UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA
ÁREA DE ANÁLISES TOXICOLÓGICAS

**IDENTIFICAÇÃO DE USUÁRIOS DE *Cannabis* POR
CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA
DE ALTA EFICIÊNCIA**

ELIANI SPINELLI

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Ovandir Alves Silva

São Paulo
1994

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Spinelli, Eliani

S757i Identificação de usuários de *Cannabis* por cromatografia em camada
delgada de alta eficiência / Eliani Spinelli.--São Paulo, 1994.
111p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e
Toxicológicas.

Orientador: Silva, Ovandir Alves

1. *Cannabis*: Análise: Toxicologia 2. Cromatografia em camada
delgada de alta eficiência: Análise toxicológica I. T. II. Silva, Ovandir
Alves, orientador

615.9523962 CDD

ELIANI SPINELLI

**IDENTIFICAÇÃO DE USUÁRIOS DE *Cannabis* POR
CROMATOGRRAFIA EM CAMADA DELGADA
DE ALTA EFICIÊNCIA**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Prof. Dr. Ovandir Alves Silva

PRESIDENTE E ORIENTADOR

Prof. Dr. Daniel Romero Munoz

2º EXAMINADOR

Prof. Assoc. Luiz Marques de Sá

3º EXAMINADOR

São Paulo, 25 de novembro de 1994.

A DEUS

pela presença constante e pela paternidade expressa na correção, no socorro e nas oportunidades abertas.

A

minha família

pelo que cada um contribuiu
com alegria, amor e enúncia.

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Ovandir Alves Silva
pela orientação sempre presente.
- A Moema dos Santos
pela normatização das
referências bibliográficas.
- A Prof. Maricê Nogueira de Oliveira
e Auriluce Missiano de Oliveira
pela assessoria técnica junto aos
computadores
- Ao Prof. Mário Polite
pela revisão quanto aos aspectos
teóricos da polarização da
fluorescência
- A Prof. Rosemary C. Pedroso
pelo incentivo e pela ajuda na
tradução dos textos em alemão.
- A Cristina, Janaina e Andréa,
colegas da pós-graduação,
pela ajuda imprescindível.
- Ao Prof. Luiz Marques de Sá
pela sugestão do tema deste
trabalho

ERRATA

1. Página 60 - não houve inclusão da amostra 9B na tabela 12, cujo resultado é: não detectado (ND). À amostra 10 corresponde o resultado positivo (+).
2. Página 64 - não houve inclusão da amostra 9B na tabela 15, cujo resultado é negativo.
3. Página 71 - na tabela 20, onde se lê canabinóides , leia-se THCCOOH.

RESUMO

A análise de fluidos biológicos para detecção de usuários de Cannabis não é rotina em nossos serviços de toxicologia forense pela falta de um método aplicável às condições de trabalho desses laboratórios. Neste trabalho foi estudado um método que utiliza a cromatografia de camada delgada de alta eficiência (CCDAE) como técnica de identificação. Cinco mililitros de urina são submetidos à hidrólise alcalina e à extração líquido/líquido, com posterior aplicação do resíduo obtido na cromatoplaça. O limite de detecção em estudo realizado com adicionados foi de 5ng/ml. Urina de usuários de Cannabis quando submetidas a esta metodologia apresentaram resultado semelhante ao do padrão de THCCOOH, principal produto de biotransformação do THC. As amostras utilizadas como branco de referência não apresentaram mancha semelhante. Na análise das amostras de usuários por imunoensaio de fluorescência polarizada ("cutoff" 50ng/ml) obteve-se resultado negativo para usuários moderados e ocasionais. Com auxílio de curva-padrão observou-se que a concentração provável de canabinóides nessas amostras estaria entre 20–50ng/ml. No estudo comparativo dos resultados obtidos nas duas técnicas, foi verificada uma correspondência de 100% para as amostras de usuários com padrão de uso intenso. Nos usuários moderados e ocasionais não foi observada boa correspondência entre os resultados.

SUMÁRIO

	pág.
1. INTRODUÇÃO	01
2. GENERALIDADES	06
2.1 ASPECTOS TOXICOLÓGICOS	06
2.1.1 EFEITOS TÓXICOS A CURTO PRAZO	06
2.1.2 EFEITOS TÓXICOS A LONGO PRAZO	09
2.1.3 TOXICOCINÉTICA	11
2.1.3.1 PERFIL PLASMÁTICO DO Δ^9 -THC E SEUS PRINCIPAIS PRODUTOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO	11
2.1.3.2 EXCREÇÃO URINÁRIA	16
2.2 ASPECTOS ANALÍTICOS	20
2.2.1 QUANTO ÀS AMOSTRAS	20
2.2.2 QUANTO À ESTABILIDADE DE CANABINÓIDES	21
2.2.3 QUANTO À SEPARAÇÃO E EXTRAÇÃO DO THCCOOH DA URINA	23
2.2.4 IDENTIFICAÇÃO DO THCCOOH POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA	26
2.2.4.1 INFLUÊNCIA DA FASE ESTACIONÁRIA	27
2.2.4.2 INFLUÊNCIA DA FASE MÓVEL	28
2.2.4.3 ESTUDO DA DETECÇÃO DO THCCOOH	29
2.2.4.4 INTERFERENTES	32
2.2.5 IDENTIFICAÇÃO POR TÉCNICAS IMUNOLÓGICAS	33
2.2.6 IMUNOENSAIO DE FLUORESCÊNCIA POLARIZADA	41
2.2.7 OUTRAS TÉCNICAS ANALÍTICAS UTILIZADAS NA ANÁLISE DE CANABINÓIDES EM FLUIDOS BIOLÓGICOS	47

3. OBJETIVO E PLANO DE TRABALHO	50
4. MATERIAL E MÉTODOS	51
4.1 MATERIAL	51
4.1.1 EQUIPAMENTOS	51
4.1.2 REAGENTES PARA IMUNOENSAIO	51
4.1.3 SOLVENTES, SOLUÇÕES E AGENTE CROMOGÊNICO	51
4.1.4 CROMATOPLAÇAS DE CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DE DE ALTA EFICIÊNCIA	51
4.1.5 NITROGÊNIO	51
4.1.6 SOLUÇÕES-PADRÃO	51
4.1.7 AMOSTRAS	52
4.2 MÉTODOS	53
4.2.1 IDENTIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DE ALTA EFICIÊNCIA	53
4.2.1.1 DETERMINAÇÃO DO LIMITE DE DETECÇÃO DA TÉCNICA DE CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DE ALTA EFICIÊNCIA PARA ANÁLISE DO THCCOOH	53
4.2.1.2 APLICAÇÃO DO MÉTODO DE MEATHERALL E GARRIOTT A ADICIONADOS DE THCCOOH	53
4.2.1.3 APLICAÇÃO DO MÉTODO DE MEATHERALL E GARRIOTT ÀS AMOSTRAS DE USUÁRIOS E “BRANCOS” DE REFERÊNCIA	54
4.2.1.4 APLICAÇÃO DO MÉTODO DE MEATHERALL E GARRIOTT MODIFICADO ÀS AMOSTRAS SELECIONADAS	55
4.2.2 IMUNOENSAIO DE FLUORESCÊNCIA POLARIZADA	56
4.2.2.1 APLICAÇÃO DO MÉTODO DE IMUNOENSAIO DE FLUORES-..... CÊNCIA POLARIZADA ÀS AMOSTRAS SELECIONADAS	56

4.2.2.2 CONSTRUÇÃO DA CURVA-PADRÃO PARA ESTUDO DO MÉTODO DE IMUNOENSAIO DE FLUORESCÊNCIA POLARIZADA NA DETECÇÃO DE THCCOOH	56
5. RESULTADOS	58
5.1 DETERMINAÇÃO DO LIMITE DE DETECÇÃO DA TÉCNICA DE CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DE ALTA EFICIÊNCIA PARA ANÁLISE DE THCCOOH	58
5.2 APLICAÇÃO DO MÉTODO DE MEATHERALL E GARRIOTT A ADICIONADOS DE THCCOOH	58
5.3 APLICAÇÃO DO MÉTODO DE MEATHERALL E GARRIOTT ÀS AMOSTRAS DE USUÁRIOS DE <i>Cannabis</i>	58
5.4 APLICAÇÃO DO MÉTODO DE MEATHERALL E GARRIOTT ÀS AMOSTRAS SELECIONADAS	60
5.5 APLICAÇÃO DO MÉTODO DE IMUNOENSAIO DE FLUORESCÊNCIA POLARIZADA ÀS AMOSTRAS DE USUÁRIOS DE <i>Cannabis</i>	64
5.6 ESTUDO DA TÉCNICA DE IMUNOENSAIO DE FLUORESCÊNCIA POLARIZADA: CONSTRUÇÃO DA CURVA-PADRÃO	67
6. DISCUSSÃO	74
7. CONCLUSÕES	94
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

INTRODUÇÃO

Há mais de cinco mil anos que os efeitos psicoativos da *Cannabis* são conhecidos pelo homem¹⁴². Os últimos 20 anos, contudo, podem ser caracterizados como o período de maior interesse no seu estudo. Isto advém de várias razões que a colocaram no "status" de droga ilícita mais consumida em todo o mundo²⁵.

A maioria dos especialistas concorda que existem pelo menos três espécies de *Cannabis*, e as principais diferenças entre elas se relacionam às sementes, ao talo, ao hábito de crescimento e, em menor extensão, ao conteúdo resinoso¹²⁸.

A espécie *Cannabis sativa* L., classificada por Linneaus em 1753, é encontrada em todo o continente americano. No Brasil, ela ocorre em diversas variedades cujo conteúdo em princípio ativo pode variar de 1 a 5%¹⁴².

A droga obtida a partir das espécies de *Cannabis* é conhecida no Brasil como maconha. Utilizada principalmente sob a forma de cigarros, ela é hoje a droga ilícita mais consumida em todo mundo, e este quadro parece não ser diferente no país^{28,7,29,147}.

O problema do tráfico e consumo de drogas no Brasil vem-se avolumando em termos quantitativos e qualitativos. Nosso país se destaca como produtor de *Cannabis*, principalmente nas regiões Norte e Nordeste, especialmente para o consumo interno, e também tem sido utilizado como rota intermediária para o tráfico de outras drogas.

Segundo relatório fornecido pela Divisão de Repressão a Entorpecentes da Polícia Federal ¹⁴, entre 1989 e 1993 foram destruídos cerca de 17.655.871 pés de *Cannabis* em plantações clandestinas localizadas por todo o país. Se um pé de *Cannabis* fornecer 100g da droga pronta para consumo, então 1.765 toneladas de *Cannabis* não entraram no mercado. Acrescentado-se 59 toneladas de *Cannabis* pronta para consumo, apreendidas no mesmo período, disso resultaria uma quantidade suficiente para fabricar cerca de 1.823.319.660 cigarros de *Cannabis* (1g por cigarro).

Só neste ano de 1994, nos meses de janeiro a agosto, a quantidade total de *Cannabis* apreendida seria suficiente para fabricar 142.000.000 de cigarros de *Cannabis*. Em oito meses, isto provavelmente supriria o consumo de milhões de usuários de fins-de-semana.

Mesmo sabendo que toda a *Cannabis* produzida no Brasil é para consumo interno, não se pode predizer que parcela da droga circulante está sendo realmente apreendida. Além disso, a região Sul e parte da região Sudeste ainda recebem reforço do tráfico internacional.

Até hoje, pouco se conhece da magnitude do problema do abuso de drogas psicotrópicas no País ²⁰. A maioria dos dados estatísticos oficiais são restritos a algumas comunidades, oriundos de trabalhos isolados que enfocam, principalmente, o meio estudantil, não sendo prudente extrapolar esses dados, tendo em vista as dimensões e características de nosso país.

COTRIM e cols ²⁸ relatam que as internações devidas à dependência de drogas (excluindo-se o álcool), apesar de serem alvo de notificação obrigatória ao Ministério da Saúde, não são informadas por cerca de 45% das clínicas e hospitais; e as que notificam o fazem de modo incompleto.

ALMEIDA e cols ⁴, CARLINI e COTRIM ²⁷ relatam que, na maioria das pesquisas realizadas entre estudantes, a *Cannabis* aparece como a droga ilícita mais consumida.

Alguns trabalhos mostram que o início do uso da *Cannabis* acontece nos primeiros anos da adolescência^{124,148}. SMITH e cols¹²⁷, estudando um grupo de adolescentes usuários de *Cannabis*, observou que os picos de consumo se localizavam imediatamente antes de entrar na escola (6h), logo após as aulas (12h) e à noite (18h/20h).

O uso de álcool e drogas, associado à evasão escolar, tem um impacto social tremendo na incidência de marginalidade, e novamente, a *Cannabis* se sobressai por seu alto consumo⁹¹.

CARLSON e EDWARDS ¹⁸ realizaram estudo relacionando valores humanos com uso de *Cannabis*. Os autores observaram que alguns valores enfatizados no grupo de não-usuários, como o autocontrole, a responsabilidade e a prudência, não o eram no grupo de usuários. Estes priorizavam outros valores, como prazer, criatividade e vida excitante.

Um estudo realizado em escolas mostrou que os usuários de drogas estão mais sujeitos à violência, tanto como agressores quanto como vítimas⁸⁸. Trabalho realizado em uma casa de detenção para menores infratores mostrou que a frequência do uso de *Cannabis* se relaciona bem com relatos de abuso físico, sexual e distúrbios emocionais³². A busca desenfreada de recursos para aquisição de drogas faz os índices de criminalidade contra o patrimônio subirem a níveis preocupantes¹⁴⁷.

Muitos acidentes fatais de trânsito matam milhares de pessoas por ano em todo o mundo. A relação do uso de *Cannabis* com acidentes de trânsito tem sido demonstrada em alguns trabalhos, com índices de 6–20% de resultados positivos. Sua participação em homicídios pode alcançar a casa dos 34%^{50,65,52}.

Em todas essas pesquisas é difícil estabelecer o papel isolado da *Cannabis*, já que esta é quase sempre encontrada em associação com o álcool. A alta incidência

dessa interação, observada na maioria dos levantamentos, quer em escolas, penitenciárias ou na investigação de acidentes de trânsito e homicídios, se constitui em um alerta para os que defendem a sua liberação. O sinergismo entre o álcool e a *Cannabis* já foi comprovado em vários efeitos farmacológicos, inclusive na queda do desempenho quanto à condução de veículos^{60,66,21}

A inovação mais importante da atual Lei Antitóxicos (Lei n.6368/76) constitui-se no tratamento diferenciado que se deu ao traficante e ao usuário. A este último, estabelece a lei que seja encaminhado a tratamento, respondendo ao processo judicial em liberdade; mais ainda: em seu artigo terceiro, a Lei avança na criação de um Sistema Nacional de Prevenção, Fiscalização e Repressão, e estabelece, em seu artigo primeiro, que é dever de toda pessoa física ou jurídica colaborar na execução de medidas preventivas e repressivas¹³².

Muitos setores governamentais ligados à Segurança Pública têm manifestado interesse na instalação de programas de detecção e reabilitação de dependentes de álcool e outras drogas.

Com o advento de uma nova mentalidade na área trabalhista, voltada para as questões inerentes à saúde do trabalhador e à segurança no ambiente de trabalho, um número cada vez maior de empresas realiza a implantação de programas para detecção e recuperação de usuários de álcool e outras drogas de abuso^{138,75}. Sabe-se que cerca de 25% das empresas norte-americanas possuem esses programas já instalados¹³⁸. A contribuição social desses programas é maior quanto mais cedo se detectar o usuário, a fim de que, pela ação preventiva, se evite a instalação de um quadro de dependência química cujo índice de recuperação pode ser muito baixo, menor que 40% ⁵¹.

As clínicas de reabilitação de dependentes químicos também solicitam exames toxicológicos para detecção de drogas de abuso, como meio de avaliar a confiabilidade do relato do paciente em tratamento^{47,122}.

Cresce, cada vez mais, a demanda para testes de drogas como fruto de pressões sociais para barrar a expansão do abuso de substâncias químicas e prover maior proteção aos seus membros¹⁹.

O desenvolvimento de metodologias analíticas cresceu muito nos últimos anos, pressionado pela necessidade de análise simultânea de um grande número de amostras, com requerimentos de especificidade e sensibilidade adequadas. Esse desenvolvimento se faz sentir com o advento de novas técnicas automatizadas de análise.

A detecção do Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), principal constituinte ativo da *Cannabis*, feita primordialmente no sangue, é prova inequívoca do uso dessa droga.

Entretanto, o decaimento rápido dos níveis plasmáticos a concentrações extremamente baixas conduz, invariavelmente, a resultados negativos se for ultrapassado o período de detecção, e se a técnica analítica empregada não for suficientemente sensível¹³¹.

Em relação à amostra, a urina também pode ser utilizada para caracterizar o uso de *Cannabis*. A detecção na urina do principal produto de biotransformação do THC, o 11-nor-9-carboxi- Δ^9 -THC (THCCOOH), também se constitui em evidência conclusiva de uso da *Cannabis*⁷⁸.

Na área forense, no que se refere à detenção de indivíduos suspeitos, um resultado positivo no exame de urina pode ser utilizado para comprovar o uso ilícito. Outras respostas, porém, não podem ser obtidas, como, por exemplo, saber se o indivíduo estava ou não sob efeito farmacológico em um determinado momento, ou mesmo dizer em torno de que hora a droga teria sido utilizada^{102,50}.

Normalmente, a análise toxicológica da urina para detecção de fármacos de abuso compreende duas fases: triagem e confirmação. A fase de triagem visa separar as amostras em positivas e negativas, sendo que as positivas requerem posterior confirmação por técnica mais sofisticada. Os ensaios imunológicos têm sido largamente empregados na fase de triagem, todavia, nós ainda dependemos da importação de equipamentos e de reagentes, o que encarece a análise e dificulta sua implantação principalmente no setor público.

Como no Brasil o uso de *Cannabis* é proibido, a aplicação de sanções penais exige a caracterização de usuários a partir da análise toxicológica forense.

Essas considerações nos conduziram ao estudo de um método que fosse acessível, de baixo custo e confiável para suprir essa demanda crescente na área analítica, dentro das condições disponíveis nos laboratórios de toxicologia do país.

Entre as técnicas normalmente recomendadas, a cromatografia em camada delgada (CCD) se sobressai pela sua simplicidade, praticidade, baixo custo e relativa especificidade, além de permitir a análise simultânea de várias amostras, sem necessitar de aparelhos sofisticados^{77,78}.

A CCD é ainda a técnica mais empregada em todos os Institutos de Medicina Legal do nosso país; mas, por não possuir sensibilidade suficiente, a detecção de usuários de *Cannabis* só era possível quando utilizados grandes volumes de amostra, que na maioria das vezes não está disponível.

A introdução da cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE) permitiu contornar esse problema, pois requer a utilização de pequenos volumes de amostra e possui sensibilidade suficiente para ser empregada nesse tipo de análise.

Por serem poucas as informações disponíveis na literatura sobre o seu emprego na detecção de usuários de *Cannabis*, necessário se fazia estudar uma metodologia em CCDAE aplicável às condições de trabalho existentes no Brasil.

O imunoensaio de fluorescência polarizada (FPIA), terminologia que se adotou neste trabalho, vem tendo grande aceitação por parte de muitos laboratórios. Por ser técnica ainda pouco conhecida em nosso país, era necessário estudá-la em seus aspectos teórico-práticos, para estabelecer os critérios necessários à boa interpretação dos resultados.

Neste estudo, o FPIA foi escolhido para formar o par analítico complementar à técnica cromatográfica estudada, tendo em vista um axioma em toxicologia que diz: "duas técnicas com princípios analíticos diferentes precisam ser empregadas para identificar a presença de um composto"⁴⁷.

A possibilidade de detectar usuários de *Cannabis* através da CCDAE representa um avanço metodológico importante para a análise toxicológica. Em nosso país, o método estudado neste trabalho possibilita que a detecção de usuários de *Cannabis* seja definitivamente introduzida na rotina analítica dos laboratórios de toxicologia forense.

2. GENERALIDADES

Aspectos botânicos e farmacognósticos, bem como estudos relativos à toxicodinamia e toxicocinética da *Cannabis*, foram anteriormente abordados por outros autores^{118,120}. Devido ao caráter do presente trabalho, contudo, é importante levantar alguns aspectos de interesse, principalmente médico-legal, com os quais os toxicologistas são diariamente confrontados.

2.1 Aspectos Toxicológicos

2.1.1 Efeitos tóxicos a curto prazo

O Δ^9 -THC, principal constituinte psicoativo da *Cannabis*, exerce seus efeitos proeminentes no organismo humano primeiramente no sistema cardiovascular (SCV), seguido por alterações no sistema nervoso central (SNC), cujo mecanismo ainda não está totalmente elucidado.

Segundo as revisões realizadas por JAFFE⁶⁶, CHIANG²¹, JONES⁷⁵, HOLLISTER⁶⁰ e DEWEY³⁴, os principais efeitos referentes à intoxicação aguda no organismo humano devido ao uso de *Cannabis* se encontram resumidos nas tabelas 1 e 2.

Segundo WEINTRAUB¹⁴², é comum entre os usuários considerar que a dose de 5 mg produz um efeito médio, de curta duração, e que doses maiores que 15 mg produzem efeito intenso e mais prolongado.

STAFFORD¹²⁸ relata que fumar um cigarro contendo 6mg, ou introduzir por via oral 15mg de THC produz um efeito psicoativo leve na maioria dos usuários; e que fumar um cigarro contendo 30mg, ou introduzir por via oral 75 mg de THC tende a produzir efeitos muito intensos, comparáveis com os obtidos por LSD.

Os cigarros de *Cannabis* encontrados no Brasil variam de peso entre 250–1000 mg. Seu conteúdo em THC também é variável, entre 0,5–5%¹⁴². Convém lembrar que o aproveitamento máximo de um cigarro para um fumante experiente conduz à absorção de quantidades inferiores a 30% do seu conteúdo em THC¹²⁸.

Outro fato importante é que o padrão de uso mais comum consiste na utilização de doses repetidas ("tragadas"). Em geral, uma vez atingido o efeito desejado, o dependente pára de fumar, só retornando quando o efeito tiver cessado¹²⁰.

Tabela 1. Efeitos farmacológicos da Cannabis no sistema cardiovascular .

EM DOSES USUAIS *	EM DOSES ELEVADAS **
<ul style="list-style-type: none"> • Taquicardia • Vasodilatação conjuntival . • Vasoconstrição periférica. Efeitos: pés e mãos frios; boca e garganta secas; diminuição do lacrimejamento; diminuição da sudorese; hipo ou hipertermia: aumento ou diminuição do apetite • Pressão sanguínea aumentada na posição supina, levemente diminuída ou inalterada em outras posições 	<ul style="list-style-type: none"> • Taquicardia intensificada . • Vasodilatação conjuntival • Efeitos devidos à vasoconstrição periférica intensificados • Hipotensão ortostática
<p>Obs.: via de exposição : pulmonar início do efeito : 9 a 28 min. duração do efeito : 39 a 120 min * : 5 - 6 mg de Δ^9-THC ^{142,128} . ** : 15 - 30 mg de Δ^9-THC ^{142,128} .</p>	

Tabela 2. Efeitos farmacológicos da Cannabis no sistema nervoso central.

EM DOSES USUAIS *	EM DOSES ELEVADAS **
<ul style="list-style-type: none"> • Período inicial de euforia (high), seguido por sonolência e relaxamento quando o indivíduo está sozinho; em grupo, esse efeito é menos pronunciado, podendo o indivíduo tornar-se falante. • Desintegração temporal: noção de tempo alterada; tendência de confundir passado, presente e futuro. • Despersonalização com sentimento de irreabilidade sobre si mesmo. com perda da introspecção; sentimentos paranóicos. • Dificuldade na concentração, com prejuízo na memória recente; diminuição da clareza no diálogo. • Maior importância a outros sentidos como tato, gosto e odor. Visão aguçada com distorções visuais. • Diminuição no desempenho de tarefas mais complexas que incluem percepção, atenção e processamento de informação. 	<ul style="list-style-type: none"> • Euforia pode chegar a ser substituída por uma sensação de pânico causada pelo aumento da ansiedade e sentimentos de que o efeito não vai acabar nunca. • Desintegração temporal acentuada. • Acentuação da despersonalização. • Pensamento confuso e desorganizado. • Mesmas alterações nos sentidos observadas nas doses usuais. • Diminuição do desempenho na realização de tarefas motoras simples. • Estado de intoxicação mais intenso e mais prolongado, podendo ocasionar urgências psiquiátricas.
Obs.: Via de exposição: Início do efeito: Duração do efeito:	pulmonar 10 a 45 minutos 2 a 4 horas para o efeito psicológico, que é perceptível para o usuário; 4 a 8 horas para a queda no desempenho, não sendo perceptível para o usuário ⁶⁶ . * : 5 - 6 mg de Δ^9 -THC ^{142,128} ** : 15-30 mg de Δ^9 -THC ^{142,128}

Não há relato, na literatura, de morte causada exclusivamente por *Cannabis*, nem mesmo em acidentes com indivíduos que carregam pequenos pacotes com resina ou óleo de haxixe dentro do próprio corpo ("bodypacker").

MEATHERALL e cols⁹⁹ relatam o caso de um indivíduo que ingeriu 39 pacotes contendo ao todo 518 gr de óleo de haxixe, com teor de THC em torno de 24%. Um pequeno extravasamento provocou a absorção de pelo menos 117 a 288 mg de THC (doses efetivas por via oral são relatadas na literatura em torno de 15 mg, cerca de 1/3 é absorvido¹⁴²). Os teores de canabinóides encontrados na urina alcançaram a cifra de 10.000 ng/ml. Apesar dos intensos efeitos observados, o estado clínico do indivíduo evoluiu bem após a remoção dos pacotes.

CHIANG e BARNETT ²¹ testaram o desempenho de pilotos em simuladores de voo, mostrando a correlação entre concentração plasmática de THC e diminuição no desempenho, que continuava até aproximadamente 7 horas após a utilização de um cigarro de *Cannabis*.

KELLY e cols ⁸⁵ desenvolveram um programa de testes em computador para avaliar a diminuição no desempenho, e provaram efeitos significativos até o último teste realizado 3 horas após a exposição a um cigarro de *Cannabis*.

Por causa dos efeitos observados, existe um senso comum em relação a se evitarem tarefas que requeiram rápida tomada de decisão, julgamento e resposta motora instantânea, pelo menos poucas horas após a exposição à *Cannabis*. Mesmo assim, permanece ainda a incerteza em relação ao período exato de permanência desse efeito e de outras causas sinérgicas (stress, má alimentação, etc.)⁷⁵

Como já mencionado anteriormente, esse efeito da *Cannabis* é potencializado pelo álcool, e é grande a incidência desse tipo de interação nos acidentes de trânsito^{50, 65, 52}.

2.1.2 Efeitos tóxicos a longo prazo

É difícil determinar os efeitos nocivos da *Cannabis* no padrão de uso normalmente empregado, isto é, por pessoas relativamente saudáveis, em doses baixas, de modo intermitente, geralmente associada ao tabaco e/ou álcool⁵³.

Muitos efeitos nocivos à saúde têm sido atribuídos ao uso crônico da *Cannabis*. Entre os mais comumente citados estão: interrupção nas funções celulares básicas, desequilíbrio hormonal, interferência no sistema de defesa contra infecções, dano

cromossomal, teratogênese, enfraquecimento do coração, danos oculares, acúmulo de THC no cérebro e testículos, dano cerebral, impotência e frigidez, câncer, dependência química e transposição para outras drogas. Tais efeitos, contudo, seriam reversíveis em semanas ou meses após a interrupção do uso da droga, não sendo possível relacionar danos permanentes de ordem física ou psíquica^{21,75,60,66,34,149}.

STAFFORD¹²⁸ discute trabalhos importantes realizados em populações que fazem uso intenso e crônico da *Cannabis*. Elas foram comparadas a populações-controle sob o ponto de vista psicológico, fisiológico, sociológico e antropológico. Não foi evidenciada uma maneira de diferenciar as duas populações. O único achado clínico interessante foi a indicação de uma hipóxia funcional nos que fazem uso de mais de um cigarro de *Cannabis* por dia, durante vários anos.

Muito se discute sobre a relação entre os efeitos tóxicos da *Cannabis* alongo prazo e o desenvolvimento de uma personalidade agressiva e violenta. O aumento da agressividade visto em experimentos com animais não pode ser usado para se prever esse efeito no ser humano³⁴. Alguns autores têm investigado esta relação com base em levantamentos epidemiológicos e estudos estatísticos.

DEMBO e cols³³ realizaram um trabalho para detecção de usuários de drogas de abuso em uma casa de detenção de menores, através de análise de urina. Foram encontrados 41% de resultados positivos, sendo 30,6% relacionados a uso exclusivo de *Cannabis*, 4% de uso exclusivo de cocaína e o restante de uso de 2 ou mais drogas. O álcool não foi avaliado nesse estudo.

Segundo HOLLISTER⁶⁰, possivelmente a *Cannabis*, tanto quanto o álcool, facilite o extravasamento de uma agressividade pré-existente.

KINGERY e cols⁸⁸ desenvolveram estudos comparativos entre estudantes e mostraram que os usuários de drogas de abuso se envolvem mais com situações de risco que os não-usuários, o que os predispõem à violência quer como agentes, quer como vítimas.

Entre usuários crônicos de *Cannabis* existe alta prevalência de distúrbios de personalidade. Não se sabe se estes distúrbios foram provocados pelo uso crônico, ou se o uso crônico foi consequência deles, mas é certo que eles interagem sinergicamente³⁴.

CARLSON e EDWARDS¹⁸ realizaram um estudo relacionando valores humanos com uso de *Cannabis*. Os autores observaram que alguns valores enfatizados no grupo de não-usuários, como o autocontrole, a responsabilidade e a prudência, não o eram no grupo de usuários. Estes priorizavam outros valores, como prazer, criatividade e vida excitante.

2.1.3 Toxicocinética

Importantes trabalhos de revisão discorrem sobre a cinética da *Cannabis*^{2,21,58,50}, não obstante, estudos mais recentes estabeleceram parâmetros pouco elucidados nos anteriores, principalmente pelo uso de técnicas analíticas mais sensíveis e seletivas. Para ordenar melhor esta exposição, podemos discutir a cinética em dois ambientes: no plasma e na urina.

2.1.3.1 Perfil plasmático do Δ^9 -THC e seus principais produtos de biotransformação

Os efeitos da *Cannabis* e de outras drogas fumadas precisam ser avaliados em termos de níveis plasmáticos, por causa da incapacidade de ser determinada uma dose específica por esta via de exposição.

HUESTIS e cols ⁶² estudaram a cinética da *Cannabis* partindo de um volume pequeno de amostra (0,5 ml de plasma) , de um rigoroso protocolo experimental e de um método analítico extremamente sensível (CG/MS-NICI), validado para o Δ^9 -THC e seus mais importantes produtos de biotransformação (11-OH- Δ^9 -THC e 11-nor-9-carboxi- Δ^9 -THC).

Com auxílio de uma bomba de coleta contínua, foi possível a obtenção de amostras em intervalos de tempo muito curtos, o que permitiu a caracterização da fase crítica de absorção que ocorre nos primeiros minutos da exposição.

A via de administração foi a pulmonar, por ser a mais usual. Variações individuais eram esperadas, de modo que os resultados foram expressos sob forma de valores médios, obtidos dentro de determinadas faixas. Infelizmente, as faixas de concentração são largas e se sobrepõem, reduzindo sua aplicabilidade na interpretação dos níveis plasmáticos.

Os resultados obtidos são apresentados de modo sintético na tabela 3, sempre com valores médios de concentração e de momento de coleta de amostra.

Tabela 3. Síntese dos resultados obtidos por HUESTIS e cols ⁴⁰ referentes às concentrações plasmáticas encontradas após a utilização de Cannabis por via pulmonar.

Momento da coleta		Concentração plasmática (cigarro contendo 1,75%THC)	Concentração plasmática (cigarro contendo 3,55%THC)
Após 1@tragada 2@ tragada	→ →	•THC = 7 ng/ml •11-OH-THC detectado = 6–10% do THC	•THC = 18,1 ng/ml •11-OH-THC detectado =6–10% do THC
Após 7@tragada T= 8,4 min	→	•Pico THC=84,3 ng/ml •THCCOOH detectado •11-OH-THC 6–10% THC	•Pico THC=162,2ng/ml •THCCOOH detectado •11-OH-THC 6–10% THC
T= 13 min	→	•Pico 11-OH-THC = 6,7 ng/ml	•Pico 11-OH-THC = 7,5 ng/ml
T= 15 min*	→	•THC= 52,3 ng/ml •11-OH-THC 6–10% THC	•THC= 94,8 ng/ml •11-OH-THC 6–10% THC
T= 30 min*	→	•Pico THCCOOH = 24,5 ng/ml •THC = 17,5 ng/ml	•Pico THCCOOH = 54 ng/ml •THC = 29,7 ng/ml
T= 45 min	→	•THCCOOH - platô •11-OH-THC cresce % devido à queda THC	• THCCOOH - platô •11-OH-THC cresce % devido à queda THC
T= 2 horas	→	•THCCOOH platô 2–4h •THC < 5ng/ml detectável 3–12 h •11-OH-THC detectável 4,5–11,2h	•THCCOOH platô 2–4h •THC próximo 5 ng/ml detectável 6–27 h •11-OH-THC detectável 4,5–11,2h
T= 24 horas	→	•THCCOOH detectável por 48–168 horas	•THCCOOH detectável por 72–168 horas
AUC 0-168 horas		•THC= 36,5 ng-h/ml •11-OH-THC= 7 ng-h/ml •THCCOOH=401,4ng-h/ml	•THC= 72,2 ng-h/ml •11-OH-THC=14,7ng-h/ml •THCCOOH=1146,5ng-h/ml

* início do efeito psicoativo

T= tempo médio de coleta

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

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

AUC= área sob a curva

A figura 1 representa a cinética plasmática para o cigarro de alta potência (3,55% THC).

Figura 1. Níveis plasmáticos médios de Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), 11-hidroxi- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (11-OH-THC) e 11-nor-9-carboxi- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THCCOOH), durante e após fumar um único cigarro de Cannabis contendo 3,55% de THC⁴⁰.

Logo após a primeira tragada, o Δ^9 -THC já é detectado no plasma, evidenciando uma absorção rápida por esta via de exposição. A biodisponibilidade é de 10–25%, dependendo da habilidade do fumante. Por via oral, cerca de 90% da dose são absorvidos, contudo os níveis plasmáticos são baixos, devido ao efeito de primeira passagem hepática².

A distribuição é bifásica. Inicialmente é rápida, em direção aos tecidos mais perfundidos e responsável pelo decaimento acentuado dos níveis plasmáticos de Δ^9 -THC. A segunda fase é lenta, em direção aos tecidos menos vascularizados⁶¹.

O Δ^9 -THC circula firmemente ligado às proteínas, sendo de 3% a fração livre⁴⁵. O clearance plasmático médio é de cerca de 0,8–0,9 l/min, e o sanguíneo de 1,5–1,6 l/min.

O volume de distribuição no equilíbrio é em torno de 10 l/Kg ²¹.

Devido ao rápido decaimento do Δ^9 -THC no plasma, os autores têm trabalhado mais na determinação do $t^{1/2}\beta$, fornecendo resultados não muito concordantes, devido às distintas condições experimentais e aos parâmetros de sensibilidade e especificidade das diferentes técnicas analíticas utilizadas². Estudos mais recentes fornecem um valor de $t^{1/2}\beta = 4.1$ dias^{84,62,70}.

Seis horas após a exposição, os níveis plasmáticos nunca ultrapassam 2–3 ng/ml, e este poderia ser um valor limite para estabelecer uso recente de *Cannabis*, desde que validado por outros trabalhos e verificada a influência de altas doses, uso crônico e diferentes vias de absorção^{62,25}.

O início do efeito psicológico ("high") foi relatado entre 15–30 minutos de exposição, depois de já terem sido alcançados os picos de concentração plasmáticas tanto do Δ^9 -THC quanto do 11-OH-THC. O mecanismo que explica este período de latência ainda não está totalmente elucidado, acontecendo o mesmo quando usada a via endovenosa².

Os níveis de 11-OH-THC sempre atingem menos que 10% da concentração de Δ^9 -THC. Ele é produzido por hidroxilação microsomal e é farmacologicamente ativo. Quando utilizada a via oral ele pode até sobrepujar os níveis de THC devido ao efeito de primeira passagem, e seu período de detecção no plasma é bem maior^{2,8,114}.

A oxidação do 11-OH-THC, via citocromo P-450, conduz à formação do derivado inativo, que é o 11-nor-9-carboxi- Δ^9 -THC (THCCOOH)^{139,140}. Sua nomenclatura varia entre diferentes autores, existindo múltiplos números de registros no Chemical Abstract. Entre os nomes mais comuns estão: 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid, 9-carboxy-11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol, Δ^9 -tetrahydrocannabinol-11-oic-acid e Δ^1 -tetrahydrocannabinol-7-oic-acid.

A concentração deste produto de biotransformação aumenta gradualmente e ultrapassa os níveis de Δ^9 -THC logo após cessar a exposição. Seu tempo de detecção é bem maior do que os dos THC e 11-OH-THC, isto como consequência da liberação lenta do Δ^9 -THC dos tecidos de depósito, com posterior biotransformação. O Δ^9 -THC desaparece rapidamente do sangue junto com o 11-OH-THC; porém o THCCOOH, após atingir o pico, permanece num platô por um período de tempo relativamente maior, sendo ainda detectado vários dias após a exposição, mas em concentrações extremamente baixas⁶².

Devido às variações individuais, o uso de quocientes entre as concentrações plasmáticas do Δ^9 -THC e seus principais produtos de biotransformação pode ser útil para estimar o tempo de exposição e a presença de efeito farmacológico. Vários modelos de interpretação foram propostos^{102,103,50,84,62,61}. Entretanto, BOGULZ ¹³ alerta

quanto à influência que podem ter concentrações residuais de THCCOOH, fruto de exposições anteriores, sobre o cálculo do tempo de exposição.

KELLY e JONES⁸⁴ relataram poucas diferenças entre usuários frequentes e ocasionais nos aspectos farmacocinéticos.

Estudos por via endovenosa confirmaram um perfil cinético semelhante à via pulmonar e diferente da via oral^{58,2}. A figura 2 mostra a diferença no perfil cinético quando utilizadas diferentes vias de exposição.

Figura 2. Média de 11 concentrações plasmáticas de THC obtidas durante 4 horas após a administração de 5mg I.V. (A), 13mg (valor médio, faixa 11,6–15,6mg) por via pulmonar(B), em um grupo de usuários de Cannabis: nível plasmático médio após administração de 20mg de THC por via oral em um bolo de chocolate (C)².

2.1.3.2 Excreção urinária

Segundo CHIANG²¹ e AGURELL², cerca de 2/3 da dose são excretadas pelas fezes e 1/3 pela urina. A eliminação é lenta, de modo que 50% da dose são excretadas em 4–5 dias. Isto mostra a similaridade entre a $t^{1/2}_{\beta}$ plasmática e a $t^{1/2}$ aparente de eliminação^{8,84}. JOHANSSON e cols⁷¹, trabalhando com Δ^9 -THC marcado com ^{14}C , mostraram não existir diferenças significativas no perfil de excreção dos produtos totais de biotransformação, entre usuários ocasionais e freqüentes, após fumar ou por via oral, sendo similar a $t^{1/2}$ aparente de eliminação. A figura 3 mostra esses resultados.

Figura 3. Excreção urinária dos produtos de biotransformação ^{14}C -THC (calculado como ng de THC), após administração oral e pulmonar. Os símbolos cheios (■, ●) se referem a usuários crônicos e os vazios (○, □) a usuários ocasionais⁷¹.

Mais de 24 produtos de biotransformação têm sido identificados na urina e fezes humanas, e existe uma fração significativa ainda não identificada. Todos os produtos de biotransformação identificados na urina do homem são de natureza ácida e eliminados preferencialmente sob forma conjugada (glicuronídeos). O mais abundante deles é o 11-nor-9-carboxi- Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THCCOOH), que conta com cerca de 27% no total eliminado^{2,21,3}.

A figura 4 mostra a estrutura química do Δ^9 -THC e de seus principais produtos de biotransformação.

Figura 4. Principal via de biotransformação do Δ^9 -THC no homem¹¹⁴.

A conversão do THC para THCCOOH procede da formação de 11-OH-THC via citocromo P-450, com subsequente oxidação para ácido carboxílico^{139,140}. Para realização da análise toxicológica, ele é o mais importante produto de biotransformação, por ser o mais abundante e ter maior período de detecção¹⁰.

A eliminação do THCCOOH inicia-se uma hora após a exposição⁸. A concentração de sua forma livre é pequena e tende a diminuir à medida que a eliminação prossegue, até desaparecer completamente cerca de 8h após a exposição,

enquanto a fração conjugada tende a aumentar com o tempo, sendo a única forma encontrada após este período⁷⁹.

ALBURGES e cols³ verificaram que, em usuários crônicos, a concentração da forma livre é maior e ainda detectável até 24 horas após a exposição. Os autores sugerem saturação da glicuronil-transferase devido ao uso crônico.

Ao comparar a excreção de produtos de biotransformação totais com a eliminação do THCCOOH, JOHANSSON e cols⁷¹ observaram perfis similares nos usuários ocasionais, porém nos usuários crônicos o perfil de eliminação do THCCOOH sofre influência de exposições anteriores, sendo detectado em níveis mais elevados e por mais tempo. A figura 5 mostra esta diferença no perfil de eliminação entre usuários crônicos e ocasionais.

Figura 5. Excreção urinária do THCCOOH (símbolos cheios ♦) e produtos de biotransformação ¹⁴C-THC (calculados como ng de THC/ml de urina) em um usuário ocasional (a) e em um usuário crônico (b) após fumar⁷¹.

O período de detecção do THCCOOH é muito variável, dependendo da dose, frequência de uso, tempo da coleta da amostra, conteúdo de gordura corpórea, grau de diluição da urina e sensibilidade da técnica analítica utilizada^{10,95}.

ELLIS e cols³⁷ estudaram o período de detecção de canabinóides em urinas de 52 usuários de *Cannabis*, utilizando EMIT® com "cutoff" de 20ng/ml. Em termos de duração de resultados positivos, cerca de 60,6% dos usuários pesados tinham resultados positivos por mais de 21 dias após o último uso. Cerca de 1/3 tinha resultados positivos por mais de 30 dias, e 4,7% por mais de 60 dias. Em usuários

ocasionais, o primeiro resultado negativo aparece em torno de 8,5 dias (faixa de 3–18) para um "cutoff" de 20ng/ml , ou 1 dia (faixa de 0–3) para o "cutoff" de 100ng/ml.

MOODY e cols²⁵ tentaram correlacionar níveis de THCCOOH da urina e do sangue na avaliação do tempo de exposição. Eles verificaram que usuários crônicos alcançam concentrações mais altas de THCCOOH em menos tempo. Se não for conhecida a hora da coleta e a dose utilizada, e levando em conta a existência de variações individuais, o fato de conhecermos a concentração dos produtos de biotransformação não é suficiente para se predizer a hora do uso e o momento do efeito tóxico para um dado indivíduo.

2.2 Aspectos Analíticos

2.2.1 Quanto à amostra.

Pelas características farmacocinéticas da *Cannabis*, podemos classificar os fluidos biológicos para análise de canabinóides em 2 tipos: os que expressam somente exposição recente, e os que podem expressar exposições anteriores. Entre as amostras que expressam apenas uso recente se enquadram a saliva, o ar expirado e o sangue, este último merecendo considerações especiais.

As vantagens do uso da saliva como amostra estão no fato de ela ser obtida por método não invasivo e de ser facilmente disponível a qualquer momento. Contudo, em relação à análise de canabinóides, a saliva oferece algumas desvantagens. Os níveis elevados de ligação protéica do Δ^9 -THC e 11-OH-THC tornam pouco provável que a presença destes na saliva seja por transferência do sangue para a saliva; foi observada adsorção de canabinóides na cavidade oral durante o ato de fumar. Concentrações de 5–330 ng/ml podem ser encontradas até 8 horas após fumar um cigarro de *Cannabis*, e o período de detecção é de no máximo 14 horas após a exposição. Além disso, o uso de *Cannabis* inibe a secreção salivar^{121,45}.

A presença do Δ^9 -THC no ar expirado é devida provavelmente à liberação lenta da droga seqüestrada pelos pulmões, e seu período de detecção é curto, apenas algumas horas após a exposição⁵⁹.

O sangue é a única amostra que oferece boa correlação entre concentração e efeito farmacológico, no entanto, as baixas concentrações dos analitos no sangue impõem o uso de técnicas sofisticadas e muito sensíveis¹¹. Seis horas após a exposição, os níveis plasmáticos do Δ^9 -THC nunca ultrapassam 2–3 ng/ml e este pode ser um valor limite para estabelecer uso recente. Contudo, o sangue também contém THCCOOH por um tempo relativamente longo dependendo da sensibilidade do método analítico utilizado, e para este analito, a simples detecção pode não corresponder a uso recente⁶².

Entre as amostras que podem expressar exposições anteriores se enquadram a urina e, especialmente, o cabelo.

A urina é o fluido biológico de eleição na análise de drogas de abuso. Está menos sujeita à interferência de compostos lipofílicos que o sangue. Volumes adequados são obtidos facilmente, por técnica não invasiva. Pela via mais comum de uso da *Cannabis* (via pulmonar), altos teores de THCCOOH são encontrados na urina, e, dependendo da frequência de uso da droga, o período de detecção vai de 3 a 20 dias ou mais^{129,45,119,121}.

Poderíamos citar, como desvantagem na utilização da urina como amostra, a quebra de privacidade no ato de coleta, tendo em vista a necessidade de um observador, a fim de evitar prováveis adulterações¹²¹.

Recentemente, tem sido dada maior atenção ao cabelo como amostra para detecção de drogas ilícitas. As drogas passam dos fluidos circulantes para o cabelo e permanecem firmemente ligadas a ele. É possível, então, acompanhar a ingestão da droga por período maior que 6 meses, dependendo do tamanho do cabelo. Mesmo que o usuário se abstenha da droga por um período maior que o de detecção na urina, a análise de fragmentos de cabelo pode, entretanto, fornecer resultado positivo.

Até o presente momento, apenas dois métodos analíticos têm tido sensibilidade suficiente para ser empregado nesta análise: radioimunoensaio e CG/MS. KINTZ e cols⁸⁹ sugerem o uso de imunoensaio de polarização de fluorescência (ADx®), para triagem de amostras de cabelo. Utilizando como cutoff a concentração de 25 ng/ml, não ocorreram falsos positivos para canabinóides, sendo observados apenas 2 falsos positivos entre 29 casos reportados como positivos pelo ADx® e confirmados por CG/MS.

2.2.2 Quanto à estabilidade de canabinóides.

Vários fatores interferem na estabilidade dos canabinóides. Dentre estes estão o oxigênio, o calor, o solvente empregado na dissolução e, principalmente, a luz^{59,41,126,133}. Na preparação de soluções-padrão, é recomendado o emprego de etanol como solvente, frascos de vidro âmbar e armazenamento em temperaturas inferiores a zero graus^{41,126}.

HARVEY e cols⁵⁸ relatam a influência do pH para a estabilidade dos canabinóides. Em meio fortemente ácido ($\text{pH} < 4$) observa-se a degradação de muitos canabinóides, o oxigênio do anel pirânico é protonado, causando abertura do anel e formação de vários canabinóides substituídos⁵⁹.

Os canabinóides ácidos são instáveis, principalmente diante da luz e do calor, sofrendo descarboxilação com passagem para os canabinóides neutros correspondentes¹²⁶. FAIRBAIRN e cols⁴¹ sugerem que o efeito da luz pode converter os canabinóides em polímeros que não são detectados pelas técnicas usuais de cromatografia gasosa e em camada delgada.

A estabilidade de canabinóides em fluidos biológicos também foi estudada. Alguns autores preconizam o uso de conservantes tipo fluoreto de sódio e oxalato de potássio, não observando degradação de canabinóides quando as amostras de sangue eram armazenadas a 4°C em tubos Vacutainer^{102,50}.

FOLTZ⁴⁵ estudou a estabilidade do Δ^9 -THC, 11-OH-THC e THCCOOH em sangue e plasma estocados em frascos de vidro, a temperatura ambiente, 4° e -10°C. JOHNSON e cols⁷² trabalharam com frascos sinalizados e usaram CG/MS-NICI para quantificação dos níveis dos analitos. Ambos relatam boa estabilidade até 30 dias em qualquer das condições de estocagem. Após este período inicia-se a degradação do THC e 11-OH-THC apenas nas amostras deixadas a temperatura ambiente; podendo gerar perda de 90% do THC e 44% do 11-OH-THC no sexto mês de estocagem. Para o THCCOOH não foi observado decréscimo significativo.

Em relação à urina, trabalhos realizados com avaliação de amostras por técnicas imunológicas mostraram boa estabilidade para as urinas congeladas a -20°C. Resultados positivos ainda eram observados após um ano de estocagem⁵. KING e cols⁸⁶ observaram que de 107 amostras na faixa de 20–185 ng/ml, apenas 11 ficaram abaixo de 20 ng/ml após 18 meses de armazenamento no freezer.

SUTHEIMER e cols¹³¹ analisaram por EMIT® um grupo de amostras de urinas divididas em 4 subgrupos: negativas, < 20ng/ml, entre 20–100 ng/ml, > 400 ng/ml. Estas amostras foram estocadas por 3 semanas a temperatura ambiente, 4° e -20°C. Alguma deterioração já era vista a partir do quarto dia nas amostras deixadas a temperatura ambiente, sendo maior a instabilidade na faixa de 20–100 ng/ml. As amostras refrigeradas e congeladas permaneceram estáveis.

Segundo FOLTZ⁸⁸, o THCCOOH em urina pode diminuir em até 50% após 30 dias de estocagem a 4°C ou a temperatura ambiente. A mesma pesquisa mostra que o THCCOOH pode concentrar-se nos sedimentos que se formam na urina estocada ou na espuma que se forma quando ocorre agitação vigorosa da amostra.

JOHANSSON e cols⁷¹ trabalharam com amostras de urina acidificadas e congeladas em frascos de vidro sinalizados, uma vez que não ocorreria degradação de canabinóides se a urina fosse estocada nestas condições.

Em estudo de proficiência feito pela American Association of Clinical Chemistry (AACC), FRINGS e cols⁴⁸ relataram que no modo como as amostras são acondicionadas (frascos de vidro com rolha de borracha) não foi observada degradação de fármacos e produtos de biotransformação, incluindo o THCCOOH.

PAUL e cols¹¹¹ estudaram o efeito do congelamento sobre a concentração de drogas de abuso em urina. Usando tubos de polipropileno, armazenou urinas adicionadas de THCCOOH a -18°C por período de 45 dias. A análise por CG/MS revelou perda média de 11% nos níveis de THCCOOH. Experimento similar conduzido sem o congelamento das amostras não revelou perdas significativas. O autor atribui esta perda ao fenômeno de adsorção, provocado pela natureza lipofílica do analito e por sua baixa solubilidade na temperatura de congelamento.

Observação similar foi feita por JOERN⁶⁹ trabalhando com frascos de vidro. Esse autor defende a preparação de controles com pH alcalino e diz que são estáveis por 18 meses a -80°C, mesmo armazenando em frascos de vidro não silanizados.

LAW e cols⁹³ estudaram a estabilidade do THCCOOH conjugado ao ácido glicurônico. O glicuronídeo sofre parcial ou total hidrólise a pH maior que 8, tanto refrigerado a 4°C quanto a temperatura ambiente, gerando o THCCOOH livre.

CHRISTOPHERSEN²² também estudou a estabilidade de canabinóides em fluidos biológicos e observou boa estabilidade nas condições em que as amostras são habitualmente acondicionadas nos procedimentos da investigação médico-legal.

2.2.3 Quanto à separação e extração do THCCOOH da urina

Como relatado anteriormente, o THCCOOH na urina se encontra predominantemente sob forma conjugada, levando a grande maioria dos autores a submeter as amostras de urina a uma etapa de hidrólise antes da extração.

Segundo ELSOHL⁴⁰ a hidrólise alcalina é mais eficiente e reprodutível do que a hidrólise ácida ou enzimática. A hidrólise enzimática é pouco empregada, sendo o custo elevado da enzima β -glicuronidase um dos fatores limitantes ao seu emprego. Outro, é que a enzima precisa ser continuamente examinada quanto à sua atividade⁶.

A hidrólise alcalina em geral é realizada com NaOH ou KOH, variando entre os autores a concentração final do álcali na amostra. Quando se usa NaOH, seja 1N^{98,105}, 6N¹³⁵ ou 10N^{90,144}, o volume do álcali geralmente corresponde a 10% do volume da amostra. Já o KOH 10N tem sido empregado em volumes correspondentes a 5%¹¹⁰ e 10%^{10,50} do volume da amostra. A hidrólise com KOH parece produzir extratos mais limpos, sendo preferida quando se destina ao uso de CG ou CG/MS⁴⁵.

As condições ideais para a hidrólise alcalina foi estudada por VINSON e LOPATOFISKY¹³⁵ e estão de acordo com a conduta utilizada pela grande maioria dos autores, isto é, temperatura entre 50–60°C e tempo necessário para liberação do THCCOOH entre 15–20 minutos. Alguns autores preconizam o uso de temperaturas mais elevadas^{90,144,105}.

A instabilidade do glicuronídeo em pH fortemente alcalino levaram KING⁸⁶ e McCURDY⁹⁷ a realizar a hidrólise em temperatura ambiente, usando KOH 11,8N em quantidade correspondente a 10% do volume da amostra. Eles relatam um tempo de apenas 5 minutos para que a hidrólise se processe.

KANTER⁸⁰ e WALL e cols¹³⁶ relatam que éter etílico extrai o glicuronídeo em pH menor ou igual a 4, dispensando a etapa de hidrólise.

A grande maioria dos métodos cromatográficos para detecção de THCCOOH em urina não dispensam a fase de extração, excetuando-se os métodos de LAW e cols⁹³ e KING e cols⁸⁶. A extração do THCCOOH do sangue ou urina pode ser feita por extração líquido/líquido ou sólido/líquido.

Entre as vantagens de se trabalhar com extração sólido/líquido, está a possibilidade de se reduzir a quantidade de impurezas químicas presentes na amostra, e de processar várias amostras simultaneamente. A presença de dois grupos funcionais ácidos no THCCOOH faz da troca aniônica uma escolha preferida entre colunas de extração¹; ácidos endógenos, entretanto, podem ser de difícil remoção. Colunas de fase reversa têm sido também empregadas.

Muitos trabalhos foram realizados com extração sólido/líquido, usando vários tipos diferentes de colunas^{97,64,135,90,144,110,10,42}. Variações entre lotes de colunas podem causar problemas na reprodutibilidade entre os laboratórios¹⁵.

A extração líquido/líquido de canabinóides naturais, presentes na planta e também em fluidos biológicos, era tradicionalmente feita pelo solvente de Brodie (álcool isoamílico 1,5% em hexano). Em publicações posteriores foi relatado que o uso isolado de hexano extrai canabinóides naturais de modo eficiente, e fornece extratos limpos, o que permite aplicação direta em cromatografia de fase gasosa^{82,98,15}.

O éter etílico também foi muito empregado^{78,80,136}, e o acetato de etila pode ser usado para extrair uma grande quantidade de produtos de biotransformação e seus conjugados de fluidos biológicos e tecidos⁵⁹.

Outros solventes e combinações de solventes podem ser empregados na extração líquido/líquido para o THCCOOH^{50,77}, sendo mais freqüentemente utilizada a mistura hexano:acetato de etila ^{6,23,105,97,10}.

Extrações conduzidas com clorofórmio, diclorometano, acetato de etila, metil-terc-butil-éter, e hexano:álcool isoamílico 95:5, resultam em resíduo com presença de interferentes que prejudicam a fase de identificação por CCDAE⁹⁸.

Entre todos os solventes, o hexano é o mais utilizado, sozinho ou combinado com acetato de etila ou isobutanol. Entretanto, MEATHERALL⁹⁸ relata que a mistura de solventes não se mostrou mais eficiente e arrasta mais impurezas.

A extração é realizada em meio ácido, geralmente em pH igual ou menor a 4. Os ácidos mais utilizados são: o HCl concentrado ou em soluções de normalidades variadas, e o ácido acético glacial.

Os autores relatam tempos de extração que variam entre 5–30 minutos, preferencialmente com agitação mecânica, suave ou moderada. Após centrifugação, o

solvente é separado e evaporado. Poucos autores trabalham com purificação por retro-extração^{108,50}.

As condições de evaporação do solvente também variam entre os autores. A maioria utiliza nitrogênio ou corrente de ar seco para acelerar o processo, sem aquecimento ou entre 50–60°C. O recipiente onde vai ser evaporado o solvente para obtenção do resíduo de extração pode ser de fundo cônico ou arredondado, desde que observados todos os cuidados na recuperação do resíduo das paredes do tubo⁹⁸.

A questão de usar vidraria silanizada ou não é discutida por alguns autores. Para sangue prevalece esta necessidade, já que neste fluido os canabinóides estão presentes em concentrações muito baixas, e qualquer adsorção pode ocasionar uma perda importante para a análise⁵⁹.

MEATHERALL⁹⁸ afirma que, após evaporação, vários solventes são capazes de recuperar todo THCCOOH do resíduo, se a vidraria for silanizada (clorofórmio, diclorometano, acetato de etila, metanol, etanol, acetona). Caso não seja silanizada, somente os álcoois ou misturas de clorofórmio ou diclorometano que contenham no mínimo 5% de etanol ou metanol são capazes de recuperar todo o THCCOOH. Trabalhando com mistura de clorofórmio:metanol 3:1, ele conseguiu excelente recuperação do resíduo para aplicação em CCDAE, sem precisar trabalhar com vidraria silanizada.

Se o resíduo não puder ser aplicado à cromatoplaça no mesmo dia, ele pode ser guardado até por 48 horas, sem que haja perda significativa nos teores de THCCOOH⁹⁸.

2.2.4 Identificação do THCCOOH por cromatografia em camada delgada

A detecção e quantificação de canabinóides nos fluidos biológicos por CCD apresenta maior dificuldade do que em plantas ou resinas, devido à menor concentração encontrada e à presença de outros compostos co-extraídos do meio biológico⁵⁹.

Em 1974, KANTER e HOLLISTER⁸¹ isolaram o mais importante produto de biotransformação do THC, através da análise de urina em CCD. Estudos com cromatografia gás-líquido e espectrometria de massa não foram conclusivos quanto à sua estrutura química; sabiam porém, que não se tratava de nenhum canabinóide até então conhecido. Este produto só foi corretamente identificado quando o THCCOOH sintetizado se tornou disponível comercialmente como padrão, a partir de 1975. Desde então, outros pesquisadores demonstraram a presença de THCCOOH em urina de usuário de *Cannabis*.

Vários trabalhos em CCD foram realizados, variando o tipo de placa, o sistema solvente e agente cromogênico. Na tabela 4 são apresentados alguns trabalhos a que se teve acesso na literatura. Com exceção do método de KING e cols⁸⁶, onde se faz aplicação direta da urina em placa especial, todos os trabalhos utilizam volumes de amostra iguais ou superiores a 10 ml.

Tabela 4. Alguns sistemas cromatográficos utilizados na identificação de THCCOOH por cromatografia em camada delgada.

Sistema solvente	Ag.Cromog.	Sensibilidade	Ref/ano
Acetona:Clorofórmio:Trietilamina 80:20:1 Éter petroleo:éter:ác.acét.glacial 50:50:1	Fast Blue B	0,5ug	78(1981)
Clorofórmio:metanol:hidróxido de amônio 85:15:2	Fast Blue RR	50–100ng/ml p/ 20ml amostra	77(1982)
Clorofórmio:metanol:hidróxido de amônio 70:30:2	Fast Blue B	-	107(1983)
Acet.Etila:Metanol:água:hidróxido amônio 2:5:0,5:1	Fast Blue RR	20 ng/ml p/ 10ml amostra	90(1984)
Heptano:acetona:ác.acét.glacial 70:30:1	Fast Blue BB	< 20ng/ml p/ 10ml amostra	47,131,122 (1985/87)
Heptano:acetona:ác.acét.glacial 50:50:1	Fast Blue BB	20 ng/ml p/ 3ml amostra	86(1989)

2.2.4.1 Influência da fase estacionária

Como se pode observar na tabela 4, o desenvolvimento nos métodos para CCD caminhava em busca de maior sensibilidade. Como em qualquer técnica de CCD, a sensibilidade é parcialmente governada pela fase estacionária e pelo agente cromogênico empregado. Com o advento da cromatografia em camada delgada de alta eficiência, temos disponível uma fase estacionária que permite ganho considerável de sensibilidade.

A cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE) teve sua origem no desenvolvimento de pequenas partículas para a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Estas partículas foram inicialmente recomendadas para a cromatografia em camada delgada (CCD) por HANS GEHRKE (Darmstadt, Germany) no início dos anos 70. Entretanto, só em 1975 é que R.E. KAISER mostrou sua aplicabilidade, passando à comercialização⁵⁷.

As placas de CCD são tipicamente manufaturadas com partículas de aproximadamente 10–12 m μ ; as placas de CCDAE são produzidas com partículas de 5–7 m μ . Enquanto a CCD alcança de 80–1000 pratos teóricos (N) em 15 cm de percurso, a CCDAE alcança 3000 N em 5 cm. Segundo GURKIN⁵⁷, muitos analistas reconhecem que alcançando este número de pratos teóricos é possível obter resultados analíticos comparáveis com análise em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) . Além disso, o uso da CCDAE elimina muitos dos processos e custos associados com purificação de amostras e pré-tratamentos requeridos para preservar as caras colunas de CLAE.

Dependendo do tamanho da placa e das condições analíticas é possível analisar várias amostras simultaneamente, dispensando o uso de equipamentos e acessórios caros.

As placas de CCDAE são mais finas que as de CCD. O consumo de solventes para CCDAE também é substancialmente menor do que na CCD convencional. Nas placas de CCDAE a cromatografia ocorre numa faixa rápida de fluxo capilar da fase móvel. Isto explica todas as vantagens da CCDAE sobre a CCD, como , por exemplo, rapidez de separação, difusão reduzida, gerando aumento na eficiência da separação, e limite de detecção menor⁵⁷.

O poder de separação na CCD é consideravelmente menor do que nos outros métodos cromatográficos como cromatografia gasosa (CG) e CLAE. Isto ocasiona problemas com a separação de interferentes. A CCDAE, tendo um poder maior de resolução do que a CCD convencional, atenua esta questão de interferentes¹³⁵. GÜBITZ

e WINTERSTEIGER⁵⁵ relataram o uso da CCDAE como técnica de triagem para várias drogas de abuso, utilizando a urina como amostra.

A primeira referência quanto ao uso da CCDAE na detecção de THCCOOH em urina de usuários de maconha data de 1984¹². Mais tarde, este mesmo grupo de pesquisadores utilizou esta metodologia em CCDAE junto com CLAE, para confirmar resultados positivos no EMIT®⁶⁴. Na revisão bibliográfica realizada, foram encontrados mais dois trabalhos: em 1985, VINSON e LOPATOFISKY¹³⁵ e, posteriormente, MEATHERALL e GARRIOTT⁹⁸. Na tabela 5 estão listados os aspectos cromatográficos destes trabalhos.

Tabela 5. Sistemas cromatográficos utilizados na detecção de THCCOOH por CCDAE

Tipo de placa	Sistema solvente	Ag.Cromog.	Sensibilidade	Ref
HPTLC-HL (Analtech)	Hexano:acetona:ác.acét.glacial 70:30:1	Fast Blue B	20ng/ml p/ 10ml amostra	12,64
LHP-K (Whatman)	Heptano:éter:ác.acét.glacial 80:10:4	Fast Blue BB	2 ng/ml p/ 2ml amostra	135
HPTLC-HLR (Analtech) LHP-KF (Whatman) HPTLC-60 F250 (Merck)	Heptano:n-butanol:ác.acét.glacial 90:9:1	Fast Blue BB	5 ng/ml p/ 2ml amostra	98

2.2.4.2 Influência da fase móvel

A seleção da fase móvel envolve vários fatores. Cada trabalho discute a sua própria escolha dentro de condições analíticas específicas. Interessante é a discussão de MEATHERALL e GARRIOTT ⁹⁸ para a escolha do sistema solvente aplicado a CCDAE.

Na fase móvel utilizada (n-heptano:n-butanol:ác.acético glacial 90:9:1), Δ^9 -THC, CNB e CBD aparecem juntos, porém separados do THCCOOH. Quanto à distância de migração do THCCOOH, não houve alteração cromatográfica quando hexano foi substituído por heptano e o pentano provocou menor distância de migração do THCCOOH. Isopropanol e n-propanol produziam bandas mais difusas. Butanol

apresentou melhores resultados na separação do THCCOOH de outros canabinóides em relação ao hexanol, álcool amílico e isoamílico.

O emprego do ácido acético mantém um pH reprodutível na fase móvel e previne a dissociação do THCCOOH durante a migração. Sem a inclusão deste, a banda do THCCOOH tem aspecto "difuso" e migra pouco. O ácido acético influencia diretamente o R_f do THCCOOH. KANTER⁷⁸ também observou a influência do ácido acético no sistema solvente. Na concentração de 1% o canabinóide migrava pouco, com 2% o canabinóide alcançava a zona de material endógeno. O autor, então, escolheu a concentração de 1,5%.

Apesar da aplicação pontual, as manchas de canabinóides visualizadas em CCDAE tem formato de bandas bem definidas. Este comportamento é devido unicamente à fase móvel, especialmente pela presença do ácido acético ⁹⁸.

2.2.4.3 Estudo da detecção do THCCOOH

Como se disse anteriormente, não só a fase estacionária, mas também o agente cromogênico governam a sensibilidade. A detecção de canabinóides apresenta uma certa complexidade ligada a vários fatores: o tipo do cromógeno, sua basicidade e a presença residual de solvente na placa^{96,135,98}.

A reação colorimétrica mais específica e a preferida para trabalhos com CCD e CCDAE envolvem a reação de canabinóides com o corante Fast Blue B. Ele é um reagente sensível, que permite detecção de 10–50 ng de canabinóides, contrastando com a sensibilidade de outros reagentes, que fica na faixa de 0,5–1 μg ⁵⁹.

O uso de Fast Blue B sofre algumas restrições, essencialmente por causa do risco de conter aminas livres residuais, carcinogênicas. Variações deste corante existem no mercado, e as principais são o Fast Blue RR e o BB.

O Fast Blue RR é menos sensível que o B, mais lento no desenvolvimento da cor, contudo apresenta menos riscos na sua utilização. Já o Fast Blue BB, igualmente mais seguro, é superior em sensibilidade e desenvolve cores mais evidentes, porém gasta mais tempo para desenvolvê-las completamente. Sua estabilidade em solução aquosa é menor, apenas algumas horas, o que impõe preparo recente.

Várias substâncias que desenvolvem cor com Fast Blue B não o fazem com o BB, sendo portanto este último mais seletivo⁶³. A questão da diferença de sensibilidade entre os sais, levantada por alguns autores, não foi confirmada por MEATHERALL e GARRIOTT ⁹⁸, que explicam para esta variação a diferença de solubilidade entre os sais. O Fast Blue B e o RR se dissolvem mais lentamente em água, e dão cor amarelada ao

fundo da placa. Contudo, todos os corantes deste grupo, quando aplicados em excesso desenvolvem cor de fundo inicialmente amarela, que escurece por ação da luz⁹⁶. O Fast Blue BB revela igualmente em concentrações variando de 0,05–0,3%, sendo que acima de 0,3% o corante confere à placa uma cor de fundo amarelada ⁹⁸.

VINSON e cols¹³⁵ estudaram a aplicação de outros corantes alternativos ao Fast Blue BB, porém nenhum apresentou melhores resultados que ele.

As placas de CCDAE reveladas com Fast Blue BB são estáveis por vários meses, se guardadas no freezer e cobertas com folhas de alumínio^{135,98}. Com o tempo, a mancha de THCCOOH enfraquece e o fundo branco da placa torna-se bege. Neste caso, não adianta reaplicar o corante porque as bandas de THCCOOH não reaparecerão⁹⁸.

Em relação à basicidade, alguns autores recomendam a adição de NaOH à solução aquosa de Fast Blue, para que se obtenha desenvolvimento mais rápido da cor dos canabinóides^{78,64,12}. Entretanto, segundo MAUNDER⁹⁶, com o uso de NaOH, ocorre uma difusão nas manchas obtidas, devido ao excesso de umidade na placa. Este problema pode ser contornado com a aplicação da base após o desenvolvimento do cromatograma e antes da aplicação do cromógeno.

Mesmo assim, a utilização de NaOH e NH₄OH desta maneira não se mostrou muito efetiva. Entre outras bases estudadas, a dietilamina, aplicada antes do desenvolvimento da placa, altera drasticamente o cromatograma e, dependendo das condições analíticas, pode-se não separar o THCCOOH do material endógeno co-extraído. Juntar dietilamina com Fast Blue BB produz um precipitado, talvez por autoquelação do corante, tornando-o inoperante, com fraco desenvolvimento da cor. Contudo, sua aplicação após o desenvolvimento da placa e antes do cromógeno mostrou bons resultados. A trietilamina funciona tão bem quanto a dietilamina, porém confere uma cor de fundo bege à placa⁹⁸.

Dietilamina tem sido a base preferida, porque tem baixo ponto de ebulição, permitindo sua aplicação como líquido e a difusão no suporte de CCD como vapor. Além disso, ela não é cara, e seu uso é menos questionado do que o da maioria das aminas, quanto ao potencial carcinogênico.

A dietilamina é considerada reagente fixador e clareador. Ela aumenta a fixação do corante nos sítios ácidos da sílica gel, conduzindo a cores mais evidentes. Quando aplicada antes e após o Fast Blue BB, ela clareia a cor de fundo, produzindo realce das bandas obtidas.

A adição prévia de dietilamina acelera o tempo de desenvolvimento da cor com Fast Blue BB^{98,96} e aumenta em cerca de 5 vezes sua sensibilidade. A aplicação posterior não é tão eficaz⁹⁸.

MAUNDER⁹⁶, trabalhando com tolueno como fase móvel, verificou que o desenvolvimento da cor de canabinóides naturais é melhor antes da total evaporação do solvente. Presumivelmente, porque as moléculas do solvente residual permanecem ligadas aos sítios ativos do suporte e permitem uma competição mais efetiva entre o complexo corante-canabinóide e as moléculas de água da sílica gel hidrofílica. Em condições predominantemente aquosas, o complexo corante pode ser precipitado da solução, em vez de ser adsorvido, e isto leva às diferenças de cor observadas. Quanto mais hidrofóbico o solvente, mais intenso o desenvolvimento de cor. Para o autor, o tempo ideal para a secagem das placas é de 5 minutos, a temperatura ambiente de 20°C. A placa foi considerada seca quando o aspecto translúcido desapareceu. Nenhum outro autor comentou esta questão.

Logo após secar, aplica-se a dietilamina e, em seguida, o Fast Blue BB. A placa deve secar naturalmente ao ar, a temperatura ambiente e, de preferência, no escuro⁹⁶.

Alguns autores preconizam o uso de vapores de HCl para observar a mudança de coloração da mancha previamente revelada, de rosa para púrpura^{47,131}. Contudo, este procedimento não é tão bom quando se pretende preservar os cromatogramas por longo tempo⁹⁶.

MEATHERALL⁹⁸ observou que a placa de CCDAE precisa ser desenvolvida até 2 horas após a aplicação do resíduo e revelada até 2 horas após o desenvolvimento. Se estes prazos forem excedidos, a intensidade da cor será menor. Parece que o THCCOOH interage com a sílica gel ou com ligantes da placa, produzindo um complexo ou um produto de fundo que não revela com Fast Blue. E este mecanismo, por certo, não envolve a descarboxilação do THCCOOH, já que deste modo seria produzido o Δ^9 -THC, e este apareceria na placa⁷⁷.

Outro problema que pode afetar a visualização das bandas de THCCOOH é o efeito da matrix urinária. FREDERICK e cols⁴⁷ utilizando como solvente extrator a mistura hexano:acetato de etila, relatam que urinas adicionadas de quantidade idênticas de THCCOOH não mostraram variação na intensidade da banda se fossem replicatas de um mesmo indivíduo. Se a mesma quantidade de THCCOOH fosse adicionada à urina de pessoas diferentes, as intensidades das manchas variavam entre si. Contudo, Meatherall⁹⁸ não observou este efeito ao utilizar apenas hexano como solvente extrator, e atribuiu estas diferenças ao sistema solvente empregado pelos autores. Ele também relata que não ocorreram diferenças de R_f entre o padrão e o THCCOOH adicionado, revelando que nenhuma substância co-extraída por hexano interferiria na interpretação do cromatograma.

Solventes tipo éter, clorofórmio, diclorometano e acetato de etila, fornecem resíduos que, quando aplicados no cromatograma, apresentam cor de fundo escura,

dificultando ou impossibilitando a visualização das bandas de THCCOOH^{98,78}. KANTER⁷⁸ observou que 80 ng de THCCOOH adicionados diretamente na placa são visualmente semelhantes a 250 ng adicionados ao resíduo do extrato etéreo da urina aplicado na placa, evidenciando a interferência dos compostos endógenos co-extraídos pelo éter.

2.2.4.4 Interferentes

A pesquisa de interferentes endógenos e exógenos na análise de canabinóides por CCD foi investigada por alguns autores. KAISTHA e TADRUS⁷⁷ pesquisaram substâncias endógenas e outros produtos de biotransformação do THC. KING⁸⁶ analisou urinas de usuários de 100 diferentes medicamentos com seus respectivos produtos de metabolismo. HUGHES⁶³ pesquisou a interferência de 71 substâncias químicas extraídas de plantas e 15 óleos essenciais. FREDERICK⁴⁷ analisou urinas contendo 59 diferentes fármacos. MEATHERALL⁹⁸ testou adicionados de 118 fármacos e produtos de biotransformação em sua metodologia para CCDAE. Em nenhum destes trabalhos foi observada mancha de igual coloração e hRf do padrão de THCCOOH, exceto para o Δ^8 -THCCOOH, fato observado em 2 trabalhos^{98,63}, o que sugere este produto como padrão substituto.

Manchas de cores diferentes não devem ser consideradas⁸¹. MEATHERALL⁹⁸ relata que a cor rosa-avermelhado é bem característica dos canabinóides. Portanto, a presença de manchas nesta tonalidade, porém em hRf diferente do padrão de THCCOOH, provavelmente se refere a outros canabinóides encontrados na urina, e não devem ser consideradas.

2.2.5 Identificação por técnicas imunológicas

Métodos imunológicos são utilizados na análise de fármacos por sua rapidez, simplicidade e relativo baixo custo. Na última década, tem sido observado o desenvolvimento e o refinamento de novos reagentes e sistemas para imunoensaios.

A possibilidade de automação fez com que os imunoensaios fossem amplamente empregados na triagem de fluidos biológicos para detecção de usuários de drogas de abuso. Os mais utilizados são: o radioimunoensaio (RIA), o enzimoimunoensaio (EIA) e, mais recentemente, o imunoensaio de fluorescência polarizada (FPIA)^{138,98}.

Existe uma tendência de substituir os ensaios em fase líquida com radioisótopos, pelos simples e rápidos ensaios homogêneos que não envolvem o uso de radioatividade. A engenharia genética trouxe ao mercado os anticorpos monoclonais, com especificidades mais definidas, e mais fáceis de serem produzidos para suprimento contínuo⁵⁴. Por isso, VINSON e cols¹³⁵ relatam que em 1983 vários milhões de testes de urina foram realizados nos Estados Unidos para determinar se indivíduos faziam uso de *Cannabis*. A grande maioria através de imunoensaios.

A filosofia que rege a utilização dos ensaios imunológicos na fase de triagem visa separar as urinas negativas das prováveis positivas para as substâncias pesquisadas. O termo "cutoff" tem sido empregado aqui como um valor limite de concentração, para que se possa classificar uma amostra como positiva ou negativa.

Este valor limite pode ser variável, dependendo do objetivo da análise toxicológica. Para estabelecer o "cutoff" na identificação de usuários, é necessário conhecimento da farmacocinética da *Cannabis* e dos níveis de produtos de biotransformação urinários presentes em diferentes padrões de uso da droga (uso ocasional, moderado ou freqüente)^{43,19}.

A maioria dos reagentes (Kits) para imunoensaios que se destinam à detecção de usuários de *Cannabis* visam o principal produto de biotransformação, que é o THCCOOH. Temos que pensar, entretanto, que pelo menos 35 diferentes produtos de biotransformação do Δ^9 -THC, 22 do Canabidiol (CBD) e 22 do Canabinol (CBN) são conhecidos no momento e estão presentes na urina depois do uso de *Cannabis*⁷⁷. As substâncias demonstraram possuir reatividade cruzada nos métodos imunológicos em padrões diferentes para cada método.

Variações individuais no metabolismo, tanto quanto diferença de reatividade dos anticorpos entre os métodos, podem conduzir a resultados diferentes para uma mesma amostra, ainda que na padronização dos métodos tenha sido usado o mesmo

calibrador^{143,74,39}. Portanto, a análise por imunoensaios não é específica para um produto de biotransformação e, sim, para um grupo estruturalmente relacionado.

Além disso, amostras de urina podem conter outras substâncias diferentes das que estão sendo testadas, tanto de origem endógena quanto exógena. Algumas destas substâncias podem interferir na reação antígeno-anticorpo, gerando resultados falsos-positivos ou falsos-negativos. Na tabela 6 estão listados alguns trabalhos onde foram avaliados os índices de resultados não-confirmados.

Muito cuidado é preciso tomar na avaliação desses resultados já que estas confirmações são feitas por técnicas cromatográficas, específicas para o THCCOOH. Outro ponto a ser observado é o valor de "cutoff" estabelecido para o ensaio imunológico, muitas vezes superior à sensibilidade do método cromatográfico⁴⁸.

Tabela 6. Índices de resultados obtidos por alguns imunoensaios e não confirmados por outras técnicas.

Imunoensaio	Não Confirmados		Método de confirmação	Ref.
	Pos%	Neg%		
RIA ("cutoff" 10ng/ml)	10	3	CG/MS	114
RIA ("cutoff" 10ng/ml)	2,5	-	CG/MS	106
EMIT®	4	-	CG/MS	1
RIA	0,3	-		
EMIT® ("cutoff" 100ng/ml)	3,1	2-4	CG/MS - CCD	122
EMIT® ("cutoff" 20ng/ml)	5	-	CCDAE	135
EMIT® ("cutoff" 75ng/ml)	8	2	CLAE - CCDAE	64
EMIT® ("cutoff" 20ng/ml)	2-3	-	CG/MS	47
EMIT® ("cutoff" 20ng/ml)	<3	-	CG/MS	131
EMIT® ("cutoff" 20ng/ml)	1	-	CG/MS	44
EMIT® ("cutoff" 20ng/ml)	1,9	-	CLAE	83
TDx® ("cutoff" 25ng/ml)	-	-		

Em estudo realizado pela American Association of Clinical Chemistry (AACC), quarenta e sete laboratórios participaram de um esquema de controle externo de qualidade. Após triagem imunológica, os laboratórios usavam na fase de confirmação diferentes técnicas cromatográficas: 30% dos laboratórios utilizavam CG/MS, 30% usavam CG com coluna capilar e outros 30%, CCD. Observaram que quando o "cutoff" utilizado na triagem era de 50ng/ml, o percentual de precisão dos resultados era de 100% para canabinóides. Não ocorreram falsos positivos e, sim, falsos negativos na faixa de 4,6%^{48,49}.

Vários autores comparam as técnicas imunológicas entre si e com métodos cromatográficos, trazendo informações importantes para a interpretação de resultados.

MOODY e cols¹⁰³, trabalhando com extratos metanólicos de sangue analisados por RIA e CG/MS, comprovaram que as concentrações de THCCOOH encontradas com RIA eram três vezes maiores que as obtidas com CG/MS, devido à reatividade cruzada do anticorpo com outros canabinóides presentes na amostra.

ABERCROMBIE e JEWELL¹, analisando por RIA 481 amostras classificadas como negativas por EMIT® ("cutoff" 100ng/ml), encontraram 22 positivas (4,6%). Ao analisá-las por CG/MS, 16 possuíam valores de THCCOOH em torno de 20 ng/ml, e 6 abaixo deste valor. Os autores relatam 91% de concordância entre os resultados do EMIT e do RIA.

BUDGETT e cols¹⁷ compararam os resultados obtidos da análise de 142 amostras de urina através de RIA (Abuscreen®) e de FPIA (TDx®) com CG/MS. Apenas 10 amostras não revelaram resultados coincidentes, e estas, quando analisadas por CG/MS, revelaram concentrações de THCCOOH entre 15–47 ng/ml. Destas dez, 9 foram positivas pelo RIA, mostrando um percentual maior de reatividade cruzada.

KARISSON e STROM⁸³ usaram CLAE para confrontar os resultados obtidos com TDx® e EMIT®. Utilizando praticamente o mesmo valor de "cutoff" para todas as técnicas, os autores construíram curvas de calibração para TDx® e EMIT®. Estudos de precisão revelaram coeficientes de variação bem menores no TDx® com boa estabilidade de calibração. Já no EMIT® existe a necessidade de se empregarem calibradores em cada corrida analítica, pelo menos uma vez ao dia. Para concentrações de 20ng/ml, foram observadas grandes flutuações no coeficiente de variação intra-série, indicando que a concentração de "cutoff" talvez esteja mais perto da sensibilidade do método no EMIT® do que no TDx®. A seguir, os autores analisaram por TDx® ("cutoff" 25 ng/ml) e por EMIT® ("cutoff" 20 ng/ml) 63 amostras com concentrações de THCCOOH na faixa de 20–873 ng/ml avaliadas em CLAE. Todas foram classificadas como positivas, com 100% de concordância entre os dois métodos imunológicos.

Novamente, outras 263 amostras foram analisadas. Destas, 203 eram negativas em ambos os métodos e 33 eram positivas. Das 27 amostras com resultados discrepantes, 15 deram resultado com erro de leitura no TDx®, devido ao alto valor de "background" das amostras. 12 amostras foram negativas no TDx® e positivas no EMIT®. Destas, 7 amostras foram positivas no CLAE com valores de THCCOOH menores ou iguais a 10ng/ml, o que justifica a classificação feita pelo TDx® como sendo "negativas* " (próximas ao valor de "cutoff"). As outras 5, quando analisadas segunda vez por EMIT®, eram negativas.

Apesar do TDx® ter um custo maior e gastar 20 min para ler um carrossel com 20 amostras, enquanto o EMIT® analisa 25 amostras em 8 minutos, sua excelente precisão e estabilidade de calibração se constituem em vantagens sobre o EMIT® ⁸³.

WELLS e BARNHELL¹⁴³, utilizando um mesmo valor de "cutoff" (100 ng/ml) compararam os resultados obtidos por 5 diferentes imunoensaios na análise de canabinóides. Três técnicas de radioimunoensaio e 2 técnicas não radioativas (EMIT® e TDx®) foram utilizadas neste estudo. Em 1988, o National Institute of Drug Abuse (NIDA) dos Estados Unidos estabeleceu o "cutoff" de 100ng/ml para os testes relacionados a programas em empresas: por isso este foi o valor de "cutoff" escolhido pelos autores. Para as 26 amostras submetidas a análise, os métodos não radioativos classificaram apenas 3 como positivas, enquanto os outros classificaram 5 (Abuscreen®) e 7 (DPC® e Immunalysis®).

As variações individuais entre usuários na metabolização do THC e as diferentes reatividades dos anticorpos entre os métodos conduziu a estes resultados discrepantes, mesmo utilizando-se um único valor de "cutoff" e o mesmo calibrador. Os autores citam que, através da comparação dos resultados obtidos por imunoensaios com os obtidos por cromatografia gasosa, foi observado que o THCCOOH corresponde apenas a 31% dos canabinóides totais detectados por RIA, enquanto para o EMIT® este percentual é maior, 48,9%, mostrando menos reatividade cruzada.

ELSOHLY e cols³⁹ relataram maior especificidade do anticorpo utilizado no TDx® do que os do EMIT® e RIA, com índice menor de reatividade cruzada entre os canabinóides.

FREDERICK e cols⁴⁷ utilizaram CCD para confirmar resultados do EMIT®; 17% das amostras positivas no EMIT® não foram confirmadas por CCD. Estas amostras, quando analisadas por CG/MS, revelaram ser realmente negativas ou que possuíam concentrações de THCCOOH inferiores a 20ng/ml (limite de sensibilidade do método de CCD empregado). Duas amostras negativas no EMIT® foram positivas na CCD, e

confirmadas por CG/MS (< 20ng/ml). Esta variação de sensibilidade na CCD pode estar ligada a fatores desconhecidos da matrix urinária.

KOGAN e cols⁹⁰ também recomendam o uso de CCD para confirmar os resultados do EMIT®, principalmente em análises com objetivo clínico. FOLTZ e SUNSHINE ⁴⁴ compararam os resultados obtidos por CCD, EMIT® e CG/MS para um grupo de amostras. Estes resultados foram transcritos para as tabelas 7 e 8.

Tabela 7. Resultados obtidos por FOLTZ e SUNSHINE⁴⁴ na análise de amostras de urina por CCD e CG/MS visando a detecção de THCCOOH.

Técnica	concentração	número de amostras
CG/MS	≥ 20ng/ml**	194
CCD	≥ 20ng/ml**	178
CG/MS	< 20ng/ml*	347
CCD	< 20ng/ml*	16

* valor limite para classificar a amostra como negativa

** valor limite para classificar a amostra como positiva.

n= 541

Como se pode ver na tabela 7, das amostras positivas por CG/MS 16(9%) foram negativas por CCD (sensibilidade = 20ng/ml) e continham em média 36,4 ng/ml de THCCOOH quando analisadas por CG/MS. Este índice de falsos negativos é, entretanto, menos problemático do que seria um índice de falso positivo, neste caso, zero para CCD. Contudo, a CCD confirmou como positivas 11 amostras que continham entre 5–19 ng/ml de THCCOOH no CG/MS. Esta diferença de sensibilidade na CCD é devida também à natureza subjetiva da interpretação (comparação visual com adicionados contendo 20 ng/ml de THCCOOH, utilizando-se 3 ml de amostra). Uma discriminação melhor foi obtida por densitometria.

Por estimativa visual, esta técnica de CCD apresenta 95% de precisão, sendo possível detectar o THCCOOH em amostras com concentrações inferiores a 10 ng/ml .

Na tabela 8, podemos observar a correlação entre os resultados do EMIT® e do CG/MS. O grande índice de falsos negativos (37%), isto é, amostras negativas no EMIT® e positivas no CG/MS, deve-se à diferença de "cutoff" entre os dois métodos. Foi

observado apenas um resultado falso positivo no EMIT®. Os resultados da CCD se correlacionam melhor com os do CG/MS do que os resultados do EMIT®. Isto não é uma surpresa, considerando-se que CCD e CG/MS detectam um canabinóide específico, enquanto no EMIT® outros canabinóides contribuem com o resultado.

Tabela 8. Resultados obtidos por FOLTZ e SUNSHINE⁴⁴ na análise de amostras de urina por EMIT e CG/MS visando a detecção de THCCOOH.

Técnica	concentração	número de amostras
CG/MS	≥ 20 ng/ml **	172
EMIT	≥ 100 ng/ml **	109
CG/MS	< 20 ng/ml *	293
EMIT	< 100 ng/ml *	63

* valor limite para classificar a amostra como negativa

** valor limite para classificar a amostra como positiva

n= 465

A interferência de grupos específicos de substâncias foi estudada. WINEK e cols¹⁴⁵ estudaram a interferência de extratos de plantas. Outros autores estudaram a interferência de medicamentos^{47,131,46}. Nenhum deles relata reatividade cruzada nas concentrações em que foram testados.

O significado legal e as consequências econômicas de um resultado positivo para droga de abuso compreensivelmente produzem um incentivo, entre os usuários de drogas ilícitas, para escaparem da detecção. Para alguns, a adulteração da amostra representa uma opção. Métodos disponíveis para isto são vários e vão desde uma simples diluição da urina até sua substituição pelo conteúdo de uma bola de borracha que, por cateterismo, alcança o frasco coletor.

Adulteração com agentes químicos é um método escolhido por muitos porque requer pouca sofisticação e pode ser facilmente executado num lugar onde não haja observação da coleta.

A introdução de uma amostra adulterada é potencialmente real em qualquer programa de teste de drogas, e o conhecimento do impacto que um adulterante pode ter

em um sistema analítico é um elemento importante para assegurar a integridade deste sistemas¹²³.

Vários trabalhos foram feitos com adição de adulterantes em urinas previamente analisadas e positivas para THCCOOH. Os adulterantes testados são substâncias facilmente disponíveis, como cloreto de sódio, vinagre, sabonete ou sabão líquido, hipoclorito de sódio, alvejantes, medicamentos (especialmente colírios), álcool, água oxigenada, bicarbonato de sódio, etc. ^{122,16,123,100,112,137,24}.

Em relação às técnicas imunológicas, os reagentes para detecção de canabinóides mostraram ser os mais sensíveis à ação de adulterantes. O FPIA é relativamente resistente a adulterantes em relação à produção de resultados falsos positivos. Adição de adulterantes a urinas negativas teve pouco impacto nos resultados. No entanto, aproximadamente metade dos adulterantes testados causa falsos negativos. Com exceção do hipoclorito de sódio, nenhum deles faz isto via degradação de canabinóides¹²³.

Nem sempre é fácil distinguir entre uma urina normal e outra adulterada. Alguns autores discutem indicadores de adulteração: pH, cor, turbidez, níveis de creatinina e gravidade específica^{100,36}.

LAFOLIE e cols⁹² relatam a importância da análise simultânea de creatinina no acompanhamento da abstinência de canabinóides. A figura 6 mostra a dosagem de canabinóides e de creatinina para um usuário pesado durante 100 dias de abstinência. Se os resultados não forem corrigidos pela creatinina, fica difícil afirmar que não houve reutilização da droga.

MANNO⁹⁵ abordou o mesmo aspecto. Como pode ser visto na figura 7, o aparente aumento na excreção de canabinóides no dia 6 se relaciona com uma amostra mais concentrada, e não com reutilização da droga.

MITCHELL e cols¹⁰¹ relatam que filtrar a urina em diferentes tipos de filtros (nylon, PVDF, polisulfona, acetato de celulose) pode provocar resultados falsos negativos em amostras com 50–100ng/ml de canabinóides. A centrifugação seria mais recomendada, mas é preciso lembrar que os canabinóides se concentram mais nos sedimentos da urina do que na fração aquosa⁴⁵.

Figura 6. Concentrações urinárias de THCCOOH (ng/ml de canabinóides) e creatinina durante 93 dias de abstinência de um usuário crônico (a). A razão THCCOOH/creatinina revela um declínio constante (b) ⁶².

Figura 7. Níveis de THCCOOH urinário de amostras colhidas em dias alternados após o último uso de Cannabis. $\square$ -THCCOOH ng/ml. Δ -ng THCCOOH/mg creatinina ⁶⁰.

2.2.6 Imunoensaio de fluorescência polarizada

O imunoensaio de fluorescência polarizada surgiu a partir do interesse em se desenvolverem imunoensaios que não utilizassem isótopos. Os marcadores não-isotópicos mais utilizados são as enzimas e as substâncias fluorescentes. As vantagens principais de se desenvolverem ensaios fluorescentes são: a relativa facilidade de se introduzirem grupos fluorescentes não-tóxicos tanto na molécula do analito quanto na do anticorpo; a sensibilidade com que estes grupos fluorescentes podem ser detectados nos espectrofluorímetros disponíveis; e a possibilidade de desenvolvimento de ensaios homogêneos, que são mais fáceis de serem executados e automatizados.

Uma das substâncias fluorescentes mais utilizadas como marcador é a fluoresceína⁸⁷. Ela é geralmente ligada ao antígeno, sendo o produto desta ligação chamado de traçador (F-Ag).

Existem vários tipos de ensaios fluorescentes que monitoram a fluorescência em função da reação antígeno-anticorpo. Se a diferença espectroscópica entre traçador ligado (complexo F-Ag-Ac) e livre (F-Ag) for suficiente, um ensaio homogêneo pode ser feito.

A maioria dos fluoroimunoensaios (FIA) homogêneos são do tipo competitivo, em que a ligação com o anticorpo causa alteração na propriedade fluorescente do antígeno marcado⁵⁶. Baseados nesta alteração, existem métodos diferentes que avaliam aumento ou diminuição da intensidade da fluorescência e, mais recentemente, a variação na polarização da fluorescência⁸⁷.

Os princípios fundamentais da polarização da fluorescência foram desenvolvidos por PERRIN, F. em uma série de artigos começando em 1926. WEBER, G. foi o primeiro a aplicar a técnica a sistemas biológicos em 1953, após desenvolver o fluorímetro requerido para sua aplicação⁷³.

Em 1961, DANDLIKER e FEIGEN⁵⁶ descreveram sua utilização no estudo da reação antígeno-anticorpo, determinando, através da polarização da fluorescência, dois importantes parâmetros: a constante de equilíbrio e a capacidade combinante característica da reação antígeno-anticorpo^{30,116}.

Em 1973, DANDLIKER apresentou, pela primeira vez, o método de imunoensaio de fluorescência polarizada (FPIA)⁷³.

Para entendermos melhor os princípios que regem essa técnica, é importante recordar de modo sucinto algumas características associadas aos fenômenos de emissão de fluorescência :

a) A energia absorvida nos processos de transição eletrônica é liberada quando os elétrons retornam ao estado fundamental. A fluorescência é um tipo característico de emissão dos estados excitados, onde a conversão da luz absorvida por uma molécula em energia emitida é rápida;

b) A determinação da quantidade de energia liberada neste processo pode ser determinada com auxílio de um fotomultiplicador ;

c) Toda a energia absorvida na excitação é liberada num curto intervalo de tempo, na faixa de nano-segundos, chamado de tempo de vida do estado excitado;

d) A fluorescência emitida pode ser polarizada. Enquanto a luz ordinária consiste em uma mistura de ondas vibrando em todas as direções perpendicularmente à sua linha de propagação, a luz polarizada é aquela em que a vibração do campo elétrico ou magnético é confinada a um plano. Podemos obtê-la com auxílio de alguns cristais. Estes cristais têm a propriedade de refratar a luz em duas diferentes direções: raio ordinário e raio extraordinário – ambos polarizados em direções perpendiculares um em relação ao outro.

Estudos com luz polarizada revelaram princípios importantes utilizados nessa técnica. Utilizando-se a fluoresceína, cujo λ de excitação é 485nm e o λ de emissão é 520nm, e levando em conta que nestas circunstâncias estuda-se apenas a transição para o primeiro estado excitado ($S_0 \rightarrow S_1$), observou-se que um máximo de emissão ocorre quando o momento de dipolo da emissão for paralelo ao vetor da luz polarizada incidente, e um mínimo de emissão quando for perpendicular. Portanto, se a observação da emissão for feita paralelamente ao vetor da luz incidente, um máximo de emissão estará sendo observado. Isto é possível se a emissão for também polarizada. Se a observação for perpendicular, o valor da emissão será mínimo. Teoricamente, os valores de polarização da emissão variam entre $+1/2$ a $-1/3$ ^{73,9}.

Na prática, são colocados dois polarizadores: um para polarizar a luz incidente e outro para polarizar a luz emitida (fluorescência). Alguns aparelhos trabalham com um polarizador móvel, ou seja, um cristal líquido capaz de rodar o plano da luz polarizada, quer no primeiro ou segundo polarizador. Isto é feito para poder observar os valores máximos e mínimos de fluorescência, se os polarizadores forem paralelos entre si ou perpendiculares entre si, respectivamente. Esta estratégia permite a avaliação da polarização relativa, que nos favorece analiticamente, por não depender da intensidade da fluorescência, nem da concentração do fluoróforo¹¹⁷.

A figura 8 mostra um esquema de sistema ótico utilizado para avaliar a polarização da fluorescência.

Figura 8. Esquema de um sistema óptico utilizado para medir a polarização da fluorescência (Vitalab Eclair®).

A avaliação da polarização relativa é feita pela seguinte fórmula:

$$Pr = I_{vv} - I_{hv} / I_{vv} + I_{hv}$$

I_{vv} seria a intensidade da fluorescência avaliada com os dois polarizadores em paralelo, enquanto que para I_{hv} os dois polarizadores estariam perpendiculares entre si, ou seja, em um deles houve a rotação do plano da luz polarizada.

Na verdade, apenas 10% da intensidade de fluorescência estão sendo avaliados. Esta perda é compensada pelo fato de a polarização ser menos sensível aos interferentes que comumente afetam os FIA homogêneos. A sensibilidade aqui é definida como a concentração de fluoresceína, que pode ser distinguida do tampão com 95 % de confiabilidade¹¹⁷.

Figura10. Mecanismo competitivo do imunoensaio de fluorescência polarizada.

Quando uma amostra, sem antígeno, é colocada em contato com o reagente [Ac-Ag-F], observamos um alto valor de polarização. Todavia, se na amostra existirem antígenos, estes vão competir pelos sítios de ligação do anticorpo, e antígenos marcados ficarão livres em solução, gerando uma diminuição na polarização.

As mudanças nos valores de Pr são geralmente pequenas, em torno de 0,1, e um controle rígido na temperatura é necessário de modo que Pr possa ser avaliado com uso de três decimais⁸⁷. Para facilitar, podemos então usar o termo milipolarização, e trabalhar com números inteiros.

A desvantagem inicial que esta técnica possuía, no sentido de limitar sua utilização à moléculas pequenas, tornou-se em vantagem para a análise de fármacos em meio biológico⁷³.

O gráfico de calibração obtido no FPIA tem dois aspectos a serem considerados: sua inclinação é negativa, porque o analito não-marcado compete com o traçador (analito marcado) pelos sítios do anticorpo, gerando queda na polarização e, conseqüentemente, a polarização é inversamente proporcional à concentração; outro aspecto é que a relação não-linear convexa é típica dos ensaios competitivos, e é obtida entre a polarização relativa de fluorescência e a concentração do analito. Esta é outra grande vantagem desta técnica; ela fornece resultado direto em termos de concentração.

A figura 11 mostra um gráfico típico de calibração obtido no FPIA.

Figura 11. Gráfico típico de calibração obtido em um imunoensaio de fluorescência polarizada (Vitalab Eclair®).

O considerável sinal de fundo das amostras biológicas limita a sensibilidade prática desta técnica. Isto se deve à fluorescência de compostos endógenos, ou de outras substâncias existentes na amostra¹³⁴. Moléculas maiores, como as moléculas de proteínas, podem causar espalhamento da luz⁸⁷. É necessário, então, proceder à análise de um branco que, no caso, seria a própria amostra com o tampão, sem adição de reagente, para avaliação e desconto desta fluorescência intrínseca. Reações cruzadas são passíveis de acontecer mas se relacionam mais às características do anticorpo³⁰.

2.2.7 Outras técnicas analíticas utilizadas na análise de canabinóides em fluidos biológicos.

Um axioma aceito na identificação qualitativa em toxicologia diz que "no mínimo duas técnicas com diferentes princípios analíticos precisam ser usadas para identificar a presença de um composto"⁴⁷. Assim, usando imunoensaios na fase de triagem, convém seja aplicado um método cromatográfico na fase de confirmação.

Alguns fatores precisam ser considerados ao se selecionar um método de análise para a fase de confirmação. Um deles é a sensibilidade. Se o objetivo é confirmar resultados oriundos de um imunoensaio, bastaria o método ser capaz de detectar 20 ng/ml de THCCOOH⁴⁵. De fato, em 1988, The United States Department of Health and Human Services (HHS) determinava um "cutoff" de 100ng/ml para fase de triagem e 20ng/ml para fase de confirmação¹³⁰. Contudo, em 1990, a NIDA (National Institute of Drug Abuse) estabelecia um "cutoff" de 15 ng/ml para fase de confirmação⁴⁴. Sendo assim, para que um método seja selecionado como método de confirmação, é necessário primeiramente que ele possua sensibilidade inferior 15ng/ml e boa precisão neste valor de "cutoff".

Vários fatores influenciam a sensibilidade e a especificidade de um método cromatográfico. Já analisamos alguns destes fatores para CCD, ou seja, a contribuição da fase estacionária e do agente cromogênico. Para os outros métodos cromatográficos pesam também muitas variáveis, como por exemplo, tipos de coluna, detectores, fase móvel, agente de derivatização, tipo de ionização (CG/MS), etc.

CCD e CLAE são capazes de detectar baixas concentrações de THCCOOH sem necessidade de derivatização prévia. Contudo, a detecção por visualização química (CCD), absorção no ultravioleta ou detecção eletroquímica (CLAE-UV e CLAE-DE) são de especificidade moderada¹⁵. PEAT¹¹³ trabalhou com CLAE acoplada a RIA.

Enquanto Δ^9 -THC pode ser analisado diretamente por CG e CG/MS, o THCCOOH precisa ser derivatizado, devido à sua alta polaridade e à tendência que os ácidos carboxílicos têm de sofrerem descarboxilação em altas temperaturas. A escolha do agente de derivatização afeta em muito o cromatograma, tanto na separação de outros compostos quanto no limite de detecção¹⁵.

Das várias técnicas que têm sido usadas para identificar e quantificar canabinóides em fluidos biológicos, a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/MS) é geralmente considerada técnica que fornece identificação inequívoca. Isto porque o CG/MS possui alta especificidade e sensibilidade, características estas que, entretanto, dependem de muitos fatores. Como exemplo, a

eficiência dos procedimentos de extração e derivatização, a qualidade do cromatograma, o método de ionização, a análise de massa e a sofisticação do processo de manuseio da informação (qualidade de comparação do computador maior ou igual a 98%). Conseqüentemente, o uso de CG/MS para análise de canabinóides não necessariamente assegura que a mais alta sensibilidade foi alcançada, nem que a identificação será conclusiva. Operações ótimas do sistema CG/MS requerem um especialista competente e com experiência, e práticas adequadas de controle de qualidade⁴⁵.

JONES e cols⁷⁴ analisaram 29 amostras de urina por 5 métodos cromatográficos diferentes. Os resultados mostraram boa correlação entre cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta (CLAE-UV), cromatografia gasosa com detectores de captura eletrônica (CG-DEC) e cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (CG-DIC) com 3 diferentes colunas: OV-17, DB-1 e DB-5.

Vários autores trabalharam com CLAE utilizando detector de UV e detector eletroquímico (DE). Eles citam limites de detecção de 50ng/ml trabalhando com 5 ml de urina e de 20 ng/ml para 10ml de amostra. A análise dos resultados de CLAE-DE mostrou menores coeficientes de variação, apontando para uma precisão maior^{65,64,12,42}.

Os métodos que utilizam a cromatografia gasosa são dependentes de derivatização. O CG-DIC é o menos sensível, necessitando de grandes volumes de amostra. O CG-DCE ganha em sensibilidade, podendo detectar canabinóides em 1 ml de amostra, dependendo do agente de derivatização e do solvente de extração. Contudo, ele perde em especificidade, pois as reações de derivatização geram interferentes oriundos de co-extração dos tecidos^{11,40}. Um novo detector para CG, o ITD (Ion Trap Detector) permite a confirmação de THCCOOH em urinas com menos de 10ng/ml, utilizando-se 10 ml de amostra⁹⁷.

Alguns autores consideram o uso da CCD como técnica de confirmação aceitável em várias situações. SUTHEIMER e cols¹³¹ e KOGAN e col⁹⁰ e WILLSON e col¹⁴⁴ citam 100% de confiabilidade na confirmação de amostras positivas por EMIT® ("cutoff" 100ng/ml) e, trabalhando com "cutoff" de 20ng/ml, apenas 4,6% dos resultados correm risco de não serem confirmados usando-se CCD convencional.

FREDERICK e cols⁴⁷ observaram no EMIT® 2-3% de resultados não confirmados por outras técnicas. CCD mostrou ser uma boa técnica de confirmação para EMIT® com eliminação de todos os positivos não confirmados.

Excelente correlação foi encontrada na fase de confirmação, quando amostras positivas por EMIT® eram analisadas por CLAE-UV, CLAE-DE e CCDAE. A confiabilidade nos resultados foi de 100% para concentrações maiores que 20 ng/ml^{65,64}.

BLACK e cols¹² avaliaram 60 amostras de urina por EMIT® ("cutoff" 20ng/ml), CLAE e CCDAE. Os resultados negativos foram todos concordantes. Houve 100% de correlação entre CLAE e CCDAE para resultados positivos.

VINSON e LOPATOFISKY¹³⁵ citam um estudo onde 560 urinas triadas como positivas por EMIT® ("cutoff" 20 ng/ml) foram analisadas por CCDAE. Destas, 517 (92,3%) foram confirmadas positivas por CCDAE. Em 43 amostras não confirmadas, 28 tratava-se de falsos positivos, e 15 não foram confirmadas, possivelmente por perdas na extração ou por interferentes apresentados na urina, que diminuíam a visualização das bandas de THCCOOH. Utilizando-se um "cutoff" maior para triagem (p.e.50ng/ml), a possibilidade de confirmação aumenta⁷².

FOLTZ⁴⁵, em 1984, e BRONNER e cols ¹⁵, em 1992, realizaram estudos de revisão quanto às metodologias empregadas na fase de confirmação por CG/MS. Eles discutem vários aspectos inerentes a essa técnica, como a escolha do agente de derivatização, do solvente extrator, de processo de purificação, método de ionização, etc. Apesar de a técnica de ionização mais empregada ser a do impacto eletrônico, o método mais sensível que foi reportado baseia-se na conversão do THCCOOH em seu éster trifluoroacetato, que é analisado por ionização química-ion negativo (NICI). Devido a sua alta eficiência de ionização e seletividade, menos que 0,1ng de THCCOOH, pode ser quantificado em 1 ml de sangue, plasma ou urina. Ele também pode ser usado para análise de THC, 11-OH-THC e THCCOOH em uma única amostra de 1ml de sangue⁴⁵. Quando se trabalha com impacto eletrônico, o melhor derivado seria o trimetilsilil¹⁵. Outras referências podem ser consultadas para análise em CG/MS^{10,68,35,38,146,115,125,23}.

3. Objetivo e plano de trabalho

O objetivo deste trabalho foi estudar uma metodologia analítica para detecção de usuários de *Cannabis* aplicável às condições existentes nos laboratórios de toxicologia do Brasil.

Para atingir este objetivo, adotou-se o seguinte plano de trabalho :

1. Revisão dos métodos cromatográficos e imunológicos existentes na literatura para identificação de usuários de *Cannabis*;
2. Seleção e estudo de uma metodologia para identificação do principal produto de biotransformação do Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), o 11-nor-9-carboxi- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THCCOOH), em urina, por cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE);
3. Aplicação do método padronizado de CCDAE em urina de usuários e não-usuários de *Cannabis*;
4. Análise das amostras selecionadas por imunoensaio de fluorescência polarizada .
5. Avaliação da correspondência entre os resultados obtidos nas técnicas estudadas.

4. Material e Métodos

4.1 Material

4.1.1 Equipamentos

Vitalab Eclair®, Merck

Agitador mecânico

Centrífuga

Banho de água

4.1.2. Reagentes para Imunoensaio:

dau-TRAK® para canabinóides, Merck

Tampão borato de sódio 10mmol/l, Merck

dau-TRAK® Multicontrol , Merck

4.1.3 Solventes e soluções e agente cromogênico

n-Hexano p.a.

n-Butanol p.a.

n-Heptano p.a.

Clorofórmio p.a.

Metanol p.a.

Ácido acético glacial p.a.

dietilamina p.a.

NaOH 1 N

HCl 1 N

KOH 11,8 N

Fast Blue BB 0,1% em H₂O:MeOH 9:1

4.1.4 Cromatoplasmas HPTLC-60 F250 , Merck

4.1.5 Nitrogênio

4.1.6 Soluções-padrão

Solução-padrão de THCCOOH a 5%, em etanol

Solução-padrão de THCCOOH a 0,5% em etanol

4.1.7 Amostras de urina

As amostras de urinas foram classificadas nos seguintes grupos:

Grupo I - Amostras de urina de usuários de *Cannabis* em três diferentes padrões de uso: ocasional ("leve"), moderado, intenso ("pesado"). Vide tabela 9.

Grupo II - Amostras de urina com resultado positivo para canabinóides, fornecidas pelo Laboratório de Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP - São Paulo.

Grupo III - Amostras de urina provenientes de uma instituição para recuperação de dependentes químicos.

Grupo IV - Grupo controle. Amostras de urina de indivíduos que não faziam uso de *Cannabis*.

Tabela 9. Padrão de uso e mometo de coleta das amostras de usuários do grupo I.

Amostra*	Padrão de uso**	Momento de coleta após exposição a 1 cigarro de Cannabis
1A	-	desconhecido
1B	-	dentro de 24 horas
2	-	desconhecido
3A	-	desconhecido
3B	-	desconhecido
4	"pesado"	desconhecido
5	"pesado"	desconhecido
6A	moderado	24 horas
6B	moderado	48 horas
6C	moderado	72 horas
7A	"pesado"	1 hora
7B	"pesado"	7 horas
8A	ocasional	dentro de 24 horas
8B	ocasional	desconhecido
9A	ocasional	durante a exposição
10	ocasional	36 horas
11A	ocasional	5 horas
11B	ocasional	12 horas
11C	ocasional	24 horas
11D	ocasional	48 horas
11E	ocasional	72 horas
12A	ocasional	48 horas
12B	ocasional	72 horas

* Cada número refere-se a um mesmo indivíduo: as letras significam horários diferentes de coleta.

** Foi adotada a mesma classificação de Mulé e col.¹⁰⁶: ocasional (1/semana), moderado (2-3/semana) e "pesado" (1 ou mais/dia).

4.2 Métodos

4.2.1 Identificação por cromatografia em camada delgada de alta eficiência.

4.2.1.1 Determinação do limite de detecção da técnica de cromatografia em camada delgada de alta eficiência para análise do THCCOOH.

Quantidades variadas de THCCOOH foram aplicadas à placa de CCDAE (5,10,20,50,100,250ng). As condições cromatográficas são as do método de MEATHERALL e GARRIOTT e estão especificadas abaixo:

Adsorvente	- sílica gel
Sistema solvente	- n-heptano:n-butanol:ac.acét. glacial (90:9:1)
Tempo de saturação da cuba	- 15 minutos
Local de aplicação do resíduo	- 1cm da extremidade da placa
Percorso da fase móvel	- 7,5 cm a partir do ponto de aplicação
Agentes cromogênicos	- dietilamina → Fast Blue 0,1% em H ₂ O:MeOH (9:1)

4.2.1.2 Aplicação do método de MEATHERALL e GARRIOTT a adicionados de THCCOOH.

Aplicação do método de MEATHERALL e GARRIOTT às amostras do grupo IV (brancos controles) adicionadas de quantidades variadas de THCCOOH para obtenção de concentrações equivalentes a 5,10 e 20ng/ml de THCCOOH. Os adicionados foram preparados em triplicatas de cada concentração.

Com intercalação aos pontos de aplicação dos resíduos dos adicionados, colocaram-se quantidades variadas de THCCOOH para uma estimativa visual, ainda que subjetiva, da "recuperação" do método.

Método de MEATHERALL e GARRIOTT (método A)

Colocar 5ml^{*} em tubo de centrífuga de 15 ml. Adicionar 0,5ml de solução de NaOH 1N. Levar o tubo ao banho-maria (50-60°C) por 15 minutos. Após resfriamento, acidificar com 1ml de HCl 1N. Adicionar 5ml de n-hexano e submeter os tubos a agitação mecânica suave por 20 minutos. Centrifugar a 1000 g por 5 minutos. Transferir o

^{*}de urina

solvente com auxílio de pipeta pasteur para um tubo pequeno e largo, de fundo redondo, e evaporar a temperatura ambiente, com auxílio de corrente de ar seco. Após evaporação do solvente, ressuspender o resíduo com 3-4 gts da mistura clorofórmio:metanol 3:1 e transferir quantitativamente para as placas de CCDAE.

Fluxograma do método A

4.2.1.3 Aplicação do método de MEATHERALL e GARRIOTT às amostras de usuários (grupo I), e brancos de referência (grupo IV) .

Paralelamente às amostras de usuários, foram analisadas as de voluntários que não faziam uso de Cannabis (branco de referência) e adicionados contendo 20ng/ml de THCCOOH,₁ (preparados a partir dos brancos de referência).

4.2.1.4 Aplicação do método de MEATHERALL e GARRIOTT modificado às amostras de usuários (grupo I), amostras fornecidas pelo LAT (grupo II), amostras enviadas por uma clínica de recuperação de farmacodependentes (grupo III) e brancos de referência (grupo IV).

Método de MEATHERALL e GARRIOTT modificado (método B)

Colocar 5ml de urina em um tubo de centrífuga de 15ml. Adicionar 0,5ml de KOH 11.8 N. Deixar em repouso por 5min a temperatura ambiente. Acidificar com 1,4ml de ácido acético glacial. Adicionar 5ml de n-hexano e prosseguir conforme o método descrito em 4.2.1.2.

Fluxograma do Método B

4.2.2 Imunoensaio de fluorescência polarizada

4.2.2.1 Aplicação do método de imunoensaio de fluorescência polarizada às amostras selecionadas para esse estudo. Utilizou-se o método preconizado pelo fabricante:

1. Colocar 10 μ l do controle médio (cutoff) em um tubo de ensaio e 1ml do tampão (branco do controle). Em outro tubo de ensaio colocar 10 μ l do controle e 1ml do reagente. Deixar os tubos por 12 minutos na unidade de incubação. Calibrar o aparelho com esta solução.
2. Repetir o mesmo processo com os controles baixo e alto. Ler os controles.
3. Colocar 10 μ l da amostra em 2 tubos de ensaio. Em um deles adicionar 1ml de tampão e no outro 1ml do reagente. Incubar por 12 min e ler branco e amostra.

4.2.2.2 Construção da curva-padrão para estudo do método de imunoensaio de fluorescência polarizada na detecção de THCCOOH em urina.

Com o objetivo de estudar a correlação entre concentração de THCCOOH presente nas amostras e polarização da fluorescência, foi construída curva-padrão utilizando os próprios controles fornecidos pelo fabricante (dau-TRAK®Multicontrol), de acordo com as condições apresentadas na tabela 10.

Tabela 10. *Preparação da curva-padrão referente a análise de THCCOOH por imunoensaio de fluorescência polarizada.*

Controle tipo/concentração	volume utilizado	THCCOOH (ng)	volume do reagente
baixo / 20ng/ml	10 μ l	0,020	1ml
baixo	18 μ l	0,036	1ml
cutoff / 50ng/ml	10 μ l	0,050	1ml
cutoff + baixo	10 μ l+13 μ l	0,076	1ml
cutoff	20 μ l	0,100	1ml
alto / 500ng/ml	4 μ l	0,200	1ml
alto	10 μ l	0,500	1ml

Com a chegada de uma nova remessa de reagentes uma segunda curva-padrão foi confeccionada tendo em vista que os resultados obtidos com a análise das amostras por esses reagentes não poderiam ser comparados com a primeira curva-padrão. As condições preparação foram as mesmas adotadas para a primeira curva.

5. Resultados

5.1 Determinação do limite de detecção da técnica de cromatografia em camada delgada de alta eficiência para análise do THCCOOH.

Após aplicação de quantidades variadas de THCCOOH à placa de CCDAE, a menor quantidade visualizada foi 10ng.

5.2 Aplicação do método de MEATHERALL e GARRIOTT a adicionados de THCCOOH.

Os resultados obtidos com a análise de adicionados de THCCOOH permitiu uma avaliação visual, ainda que subjetiva, do método. Os adicionados de 20ng/ml tinham bandas comparáveis às produzidas por mais de 50 e menos de 100ng de THCCOOH. Os adicionados de 10ng/ml tinham bandas correlacionadas com 30ng de THCCOOH e os de 5ng/ml com menos de 20ng de THCCOOH.

5.3 Aplicação do método de MEATHERALL e GARRIOTT a amostras de usuários de *Cannabis* (grupo I e IV).

As amostras de usuários do grupo I foram submetidas ao método A. As manchas obtidas foram visualmente comparadas com quantidades conhecidas de THCCOOH aplicadas diretamente à placa, e os resultados estão na tabela 11.

Nenhuma das amostras do grupo IV (branco de referência) forneceu mancha da mesma cor e R_f do padrão de THCCOOH.

Tabela 11 - Resultado da análise por CCDAE das amostras de usuários de Cannabis (grupo I) pelo método de MEATHERALL e GARRIOTT (método A).

Amostra	CCDAE (método A)
1 A	-
1 B	+
2	+
3 A	-
3 B	++
3 C	-
4	+++
5	+++
6 A	++
6 B	+
6 C	+
7 A	+++
7 B	+++
8 A	+
8 B	ND/+
9 A	ND
9 B	ND
10	++
11 A	++
11 B	++
11 C	+
11 D	+
11 E	ND/+
12 A	+
12 B	+

Legenda: + comparáveis a 20–50 ng/ml THCCOOH
 ++ comparáveis a 100 ng/ ml THCCOOH
 +++ comparáveis a >200 ng/ ml THCCOOH
 ND não detectado
 (-) amostras não analisadas

5.4 Aplicação do método de MEATHERALL e GARRIOTT modificado (método B) às amostras de usuários (grupo I), amostras fornecidas pelo LAT (grupo II) e amostras enviadas por uma clínica de recuperação de farmacodependentes (grupo III).

Tabela 12 - Resultado da análise por CCDAE das amostras de usuários de Cannabis do grupo I pelo método de MEATHERALL e GARRIOTT modificado (método B), utilizando 3ml de amostra.

Amostra	CCDAE(método B)*
1A	++
1B	+
2	ND
3A	+++
3B	++
3C	+++
4	+++
5	+++
6A	+
6B	+
6C	+
7A	+++
7B	+++
8A	+
8B	ND
9A	ND
10	ND
11A	+
11B	+
11C	+
11D	+
11E	ND
12A	+
12B	+

Legenda: + comparáveis a 20–50ng/ml THCCOOH
 ++ comparáveis a 100ng/ml THCCOOH
 +++ comparáveis a mais de 200ng/ml THCCOOH
 ND= não detectado

As figuras 12 e 13 são fotografias de cromatogramas típicos obtidos por esta metodologia.

Figura 12. Cromatograma típico obtido com a aplicação do método de MEATHERALL e GARRIOTT às amostras de usuários de Cannabis.

Figura 13. Cromatograma típico obtido com a aplicação do método de MEATHERALL e GARRIOTT às amostras de usuários de Cannabis.

Os valores de **hRf** obtidos do padrão de THCCOOH, acompanhados dia a dia, num total de dezesseis determinações, apresentaram valor médio igual a 34, com desvio-padrão = 3 e coeficiente de variação = 8,82%. Não foi observada variação significativa no **hRf** para uma mesma placa.

Tabela 13 - Resultados da análise por CCDAE das amostras de usuários de Cannabis do grupo II pelo método de MEATHERALL E GARRIOTT modificado (método B).

Amostra	CCDAE
1L	+++
2L	+
3L	ND
4L	++
5L	ND
6L	ND
7L	+
8L	+
9L	+
10L	+++
11L	ND
12L	++
13L	++
14L	++
15L	+
16L	ND
17L	ND

Legenda: + comparáveis a 20–50ng/ml THCCOOH
 ++ comparáveis a 100ng/ml THCCOOH
 +++ comparáveis a mais de 200ng/ml THCCOOH
 ND= não detectado

Tabela 14 - Resultados da análise por CCDAE das amostras de usuários de Cannabis do grupo III pelo método de MEATHERALL e GARRIOTT modificado (método B).

Amostra	CCDAE
1F	+++
2F	+
3F	+
4F	+
5F	+
6F	++
7F	+
8F	+
9F	ND
10F	ND
11F	ND
12F	+

Legenda: + comparáveis a 20–50ng/ml THCCOOH
 ++ comparáveis a 100ng/ml THCCOOH
 +++ comparáveis a mais de 200ng/ml THCCOOH
 ND = não detectado

5.5 Aplicação do método de Imunoensaio de fluorescência polarizada às amostras de usuários de *Cannabis*.

Tabela 15 - Resultados obtidos no imunoensaio de fluorescência polarizada (FPIA) para amostras de usuários do grupo I, no "cutoff" de 20ng/ml.

Amostra	FPIA
1A	positivo
1B	positivo
2	positivo
3A	positivo
3B	positivo
3C	positivo
4	positivo
5	positivo
6A	positivo*
6B	negativo
6C	negativo*
7A	positivo
7B	positivo
8A	negativo
8B	negativo
9A	positivo
10	positivo*
11A	negativo
11B	positivo
11C	negativo
11D	positivo
11E	negativo
12A	positivo
12B	positivo

* próximo ao valor de "cutoff".

Tabela 16 - Resultados obtidos no imunoensaio de fluorescência polarizada (FPIA) para amostras de usuários de Cannabis do grupo II, no "cutoff" de 20ng/ml.

Amostra	FPIA
1L	positivo
2L	negativo
3L	negativo
4L	positivo
5L	negativo
6L	negativo
7L	positivo*
8L	negativo
9L	positivo*
10L	positivo
11L	negativo*
12L	positivo
13L	positivo
14L	positivo
15L	positivo
16L	positivo*
17L	negativo

* próximo ao valor de "cutoff".

Tabela 17 - Resultados obtidos no imunoensaio de fluorescência polarizada (FPIA) para as amostras de usuários de Cannabis do grupo III, no "cutoff" de 20ng/ml.

Amostra	FPIA
1F	positivo
2F	positivo
3F	negativo*
4F	positivo
5F	positivo
6F	positivo
7F	negativo*
8F	negativo*
9F	negativo
10F	negativo
11F	negativo
12F	positivo

* próximo ao valor de "cutoff".

5.6 Estudo da técnica de imunoensaio de fluorescência polarizada: construção da curva-padrão.

Os resultados da análise em triplicata de cada concentração estão relacionados na tabela 18.

Tabela18 - Resultados em milipolarizações (mP) obtidos no imunoensaio de fluorescência polarizada para diversas concentrações de THCCOOH; desvio-padrão e coeficiente de variação calculados para cada concentração.

Concentração	mP	média	DP	CV%
20 ng/ml	140,4 149,5 150,4	146,7	5,53	3,76
36 ng/ml	143,2 140,8 136,2	140,0	3,55	2,53
50 ng/ml	139,2 132,4 133,7	135,1	3,60	2,66
76 ng/ml	132,4 129,8 130,6	130,9	1,33	1,01
100ng/ml	124,1 128,2 123,5	125,2	2,55	2,03
200ng/ml	110,0 112,9 109,7	110,8	1,76	1,58
500ng/ml	101,4 103,4 101,1	101,9	1,25	1,22

mP = milipolarização

A figura 14 mostra a curva-padrão obtida. As curvas paralelas em traços alternados representam, respectivamente, 1 desvio-padrão (DP) e 2 DP. A análise através de regressão forneceu a seguinte equação : $y = bx^a$, onde $a = -0,119459$ e $b = \text{Ln } a$. Coeficiente de correlação = -0,990378 .

Figura 14. Curva-padrão obtida por imunoensaio de fluorescência polarizada (resultados expressos em milipolarizações –mP–), para diferentes concentrações de THCCOOH (ng/ml).

Os resultados da análise em triplicata de cada concentração para confecção da 2ª curva-padrão estão na tabela 19.

Tabela 19- Resultados em milipolarizações obtidos para confecção da 2ª curva-padrão. Desvio-padrão e coeficiente de variação calculados para cada concentração.

Concentração	mP	média	DP	CV%
20 ng/ml	135,9 139,6 138,3 135,5	137,8	1,95	1,42
36 ng/ml	131,9 129,2 126,5 138,0 139,5	133,0	5,59	4,20
50 ng/ml	132,0 130,9 128,3 127,3 128,3	129,3	1,98	1,54
76 ng/ml	123,6 120,9 124,3 125,0	123,4	1,79	1,45
100 ng/ml	109,8 112,0 119,8 118,1	114,9	4,78	4,16
200 ng/ml	98,0 98,4 101,5 101,0	99,7	1,78	1,79
500 ng/ml	92,9 91,6 93,4 90,9	92,2	1,15	1,25

mP= milipolarização

A figura 15 mostra a curva - padrão obtida com estes resultados. Na equação $y=bx^a$, $a= -0,137084$, $b= \text{Ln } a$, e o coeficiente de correlação obtido = $-0,979249$.

Figura 15. Curva-padrão obtida por imunoensaio de fluorescência polarizada (resultados expressos em milipolarização –mP–), para diferentes concentrações de THCCOOH (ng/ml).

Tabela 20. Concentrações prováveis de THCCOOH nas amostras de usuários de Cannabis do grupo I, obtidas por comparação com a curva-padrão.

Amostra	concentração provável de canabinóides (ng/ml)
1 A	111,5
1 B	38,9
2	26,4
3 A	155,3
3 B	32,1
3 C	925,5
4	455,9
5	459,5
6 A	29,7
6 B	17,5
6 C	24,3
7 A	393,4
7 B	311,2
8 A	21,6
8 B	8,3
9 A	28,2
9 B	15,6
10	27,1
11 A	19,0
11 B	38,3
11 C	18,1
11 D	33,1
11 E	16,3
12 A	51,2
12 B	32,4

Tabela 21. Concentrações prováveis de THCCOOH nas amostras de usuários de Cannabis do grupo II, obtidas por comparação com a curva-padrão.

Amostra	concentração provável de THCCOOH (ng/ml)
1L	588,6
2L	16,8
3L	20,6
4L	64,1
5L	18,0
6L	17,6
7L	27,4
8L	20,0
9L	27,3
10L	239,2
11L	25,6
12L	32,4
13L	88,7
14L	118,2
15L	33,9
16L	31,6
17L	16,7

Tabela 22. Concentrações prováveis de THCCOOH em amostras de usuários de Cannabis do grupo III, obtidas por comparação com a curva-padrão

Amostra	Concentração provável de THCCOOH (ng/ml)
1F	396,5
2F	40,0
3F	21,5
4F	58,9
5F	82,3
6F	55,6
7F	25,5
8F	16,7
9F	11,0
10F	11,4
11F	18,4
12F	31,7

DISCUSSÃO

Desenvolver em nosso país um estudo analítico que envolva drogas de abuso representa mais uma dificuldade, além das que normalmente enfrentamos na pesquisa científica.

Pela rigidez de nossa legislação, seria impossível seguir os mesmos padrões éticos e jurídicos utilizados por pesquisadores em outros países. No Brasil, não é permitido fornecer substância de uso ilícito, ou mesmo presenciar sua utilização, o que se constituiria em flagrante delito, e diante do qual todo cidadão pode e todo policial deve agir de conformidade com a lei, no sentido de deter o indivíduo infrator.

Por outro lado, o fornecimento de um fluido biológico devidamente identificado pode-se constituir em prova contra o doador, já que o uso de uma substância caracterizada como de uso ilícito constitui crime.

O grande problema ainda é a obtenção de amostras de usuários.

No sentido de contornar este problema, de início, pretendíamos trabalhar junto a clínicas de recuperação de farmacodependentes. Quando do ingresso destes indivíduos na instituição, seria solicitada informação quanto ao uso anterior de *Cannabis*, e caso a resposta fosse positiva, o indivíduo seria informado sobre este trabalho científico e convidado a participar através da doação de uma amostra.

Todo este trabalho seria realizado pelos funcionários das clínicas, e em nenhum momento a amostra identificada ou o usuário em recuperação conhecido por pessoas não pertencentes ao quadro de funcionários das clínicas.

Porém o pequeno número de amostras obtido dessa maneira e a escassez de informações nos levaram a procurar outras fontes de obtenção de amostras.

Uma segunda opção seria o Laboratório de Análises Toxicológicas (LAT) da FCF-USP. As amostras analisadas por imunoensaio de fluorescência polarizada, com resultado positivo para canabinóides, seriam cedidas para a realização deste trabalho.

Ainda assim, eram totalmente desconhecidas as informações sobre padrão de uso da droga e último uso antes da coleta de amostra.

Algumas pessoas, entendendo a importância deste trabalho e sensibilizadas com as dificuldades que se vinha tendo com a obtenção de amostras e informações, contactaram terceiros, no sentido de encontrarem usuários que quisessem colaborar com esta pesquisa, tendo a garantia de total confidencialidade por parte destas pessoas.

Sendo assim, algumas amostras chegaram, em frascos de vidro sem identificação do doador, numerados aleatoriamente e com informações muito interessantes.

Apesar de não ser possível garantir a precisão dessas informações, especialmente em relação ao horário das coletas, por se tratar de voluntários, não questionamos a veracidade das informações ou a autenticidade das amostras. As informações disponíveis estão relatadas na tabela 9.

Outra dificuldade encontrada foi o período de recebimento das amostras. As do grupo I foram recebidas de novembro de 92 a dezembro de 93. As amostras provenientes do LAT e de uma clínica de recuperação, foram obtidas durante dois anos.

Outro obstáculo a ser vencido foi a obtenção do padrão de THCCOOH. A aquisição dessa substância, encontrada apenas no Exterior, carece de autorização especial para importação, emitida por entidades governamentais. Devido às barreiras burocráticas, leva-se mais tempo para importar esta substância do que o normalmente gasto em procedimentos de importação.

Graças a uma doação da Organização Mundial de Saúde ao LAT é que conseguimos o padrão de THCCOOH utilizado neste trabalho. A realização da análise toxicológica forense, desta forma, enfrenta muitas restrições em nosso país.

Toda esta dificuldade em obter amostras pode ter sido a causa desta lacuna de conhecimentos em nosso país, que vai desde a correta utilização de técnicas analíticas até a interpretação de resultados.

Trabalhos anteriores^{118,120} trouxeram uma colaboração importante para os toxicologistas forenses, mas ainda assim faltava estudar uma metodologia que fosse acessível, de baixo custo e confiável na detecção do uso de *Cannabis*.

Essa foi a finalidade deste trabalho.

A extensa revisão que realizamos na literatura especializada nos levaram a selecionar o método preconizado por MEATHERALL e GARRIOTT⁹⁸ para ser estudado.

Este método recomendava o uso da cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE), uma técnica cujo princípio é relativamente bem conhecido pelos toxicologistas forenses em todo o país, devido a utilização da cromatografia em camada delgada. Os resultados obtidos com a aplicação desse método, demonstrou sua eficácia na detecção do THCCOOH.

Utilizando as condições cromatográficas preconizadas no método de referência, foi alcançada a sensibilidade de 10ng para o padrão de THCCOOH.

No estudo com adicionados, a sensibilidade encontrada foi de 5ng/ml utilizando 5ml de amostra. MEATHERALL e GARRIOTT⁹⁸ relatam sensibilidade de 5ng/ml a partir da utilização de 2ml de amostra. A causa desta diferença de sensibilidade foi, provavelmente, em decorrência do padrão. Na época em que estes testes foram feitos o padrão já apresentava no cromatograma uma pequena mancha secundária que, a partir das informações disponíveis, supomos tratar-se do Δ^9 -THC, produto de descarboxilação do THCCOOH⁷⁷.

Em relação à recuperação, por não haver densitômetro disponível, este estudo não pode ser realizado. Um ensaio de estimativa visual, ainda que de valor subjetivo, poderia ter alguma validade, pelo menos para avaliar os resultados obtidos dentro das nossas condições de trabalho.

Sendo assim, adicionados foram preparados em triplicata e comparados com quantidades conhecidas de THCCOOH aplicadas diretamente à placa. Os resultados obtidos foram compatíveis com a faixa relatada por MEATHERALL (60–82%), tendendo ao limite inferior para concentrações menores que 20ng/ml.

Nos trabalhos consultados, onde a CCDAE foi utilizada, os volumes de amostra eram de 2ml^{135,98} e 10ml^{12,64}. Como o limite de sensibilidade neste trabalho foi de 5ng/ml partindo-se de 5ml de amostra, passou-se a utilizar este volume de amostra.

Apesar desta diferença de sensibilidade, os resultados que encontramos foram satisfatórios, tendo em vista que a literatura relata que as concentrações normalmente encontradas em usuários ocasionais e pesados variam de 20–500 ng/ml^{99,106}. Além disso, não existe atualmente um consenso em torno do cutoff a ser utilizado na fase de triagem para canabinóides. O National Institute of Drug Abuse (NIDA) estabelece o valor de 100ng/ml. Entretanto, alguns autores têm recomendado a utilização de um cutoff menor, com base na faixa de concentração relacionada ao uso ocasional. Comercialmente estão disponíveis calibradores com 20, 25, 50 e 75 ng/ml, entre os diferentes fabricantes. O mais utilizado tem sido 50ng/ml.

Para a fase de confirmação, a NIDA estabelece um cutoff de 15ng/ml para o THCCOOH. Portanto, a sensibilidade de 5ng/ml é mais do que suficiente para satisfazer as exigências analíticas dos programas de controle do uso de drogas de abuso, e o volume de amostra de 5ml é um volume facilmente obtido.

Na fase de preparação da amostra, a grande maioria dos autores não dispensam o uso de hidrólise, especialmente a alcalina. Isto se deve às características de eliminação do THCCOOH do organismo. A concentração de sua forma livre na urina é pequena e tende a diminuir a medida que a eliminação prossegue até desaparecer completamente cerca de 8h após a exposição, sendo que a forma conjugada é a única encontrada após este período⁷⁹. No trabalho, o aumento no volume de amostra foi acompanhado, então, por um aumento proporcional no volume de álcali utilizado no passo de hidrólise. Isto porque os autores que trabalharam com NaOH utilizaram um volume de álcali correspondente a 10% do volume de amostra^{105,135,98,90,144}.

As condições ideais para a hidrólise alcalina com NaOH 6M, estudadas por VINSON e LOPATOFISKY¹³⁵ foram seguidas por MEATHERALL⁹⁸, que trabalhou com

NaOH 1N. Estas condições foram adotadas inicialmente neste trabalho e basicamente envolvem submeter a amostra à temperatura de 50–60°C durante 15 minutos.

A grande maioria dos trabalhos realiza a extração do THCCOOH da urina em meio ácido, pH 4^{105,50,97,135,98,90,144,45}. Em relação ao aumento do volume de amostra de 2 para 5ml, e do volume do álcali para 0,5ml, não houve necessidade de aumento proporcional do HCl 1N utilizado por MEATHERALL na fase de acidificação da amostra, pois o pH continuava inferior a 4. Quando utilizado o método B, a acidificação da amostra era feita com ácido acético glacial, pois este era o ácido recomendado pelos autores^{97,86}, além do que bastava um pequeno volume, cerca de 1,4ml, para produzir o pH desejado (pH 4).

Para a extração líquido/líquido de canabinóides, vários solventes são citados na literatura. Entre os mais citados está o hexano^{81,98,15} e a mistura hexano:acetato de etila 7:1^{6,23,105,97,10}. Os autores que trabalham com hexano relatam que ele produz extratos com menos interferentes, sem necessidade de purificação posterior, o que permite sua aplicação direta em cromatografia em fase gasosa.

Ambos os solventes foram estudados, e a substituição do hexano por hexano:acetato de etila não produziu aumento significativo na intensidade das bandas de THCCOOH. Pelo contrário, a presença de um segundo solvente mais polar produziu resíduos mais "sujos", e para algumas amostras isto chegou a interferir na visualização das bandas na CCDAE. Esta observação está de acordo com o verificado por MEATHERALL, que relata o arraste de impurezas feito pela mistura de solventes e sua influência sobre a detecção do THCCOOH.

Um solvente alternativo, o ciclohexano, mostrou ser equiparável ao n-hexano quando utilizado na extração de amostras de usuários. Ele é citado na literatura misturado com acetato de etila na proporção 96:4⁷⁷. Contudo como o efeito da adição de solventes mais polares já era conhecido, ele foi utilizado sozinho.

Embora tenha sido utilizado um volume de amostra maior que o recomendado no método de MEATHERALL e GARRIOTT, isto é, 5ml, o volume do solvente extrator não foi

alterado. A emulsão formada na fase de agitação mecânica é facilmente quebrada na etapa de centrifugação, usando 1000g por 5min. As amostras que produziram emulsão mais persistente foram tratadas como indicado no método original, ou seja, a emulsão foi separada, acrescida de algumas gotas de n-butanol e novamente centrifugada. A parte superior que contém o hexano é retirada com auxílio de pipeta pasteur.

Alguns problemas de recuperação foram observados em resíduos que, apesar de virtualmente secos, após reconstituição pela mistura solvente clorofórmio:metanol 3:1, apresentavam dificuldades na transferência para placa, como se contivessem água residual. Neste caso, duas importantes observações precisam ser feitas. Primeiramente, muita atenção tem que ser dada à possível transferência de emulsão residual no processo de separação das fases. Uma gota de emulsão pode gerar um pequeno resíduo denso que, mesmo depois de seco, ao ser ressuspendido, atrapalha a transferência de material para a placa.

Outro aspecto a ser levado em consideração é o processo de evaporação do solvente. A citação de MEATHERALL quanto à utilização de corrente de ar seco nos levou a testar a utilização de uma simples corrente de ar obtida com o uso de um secador de cabelo. Uma corrente a frio e suave era suficiente para evaporar o hexano a temperatura ambiente, sem maiores problemas.

O processo, contudo, era moroso, e em dias frios ou úmidos ocorria algumas vezes condensação de água nas paredes dos recipientes que continham o resíduo.

A conjugação do secador de cabelo com um banho-maria (50°C) minimizou o problema de condensação de água, entretanto, o processo de evaporação continuava lento e preocupava o tempo em que o resíduo permanecia sob ação do calor, visto como este é um fator deletério para o THCCOOH. Como Meatherall indicava o uso de corrente de ar seco, passou-se a evaporar o solvente sob corrente de nitrogênio, pois este era tratado com sílica gel antes de chegar à amostra.

Mesmo assim, não foi possível dispensar o uso de banho-maria, devido ao problema de condensação de água nas paredes dos recipientes. Por precaução, a

temperatura de 45–50°C nunca foi ultrapassada. Ainda que o resíduo no fundo do recipiente esteja seco, deve-se observar suas bordas superiores, para não ocorrer que, no processo de ressuspensão, alguma gotícula de água seja arrastada das paredes laterais para o fundo do recipiente. Todo resíduo de difícil transferência gerava banda mais difusa, e em algumas amostras de usuários ocasionais não foi possível visualizar a banda referente ao THCCOOH.

Alguns trabalhos mencionam a necessidade de se trabalhar com vidraria silanizada. Segundo MEATHERALL⁹⁸, vários solventes são capazes de recuperar todo o THCCOOH do resíduo se a vidraria for silanizada. Caso não seja silanizada, somente álcoois ou misturas de clorofórmio ou diclorometano que contenham no mínimo 5% de etanol ou metanol são capazes de recuperar todo o THCCOOH. Como silanizar o material pode representar uma dificuldade e um custo a mais, adotamos como solvente para ressuspensão de resíduo a mistura clorofórmio:metanol 3:1, utilizada por MEATHERALL⁹⁸. Os sistemas solventes indicados para fase móvel nos trabalhos com CCDAE são misturas que envolvem, geralmente, n-heptano, ácido acético glacial e um terceiro solvente que pode ser acetona^{12,64}, éter¹³⁵ ou n-butanol⁹⁸. MEATHERALL e GARRIOTT utilizaram o n-butanol. Os valores de R_f obtidos com a utilização destas fases móveis são próximos: 38^{12,64}, 32-34¹³⁵ e 40⁹⁸.

A saturação da fase móvel parece ocorrer dentro de 15 minutos. Tempos maiores não oferecem nenhuma vantagem. Em nossa experiência, nunca foi possível obter bons cromatogramas desenvolvendo 2 ou 3 placas simultaneamente. Nem mesmo retirando uma e colocando outra logo de imediato. O front do solvente apresenta irregularidades, e problemas típicos de insaturação ocorrem freqüentemente. Melhores resultados são obtidos com fase móvel recentemente preparada e eluição de uma placa por vez. Caso seja necessário eluir outra placa, deve-se novamente esperar 10–15 minutos antes de desenvolver o segundo cromatograma, para que novamente se alcance a saturação da cuba.

Após o desenvolvimento, as placas eram deixadas na capela, a temperatura ambiente, por 5–10 minutos; tempo suficiente para evaporação do solvente.

A reação colorimétrica mais específica e a preferida para identificação de canabinóides por CCD e CCDAE envolve a reação de canabinóides com o corante Fast Blue. Três variações deste corante são mencionadas na literatura: o Fast Blue B ^{12,64,107,78}, o Fast Blue RR ^{77,90} e o Fast Blue BB^{98,135,131,63,96,86}. Este último apresenta vantagens sobre os dois primeiros, como já citado anteriormente, e foi a escolha feita para este trabalho.

Como considerado anteriormente, nos aspectos analíticos, a basicidade do cromógeno é importante para o desenvolvimento da cor. A dietilamina possui vantagens já mencionadas anteriormente em relação a outros álcalis e tem sido muito citada na literatura^{131,98,96,86}. Ela foi o álcali escolhido e sua aplicação segue as recomendações feitas por MEATHERALL, ou seja, ela deve ser aplicada antes e depois do Fast Blue BB.

Depois de secos, os cromatogramas são nebulizados com dietilamina e , logo a seguir, a solução de Fast Blue BB é aplicada. No preparo da solução de Fast Blue BB 0,1% , devido a dificuldades encontradas na sua dissolução, o sal é inicialmente dissolvido em 1ml de metanol e completado volume para 10ml com água destilada. Isto acelera a dissolução do corante.

Após 5–10 minutos as placas eram observadas e, depois de totalmente secas, eram envolvidas por filme plástico transparente, e guardadas em caixa de isopor, ao abrigo da luz. Nestas condições observamos que os cromatogramas eram estáveis por vários meses. Alguns permanecem com a cor original mesmo depois de 2 anos. Outros adquiriram um fundo mais escuro, alaranjado. Segundo relatado por alguns autores ^{135,98} isto se deve à aplicação de soluções mais concentradas de Fast Blue BB.

Esta durabilidade dos cromatogramas também foi mencionada por MEATHERALL⁹⁸ , VINSON¹³⁵ e em uma publicação da Organização Mundial de Saúde¹⁰⁹, exceto que aqui os cromatogramas não foram guardados no freezer, e sim, em caixas de isopor.

Isto constitui-se em vantagem, principalmente para a análise de caráter forense, sendo o próprio cromatograma uma forma de documentar os resultados para consulta posterior.

Em relação ao tempo máximo que se pode esperar entre a aplicação do resíduo e o desenvolvimento do cromatograma (2 horas), e entre o desenvolvimento e a revelação (2 horas), sempre foram respeitados esses limites durante este trabalho. Quando o padrão foi aplicado à placa e, na manhã seguinte, ela foi revelada, não visualizou-se o padrão de THCCOOH.

Os resultados obtidos mostram boa reprodutibilidade nos valores de hRf. A análise inter-série de 16 cromatogramas produziu um valor médio de hRf igual a 34 com desvio-padrão = 3. Excetuando-se alguns problemas devido à insaturação, não foi observada variação significativa no hRf para uma mesma placa.

MEATHERALL⁹⁸ se refere, não ao hRf, mas à distância de migração a partir do ponto de aplicação da amostra, para um percurso de 7,5cm. O autor relata um valor médio de 3cm com variações dia a dia de mais ou menos 0,5cm. Isto equivaleria a falar de um hRf médio = 40. Ele preferiu trabalhar com Rf relativo e usar o canabinol como referência. Como não havia disponibilidade deste canabinóide em nosso laboratório, trabalhamos apenas com o THCCOOH.

Em relação à influência das substâncias normalmente presentes na urina, não observamos alteração o hRf do THCCOOH. Em todos os cromatogramas o hRf das amostras coincide com o hRf do padrão. Segundo MEATHERALL, esta qualidade é atribuída ao solvente extrator, no caso, o hexano, que fornece extratos limpos. O mesmo não é observado quando se trabalha com outros solventes.

A literatura cita, pelo menos, 4 trabalhos onde foi pesquisada a interferência de outras substâncias na identificação de canabinóides por cromatografia em camada delgada^{77,86,47,63} e o próprio Meatherall testou a interferência de 118 fármacos e produtos de biotransformação no método proposto, com resultados negativos.

A esse método de MEATHERALL⁹⁸, cuja única alteração importante foi em relação ao volume de amostra, chamamos de método A. Por este método, foram analisadas as amostras de usuários do grupo I, primeiro grupo de amostras disponível para estudo, tendo em vista que seria impossível estudar a hidrólise através de adicionados de THCCOOH. Nesse estudo, era sempre realizada, em paralelo, a análise de um branco e de um adicionado.

Neste primeiro grupo, doze usuários participaram doando amostras (n=25). Segundo a classificação de MULÉ e cols¹⁰⁶, três eram usuários "pesados"(uso de um ou mais cigarros de *Cannabis* por dia); um era usuário moderado (uso de 2 a 3 cigarros de *Cannabis* por semana); e cinco eram usuários ocasionais (uso de um cigarro de *Cannabis* por semana ou menos). Os três usuários restantes não informaram seu padrão de uso.

O conhecimento do padrão de uso é importante porque existe uma correlação direta entre frequência de uso e período de detecção de canabinóides na urina. O efeito acumulativo do THC no organismo humano, devido ao uso repetido de *Cannabis*, e sua liberação lenta com conseqüente biotransformação⁷¹, explica as altas concentrações de canabinóides encontradas na urina de usuários "pesados" , por muitos dias após uso de *Cannabis*, e resultados positivos no exame de urina por mais de 21 dias após o último uso³⁷.

Em 21 das 25 amostras de usuários foi observada mancha em formato de banda, da mesma cor e hRf do padrão de THCCOOH. Somente 4 amostras passaram como negativas por esta metodologia. Duas delas foram colhidas uma hora após o indivíduo fumar meio cigarro de *Cannabis*: considerando que se tratava de usuário ocasional, não era de se esperar resultado positivo, já que neste período apenas se inicia o aparecimento do THCCOOH na urina⁸. No usuário 7, um usuário "pesado", a quantidade de THCCOOH encontrada reflete, provavelmente, exposições anteriores, já que a amostra também foi colhida uma hora após fumar um cigarro. As outras duas amostras (11E e 8B) estavam, supostamente, no limite de sensibilidade do método,

pois análises repetidas ora davam resultado levemente positivo, oram davam negativo. Este fato fortaleceu ainda mais a determinação de trabalharmos com 5ml de amostra, tendo em vista que uma destas amostras tinha sido colhida 72 horas após a utilização de um cigarro de *Cannabis* por um usuário ocasional.

Pela observação dos resultados obtidos, as bandas de THCCOOH eram bem mais evidentes nos usuários pesados, com dimensões comparáveis às produzidas por quantidades maiores que 200ng de THCCOOH. Em usuários leves e moderados, essas bandas foram visualmente comparáveis a quantidades entre 20–100ng de THCCOOH.

Nas condições em que este trabalho foi desenvolvido, foi possível detectar a presença de THCCOOH na urina de um usuário ocasional até 72 horas após a utilização de um cigarro de *Cannabis*.

Um usuário do grupo I, de padrão de uso ocasional (usuário 11), foi o único a fornecer amostras em horários regulares. Da primeira coleta, 5 horas após o uso de um cigarro, até a última, 72 horas após a exposição, obteve-se resultados positivos.

Nas primeiras 24 horas observa-se quantidade maior de THCCOOH do que nas coletas subsequentes (48 e 72h). Os mesmos resultados foram observados com o usuário número 6.

Estes resultados mostram uma excreção urinária de maiores concentrações de THCCOOH nas primeiras 24 horas. Isto está de acordo com os resultados obtidos por JOHANSSON e cols⁷¹ para usuários ocasionais.

Tendo em vista citações na literatura de metodologias que não envolviam a etapa de hidrólise^{136,108}, foi experimentada a extração com éter etílico em pH 4 e a extração com hexano:isobutanol 9:1 em pH levemente ácido (adição de tampão fosfato 0,1M - pH 6). Com amostras de usuários analisadas por estas metodologias não foram obtidos bons resultados, com queda de rendimento afetando principalmente as amostras de usuários ocasionais.

Consideramos, então, a hidrólise, uma etapa indispensável no processo analítico para detecção de THCCOOH em urina de usuários leves e moderados. Nos usuários

pesados existe uma quantidade maior de THCCOOH livre³, o que pode explicar o prejuízo menor causado pela ausência da etapa de hidrólise

Um outro estudo desenvolvido foi verificar a possibilidade de realização da hidrólise do THCCOOH-conjugado à temperatura ambiente, como relatado por KING⁸⁶ e McCURDY⁹⁷. Os autores usam, como álcali, o KOH 11,8N, e relataram que a hidrólise é completa após 5 minutos à temperatura ambiente.

O tempo necessário para a hidrólise foi verificado em duas amostras de usuários ocasionais. Usuários "pesados" não foram utilizados porque, como visto anteriormente, possuem maior concentração da forma livre.

Tempos de 5 e 15 minutos foram utilizados para 5ml de amostra e comparados ao método de MEATHERALL. Não foi observada diferença significativa em relação ao tempo de hidrólise. A hidrólise era eficaz 5 minutos após a adição de 0,5ml de KOH 11.8N (10% do volume de amostra). A esta modificação no processo de hidrólise chamamos de método de MEATHERALL modificado ou método B.

Para verificar o impacto da redução do volume de amostra para 3ml sobre os resultados nos três diferentes padrões de uso, duas amostras de usuários ocasionais (24 e 48 horas após a utilização de um cigarro de *Cannabis*) foram inicialmente utilizadas.

Para estes usuários, não foi verificada nenhuma diferença em termos qualitativos quando se parte de 5ml ou 3ml de amostra. O resultado continuava positivo.

Contudo, quando todas as amostras do grupo I foram analisadas pelo método de MEATHERALL e GARRIOTT modificado (método B) a partir de 3ml de amostra, uma diferença para menos foi observada para algumas amostras (6A, 10, 11A e 11B), e uma amostra positiva apareceu como negativa (2).

A partir desses resultados, optamos por trabalhar com 5ml de amostra, e as amostras de usuários, que chegaram após esta etapa do trabalho, passaram a ser analisadas pelo método B, por ser mais rápido, simples e não envolver utilização de calor.

As amostras fornecidas pelo LAT foram analisadas pelo método B. Todas as amostras (n=17) apresentaram resultados positivos por imunoensaio de fluorescência polarizada e por CCDAE (método A), na época em que chegaram ao laboratório.

Pela intensidade das manchas obtidas após análise pelo método B, foi possível concluir que pelo menos duas delas eram de usuários "pesados" (1L e 10L), e mesmo após dois anos no freezer, acondicionadas em frascos plásticos, continuavam fornecendo resultado positivo. Seis amostras deram resultado negativo.

No estudo destes resultados discordantes, deve-se levar em conta a instabilidade do THCCOOH em urinas estocadas por longos períodos, mesmo a temperaturas menores que 0°C.

PAUL e cols ¹¹¹ relatam perda de 11% nos níveis de THCCOOH após 45 dias de congelamento das amostras. KING e cols ⁸⁶ observaram que de 107 amostras na faixa de 20–185ng/ml, 11 ficaram abaixo de 20ng/ml após 18 meses de congelamento.

Das amostras enviadas pela clínica de recuperação de farmacodependentes (n=12), 7 eram de indivíduos com indicação de uso de *Cannabis*, e 5 eram de indivíduos suspeitos de uso de alguma droga de abuso. Nos primeiros 7 indivíduos obteve-se resultado positivo; dos outros 5, três foram negativos. Neste caso, o resultado negativo pode significar que a droga utilizada não foi a *Cannabis*.

Alguns autores citam que a hidrólise feita com KOH gera extratos mais limpos do que a produzida com NaOH. Ainda que isto tenha sido verificado por alguns autores em relação à cromatografia gasosa⁴⁵, não foi observado neste trabalho qualquer influência em relação à CCDAE.

O imunoensaio de fluorescência polarizada (FPIA) é técnica recentemente introduzida no mercado para análise de drogas de abuso em urina. Há pouca literatura disponível e, mesmo assim, os trabalhos que existem foram feitos em outro tipo de equipamento, diferente do utilizado neste trabalho. Quanto a este, não haviam citações de seu emprego nos trabalhos consultados durante a revisão bibliográfica. Através de

contato com a empresa fabricante, tivemos acesso aos dois únicos trabalhos^{31,76} realizados; isto já na fase final deste trabalho.

Por ser técnica pouco utilizada em nosso país, havia a necessidade de estudá-la em seus aspectos teórico-práticos, principalmente para estabelecer os critérios necessários à boa interpretação dos resultados. Por isso, foi incluído neste trabalho um capítulo abordando a teoria do método e, na parte prática, um trabalho mais elaborado do que o originalmente pensado.

Mesmo existindo uma correspondência entre concentração e o resultado expresso em milipolarização (mP), o que permitiu o emprego desta técnica em controle terapêutico, o uso do FPIA para análise de drogas de abuso é primordialmente qualitativo, porquanto os resultados são emitidos não em valor de concentração e, sim, como positivos ou negativos.

As amostras de usuários do grupo I, submetidas ao FPIA no "cutoff" de 50ng/ml, apresentaram resultado negativo para várias amostras com resultado positivo por CCDAE. Na tentativa de melhor compreender esses resultados, foi elaborado um estudo com a construção de uma curva-padrão, para verificar a relação entre concentração e polarização de fluorescência. Dessa maneira, poderíamos conhecer o teor provável de canabinóides que estas amostras possuíam.

Uma das dificuldades em interpretar resultados oriundos de ensaio imunológico se deve às características de biotransformação do Δ^9 -THC. Enquanto os controles e calibradores possuem apenas o THCCOOH adicionado a um "pool" de urinas, uma amostra de usuários conterá vários canabinóides. Acrescente-se a isto a variação individual observada no processo de biotransformação e as diferentes proporções encontradas dia a dia na composição dos canabinóides urinários.

Esperam-se reações cruzadas, ainda que o fabricante relate apenas reatividade cruzada com o Δ^8 -THCCOOH. Por isso, os resultados obtidos com a curva-padrão não podem ser extrapolados para as amostras, senão com certa reserva.

Na construção da curva-padrão, foram utilizados os controles (dau-TRAK® Multicontrôle) fornecidos pelo fabricante.

Pelo menos, duas concentrações diferentes na faixa de controle baixo e alto foram utilizadas, e três em torno do valor de "cutoff", todas em triplicata. Como o uso de pipeta automática não forneceu resultados com boa correlação, passou-se a utilizar micro-seringa.

A curva-padrão, típica de ensaios imunológicos, foi obtida neste trabalho, com configuração convexa, bem como a inclinação descendente, devido à relação inversamente proporcional entre polarização e concentração. Com esta alteração, foi obtido um coeficiente de correlação $\approx 0,99$.

O coeficiente de correlação obtido nos encorajou a utilizar a equação gerada no modelo de regressão linear, para verificar a concentração provável de canabinóides nas amostras.

Pelos resultados obtidos, as amostras negativas no "cutoff" de 50ng/ml possuíam concentrações de canabinóides, na sua maioria, entre 20–50ng/ml. O que explicaria os resultados negativos obtidos para amostras de usuários neste valor de "cutoff".

A utilização de um "cutoff" de 20ng/ml poderia produzir resultados positivos para estas amostras. Neste momento, uma nova remessa de reagentes teria que ser utilizada na análise das amostras. Como a nova calibração apresentou um valor menor de milipolarização que a anterior, optou-se por construir uma segunda curva-padrão com este novo reagente e reanalisar as amostras no "cutoff" de 20ng/ml.

Para esta segunda curva-padrão, observou-se ligeira queda nos valores de polarização proporcional a todas as concentrações. Desta forma, as amostras analisadas por esta remessa de reagentes tiveram seus resultados correlacionados com a segunda curva-padrão, e não com a primeira.

A análise por FPIA das amostras de usuários, como era de se esperar, apresentou resultados positivos no "cutoff" de 20ng/ml, principalmente para os usuários

ocasionais. Alguns usuários ainda demonstraram possuir concentrações menores que 20ng/ml.

As amostras dos grupos II e III também foram analisadas no "cutoff" de 20ng/ml.

Nas 17 amostras fornecidas pelo LAT, 10 foram positivas; 6 , negativas; e uma foi negativa porém próxima ao valor de "cutoff". Estas amostras tinham sido analisadas por FPIA no "cutoff" de 100ng/ml.

Nas amostras 1F a 7F, de indivíduos com indicação de uso de *Cannabis*, apenas duas amostras deram negativo, porém com sinal de advertência do aparelho de que se tratava de valor próximo ao "cutoff". Nas amostras onde havia suspeita de uso de alguma droga de abuso, amostras 8F a 12F, apenas uma foi positiva; três foram negativas e uma foi negativa, porém próxima ao valor de "cutoff".

Conforme relatado pelo fabricante, espera-se uma variação de mais ou menos 5 milipolarizações (mP) em leituras repetidas (imprecisão). Durante os meses em que o aparelho foi utilizado, observaram-se variações de leitura dentro desta faixa de mais ou menos 5 mP. KÄFERSTEIN e STICHT⁷⁶ estudaram a precisão no Vitalab Eclair®, com reagentes dau-TRAK® para canabinóides, e relatam um c.v._{max} de 2,2%. O mesmo autor relata que nenhum resultado cujo valor esteja próximo ao cutoff deve ser desprezado, mormente em relação aos canabinóides.

Em nosso trabalho, observamos que a pipetagem é crítica, devido à alta sensibilidade do método. A utilização de micro-seringa para análises repetidas de uma mesma amostra revelou uma variação de resultados dentro da faixa de imprecisão do método. O uso de pipetas automáticas de baixa qualidade produziu variações de até 40% nos valores de mP para uma mesma amostra.

É por esta razão que os resultados obtidos com a curva-padrão para as amostras selecionadas nesse trabalho, mencionam concentração provável de THCCOOH, e não um valor absoluto. Mais ainda, pela própria característica da curva , muito cuidado tem que ser tomado na estimativa de concentrações urinárias de canabinóides para indivíduos que fazem uso intenso da *Cannabis*. Esses usuários geralmente possuem

concentrações maiores que 100ng/ml e, nesta região da curva, pequenas variações na milipolarização causam grandes variações nos resultados.

O estudo realizado com a curva-padrão permitiu uma melhor avaliação dos resultados obtidos com a análise de amostras de usuários. Foi possível verificar que os níveis de canabinóides em usuários ocasionais e moderados estão na faixa de 20–100ng/ml, sendo que uma fração considerável permanece abaixo de 50 ng/ml. Esta faixa de concentração para usuários ocasionais e moderados também foi reportada por JONES⁷⁵ e MULÉ¹⁰⁶.

DEGEL e cols³¹ citam em seu trabalho que o valor de "cutoff" igual a 100ng/ml pode ser utilizado em situações que envolvem a clínica toxicológica, mas é muito alto para a análise com fins forenses. Mesmo não tendo um número muito elevado de amostras, os resultados obtidos neste trabalho corroboram esta conclusão.

Alguns autores consideram arriscado usar um "cutoff" de 20ng/ml, devido ao problema da inalação passiva. Contudo, em experimentos realizados com inalação passiva, mesmo em condições extremas de exposição, em níveis maiores dos que os encontrados em situações normais, as concentrações de canabinóides na urina foram inferiores a 20ng/ml^{26,94}. Em condições experimentais mais próximas das situações reais conhecidas, estes níveis foram inferiores a 6ng/ml^{104,106}.

A seleção da concentração de "cutoff" não pode ser feita com base na sensibilidade do método⁴³, como também não pode ser confundida com sensibilidade⁴³. Mesmo trabalhando com 20ng/ml, ainda estamos acima da sensibilidade do método (5ng/ml).

Ainda que isso implique um aumento do percentual de resultados não confirmados pelo CG/MS ou pela CCDAE, e considerando esta técnica como técnica de triagem, a não detecção de um provável usuário é, no mínimo, pouco recomendável em um programa direcionado a este propósito¹⁴¹.

A comparação entre os resultados obtidos com a análise de urina de usuários de *Cannabis* por FPIA e por CCDAE, levantou questões interessantes .

Nas amostras do grupo I, houve excelente correlação entre os resultados obtidos por ambas as técnicas para os usuários "pesados". De acordo com a curva-padrão, estas amostras teriam teores elevados de canabinóides (mais de 300ng/ml).

O usuário moderado apresentou concentrações urinárias de canabinóides semelhantes aos usuários ocasionais, isto é , na faixa de 20–50ng/ml, com resultados imunológicos variando entre negativo, negativo*, positivo* e positivo ("cutoff" de 20ng/ml).

Algumas amostras negativas no FPIA foram positivas por CCDAE (6B, 6C, 8A, 8B, 11A, 11C e 11E, 2L,8L,3F,7F,8F). Isto pode ser explicado pela diferença entre o "cutoff" do método imunológico (20ng/ml) e a sensibilidade alcançada neste método em CCDAE (5ng/ml).

Três amostras positivas no FPIA foram negativas na CCDAE (2, 9A,16L,). A primeira vista poderíamos dizer que se tratam de falsos-positivos. Contudo as duas primeiras eram amostras de indivíduos que se declararam usuários de *Cannabis*, e a última havia dado positivo por FPIA e CCDAE quando de sua chegada ao LAT há dois anos. A utilização da curva-padrão mostra concentração provável de canabinóides na faixa de 20–30ng/ml.

JOERN⁶⁷ relata que nem todos os resultados positivos de um ensaio imunológico serão efetivamente confirmados, mesmo não se tratando de um falso positivo. Isto se deve às características da biotransformação. Ele observou que a proporção de THCCOOH varia em relação aos outros canabinóides, de modo que um teor relativamente elevado de canabinóides pode , em dado momento, corresponder a um baixo teor de THCCOOH.

Para uma das amostras fornecidas pelo LAT (amostra 16L), é importante que se leve em consideração a degradação do THCCOOH ocorrida durante o longo armazenamento da amostra.

Vale ressaltar que na CCDAE pesquisamos apenas um canabinóide, o THCCOOH, enquanto no ensaio imunológico, dependendo das características do anticorpo, um grupo de canabinóides estruturalmente relacionados contribuem com o resultado.

Apesar do fabricante dos reagentes utilizados neste trabalho relatarem reatividade cruzada apenas com o Δ^8 -THCCOOH, os resultados obtidos mostram que um percentual maior de reatividade cruzada provavelmente existe com outros canabinóides.

Em termos qualitativos, os resultados da CCDAE se correlacionam melhor com os resultados negativos obtidos por FPIA no "cutoff" de 20ng/ml do que no de 50ng/ml, significando que muitas amostras que passam como negativas pelo "cutoff" de 50ng/ml poderiam ser positivas na CCDAE.

Em relação aos resultados positivos por FPIA, a literatura relata que quanto maior o "cutoff" utilizado, maior será a correlação existente entre o método imunológico e o método cromatográfico^{72,48,49}. Isto também foi visto neste trabalho para as amostras de usuários "pesados", geralmente contendo mais de 100ng/ml de canabinóides.

Assim como relatado por outros autores^{131,135,12,31}, a CCDAE pode ser útil para confirmar os resultados de um imunoensaio. Devido ao índice de falsos positivos apresentado pelos métodos imunológicos, a análise prévia por CCDAE antes da confirmação por CG/MS pode ser uma maneira viável de se diminuir os custos analíticos, quando se trabalha com uma grande quantidade de amostras.

Quanto ao número de amostras que podem ser analisadas por placa de CCDAE, as placas 10x10cm comportam até 9 amostras, o padrão, um branco ou adicionado. Contudo, estas placas podem ser cortadas ao meio, sem que isto traga qualquer prejuízo às condições cromatográficas, permitindo a análise de um número menor de amostras.

No caso da análise forense, por ser irregular o fluxo de amostras de urina para detecção de drogas de abuso, visto que isso depende muito da prisão em flagrante e da cooperação do indivíduo detido no fornecimento da amostra como prova, o uso de ensaios imunológicos pode ser dificultado devido a validade limitada dos reagentes após

a primeira utilização. Juntar amostras até um número de 20 ou 30 é inviável, pois atrasaria em muito todo andamento do processo penal.

Um resultado positivo por método imunológico necessitará obrigatoriamente de ser confirmado por um outro método com princípio analítico diferente. O principal método para confirmação do THCCOOH tem sido o CG/MS. Entretanto, devido ao alto custo do equipamento e dos reagentes necessários à sua operação, ainda não é possível, infelizmente, utilizarmos o CG/MS nas análises de rotina em nossos serviços forenses.

Têm-se estudado outros métodos cromatográficos para a fase de confirmação ^{64,47,131,97,42,90,107}, incluindo a CCDAE ^{131,135,12,31}.

Pelos resultados obtidos, o método estudado é perfeitamente aplicável à análise forense, por sua sensibilidade e especificidade adequadas a detecção de usuários ocasionais mesmo após 3 dias de utilização de apenas 1 cigarro de *Cannabis*.

Nenhuma das amostras utilizadas como controle (branco de referência) forneceu resultados semelhantes ao padrão de THCCOOH, o que nos permite relatar, até o momento, que se trata de um método com especificidade adequada, podendo ser empregado como método analítico confiável para detecção de usuários de *Cannabis* em nossos serviços de toxicologia forense.

7. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no trabalho experimental realizado, podemos concluir:

- A cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE), nas condições estudadas, possui sensibilidade para detecção de 10ng de THCCOOH.
- O volume adequado de amostra para identificação de usuários de *Cannabis* é de 5ml.
- A sensibilidade verificada no estudo com adicionados foi de 5ng/ml para 5ml de amostra.
- Amostras de usuários de *Cannabis* apresentaram resultados semelhantes aos observados no padrão de THCCOOH.
- Pelo método estudado, foi possível detectar o THCCOOH em urina de usuários de *Cannabis* até 72 horas após a utilização de um único cigarro.
- Na cromatografia em camada delgada de alta eficiência não foram observados resultados semelhantes aos obtidos com o padrão de THCCOOH em nenhuma das amostras utilizadas como branco de referência.
- Amostras de usuários ocasionais foram negativas no FPIA com a utilização do "cutoff" de 50ng/ml.
- No estudo comparativo dos resultados obtidos nas duas técnicas, foi verificada uma correspondência de 100% nas amostras de usuários com padrão de uso intenso.
- No estudo comparativo dos resultados obtidos nas duas técnicas, não foi verificada boa correspondência nas amostras de usuários com padrão de uso moderado e ocasional.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- 001.ABERCROMBIE, M.L., JEWELL, J.S. Evaluation of EMIT® and RIA high volume test procedure for THC metabolites in urine utilizing CG/MS confirmation. J.Anal.Toxicol., Niles, v.10, p.178–180, 1986.
- 002.AGURELL,S., HALLDIN,M., LINDGREN,J., OHLSSON,A., WIDMAN,M., GILLESPIE,H., HOLLISTER,L. Pharmacokinetics and metabolism of Δ^1 -tetrahydrocannabinol and other cannabinoids with emphasis on man. Pharmacol.Rev., Baltimore, v.38, n.1,p.21–43, 1986.
- 003.ALBURGES, M.E., PEAT,M.A. Profiles of Δ^9 -tetrahydrocannabinol metabolites in urine of Marijuana users: preliminary observations by high performance liquid chromatography-radioimmunoassay. J. Forensic Sci., Philadelphia, v.31, n.2, p.695–706, 1986.

* De acordo com a norma NBR 6023/89 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas e local de publicação dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI), 1990.

- 004.ALMEIDA FILHO,N., SANTANA,V.S., PINTO,I.M., CARVALHO NETO,J.A. Is there an epidemic of drug misuse in Brazil? A review of the epidemiologic evidence (1977-1988). Int. J. Addict., New York, v.26, n.3, p.355–369, 1991.
- 005.ANDERSEN,J.M., NIELSEN,E., SCHOU,J., STEENTOFT,A., WORM,K. A specific method for the demonstration of cannabis intake by TLC of urine. Acta Pharmacol. Toxicol., Copenhagen, v.29, p.111–112, 1971.
- 006.BAKER,T.S., HARRY,J.V., RUSSELL,J.W., MYERS,R.L. Rapid method for the CG/MS confirmation of 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol in urine. J.Anal.Toxicol., Niles, v.8, p.255–259, 1984.
- 007.BARBOSA,M.T.S., COTRIM,B.C., SILVA FILHO,A.R., CARLINI,E.A. Levantamento nacional sobre o uso de drogas psicotrópicas na população estudantil. Ciênc. Cult., São Paulo, v.40, n.7 supl., p. 987, 1988,
- 008.BASELT,R.C. Urine drug screening by immunoassay: interpretation of results. Adv. Anal. Toxicol. Foster City, v.1, p.81–123, 1984.
- 009.BECKER,R.S. Theory and interpretation of fluorescence and phosphorescence. New York: Wiley Interscience, 1969. p.76–90.
- 010.BELL,R., TAYLOR,E.H., ACKERMAN,B., PAPPAS,A.A. Interpretation of urine quantitative 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid to determine abstinence from Marijuana smoking. Clin.Toxicol., New York, v.27, n.1 & 2, p.109–115, 1989.
- 011.BERGMAN, R.A., LUKASZEWSKI, T., WANG, S.Y.S. The detection of tetrahydrocannabinol in blood: a comparative study. J.Anal.Toxicol. Niles, v.5, p.85–89, 1981.
- 012.BLACK,D.L., GOLDBERGER,B.A., ISENSCHMID,D.S., WHITE,S.M., CAPLAN,Y.H. Urine cannabinoid analysis: an integrated multi-method approach. J.Anal.Toxicol., Niles, v.8, p.224–227, 1984.

- 013.BOGUSZ,M. Concerning blood cannabinoids and the effect of residual THCCOOH on calculated exposure time. J.Anal.Toxicol. , Niles, v.17, p.313, 1993.
- 014.BRASIL.Ministério da Justiça.Secretaria da Polícia Federal. Dados de apreensões de entorpecentes efetuadas em todo Brasil. 1994.
- 015.BRONNER,W.E. , XU,A.S. Gas chromatographic-mass spectrometric methods of analysis for detection of 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol- 9-carboxylic acid in biological matrices. J.Chromatogr. , Amsterdam, v.580, p.63–75, 1992.
- 016.BRONNER, W.E., NYMAN, P., MINDEN, D. Detectability of phencyclidine and 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in adulterated urine by radioimmunoassay and fluorescence polarization immunoassay. J.Anal.Toxicol., Niles, v.14, p.368–371, 1990.
- 017.BUDGETT,W.T., LEVINE,B., XU,A., SMITH,M.L. Comparison of Abbott fluorescence polarization immunoassay (FPIA) and Roche radioimmunoassay for the analyses of cannabinoids in urine specimens. J.Forensic Sci. , Philadelphia, v.37, n.2, p.632–635, 1992.
- 018.CARLSON,B.R. , EDWARDS,W.H. Human values and marijuana use. Int.J.Addict., New York, v.25, n.12, p.1393–1401, 1990.
- 019.CATLIM,D., COWAN,D., DONIKE,M., FRAISSE,D., OFTEBRO,H., RENDIC,S. Testing urine for drugs. Clin.Chim.Acta, Amsterdam, v.207, p.513–526, 1992.
- 020.CENTRO BRASILEIRO DE INFORMAÇÕES SOBRE DROGAS PSICOTRÓPICAS. Catálogo das publicações científicas brasileiras sobre o abuso de drogas psicotrópicas. São Paulo, 1991. 153 p.
- 021.CHIANG,C.N. , BARNETT,G. Marijuana pharmacokinetics and pharmacodynamics. In: REDDA,K.K., WALKER,C.A., BARNETT,G., eds. Cocaine, marijuana, designer drugs: chemistry, pharmacology, and behavior. Boston: CRC Press, 1989. p.113–125.

022. CHRISTOPHERSEN, A.S. Tetrahydrocannabinol stability in whole blood: plastic versus glass containers. J. Anal. Toxicol., Niles, v.10, p.129–131, 1986.
023. CLOUETTE, R., JACOB, M., KOTEEL, P., SPAIN, M. Confirmation of 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol in urine as its t-butyldimethylsilyl derivative using CG/MS. J. Anal. Toxicol., Niles, v.17, p.1–4, 1993.
024. CODY, J.T. SCHWARZHOFF, R.H. Impact of adulterants on RIA analysis of urine for drugs of abuse. J. Anal. Toxicol., Niles, v.13, p.277–284, 1989.
025. CONE, E.J., HUESTIS, M.A. Relating blood concentrations of tetrahydrocannabinol and metabolites to pharmacologic effects and time of marijuana usage. Ther. Drug Monit., New York, v.15, n.6, p.527–532, 1993.
026. CONE, E.J., JOHNSON, R.E., DARWIN, W.D., YOUSEFNEJAD, D., MELL, L.D., PAUL, B.D., MITCHELL, J. Passive inhalation of marijuana smoke: urinalysis and room air levels of Δ^9 -tetrahydrocannabinol. J. Anal. Toxicol., Niles, v.11, p.89–96, 1987.
027. COTRIM, B.C., CARLINI, E.A. The use of solvents and others drugs among children and adolescents from a low socioeconomic background: a study in São Paulo, Brazil. Int. J. Addict., New York, v.23, n.11, p.1145–1156, 1988.
028. COTRIM, B.C., SILVA FILHO, A.R., BARBOSA, M.T.S., CARLINI, E.A. Levantamento nacional sobre interações por dependentes de drogas psicotrópicas. Ciênc. Cult., São Paulo, v.40, n.7 supl., p. 982–983, 1988.
029. COTRIM, B.C. Dados sobre o consumo de drogas por adolescentes no Brasil. In: SIMPÓSIO DE INTEGRAÇÃO ENTRE A CLÍNICA E A PSIQUIATRIA. 4. São Paulo, Biogalênica, 1987. p.85–91.
030. DANDLIKER, W.B., FEIGEN, G.A. Quantification of the antigen-antibody reaction by the polarization of fluorescence. Biochem. Biophys. Res. Commun., New York, v.5, n.4, p.299–304, 1961.

- 031.DEGEL,F., BROCKHAUS,W., JALALIAN,M. Drogenscreening im Urin mit dem VITALAB-ECLAIR® Fluoreszenz-polarisations-Immuno-assays. Klin.Lab., Darmstadt,v.39, p.381–387, 1993.
- 032.DEMBO, R., WILLIAMS, L., LA VOIE, L., SCHMEIDLER, J., KERN, J., GETREU, A., BERRY, E., GENUNG, L., WISH, E.D. A longitudinal study of the relationship among alcohol use, marijuana / hashish use, cocaine use, and emotional, psychological functioning problems in a cohort of high-risk youths. Int.J.Addict., New York, v.25, n.11, p.1341–1382, 1990.
- 033.DEMBO, R., WILLIAMS, L., WISH, E.D., BERRY, E., GETREU, A., WASHBURN, M., SCHMEIDLER,J. Examination of relationships among drug use, emotional /psychological problems, and crime among youths entering a juvenile detention center. Int.J.Addict., New York, v.25, n.11, 1301–1340, 1990.
- 034.DEWEY,W.L. Cannabinoid pharmacology. Pharmacol. Rev., Baltimore, v.38, n.2, p.151–178, 1986.
- 035.DIXIT,V., DIXIT,V.M. Solid-phase extraction of 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid from human urine with gas chromatographic - mass spectrometric confirmation. J.Chromatogr., Amsterdam, v.567, p.81–91, 1991.
- 036.EDWARDS, C., FYFE, M.J., LIU, R.H., WALIA, A.S. Evaluation of common urine specimen adulteration indicators. J.Anal.Toxicol., Niles, v.17, p. 251–252, 1993.
- 037.ELLIS Jr,G.M., MANN,M.A., JUDSON,B.A., SCHRAMM,N.T., TASHCHIAN,A. Excretion patterns of cannabinoid metabolites after last use in a group of chronic users. Clin.Pharmacol.Ther., St.Louis, v.38, n.5, p.572–578, 1985.
- 0.38.ELSOHLY, M.A., LITTLE Jr, T.L., STANFORD, D.F. Hexadeutero - 11 - nor - Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid: a superior internal standard for the CG/MS analysis of Δ^9 -THC acid metabolite in biological specimens. J.Anal.Toxicol., Niles, v.16, p.188–191, 1992.

- 039.ELSOHLY, M.A., JONES, A.B., ELSOHL, H.N. Cross - reactivity of selected compounds in the Abbott Tdx® cannabinoid assay. J.Anal.Toxicol., Niles, v.14, p.277–279, 1990.
- 040.ELSOHLY, M.A., ELSOHL, H.N. Marijuana: analysis and detection of use through urinalysis. In : REDDA, K. K., WALKER, C. A., BARNETT, G., eds. Cocaine, marijuana, designer drugs: chemistry, pharmacology, and behavior. Boston: CRC Press, 1989. p.145–161.
- 041.FAIRBAIRN, J.W., LIEBMANN, J.A., ROWAN, M.G. The stability of cannabis and its preparations on storage. Pharm.Pharmacol., London, v.28, p.1–7, 1976.
- 042.FERRARA, S.D., TEDESCHI, L., FRISON, G., CASTAGNA, F. Solid - phase extraction and HPLC-UV confirmation of drugs of abuse in urine. J.Anal.Toxicol., Niles, v.16, p.217–222, 1992.
- 043.FINKLE, B.S., BLACK, D., BLANKE, R.V., BUTLER, T.J., JONES, G.R., SAMPLE, R.H.B. Analysis for commonly abused drugs in urine at selected threshold ("cutoff") concentrations. Clin.Chem., Winston-Salem, v.37, n.4, p.586–587, 1991.
- 044.FOLTZ, R.L., SUNSHINE, I. Comparison of a TLC method with EMIT® and CG/MS for detection of cannabinoids in urine. J.Anal.Toxicol., Niles, v.14, p.375–378, 1990.
- 045.FOLTZ, R.L. Analysis of cannabinoids in physiological specimens by gas chromatography / mass spectrometry. Adv. Anal. Toxicol., Foster City, p.125–157, 1984.
- 046.FRASER, A.D., MEATHERALL, R. Lack of interference by Nabilone in the EMIT® d.a.u. cannabinoid assay, Abbott TDx® cannabinoid assay, and a sensitive TLC assay for Δ^9 -THC-carboxylic acid. J.Anal.Toxicol., Niles, v.13, p.240, 1989.
- 047.FREDERICK, D.L., GREEN, J. Comparison of six cannabinoid metabolite assays. J.Anal.Toxicol., Niles, v.9, p.116–120, 1985.

- 048.FRINGS, C.S., WHITE, R.M., BATTAGLIA, D.J. Status of drugs-of-abuse testing in urine:an AACC study. Clin.Chem., Winston-Salem, v.33, n.9, p.1683–1686,1987.
- 049.FRINGS, C.S., WHITE, R.M., BATTAGLIA, D.J. Status of drugs-of-abuse testing in urine under blind conditions: an AACC study. Clin.Chem., Winston-Salem, v.33, n.5, p.891–894, 1989.
- 050.GARRIOT, J.C., Di MAIO, V.J.M., RODRIGUEZ, R.G. Detection of cannabinoids in homicide victims and motor vehicle fatalities. J.Forensic Sci., Philadelphia, v.31, n.4, p.1274–1282, 1986.
- 051.GAWIN,F.H. Laboratory assessments in treatments of substance abuse: utilization and effects on treatment design. Clin.Chem., Winston-Salem, v.33, n.11B, p.95B–100B, 1987.
- 052.GEROSTAMOULOS,J., DRUMMER,O.H. Incidence of psychoactive cannabinoids in drivers killed in motor vehicle accidents. J.Forensic.Sci., Philadelphia, v.38, n.3, p.649–656, 1993.
- 053.GIKOVATE,F. Drogas: opção de perdedor. São Paulo: Moderna, 1992. 85 p.
- 054.GOSLING,J.P. A decade of development in immunoassay methodology. Clin.Chem., Winston-Salem, v.36, n.8, p.1408–1427, 1990.
- 055.GUBITZ, G., WINTERSTEIGER, R. Identification of drugs of abuse by high-performance thin-layer chromatography. J.Anal.Toxicol., Niles, v.4, p.141–144,1980.
- 056.GUTIERREZ,M.C., GOMES-HANS,A., PEREZ-BENDITO,D.Immunoassay methods based on fluorescence polarization. Talanta, London, v.36, n.12, p.1187–1201,1989.
- 057.GURKIN,M. How do HPTLC and S-HPTLC compare with TLC? J.Chromatogr.Sci., Niles, v.26, p.596, 1988.

- 058.HARVEY,D.J., PATON,W.D.M. Metabolism of the cannabinoids. Rev. Biochem. Toxicol. , New York, p.221–264, 1984.
- 059.HARVEY,D.J. Cannbinoids analysis. In: CURRY, A.S., ed. Analytical methods in human toxicology. London: Macmillan Press, 1984, p.257–297.
- 060.HOLLISTER,L.E. Health aspects of cannabis. Pharmacol.Rev., Baltimore, v.38, n.1, p.1–20, 1986.
- 061.HUESTIS,M.A., HENNINGFIELD,J.E., CONE,E.J. Blood cannabinoids. II. Models for the prediction of time of marijuana exposure from plasma concentrations of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) and 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THCCOOH). J.Anal.Toxicol., Niles, v.16, p.283–290, 1992.
- 062.HUESTIS,M.A., HENNINGFIELD,J.E., CONE,E.J. Blood cannabinoids. I. Absorption of THC and formation of 11-OH-THC and THCCOOH during and after smoking marijuana. J.Anal.Toxicol., Niles, v.16, p.276–282, 1992.
- 063.HUGHES,R.B., KESSLER,R.R. Increased safety and specificity in the thin-layer chromatographic identification of marijuana. J.Forensic Sci., Philadelphia, v.24, n.3, p.842–846, 1979.
- 064.ISENSCHMID,D.S., CAPLAN, Y.H. A method for the determination of 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in urine using high performance liquid chromatography with electrochemical detection. J.Anal.Toxicol., Niles, v.10, p.170–174, 1986.
- 065.ISENSCHMID,D.S., CAPLAN,Y.H. Incidence of cannabinoids in medical examiner urine specimens. J.Foresinc.Sci., Philadelphia, v.33, n.6, p.1421–1431, 1988.
- 066.JAFFE,J.H. Drug addiction and drug abuse. In: GILMAN, A.G., GOODMAN, L.S., RALL, T.W., MURAD, F., eds. The pharmacological basis of therapeutics . 7.ed. New York: Macmillan, 1985. p.558–561.
- 067.JOERN,W.A. Detection of past and recurrent marijuana use by a modofied CG/MS procedure. J.Anal.Toxicol., Niles, v.11, p.49–52, 1987.

068. JOERN, W.A. CG/MS assay of the marijuana carboxy metabolite: urine interference with the dimethyl derivative. J.Anal.Toxicol., Niles, v.16, p.207, 1992.
069. JOERN, W.A. Surface adsorption of the urinary marijuana carboxy metabolite: the problem and a partial solution. J.Anal.Toxicol., Niles, v.16, p.401, 1992.
070. JOHANSSON, E., AGURELL, S., HOLLISTER, L.E., HALLDIN, M.M. Prolonged apparent half-life of Δ^1 -tetrahydrocannabinol in plasma of chronic marijuana users. J.Pharm.Pharmacol., London, v.40, p.374–375, 1988.
071. JOHANSSON, E., GILLESPIE, H.K., HALLDIN, M.M. Human urinary excretion profile after smoking and oral administration of [^{14}C]- Δ^1 -tetrahydrocannabinol. J.Anal.Toxicol., Niles, v.14, p.176–180, 1990.
072. JOHNSON, J.R., JENNISON, T.A., PEAT, M.A., FOLTZ, R.L. Stability of Δ^9 -THC, 11-hydroxy-THC, and 11-nor-carboxy-THC in blood and plasma. J.Anal.Toxicol., Niles, v.8, p.202–204, 1984.
073. JOLLEY, M.E. Fluorescence polarization immunoassay for the determination of therapeutic drug levels in human plasma. J.Anal.Toxicol., Niles, v.5, p.236–240, 1981.
074. JONES, A.B., ELISOHLY, H.N., ELISOHLY, M.A. Analysis of the major metabolite of Δ^9 -tetrahydrocannabinol in urine. V. Cross-reactivity of selected compounds in a radioimmunoassay. J.Anal.Toxicol., Niles, v.8, p.252–254, 1984.
075. JONES, R.T. Drug of abuse profile: cannabis. Clin.Chem., Winston-Salem, v.33, n.11B, p.72B–81B, 1987.
076. KÄFERSTEIN, H., STICHT, G. Erfahrungen mit einem neuen FPIA-system beim nachweis von Drogen in Urin. Labor-Medizin, Darmstadt, v.16, p.60–64, 1993.
077. KAISTHA, K.K., TADRUS, R. Semi-quantitative thin-layer mass-screening detection of 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in human urine. J.Chromatogr., Amsterdam, v.237, p.528–533, 1982.

- 078.KANTER,S.L., HOLLISTER,L.E., MUSUMECI,M. Marijuana metabolites in urine of man. X. Identification of marijuana use by detection of Δ^9 -tetrahydrocannabinol-11-oic acid using thin-layer chromatography. J.Chromatogr., Amsterdam, v.234, p.201–208, 1982.
- 079.KANTER, S.L., HOLLISTER, L.E., ZAMORA, J.U. Marijuana metabolites in urine of man. XI. Detection of unconjugated and conjugated Δ^9 -tetrahydrocannabinol-11-oic acid by thin-layer chromatography. J.Chromatogr., Amsterdam, v.235, p.507–512, 1982.
- 080.KANTER,S.L., HOLLISTER,L.E., WILLIAMS,M. Extraction of glucuronide metabolites of Δ^9 -tetrahydrocannabinol by diethyl ether. J.Chromatogr., Amsterdam, v.234, p.255–260, 1982.
- 081.KANTER, S.L., HOLLISTER, L.E. Marijuana metabolites in urine of man. IX. Identification of Δ^9 - tetrahydrocannabinol - 11 - oic acid by thin-layer chromatography. J.Chromatogr., Amsterdam, v.151, p.225–227, 1978.
- 082.KARLSSON,L., ROOS,C. Combination of liquid chromatography with ultraviolet detection and gas chromatography with electron-capture detection for the determination of Δ^9 -tetrahydrocannabinol-11-oic acid in urine. J.Chromatogr., Amsterdam, v.306, p.183–189, 1984.
- 083.KARLSSON,L., STROM,M. Laboratory evaluation of the TDx® assay for detection of cannabinoids in urine from prison inmates. J.Anal.Toxicol., Niles, v.12, p.319–321, 1988.
- 084.KELLY, P., JONES, R.T. Metabolism of tetrahydrocannabinol in frequent and infrequent marijuana users. J.Anal.Toxicol., Niles, v.16, p.228–235, 1992.
- 085.KELLY,T.H., FOLTIN,R.W., EMURIAN,C.S., FISCHMAN,M.W. Performance-based testing for drugs of abuse: dose and time profiles of marijuana, amphetamine, alcohol and diazepam. J.Anal.Toxicol., Niles, v.17, p.264–272, 1993.

- 086.KING, D.L., GABOR, M.J., MARTEL, P.A., O'DONNELL, C.M. A rapid sample-preparation technique for thin - layer chromatographic analysis for 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in human urine. Clin.Chem., Winston-Salem, v.35, n.1, p.163–166, 1989.
- 087.KING,L.A., MILLER,J.N. Fluorescence analysis. In: CURRY,A.S., ed. Analytical methods in human toxicology. London: Macmillan, 1986. p.71–112.
- 088.KINGERY,P.M., PRUITT,B.E., HURLEY,R.S. Violence and illegal drug use among adolescents: evidence from the U.S. National Adolescent Student Health Survey. Int.J.Addict., New York, v.27, n.12, p.1445–1464, 1992.
- 089.KINTZ, P., LUDES, B., MANGIN, P. Detection of drugs in human hair using Abbott Adx[®], with confirmation by gas chromatography / mass spectrometry (CG/MS). J.Forensic Sci., Philadelphia, v.37, n.1, p.328–331, 1992.
- 090.KOGAN, M.J., NEWMAN, E., WILLSON, N.J. Detection of marijuana metabolite 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in human urine by bonded-phase adsorption and thin-layer chromatography. J.Chromatogr., Amsterdam, v.306, p.441–443, 1984.
- 091.KUHNS,J.B., HEIDE,K.M., SILVERMAN,I. Substance use / misuse among female prostitutes and female arrestees. Int.J.Addict., New York, v.27, n.11, p.1283–1292, 1992.
- 092.LAFOLIE, P., BECK, O., BLENNOW, G., BOREUS, L., BORG, S., ELWIN, C.E., KARLSSON,L., ODELIUS,G., HJEMDAHL,P. Importance of creatinine analyses of urine when screening for abused drugs. Clin.Chem., Winston-Salem, v.37, n.11, p.1927–1931, 1991.
- 093.LAW,B., MASON,P.A., MOFFAT,A.C. Confirmation of cannabis use by the analysis of Δ^9 -tetrahydrocannabinol metabolites in blood and urine by combined HPLC and RIA. J.Anal.Toxicol., Niles, v.8, p.19–22, 1984.
- 094.LAW,B., MASON,P.A., MOFFAT,A.C., KING,L.J., MARKS,V. Passive inhalation of cannabis smoke. J.Pharm.Pharmacol., London, v.36, p.578–581, 1984.

- 095.MANNO,J.E. Interpretation of urinalysis results. NIDA - Res.Monogr., Rockville, v.73, p.54–61, 1986.
- 096.MAUNDER, M. J. DE F. Preservation of cannabis thin - layer chromatograms. J.Chromatogr., Amsterdam, v.100, p.196–199, 1974.
- 097.McCURDY,H.H., LEWELLEN,L.J., CALLAHAN,L.S., CHILDS,P.S. Evaluation of the Ion Trap Detector for the detection of 11-nor- Δ^9 -THC-9-carboxylic acid in urine after extraction by bonded - phase adsorption. J.Anal.Toxicol., Niles, v.10, p.175–177, 1986.
- 098.MEATHERALL, R.C., GARRIOTT, J.C. A sensitive thin - layer chromatographic procedure for the detection of urinary 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9- -carboxylic acid. J.Anal.Toxicol., Niles, v.12, p.136–140, 1988.
- 099.MEATHERALL,R.C. , WARREN,R.J. High urinary cannabinoids from a hashish body packer. J.Anal.Toxicol., Niles, v.17, p.439–440, 1993.
- 100.MIKKELSEN,S.L., ASH,K.O. Adulterants causing false negatives in illicit drug testing. Clin.Chem., Winstom-Salem, v.34, n.11, p.2333–2336, 1988.
- 101.MITCHELL,J.D., PERRIGO,B.J., MASON-DANIEL,V.A. Falsely negative urine drug assay results due to filtration. Clin.Chem. , Winston-Salem, v.38, n.2, p.2556–2557, 1992.
- 102.MOODY, D.E., MONTI, K.M., CROUCH, D.J. Analysis of forensic specimens for cannabinoids. II. Relationship between blood Δ^9 -tetrahydrocannabinol and blood and urine 11 - nor - Δ^9 - tetrahydrocannabinol - 9 - carboxylic acid concentrations. J.Anal.Toxicol., Niles, v.16, p.302–306, 1992.
- 103.MOODY,D.E., RITTENHOUSE,L.F., MONTI,K.M. Analysis of forensic specimens for cannabinoids. I. Comparison of RIA and CG/MS analysis of blood. J.Anal.Toxicol., Niles, v.16, p.297–301, 1992.
- 104.MULÉ,S.J., GROSS,S.J. Significance of urine assay sensitivity in marijuana detection. Clin.Chem., Winston-Salem, v.33, n.4, p.613, 1987.

- 105.MULÉ, S.J., CASELLA, G.A. Confirmation of marijuana, cocaine, morphine, codeine, amphetamine, methamphetamine, phencyclidine by CG/MS in urine following immunoassay screening. J.Anal.Toxicol., Niles, v.12, p.102–107, 1988.
- 106.MULÉ,S.J., LOMAX,P., GROSS,S.J. Active an realistic passive marijuana exposure tested by three immunoassays and CG/MS in urine. J.Anal.Toxicol., Niles, v.12, p.113–116, 1988.
- 107.NAKAMURA, G.R., STALL, W.J., FOLEN, V.A., MASTERS, R.G. Thin - layer chromatographic - mass spectrometric identification of 11 - nor - Δ^9 -tetrahydrocannabinol - 9 - carboxylic acid. J.Chromatogr., Amsterdam, v.264, p.336–338, 1983.
- 108.NEEDLEMAN,S.B., GOODIN,K., SEVERINO,W. Liquid-liquid extraction systems for THCCOOH and benzoylecgonine. J.Anal.Toxicol., Niles, v.15, p.179–181, 1991.
- 109.ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Métodos recomendados para el ensayo de la cannabis. Viena, 1987. 38p.
- 110.PARRY,R.C., NOLAN,L., SHIREY,R.E., WACHOB,G.D., GISCH,D.J. Pretreatment of urine samples for the analysis of 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid using solid-phase extraction. J.Anal.Toxicol. , Niles, v.14, p.39–44, 1990.
- 111.PAUL, B.D., McKINLEY, R.M., WALSH Jr, J.K., JAMIR, T.S., PAST, M.R. Effect of freezing on the concentration of drugs of abuse in urine. J.Anal.Toxicol., Niles, v.17, p.378–380, 1993.
- 112.PEARSON, S.D., ASH, K.O., URRY, F.M. Mechanism of false - negative urine cannabinoid immunoassay screens by VISINETM eyedrops. Clin.Chem., Winston-Salem, v.35, n.4, p.636–638, 1989.
- 113.PEAT,M.A.,DEYMAN,M.E., JOHNSON,J.R. High performance liquid chromatography - immunoassay of Δ^9 - tetrahydrocannabinol and its metabolites in urine. J.Forensic Sci., Philadelphia, v.29, n.1, p.110–119, 1984.

114. PEAT, M.A. The analysis of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and its metabolites by immunoassay. Adv. Anal. Toxicol., Foster City, v. 1, p. 59–79, 1984.
115. PODKOWIK, B., KIPPENBERGER, D.J., SMITH, M.L. Interference in CG/MS confirmation of Δ^9 -tetrahydrocannabinol - 9 - carboxylic acid by a secondary tetrahydrocannabinol metabolite. Clin. Chem., Winston-Salem, v. 37, n. 7, p. 1307–1308, 1991.
116. PORTMANN, A.J., DANDLIKER, W.B. Anti-fluoresceina antibody of high affinity and restricted heterogeneity as characterized by fluorescence polarization and quenching equilibrium techniques. Biochem. Biophys. Res. Commun., New York, v. 43, n. 1, p. 207–212, 1971.
117. POPELKA, S.R., MILLER, D.M., HOLEN, J.T., KELSO, D.M. Fluorescence polarization immunoassay II. Analyser for rapid, precise, measurement of fluorescence polarization with use of disposable cuvettes. Clin. Chem., Winston -Salem, v. 27, n. 7, p. 1198–1201, 1981.
118. REINHARDT, V.E.D. Aspectos da análise toxicológica forense para identificação de usuários de Cannabis. São Paulo, 1993. p. [Dissertação - mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP].
119. ROLLINS, D.E., JENNISON, T.A., JONES, G. Investigation of interference by nonsteroidal anti-inflammatory drugs in urine tests for abused drugs. Clin. Chem., Winston-Salem, v. 36, n. 4, p. 602–606, 1990.
120. SÁ, L.M. Identificação de canabinoides em urina humana por cromatografia de gás e ensaio imunoenzimático com finalidade forense. São Paulo, 1981. 80p. [Tese - Livre Docência - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP].
121. SCHRAMM, W., SMITH, R.H., CRAIG, P.A. Drugs of abuse in saliva: a review. J. Anal. Toxicol., Niles, v. 16, p. 1–9, 1992.
122. SCHWARTZ, R.H., WILLETTE, R.E., HAYDEN, G.F., BOGEMA, S., THORNE, M.M., HICKS, J. Urinary cannabinoids in monitoring abstinence in a drug abuse treatment program. Arch. Pathol. Lab. Med., Chicago, v. 111, p. 708–711, 1987.

- 123.SCHWARZHOFF,R., CODY,J.T. The effects of adulterating agents on FPIA analysis of urine for drugs of abuse. J.Anal.Toxicol., Niles, v.17, p.14–17, 1993.
- 124.SEGAL,B. Adolescent initiation into drug-taking behavior: comparisons over a 5-year interval. J.Int.Addict., New York, v.26, n.3, p.267–279, 1991.
- 125.SHAW, L.M., EDLING, J., MATTES, R. Ultrasensitive measurement of Δ^9 - tetrahydrocannabinol with a high energy dynode detector and electron-capture negative chemical-ionization mass spectrometry. Clin.Chem., Winston-Salem, v.37, n.12, p.2062–2068, 1991.
- 126.SMITH, R. N., VAUGHAN, C.G. The decomposition of acidic and neutral cannabinoids in organic solvents.J.Pharm.Pharmacol., London, v.23, p.190–195, 1971.
- 127.SMITH, T.E., KOOB, J., WIRTZ, T. Ecology of adolescents' marijuana abuse. Int.J.Addict., New York, v.20, n.9, p.1421–1428, 1985.
- 128.STAFFORD,P. Psychedelics encyclopedia. 3.ed. Berkeley: Ronin,1992. p.156-221.
- 129.STRASINGER, S.K. Urinalysis and body fluids: a self - instructional text. 2.ed. Philadelphia: F.A.Davis , 1989. p.1–45.
- 130.SUNSHINE,I. Preliminary tests for drugs of abuse. Clin.Chem., Winston-Salem, v.34, n.2, p.331–334, 1988.
- 131.SUTHEIMER,C.A., YARBOROUGH,R., HEPLER,B.R., SUNSHINE,I. Detection and confirmation of urinary cannabinoids. J.Anal.Toxicol., Niles, v.9, p.156–160, 1985.
- 132.TELLES,C. Aspectos legais e policiais das drogas no Brasil. Prevenção e repressão - capacitação profissional do policial. Arq. Policia Civil, São Paulo, v.36, p.41–61, 1981.
- 133.TURK,R.F., MANNO,J.E., JAIN,N.C., FORNEY,R.B. The identification, isolation, and preservation of Δ^9 -tetrahydrocannabinol. J.Pharm.Pharmacol., London, v.23, p.190–195, 1971.

134. UDENFRIEND, S. Fluorescence assay in biology and medicine. New York: Academic Press, 1962. 443p.
135. VINSON, J.A., LOPATOFISKY, D.J. A semi - automated extraction and spotting system for drug analysis by TLC. I. Procedure for analysis of the major metabolite of Δ^9 -tetrahydrocannabinol in urine. J.Anal.Toxicol., Niles, v.9, p.6–9, 1985.
136. WALL, M.E., SADLER, B.M., BRINE, D., TAYLOR, H., PEREZ-REYES, M. Metabolism, disposition, and kinetics of Δ^9 -tetrahydrocannabinol in men and women. Clin.Pharmacol.Ther., ST.Louis, v.34, n.3, p.352–363, 1983.
137. WARNER, A. Interference of common household chemicals in immunoassay methods for drugs of abuse. Clin.Chem., Winstom-Salem, v.35, n.4, p.648–651, 1989.
138. WARNER, M. Jumping to conclusions. Anal.Chem., Washington, v.59, n.7, p.521A–522A, 1987.
139. WATANABE, K., NARIMATSU, S., YAMAMOTO, I., YOSHIMURA, H. Oxygenation mechanism in conversion of aldehyde to carboxylic acid catalysed by a cytochrome P-450 isozyme. J.Biol.Chem., Baltimore, v.266, n.5, p.2709–2711, 1991.
140. WATANABE, K., YAMAMOTO, I., OGURI, K., YOSHIMURA, H. Microsomal oxygenase catalysed oxydation of 11 -hidroxy - Δ^8 -tetrahydrocannabinol to 11-oxo- Δ^8 - tetrahydrocannabinol. Biochem. Biophys. Res. Commun., New York, v.88, n.1, p.178–182, 1979.
141. WATSON, I.D. Analysis of commonly abused drugs in urine at selected threshold (cutoff) concentrations. Clin.Chem., Winstom-Salem, v.38, n.3, p.441, 1992.
142. WEINTRAUB, M. Sonhos e sombras: a realidade da maconha. São Paulo: Harper & Row, 1983. 112p.

143. WELLS, D.J., BARNHILL Jr, T. Comparative results with five cannabinoid immunoassay systems at the screening threshold of 100 ug/L. Clin.Chem., Winstom-Salem, v.35, n.11, p.2241–2243, 1989.
144. WILLSON, N.J., KOGAN, M.J., PIERSON, D.J., NEWMAN, E. Confirmation of EMIT® cannabinoid assay results by bonded phase adsorption with thin layer chromatography. J.Toxicol.Clin.Toxicol., New York, v.20, n.5, p.465–473, 1983.
145. WINEK, C.L., ELZEIN, E.O., WAHBA, W.W., FELDMAN, J.A. Interference of herbal drinks with urinalysis for drugs of abuse. J.Anal.Toxicol., Niles, v.17, p.246–247, 1993.
146. WU, A.H.B., ONIGBINDE, T.A., WONG, S.S., JOHNSON, K.G. Evaluation of full-scanning GC / Ion Trap MS analysis of NIDA drugs-of-abuse urine testing in urine. J.Anal.Toxicol., Niles, v.16, p.202–206, 1992.
147. XAVIER, G.M. Relatório sobre a situação brasileira do tráfico e consumo de drogas. Ministério da Justiça. Departamento de Polícia Federal. 1979. 8p.
148. YU, J., WILLIFORD, W.R. The age of alcohol onset and alcohol, cigarette, and marijuana use patterns: an analysis of drug use progression of young adults in New York state. Int.J.Addict., New York, v.27, n.11, p.1313–1323, 1992.
149. ZIMMERMAN, S., ZIMMERMAN, A.M. Genetic effects of marijuana. Int.J.Addict., New York, v.25, n.1A, p.19–33, 1990–1991.

ERRATA

1. Página 60 - não houve inclusão da amostra 9B na tabela 12, cujo resultado é: não detectado (ND). À amostra 10 corresponde o resultado positivo (+).
2. Página 64 - não houve inclusão da amostra 9B na tabela 15, cujo resultado é negativo.
3. Página 71 - na tabela 20, onde se lê canabinóides , leia-se THCCOOH.