

QUANTIFICAÇÃO DE Δ 9-THC, 11-OH-THC E THCCOOH POR SPE E GC-MS-MS EM SANGUE TOTAL

André Castro¹, Sónia Tarelho¹, Maria José Quintas¹, Pedro Costa¹, Paula Melo¹, João Miguel Franco¹, Mário João Dias²

(1) Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P. - Serviço de Química e Toxicologia Forenses

(2) Diretor da Delegação do Sul e Membro do Conselho Diretivo do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.

INTRODUÇÃO

Os componentes obtidos a partir da planta *Cannabis sativa* (figura 1) continuam a ser o conjunto de substâncias ilícitas com maior prevalência de consumo a nível mundial. O seu abuso representa um problema importante de saúde pública, não só devido aos seus efeitos físicos e psicológicos no indivíduo consumidor, mas também em termos de incapacidade de ação, nomeadamente na capacidade de condução. O seu metabolismo é complexo, devido à grande quantidade de compostos presentes na planta, sendo dependente, entre outros fatores, da via de administração e da dose consumida. A substância mais ativa, em termos de ação psicoativa, é o Δ 9-tetrahydrocannabinol (Δ 9-THC) (figura 2). O seu metabolismo conduz à produção de um metabolito ativo denominado 11-hidroxi- Δ 9-tetrahydrocannabinol (11-OH-THC) (figura 3), e um metabolito inativo denominado 11-nor-9-carboxy- Δ 9-tetrahydrocannabinol (THCCOOH) (Figura 4).

Contrastando o seu consumo ilícito, é importante salientar, em paralelo, a sua utilização em protocolos experimentais associados à terapêutica da dor em doentes terminais em tratamento paliativo.

A deteção e quantificação precisas e fiáveis a níveis de concentração baixos, nomeadamente no que ao Δ 9-THC e 11-OH-THC diz respeito, são fundamentais na capacidade de resposta de um laboratório de toxicologia forense. O objetivo deste trabalho inclui a validação analítica de um procedimento de deteção e quantificação de Δ 9-THC, 11-OH-THC e THCCOOH em amostras de sangue total, in vivo e post-mortem, com fins forenses, bem como a avaliação da prevalência de casos positivos após a implementação da técnica descrita a casos reais.



Figura 1. Folha de *Cannabis sativa*

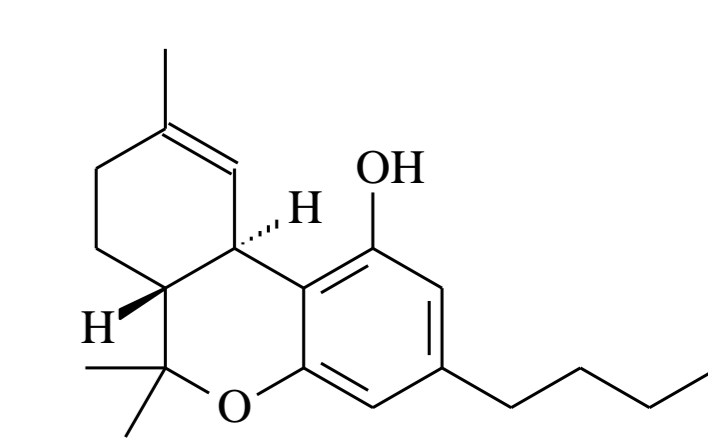


Figura 2. Δ 9-THC

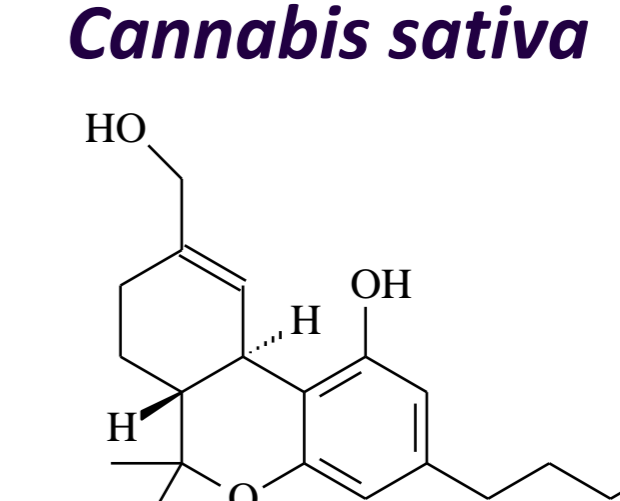


Figura 3. 11-OH-THC

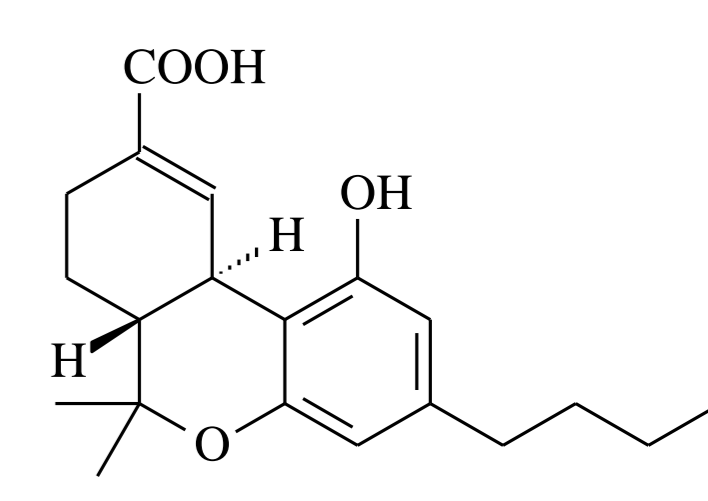


Figura 4. THCCOOH

MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia desenvolvida incluiu um procedimento de extração em fase sólida (SPE) e uma metodologia analítica hifenada em tandem (GC-MS-MS).

O procedimento SPE (Figura 5) utiliza cartuchos de extração HLB[®] da WATERS[™], e a metodologia analítica utiliza um cromatógrafo gasoso GC-450 acoplado a um detetor de massa do tipo triplo quadrupolo MS-300 da BRUKER Daltonics (Tabela 1).

TABELA 1. Parâmetros de aquisição do detetor de massas. Ião de quantificação sublinhado.

Composto	Ião-precursor (m/z)	Iões Produto (m/z)	Energia de colisão	Tempo de retenção (min)
THC	371	<u>289</u> , 305	16 V	4,74
THC-d ₃ (IS)	374	<u>292</u>	16 V	4,72
11-OH-THC	371	<u>289</u> , 305	16 V	5,63
11-OH-THC-d ₃ (IS)	374	<u>292</u>	16 V	5,61
THCCOOH	371	<u>289</u> , 305	16 V	6,35
THCCOOH-d ₃ (IS)	374	<u>292</u>	16 V	6,33

A validação analítica do método foi efetuada segundo os critérios e parâmetros de validação estabelecidos pelo SQTf para aceitação e implementação de metodologias analíticas à bateria de testes aplicáveis a amostras recebidas no SQTf-N.

Alguns dos parâmetros de validação estudados estão representados na Tabela 2.

TABELA 2. Valores de alguns parâmetros de validação.

Composto	LOD ng/mL	LOQ ng/mL	Gama de trabalho ng/mL	Recuperação (%)	Limite Repetibilidade
THC	1	1	1 – 100	80	30,3
11-OH-THC	1	1	1 – 100	80	19,1
THCCOOH	1	1	1 – 100	72	31,0

RESULTADOS

A capacidade de deteção, de identificação e de quantificação, quando aplicável, de um composto, ou grupo de compostos, são características fundamentais para a aplicabilidade de um método analítico ao fim em causa.

As figuras 6 e 7 apresentam as representações gráficas dos cromatogramas, em modo SIM-SIM, representativos dos sinais analíticos de aquisição por parte do detetor de massas. São apresentadas uma amostra branca e uma amostra fortificada com 1 ng/mL dos três compostos.

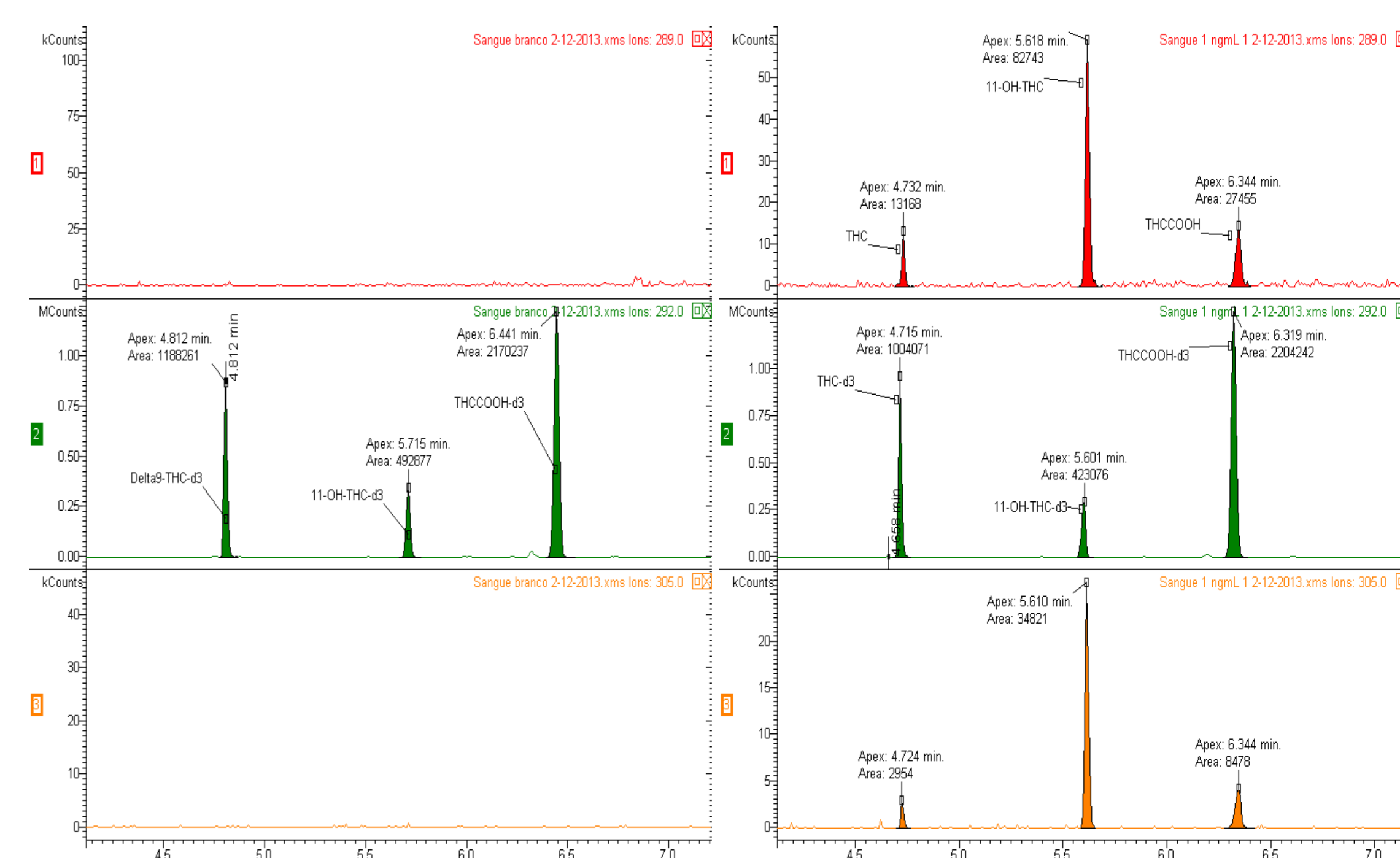


Figura 6. Amostra branca de sangue total.

Figura 7. Amostra branca fortificada com 1 ng/mL de cada composto.

DISCUSSÃO

As capacidades analíticas demonstradas pelo método permitiram a sua aplicação a amostras reais. As amostras analisadas tiveram origem em indivíduos vivos, provenientes da Clínica Forense (CF) e de ações de fiscalização do Código da Estrada por parte das autoridades policiais (AR), e em casos post-mortem, provenientes do Serviço de Patologia Forense da Circunscrição Médico-Legal do Norte (PF). Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 3 e nos gráficos 1 a 4, com a representação do número de casos positivos para os três compostos em termos absolutos e percentuais, com amostras recebidas e processadas entre Janeiro de 2013 (momento em que se implementou a técnica descrita à rotina laboratorial) e Setembro de 2014. A comparação com resultados obtidos através do método anteriormente em vigor é também avaliada, bem como o Z-score de participação em ensaios interlaboratoriais.

TABELA 3. Casos positivos por composto e por tipo de caso.

2011-2012	AR (n=52)	CF (n=12)	PF (n=22)	2013-2014	AR (n=74)	CF (n=9)	PF (n=35)	Positivos em % de casos	2011-2012	2013-2014
THC	0	1	5	THC	13	3	25	THC	7,0	34,7
11-OH-THC	6	2	9	11-OH-THC	24	3	17	11-OH-THC	19,8	37,3
THCCOOH	52	12	22	THCCOOH	74	9	35	THCCOOH	100,0	100,0

Gráfico 1. Amostras de ações de fiscalização rodoviária

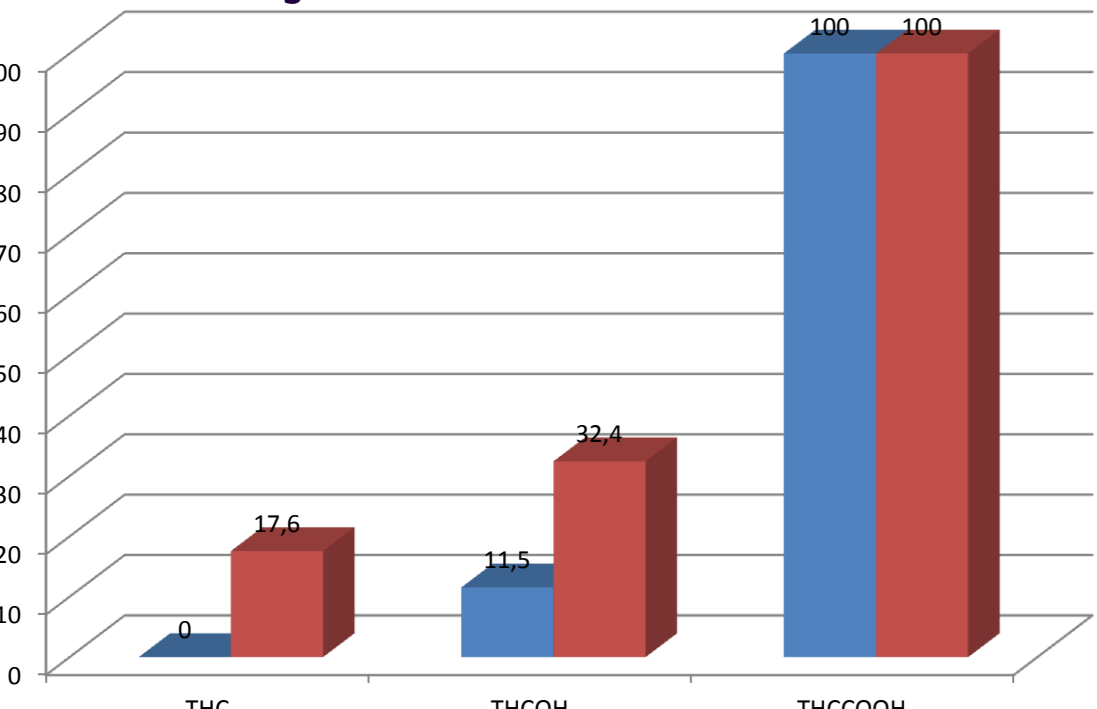


Gráfico 2. Amostras de casos de Clínica Forense

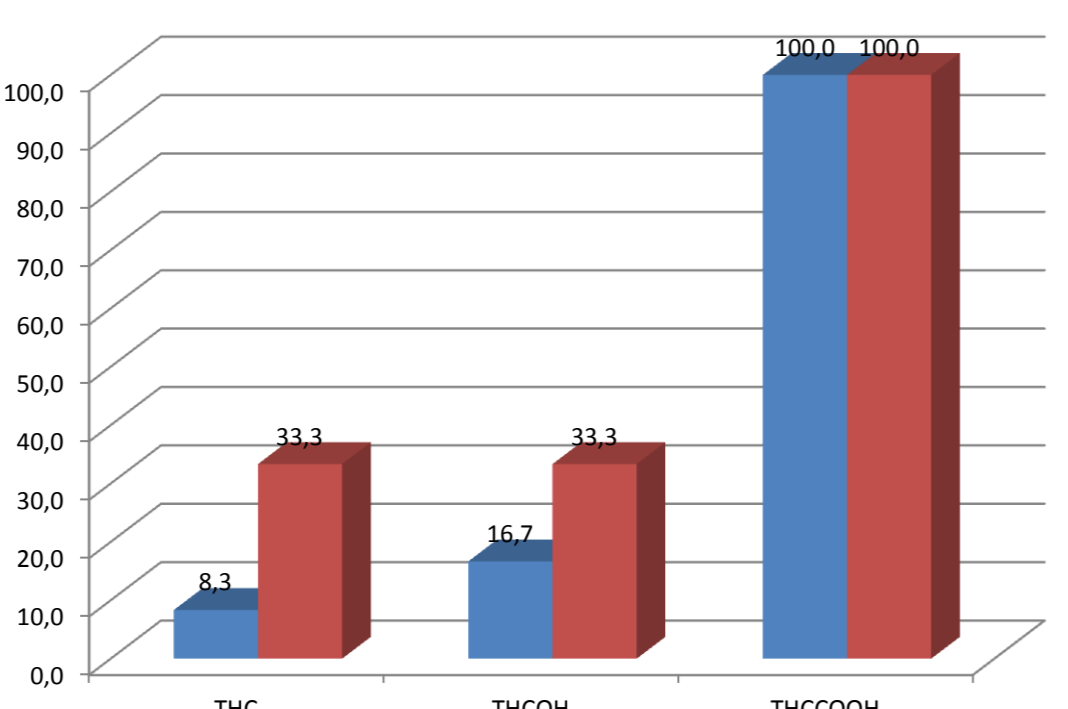


Gráfico 3. Amostras de casos de Patologia Forense

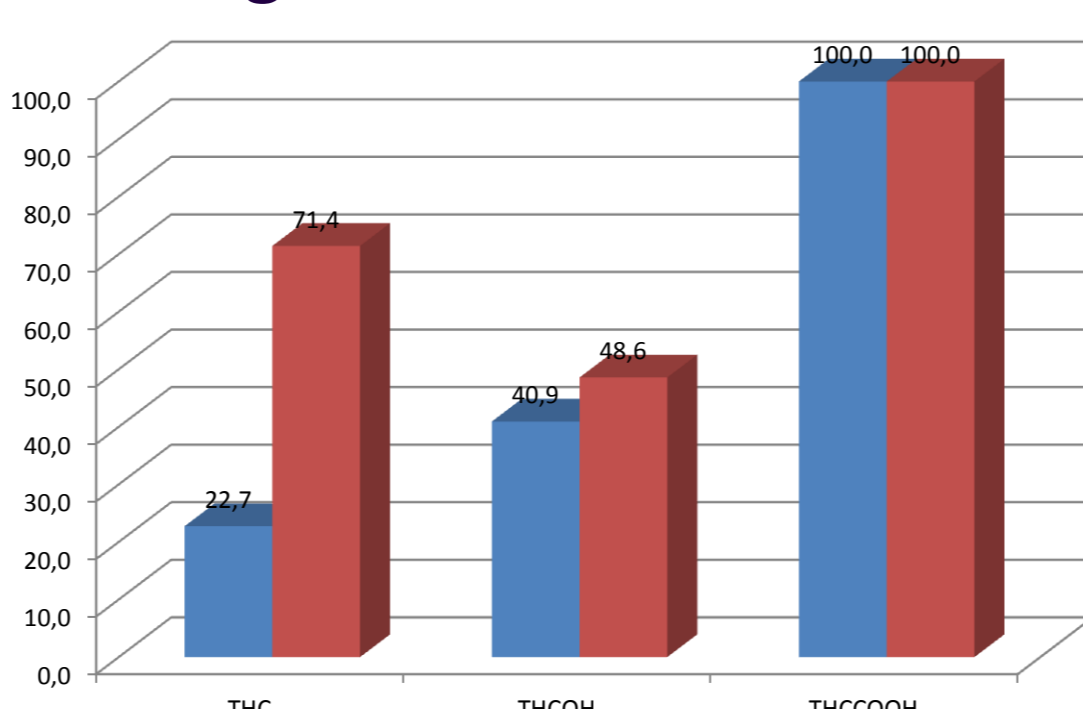
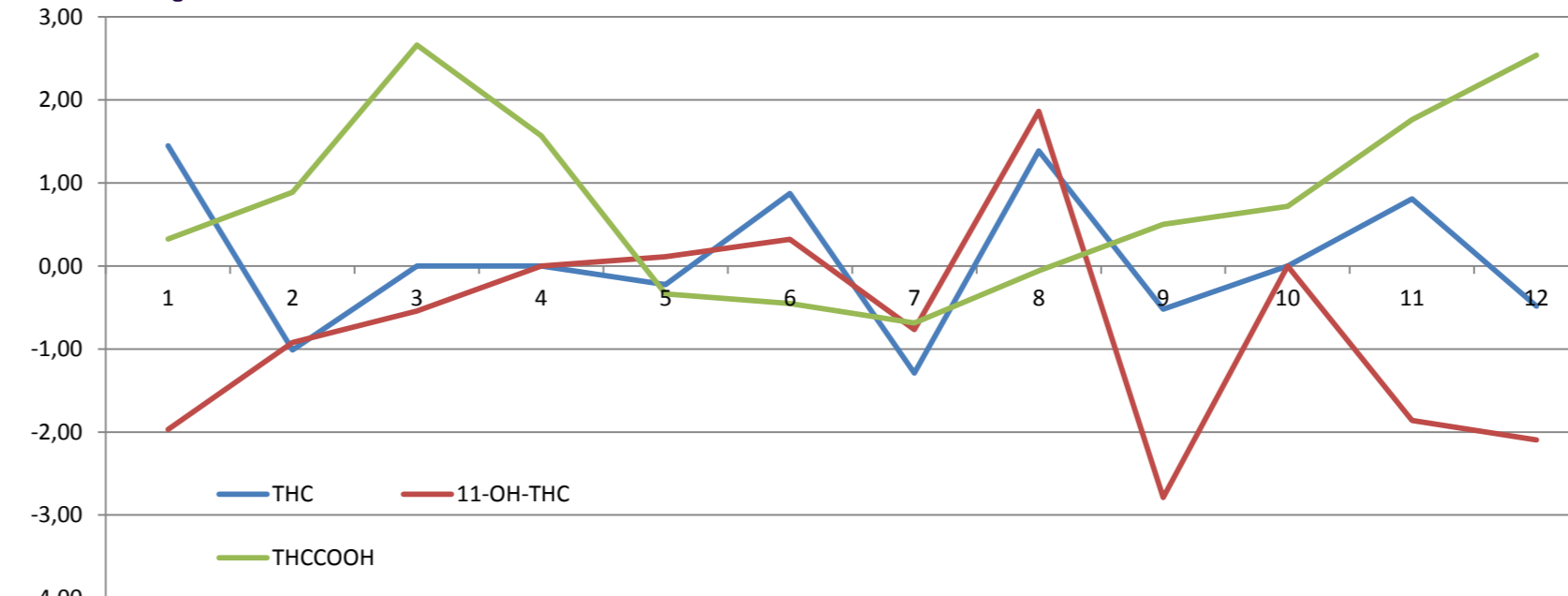


Gráfico 4. Comportamento do método para os três compostos-alvo em ensaios interlaboratoriais.



Avaliando os quadros apresentados, é notório o aumento de casos positivos para o THC e o 11-OH-THC. Considerando que o número de casos foi aproximado nos dois períodos de tempo estudados, podemos inferir que esta diferença se deverá ao método.

Esta diferença é notória nestes dois compostos já que ambos apresentam-se nas amostras em concentrações invariavelmente muito baixas. Consequentemente, a capacidade de deteção do método fica comprovadamente melhorada. Assim, a aplicação desta metodologia apresenta-se como uma alternativa válida à U(H)PLC-MS-MS, permitindo uma deteção eficaz dos compostos numa gama de concentrações com interesse médico-legal reforçada.

(1) Simões S.S., Ajenjo A.C., Dias M.J.; Qualitative and quantitative analysis of THC, 11-hydroxy-THC and 11-nor-9-carboxy-THC in whole blood by ultra-performance liquid chromatography /tandem mass spectrometry; *Rapid Communications in Mass Spectrometry*; 2011; 25; 2603-2610.