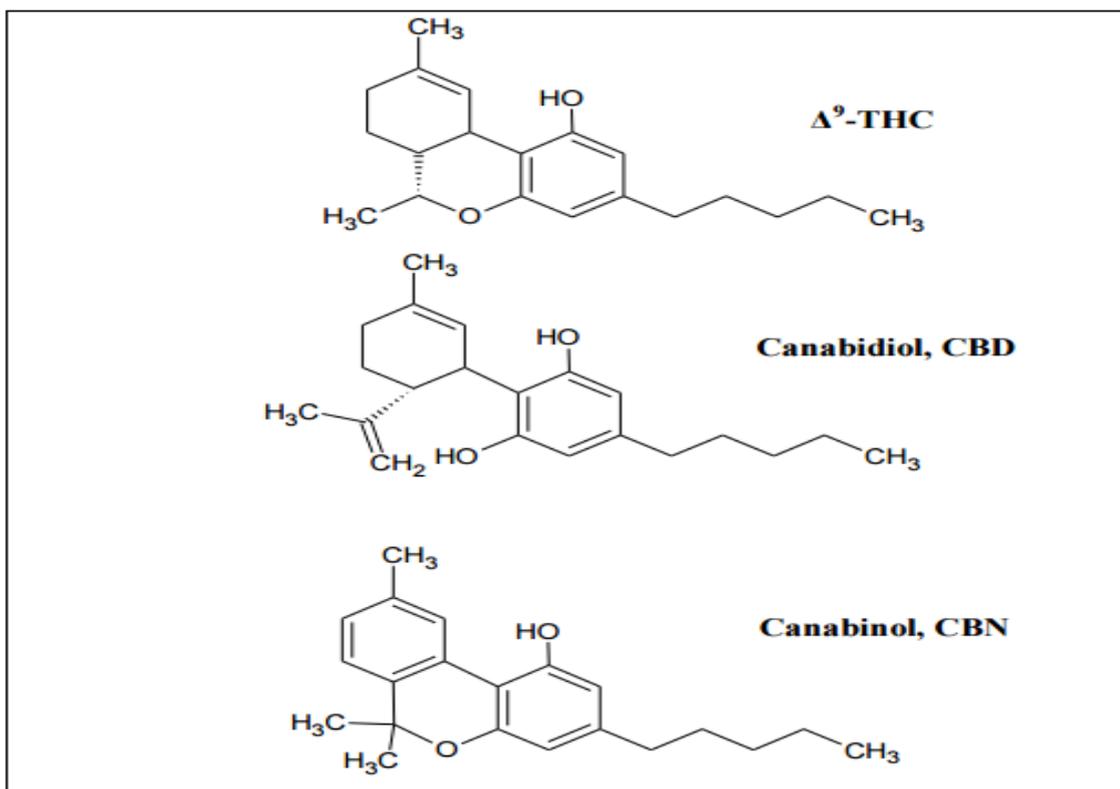


Figura 1. Estrutura química dos canabinoides de interesse forense.
 Fonte: BALBINO, 2014.

O THC (C₂₁H₃₀O₂) é o canabinoide mais abundante da canábis droga e também o farmacologicamente mais ativo e de importância toxicológica, atuando principalmente no SNC. É formado a partir da descarboxilação não enzimática do ácido tetrahydrocannabinólico (Δ⁹-THCA), que tem origem a partir da atuação da enzima oxidociclase Δ⁹-THCA sintase (Δ⁹-THCAS) sobre o ácido canabigerólico (CBGA), conforme representado na Figura 2 (BORILLE, 2016). Como produto da oxidação do THC tem-se o CBN (BALBINO, 2014).

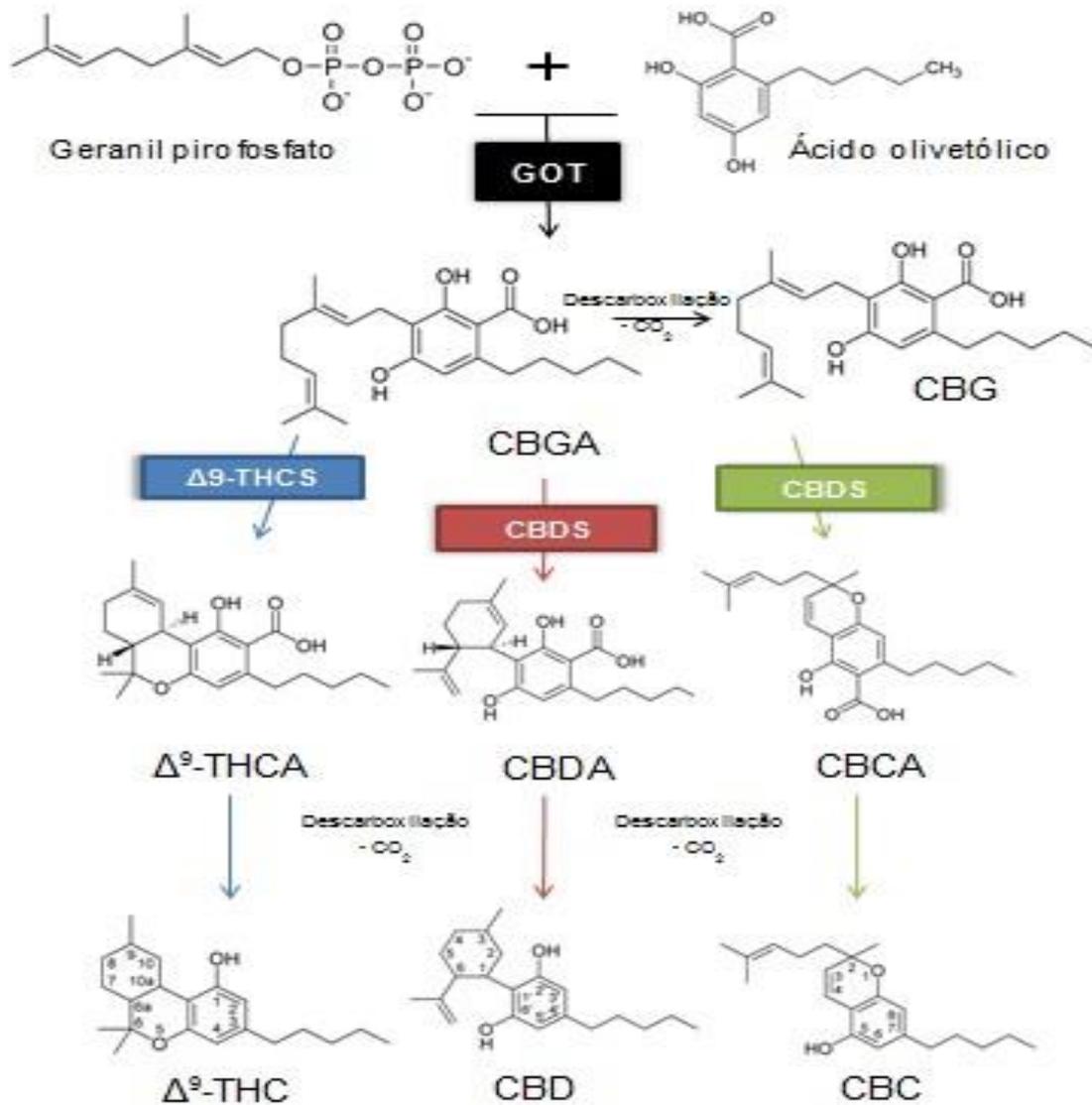


Figura 2. Esquema básico da biossíntese vegetal dos principais canabinoides C21 presentes na *Cannabis sativa* L.

Fonte: BORILLE, 2016. GOT: geranyl pirofosfato-olivetolato geranyl transferase; CBGA: ácido canabigerólico; CBG: canabigerol; Δ⁹-THCA: ácido Δ⁹-tetrahydrocannabinólico; CBDA: ácido canabidiólico; CBCA: ácido canabicromênico; Δ⁹-THCAS: ácido Δ⁹-tetrahydrocannabinólica sintase; CBDAS: ácido canabidiólica sintase; CBCAS: ácido canabicromênica sintase; Δ⁹-THC: Δ⁹-tetrahydrocannabinol; CBD: canabidiol; CBC: canabicromeno.

3.2 Particularidades do THC

A molécula de THC é altamente lipofílica e essencialmente insolúvel em água. Além disso, é termolábil e fotolábil (HUESTIS, 2007). As propriedades físico-químicas do THC desempenham papel fundamental nos seus mecanismos

de absorção e distribuição, além de refletirem cuidados necessários a serem tomados nas etapas analíticas, a fim de reduzir a perda de teor de THC por degradação.

3.3 Farmacocinética

A principal via de administração utilizada para a canábis é a inalatória. Esta via permite a rápida e eficiente passagem da droga dos pulmões para o SNC, contribuindo para o seu potencial de abuso (HUESTIS, 2007). É possível detectar o THC no plasma e no FO segundos após o início do consumo da droga por via inalatória, atingindo o pico de concentração plasmática após cerca de 3 a 10 minutos (HUESTIS, 2007; ARMENTANO, 2013; MOREAU, 2014).

A concentração máxima de THC em FO ocorre durante ou imediatamente após o consumo da canábis, independente da via utilizada, devido à contaminação da cavidade bucal e à rápida absorção por difusão passiva (SWORTWOOD, 2016). A concentração máxima de THC em FO demonstrou-se semelhante em usuários crônicos e eventuais. Entretanto, a concentração máxima de THC em sangue de usuários frequentes foi maior (média: 17,7 ng/ml) se comparada a usuários eventuais (média: 8,2 ng/ml) (NEWMAYER, 2017).

A via oral também pode ser utilizada através da ingestão da droga incorporada a alimentos, sendo a absorção por esta via mais lenta, de forma que o pico plasmático de THC é atingido de cerca de 60 a 120 minutos após o consumo (HUESTIS, 2007; ARMENTANO, 2013). Essa via apresenta uma biodisponibilidade de THC mais baixa se comparada à via inalatória entre 10 e 35% (GROTENHERMEN, 2003) e 2 a 56% (HUESTIS, 2007). Conseqüentemente, é necessário um maior tempo para início dos efeitos fisiológicos decorrentes do consumo da droga (HUESTIS, 2007; WOLFF, 2013), sendo cerca de 30 a 60 minutos (MOREAU, 2014) ou até 2 horas, tendo efeito mais prolongado devido a vagarosa absorção que continua a ocorrer no intestino (ASHTON, 2001).

A biodisponibilidade sistêmica do THC para a via inalatória varia e é influenciada pelo número e duração das tragadas, volume inalado, tempo entre as tragadas, tempo de retenção da fumaça no pulmão (GROTENHERMEN, 2003; HUESTIS, 2007; MOREAU, 2014) e também pela topografia da droga, o que influencia no grau de exposição aos ativos. Para a via oral, a biodisponibilidade reduzida está relacionada à degradação do THC em pH ácido e isomerização deste, e ao extenso metabolismo de primeira passagem no fígado, com biotransformação do THC antes da sua ligação nos sítios de ação (Tabela 1) (HUESTIS, 2007).

Tabela 1. Diferenças na velocidade de absorção, biodisponibilidade e no tempo de efeito subjetivo entre as vias oral e pulmonar após utilização de canábis.

Via de administração	Velocidade de absorção	Biodisponibilidade sistêmica	Início dos efeitos	Efeito subjetivo máximo	Duração dos efeitos
Oral	Lenta e irregular	4 - 12%	30 - 60 minutos	2,5 - 3,5 horas	4 – 6 horas
Pulmonar	Muito rápida	8 - 24%	minutos	8 - 15 minutos	1 – 3 horas

Autor: Bruna Tassi Borille (2016). Adaptado de MOREAU, 2014.

Apesar da alta taxa de ligação às proteínas plasmáticas (97 a 99%) (MOREAU, 2014), a distribuição do THC e dos seus produtos de biotransformação parecem depender apenas das suas propriedades físico-químicas (lipofilia), não estando associada a nenhum transporte específico (GROTENHERMEN, 2003). A concentração plasmática de THC diminui rapidamente após o término do consumo da droga pela via inalatória devido a sua rápida distribuição para os tecidos altamente vascularizados (HUESTIS, 2007; MOREAU, 2014) e à biotransformação hepática (HUESTIS, 2007). Uma vez no cérebro, os canabinoides se distribuem neste órgão, atingindo altas concentrações nas áreas neocortical, límbica, sensorial e motora (ASHTON, 2001). Ocorre também a redistribuição do THC e dos seus produtos de biotransformação, que se acumulam no tecido

adiposo e em tecido menos vascularizados, podendo atingir concentrações cerca de 1000 vezes maior nestes tecidos que no plasma, conforme ilustrado na Figura 3 (MOREAU, 2014).

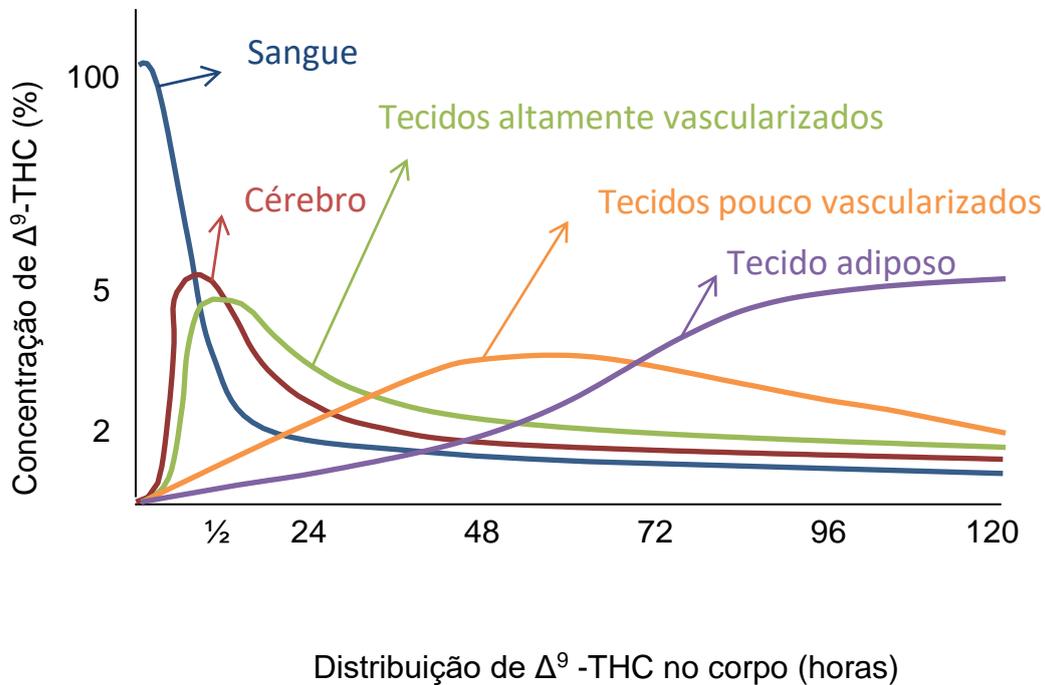


Figura 3. Distribuição de THC em diferentes tecidos do corpo humano em função do tempo decorrido.

Autor: Bruna Tassi Borille (2016). Adaptado de ASHTON, 2001.

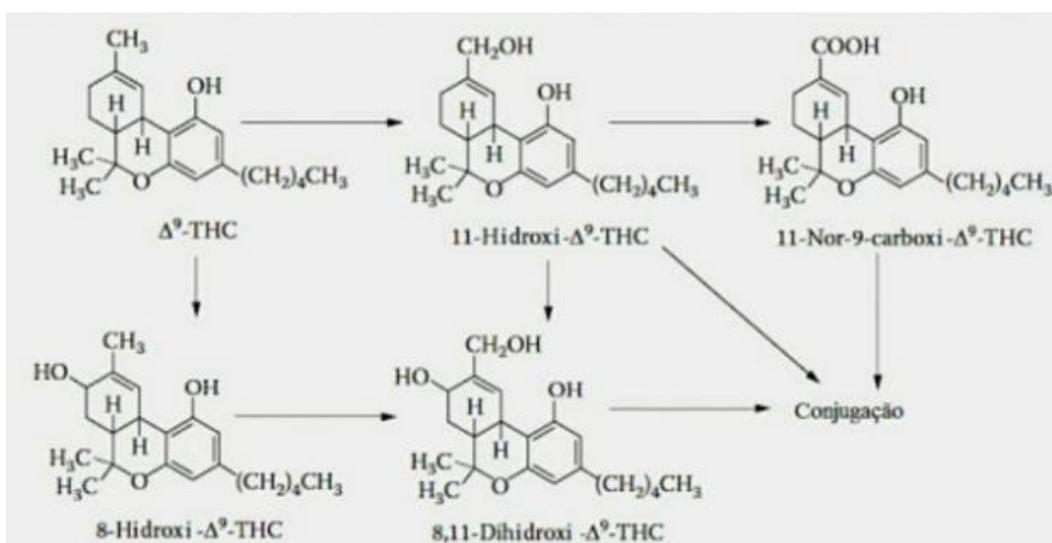


Figura 4. Biotransformação do tetrahidrocanabinol (THC).

Fonte: MOREAU, 2014.

Conforme Figura 4, a biotransformação do THC envolve, primeiramente, sua hidroxilação a THC-OH, oxidação a 11-oxo-THC e, posteriormente, a THC-COOH, sendo os dois últimos produtos de biotransformação inativos (HUESTIS, 2007). O THC-OH é um metabólito psicoativo e é considerado pelo menos equipotente ao THC. Seu pico de concentração sanguínea ocorre de 20 a 30 minutos após consumo de canábis via inalatória, e é detectado por um curto período de tempo (ARMENTANO, 2013).

A eliminação dos produtos de biotransformação ocorre majoritariamente através das fezes para a forma hidroxilada (aproximadamente 65%), e através urina (20%) para a forma carboxilada (THC-COOH), que sofre glicuronidação no grupamento carboxílico (HUESTIS, 2007), podendo ser detectado nesta matriz até cerca de 4 dias após o uso de um único cigarro de canábis ou até 4 semanas em usuários frequentes (MAURER, 2006). No sangue, é possível detectar THC-COOH em até 8 minutos após começar a fumar. Já no fluido oral, o THC pode ser detectado em baixas concentrações por imunoensaio em até 24 horas após o consumo da droga (HUESTIS, 2007), sendo que o seu pico de concentração nesta matriz ocorre nos primeiros 15 minutos após o início do consumo de canábis pela via oral (LEE, 2012).

Os níveis de THC em sangue aumentam rapidamente após o consumo via inalatória, atingindo pico de concentração máxima no sangue antes de terminar de fumar, que rapidamente se dissipa. O pico de concentração de THC-OH ocorre logo após o término do consumo da droga via inalatória e atinge níveis bem inferiores ao THC. O THC-COOH tem sua concentração aumentada vagarosamente, mas atinge um platô por um extenso período, podendo ser detectado por um maior intervalo de tempo (MAURER, 2006), motivo pelo qual a detecção de THC-COOH não serve para prever há quanto tempo a canábis foi consumida nem para sugerir alguma relação entre a concentração de THC-COOH e o desempenho psicomotor (Figura 5) (ARMENTANO, 2013).

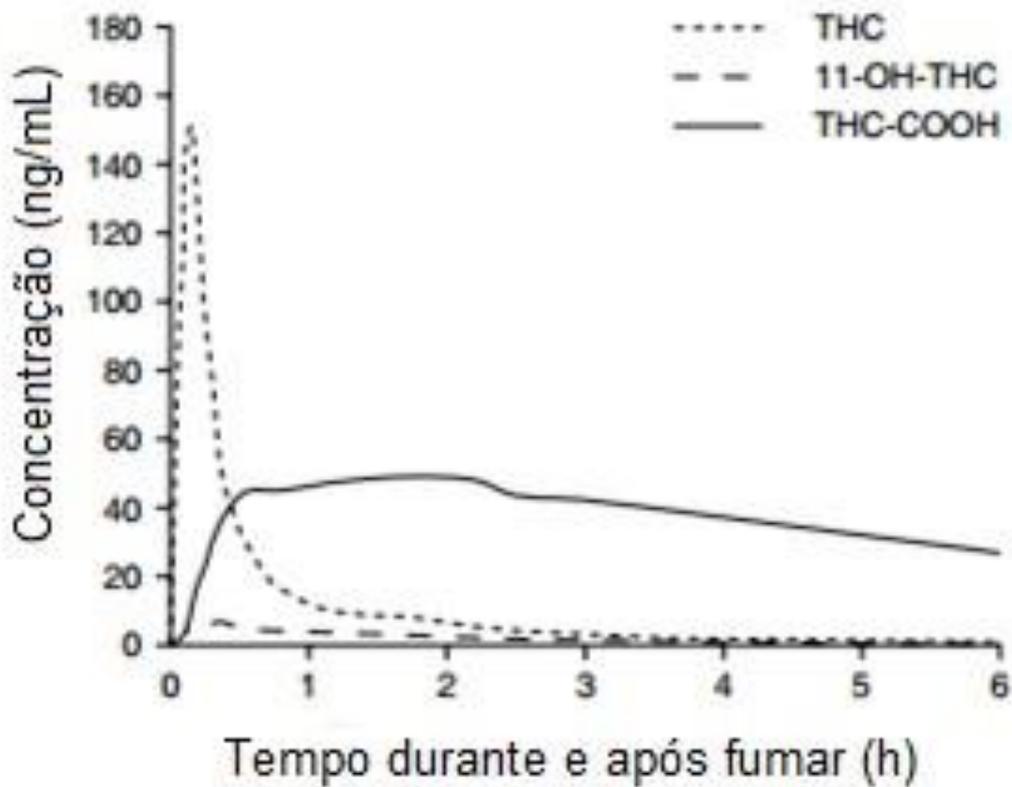


Figura 5. Média das concentrações plasmáticas de THC, 11-THC-OH e THC-COOH durante e após uso oral de um cigarro de canábis contendo 34 mg de THC por 6 indivíduos.

Adaptado de: GROTENHERMEN, 2003.

A Figura 6 demonstra a abundância relativa dos canabinoides e dos seus produtos de biotransformação nas matrizes sangue, saliva, suor e cabelo, evidenciando a necessidade de adequação de metodologia analítica a ser empregada na análise destas matrizes face ao diferente perfil de distribuição de substâncias nas mesmas.

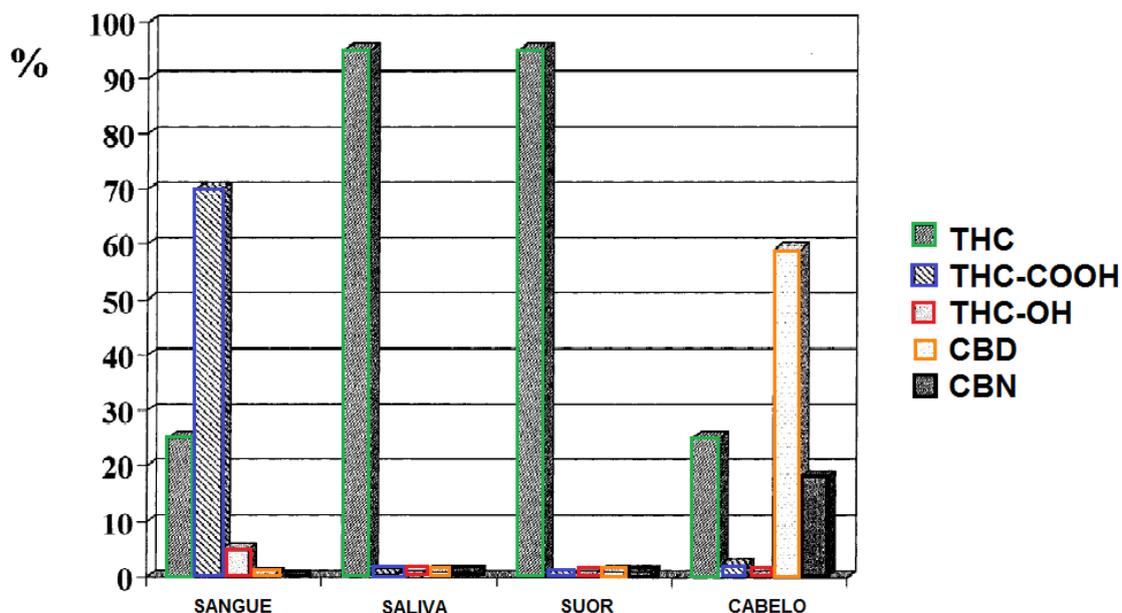


Figura 6. Abundância relativa dos canabinóides em matrizes biológicas. Adaptado de: Staub, 1999.

3.4 Farmacodinâmica

Os canabinoides exercem seus efeitos devido a sua interação específica com os receptores endocanabinoides (ASHTON, 2001). O sistema endocanabinoide é composto por três elementos principais: (1) enzimas que sintetizam os agonistas endocanabinoides; (2) receptores nos quais os agonistas se ligam e desencadeiam a cascata de sinalização intracelular; e (3) enzimas e transportadores cuja função é remover os endocanabinoides dos receptores (VOLKOW, 2017).

Embora haja indicativo da existência de outros subtipos de receptores canabinoides (GROTENHERMEN, 2003), são conhecidos dois receptores canabinoides (CB1 e CB2), ambos acoplados a proteína G, com sete domínios transmembrana, apresentando diferente função e distribuição nos tecidos (VOLKOW, 2017), ligados à inibição da adenilatociclase (MOREAU, 2014; RANG e DALE, 2016) e exercendo efeito inibitório sobre a liberação de transmissor (RANG e DALE, 2016).

Os receptores canabinoides cerebrais CB1 – ou receptores neuronais

são pré-sinápticos e podem ser encontrados em abundância no hipocampo (prejuízo da memória), cerebelo e substância nigra (distúrbio motor), nas vias dopaminérgicas mesolímbicas (recompensa) e córtex (ASHTON, 2001; HUESTIS, 2007; VOLKOW, 2017), e estão relacionados com os efeitos psíquicos do THC (HUESTIS, 2007), relacionados à cognição e à coordenação motora, sendo de grande importância no desempenho de dirigir (ARMENTANO, 2013).

O CB2 – receptor canabinoide periférico – ocorre principalmente nas células imunes (ASHTON, 2001; RANG e DALE, 2016; VOLKOW, 2017) e tem sido alvo de pesquisa para uso terapêutico dos canabinoides (HUESTIS, 2007). Estes receptores apresentam diferente especificidade farmacológica (RANG e DALE, 2016; VOLKOW, 2017).

Enquanto os dados farmacocinéticos dos canabinoides não demonstram diferença entre os gêneros feminino e masculino ou conforme frequência de uso da droga pelos consumidores (HUESTIS, 2007), a manifestação dos efeitos farmacológicos varia de indivíduo para indivíduo e depende do padrão de uso, que está relacionado com a dose absorvida, a via de administração utilizada e a experiência do usuário (MOREAU, 2014).

Os principais efeitos farmacológicos centrais da canábis incluem prejuízo da memória a curto prazo e de tarefas de aprendizagem simples, prejuízo da coordenação motora, catalepsia, analgesia, ação antiemética e aumento do apetite (GROTENHERMEN, 2003; HUESTIS, 2007; RANG e DALE, 2016). Os efeitos são dose-dependentes e incluem euforia, disforia, sedação e alteração de percepção, bem como alteração do tempo de reação, atenção e coordenação motora, reduzindo consideravelmente a habilidade de dirigir (HUESTIS, 2007; HARTMAN, 2013).

Como principais efeitos periféricos tem-se a taquicardia, vasodilatação, redução da pressão intraocular e broncodilatação (GROTENHERMEN, 2003; RANG e DALE, 2016). Como manifestação destes efeitos periféricos, os indivíduos que consumiram canábis podem apresentar vermelhidão da conjuntiva ocular, dificuldade de caminhar e fala arrastada, que configuram os sinais notórios do consumo de canábis, podendo ser utilizados pelos agentes

de trânsito como suspeita do uso de canábis (FIERRO, 2014).

3.5 Fisiologia do sangue

O sangue é o fluido corporal que circula pelos vasos do sistema circulatório. A média de volume sanguíneo corporal é de 8% do peso para adultos, o que representa cerca de 5 litros de sangue para indivíduos de 70 Kg (GUYTON, 2015). Este líquido viscoso de coloração avermelhada possui células em suspensão e moléculas e íons dissolvidos em água, apresentando propriedades de soluções coloidais. Uma importante característica do sangue é a pequena variação da sua composição química e das suas propriedades físicas (pH de aproximadamente 7,4), o que proporciona meio adequado para funcionamento das células (GANONG, 1998). O sangue é responsável pela mediação das interações metabólicas entre todos os tecidos, como o transporte de oxigênio, gás carbônico e de nutrientes (NELSON, 2011). Esta matriz é constituída de duas frações, sendo elas a celular, que representa cerca de 40% do volume de sangue total, e a plasmática (60%), que constitui o fluido extracelular (GUYTON, 2015).

A fração celular é composta por três tipos de células - os elementos figurados, sendo eles os glóbulos vermelhos (ou também hemácias ou eritrócitos), os glóbulos brancos (ou leucócitos) e as plaquetas (ou trombócitos). A fração plasmática é acelular, sendo composta majoritariamente por água (aproximadamente 90%), que é o veículo para as células, eletrólitos, moléculas e íons, e também para enzimas, hormônios, proteínas, lipídios e outros constituintes orgânicos (8%) (NELSON, 2011). As principais proteínas presentes no plasma são a albumina, cuja função está relacionada à pressão osmótica coloidal, a globulina (relacionadas às funções enzimáticas no plasma) e o fibrinogênio (relacionado à coagulação sanguínea) (GUYTON, 2015).

Os derivados sanguíneos soro e plasma podem ser obtidos a partir da centrifugação de amostras de sangue sem anticoagulante e com anticoagulante, respectivamente, de forma que o fibrinogênio está presente

apenas no plasma. Assim, pode-se dizer que o soro é o plasma sem fibrinogênio (GUYTON, 2015).

Do ponto de vista toxicológico, é recomendada a utilização de sangue total como padrão-ouro (SOFT/AAFS, 2006; WALSH, 2008), visto que a detecção de xenobióticos nesta matriz é a que melhor se correlaciona com efeitos dessas substâncias no organismo (MOREAU, 2014) e, por não passar por etapa de coagulação e precipitação, que pode levar a perda de analito, esta é a matriz de escolha para interpretação dos efeitos das drogas (WALSH et al., 2008). Recomenda-se que seja realizada a coleta de 10 mL de sangue total em tubo estéril tipo vacutainer, contendo anticoagulante e fluoreto como conservante, sendo que as amostras devem ser refrigeradas o mais breve possível, devendo-se ter o registro do horário da coleta (WALSH et al., 2008). Apesar de não haver equivalência entre as matrizes sangue total, soro e plasma, estas podem ser utilizadas em análises toxicológicas, devendo, entretanto, a interpretação dos resultados considerar a matriz que foi analisada. A vantagem da utilização de soro frente ao plasma, é que o soro mantém a composição da amostra inalterada, uma vez que para a sua obtenção não há acréscimo de aditivo na amostra (MOREAU, 2014).

3.6 Fisiologia do fluido oral

O FO é constituído principalmente por saliva, fluido gengival crevicular, transudatos bucais e mucosos, detritos celulares, bactérias e resíduos de alimentos (CONE, 2007; UNODC, 2014). A saliva é uma secreção mucoserosa clara, composta por 98% de água, 0,7% de proteínas e 0,26% de glicoproteínas e eletrólitos. É produzida a partir da secreção de três pares de glândulas salivares principais: a parótida, a submandibular e a sublingual (HUMPHREY, 2001), além de inúmeras outras glândulas salivares menores, localizadas no lábio inferior, língua, palato, bochechas e faringe (CHIAPPIN, 2007).

As glândulas salivares contribuem de formas distintas para a produção de saliva. Para um fluxo basal, 20% da saliva é produzida pelas glândulas parótidas, 65% pelas submandibulares, 7% a 8% pelas sublinguais e menos

de 10% por inúmeras glândulas menores. A ocorrência de algum estímulo para produção de saliva altera drasticamente as contribuições percentuais de cada uma destas glândulas, com a parótida contribuindo para mais de 50% das secreções salivares totais (HUMPHREY, 2001).

Cada tipo de glândula produz e secreta um tipo característico de saliva, com diferente composição proteica, salina e iônica. A secreção pode ser classificada como serosa, mucosa ou mista. Secreções serosas são produzidas principalmente a partir das glândulas parótidas (HUMPHREY, 2001). A produção salivar e sua composição dependem do sistema nervoso autônomo, que opera através de sistemas de transdução de sinal que acoplam a estimulação do receptor ao transporte de íons e aos mecanismos secretores de proteínas. O sistema simpático é responsável pela produção da parte serosa da saliva enquanto a parte mucosa depende de ambos os sistemas simpático e parassimpático (CHIAPPIN, 2007).

A produção de saliva em adultos saudáveis varia de 500 a 1500 mL por dia, a uma taxa de aproximadamente 0,6 mL/min, podendo aumentar até uma média de 2 mL/min (UNODC, 2014). Diversas condições fisiológicas e patológicas podem modificar a qualidade e quantidade de saliva produzida, como, por exemplo, cheiro e estimulação através do paladar, mastigação, estado psicológico e hormonal, drogas, idade, influências hereditárias, higiene oral e exercícios físicos (CHIAPPIN, 2007).

A saliva é composta por eletrólitos, como sódio, potássio, cálcio, magnésio, bicarbonato e fosfatos; imunoglobulinas, proteínas, enzimas, mucinas, ureia e amônia. Estas substâncias estão relacionadas com funcionalidades específicas na saliva: (a) bicarbonatos, fosfatos e ureia: regulação do pH e da capacidade tamponante da saliva; (b) proteínas e mucinas: limpeza ou agregação de microrganismos orais que contribuem para o metabolismo da placa dentária; (c) cálcio, fosfato e proteínas: agentes antisolubilidade e fator/modulador da desmineralização e remineralização; e (d) imunoglobulinas, proteínas e enzimas: ação antibacteriana (HUMPHREY, 2001).

O pH do FO é levemente mais ácido que o do sangue. Contudo, o aumento do fluxo de saliva através de estímulo no momento da coleta pode fazer com que o pH varie de 5,5 a 7,9. Como consequência da alteração do

pH do FO, a exemplo do que ocorre com a utilização de ácido cítrico em alguns dispositivos de coleta, a partição das drogas entre o FO e o plasma pode ser afetada (UNODC, 2014).

Devido à elevada perfusão das glândulas salivares, ocorre a rápida transferência dos fármacos presentes no sangue para as glândulas salivares. Após a administração parenteral de drogas e medicamentos, as substâncias podem aparecer no FO em questão de minutos na sua forma inalterada. O mecanismo de transferência de drogas e metabólitos do sangue para a saliva ocorre, principalmente, por difusão passiva e é dependente de inúmeros fatores, tais quais: propriedades químicas da droga, pH da saliva, concentração de droga na forma não-ionizada, fração de droga ligada a proteínas e características da membrana (CONE, 2007), bem como pelo tipo de coleta, contaminação da cavidade bucal e velocidade de eliminação da droga (GJERDE, 2015).

Considerando o monitoramento do uso de SPA por condutores, o FO tem sido utilizado como matriz biológica alternativa ao sangue, oferecendo informação toxicológica complementar àquela obtida na análise de matrizes tradicionais como sangue e urina, apresentando janela de detecção semelhante ao sangue (de algumas horas a 1-2 dias). O aumento do emprego de FO como matriz para monitoramento do abuso de drogas se deve às melhorias das técnicas analíticas, que cada vez apresentam menores limites de detecção e quantificação, fornecendo melhor entendimento da relação de droga em FO e sangue (UNODC, 2014). Aliado a isso, as vantagens das condições de coleta são inquestionáveis, pois estas ocorrem de forma minimamente invasiva, sendo precisas, sensíveis e confiáveis no teste de drogas (BAKER, 2013) e podem ser realizadas por agentes de trânsito devidamente qualificados, mas sem a necessidade de formação médica, podendo ser aplicada no monitoramento do consumo de drogas no trânsito no local da abordagem (UNODC, 2014). Recomenda-se a coleta de 1 mL de FO, preferencialmente com dispositivo que permita a visualização da quantidade de amostra coletada e sem a adição de estimulantes (WALSH et al., 2008).

3.7 Canábis e trânsito

A utilização de SPA por condutores de veículo automotor vem sendo amplamente discutida nos últimos anos. Dirigir sobre efeito de drogas é um problema crescente em países industrializados devido ao risco e causa de acidentes (MOELLER, 2002). A canábis é a droga ilícita mais utilizada no mundo (UNODC, 2016) e a mais detectada em sangue e FO de condutores no período noturno (WOLFF, 2013), bem como a mais prevalente em amostras de sangue no projeto DUID (*Driving Under the Influence of Drugs*) na União Européia (MOELLER, 2002), Estados Unidos e Austrália, ficando atrás apenas do etanol, droga lícita mais consumida no mundo.

Há muitas evidências epidemiológicas do efeito prejudicial da canábis na habilidade de dirigir. O aumento do risco de acidentes por consumo de canábis é dose-dependente, de forma que quanto maior a concentração de THC, maior o prejuízo da capacidade de dirigir e, conseqüentemente, menos seguro é o trânsito, podendo dobrar (HUESTIS, 2015), e até triplicar os riscos de gravidade/fatalidade (WOLF, 2013). Este risco é maior até 2 horas após o consumo de canábis, sendo mais crítico na primeira hora (ARMENTANO, 2012; WOLF, 2013), e parece estar relacionado a situações que envolvam inesperada alteração na direção, exigindo resposta psicomotora complexa (ARMENTANO, 2012).

Estudos demonstram que o risco de acidentes se torna ainda maior quando há o consumo concomitante de canábis e etanol, devido ao efeito sinérgico destas drogas sobre o desempenho de dirigir, principalmente no período noturno (DOWNEY, 2013; WOLF, 2013; HUESTIS, 2015).

A intoxicação aguda pelo consumo de canábis pode ser avaliada tanto através do prejuízo das funções psicomotoras e cognitivas quanto pela determinação da concentração de THC em fluidos biológicos, tendo em vista que está associada ao comprometimento destas funções (GJERDE, 2016).

Devido à legalização do consumo de canábis em alguns estados americanos e em alguns países (em especial o Uruguai, considerando a proximidade com o Brasil) tem-se tentado estabelecer, sem nenhum consenso até o presente momento, um limite a partir do qual os condutores não poderiam dirigir. Aparentemente, uma concentração sanguínea de 3,7 ng/mL de THC

equivale aos mesmos prejuízos motores apresentados quando a concentração de álcool no sangue é de 5 dg/L. Entretanto, os condutores já apresentam risco com concentrações sanguíneas de 2,5 ng/mL e, a partir de 5,0 ng/mL o risco de acidente de trânsito se torna crítico (WOLF, 2013). No Brasil, onde a canábis é proscrita, não há limites legais previstos, sendo qualquer nível detectado através de análise qualitativa confirmatória suficiente para a tipificação de crime de trânsito (CTB, 2012).

Brubacher e colaboradores (2015) analisaram amostras de sangue coletadas de condutores até 6 horas após a ocorrência de acidente de trânsito no Canadá, entre 2010 e 2012. A canábis foi a segunda droga recreacional mais utilizada, ficando atrás apenas do álcool (BRUBACHER, 2015), contrastando com os resultados encontrados por Asbridge e colaboradores (2014), em que o etanol estava presente em menos condutores que a canábis, em estudo realizado no período de abril de 2009 a julho de 2011 também no Canadá.

Senna e colaboradores (2010) avaliaram os resultados de análises de DUID realizadas por laboratórios autorizados na Suíça e verificaram que pelo menos uma substância psicoativa havia sido detectada em 89% das amostras analisadas. Os canabinoides foram o grupo de substância mais encontrado, representando 48% do número total de casos avaliados (SENNA, 2010).

Em estudo que avaliou a presença de drogas no FO de motoristas de caminhão no Brasil, o THC foi a substância mais encontrada entre motoristas que percorreram distâncias de até 500 Km, tendo sido a terceira droga mais consumida depois dos estimulantes anfetamínicos e de cocaína nos motoristas que percorreram maiores distâncias. O consumo de SPA por este grupo de motoristas reforça a necessidade de implementação de medidas preventivas do consumo de drogas por caminhoneiros no Brasil (BOMBANA, 2017).

Zancanaro e colaboradores (2012) avaliaram a utilização de 32 substâncias psicoativas ilícitas e de uso medicinal por condutores no Brasil, entre 2008 e 2009, e identificaram que cerca de 10% dos condutores haviam consumido pelo menos uma das substâncias pesquisadas, das quais 1,1% positivou para THC ou CBN, indicando o uso de canábis.

Apesar das especificações de penalidades administrativas e criminais relativas ao consumo de SPA por condutores, definidas no CTB desde 1997

(alterado pela Lei nº 11.705 / 2008 e posteriormente pela Lei nº 12.760 / 2012) (BRASIL, 1998; BRASIL, 2008; BRASIL, 2012), estudos nacionais têm evidenciado consumo de SPA no trânsito (LEYTON, ZANCANARO, 2012; BOMBANA, 2017), refletindo a necessidade de monitoramento do consumo de outras substâncias psicoativas por condutores (além do etanol) de forma mais rigorosa. Entretanto, até o presente momento, não está estabelecido nem implementado no país um programa de monitoramento de SPA por condutores.

3.8 Metodologias analíticas para detecção e quantificação de THC e THC- COOH em matrizes biológicas

A guia internacional da SOFT/AAFS (2006) estabelece diretrizes a serem seguidas nas análises forenses. Entre elas, está prevista a realização das análises toxicológicas em pelo menos duas etapas, sendo uma de triagem e outra confirmatória. A análise confirmatória deve ser realizada utilizando-se uma técnica analítica de diferente princípio químico da triagem, podendo-se utilizar triagem por imunoensaio e confirmação por CG/EM e/ou CL-EM, ou, por exemplo, na ausência de imunoensaio, proceder à análise em CG/EM ou CL-EM no modo *fullscan* como triagem, e no SIM (*selected ion monitoring*) como confirmação. A identificação do analito deve ser feita em diferente extrato da amostra ou em uma segunda matriz (SOFT/AAFS, 2006).

A Figura 7 ilustra o fluxograma de análise das amostras, indicando que amostras positivas na triagem devem ser confirmadas. Além destas, deve-se selecionar 5% das amostras negativas para realizar análise confirmatória. Neste último caso, assim como naqueles que apresentaram um resultado divergente do inicial, deve-se proceder a uma terceira análise da amostra para obtenção do resultado final (SOFT/AAFS, 2006), de preferência por metodologia analítica distinta das etapas anteriores.

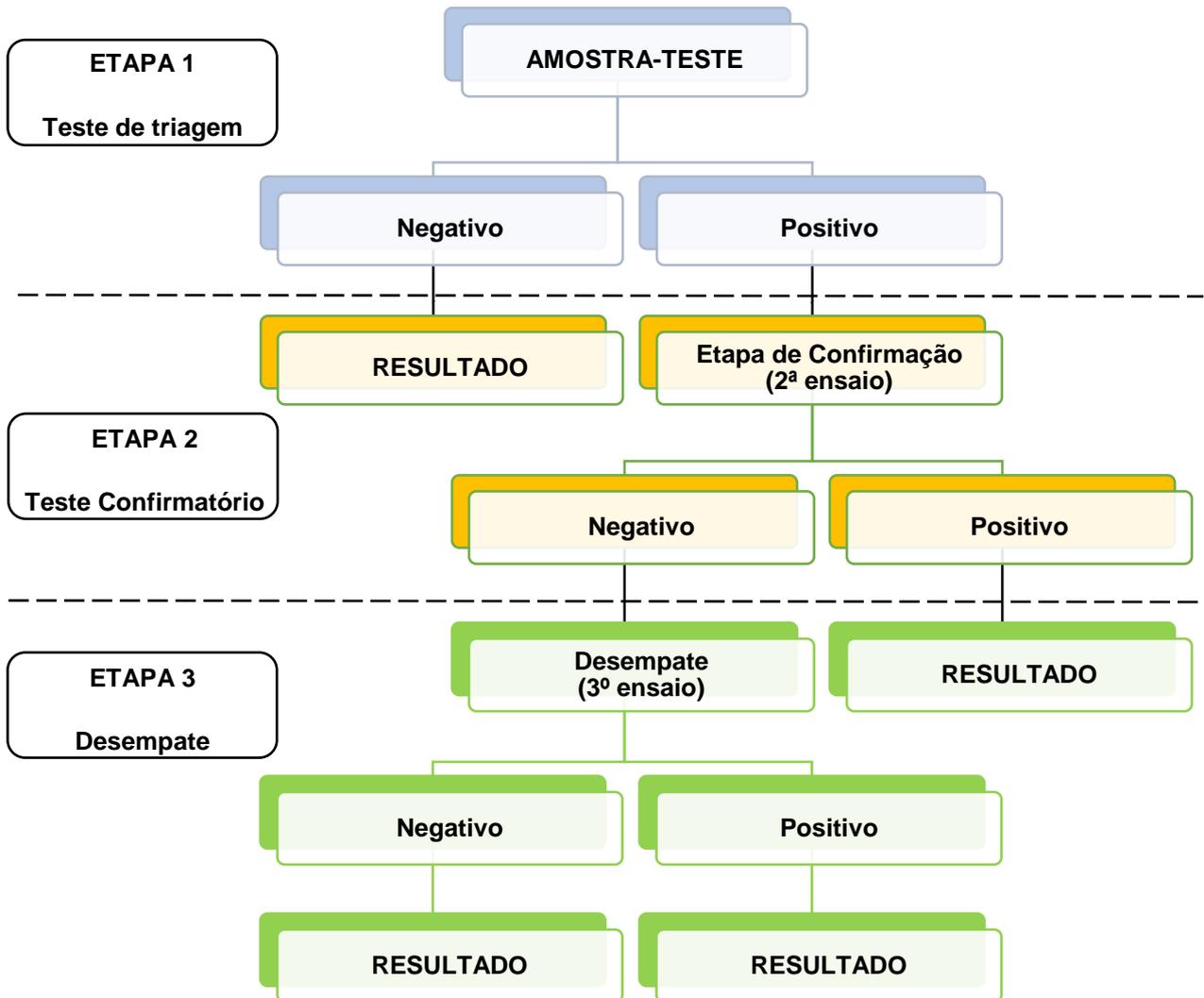


Figura 7. Fluxograma analítico recomendado para análises forenses.

Diversas metodologias analíticas e técnicas de extração têm sido utilizadas nas análises toxicológicas de amostras biológicas para pesquisa de canabinoides. A Tabela 2 apresenta uma relação das técnicas utilizadas para determinação de THC- COOH e/ou THC em matrizes biológicas, bem como os reagentes utilizados na derivatização das amostras, imprescindível para a análise de THC-COOH por CG/EM, juntamente com os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ). A pesquisa de metodologias realizada foi direcionada para aquelas que empregam a CG/EM, uma vez que esta técnica está disponível na maioria das instituições forenses no Brasil. Além disso,

optou-se por utilizar extração líquido-líquido (ELL) miniaturizada devido ao baixo custo associado a esta técnica, principalmente se comparado à extração em fase sólida (SPE) e microextração em fase sólida (SPME), e também, à compatibilidade de emprego na rotina laboratorial forense.

A escolha do método analítico a ser utilizado deve ser feita considerando as propriedades físico-químicas do analito de interesse, bem como as limitações do método (limites de detecção e quantificação, robustez, tempo e demanda analítica) e os recursos disponíveis em cada laboratório. Devido à polaridade da molécula de THC-COOH, se faz necessária uma etapa de derivatização das amostras para análise por CG/EM, visto sua baixa volatilidade.

Conforme pode-se observar na Tabela 2, os limites de detecção mais baixos são aqueles obtidos com o emprego de SPE e SPME como técnica de preparo de amostras e/ou com a derivatização do analito, técnicas mais caras e com maior número de etapas, cabendo ao analista a seleção do método de melhor custo-benefício de acordo com a realidade e necessidade do seu laboratório.

Tabela 2. Relação de métodos para determinação de THC e THC-COOH em análise toxicológica de matrizes biológicas por CG/EM.

Matriz	Método	Extração	Analito	LD/LQ (ng/mL)	Derivatizante	Referência
FO	CG/EM	SPME	THC	0,5 / 0,5	-	ANZILLOTTI <i>et al</i> ,
FO	CG/EM	SPE	THC	NI*	ACN/MTBSTFA	UNODC, 2014
FO	CG/EM	SPE	THC	0,5 / 0,5	BSTFA/TMCS	MOORE <i>et al</i> , 2007
FO	CG/EM	ELL	THC	1,0 / 1,0	iodo METANO	CIRIMELE <i>et al</i> , 2006
Plasma	2D-CG/EM	SPE	THC THC-COOH	0,25 / 0,25 0,125 / 0,25	BSTFA/TMCS	KARSCHNER <i>et al</i> , 2010
Plasma	CG/EM	SPE	THC THC-COOH	0,24 / 0,80 0,26 / 0,88	BSTFA	NADULSKY <i>et al</i> , 2005
Plasma ou ST	CG/EM	SPE	THC/THC-COOH	0,7	iodo METANO	TESKE <i>et al</i> , 2002
Soro	CG/EM	ELL	THC/THC-COOH	0,3	MSTFA	PURSCHKE <i>et al</i> , 2016
Soro	CG/EM	SPE	THC THC-COOH	0,52 / 0,62 0,65 / 3,35	TBAH/DMSO/iodo METANO	STEINMEYER <i>et al</i> , 2002
ST	Fast CG/EM	ELL	THC/THC-COOH	0,5 / 2,5	TFAA/HFIP	THOMAS <i>et al</i> , 2007
ST	CG/EM	ELL	THC	0,5	PFP/PFAA	CHICHU <i>et al</i> , 2002
Urina	CG/EM	LPME	THC-COOH	1,5 / 2	BSTFA/TMCS	ELLER <i>et al</i> , 2014

Legenda: FO: fluido oral; ST: sangue total; ELL: extração líquido-líquido; SPE: extração em fase sólida; SPME: microextração em fase sólida; CG/EM: cromatografia gasosa com detector de massas; 2D-CG/EM: cromatografia bidimensional com detector de massas; HF-LPME: microextração em fase líquida; MSTFA: metil-silil-trifluoroacetamida; BSTFA + 1% TMCS: *N,O*-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida com 1% trimetilclorosilano; TFAA: anidrido trifluoroacético; HFIP: hexafluoroisopropanol; PFP + PFAA: 2,2,3,3,3-pentafluoro-1-propanol e anidrido pentafluoropropiônico; TBAH+DMSO: hidróxido de amônio e tetrabutila e dimetilsulfóxido, NI*: não informado.

3.8.1 Cromatografia gasosa com detector de massas (CG/EM)

A guia da SOFT/AAFS (2006) recomenda o emprego de duas técnicas com diferentes princípios físicos e/ou químicos para a identificação inequívoca de substâncias. Essa identificação pode ser realizada através da extração de matrizes biológicas, seguida da análise do extrato por CG/EM (SOFT/AAFS, 2006).

A CG é uma técnica de separação e quantificação de compostos voláteis presentes em amostras. O detector de massas emprega o espectrômetro de massas, através do uso de energia de ionização para fragmentação das moléculas e o campo elétrico e/ou magnético para separação dos fragmentos formados. O acoplamento dessas duas técnicas permite identificar um grande número de substâncias, cuja identificação é realizada através da comparação do tempo de retenção das amostras contra um padrão analítico e, também, pela comparação do padrão de fragmentação das moléculas.

3.8.2 Derivatização

A derivatização é um processo de síntese orgânica que envolve a proteção de grupos polares de determinadas moléculas com o objetivo de torná-la mais volátil, mais estável e de melhorar sua detectabilidade e, conseqüentemente, seu perfil cromatográfico, sua especificidade e a sensibilidade do método analítico utilizado (LANÇAS, 2015).

Vários agentes de derivatização podem ser empregados para o THC e THC-COOH, sendo o *N,O*-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida com 1% trimetilclorosilano (BSTFA + 1% TMCS) muito utilizado nas rotinas forenses. Na determinação de THC e THC-COOH com BSTFA + 1% TMCS, ocorre a ligação do grupamento trimetilsilil do agente derivatizante à hidroxila fenólica das moléculas de THC e THC-COOH) e à hidroxila do grupamento ácido da molécula de THC-COOH, sendo a proporção estequiométrica da reação de uma molécula de THC para uma molécula de BSTFA + TMCS 1%, ao passo que para o THC-COOH a proporção é 2:1.

A Figura 8 demonstra o mecanismo de reação de derivatização de amostras contendo o grupamento $-OH$ utilizando-se o BSTFA com 1% TMCS como agente derivatizante.

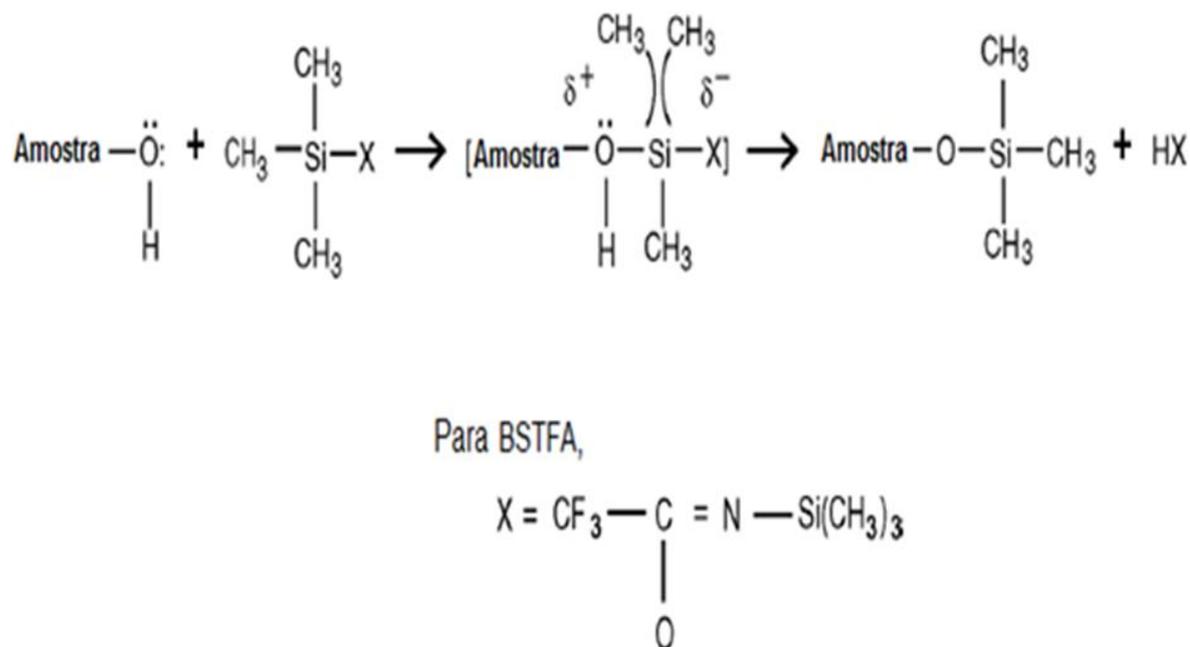


Figura 8. Mecanismo de reação da derivatização com BSTFA. Adaptado de: Supelco, 1999.

3.8.3 Extração líquido-líquido (ELL)

A ELL é a técnica de preparo de amostra mais frequentemente utilizada para análise por CG/EM, cujo o objetivo é isolar e concentrar os analitos de interesse de determinada matriz (MOFFAT, 2011). Baseada no coeficiente de partição do analito em duas fases imiscíveis (orgânica e aquosa), sua eficiência depende da afinidade do soluto pelo solvente extrator, da proporção das fases e do número de extrações. A recuperação do analito também depende do ajuste do pH (importante para garantir que os analitos estejam na forma não-ionizada) e da escolha do solvente orgânico (LANÇAS, 2015).

É uma técnica simples e de custo relativamente baixo se comparada a técnicas mais modernas como SPE, e sua miniaturização envolve pequenas quantidades de solvente, o que é interessante do ponto de vista ambiental e econômico.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Reagentes

Foram utilizados os seguintes solventes: metanol (grau HPLC) (Sigma-Aldrich), metanol PA (Nuclear), diclorometano - grau HPLC (J.T. Baker), diclorometano P.A. (Vetec), ácido clorídrico P.A. (Synth), ácido acético glacial P.A. (Vetec), hexano P.A. (Chemis), acetato de etila P.A. (Synth) e cloreto de sódio (Neon). Foram também utilizados o fenantreno (Sigma Aldrich) e o agente derivatizante o *N,O*-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida com 1% trimetilclorosilano (BSTFA-1% TMCS - Supelco).

4.1.2 Padrões analíticos

Foram preparadas soluções de trabalho de THC, THC-COOH e d3-THC- COOH nas concentrações de 1 µg/mL e 10 µg/mL, em hexano e em metanol, a partir de soluções metanólicas dos padrões analíticos de (-)-11-nor-9-carboxy-delta9-THC 1 mg/mL e (±)-11-nor-9-carboxy-delta9-THC D3 1mg/mL (Cerrilant, USA) e delta-9-THC 5 mg/mL em hexano (Lipomed). As soluções foram mantidas sob refrigeração a 4°C.

4.1.3 Amostras

Foram obtidas amostras de fluido oral e de sangue total de voluntários declarados não usuários de canábis. As amostras foram mantidas congeladas até a realização das análises. Para a execução dos testes realizados foi realizado um *pool* das amostras de ST e das amostras de FO.

Foram coletados 3 frascos para coleta de sangue à vácuo, contendo anti-coagulante e conservante, com capacidade para 5 mL, de amostras de ST de dez voluntários.

As amostras de FO foram coletadas após um período mínimo de 30 minutos após o consumo de alimentos e/ou bebidas (exceto água), tendo-se obtido amostra de 10 voluntários por cuspe em frascos de coleta estéreis.

4.1.4 Equipamentos

Foram utilizados os seguintes equipamentos na realização deste trabalho:

- a) Cromatógrafo em fase gasosa modelo 6890 GC acoplado ao espectrômetro de massas modelo 5973 (Agilent Technologies, Melbourne, Australia), operado no modo de impacto de elétrons, utilizando liner Agilent (PN 5183-4711) coluna cromatográfica de sílica fundida com 5% de fenil-dimetilpolisiloxano DB-5 MS 30 m x 25 mm x 0,25 µm (Agilent Technologies);
- b) Centrífuga Eppendorf Mini SpinPlus;
- c) Concentrador Pierce Reacti-Therm Heating Module, acoplado à unidade evaporadora Pierce Reacti-Vap Modelo 18780;
- d) Agitador Vórtex Biomixer VTX2500;
- e) Homogeneizador rotatório Siel modelo 026.

4.2 Métodos

Este trabalho utilizou como técnica de preparo de amostras a ELL, seguida de uma etapa de derivatização, quando necessário, para análise dos analitos de interesse por CG/EM.

4.2.1 Preparo de amostras

4.2.1.1 Derivatização

Uma vez que a análise de THC-COOH por CG/EM envolve uma etapa de derivatização, inicialmente foi necessário estabelecer este procedimento para que fosse possível avaliar qual o melhor processo extrativo tanto para o THC-COOH quanto para o THC. Com base nos métodos descritos na literatura (Tabela 2) e nas recomendações da UNODC (1995), optou-se por utilizar como agente derivatizante o BSTFA - 1% TMCS (*N,O*-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida com 1% trimetilclorosilano), uma vez que este reagente é amplamente utilizado nos laboratórios forenses e estava disponível no LABTOXICO. Como solventes, foram testados o hexano, o acetato de etila e o diclorometano.

4.2.1.2 Extração líquido-líquido

4.2.1.2.1 Sangue

Para a extração de THC e THC-COOH (pKa 4,21) de ST foram testados como agente acidificante o ácido acético 10% e o ácido clorídrico 1 M. Como solução extratora foi testado o hexano:acetato de etila nas proporções 2:1 e 9:1.

4.2.1.2.2 Fluido oral

A extração de THC de FO foi testada com e sem a adição de ácido clorídrico 1 M. Como solução extratora foram testados o hexano, o diclorometano e o hexano:acetato de etila na proporção 9:1.

4.2.2 Método cromatográfico

4.2.2.1 Análise de THC e THC-COOH em sangue

As análises de ST foram realizadas em CG/EM, modelo 7890A GC e MS 5975C, respectivamente (Agilent Technologies, CA, USA), localizado no Laboratório de Produção de Padrões Secundários da Faculdade de Farmácia da UFRGS (LAPPS). Foi utilizada coluna cromatográfica DB-5MS (Agilent Technologies, CA, USA) de dimensões 30m x 0,250mm x 0,25 µm e hélio 5.0 como gás de arraste, com fluxo de 1mL/min.

A ionização foi realizada por impacto de elétrons com energia de ionização de 70 eV. Inicialmente, o detector foi configurado para operar no modo *fullscan* (70-500 m/z) e, posteriormente foi alterado para operar simultaneamente nos modos *fullscan* e SIM (*selected ion monitoring*), com monitoramento dos fragmentos 303, 371 e 386 (correspondentes ao THC-TMS) até 9,00 minutos e 371, 374, 473, 476, 488 e 491 (correspondentes ao THC-COOH- 2TMS e *d*₃-THC-COOH- 2TMS) após esse tempo. Foram injetados 4 µL de amostra utilizando o amostrador automático CTC (Agilent Technologies, CA, USA), no modo *splitless pulsed* até 1 min, com pressão de 40 psi. As temperaturas do injetor, do detector, do quadrupolo e da fonte de íons foram 280°C, 300°C, 150°C e 230°C, respectivamente. A temperatura inicial do forno foi mantida por 1 minuto a 60°C, com taxa de aquecimento de 40°C por minuto até 300°C, mantendo esta temperatura por 7 minutos, totalizando 14 minutos de análise cromatográfica.

4.2.2.2 Análise de THC em fluido oral

As análises de FO foram realizadas em CG/EM, modelo 7890A GC e MS 5975C, respectivamente (Agilent Technologies, CA, USA), localizado no Laboratório de Produção de Padrões Secundários da Faculdade de Farmácia da UFRGS (LAPPS). Foi utilizada coluna cromatográfica DB-5MS (Agilent Technologies, CA, USA) de dimensões 30m x 0,250mm x 0,25 µm e como gás de arraste foi utilizado hélio 5.0, com fluxo de 1 mL/min.

A ionização foi realizada por impacto de elétrons com energia de ionização de 70 elétrons volt (eV). O detector foi configurado para operar simultaneamente

nos modos fullscan (70-400 m/z) e SIM, com monitoramento dos fragmentos 152, 176 e 178 (correspondentes ao fenantreno) até 6,5 minutos e 231, 271, 299 e 314 (correspondentes ao THC) após esse tempo. Foram injetados 4 µL de amostra utilizando o amostrador automático CTC (Agilent Technologies, CA, USA), no modo *splitless-pulsed* até 1 minuto, com pressão de 40 psi. As temperaturas do injetor, do detector, do quadrupolo e da fonte de íons foram 280°C, 300°C, 150°C e 230°C, respectivamente. A temperatura inicial do forno foi 120°C, com taxa de aquecimento de 30°C por minuto a partir de 1 minuto, até atingir 300°C, mantendo esta temperatura por 3 minutos, totalizando 10 minutos de análise cromatográfica.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Preparo de amostra

5.1.1 Pesquisa de THC e THC-COOH em sangue

5.1.1.1 Derivatização

Para determinação das melhores condições de derivatização, foram utilizadas soluções de THC, THC-COOH e d_3 -THC-COOH 10 µg/mL. Em vial de vidro de 2 mL, foram pipetados 100 µL de cada uma dessas soluções e o solvente foi evaporado a 48°C com fluxo de nitrogênio. Ao extrato seco, foram adicionados derivatizante/solvente, conforme descrito na tabela 3, e após homogeneização em vórtex por 1 minuto os vials foram incubados nas suas respectivas temperaturas, pelo tempo especificado na Tabela 3.

Tabela 3. Testes de derivatização de THC, THC-COOH e d_3 -THC-COOH realizados com BSTFA 1% TMCS.

Volume de reagente (µL)	T (°C)	t (min)	Referência
25	90	15	Eller, 2014*
25	70	30	Karschner, 2010
20	25	30	Nadulski, 2005
50	60	10	ONU, 1995

*Também foram adicionados 25 µL de acetato de etila antes da incubação.

Após incubação das soluções pelo tempo determinado, aguardou-se o resfriamento dos vials e adicionou-se quantidade de solvente necessária para completar 1 mL e procedeu-se à análise cromatográfica.

As análises foram realizadas em triplicata e para cada condição avaliada houve bastante variação de rendimento da reação, não tendo havido repetibilidade das análises realizadas sob as mesmas condições. A condição que apresentou menor variação foi a proposta por Nadulski (2005), entretanto o

rendimento da reação de derivatização foi muito baixo, motivo pelo qual a temperatura ambiente foi excluída dos testes seguintes.

Com o objetivo de determinar quais as melhores condições de derivatização de THC e THC-COOH, foram realizados os experimentos planejados através da técnica Box-Behnken Design (BBD). Para tanto, foram consideradas três níveis de três parâmetros diferentes: temperatura (60°C, 75°C e 90°C), volume de derivatizante (10, 25 e 40 µL) e tempo de incubação/derivatização (10, 25 e 40 minutos), cujos testes foram realizados em dois blocos em dias distintos, em replicata e de forma randomizada. Entretanto, os resultados obtidos com o desenho experimental indicaram que os parâmetros avaliados não foram adequados à determinação da melhor condição de derivatização, as quais foram posteriormente definidas a partir das condições dos testes preliminarmente realizados.

Dessa forma, foram testadas as temperaturas de 70, 80 e 90°C, tempo de incubação de 15 e 30 minutos e 25 µL de derivatizante, com e sem acetato de etila. A Tabela 4 indica as condições com quais pode-se observar maior rendimento de reação, com maior formação de produtos de derivatização de THC e THC-COOH (THC-TMS e THC-COOH-2TMS, respectivamente), cromatograma mais limpo e maior repetibilidade dos resultados.

Tabela 4. Condições de derivatização.

Volume		Temperatura	Tempo
BSTFA+1%TMCS	Acetato de etila		
25 µL	50 µL	90°C	30 min

O processo de derivatização foi realizado a partir da adição de 25 µL do agente derivatizante (BSTFA+1%TMCS) e 50 µL de acetato de etila ao extrato seco. O vial foi fechado, agitado por 30 segundos em vórtex e incubado por 30 minutos a 90°C. Concluída esta etapa, ao extrato derivatizado foi adicionada quantidade de solvente necessária para preparar solução de 1 µg/mL, a qual foi submetida à análise cromatográfica. Neste processo, ocorre a substituição nucleofílica de um átomo de hidrogênio pelo grupamento trimetilsilil nas posições ocupadas pela carboxila (THC-COOH) e pela hidroxila (THC e THC-COOH), conforme

representado na Figura 9.

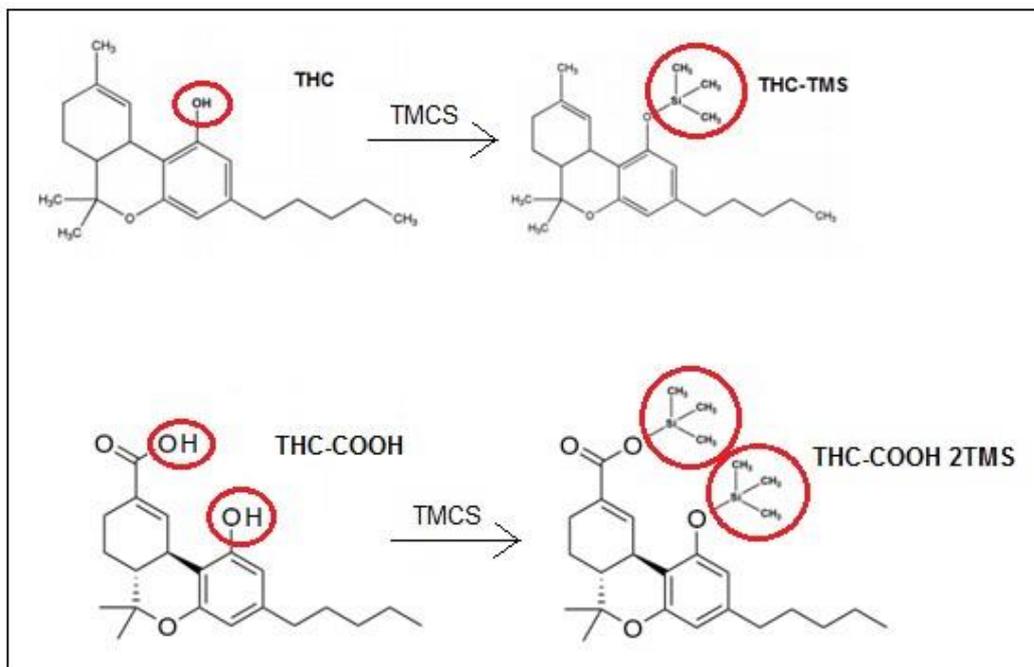


Figura 9. Estruturas do THC e THC-COOH e de seus derivados-TMS.

Dos solventes testados, o que apresentou melhor resposta cromatográfica foi o diclorometano, mas devido a sua elevada volatilidade optou-se por utilizar o hexano, que, além de ser menos volátil, é menos denso que a água, permanecendo na fase superior, mais fácil e com menos chances de perda de analito na transferência da fase orgânica.

Uma vez definidas as condições de derivatização, foi realizada uma curva de calibração dos padrões de THC-TMS e THC-COOH-2TMS com o objetivo de verificar o LD do método e a linearidade da faixa de concentração pretendida.

Foram construídas curvas de calibração para os padrões de THC-TMS, contemplando os pontos 15, 30, 40, 50, 75, 100 e 200 ng/mL, e de THC-COOH - 2TMS, contemplando os pontos 1, 5, 10, 20, 50 e 100 ng/mL, sendo que o ponto de 15 ng/mL não foi detectado e 1 ng/mL de THC-COOH - 2TMS foi detectado somente em uma das análises da triplicata deste ponto, motivo pelo qual os mesmos foram descartados. As representações gráficas das Figuras 10 e 11 ilustram as curvas de calibração do THC-TMS e do THC-COOH - 2TMS, respectivamente, tendo sido obtida maior linearidade para o THC-COOH - 2TMS, bem como menor limite de detecção, sendo de 5 ng/mL o LD para o THC-COOH- 2 TMS e de 30 ng/mL para o

THC - TMS.

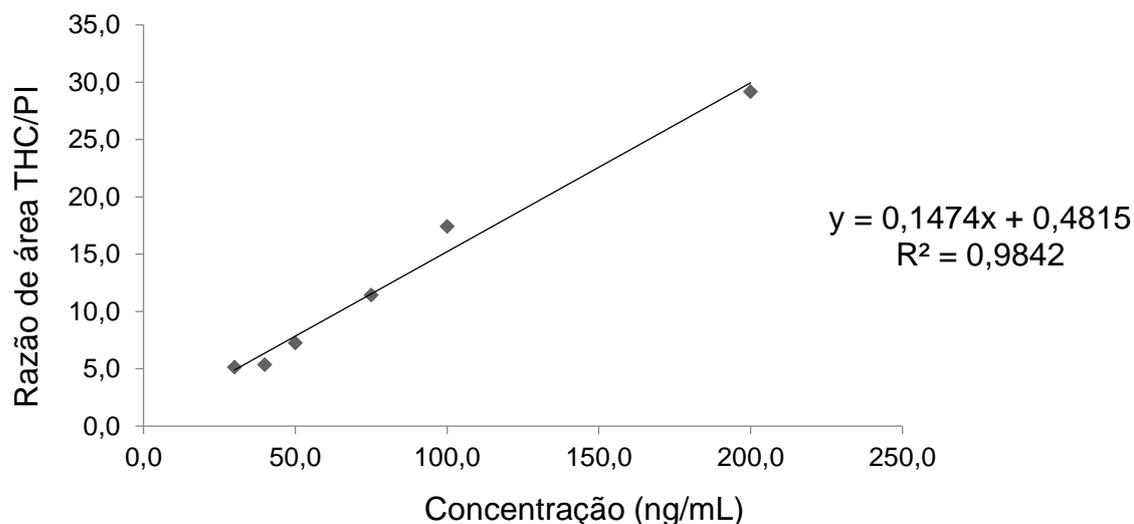


Figura 10. Curva padrão de calibração obtida através da média das triplicatas realizadas com padrão de THC-TMS.

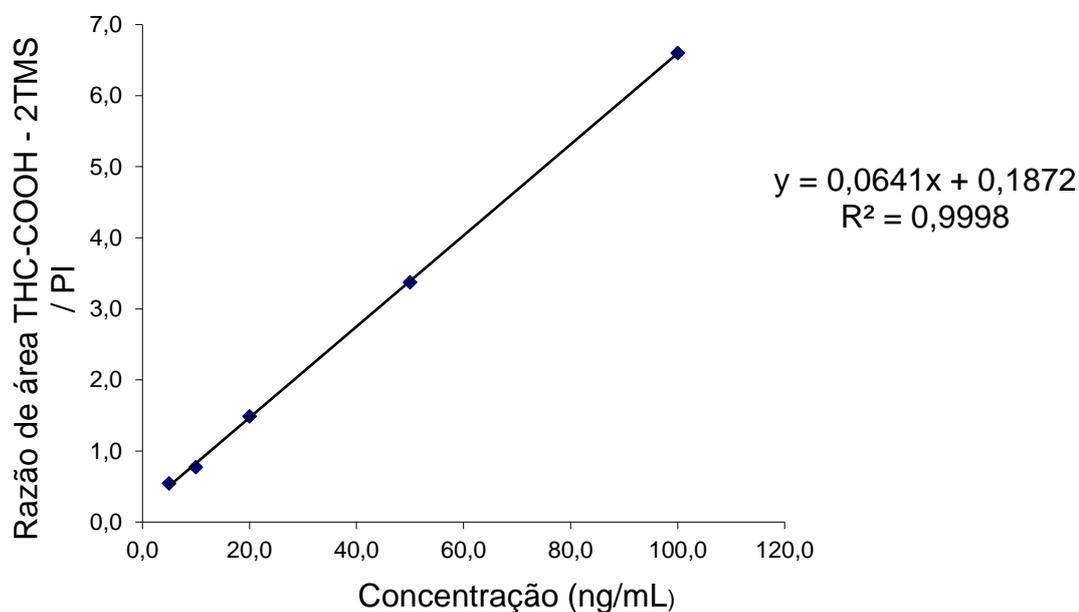


Figura 11. Curva padrão de calibração obtida através da média das triplicatas realizadas com padrão de THC-COOH - 2TMS.

A derivatização possibilita a identificação de substâncias pouco voláteis por cromatografia em fase gasosa, servindo também para aumentar a especificidade e sensibilidade do método empregado (LANÇAS, 2015). Contudo, esta técnica

constitui uma etapa a mais no processo, aumentando o tempo e custo de análise. Outra limitação importante desta técnica, é que a presença de umidade pode reduzir o rendimento da reação por hidrólise do derivatizante e que solventes com sítios ativos podem comprometer o rendimento da reação por competir pelo derivatizante.

A derivatização se fez necessária para analisar o THC-COOH devido a sua baixa volatilidade, entretanto, como no processo extrativo seriam extraídos o THC e THC-COOH, ambos sofrem derivatização. Apesar de o THC não necessitar deste recurso para ser analisado, com ele foi possível reduzir o limite de detecção do método analítico.

5.1.1.2 Extração de THC e THC-COOH de amostras de sangue

Amostras de ST de voluntários declarados não usuários de canábis foram utilizadas para desenvolvimento da metodologia. Tais amostras foram unificadas e homogeneizadas em agitador rotatório por 10 minutos, antes e após fortificação. Para os testes iniciais, as amostras foram preparadas de forma a apresentarem concentração de 1 µg/mL.

Com base na literatura disponível, foram realizados testes de ELL de amostras de sangue fortificadas com padrão analítico de THC e THC-COOH. Foram realizados experimentos para extração de THC e THC-COOH das amostras de sangue a fim de definir um método que fosse capaz de extrair ambas as substâncias (PURSCHKE, 2016). Para tanto, foram testados como solvente extrator hexano:acetato de etila nas proporções 2:1 e 9:1, bem como diferentes volumes de ácido (ácido acético 10% e ácido clorídrico 1 M), conforme consta na Tabela 5.

vial da primeira fração, ao qual também foi adicionado o padrão interno (d_3 -THC-COOH), e foi seco com fluxo de nitrogênio (48°C), para que então se procedesse à derivatização. Ao extrato derivatizado adicionou-se hexano em quantidade suficiente para completar 500 μ L, o qual foi injetado no cromatógrafo.

As extrações foram realizadas em replicatas, entretanto, não houve repetibilidade dos resultados, de forma que não foi realizada curva de calibração em sangue, o que inviabilizou as análises quantitativas e qualitativas nesta matriz, tendo em vista que foram encontradas dificuldades na repetibilidade do método.

Como possíveis razões que possam ter interferido na repetibilidade dos resultados, é possível que o volume de solução derivatizante e de acetato de etila utilizados na derivatização não tenham sido suficientes para remover o extrato das paredes do vial, que chega próximo à marca de 1 mL, de forma que tenha ficado analito aderido às paredes do vial. Outra questão importante a ser considerada é a secagem das amostras, uma vez que a presença de umidade ou de solvente prótico diminui a disponibilidade do derivatizante, podendo comprometer a repetibilidade dos testes realizados. Cabe ainda considerar a perda de analito por adsorção no plástico dos eppendorfs utilizados no processo extrativo (MOLNAR, 2012).

Dos métodos analíticos pesquisados, poucos deles realizam ELL, e os que utilizam esta técnica empregavam um grande volume de amostra e de solvente, maior que os 500 μ L de amostra utilizados nos testes realizados. A tentativa de realizar extração com este volume era para que este método pudesse ser empregado na rotina de análises de laboratórios forenses do país, a partir do mesmo tubo de coleta de sangue que se utiliza para realizar a análise de alcoolemia, sem que o volume de amostra (geralmente de 1 a 4 mL) fosse fator limitante para realização da análise. Além disso, miniaturizando a ELL tem-se redução dos custos de análise e, conseqüentemente, dos resíduos gerados, sendo ambientalmente mais adequado.

Como alternativa para aumentar a sensibilidade do método e reduzir seu limite de detecção pode-se empregar as técnicas de preparo de amostra SPE e SPME, conforme apresentado na tabela 2, porém, estas técnicas possuem implicações como o aumento do custo e do tempo de análise.

5.1.2 Pesquisa de THC em fluido oral

Foram utilizadas amostras de FO de voluntários declarados não usuários de canábis para desenvolvimento da metodologia. Devido às dificuldades analíticas encontradas para analisar THC-COOH por CG/EM, a análise de FO se restringiu a pesquisa de THC. Dos testes realizados, a acidificação do meio com HCl 1 M e a utilização de hexano como solvente extrator apresentaram maior eficiência extrativa, tendo-se definido o protocolo de extração a seguir.

As amostras de FO foram descongeladas à temperatura ambiente, e em seguida fortificadas com padrão analítico de THC e padrão interno (PI), ambas diluídas em hexano. Foram adicionados 10 µL de solução padrão de THC 10 µg/mL e 10 µL de solução de fenantreno 10 µg/mL (PI) a um eppendorf contendo 180 µL de FO. Após adição de 200 µL de ácido clorídrico 1 M acrescentou-se 400 µL de hexano e procedeu-se à homogeneização do conteúdo e à extração do THC em vórtex por 30 segundos, seguido de centrifugação a 10000 rpm por 5 minutos. Devido à formação de emulsão, foram adicionados aproximadamente 40 mg de cloreto de sódio e procedeu-se a homogeneização e centrifugação novamente. A fase orgânica (extrato contendo THC) foi transferida para vial-traço de vidro e o extrato foi seco com fluxo de nitrogênio a 48°C. O extrato de THC foi reconstituído em 200 µL de hexano e injetado no CG/EM.

5.2 Análises em amostras de sangue

5.2.1 Desenvolvimento do método cromatográfico

O desenvolvimento do método cromatográfico teve como base o método descrito por Cirimele e colaboradores (2006). O método cromatográfico foi desenvolvido primeiramente para análise de THC - TMS e THC-COOH - 2TMS em amostras de sangue. Posteriormente, na análise de THC em FO, considerando a possibilidade de utilização do método na rotina forense, com grande demanda de perícias, e o fato do aumento da temperatura inicial da rampa não afetar a análise de THC, esta foi aumentada para 120°C com o objetivo de reduzir o tempo

de análise, que de 14 minutos passou para 10 minutos.

Para aumentar a sensibilidade analítica do método o detector foi configurado para operar em ambos os modos *fullscan* e SIM (*selected ion monitoring*) e, de acordo com a capacidade volumétrica do liner utilizado e com o volume de expansão do solvente, o volume de injeção foi aumentado para 4 μL . Tais recursos foram necessários para que fosse possível trabalhar com concentrações próximas aos limites de detecção preconizados pela guia de Walsh, conforme Tabela 6 (WALSH, 2008).

Tabela 6. *Cut-off* de THC e THC-COOH recomendados pela guia de Walsh (2008).

	THC (ng/mL)	THC-COOH (ng/mL)
Fluido Oral	2	-
Sangue	1	5

A escolha dos íons qualificadores e quantificadores a serem monitorados é fundamental para a correta identificação das substâncias e para que o método mostre repetibilidade e reprodutibilidade (SOFT/AAFS, 2006). A Tabela 7 mostra os íons monitorados no modo SIM para quantificação de THC, THC-COOH e *d*₃-THC-COOH derivatizados, dentre eles, os íons moleculares e os picos-base, conforme espectros representados nas figuras 12, 13 e 14 para o THC-TMS, THC-COOH – 2TMS e *d*₃-THC-COOH – 2TMS, respectivamente.

Tabela 7. Fragmentos e tempo de retenção dos analitos pesquisados em sangue total derivatizados.

Composto	m/z	Tempo de retenção
THC-TMS	303, 371*, 386	8,231
THC-COOH-2TMS	371*, 473, 488	9,744
<i>d</i> ₃ - THC-COOH-2TMS	374*, 476, 491	9,744

*Fragmentos quantificadores marcados em cinza.

As Figuras 12 e 13 apresentam, respectivamente, os cromatogramas e espectros de massas de THC-TMS e THC-COOH - 2TMS, juntamente com a proposta de fragmentação das moléculas.

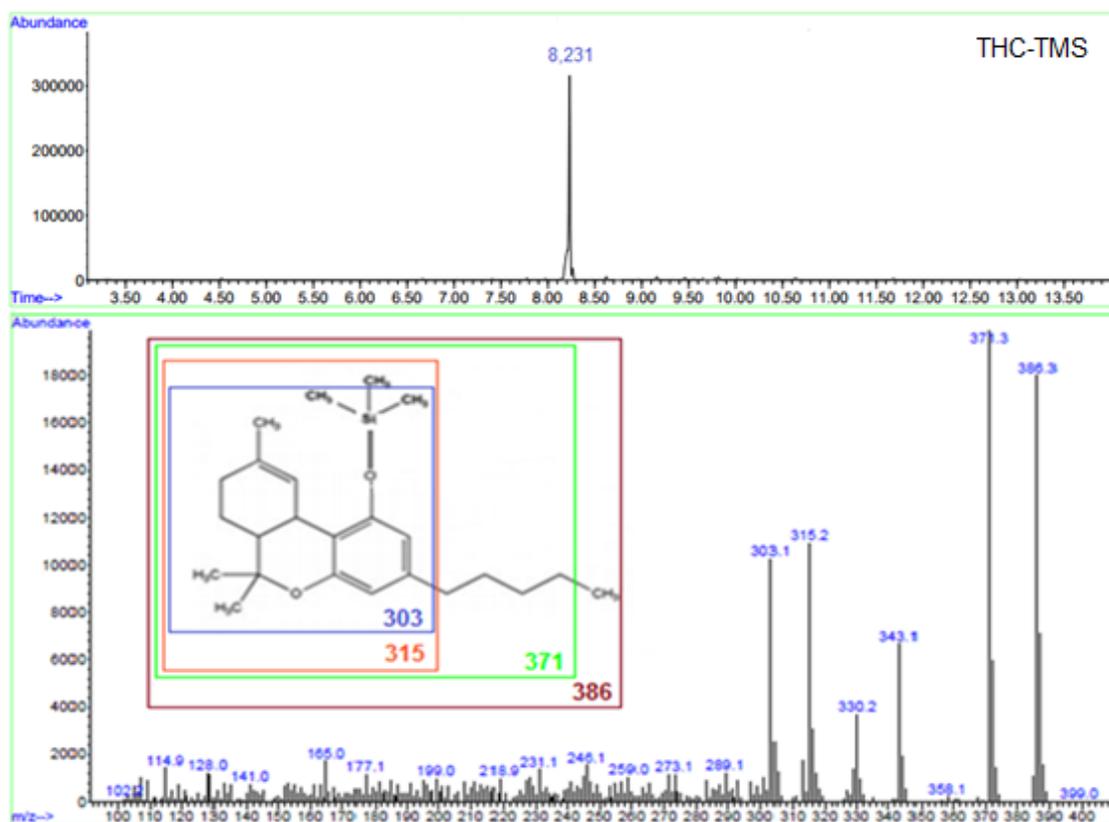


Figura 12. Cromatograma, espectro de massas e proposta de fragmentação do THC TMS.

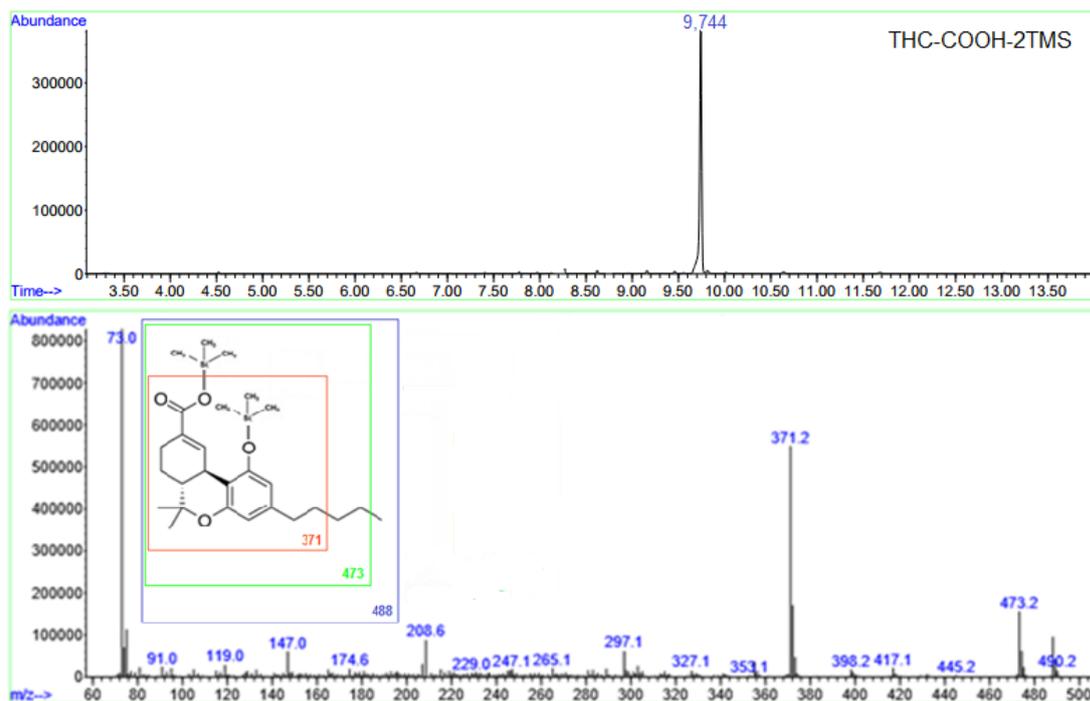


Figura 13. Cromatograma, espectro de massas e proposta de fragmentação do THC-COOH - 2TMS.

A pequena diferença de massa existente entre o padrão interno (d_3 -THC-COOH) e o THC-COOH não permite que essas substâncias sejam separadas com a coluna cromatográfica utilizada, de forma que há coeluição destes analitos. Como forma de separar estas substâncias, obteve-se o cromatograma por extração dos fragmentos 371 (THC-COOH) e 374 (d_3 -THC-COOH). A figura 14 apresenta o cromatograma e o espectro de massas do d_3 -THC-COOH - 2TMS.

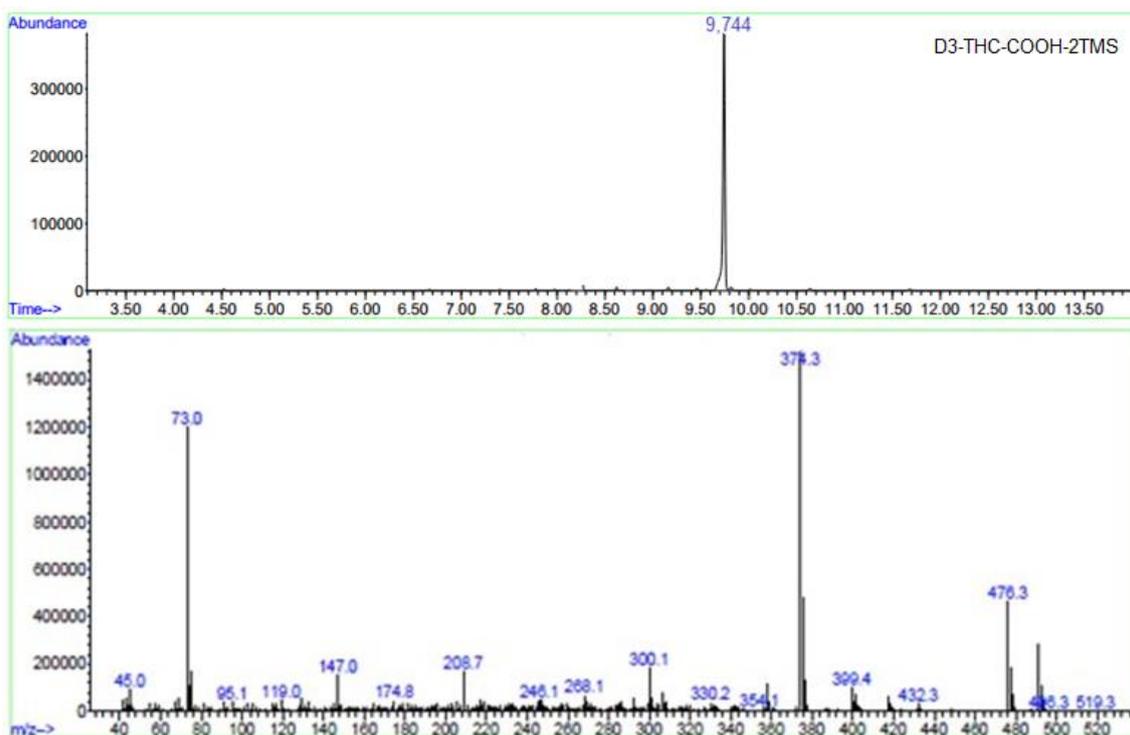


Figura 14. Cromatograma e espectro de massas do padrão de d_3 -THC-COOH-2TMS.

O d_3 -THC-COOH foi utilizado como padrão interno para controle de injeção, tendo sido adicionado às amostras após o processo extrativo, antes da derivatização.

5.3 Análises em amostras de fluido oral

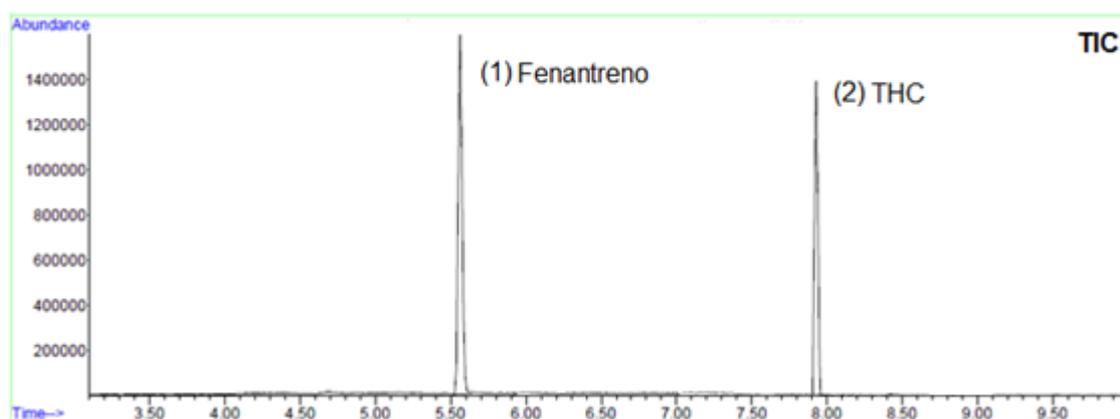
As amostras de FO foram analisadas por CG/EM, com o detector de massas configurado para operar no modo *fullscan* e SIM, simultaneamente. A identificação das substâncias foi realizada a partir dos picos cromatográficos obtidos por extração dos fragmentos 178 (PI) e 299 (THC), cujo espectro foi comparado com a biblioteca de espectros da NIST. A Tabela 8 apresenta os fragmentos monitorados na análise de THC em FO (os íons quantificadores estão em destaque), bem como os tempos de retenção obtidos para o fenantreno (PI) e para o THC.

Tabela 8. Fragmentos e tempo de retenção dos analitos pesquisados em FO.

Composto	m/z	Tempo de retenção (min)
Fenantreno (PI)	152, 176, 178	5,678
THC	231, 271, 299, 314	7,954

A utilização do fenantreno como padrão interno baseou-se em trabalhos realizados pelo grupo de pesquisa e se deve a sua semelhança estrutural com o THC que, por ser uma substância exógena, exclui a possibilidade de interferência com outras substâncias presentes na matriz.

A Figura 15 demonstra o cromatograma do fenantreno na concentração de 0,5 µg/mL e do THC 2 µg/mL em hexano.

**Figura 15.** Cromatograma de íons totais (1) Fenantreno e (2) THC por CG/EM.

Na Figura 16 são apresentadas as propostas de fragmentação para o fenantreno e para o THC, juntamente com seus espectros de massas no modo SIM, em (1) e (2), respectivamente.

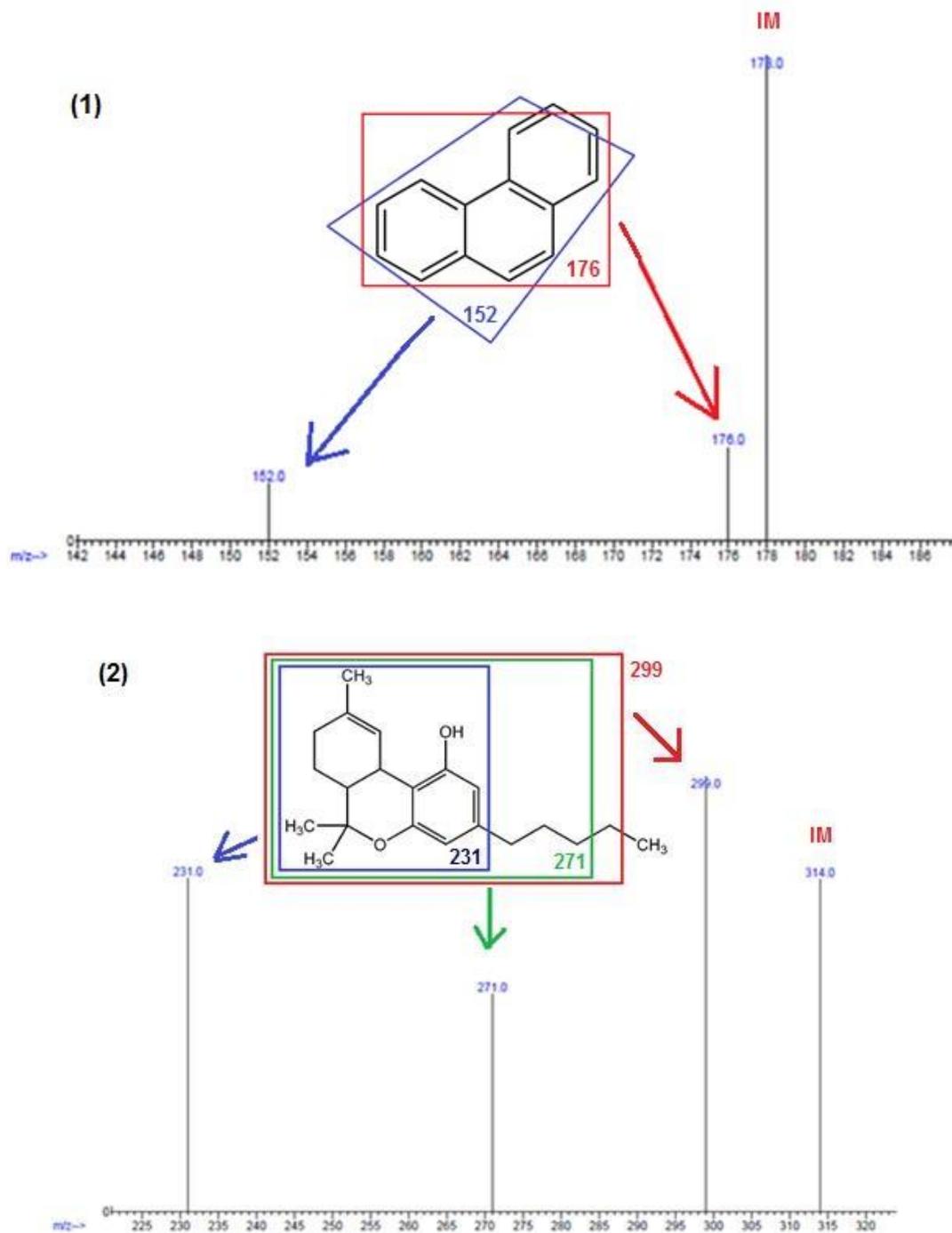


Figura 16. Estrutura e espectro de massas no modo SIM do Fenantreno (1) e do THC (2), juntamente com o modelo de fragmentação proposto para as moléculas.

A seletividade do método foi testada frente a fármacos de carácter neutro a ácido, que pudessem ser extraídos da matriz juntamente com o THC (MOFFAT,

2011). A Tabela 9 relaciona os analitos testados, seus tempos de retenção e os principais fragmentos dos seus espectros de massas, mostrando que não há interferência destas substâncias nas análises de THC e do PI.

Tabela 9. Seletividade do método cromatográfico.

ANALITOS	FRAGMENTOS	Tempo de retenção (min)
Ibuprofeno	91 / 119 / 161 / 206	4,779
Paracetamol	109 / 135 / 151	5,123
Fenantreno	152 / 158 / 178*	5,550
Cafeína	109 / 165 / 194	5,737
Fenobarbital	117 / 161 / 204 / 232	6,201
Carbamazepina	165 / 177/ 193 / 236	7,432
Fenitoína	104 / 180 / 223 / 252	7,454
THC	231 / 299* / 314	7,855

*fragmentos quantificadores.

O limite de detecção do método cromatográfico utilizado para a análise de THC foi de 50 ng/mL, entretanto o limite de detecção após extração do FO fortificado com THC conforme protocolo de extração adotado foi de 200 ng/mL. Considerando-se o *cut-off* recomendado pela guia de Walsh de 2 ng/mL e o esgotamento do prazo de conclusão deste trabalho, decidiu-se não realizar a validação do método em concentrações superiores às emanadas pelas guias internacionais, visto que o mesmo não atenderia aos requisitos de limite de detecção e o gasto de materiais (principalmente de padrão analítico de THC). Entretanto, este grupo já está trabalhando na detecção de THC em FO utilizando SPME como técnica de preparo de amostra. Cabe salientar a possibilidade de se trabalhar dentro de faixa de concentração divergente das especificadas na literatura, desde que se conheça as limitações do método utilizado, bem como suas implicações.

Considerando-se a baixa concentração de THC no FO, assim como nos demais fluidos biológicos, e o limite de detecção do método empregado, percebe-se a necessidade de adequação do método para que este possa ser empregado no monitoramento do uso de canábis no trânsito. Aparentemente, uma concentração plasmática de 7 a 10 ng/mL de THC representa os mesmos riscos no trânsito que

àqueles observados em indivíduos com concentração de etanol no sangue de 5 dg/L (WOLF, 2013), sendo fundamental que os métodos analíticos utilizados sejam capazes de detectar essa faixa de concentração.

Sendo assim, como alternativas de melhorar a sensibilidade do método e atingir os limites adequados para o monitoramento do consumo recente de canábis pelos condutores de veículos, têm-se os recursos das técnicas de pré-concentração de amostra, através de SPE ou SPME e a utilização de técnicas analíticas mais sensíveis, como cromatografia acoplada a detectores EM/EM (triplo quadrupolo). O pequeno volume de FO disponível dificulta a utilização de volumes maiores de amostra para redução do LD, entretanto, pode ser uma alternativa viável quando se utiliza métodos multianalíticos (UNODC, 2014).

De acordo com estudo realizado por Swortwood e colaboradores (2016) as concentrações máximas de THC em fluido oral após 10 minutos de consumo da droga pela via inalatória variam de 141 a 8503 ng/mL para usuários frequentes e de 81,4 a 5914 ng/mL para usuários ocasionais, com concentração média de 2789 ng/mL e 837 ng/mL, respectivamente (SWORTWOOD, 2016). Frente a estes dados, e considerando-se o limite de detecção para o THC em FO estabelecido pelo método proposto neste trabalho (200 ng/mL), existe a possibilidade de emprego deste na determinação qualitativa de THC em usuários frequentes e ocasionais e em casos de intoxicação aguda, frequentemente relacionados a acidentes de trânsito fatais, associados à detecção de elevadas dosagens de THC, embora a guia de Walsh recomende um *cut-off* de THC em FO de 2 ng/mL (WALSH et al., 2008).

Considerando-se uma rotina de trânsito em que a triagem é realizada *in loco* através de testes de imunoensaio, a metodologia proposta tem aplicabilidade na análise confirmatória qualitativa de THC em FO. Em caso de divergência de resultado entre a triagem e análise confirmatória, deve ser realizada outra etapa de análise (desempate), preferencialmente por metodologia distinta das anteriormente utilizadas (Figura 6). Cabe ressaltar, que diferente da análise em sangue, a detecção de THC em FO está associada ao consumo recente de canábis como resultado da contaminação da cavidade bucal (ANDAS, 2014; SWORTWOOD, 2016), fato que pode ser corroborado pela detecção de canabinóides secundários como Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THCV), CBD e canabigerol (CBG) em FO. É

possível detectar estas substâncias até 26 h após o consumo de maconha, sendo estas potencialmente marcadoras do consumo recente de canábis (1 dia), fornecendo informações importantes do ponto de vista clínico e forense quanto ao uso desta droga (SWORTWOOD, 2016).

Como alternativas economicamente viáveis de emprego deste método, é possível, além de aumentar o volume de amostra utilizado na extração, utilizar o recurso da derivatização para reduzir os limites de detecção e de quantificação do método, embora seja necessário ter maior controle das condições de reação. Tais alterações, potencialmente poderiam viabilizar a análise quantitativa de THC em FO, diminuindo o limite de detecção do método analítico. A partir da definição dos novos limites, seria necessário testar a linearidade em outra faixa de concentração, para que o método quantitativo pudesse ser empregado na rotina laboratorial forense. Estas etapas já estão sendo realizadas pelo nosso grupo de pesquisa.

Este trabalho teve como objetivo desenvolver metodologia para monitorar o consumo de canábis por condutores de veículo automotor, atendendo às recomendações das guias internacionais, como a guia da SOFT (2006) e de WALSH (2008), bem como a legislação brasileira para validação de métodos analíticos, através da RDC N° 899/2003, recentemente substituída pela RDC N° 166/2017. Paralelo a isso, o objetivo foi miniaturizar a ELL para que a aplicação da metodologia fosse compatível com a demanda da rotina laboratorial forense e com a limitação dos recursos disponíveis nas instituições forenses brasileiras.

5.4 Aplicabilidade das diferentes matrizes biológicas no monitoramento do consumo de SPA no trânsito

O sangue é a matriz de escolha no monitoramento do uso de SPA no trânsito (SOFT, 2006; WALSH, 2008), sendo a matriz que melhor se relaciona com o desempenho na direção. Entretanto, as condições de coleta de amostras de sangue *in loco* são de difícil padronização, motivo pelo qual se tem considerado o *screening* em fluido oral (WOLF, 2013). O THC já pode ser detectado no sangue de 3 a 10 minutos após fumado. Entretanto, uma vez que a farmacocinética do THC é não-convencional, o pico de THC no sangue não corresponde ao nível máximo de

prejuízo comportamental. Esse fenômeno é definido como histerese no sentido anti-horário, e significa que os efeitos psicoativos do THC ocorrem após seu pico de concentração (ARMENTANO, 2013). Como consequência, usuários frequentes de canábis mantêm pequenas concentrações de THC em sangue por longos períodos, muito além da duração do efeito da droga (ARMENTANO, 2013).

O interesse na utilização do FO como uma matriz alternativa ao sangue tem crescido devido ao fato de ser de fácil obtenção, à coleta não-invasiva, dificuldade de adulteração, ao baixo custo de coleta e possibilidade de obtenção desta matriz *in loco* ou em curto intervalo de tempo e próximo ao tempo em que se estava dirigindo, além da perspectiva de se realizar teste preliminar *on site*, tendo-se resultados disponíveis para avaliar a sobriedade do condutor (LOGAN, 2013). Apesar de não haver relação confiável entre as concentrações de THC em sangue e em fluido oral (LOGAN, WOLF, 2013), a detecção de THC em FO indica uso recente (BAKER, 2013; ANDAS, 2014; SWORTWOOD, 2016), ao passo que a detecção de THC apenas em sangue pode não indicar uso recente da droga, visto que não há correspondência entre o seu pico de concentração plasmática e os efeitos farmacodinâmicos causados pelo uso desta droga, principalmente para usuários frequentes (WOLF, 2013), não havendo relação direta entre a concentração de THC em sangue e prejuízo da habilidade de dirigir (HARTMAN, 2013).

Considerando a relevância legal de determinar se os indivíduos estão dirigindo sobre a influência de drogas, em especial a canábis, droga mundialmente mais utilizada, é de fundamental importância que o tempo para a coleta de amostra seja o menor possível uma vez que a concentração de THC pode ser subestimada quanto maior seja este intervalo (WOLF, 2013). Neste sentido, a coleta de FO, que pode ser realizada *in loco*, tende a revelar resultados de concentração de THC mais compatíveis com aquelas concentrações no momento do acidente/abordagem policial, permitindo a caracterização do auto de flagrante e retirando os condutores sob efeito de canábis do trânsito, reduzindo assim o risco e a probabilidade de acidentes.

Em contrapartida, nas amostras de urina e cabelo é possível detectar o THC-COOH por períodos maiores, sem, entretanto, haver associação da sua concentração urinária e no cabelo com estado clínico e risco de acidente de trânsito.

Após 4 horas, os metabólitos de THC já aparecem na urina em concentrações suficientes para detecção por imunoensaio, enquanto no cabelo essa janela de detecção varia de 3 dias a meses ou anos (UNODC, 2014). Porém, em ambos os casos, só indicam uso pretérito e não tempo do último uso (WOLF, 2013), motivo pelo qual a utilização destas matrizes para análise toxicológica deve ser realizada de forma complementar a outros indicadores de consumo de droga (LOGAN, 2013). Possivelmente, o acúmulo de THC nos tecidos adiposos e a presença de metabólitos ativos contribuem para a baixa correlação entre os níveis plasmáticos e urinários de canabinoides com a intoxicação por THC. Dessa forma, o cabelo e a urina não são consideradas matrizes de escolha para monitoramento do uso de THC no trânsito (Tabela 10).

Tabela 10. Janela de detecção para drogas em diferentes matrizes biológicas

Matriz	Janela de detecção
Sangue (soro)	Algumas horas a 1-2 dias
Urina	Algumas horas a 3 dias
Fluido Oral	Algumas horas a 1-2 dias (ou mais para drogas básicas)
Suor	Semanas
Cabelo	Meses/anos

Fonte: Adaptado de UNODC, 2014.

Parece não haver consenso entre os cientistas quanto à forma mais adequada para determinar se o condutor está sobre a influência de THC devido a sua farmacocinética não-convencional, onde o pico de THC em sangue não corresponde com o momento de máximo prejuízo das habilidades psicomotoras (HUESTIS, 2007; ARMENTANO, 2013). Nesse sentido, é importante considerar a informação complementar obtida a partir da análise adicional de outra matriz, como de FO, por exemplo, em que a presença de droga inalterada, juntamente com o resultado da análise em sangue, revela consumo recente de THC, indicando que o

indivíduo está sob efeito da droga.

Devido às limitações de cada matriz, no que se refere à canábis é importante considerar a análise de mais de uma matriz, como sangue e FO, uma vez que seus resultados são complementares e podem refletir numa melhor interpretação do estado clínico dos condutores. A presença de altas concentrações de droga inalterada se comparada aos metabólitos e uma alta relação entre a concentração de droga no FO e no sangue são indicativos de que houve consumo recente de canábis.

Alguns autores consideram a possibilidade da detecção de THC em FO dever-se à contaminação da cavidade bucal, decorrente da via de administração da droga (inalatória ou oral), entretanto, de qualquer maneira, a única forma de haver THC no FO é pelo consumo de canábis, seja pela passagem do THC do sangue para o FO ou por contaminação.

Em estudo realizado recentemente foi demonstrado que o monitoramento do consumo de canábis também pode ser realizado pela pesquisa de canabinóides secundários no FO, como THCV, CBD e CBG, marcadores do consumo recente de canábis, restando ainda avaliar a necessidade de analisar mais de uma matriz biológica (SWORTWOOD, 2016).

6. CONCLUSÕES

Os métodos cromatográficos desenvolvidos apresentaram limite de detecção próximo aos *cut-offs* recomendados pela guia de Walsh, e podem ser empregados nos laboratórios forenses mediante pequenas alterações e à validação da metodologia, mesmo apresentando limite de detecção superior àqueles recomendados pela guia de Walsh.

Entretanto, a técnica de preparo de amostras utilizada não se mostrou adequada para este propósito, uma vez que a extração líquido-líquido utilizada não demonstrou repetibilidade na recuperação dos analitos de interesse nas análises realizadas em amostras de sangue e que o limite de detecção foi superior ao desejado nas análises de FO, necessitando de ajustes para demonstrarem-se compatíveis com a aplicação na área forense.

Considerando-se as dificuldades analíticas encontradas nas técnicas de preparo de amostras propostas, apesar de as mesmas terem potencial de aplicabilidade na rotina forense, ainda necessitam de ajustes para tornarem-se compatíveis com esta rotina laboratorial, podendo servir de base para novos testes, de forma que as modificações realizadas propiciem a redução dos limites de detecção e de quantificação em matriz (FO e ST), atendendo assim aos limites preconizados pelas guias internacionais.

Cabe ressaltar que as limitações encontradas devem-se às técnicas de extração e de análise empregadas. Atualmente o mercado dispõe de técnicas extrativas mais eficientes e de equipamentos de maior sensibilidade, que requerem, entretanto, maior investimento por parte dos laboratórios.

Devido à elevada lipofilia do THC e ao seu padrão de distribuição no organismo, decorrente de mecanismos de cinética não-convencionais, o monitoramento mais adequado do consumo de canábis por condutores de veículo automotor parece envolver a análise de ambas as matrizes ST e FO, visto a complementaridade de informações obtidas pela presença de THC nestas matrizes, podendo ainda haver monitoramento da presença de canabinóides secundários no FO, uma vez que estes também são marcadores do consumo recente de canábis.

7. PERSPECTIVAS

Adequar o método de determinação de canabinoides em FO utilizando técnicas pré-analíticas de preparo de amostra, como, por exemplo, a SPME de forma que as recomendações de valores de corte das guias internacionais de qualidade sejam atendidas e aplicá-lo em amostras de FO coletadas junto à Balada Segura, em parceria com o Detran-RS e EPTC

8. REFERÊNCIAS

Andås HT, Krabseth HM, Enger A, Marcussen BN, Haneborg AM, Christophersen AS, Vindenes V, Øiestad EL. Detection time for THC in oral fluid after frequent cannabis smoking. **Therapeutic Drug Monitoring**, v.36, p. 808-814, 2014.

Anzillotti L, Castrignanò E, Strano Rossi S, Chiarotti M. Cannabinoids determination in oral fluid by SPME–GC/MS and UHPLC–MS/MS and its application on suspected drivers. **Science and Justice**, v. 54, p. 421-426, 2014.

Armentano P. Cannabis and psychomotor performance: A rational review of the evidence and Implications for public policy. **Drug Testing and Analysis**, v. 5, p. 52-56, 2012.

Armentano P. Should Per Se Limits be Imposed for Cannabis? Equating Cannabinoid Blood Concentrations with Actual Driver Impairment: Practical Limitations and Concerns. **Humboldt Journal of Social Relations**, v. 35, p. 41-51, 2013.

Asbridge M, Mann R, Cusimano MD, Trayling C, Roerecke M, Tallon JM, Whipp A, Rehm J. Cannabis and traffic collision risk: findings from a case- crossover study of injured drivers presenting to emergency departments. **International Journal of Public Health**, v.59, p. 395-404, 2014.

Ashton CH. Pharmacology and effects of cannabis: a brief review. **British Journal of Psychiatry**, v. 178, p. 101-106, 2001.

Balbino MA. **Estudo do comportamento eletroquímico do Δ^9 - tetraidrocannabinol derivatizado com Fast Blue B**. Tese (Doutorado em Química) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2014.

Bombana HS, Gjerde H, Dos Santos MF, Jamt REG, Yonamine M, Rohlfs WJC, Muñoz DR, Leyton V. Prevalence of drugs in oral fluid from truck drivers in Brazilian highways. **Forensic Science International**, v. 273, p. 140-143, 2017.

Borille BT. Caracterização química da planta Cannabis Sativa L. a partir de sementes apreendidas pela Polícia Federal no Estado do Rio Grande do Sul (tese de doutorado). Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2016.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria nº 344, de 12 de maio de 1998**, Regulamento Técnico sobre substâncias e medicamentos sujeitos a controle especial. Diário Oficial da União em 19 de maio de 1998.

Brasil. **Lei Nº 9.503, de 23 de setembro de 1997**. Institui o Código de Trânsito Brasileiro. Diário Oficial da União, seção 1 de 24/9/1997, p. 21201, 1997.

Brasil. **Lei nº 9.602, de 21 de janeiro de 1998**. Dispõe sobre legislação de trânsito e dá outras providências. Diário Oficial da União, Seção 1, 22/1/1998.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RE nº 899, de 29 de maio de 2003** – Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 2003.

Brasil. **Lei nº 11.705, de 19 de junho de 2008**. Altera a Lei nº 9.503, de 23 de setembro de 1997, que ‘institui o Código de Trânsito Brasileiro’, e a Lei nº 9.294, de 15 de julho de 1996, que dispõe sobre as restrições ao uso e à propaganda de produtos fumíferos, bebidas alcoólicas, medicamentos, terapias e defensivos agrícolas, nos termos do § 4º do art. 220 da Constituição Federal, para inibir o consumo de bebida alcoólica por condutor de veículo automotor, e dá outras providências. Diário Oficial da União - Seção 1 - 20/6/2008.

Brasil. **Lei nº 12.760, de 20 de dezembro de 2012**. Altera a Lei nº 9.503, de 23 de setembro de 1997, que institui o Código de Trânsito Brasileiro. Diário Oficial da União, seção 1 - 21/12/2012.

Brazil, Ministry of Health. Health Surveillance Secretariat. **Health Brazil 2014: a situational analysis of road injuries and other external causes**. Brasília: Ministry of Health of Brazil, 2015. Chapter 6: Road Traffic Injuries – Profile and Trends – Brasil, 2004 – 2013. p. 117-144.

Brubacher JR, Chan H, Martz W, Schreiber W, Asbridge M, Eppler J, Lund A, Macdonald S, Drummer O, Purssell R, Andolfatto G, Mann R, Brant R. Prevalence of alcohol and drug use in injured British Columbia drivers. **BMJ Journal**, v.6, p.1-10, 2016.

Cirimele V, Villain M, Mura P, Bernard M, Kintz P. Oral fluid testing for cannabis: on-site OraLine IV s.a.t. device versus GC/MS. *Forensic Sci Int.* 2006 Sep 12;161(2-3):180-4.

Chiappin S, Antonelli G, Gatti R, De Palo EF. Saliva specimen: A new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. **Clinica Chimica Acta**, v. 383, p. 30-40, 2007.

Chi Chu MH, Drummer OH. Determination of Δ^9 -THC in Whole Blood using Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **Journal of Analytical Toxicology**, v.26, p.575-581, 2002.

Cone EJ, Huestis MA. Interpretation of Oral Fluid Tests for Drugs of Abuse. **New York Academy Science**, v. 1098, p. 51-103, 2007.

de Carvalho HB, Andreuccetti G, Rezende MR, Bernini C, Silva JS, Leyton V, D'Andréa Greve JM. Alcohol and drug involvement in motorcycle driver injuries in the city of Sao Paulo, Brazil: Analysis of crash culpability and other associated factors. **Drug and Alcohol Dependence**, v.162, p. 199-205, 2016.

Downey LA, King R, Papafotiou K, Swann P, Ogden E, Boorman M, Stough C. The effects of cannabis and alcohol on simulated driving: Influences of dose and experience. **Accident Analysis and Prevention**, v.50, p. 879-886, 2013.

Eller SCWS, Flaiban LG, Paranhos BAPB, Costa JL da, Lourenço FR, Yonamine M. Analysis of 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol in urine samples by hollow fiber-liquid phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry in consideration of measurement uncertainty. **Forensic Toxicology**, v. 32, p.282-291, 2014.

Fierro I, González-Luque JC. The relation between observed signs of impairment and THC concentrations in oral fluid. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 144, p. 231-238, 2014.

Ganong, W F. Fisiologia Médica. 17. ed. Rio de Janeiro: Prentice-Hall do Brasil, 1998. pg. 578.

Gjerde H, Langel K, Favretto D, Verstraete AG. Detection of illicit drugs in oral fluid from drivers as biomarker for drugs in blood. **Forensic Science International**, v. 256, p. 42-45, 2015.

Gjerde H, Nordfjærn T, Bretteville-Jensen AL, Edland-Gryt M, Furuhaugen H, Karinen R, Øiestad EL. Comparison of drugs used by nightclub patrons and criminal offenders in Oslo, Norway. **Forensic Science International**, v. 265, p. 1-5, 2016.

Grotenhermen F. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Cannabinoids. **Clinical Pharmacokinetics**, v.42, p. 327-360, 2003.

Guyton AC, Hall JE. Tratado de Fisiologia Médica. 13ª ed., Ed. Elsevier, Rio de Janeiro, RJ. 2015.

Hartman RL, Huestis MA. Cannabis Effects on Driving Skills. **Clinical Chemistry**, v. 59, p. 478-492, 2013.

Huestis MA. Human Cannabinoid Pharmacokinetics. **Chemistry Biodiversity**, v. 4, n. 8, p. 1770-1804, 2007.

Huestis MA. Cannabis-impaired driving: a public health and safety concern. **Clin Chem.**, v. 61, n. 10, p. 1223-5.

Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent*, 2001, Feb; v. 85 (2); p. 162-9.

Karchner EL, Barnes AJ, Lowe RH, Scheidweiler KB, Huestis MA. Validation of a two-dimensional gas chromatography mass spectrometry method for the simultaneous quantification of cannabidiol, Δ^9 - tetrahydrocannabinol (THC), 11-hydroxy-THC, and 11-nor-9-carboxy-THC in plasma. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.397, p. 603-611, 2010.

Kelley-Baker T, Moore C, Lacey JH, Yao J. Comparing drug detection in oral fluid and blood: data from a national sample of nighttime drivers. **Traffic Injury Prevention**, 2013; v. 15, n. 2; p. 111-8.

Kuypers KPC, Legrand A-A, Ramaekers JG, Verstraete AG. A Case-Control Study Estimating Accident Risk for Alcohol, Medicines and Illegal Drugs. **Plos One**, v.7, n. 8, p. e43496, 2012.

Lanças FM. **Cromatografia Líquida Moderna: HPLC / CLAE**. 2. ed. Campinas: Átomo, 2016.

Lee D, Schwoppe DM, Milman G, Barnes AJ, Gorelick DA, Huestis MA. Cannabinoid disposition in oral fluid after controlled smoked cannabis. **Clin Chem**. 2012 Apr;58(4):748-56.

Leyton V, Sinagawa DM, Oliveira KC, Schmitz W, Andreuccetti G, De Martinis BS, Yonamine M, Munoz DR. Amphetamine, cocaine and cannabinoids use among truck drivers on the roads in the State of São Paulo, Brazil. **Forensic Science International**, v. 215, p. 25-27, 2012.

Logan BK, Lowrie KJ, Turri JL, Yeakel JK, Limoges JF, Miles AK, Scarneo CE, Kerrigan S, Farrell LJ. Recommendations for toxicological investigation of drug-

impaired driving and motor vehicle fatalities. **Journal of Analytical Toxicology**, p.1-8, 2013.

Mariotti Kde C, Ortiz RS, Souza DZ, Mileski TC, Fröhlich PE, Limberger RP. Trends in counterfeit amphetamine-type stimulants after its prohibition in Brazil. **Forensic Science International**, v. 229, p. 23-26, 2013.

Maurer HH, Sauer C, Theobald DS. Toxicokinetics of drugs of abuse: current knowledge of the isoenzymes involved in the human metabolism of tetrahydrocannabinol, cocaine, heroin, morphine, and codeine. **Therapeutic Drug Monitoring**, v.28, p. 447-453, 2006.

Moeller MR, Kraemer T. Drugs of abuse monitoring in blood for control of driving under the influence of drug. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 24, p. 210-221, 2002.

Moffat AC, Osselton MD, Widdop B. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons. Pharmaceutical Press, Fourth Edition. London, 2011.

Molnar A, Lewis J, Fu S. Recovery of spiked Δ^9 -tetrahydrocannabinol in oral fluid from polypropylene containers. **Forensic Science International**, v. 227, p. 69-73, 2013.

Moore C, Rana S, Coulter C. Simultaneous identification of 2-carboxy-tetrahydrocannabinol, tetrahydrocannabinol, cannabinol and cannabidiol in oral fluid. **Journal of Chromatography B**, v. 852, pg. 459-464, 2007.

Moreau, RLM. *In*: OGA, S., CAMARGO, M.Maria de A.; BATISTUZZO, José Antonio de O. **Fundamentos de Toxicologia**. 4. ed. Editora Atheneu: São Paulo, 2014.

Nadulski T, Sporkert F, Schnelle M, Stadelmann AM, Roser P, Scheffer T, Pragst F. Simultaneous and sensitive analysis of THC, 11-OH-THC, THC-COOH, CBD, and CBN by GC-MS in plasma after oral application of small doses of THC and Cannabis extract. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 29, p. 783-789, 2005.

Nelson DL. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, p. 1274, 2011.

Newmeyer MN, Swortwood MJ, Abulseoud OA, Huestis MA. Subjective and physiological effects, and expired carbon monoxide concentrations in frequent and occasional cannabis smokers following smoked, vaporized, and oral cannabis administration. **Drug Alcohol Depend**. 2017 Jun 1;175:67-76.

NIDA. **National Institute on Drug Abuse.** Disponível em: <<http://www.drugabuse.gov/publications/drugfacts/marijuana#mjextracts>>. Acesso em: 02 fev. 2016.

Passagli, M; Marinho, PA. Drogas Depressoras do Sistema Nervoso Central. In: PASSAGLI, M. **Toxicologia Forense: Teoria e Prática.** Editora: Millennium, 3ª edição. Campinas, São Paulo, 2013.

Pelição FS, Peres MD, Pissinate JF, de Paula DM, de Faria Md, Nakamura-Palacios EM, De Martinis BS. Predominance of alcohol and illicit drugs among traffic accidents fatalities in an urban area of Brazil. **Traffic Inj Prev.** 2016 Oct 2;17(7):663-7.

Purschke K, Heini S, Lerch O, Erdmann F, Veit F. Development and validation of an automated liquid-liquid extraction GC/MS method for the determination of THC, 11-OH-THC, and free THC- carboxylic acid (THC-COOH) from blood serum. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, p. 4379-4388, 2016.

Radwan MM, Elsohly MA, El-Alfy AT, Ahmed SA, Slade D, Husni AS, Manly SP, Wilson L, Seale S, Cutler SJ, Ross SA. Isolation and Pharmacological Evaluation of Minor Cannabinoids from High-Potency *Cannabis sativa*. **Journal of Natural Products**, v. 78, p. 1271-1276, 2015.

Rang HP, Dale MM, Ritter LM, Flower RJ, Henderson G. **RANG & DALE'S PHARMACOLOGY.** Elsevier Ltd, 8ed., cap. 19, 2016.

Reis AD, Figlie NB, Laranjeira R. Prevalência do uso de substâncias em pacientes com traumas em um pronto socorro brasileiro. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v.28, n.3, p.191-195, 2006.

Senna MC, Augsburger M, Aebi B, Briellmann TA, Donzé N, Dubugnon JL, Iten PX, Staub C, Sturm W, Sutter K. First nationwide study on driving under the influence of drugs in Switzerland. **Forensic Science International**, v. 198, p. 11-16, 2010.

Schwoppe DM, Bosker WM, Ramaekers JG, Gorelick DA, Huestis MA. Psychomotor Performance, Subjective and Physiological Effects and Whole Blood Δ^9 -Tetrahydrocannabinol Concentrations in Heavy, Chronic Cannabis Smokers Following Acute Smoked Cannabis. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 36, p. 405-412, 2012.

SOFT/AAFS. **Forensic toxicology laboratory guidelines.** Disponível em: <http://www.soft-tox.org/>. Acessado em: 04. Ago, 2017.

Staub C. Chromatographic procedures for determination of cannabinoids in biological samples, with special attention to blood and alternative matrices like hair, saliva, sweat and meconium. **Journal of Chromatography B**, v. 733, p. 119-126, 1999.

Steinmeyer S, Bregel D, Warth S, Kraemer T, Moeller MR. Improved and validated method for the determination of D- tetrahydrocannabinol (THC), 11-hydroxy-THC and 11-nor-9-carboxy-THC in serum, and in human liver microsomal preparations using gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 772, p. 239-248, 2002.

Swortwood MJ, Newmeyer MN, Andersson M, Abulseoud OA, Scheidweiler KB, Huestis MA. Cannabinoid disposition in oral fluid after controlled smoked, vaporized, and oral cannabis administration. **Drug Testing and Analysis**, 2016.

Teske J, Putzbach K, Engewald W, Müller RK. Determination of cannabinoids by gas chromatography–mass spectrometry and large-volume programmed-temperature vaporizer injection using 25 ml of biological fluid. **Journal of Chromatography B**, v. 772, p. 299-306, 2002.

Thomas A, Widmer C, Hopfgartner G, Staub C. Fast gas chromatography and negative-ion chemical ionization tandem mass spectrometry for forensic analysis of cannabinoids in whole blood. **Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 45, p. 495-503, 2007.

UNODC. United Nations Office on Drugs and Crime. **Recommended Methods for the Identification and Analysis of Cannabis and Cannabis Products**. MANUAL FOR USE BY NATIONAL DRUG ANALYSIS LABORATORIES. Nova York: United Nations Publication, Sales No. E.09.XI.15, 2009.

UNODC. United Nations Office on Drugs and Crime. **Testing Drugs under International Control in Hair, Sweat and Oral Fluid**. Nova York: United Nations Publication, 2014.

UNODC. United Nations Office on Drugs and Crime. **World Drug Report 2016**. Nova York: **United Nations Publication**, 2016.

Vindenes V, Lund HM, Andresen W, Gjerde H, Ikdahl SE, Christophersen AS, Øiestad EL. Detection of drugs of abuse in simultaneously collected oral fluid, urine and blood from Norwegian drug drivers. **Forensic Science International**, v. 2019, p. 165-171, 2012.

Walsh JM, Verstraete AG, Huestis, MA, Morland J. Guidelines for research on drugged driving. **Addiction**, 2008 Aug; v. 103 (8); p. 1258-1268.

Wolff K, Brimblecombe, R, Forfar JC, Forrest AR, Gilvarry E, Johnston a, Morgan J, Osselton MD, Read L, Taylor D. Driving under the influence of drugs. **Department for Transport Great Minster House**. London, 2013.

Wolff K, Johnston A. Cannabis use: a perspective inrelation to the proposed UK drug-driving legislation. **Drug Testing and Analysis**, v. 6, p. 143-154, 2014.

Zancanaro I, Limberger RP, Bohel PO, dos Santos MK, De Boni RB, Pechansky F, Caldas ED. Prescription and illicit psychoactive drugs in oral fluid – LC- MS/MS method development and analysis of samples from Brazilian drivers. **Forensic Science International**, v. 2019, p. 165-171, 2012.