UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM TÓXICOLOGIA E ANÁLISES
TOXICOLÓGICAS

Determinação de canabinóides em cabelo por
microextração em fase sólida por *headspace* e
análise por espectrometria de massa
associada à cromatografia em fase gasosa

CAROLINA DIZIOLI RODRIGUES DE OLIVEIRA

Orientadora:

Profa. Dra. Regina Lúcia de Moraes Moreau

São Paulo

2005

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e
Análises Toxicológicas

Determinação de canabinóides em cabelo por
microextração em fase sólida por *headspace* e análise por
espectrometria de massa associada à cromatografia em
fase gasosa

Carolina Dizioli Rodrigues de Oliveira

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Regina Lúcia de Moraes Moreau

São Paulo
2005

Carolina Dizioli Rodrigues de Oliveira

Determinação de canabinóides em cabelo por microextração em fase sólida por *headspace* e análise por espectrometria de massa associada à cromatografia em fase gasosa

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Regina Lúcia de Moraes Moreau
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Relatório de Defesa

Relatório de defesa pública de Dissertação do(a) Senhor(a) Carolina Dizioli Rodrigues de Oliveira no Programa: Toxicologia e Análises Toxicológicas, do(a) Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Aos 21 dias do mês de julho de 2005, no(a) Auditório - Bloco 13A realizou-se a Defesa da Dissertação do(a) Senhor(a) Carolina Dizioli Rodrigues de Oliveira, apresentada para a obtenção do título de Mestre em Toxicologia e Análises Toxicológicas, intitulada:

"Determinação de canabinóides em cabelo de usuários de 'Cannabis' por microextração em fase sólida por 'headspace' e análise por espectrometria de massa associada à cromatografia em fase gasosa e avaliação da exposição"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Vínculo do Docente	Sigla da Unidade	Resultado
Regina Lucia de Moraes Moreau	Presidente	FCF	<i>aprovada</i>
André Malbergier	Suplente	Docente Externo	<i>Aprovado</i>
Ovandir Alves Silva	Titular	FCF	<i>Aprovado</i>
Resultado Final: <i>APROVADA</i>			
Parecer da Comissão Julgadora			

Eu, Maria Roseli Ramos *MR Ramos*, Secretária, lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as). São Paulo, aos 21 dias do mês de julho de 2005.

André Malbergier
André Malbergier

Ovandir Alves Silva
Ovandir Alves Silva

Regina Lucia de Moraes Moreau
Regina Lucia de Moraes Moreau
Orientador(a)

Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

Nos termos do artigo 110, do RG-USP, encaminhe-se o presente relatório à CPG, para homologação.

Impresso em: 07/07/2005

*“Cada um de nossos atos tem uma
dimensão universal. Por causa disso,
a disciplina ética, a conduta íntegra e
um discernimento cuidadoso são
elementos decisivos para uma vida
feliz e significativa.”*

Dalai Lama

*Aos meus pais, João Baptista e Evelina,
Pelo esforço, apoio e incentivo necessários
para eu construir meu caminho, e serem o exemplo
que me faz querer sempre o melhor.*

*A Deus e à Nossa Senhora Auxiliadora
Por iluminarem meus passos
e jamais me deixarem só.*

Agradecimentos

À coordenadora do programa de pós-graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas e orientadora Profa. Dra. Regina Lúcia de Moraes Moreau pela acolhida e oportunidade de crescimento acadêmico, pela orientação e pelos relevantes conselhos durante a realização deste trabalho.

À vice-coordenadora do programa de pós-graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas Profa. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky pela oportunidade.

Aos professores do programa de pós-graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas, pelos ensinamentos recebidos.

Aos voluntários que participaram deste estudo pela valiosa contribuição.

À equipe médica da Clínica de Tratamento de Dependentes Químicos Vila Serena, São Paulo, SP, em especial à Eleni e à Silze, pela coleta das amostras e dedicação.

À Leila Aparecida Bonadio pela normatização das referências bibliográficas.

Aos amigos do Laboratório de Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Carmem, Dalva, Luzia. Ângelo, Roseli, Alessandro, Mônica, Helena e Karla pelo carinho e auxílio nesses anos.

Ao Maurício pela amizade, franqueza, paciência, carinho e pela valiosa contribuição científica para esse trabalho e para meu crescimento intelectual.

Aos amigos da pós-graduação, em especial à Paula Garcia, Emerson, Simone, Daniela, Luciane, Paula Kujbida, Vânia e Daniel, pela solidariedade, pelo companheirismo nos momentos de alegria e, principalmente, nos momentos mais difíceis.

Às amigas de hoje e de sempre: Thais, Renata, Patrícia e Priscila pela amizade e essencial presença na minha vida.

À minha amiga e segunda mãe, Maria Emília, pelo apoio constante e incondicional, pelas conversas e conselhos e por acreditar em meu potencial.

Aos meus queridos irmãos Irene, Eloiza e Leandro, pelo carinho, companheirismo e constante estímulo em todos os momentos.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para realização deste trabalho.

Meus agradecimentos

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	6
2.1. Características da planta	7
2.2. Constituintes	8
2.3. Produtos obtidos da <i>Cannabis</i>	11
2.4. Toxicocinética	12
2.5. Toxicodinâmica	16
2.6. Efeitos tóxicos	18
2.7. Uso terapêutico	25
2.8. Matrizes não convencionais para análises toxicológicas de canabinóides	27
2.9. Cabelo como importante matriz não convencional na verificação da exposição à drogas de abuso	29
2.10. Mecanismo de incorporação de fármacos no cabelo	33
2.11. Aspectos analíticos da detecção de canabinóides em cabelo ..	38
2.11.1. Microextração em fase sólida (SPME)	45
3. OBJETIVO DO TRABALHO	48
4. MATERIAL E MÉTODOS	50
4.1. Material	51
4.1.1. Reagentes	51
4.1.2. Soluções-padrão	51
4.1.3. Equipamentos e Acessórios	52
4.1.4. Amostras	52
4.2. Métodos	53
4.2.1. Aplicação do questionário	53
4.2.2. Coleta de amostras	53
4.2.3. Método para análise de canabinóides na urina	55
4.2.4. Desenvolvimento de método para determinação de canabinóides no cabelo por HS-SPME e GC/MS	55
4.2.4.1. Preparação da amostra	55
4.2.4.2. Condições Cromatográficas	56
4.2.4.3. Otimização do método	57
4.2.4.3.1. Estudo do pH ótimo para extração dos analitos	57
4.2.4.3.2. Estudo da influência da temperatura no rendimento da análise	58
4.2.4.3.3. Estudo da influência da massa de cabelo para análise dos canabinóides	58
4.2.4.3.4. Estudo do tempo de adsorção dos analitos	58
4.2.5. Validação do método	59

4.2.5.1. Limite de Detecção e Quantificação	60
4.2.5.2. Linearidade	60
4.2.5.3. Precisão intraensaio e interensaio	60
4.2.5.4. Recuperação	61
5. RESULTADOS	62
5.1. Resultados da otimização do método	63
5.1.1. Estudo do pH ótimo para extração dos analitos	63
5.1.2. Estudo da influência da temperatura no rendimento da análise	64
5.1.3. Estudo da influência da massa de cabelo para análise dos canabinóides	64
5.1.4. Estudo do tempo de adsorção dos analitos	65
5.2. Cromatograma característico da análise de canabinóides em cabelo	66
5.3. Resultados da validação do método para determinação de canabinóides no cabelo	66
5.3.1. Limites de Detecção e Quantificação	66
5.3.2. Linearidade	68
5.3.3. Precisão Intra-ensaio e Interensaio	69
5.3.4. Recuperação	69
5.4 Resultados obtidos com a análise toxicológicas de amostras de usuários de <i>Cannabis</i>	70
6. DISCUSSÃO	72
7. CONCLUSÃO.....	86
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
9. ANEXOS	103
ANEXO A	105
ANEXO B	106
ANEXO C	109
ANEXO D	111

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – . A – planta masculina, B – flor masculina, C- flor feminina, D – fruto, E – semente, F - planta feminina	9
FIGURA 2 – Estrutura molecular dos principais constituintes da <i>Cannabis</i>	10
FIGURA 3 – Principais produtos de biotransformação do Δ^9 -tetraidrocanabinol (THC)	15
FIGURA 4 – Diagrama do modelo de difusão passiva para incorporação de fármacos no cabelo, mostrando transferência de fármacos do sangue para o crescimento das células do cabelo no bulbo	35
FIGURA 5 – Diagrama de modelo multi-compartimental para incorporação de fármacos, mostrando transferência de drogas durante as três fases do crescimento capilar e por múltiplas fontes	36
FIGURA 6 – Esquema para extração da amostra	56
FIGURA 7 – Estudo do pH ótimo para extração dos analitos em cabelo adicionado dos padrões de canabidiol (CBD), canabinol, (CBN) e Δ^9 -tetraidrocanabinol (THC) na concentração de 5,0ng/mg	63
FIGURA 8 – Estudo da influência da temperatura no rendimento da análise. Cabelo adicionado dos padrões de canabidiol (CBD), canabinol, (CBN) e Δ^9 -tetraidrocanabinol (THC) na concentração de 5,0ng/mg	64
FIGURA 9 – Estudo da influência da quantidade de cabelo no rendimento da análise. Massas de cabelo adicionadas 50ng dos padrões de canabidiol (CBD), canabinol, (CBN) e Δ^9 -tetraidrocanabinol (THC) nas amostras	65
FIGURA 10 – Estudo do tempo de exposição para adsorção dos analitos na fibra em cabelo adicionado dos padrões de canabidiol (CBD), canabinol, (CBN) e Δ^9 -tetraidrocanabinol (THC) na concentração de 5,0ng/mg	65
FIGURA 11 – Cromatograma obtido pela análise por HS-SPME-GC/MS de cabelo adicionado dos padrões de canabinóides na concentração de 7,5ng/mg. (A- canabidiol, B- Δ^9 -tetraidrocanabinol, C- Δ^9 -tetraidrocanabinol deuterado, D- canabinol)	66
FIGURA 12 – Estudo da linearidade do canabidiol (CBD) na faixa de concentração de 0,75 a 12ng/mg. Curva de calibração, equação da reta e coeficiente de correlação linear	67

FIGURA 13 – Estudo da linearidade do canabinol (CBN) na faixa de concentração de 0,5 a 12ng/mg. Curva de calibração, equação da reta e coeficiente de correlação linear	68
FIGURA 14 – Estudo da linearidade do Δ^9 -tetraidrocanabinol (THC) na faixa de concentração de 0,5 a 12ng/mg. Curva de calibração, equação da reta e coeficiente de correlação linear	68
FIGURA 15 – Cromatograma obtido pela análise por HS-SPME-GC/MS de cabelo de voluntário contendo canabidiol na concentração de 0,12ng/mg (A), Δ^9 -tetraidrocanabinol (B) na concentração de 0,19ng/mg e canabinol (D) na concentração de 0,48 ng/mg. Padrão interno (C): Δ^9 -tetraidrocanabinol deuterado...	70

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Principais comparações entre amostras de cabelo e urina	33
TABELA 2 – Procedimentos analíticos desenvolvidos para detecção de canabinóides no cabelo	43
TABELA 3 – Esquema de coleta de amostras de cabelo e urina	54
TABELA 4 – LOD (Limite de detecção) e LOQ (Limite de quantificação) para canabidiol (CBD), canabinol (CBN) e Δ^9 -tetraidrocanabinol (THC) e seus respectivos CV% (coeficiente de variação)	66
TABELA 5 – Coeficientes de variação para canabidiol (CBD), canabinol (CBN) e tetraidrocanabinol (THC), onde CQ1 corresponde ao controle de qualidade baixo (concentração de 1,5ng/mg de cabelo), CQ2 corresponde ao controle de qualidade médio (concentração de 4,5ng/mg de cabelo) e CQ3 corresponde ao controle de qualidade alto (concentração de 7,5ng/mg de cabelo)	69
TABELA 6 – Recuperação média para canabidiol (CBD), canabinol (CBN) e tetraidrocanabinol (THC), onde CQ1 corresponde ao controle de qualidade baixo (concentração de 1,5ng/mg de cabelo), CQ2 corresponde ao controle de qualidade médio (concentração de 4,5ng/mg de cabelo) e CQ3 corresponde ao controle de qualidade alto (concentração de 7,5ng/mg de cabelo)	69
TABELA 7 – Resultados da análise dos questionários e das amostras de cabelo de voluntários	71

RESUMO

Determinação de canabinóides em cabelo por microextração em fase sólida por *headspace* e análise por espectrometria de massa associada à cromatografia em fase gasosa

Carolina Dizioli Rodrigues de Oliveira, Regina Lúcia de Moraes Moreau - Mestrado

Foi desenvolvido um método para determinar canabinóides (canabidiol, canabinol e delta-9-tetraidrocanabinol) no cabelo. Uma amostra de 10mg foi descontaminada com diclorometano, seguida de digestão alcalina, microextração em fase sólida por *headspace* (HS-SPME) e analisada por espectrometria de massa associada à cromatografia em fase gasosa (GC/MS). Os limites de detecção e de quantificação foram de 0,07 e 0,12 ng/mg, respectivamente, para todos canabinóides estudados. O método demonstrou ser simples, rápido, preciso e linear no intervalo de 0,12 a 12 ng/mg ($r^2 > 0,98$). Amostras de cabelo de 8 usuários de *Cannabis* foram coletadas de pacientes provenientes de uma clínica dependentes pela equipe médica. O método mostrou-se eficiente em amostras de cabelos de usuários que faziam uso da droga pelo menos 10 vezes por semana.

Unitermos:

- Cabelo
- Canabinóides
- *Cannabis*
- Cromatografia em fase gasosa associada a espectrometria de massa
- Microextração em fase sólida por *headspace*

E-mail: caroldizioli@hotmail.com

SUMMARY

Determination of cannabinoids in hair of Cannabis user by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry and exposure assessment

Carolina Dizioli Rodrigues de Oliveira, Regina Lúcia de Moraes
Moreau - Mestrado

A method was developed to detect cannabinoids (cannabidiol, cannabinol and delta-9-tetrahydrocannabinol) in hair. A 10 mg of hair sample was decontaminated by dichloromethane followed by alkaline digestion, headspace solid-phase microextraction technique (HS-SPME) and analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS). The detection and quantitation limits were 0,07 and 0,12ng/mg respectively for all studied cannabinoids. The method proved to be simple, fast, precise and linear at the range of 0,12 to 12ng/mg ($r^2 > 0,98$). Eight hair samples of Cannabis user were collected from patients at admittance from a dependence clinic by clinical staff. The method showed efficient in samples of users who use the drug at least 10 fold a week.

Uniterms:

- *Hair*
- *Cannabinoids*
- *Cannabis*
- *Gas chromatography-mass spectrometry*
- *Headspace solid-phase microextraction*

E-mail: caroldizioli@hotmail.com

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Originária da Ásia Central, os primeiros registros sobre o uso da planta *Cannabis sativa* datam por volta de 5.000 a 6.000 anos atrás. A fibra de *Cannabis* (cânhamo) serviu de matéria-prima para confecção de velas de navios, cordas e roupas que foram utilizados pelos antigos povos gregos, chineses e romanos. Em 2737 a.C., o imperador chinês Shen-Nung mencionou em seus manuscritos, as propriedades farmacológicas da *Cannabis* contra malária e reumatismo. Na Índia e na Península Arábica também foi conhecida antes do nascimento de Cristo como uma erva medicinal, usada no tratamento de diversas doenças (ADAMS & MARTIN, 1996; DRUMMER, 2001).

A *Cannabis sativa* é relativamente nova na cultura do ocidente. No início do século XX suas propriedades psicoativas foram descobertas, mas não atraíram muita atenção. Durante o início da década de 20 foi tratada como maléfica devido a associação entre seu uso e a criminalidade. Em meados da década de 30, foi classificada como uma droga responsável por atos de violência; na década de 40, a população se convenceu que a *Cannabis* era uma “droga assassina” (*killer drug*), sendo considerada uma grande ameaça social. Apesar da campanha contra o uso da maconha continuar até os anos 50, entre 50 e 60, tornou-se extremamente popular entre os jovens e continua até os dias de hoje (JULIEN, 1997).

A *Cannabis* é a droga ilícita mais comumente produzida, traficada e consumida em todo o mundo (CIRIMELE, KINTZ & MANGIN, 1995; EUROPEAN MONITORING CENTRE FOR DRUGS AND DRUG

ADDICTION UNITED, 2004; NATIONS OFFICE ON DRUG AND CRIME, 2004).

No período de 2001 a 2003, cerca de 146 milhões, ou 3,7% da população mundial entre as idades de 15 a 64 anos consumiram *Cannabis*. (UNITED NATIONS OFFICE ON DRUG AND CRIME, 2004). Em 2003, considerando a população americana acima de 12 anos, estimou-se que 14,6 milhões (6,2% da população) eram usuários freqüentes de maconha; 25 milhões (10,6%) haviam feito uso nos últimos 12 meses e 3,1 milhões (1,3%) usavam diariamente, ou seja, 300 dias ou mais por ano (DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2003). Com relação aos Estados Membro da União Européia, em 2003, as taxas mais elevadas de prevalência de consumo recente de *Cannabis* (nos últimos 12 meses) em jovens adultos (15-34 anos) situaram na maior parte dos países entre 5 a 20% (EUROPEAN MONITORING CENTRE FOR DRUGS AND DRUG ADDICTION UNITED, 2004).

No Brasil, um levantamento realizado pelo CEBRID (Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas, da Universidade Federal de São Paulo) com estudantes de Ensino Fundamental e Médio (entre 13 e 18 anos) em 10 capitais brasileiras em 1997, mostrou que a maconha é a droga ilícita mais utilizada e pela primeira vez em 10 anos, ultrapassou os solventes como a droga de maior uso ao longo da vida. Comparando levantamentos anteriores (1987, 1989 e 1993), a *Cannabis* foi a droga que teve seu uso aumentado, passando de 2,8% em 1987 para 7,6% em 1997. O uso freqüente (seis vezes ou mais por mês) também aumentou estatisticamente ao longo dos quatro levantamentos, passando de 0,4% em 1987 para 1,7% em 1997. Em levantamento domiciliar feito na cidade de São Paulo em 1999, com a população acima de 12 anos, a *Cannabis* foi a droga que teve maior uso (6,6%), seguida pelos solventes (2,7%) e pela cocaína (2,1%) (CEBRID, 1997; RIBEIRO & MARQUES, 2002).

A sociedade luta contra o aumento do uso e do abuso de drogas ilícitas através de legislações, prevenção, regulamentações, tecnologia e tratamento (CONE, 2001).

O consumo de drogas de abuso atinge diversos segmentos da sociedade e as análises toxicológicas são importantes como medidas de prevenção e controle. Assim, vêm sendo requisitadas com a finalidade de identificar a exposição à drogas de abuso no ambiente de trabalho, em programas anti-dopagem no esporte, no auxílio e acompanhamento do tratamento de usuários em clínicas e investigações forense (KIDWELL, BLANCO & SMITH, 1997; CAMPOS, YONAMINE & MOREAU, 2003; FOLLADOR *et al*, 2004; SILVA & YONAMINE, 2004;).

O desenvolvimento de métodos para essas análises, assim como sua regulamentação e certificação são assuntos de grande importância, não somente em relação à melhora da sensibilidade e confiabilidade, como também no emprego de regras uniformes e bem estabelecidas (CHRISTOPHERSEN & MORLAND, 1994; DE LA TORRE *et al*; 1997; CONE, 2001; MIDIO, DE MORAES MOREAU & SILVA, 2001).

Métodos para a detecção de drogas de abuso em urina estão bem estabelecidos e são aplicados na rotina dos laboratórios que realizam o controle do uso de drogas. Esta matriz possui um período de detecção relativamente curto, podendo variar de horas a dias, o que permite comprovar exposição recente.

Atualmente, análises toxicológicas vêm sendo empregadas em matrizes alternativas com finalidade de investigações criminosas (cabelo, saliva e suor), casos de custódia de crianças (cabelo), vigilância de liberdade condicional (suor), casos de divórcio (cabelo) e avaliação da segurança no trabalho ou no trânsito (saliva) (CONE, 2001).

A análise de cabelo tem mostrado ser de grande potencial na detecção e controle da exposição do uso drogas de abuso, pois os fármacos são incorporados durante a formação da fibra capilar e permanecem

estáveis na matriz queratinosa. Oferece a vantagem de ser uma matriz de coleta simples, não invasiva, de difícil adulteração, sem a necessidade de condições especiais de transporte e armazenamento. Além disso, possui uma larga janela de detecção dos analitos incorporados, que pode variar, de acordo com o comprimento do cabelo do indivíduo, de meses até anos, permitindo comprovar exposição a longo prazo.

No entanto, uma exata interpretação dos resultados analíticos é difícil, pois muitas questões a respeito da incorporação dos fármacos no cabelo ainda não foram respondidas, principalmente no que diz respeito aos canabinóides (THORSPECKEN, SKOPP & PÔTSCH, 2004).

A importância deste projeto está em desenvolver e validar um método para a determinação de canabinóides no cabelo, no sentido de fornecer subsídios no esclarecimento de situações onde é necessário evidenciar o uso pregresso de canabinóides, particularmente naqueles que envolvam casos forenses.

Revisão da Literatura

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Características da planta

Taxonomia

Divisão: Anthopyta

Classe: Hammamelidae

Ordem: Urticales

Família: Cannabinaceae

Nome Científico: *Cannabis sativa* L. var. *indica* Lamarck

Sinonímia científica: *Cannabis indica* Lamarck, *Cannabis chinesis* Del, *Cannabis erratica* Siev. , *Cannabis foetida* Gilib. , *Cannabis lupulus* Scop. , *Cannabis macrosperma* Stokes (OLIVEIRA, AKISUE & AKISUE, 1991).

É um arbusto, classificado pelo naturalista e médico sueco, Carolus Linneaus como *Cannabis sativa* L., em 1753 (FONT QUER, 1962). Originária da Ásia Central, há várias subespécies de *Cannabis sativa* incluindo: *Cannabis sativa* var. *indica*, var. *americana*, var. *mexicana* e var. *ruderalis* (DRUMMER, 2001; CLARKE & WATSON, 2002).

A *Cannabis sativa* é alta, ereta e anual. Cresce tanto em solo fértil como em zonas estéreis e áridas, atingindo alturas variáveis podendo alcançar até 5 metros. As sementes plantadas no outono geralmente germinam dentro de 3 a 7 dias. Como observado na Figura 1 *Cannabis sativa* é uma planta dióica, ou seja, apresenta órgãos de reprodução femininos (pistilo) e masculinos (estames) que se desenvolvem em plantas separadas, embora exemplares monóicos, com ambos os sexos na mesma planta, já tenham sido encontrados (OLIVEIRA, AKISUE & AKISUE, 1991; REINHARDT, 1993; CLARKE & WATSON, 2002).

As inflorescências e folhas da *Cannabis sativa* secretam uma resina contendo compostos psicoativos chamados canabinóides. As mais altas concentrações são encontradas nas inflorescências, seguido pelas folhas. Pequenas quantidades são encontradas no caule e na raiz e nenhuma nos frutos. A concentração dos canabinóides depende também de outros fatores, como a região e a quantidade de luz disponível, o clima e a forma de cultivo. (REINHARDT, 1993). Métodos modernos de hibridização têm produzido numerosas culturas que chegam a conter 20% do principal psicoativo (Δ^9 -tetraidrocanabinol – THC) no composto seco (ADAMS & MARTIN, 1996; CLARKE & WATSON, 2002).

Conforme as diferentes proporções de caule, folhas, inflorescências e material fibroso presentes na confecção de um cigarro de maconha, a concentração de THC podem variar (ADAMS & MARTIN, 1996). Silva (2003), analisou 28 amostras de *Cannabis* apreendidas no estado de São Paulo e encontrou teores que variaram de 0,5 a 1,55%.

2.2. Constituintes

O termo canabinóide, considerando sua restrita definição farmacognóstica, se refere aos fitocanabinóides da *Cannabis sativa* L com estrutura típica de 21 carbonos, numerados de acordo com o sistema monoterpenóide ou sistema dibenzopirano. No entanto, este conceito tem sido substituído pelo conceito baseado na farmacologia e na química (GROTENHERMEN, 2003).

A classe dos canabinóides é a principal dentre os 421 compostos presentes na planta (TURNER, 1980, REINHARDT, 1993). Um total de 61 fitocanabinóides já foi identificado (TURNER, 1980; VOTH & SCHWARTZ, 1997), a maior parte deles pertencentes a diferentes subclasses ou tipos (GROTENHERMEN, 2003).

Figura 1 – A – planta masculina, B – flor masculina, C- flor feminina, D – fruto, E – semente, F - planta feminina (OLIVEIRA, AKISUE & AKISUE, 1991).

O principal constituinte ativo (Figura 2) da *Cannabis sativa* é o Δ^9 -tetraidrocanabinol (THC). Existe como isômero (-)-trans. O THC é termossensível e fotossensível. O armazenamento por longo prazo leva à diminuição do conteúdo de THC devido a sua degradação e oxidação a canabinol. O canabinol (CBN) é o canabinóide mais abundantemente encontrado na *Cannabis* adulta e tem cerca de um décimo da atividade do THC em humanos, quando administrado por via intravenosa. Outro constituinte bastante presente é o canabidiol (CBD), no qual, em humanos, apresenta atividade anticonvulsivante, e além de ser desprovido de atividade psicomimética, parecer agir de forma antagônica sobre os efeitos psíquicos do THC. (DRUMMER, 2001; GROTENHERMEN, 2003).

Pode-se distinguir a planta *Cannabis* em 3 tipos. A primeira é tipo droga, com concentração de THC maior que 1% e de CBD igual a zero,

encontrada em plantas que crescem em climas quentes como México e África do Sul. A segunda é a tipo fibra, com concentração de THC menor que 0,25% e de CBD maior que 0,50%, observada em plantas de climas temperados como França e em alguns países do Leste Europeu. E a terceira, do tipo intermediária, com concentração de THC maior que 0,50% e de CBD maior que 0,50%, encontrada em plantas que crescem em países de clima quente ao redor do Mediterrâneo como Marrocos e Líbano (REINHARDT & MIDIO, 1993).

Alguns autores julgam ser pouco válida a correlação do conteúdo de canabinóides com o país ou região de origem da planta. Porém, outros pensam que o estudo da proporção de CBD e THC seja um critério extremamente útil para indicar o país de origem da planta e a quantidade de canabinóides administradas (STEFANIDOU *et al*, 1998).

Figura 2 – Estrutura molecular dos principais constituintes da *Cannabis*

2.3. Produtos obtidos da *Cannabis*

De acordo com a parte da planta utilizada e o modo de preparo para consumo, os extratos da *Cannabis* recebem diferentes nomes, que podem variar conforme a região ou país e são sempre difíceis de serem definidos (REINHARDT, 1993).

Maconha é a denominação da *Cannabis* usada no Brasil (*marijuana* nos Estados Unidos), formada por diversas partes da planta em proporções variáveis, incluindo folhas e inflorescências. É fumada através de cigarros preparados da planta. Em média um cigarro de maconha contém entre 0,5 a 1,0 g da planta, possuindo teores de 1 a 3% de THC (REINHARDT, 1993; BONO, 1998).

Haxixe é um exsudato resinoso removido da *Cannabis*, usualmente encontrado na forma de blocos deste material; de coloração marrom a preta. Esse é o produto mais potente da planta, contendo teores de THC que variam de 1,4 a 18,8%. É geralmente fumado através de cachimbos ou consumido em alimentos (REINHARDT, 1993; BONO, 1998).

Hash oil é um extrato oleoso da planta que é aquecido para remoção dos solventes orgânicos utilizados. Contém até 60% de THC, podendo ser adicionado a alimentos ou bebidas (REINHARDT, 1993; BONO, 1998).

Sinsemilla é obtida das sumidades floridas das plantas de *Cannabis* femininas não polinizadas (não há sementes na planta). Pode conter teores relativamente altos de THC (REINHARDT, 1993; BONO, 1998).

Hemp é uma forma de *Cannabis sativa* que contém pouco ou nenhum teor de THC (< 0,5%). *Hemp* é usado para produzir longas fibras para a indústria têxtil ou de papel. Sementes e derivados oleosos da semente têm aparecido em cosméticos e em alimentos (DRUMMER, 2001).

Ganja (Índia) é uma resina de folhas e inflorescências que pode ser fumada ou adicionada a bebidas e doces, possuindo concentração em torno de 3% (REINHARDT, 1993).

Skunk (ou *skank*) amplamente descrito na literatura, é também chamado de “maconha de laboratório”, devido ao cultivo em condições controladas de temperatura, umidade, nutrientes, luminosidade (intermitente, por luz artificial), geralmente em hidroponia. Este controle tem por finalidade obter plantas com concentrações bem maiores de THC que nas plantas cultivadas em áreas externas, produzidas naturalmente. É também chamados de “Super Maconha” e os teores de THC podem chegar variar entre 5 – 10% (BONO, 1998; SILVA, 2003).

2.4. Toxicocinética

Os produtos da *Cannabis* podem ser administrados por via pulmonar, oral, oftálmica, intravenosa, parenteral, retal e dérmica (GROTENHERMEN, 2003).

Por via oral, pode ser incorporada a alimentos como bolos, biscoitos ou ainda adicionada na forma de extratos ou soluções alcoólicas em bebidas, usando a semente ou óleo da planta. (CHIANG & RAPAKA, 1987; ADAMS & MARTIN, 1996; DRUMMER, 2002; GROTENHERMEN, 2003). Após administração oral, os canabinóides são absorvidos de forma lenta e irregular, atingem concentração máxima entre 1 e 5 horas, mostrando uma baixa biodisponibilidade sistêmica, da ordem de 6%, devido a um extenso efeito de primeira passagem (CHIANG & RAPAKA, 1987; DRUMMER, 2001; GROTENHERMEN, 2003).

Fumar *Cannabis* por meio de cigarros ou *pipas* (pequenos cachimbos) contendo em média de 0,5 a 1,0 grama da planta é a maneira mais popular de consumo desta droga. A velocidade de absorção por esta via é muito mais rápida quando comparada com a via oral devido às condições anatômicas do pulmão (extensa área de superfície alveolar, extensa rede capilar e alto fluxo sanguíneo) (PEREZ-REYES, 1990; CHIANG & RAPAKA,

1987; SOUBHIA, 1999; DRUMMER, 2001). A biodisponibilidade pela via pulmonar varia de 14-50%. A máxima concentração de THC no plasma ocorre em poucos minutos, devido a diversos fatores que ocorrem durante o ato de fumar (CHIANG & RAPAKA, 1987; PEREZ-REYES, 1990; DRUMMER, 2001; GROTENHERMEN, 2003), dentre eles:

- Potência da *Cannabis* fumada,
- Perdas no processo de pirólise, que podem variar entre 23 e 30% do conteúdo inicial,
- Perda de THC pela corrente secundária (entre 40-50%); apenas 20-27% está disponível na corrente primária (fumaça inalada),
- Dinâmica do ato de fumar (cigarro ou cachimbo),
- Quantidade de THC retida no trato respiratório superior (CHIANG & RAPAKA, 1987; PEREZ-REYES, 1990).

A distribuição de THC e seus produtos de biotransformação para os tecidos está relacionada com suas propriedades físico-químicas, com processos ou barreiras específicas de transporte (GROTENHERMEN, 2003).

Cerca de 90% do THC encontrado no sangue é distribuído para o plasma e os outros 10% para as células vermelhas do sangue. Estima-se que 90-95% do THC do plasma é ligado a proteínas plasmáticas, principalmente lipoproteínas e em menor proporção à albumina (CHIANG & RAPAKA, 1987; GROTENHERMEN, 2003).

Após a absorção, o THC é rapidamente distribuído para os tecidos, penetrando prontamente em tecidos vascularizados como fígado, coração, pulmão, jejuno, rim, baço, glândulas mamárias, placenta, córtex adrenal, músculos, glândulas pituitária e tireóide, resultando numa queda significativa na concentração plasmática. Posteriormente, devido a sua lipofilicidade ocorre uma alta ligação em tecidos e áreas gordurosas. A concentração de THC no tecido adiposo é cerca de 1.000 vezes maior que a concentração plasmática, enquanto a concentração THC no cérebro é de 3 a 10 vezes a concentração plasmática. A relativa baixa concentração no cérebro é

provavelmente devido à alta perfusão deste órgão (CHIANG & RAPAKA, 1987; GROTENHERMEN, 2003).

A biotransformação do THC é complexa, com cerca de 20 produtos identificados (CHIANG & RAPAKA, 1987; DRUMMER, 2001). Envolve oxidação alílica, epoxidação, oxidação alifática, descarboxilação e conjugação (TURNER, 1990; CHIANG & RAPAKA, 1987). Somente 3 são mais significantes: o hidroxí-THC, o carboxi-THC e o carboxi-THC glicuronídeo (ver Figura 3):

- 11-hidroxí- Δ^9 -tetraidrocanabinol (hidroxí-THC); composto levemente mais psicoativo que THC.
- Ácido 11-nor- Δ^9 -tetraidrocanabinol-9-carboxílico (carboxi-THC ou THCCOOH), produzido pela oxidação do 11-OH- Δ^9 -THC. É um composto polar e inativo.
- Ácido 11-nor- Δ^9 -tetraidrocanabinol-9-carboxílico glicuronídeo. O carboxi-THC conjuga-se com ácido glicurônico para ser eliminado pela urina (DRUMMER, 2001).

O THC é completamente biotransformado e excretado como produtos polares como hidroxí, carboxi e formas conjugadas. Aproximadamente 20% da dose é excretada na urina e 40% nas fezes. O carboxi-THC é o principal produto de biotransformação eliminado como glicuronídeo conjugado, embora cerca de 2% seja excretado como 11-hidroxí-THC (DRUMMER, 2001).

Figura 3 – Principais produtos de biotransformação do tetraidrocanabinol (THC)

Estudos mostram que há uma grande variação na quantidade do carboxi-THC excretado na urina, persistindo detectável por 12 dias seguidos com consumo moderado de *Cannabis*, enquanto que altas doses (56 mg de THC em 2 dias) promovem tempo de detecção acima de 25 dias em usuários regulares de *Cannabis* (DRUMMER, 2001). Entretanto, SOUBHIA (1999) verificou que o período de detecção de carboxi-THC na urina pode variar de 33 a 498 horas, sem que haja uma correlação relevante com as seguintes variáveis: frequência de uso, tempo total de utilização e quantidade de cigarros utilizada na última exposição.

A meia-vida do THC é calculada depois do processo de distribuição para os tecidos e representa a fase terminal da curva de eliminação (DRUMMER, 2001). A liberação do THC pelos tecidos ricos em gordura ocorre lentamente e produz um período de eliminação mais longo, que pode variar de 18,7 horas até 4,1 dias. Essa grande variação pode ser devido a diferenças na sensibilidade das técnicas analíticas empregadas e ao tempo transcorrido para a determinação dessas concentrações no sangue (ADAMS & MARTIN, 1996).

A média de depuração plasmática é de cerca de 605-980mL/min. Sugere-se que a proporção da biotransformação do THC seja claramente

dependente do fluxo de sangue para o fígado, e a inibição/ indução enzimática parece ter pequeno efeito na depuração do THC (CHIANG & RAPAKA, 1987).

O perfil plasmático do CBD após administração intravenosa é semelhante ao observado com o THC, assim como sua depuração, sua meia-vida e seu volume de distribuição (CHIANG & RAPAKA, 1987). Assim como o THC, o CBD é extensamente biotransformado, sendo o carboxi-CBD o produto de biotransformação mais abundante no plasma. Entretanto, diferente do THC, o CBD é excretado pelas fezes em maior parte (CHIANG & RAPAKA, 1987).

Semelhante ao THC, os níveis plasmáticos de canabinol (CBN) após administração intravenosa diminuem rapidamente. O CBN é também extensamente biotransformado, sendo o carboxi-CBN seu principal produto de biotransformação. Uma maior porcentagem de CBN absorvido é excretado pelas fezes, e uma menor porção é encontrada na urina (CHIANG & RAPAKA, 1987).

2.5. Toxicodinâmica

O potencial farmacológico dos canabinóides está relacionado com sua afinidade ao sítio de ligação (ADAMS & MARTIN, 1996). O THC, bem como outros canabinóides, é uma molécula altamente lipofílica e acreditou-se por um longo período que os efeitos promovidos por esses compostos eram devido a interações não específicas com lipídios da membrana e pela alteração da sua fluidez (AMERI, 1999).

Especulações sobre a ação celular dos canabinóides foram finalmente resolvidas quando a inibição da adenilato ciclase foi observada após a adição de THC em células neuroblásticas, demonstrando e comprovando a estereoseletividade dos (-)-enantiômeros do THC. Estima-se

que o isômero natural (-)-trans seja de 6 a 100 vezes mais potente que o (+)-trans, dependendo do método de análise (GROTENHERMEN, 2003). A ligação de agonistas radiolábeis em membranas cerebrais de ratos e de humanos, indicaram que a maioria dos efeitos centrais dos canabinóides também são mediados por uma proteína específica localizada na membrana, o receptor canabinóide 1 (CB1) (AMERI, 1999).

O receptor canabinóide foi identificado no cérebro e pertence à família dos receptores conhecidos como receptores acoplados a proteína G (DRUMMER, 2001). Quando ativado, inibe a atividade da adenilato ciclase, que não pode catalisar a conversão de ATP (adenosina trifosfato) para o segundo mensageiro cAMP (adenosina monofosfato cíclico). Este receptor também afeta o movimento de cálcio através dos canais iônicos (ADAMS & MARTIN, 1996; MUSTY, REGGIO & CONSROE, 1995; DRUMMER, 2001). Está localizado em regiões específicas do cérebro que são conhecidas como sítios de ação do THC, que incluem hipocampo e córtex para efeitos cognitivos (memória e aprendizado) e gânglios basais e cerebelo, que controlam equilíbrio e coordenação. São conhecidos como CB1, e difere dos sítios de ligações periféricas conhecidos como CB2, que podem fazer o papel de modulador da resposta imune e da inflamação. A falta de receptores canabinóides na base do cérebro, explica a falta de letalidade exibida pela *Cannabis*, uma vez que essa porção do cérebro regula a respiração e outras funções vitais (AMERI, 1999; DRUMMER, 2001).

A função fisiológica desses receptores é afetada pelo número de modulações do sistema neuronal por outras drogas de abuso: opióides (morfina), GABA (benzodiazepínicos), dopamina, serotonina (anfetamina e cocaína) e receptores colinérgicos (DRUMMER, 2001).

A presença de receptores específicos para o THC aumenta as questões do papel fisiológico desses receptores. Substâncias endógenas têm sido isoladas, parecendo mimetizar a ação do THC e podem ser canabinóides endógenos. Essas substâncias, incluindo a anandamida (aracdomiletanolamida), e 2-aracdonilglicerol são derivados do ácido

aracônico, um precursor essencial para a formação de prostaglandinas e substâncias relacionadas (O'BRIEN, 2001). A administração dessas substâncias em animais de laboratório produz efeitos que são semelhantes àqueles produzidos pelo THC. Contudo, diferenças farmacológicas entre o derivado da planta THC e os canabinóides endógenos podem ser devido a diferenças farmacodinâmicas e farmacocinéticas. Receptores canabinóides e seus ligantes endógenos juntos constituem o "sistema endocanabinoide" (DRUMMER, 2001; GROTENHERMEN, 2003).

2.6. Efeitos tóxicos

O consumo de *Cannabis* produz uma variedade de mudanças fisiológicas e comportamentais. (AMERI, 1999; DRUMMER, 2001; GROTENHERMEN, 2003). Efeitos agudos observados em exposições isoladas incluem um grande número de alterações nas funções cognitivas como prejuízo temporário na memória a curto prazo e os tempos de reação a estímulos e execução de habilidades, diminuição da concentração, da atenção e do reflexo motor, dificuldade de expressão verbal, risos imotivados, aumento da sociabilidade, podendo persistir por dias após o consumo (KALANT, 2004). A correta lembrança de números, cálculos simples e tarefas perceptivas, particularmente aquelas que requerem o sustento da vigilância, são significativamente prejudicadas pela *Cannabis*, mesmo em cigarros de maconha de baixa potência (DRUMMER, 2001).

O uso de álcool e *Cannabis* por motoristas de veículos automotores é uma das mais freqüentes associações observadas em casos forenses (DRUMMER, 2001; KALANT, 2004; RAMAEKERS *et al*, 2004). Falta de atenção é também reconhecida como um sinal de intoxicação por *Cannabis*, levando a falta de percepção no fluxo de trânsito e na mudança das cores de semáforos (ALBERY, 2000). DRUMMER e colaboradores (2003) verificaram a incidência do abuso de drogas relacionadas com acidentes de trânsito

fatais em três estados da Austrália. Num total de 3398 fatalidades envolvendo motoristas de veículos de passeio e motoristas de ônibus, 13,5% dos casos estavam relacionados com o uso de *Cannabis*.

Mudanças psicológicas verificadas com a exposição à fumaça de *Cannabis* incluem um efeito eufórico transitório com alterações emocionais e cognitivas associadas, mas que são usualmente notadas como eufóricas (do inglês – *high*). Esses efeitos são experiências subjetivas que não podem ser quantificadas. Em alguns usuários, particularmente os inexperientes, ocorrem disforia, manifestada geralmente como sentimentos desagradáveis, como ansiedade, paranóia, pânico, podendo também ocorrer despersonalização (KALANT, 2004).

ANDREASSON (1987), em seu estudo realizado na Suíça num período de 15 anos, com cerca de 50 mil jovens, mostrou uma associação temporal entre o uso intenso de *Cannabis* e a manifestação de sintomas esquizofrênicos. A incidência de um estado tóxico psicótico agudo é sabidamente alto (60%) nos usuários de *Cannabis*, particularmente em indivíduos vulneráveis (DRUMMER, 2001; SOARES-WEISER, WEISER & DAVIDSON, 2003).

A partir de 1996, a literatura relata o aparecimento de problemas psiquiátricos relacionados com o uso de *Cannabis*. Reações psicóticas agudas, consistindo de paranóia, ilusão, alucinação, despersonalização, confusão, inquietude e excitação são causadas por uma intoxicação devido a altas doses de consumo da droga. Usuários de *Cannabis* por longo período tendem a tornar-se retirados e indiferentes, com a possibilidade de desenvolverem síndrome amotivacional, com menos propensão de se tornarem violentos (VAN OS *et al*, 2002, KALANT, 2004). O uso freqüente e intenso de ingredientes ativos da *Cannabis* pode aumentar o risco de desencadear sintomas de depressão. Ainda não há modelos animais que suportem esta hipótese, mas ela não pode ser excluída. Usuários de *Cannabis* na adolescência parecem ser mais suscetíveis a esse transtorno psicológico (DEGENHARDT, HALL & LYNSKEY, 2003; KALANT, 2004).

Alterações fisiológicas decorrentes do consumo de *Cannabis*, incluem diminuição da pressão intra-ocular, redução do lacrimejamento, produção de hiperemia das conjuntivas e discreta midríase, causando fotofobia (DRUMMER, 2001; ADAMS & MARTIN, 1996). Em estudos com voluntários usuários de *Cannabis* relatou-se que THC pode produzir taquicardia, hipotensão ortostática e diminuição da agregação plaquetária (ADAMS & MARTIN, 1996; AMERI, 1999).

Tem sido demonstrado claramente que o uso freqüente de *Cannabis* produz alterações inflamatórias crônicas no trato respiratório em uma alta porcentagem dos usuários, manifestado como uma tosse crônica, respiração ruidosa, podendo iniciar doença pulmonar obstrutiva crônica (KALANT, 2004).

O processo de fumar, seja maconha ou tabaco, gera uma grande quantidade de produtos nos pulmões dos indivíduos, muitos dos quais são formados pela pirólise durante o estágio de aquecimento. Um grande número de canabinóides é liberado e, assim como o tabaco, a maconha contém inúmeros agentes carcinógenos: cloreto de vinila, fenóis, aldeídos, nitrosaminas, espécies reativas de oxigênio e uma variedade de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs). Cigarros de maconha contêm cerca de 50% mais PAHs que cigarros de tabaco. (ROTH *et al*, 2001).

Estudos em ratos não encontraram evidências que mostrem potencial carcinogênico para o THC. (CHAN *et al*, 1996). Porém, há evidências mais consistentes para a possibilidade da fumaça da *Cannabis* ser mutagênica, causando câncer em ratos, sugerindo grande probabilidade de usuários crônicos desenvolverem câncer no pulmão, no trato aerodigestivo superior (boca, língua, esôfago) ou na bexiga (HALL & MACPHEE , 1999).

Casos de mutação, inibição de síntese de DNA e RNA, e da resposta imune têm sido encontrados em testes experimentais com extratos de *Cannabis*. Assim, é esperado que a inalação por um longo período de *Cannabis* cause efeitos deletérios similares no pulmão como ocorrido com o

fumo de tabaco. Há uma incidência 10 vezes maior de casos de leucemia em crianças de mulheres que fumaram durante a gravidez, além de casos de anormalidades comportamentais e retardado desenvolvimento nesses recém-nascidos (DRUMMER, 2001).

Outra ação dos canabinóides é o prejuízo no sistema imunológico. Altas doses de THC exercem efeitos de imunossupressão na função linfocitária, incluindo estimulação da proliferação e aumento da produção de interleucina-2 (ADAMS & MARTIN, 1996). Os canabinóides afetam a função e a morfologia dos macrófagos e das células T *helper* de macacos expostos a *Cannabis* por um ano (AMERI, 1999).

A *Cannabis* é freqüentemente usada com outras drogas, como o álcool, causando um efeito aditivo no prejuízo de habilidades cognitivas (AMERI, 1999). Também, o consumo concomitante de *Cannabis* com outros depressores do SNC pode levar a um aumento da resposta tóxica (DRUMMER, 2001).

O uso de *Cannabis* mostrou pouca relação com o uso de cocaína ou de heroína, por não haver relação linear entre dose-resposta do uso de *Cannabis* (intenso, moderado, ou inexistente) e do uso de outras drogas (EPSTEIN & PRESTON, 2003). Solinas *et al* (2004) verificaram que a auto-administração de heroína foi alterada em ratos expostos concomitantemente a *Cannabis*, mas seus achados não suportam a teoria que a exposição a *Cannabis* tornaria pessoas mais vulneráveis aos efeitos de reforço direto da heroína.

A dose letal média (DL50) de THC pela via oral em ratos é de 800-1900 mg/kg dependendo do sexo e da linhagem. Casos fatais em humanos não foram relatados (GROTENHERMEN, 2003). É provável que se uma formulação pura de THC for ingerida em doses muito altas, a morte possa ocorrer. A disponibilidade de cápsulas de THC e variações sintéticas do THC podem permitir que isso aconteça. Depressão respiratória, um efeito comum de muitas outras drogas depressoras do SNC, não é observada com o uso da *Cannabis* (DRUMMER, 2001).

O desenvolvimento da tolerância aos canabinóides segue diferentes cursos e extensões. O exato mecanismo é ainda desconhecido (ADAMS & MARTIN, 1996; AMERI, 1999; DRUMMER, 2001; GROTENHERMEN, 2003). Usuários regulares de *Cannabis* sentem menos efeitos de disforia e náusea e menor alteração de humor; esses efeitos declinam em intensidade com o uso repetido. Porém, a tolerância não desenvolve efeitos depressivos no SNC para o mesmo nível de algumas mudanças cardiovasculares (JONES, BENOWITZ & HERNING, 1981; DRUMMER, 2001). Têm-se observado a ocorrência de efeitos antinociceptivos, anticonvulsivantes, de catalepsia, depressão da atividade psicomotora e hipotensão em administrações repetidas de *Cannabis* (AMERI, 1999; DRUMMER, 2001).

A tolerância pelo uso de canabinóides parece se desenvolver sem mudanças farmacocinéticas, ou com alterações mínimas. Há uma forte evidência que alterações nos receptores canabinóides, associada com mudanças na expressão da proteína G, sejam as principais causas da produção de tolerância (AMERI, 1999). Os eventos farmacodinâmicos, como o prejuízo da regulação, mudança conformacional do receptor, ou sua internalização, são conseqüências bem conhecidas e provavelmente relacionadas com o desenvolvimento de tolerância (ADAMS & MARTIN, 1996; AMERI, 1999). Muitos grupos têm demonstrado uma *downregulation* nos receptores canabinóides em animais canabinóides-tolerantes (OVIEDO, GLAM & HERKENHAM, 1993; RODRÍGUEZ DE FONSECA *et al.*, 1994).

O uso recreativo da grande maioria das drogas de abuso pode produzir dependência. Uma característica comum da retirada de drogas de abuso é um negativo estado afetivo, que é caracterizado por disforia e ansiedade (AMERI, 1999).

“A característica essencial da dependência de substância é a presença de um agrupamento de sintomas cognitivos, comportamentais e fisiológicos indicando que o indivíduo continua utilizando uma substância, apesar de problemas significativos relacionados a ela. Existe um padrão de auto-administração repetida que geralmente resulta em tolerância,

abstinência e comportamento compulsivo de consumo da droga". (A Associação Americana de Psiquiatria, através da quarta edição do *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* - DSM-IV – AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 1994)

De acordo com o DSM-IV, os critérios para verificação da dependência de uma substância são analisados por um padrão mal-adaptativo do seu uso, levando ao prejuízo ou sofrimento clinicamente significativo, manifestado por três (ou mais) dos seguintes critérios, ocorrendo a qualquer momento num período de 12 meses:

(1) tolerância, definida por qualquer um dos seguintes aspectos:

(a) uma necessidade de quantidades progressivamente maiores da substância para adquirir a intoxicação ou efeito desejado,

(b) acentuada redução do efeito com o uso continuado da mesma quantidade de substância.

(2) abstinência, manifestada por qualquer dos seguintes aspectos:

(a) síndrome de abstinência característica para a substância,

(b) a mesma substância (ou uma substância estreitamente relacionada) é consumida para aliviar ou evitar sintomas de abstinência.

(3) a substância é freqüentemente consumida em maiores quantidades ou por um período mais longo do que o pretendido.

(4) existe um desejo persistente ou esforços mal-sucedidos no sentido de reduzir ou controlar o uso da substância.

(5) muito tempo é gasto em atividades necessárias para a obtenção da substância na utilização da substância ou na recuperação de seus efeitos.

(6) importantes atividades sociais, ocupacionais ou recreativas são abandonadas ou reduzidas em virtude do uso da substância.

(7) o uso da substância continua, apesar da consciência de ter um problema físico ou psicológico persistente ou recorrente que tende a ser causado ou exacerbado pela substância.

Embora não seja especificamente relacionada como um critério, a "fissura" (um forte impulso subjetivo para usar a substância) tende a ser experimentada pela maioria dos indivíduos com dependência a uma

substância (se não por todas) (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 1994).

Foi verificado que *Cannabis* pode causar dependência em usuários, principalmente quando esta droga apresenta elevados teores de THC (ADAMS & MARTIN, 1996; DRUMMER, 2001; MC RAE, 2003; KALANT, 2004). A mudança do estilo de vida causada pela compulsão ao uso da droga e o desejo de continuar os efeitos psicotrópicos, são provavelmente os fatores mais negativos causados pela administração de todas as drogas que causam dependência (DRUMMER, 2001). Com o estabelecimento destes critérios para diagnóstico da dependência, houve um progresso no envolvimento e na compreensão dos sintomas observados (KALANT, 2004).

A síndrome de abstinência tem sido observada em animais e em humanos que administram altas doses de THC, descritas como piloereção, anorexia, perda de apetite, ansiedade, irritabilidade, sonolência, sudorese, tremores, fotofobia, dor estomacal, dentre outros sintomas somáticos que são similares aos sintomas de abstinência associados com alguns tranqüilizantes. O fumo de 2 a 4 cigarros diários de THC por 10 dias pode levar o indivíduo a produzir síndrome de abstinência (WIESBECK *et al*, 1996; DRUMMER, 2001; MC RAE, 2003). Entretanto, SMITH (2002), em seu trabalho de revisão, propõe que devido à falta de gravidade nos sintomas e da possibilidade de explicações alternativas, não há resultados consistentes que suportem a existência de síndrome de abstinência em usuários de *Cannabis*.

2.7. Uso terapêutico

Os chineses utilizavam a *Cannabis* para o tratamento de constipação, malária, dores reumáticas e doenças femininas desde 2737 a.C. Na medicina ocidental, foi introduzida em 1939, após a publicação do tratado do

médico irlandês de W. B. O'Shaughnessy, que cuidadosamente revisou cerca de 900 anos de literatura médica indiana, onde encontrou relatos sobre seu uso terapêutico. Seus estudos divulgaram o uso da *Cannabis* na Inglaterra e outros países da Europa. Posteriormente, foi utilizada nos Estados Unidos, que desenvolveram a droga sintética (ADAMS & MARTIN, 1996).

Atualmente, preparações de *Cannabis* são empregadas para inúmeras doenças, devendo-se deter atenção às indicações de uso, aos efeitos comprovados e estabelecidos (GROTENHERMEN, 2003). Há indicações relativamente bem confirmadas em casos de esclerose múltipla, asma e distonia (VOTH & SCHWARTZ, 1997, WILLIAMSON & EVANS, 2000; GROTENHERMEN, 2003). É também bastante conhecido o uso da *Cannabis* para reduzir a pressão intra-ocular, no tratamento do glaucoma. Porém, essa indicação terapêutica não tem sido sustentada devido aos efeitos não desejados e ao tempo prolongado do tratamento (SOUBHIA, 1999).

As aplicações mais importantes para os canabinóides são indicadas para doenças onde não há outro tratamento totalmente satisfatório (WILLIAMSON & EVANS, 2000). O uso da *Cannabis* e principalmente das drogas sintéticas dronabinol (*Marinol®*, THC formulado) e nabilona (*Cesamet®*, um canabinóide sintético, análogo do THC), estão bem estabelecidos para casos de náusea e vômitos provocados pela quimioterapia em pacientes com câncer, para estimular o apetite em pacientes com AIDS/HIV e em casos de anorexia progressiva relacionada ao câncer (CHIANG & RAPAKA, 1987; VOTH & SCHWARTZ, 1997, GROTENHERMEN, 2003).

Evidências farmacológicas em modelos animais e um estudo com usuários regulares mostraram diferentes efeitos ao comparar a administração do THC isolado com a do extrato de *Cannabis* ou mesmo da própria erva. Verificou-se que estados de euforia são geralmente maiores nos grupos relativos ao THC isolado e a sedação é mais marcadamente

observada nos grupos em que se administrou a erva (WILLIAMSON & EVANS, 2000).

Como mostrado no item 2.2, os canabinóides são os principais constituintes da *Cannabis*, sendo o THC seu principal fármaco ativo. Outros canabinóides possuem pouca ou nenhuma psicoatividade e diferentes ações farmacológicas, podendo modular a atuação do THC, ativando-o ou inibindo-o. O CBD, por exemplo, não é psicoativo, mas tem demonstrado ser ansiolítico em animais e em humanos, reduzindo a ansiedade induzida pelo THC (WILLIAMSON & EVANS, 2000).

Estudos complementares e uma padronização do conteúdo de canabinóides nos extratos de THC deve ser futuramente realizada para uma melhor elucidação desses efeitos (WILLIAMSON & EVANS, 2000).

2.8. Matrizes não convencionais para análises toxicológicas de canabinóides

Análises toxicológicas em sangue e urina (matrizes convencionais) são comumente empregadas em muitos países com diferentes finalidades, como investigações forenses, controle da dopagem, controle terapêutico, diagnóstico de intoxicações agudas, avaliação de tratamento da farmacodependência, entre outros (KIDWELL, BLANCO & SMITH, 1997; CONE, 2001; CAMPOS, YONAMINE & MOREAU, 2003). Matrizes alternativas, não convencionais atualmente empregadas são: saliva, suor, meconio, unhas e cabelo.

A saliva é um fluido incolor excretado diariamente na cavidade oral, entre 500 e 1500mL, que contém cerca de 99% de água. A transferência dos fármacos do sangue para a saliva ocorre por difusão passiva, ultrafiltração e transporte ativo (KIDWELL, HOLLAND & ATHNASELIS, 1998; YONAMINE *et al*, 2003). Em muitos casos a presença de fármacos na saliva pode fornecer a mesma informação que a urina ou o sangue, com a vantagem de ser uma matriz mais fácil de ser coletada em campo (KIDWELL, HOLLAND & ATHNASELIS, 1998). Limitadas quantidades de saliva podem ser coletadas por expectoração, grandes quantidades por meio da estimulação da mastigação de borrachas, ceras, fitas de *teflon* ou gomas, rolos de algodão com ácido cítrico ou administração de pilocarpina (KIDWELL, HOLLAND & ATHNASELIS, 1998).

Há muita controvérsia na literatura relativa a presença de canabinóides na saliva (STUAB, 1999; KINTZ & SAMYN, 2002). Embora haja pouco transporte de THC do sangue para a saliva este é detectável por muitas horas após administração via pulmonar e oral. Provavelmente, a maior concentração de THC parece ser atribuída à contaminação da cavidade bucal durante o ato de fumar. O cálculo da relação saliva/plasma nessas circunstâncias é de pouco valor. (KINTZ & SAMYN, 2002). YONAMINE e colaboradores (2003) analisaram THC na saliva por GC/MS e obtiveram um limite de detecção 5ng/mL.

Em relação ao suor, cerca de 300 a 700mL são produzidos diariamente por todo o corpo. Ao lado da secreção aquosa, a pele é banhada também por secreções sebáceas que podem transportar e absorver muitos fármacos, estando em maiores quantidades na testa e no couro cabeludo que em outras áreas do corpo (KIDWELL, HOLLAND & ATHNASELIS, 1998).

Trabalhos na literatura verificaram que análises no suor aumentaram em uma semana a janela de detecção de fármacos em relação à urina. (KINTZ, 1996). Para a coleta desta amostra, a sudorese pode ser induzida por exercícios e muitos mililitros de suor podem ser coletados em

envoltórios; pequenas quantidades podem ser produzidas por difusão pilocarpina ou através de aquecimento. Adesivos (*patches*) têm sido desenvolvidos para serem usados num grande período de tempo.

A quantificação de drogas no suor é difícil, pois a quantidade coletada é desconhecida. É feita uma estimativa baseada na concentração de sódio e lactato, pois essas substâncias são constantemente secretadas no suor. Somente baixas concentrações de THC podem ser identificadas e o carboxi-THC nunca foi detectado (KIDWELL, HOLLAND & ATHNASELIS, 1998; STUAB, 1999).

As primeiras fezes do recém nascido são chamadas de mecônio. É formado por resíduos das secreções do tubo digestivo fetal, do líquido amniótico e por células (normalmente epiteliais), tendo coloração esverdeada escura e aspecto pegajoso. O THC está ausente no mecônio e seus produtos de biotransformação, hidrox-THC e carboxi-THC, são encontrados em pequenas quantidades. MOORE e colaboradores (1996) determinaram carboxi-THC no mecônio por GC/MS e obtiveram um limite de detecção 2ng/g. Portanto, as principais desvantagens da utilização do mecônio são: o difícil processamento da matriz, a amostra não ser homogênea e a pequena quantidade de canabinóides presentes. No entanto pode ser considerada uma matriz apropriada e viável para determinação de drogas de abuso na gravidez, pois fornece uma maior história da exposição da droga que a urina. Um diagnóstico correto e precoce de exposição da droga é a melhor maneira para o recém-nascido receber um tratamento adequado (STUAB, 1999).

Unhas são duras camadas que recobrem a superfície dos dedos das mãos, crescem em média 3 a 5 mm/ mês, e dos pés, crescem em média 1,1mm/ mês. Verifica-se, assim, uma grande diferença dos níveis de fármacos entre essas duas regiões (LEMOS *et al*, 1999).

A principal vantagem da análise de unhas está na sua habilidade de detectar drogas num período de meses a anos, além de serem mais facilmente coletadas do que sangue ou urina. A quantidade de amostra

necessária para detectar a exposição de drogas pela unha é muito pequena – 2,5 a 25 mg, são coletadas por procedimentos não invasivos e facilmente estocadas. O alto custo para análise em rotina, o trabalhoso processamento da amostra, a existência de poucos trabalhos desenvolvidos e a falta valores de referência estabelecidos são suas principais desvantagens (LEMOS *et al*, 1999).

2.9. Cabelo como matriz não convencional na verificação da exposição a drogas de abuso

Quando a análise de urina foi inicialmente implementada para a verificação da exposição à drogas de abuso, acreditava-se que o cabelo não seria uma amostra factível de ser utilizada na prática, devido à quantidade de fármaco incorporado ser muito menor que na urina, o que limitaria sua detecção. No entanto, com o significativo e rápido progresso tecnológico, pelo uso do espectrômetro de massa para confirmação das análises, pôde-se pensar no emprego do cabelo como amostra biológica viável (DU PONT & BAUMGARTENER, 1995).

A análise da urina fornece um curto prazo de informação do uso da droga por um indivíduo, ao passo que histórias a longo prazo são acessíveis pela análise de cabelo, levando em consideração seu comprimento. Essa ampla janela de detecção é uma das suas vantagens mais relevantes da utilização do cabelo como amostra biológica na detecção de substâncias. Assim, sempre que possível, a análise de cabelo e urina devem ser exames complementares para verificação do uso de drogas (BARRERA & STRANO-ROSSI, 1995; DU PONT & BAUMGARTENER, 1995; MIECZKOWSKI, 1996; MOELLER, 1996; JURADO *et al*, 1997; McBAY, 1999; NAKAHARA, 1999a; STAUB, 1999; MIDIO, DE MORAES MOREAU & SILVA, 2001; KINTZ & SAMYN, 2002; THORSPECKEN, SKOPP & PÖTSCH, 2004).

Atualmente, o cabelo é reconhecido como o terceiro principal espécime biológico para análises de drogas, ao lado da urina e do sangue (NAKAHARA, 1999a). A coleta de amostras de cabelo é um processo simples, não invasivo, sendo difícil sua adulteração. Sempre que necessário, é possível se coletar outra amostra, que exibirá as mesmas características da previamente coletada, fato impossível de ocorrer com amostras de sangue ou urina (KINTZ & SAMYN, 2002). Não é preciso condições especiais de transporte e armazenamento, pois as amostras de cabelo são estáveis por um longo período de tempo (KINTZ, 1996). Além disso, um grande número de estudos de drogas de abuso baseados na análise de cabelo humano são descritos, devido à sensibilidade e especificidade de determinação (DU PONT & BAUMGARTENER, 1995; NAKAHARA, 1999a; UHL, 1997).

SACHS (1997) descreveu que, em 1958, Hope empregou pela primeira vez o cabelo humano para detectar a presença de arsênico, proveniente de um corpo exumado há 11 anos. Durante a década de 60, o cabelo foi amplamente utilizado como espécime biológico para avaliar a exposição a metais pesados como chumbo e mercúrio, além do arsênico.

Nos últimos 30 anos o cabelo tem sido usado para documentar a exposição de drogas de abuso em várias situações: áreas forense, ocupacional e clínica (DEVEAUX *et al* , 2000; DU PONT & BAUMGARTENER, 1995; KINTZ, 1996; MIECZKOWSKI, 1996; MOELLER, 1996). É constatado um grande potencial para aplicação do cabelo nas análises de controle da dopagem, porém ainda não foi aprovado pelo Comitê Olímpico Internacional (COI) (KINTZ, 1996; MIDIO, DE MORAES MOREAU & SILVA, 2001; AQUINO NETO, 2002).

A análise de cabelo é uma poderosa ferramenta analítica, para detecção e controle das drogas de abuso, pois os fármacos são incorporados durante a formação da fibra capilar e permanecem estáveis na matriz queratinosa (DU PONT & BAUMGARTENER, 1995; KINTZ, 1996; MOELLER, 1996; DEVEAUX *et al* , 2000). Uma exata interpretação dos

resultados analíticos tem se mostrado difícil, pois muitas questões a respeito da incorporação da droga no cabelo ainda não foram respondidas, principalmente no que diz respeito aos canabinóides (THORSPECKEN, SKOPP & PÖTSCH, 2004).

Vários estudos têm sido desenvolvidos, para verificar o uso de drogas, tais como morfina, heroína, cocaína, crack, barbitúricos, anfetaminas, entre outras que podem ser identificadas no cabelo, meses ou anos após o uso (MAGURA, 1992; MOELLER, 1996). O cabelo pode, seguindo orientação da raiz à sua extensão, ser seqüencialmente seccionado, e cada secção analisada individualmente resultando num perfil tempo/exposição (MIECZKOWSKI, 1996). Em alguns casos pode-se obter uma estimativa em relação ao uso intenso, moderado ou ocasional de determinadas substâncias (DU PONT & BAUMGARTENER, 1995).

Desde 1996, quando ocorreu o primeiro encontro da *Society of Hair Testing* discute-se os aspectos legais da análise de cabelo, os critérios para se obter resultados positivos e a relação entre a dose administrada e a concentração do fármaco no cabelo (SOCIETY OF HAIR TESTING, 1997). Foi considerado adequado que a coleta de amostras de cabelo seja feita por um profissional treinado, em quantidade suficiente para permitir a análise ou repetição da análise por outro laboratório para confirmação do resultado. O material de referência deve ser produzido por amostras de cabelo coletadas de usuários da droga.

Toxicologistas são freqüentemente questionados quanto ao tempo que um fármaco e seus produtos de biotransformação podem ser detectados após sua administração. A questão mais significativa é saber se uma administração única de uma droga pode ser detectada no cabelo e seu intervalo de tempo. Essa é uma questão difícil de ser respondida, pois o tempo de detecção de uma substância depende de diversos fatores, e poucos estudos foram feitos sobre este assunto. Além disso, é difícil conseguir a aprovação pela ética deste tipo de estudo, pois se permitiria a administração de drogas ilícitas a voluntários saudáveis. Em consequência

disso, em muitos estudos, a administração das doses são relativamente baixas, comparadas com as doses reais utilizadas pelos próprios usuários (VERSTRAETE, 2004).

O tempo de detecção de um fármaco depende principalmente da dose, da sensibilidade do método empregado e também do preparo, da via de administração, do tempo de uso (crônico ou agudo). De acordo com esse contexto será escolhida uma matriz para análise do princípio ativo ou de seu produto de biotransformação. Vários aspectos devem ser ressaltados como: pka da substância, quantidade da substância na matriz, variação interindividual do metabolismo, limite de detecção da técnica. Em geral, o tempo de detecção é mais prolongado no cabelo, tanto em relação com o período de incorporação quanto ao seu comprimento; seguido pela urina, suor, saliva e sangue (VERSTRAETE, 2004).

A TABELA 1 compara as amostras de cabelo e urina em relação a vários aspectos. Esses critérios são importantes ao se selecionar uma matriz biológica para se pesquisar uma determinada substância. Deve-se levar em conta que no cabelo, o tempo de detecção depende do comprimento capilar (VERSTRAETE, 2004).

	Urina	Cabelo
Janela de detecção	1-7 dias	Meses ou anos*
Reprodutibilidade da amostra	Não comparável	Comparável
Potencial Invasivo	Moderado a alto	Baixo
Estocagem	Requer refrigeração	Temperatura ambiente
Manipulação	Amostra encarada como contaminada (Alto risco)	Baixo risco

TABELA 1 – Principais comparações entre amostras de cabelo e urina. (adaptada de MIECZKOWISKI, 1996). * período dependente do comprimento do cabelo

2.10. Mecanismo de incorporação de fármacos no cabelo

Embora o cabelo pareça ser uma estrutura primitiva, é na verdade uma complexa estrutura que faz parte do corpo humano e sua biologia ainda não está totalmente esclarecida em muitos aspectos (NAKAHARA, 1999a). O cabelo contém proteínas, melanina e lipídios. Por ser um tecido vivo, fármacos podem ser incorporados durante o crescimento capilar juntamente com outros nutrientes (CONE, 1996; NAKAHARA, 1999b).

O folículo piloso possui uma interação entre a epiderme e a derme; a camada da epiderme invagina-se para o interior e forma o bulbo do pêlo. A base do bulbo é formada por células alargadas, queratinizadas e cimentadas umas às outras, conhecida como córtex (HARKEY, 1993; WILKINSON & MOORE, 1990). Nas células corticais encontram-se grânulos de melanina (um polímero polianiônico), responsáveis pela cor dos pêlos, olhos e pele, conforme a quantidade, distribuição e tipo de melanina (HARKEY, 1993). É chamada de eumelanina, quando fornece coloração preta ou marrom e de feomelanina, quando fornece cor vermelha aos cabelos (ROLLINS *et al*, 2003). A melanina, principalmente a eumelanina, desempenha um importante papel como um composto auxiliar na incorporação de fármacos (NAKAHARA, 1999b).

Quase todos os folículos pilosos apresentam atividade cíclica, que consiste de três fases. A fase anágena, com duração de 4 a 6 anos, na qual o pêlo se forma, alternando com um período de repouso chamado de fase telógena, com duração de 4 a 6 meses e a fase catágena correspondendo a um período de transição entre as fases anágenas e telógenas, com duração de poucas semanas, em que o bastão do pêlo recentemente formado se desloca até a superfície da pele (HARKEY, 1993; WILKINSON & MOORE, 1990; WENNIG, 2000).

O cabelo cresce em média 1 cm/mês, podendo variar de 0,2 a 1,12 mm/ dia (0,6 – 3,36 cm/ mês). É melhor coletado na região distal da cabeça, chamada vértice posterior. Essa região é freqüentemente selecionada por ter um alto percentual de folículos na fase anágena (aproximadamente 85%), com menor variabilidade de crescimento e de influências relacionadas à idade e ao sexo. (HARKEY, 1993; KINTZ & MANGIN, 1995; MOELLER, 1996; NAKAHARA, 1999a STAUB, 1999). Atenção deve também ser dada à diferença de concentração verificada em diferentes regiões do corpo, bem como a razão tempo e acúmulo dos fármacos. OFFIDANI, STRANO-ROSSI & CHIAROTTI (1993) mostraram em seu estudo que há diferença na concentração de morfina, cocaína e benzodiazepínicos quando se analisa pêlos na região da cabeça, na região axilar e na região pubiana de um mesmo indivíduo, onde a mais alta concentração é encontrada nos pêlos pubianos, mas ainda assim sugere-se que o pêlo da cabeça (cabelo) seja a melhor região de amostra para análises toxicológicas por ter um crescimento maior e mais homogêneo.

O preciso mecanismo envolvido na incorporação de substâncias no cabelo ou os fatores que influenciam na incorporação não foram ainda completamente elucidados. O mecanismo geralmente proposto para incorporação de fármacos no cabelo, baseia-se na difusão passiva das substâncias presentes no sangue para as células na base do folículo capilar durante o processo de queratogênese, permanecendo na estável estrutura do fio de cabelo, que é rodeada por uma densa rede de capilares sangüíneos. A Figura 4 mostra um diagrama do simples modelo proposto. (HERDERSON, 1993; MOELLER, 1996; STAUB, 1999).

Figura 4 – Diagrama do modelo de difusão passiva para incorporação de fármacos no cabelo, mostrando transferência de fármacos do sangue para o crescimento das células do cabelo no bulbo (adaptada de HERDERSON, 1993).

Discute-se a existência de outros mecanismos ou vias como por exemplo, a utilização de um modelo multi-compartimental de incorporação dos fármacos e seus produtos de biotransformação. A via endógena de incorporação pode ocorrer durante a formação dos fios presentes, por difusão passiva, decorrente do consumo intencional e após sua formação, pelas glândulas apócrinas e sebáceas. Após os cabelos emergirem da superfície da pele, pode ocorrer a transferência de moléculas para o cabelo queratinizado, pela perspiração (suor, gordura, excreção transdérmica via extrato córneo) e pela deposição da contaminação externa (poluição, tratamentos capilares, formulações farmacêuticas), representando a via exógena (ver Figura 5) (CONE, 1996; HERDERSON, 1993; PÖTSCH, SKOPP & MOELLER, 1997).

Figura 5 – Diagrama de modelo multi-compartimental para incorporação de fármacos, mostrando transferência de drogas durante as três fases do crescimento capilar e por múltiplas fontes (Adaptada de HERDERSON, 1993)

O conceito bioquímico para incorporação endógena de fármacos durante a formação da fibra do cabelo é baseado nos princípios biológicos de transporte através das membranas celulares, afetado pelo fluxo sanguíneo, ligação da substância às proteínas plasmáticas, lipofilicidade, basicidade, tamanho e geometria da molécula, gradiente de pH e de concentração, nos princípios de biotransformação e na afinidade do composto à melanina (CONE, 1996; PÖTSCH, SKOPP & MOELLER, 1997; MOELLER, 1996; NAKAHARA, 1999b, STAUB, 1999).

Compostos mais hidrofílicos como o caso dos produtos de biotransformação, são relativamente pouco incorporados quando comparados com compostos lipofílicos (CONE, 1996; PÖTSCH, SKOPP & MOELLER, 1997; NAKAHARA, 1999b).

Substâncias de caráter neutro ou ácido são encontradas nos cabelos em baixas concentrações, pois sugere-se que o fluxo de solutos em

biomembranas depende de sua lipofilicidade e seu gradiente de concentração entre o sangue (pH 7,4) e a raiz do cabelo (pH 3,67) (NAKAHARA, 1999b).

A forma, a cor, a textura, o diâmetro do cabelo e o índice de crescimento capilar variam consideravelmente entre gêneros e entre raças (NAKAHARA, 1999a). GYGI *et al* (1996) e SLAWSON *et al* (1996) verificaram que cabelos pigmentados possuem maior capacidade de ligar e incorporar diversas substâncias que cabelos não pigmentados.

Tratamentos cosméticos envolvendo processos químicos, tais como descoloração, permanentes, relaxamentos e tingimentos modificam a aparência dos cabelos, alterando ou até mesmo destruindo estruturas que constituem o fio de cabelo (melanina, proteínas, lipídeos), causando alterações nos locais onde provavelmente ocorre deposição do fármaco (TOLEDO, 1999). O cabelo é diariamente submetido à influência de fatores naturais tais como: exposição ao sol, vento, água, poluição, que afetam e danificam a cutícula, mas tratamentos cosméticos aumentam esse dano (KINTZ, 2004).

Muitas questões relacionadas à análise para identificação de substâncias no cabelo ainda não estão totalmente elucidadas. Uma grande preocupação para os toxicologistas é o tempo de incorporação das substâncias no cabelo após administração, e o período em que nele permanecem (TOLEDO, 1999).

2.11. Aspectos analíticos da detecção de canabinóides em cabelo

É reconhecida a dificuldade e a incerteza na interpretação desta ferramenta analítica diagnóstica em relação à dose, frequência, e tempo de

consumo da droga (PÖTSCH, SKOPP & MOELLER, 1997; KINTZ, 2004). Há algumas controvérsias relacionadas à interpretação das análises de cabelo, quanto à efetividade das técnicas de descontaminação, existência de contaminação externa, efeitos da variação da textura e tipo de cabelo, estabelecimento de padrões e valores de referência, os mecanismos de incorporação dos fármacos, a relação dose administrada/analizada (MIECZKOWSKI, 1996; WENNIG, 2000).

KELLY *et al* (2000) examinaram cerca de 2.000 amostras randomizadas (sendo 500 amostras negativas, 500 positivas para cada uma das três drogas: *Cannabis*, cocaína e anfetamina) e verificaram que há diferenças entre os diversos tipos de cabelo e etnias, mas essas diferenças não respondem da mesma forma para todas as drogas.

MIECZKOWSKI (2003) quantificou a presença de carboxi-THC em aproximadamente 4.000 amostras de cabelo de diferentes colorações: preto, marrom, louro natural, louro tingido, grisalho e vermelho; concluindo não haver significância estatística na concentração de carboxi-THC e a cor de cabelo.

Os pré-requisitos para o estudo da relação entre a dose do fármaco e sua concentração no cabelo são a manutenção da cadeia de custódia, a consideração da contaminação externa, definições apropriadas de resultados positivos e metodologias analíticas aceitáveis com controle de qualidade interno e externo ao laboratório (NAKAHARA, 1999a; WENNIG, 2000).

Em 1993 OFFIDANI *et al* analisaram a concentração de cocaína em diferentes regiões de pêlo do corpo e verificaram que a região pubiana obteve maiores concentrações que as regiões axilares e da cabeça. Uma das justificativas seria que a taxa de crescimento em relação a um mesmo período seria diferente em diferentes regiões. Outra hipótese seria a possível contaminação dos pêlos púbicos com a urina e dos pêlos axilares com o suor. Assim, concluiu-se que a região da cabeça continua sendo o local de escolha para coleta.

Muitas investigações mostraram que o cabelo embebido em soluções de drogas ou exposição a vapores não são completamente descontaminados por procedimentos usuais de descontaminação. Fármacos podem ser absorvidos não-intencionalmente pela respiração ou pela via transdérmica e incorporados durante a formação da haste do cabelo (PÖTSCH, SKOPP & MOELLER, 1997; KINTZ, 2004).

Uma importante etapa para análise de substâncias no cabelo é sua descontaminação, no sentido de promover a eliminação dos contaminantes externos e interferentes depositados, como no caso de tratamentos cosméticos (TOLEDO, 1999). A maioria dos laboratórios utiliza uma etapa de lavagem, mas ainda não há um consenso ou uniformidade para este procedimento. Esta etapa deve ser feita de tal forma que haja efetiva remoção dos contaminantes externos sem remoção dos componentes existentes no interior dos cabelos (KINTZ & MANGIN, 1995; KINTZ, 2004).

A *Society of Hair Testing* sugere que sejam realizados ensaios para verificar a presença da substância nos resíduos de lavagem, para se avaliar a possibilidade de uma contaminação externa, assim como estabelecer valores limites, identificar os produtos de biotransformação das substâncias e obter uma relação entre os produtos de biotransformação e a droga de origem.

Após exposição passiva e não intencional da fumaça da *Cannabis*, canabinóides podem ser identificados nas amostras de urina e também de cabelo, com a possibilidade de um falso-positivo. Para urina, este problema foi resolvido pelo estabelecimento e uso apropriado de valores de referência. No caso do cabelo, além da descontaminação das possíveis substâncias aderidas superficialmente, a determinação de valores de referência ainda não está estabelecida, mas permitirá uma interpretação mais padronizada das análises (KINTZ & MANGIN, 1995).

Segundo NAKAHARA (1999a), os procedimentos de extração de fármacos do cabelo podem ser principalmente divididos em três tipos:

- digestão alcalina: método que envolve incubação com solução de hidróxido de sódio ou de potássio, sendo aplicáveis para compostos estáveis em meio alcalino como a morfina, as anfetaminas e os canabinóides, mas não são aconselháveis para heroína e cocaína.
- digestão ácida: onde o cabelo é incubado com solução de ácido clorídrico ou sulfúrico, sendo amplamente utilizado na extração de heroína.
- tratamento enzimático: através de enzimas como a β -glucuronidase, a proteinase K, protease K e VIII, nas quais degradam e destroem a estrutura do cabelo. Sua principal desvantagem é o alto custo.

Várias técnicas têm sido descritas para a determinação de canabinóides em amostras de cabelo, sendo a cromatografia em fase gasosa associada à espectrometria de massa (GC/MS) a de escolha para essas análises. A maior sensibilidade é encontrada pela cromatografia em fase gasosa associada à dupla espectrometria de massa (GC/MS/MS) (MUSSHOFF *et al*, 2002).

A preparação da amostra pode ser feita através da extração com metanol (KAUERT & ROHRICH, 1996) ou preferencialmente por hidrólise alcalina, com subsequente extração em fase sólida ou extração líquido-líquido.

O primeiro trabalho na literatura sobre análise de canabinóides no cabelo foi descrito por KINTZ *et al* (1992), no qual utilizaram hidrólise alcalina com extração em fase sólida e derivação para determinação de carboxi-THC.

Trabalhos semelhantes foram posteriormente descritos, substituindo-se a extração em fase sólida pela extração líquido-líquido. A TABELA 2 mostra os principais trabalhos em que se utilizou o cabelo como matriz biológica. Entre os mais recentes, verifica-se um trabalho utilizando a microextração em fase sólida (SPME) e dois trabalhos utilizando a microextração em fase sólida por *headspace* (HS-SPME).

STRANO-ROSSI & CHIARROTTI (1999) foram os primeiros a utilizar a SPME para identificação de canabinóides (THC, CBD e CBN) no cabelo. As amostras de cabelo são descontaminadas, hidrolisadas com NaOH, neutralizadas com HCl, adicionadas de tampão fosfato e submetidas por imersão direta à SPME. Então o extraído da SPME foi analisado por GC/MS.

Posteriormente, SPORKET e PRAGST (2000) em seu trabalho utilizaram amostras de cabelo descontaminadas e hidrolisadas com NaOH, neutralizadas com ácido ortofosfórico, adicionadas de sulfato de sódio e submetidas a extração por HS-SPME e análise por GC/MS

Seguindo MUSSHOF *et al* (2002) desenvolveram um método totalmente automatizado, onde as amostras são descontaminadas, hidrolisadas com NaOH e acrescentadas de carbonato de sódio para aumentar o efeito de *salting out*, seguindo por HS-SPME a 100°C por 25 minutos e posterior derivação por 8 minutos e análise por GC/MS.

Este método de SPME demonstra ser o método mais rápido para detecção de canabinóides no cabelo . (THC, CBN e CBD) em comparação com as extrações líquido-líquido e as extrações em fase sólida observadas na literatura (STRANO-ROSSI & CHIAROTTI, 1999).

A análise de canabinóides no cabelo é uma das análises mais difíceis devido a problemas de detecção e interpretação, pois a taxa de incorporação no cabelo é baixa e o constante problema da contaminação externa (NAKAHARA, 1999a).

Referência	Composto Analisado	Descontaminação	Hidrólise	Extração	Derivação	Tipo de Detecção
KINTZ et al, 1992	carboxi-THC	Etanol	1 M NaOH	SPE	TFA	GC-MS
MOLLER, 1992	carboxi-THC	Diclorometano	2 M NaOH	SPE	PFPA / PFPOH	GC-MS
CIRIMELE et al, 1995	THC carboxi-THC	Cloreto de metileno	1 M NaOH	LLE	-----	GC-MS
JURADO et al, 1995	THC carboxi-THC	Diclorometano	11,8 M KOH	LLE	HFBA/ HFPOH	GC-MS
KINTZ et al, 1995	carboxi-THC	Cloreto de metileno	1 M NaOH	LLE	PFPA / PFPOH	GC-MS
WILKINS et al, 1995	THC carboxi-THC	Cloreto de metileno	1 M NaOH	LLE	TFAA + MeOH-BF	GC-MS
MIECZKOWSKI, 1995	carboxi-THC	Diclorometano	1 M NaOH	LLE	HFBA/ HFIP	GC-MS-MS
CIRIMELE et al, 1996	THC CBN/CBD	Cloreto de metileno	MeOH	LLE	PAA	GC-MS

KAUERT & ROHRICH, 1996	THC CBN / CBD	Diclorometano	1 M NaOH	LLE	PAA	GC-MS
UHL, 1997	carboxi-THC	n- hexano/ acetona	1 M KOH	SPE	PFPA/ HFPOH	GC-MS-MS
STRANO-ROSSI & CHIAROTTI, 1999	THC CBN/CBD	a. Tween 80 b. Diclorometano c. Petróleo leve	1 M NaOH	SPME	-----	GC-MS
BAPTISTA et al, 2002	carboxi-THC	Solução detergente	β -glicuronidase/ arilsulfatase	LLE	PFPA / PFPOH	GC-MS
SPORKET & PRAGST, 2000	THC CBN, CBD	Acetona	4% NaOH	HS-SPME	-----	GC-MS
MUSSHOFF et al, 2002	THC CBN, CBD	Diclorometano	1 M NaOH	HS-SPME	MSTFA	GC-MS

Tabela 3 – Principais trabalhos desenvolvidos com cabelo

LEGENDA: **BF** – trifluoreto de boro, **Carboxi-THC** – 11-nor- Δ^9 -tetraidrocanabinol-9-carboxílico, **CBD** – canabidiol, **CBN** – canabinol, **GC** – cromatografia gasosa, **HFBA** – heptafluoropropanol, **HFIP** – hexafluoroisopropanol, **HFPOH** – hexafluoropropanol, **HS** – *headspace*, **KOH** – hidróxido de potássio, **LLE** – extração líquido-líquido, **MeOH** – metanol, **MS** – espectrometria de massa, **MSTFA** – N-trimetilsilil-trifluoroacetamida, **NaOH** – hidróxido de sódio, **PAA** – ácido anidrido propiônico, **PFPA** – anidrido pentafluoropropiônico, **PFPOH** – pentafluoro-1-propanol, **SMPE** – microextração em fase sólida, **SPE** – extração em fase sólida, **TFA** – anidrido trifluoroacético, **THC** – Δ^9 -tetraidrocanabinol.

2.11.1. Microextração em fase sólida (SPME)

Estudos mostram que mais de 80% do tempo de análise é gasto no preparo da amostra (separação da matriz, concentração, fracionamento e derivatização). O uso excessivo de solventes e a preocupação com seu descarte, além do risco à saúde aos profissionais do laboratório, são problemas adicionais ao custo do procedimento experimental. Técnicas de extração líquido-líquido – LLE envolvem várias etapas, consomem tempo e são trabalhosas. Cada passo, especialmente na fase de concentração da amostra, pode gerar erros e perdas, principalmente quando o analito é volátil, além da possibilidade de adsorção dos analitos na parede do frasco e a contaminação de impurezas. O emprego da extração em fase sólida (SPE) necessita de menor quantidade de solventes, porém ainda é um procedimento que consome muito tempo e envolve muitas etapas (VAS & VÉKEY, 2004).

A microextração em fase sólida (SPME) é um método analítico de separação que pode solucionar a análise de praticamente todos os tipos de misturas, gases e matrizes biológicas. Foi introduzida por Arthur e Pawliszyn em 1990, e usada inicialmente para análises de amostras ambientais em uma tentativa de reduzir as limitações inerentes à SPE e à LLE (LORD & PAWLISZYN, 2000; ULRICH, 2000; VAS & VÉKEY, 2004). É uma técnica rápida que possui como principais vantagens: rapidez, simplicidade, a ausência ou necessidade de pequeno volume de solventes, conseqüente redução dos gastos com solventes e possibilidade de se melhorar os limites de detecção (STAUB, 1999; STRANO-ROSSI & CHIAROTTI, 1999, LORD & PAWLISZYN, 2000; SPORKET & PRAGST, 2000; VAS & VÉKEY, 2004).

O desenvolvimento da SPME foi derivado da idéia de uma coluna capilar aberta imersa na cromatografia em fase gasosa. Consiste de uma seringa modificada que contém um microtubo de aço dentro da agulha. Esse microtubo contém na extremidade uma fibra de sílica fundida de cerca de 1 cm, que é recoberta por um polímero orgânico que age como uma esponja,

concentrando os analitos por processos de adsorção e absorção. Ocorre absorção quando camadas líquida da fibra removem os compostos da amostra (por exemplo, PDMS - polidimetilsiloxano) e ocorre adsorção no caso de camadas sólidas (por exemplo, carboxano). A eficiência da extração baseia-se na partição do analito entre a amostra e a fibra, semelhante ao princípio da cromatografia. Quanto maior for a afinidade do analito pela fase de extração, maior a concentração de analito extraído. Os analitos são sorvidos para um fino filme depositado sobre a fibra de sílica fundida. Posteriormente, a fibra é exposta à amostra, retraída e transferida para o cromatógrafo (LORD & PAWLISZYN, 2000; VAS & VÉKEY, 2004).

O maior problema encontrado com análises por microextração é que alguns fatores que alteram o coeficiente de partição do analito influenciam a proporção extraída. Porém, se estes fatores permanecerem constantes na matriz utilizada, a análise se torna reprodutível e esses fatores deixam de ter relevância (LORD & PAWLISZYN, 2000).

Há dois tipos de aplicações para a SPME. Amostras podem ser submetidas à extração através da exposição da fibra diretamente na amostra por imersão direta (DI-SPME) ou pelo *headspace* (HS-SPME) que consiste na partição dos analitos entre a amostra, o vapor formado acima da solução (*headspace*) e a fibra de sílica. Os analitos são adsorvidos e concentrados na fibra até que um equilíbrio entre as 3 fases seja alcançado. Assim, a fibra pode ser diretamente injetada no cromatógrafo para desorção (LORD & PAWLISZYN, 2000; MUSSHOFF, 2002; VAS & VÉKEY, 2004). Também necessita de um exaustivo ajuste de diversas condições de extração, tais como agitação, pH, *salting out*, temperatura e tempo, no qual determinadas variações resultam em significativa melhora da sensibilidade da análise (MILLS & WALKER, 2000).

Matrizes biológicas com componentes de alta massa molecular, como proteínas, que poderiam interferir na extração por SPME, têm este fator eliminado quando se substitui a exposição direta da fibra na amostra pela

técnica de *headspace* (MILLS & WALKER, 2000), prevenindo a contaminação da superfície da fibra e promovendo a obtenção de extratos mais limpos, que posteriormente serão injetados no cromatógrafo. A técnica de *headspace* é indicada para matrizes de volatilidade média a alta (ULRICH, 2000).

Diversos tipos de fibra estão disponíveis comercialmente para extração de compostos voláteis ou não voláteis, polares ou apolares. A fibra de polidimetilsiloxano, por exemplo, é utilizada para compostos apolares e a volatilidade dependerá da espessura do filme: 100µm para compostos voláteis e 30µm para semi-voláteis (MILLS & WALKER, 2000).

Inicialmente a SPME era utilizada somente em estudos qualitativos ou semi-quantitativos. Posteriormente, verificou-se também a possibilidade de análises quantitativas, sendo necessário, como no caso da LLE e da SPE, a utilização de padrão interno. A HS-SPME envolve um processo de equilíbrio multi-fase, assim cuidadosas considerações devem ser feitas para as propriedades físico-químicas dos compostos candidatos a serem empregados como padrão interno, sendo preferencialmente indicados os deuterados (LORD & PAWLISZYN, 2000; VAS & VÉKEY, 2004).

O cabelo é uma amostra extremamente complexa e o uso da técnica de HS-SPME tem como grande vantagem a produção de extratos altamente puros, sem interferentes (VAS & VÉKEY, 2004).

Objetivo

3. OBJETIVO DO TRABALHO

O objetivo do trabalho é a determinação dos canabinóides em cabelo de usuários de *Cannabis* utilizando a técnica de microextração em fase sólida por *headspace* e a espectrometria de massa associada à cromatografia em fase gasosa (HS-SPME-GC/MS).

Para se alcançar tal objetivo, elaborou-se o seguinte plano de trabalho:

- Desenvolvimento e validação de um método utilizando microextração em fase sólida por *headspace* e cromatografia em fase gasosa associada a espectrometria de massa (HS-SPME-GC/MS) para determinação de Δ^9 -tetraidrocanabinol (THC), canabidiol (CBD) e canabinol (CBN) em cabelos.
- Coleta de amostras de cabelo e urina de pacientes internados em clínica para tratamento da dependência a drogas de abuso, usuários de *Cannabis* em abstinência.
- Aplicação do método validado nas amostras de cabelos de usuários de *Cannabis* para a detecção de THC, CBD e CBN .
- Avaliação de uma possível correlação entre exposição e incorporação desses canabinóides no cabelo.

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Reagentes

Diclorometano, hidróxido de sódio, carbonato de sódio anidro e ácido sulfúrico foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha).

4.1.2. Soluções-padrão

- soluções-padrão estoque em metanol de Δ^9 -tetraidrocanabinol, canabinol, canabidiol na concentração de 1mg/mL e de Δ^9 -tetraidrocanabinol deuterado (padrão interno) na concentração de 100 μ g/mL , obtidos da Radian International.
- soluções-padrão de trabalho em metanol de Δ^9 -tetraidrocanabinol, canabinol, canabidiol e de Δ^9 -tetraidrocanabinol deuterado nas concentrações de 100 μ g/mL, 10 μ g/mL, 1 μ g/mL e 0,1 μ g/mL para cada canabinóide, obtidas pela diluição em metanol das soluções-padrão estoque de cada canabinóide.

4.1.3. Equipamentos e Acessórios

- Espectrômetro de massa modelo 5972 associado a um equipamento de cromatografia em fase gasosa modelo 6890 (GC/MS), ambos da Hewlett Packard (Little Falls, EUA), equipado com coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (Hewlett Packard) com as seguintes dimensões: 30m x 0,25mm x 0,10 μ m.

- Sistema para microextração em fase sólida (SPME) obtido da Supelco (Bellefonte, PA, USA) equipado com 100 μ m de polimetilsiloxane ligado a fibra sílica.

- Gás hélio especial para cromatografia em fase gasosa (Air Liquide)
- Pipetas automáticas com volume reguláveis – Labsystems
- Balança eletrônica analítica – Sartorius Modelo R200D
- Frasco para *headspace* de 10 mL – Agilent
- Septo de silicone para *headspace* – Agilent
- Lacre de alumínio – Agilent
- Barra magnética
- Termômetro de Mercúrio
- Balão volumétrico
- Proveta
- Pipeta graduada
- Fita de pH – Merck
- Estufa – Ética Modelo 410.1
- Estufa – FANEM Modelo 515/4/A
- Agitador magnético com aquecimento – Fisatom Modelo 752A
- Ultra-som – UNIQUE Modelo USC700

4.1.4. Amostras

- Amostra de Referência Negativa: “pool” de cabelos preparado a partir de amostras fornecidas por voluntários que não fizeram uso de produtos contendo canabinóides.
- Amostra de Referência Positiva: “pool” de cabelos de referência negativa, adicionado dos padrões para estudos de extração e validação.
- Amostras de Cabelo e Urina provenientes de usuários de *Cannabis*: coletadas de pacientes internados no Centro de Tratamento de Dependência Química Vila Serena, localizado em São Paulo, Capital, durante o período de julho de 2004 a abril de 2005.

4.2. Métodos

4.2.1. Aplicação do questionário

Todos os voluntários que participaram do estudo responderam um questionário (ANEXO C) para verificar o padrão de consumo de *Cannabis* (tempo e frequência de uso, quantidade utilizada na última e na penúltima exposição).

4.2.2. Coleta de amostras

A coleta das amostras foi realizada de acordo com projeto de pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (ANEXO A). Os voluntários foram selecionados no momento da internação, quando foram entrevistados pela equipe médica do Centro de Tratamento de Dependência Química Vila Serena. Nesta primeira avaliação, caso tenha sido constatado que o paciente fez uso de *Cannabis* em um período não superior a uma

semana, e o paciente consentiu em participar da pesquisa, coletou-se uma amostra de urina para comprovar a exposição recente e uma amostra de cabelo como referência basal.

Decorridos 30 dias de internação, coletou-se uma segunda amostra de cabelo, pois se esperava que após este período, os canabinóides já pudessem estar incorporados no cabelo. Coletou-se também urina 15 e 30 dias após a 1ª coleta, com o intuito de verificar se o paciente não fez uso de *Cannabis*.

Portanto, considerando cada paciente, foram coletadas amostras de cabelo em dois períodos e amostras de urina em três períodos (TABELA 3).

CABELO	URINA
1º período: início da internação na clínica	1º período: início da internação na clínica
2º período: 30 dias após a primeira coleta	2º período: 15 dias após a primeira coleta
	3º período: 30 dias após a primeira coleta

TABELA 3 – Esquema de coleta de amostras de cabelo e urina

Os pacientes foram esclarecidos quanto aos procedimentos da clínica e concordaram em fornecer amostras de cabelo e urina (ANEXO D). As amostras serão coletadas de acordo com o procedimento adotado pelo Laboratório de Análises Toxicológicas (LAT-FCF-USP) pela equipe de enfermagem de Vila Serena (ANEXO B).

As amostras de urina foram coletadas sob supervisão da equipe médica da clínica Vila Serena. As amostras foram acondicionadas em frascos numerados, armazenadas sob refrigeração (+4°C) e transportadas em embalagens de isopor contendo gelo para conservar a temperatura até

chegarem ao Laboratório de Análises Toxicológicas, onde foram então armazenadas em freezer até o momento da análise.

As amostras de cabelo foram coletadas pela equipe médica da clínica Vila Serena, de acordo com procedimento de coleta de cabelo fornecido (ANEXO B). As amostras de cabelo foram armazenadas e transportadas em temperatura ambiente.

4.2.3. Método para análise de canabinóides na urina

As amostras de urina foram submetidas à análise de triagem para canabinóides por enzimaímunoensaio (EMIT®) de acordo com procedimento padronizado pelo LAT.

4.2.4. Desenvolvimento de método para determinação de canabinóides no cabelo por HS-SPME e GC/MS

Um método foi desenvolvido para determinação de tetraidrocanabinol (THC), canabinol (CBN) e canabidiol (CBD) em amostras de cabelo utilizando a técnica de microextração em fase sólida por *headspace* (HS-SPME) e identificação por espectrometria de massa associada à cromatografia em fase gasosa (GC/MS).

4.2.4.1. Preparação da amostra

Uma alíquota de amostra de cabelo (10mg) foi transferida para um frasco de *headspace* de 10mL e submetida à prévia descontaminação com diclorometano (2mL) por 15 minutos a 37°C. Em seguida, 50ng do padrão interno deuterado (THC-d3) foi adicionado à amostra. O processo de digestão do cabelo foi realizado através de hidrólise alcalina com 1mL de NaOH (1M) a 90°C por 20 minutos. Após o resfriamento da solução à temperatura ambiente, o pH foi ajustado a aproximadamente 10 com ácido sulfúrico (0,5M). Em seguida 0,5g de Na₂CO₃ foi adicionado. O frasco foi selado utilizando-se um septo de silicone e lacre de alumínio. Para absorção

o dispositivo de SPME contendo a fibra foi inserido através do septo do frasco e a fibra foi, então, exposta ao *headspace* (HS) por 40 minutos a 90°C, sob agitação magnética constante. Os analitos retidos na fibra foram desorvidos pela sua exposição no injetor do equipamento de cromatografia em fase gasosa associada à espectrometria de massa (Figura 6).

Figura 6 – Esquema para extração da amostra

4.2.4.2. Condições Cromatográficas

As seguintes condições foram padronizadas para análise de canabinóides extraídos do cabelo:

- Injetor: - temperatura: 270°C.
- Modo *Splitless*
- Coluna: - fluxo de hélio constante: 0,6 mL/minuto;
- temperatura inicial do forno: 150°C por 1 minuto;
- rampa: 15°C/minuto;
- temperatura final do forno: 280°C por 9 minutos.
- Interface: - temperatura: 260°C.
- Gás de arraste: Hélio
- Detector: espectrômetro de massa (Modo de operação: fragmentação por Impacto de Elétrons e monitoramento seletivo de íons-SIM)

Íons selecionados:

CBD: 231, 246, 314

CBN: 238, 295, 310

THC: 231, 299, 314

4.2.4.3. Otimização do método

Antes de se efetuar os ensaios necessários para validação de um método, alguns testes preliminares foram feitos para se verificar a situação ótima para cada parâmetro que compõe o método. Cada um dos parâmetros analisados foram feitos em triplicatas, observando a abundância absoluta obtida no GC/MS.

4.2.4.3.1. Estudo do pH ótimo para extração dos analitos

Alíquotas de amostra de cabelo (10mg) foram descontaminadas com diclorometano e adicionadas com 50ng de cada um dos canabinóides de interesse (THC, CBN, CBD). Em seguida, as amostras foram submetidas ao método descrito em **4.2.4.1** e **4.2.4.2**, variando-se o pH nos seguintes valores: 4,0; 7,0 e 10,0. Para cada pH, as análises foram conduzidas em triplicata.

4.2.4.3.2. Estudo da influência da temperatura no rendimento da análise

Alíquotas de amostra de cabelo (10mg) foram descontaminadas com diclorometano e adicionadas com 50ng de cada um dos canabinóides. Em seguida, as amostras foram submetidas ao método descrito em **4.2.4.1** e **4.2.4.2**, variando-se a temperatura para realização do *headspace* em: 60, 80

e 90°C. Para cada uma das temperaturas, as análises foram conduzidas em triplicata.

4.2.4.3.3. Estudo da influência da massa de cabelo para análise dos canabinóides

Alíquotas de amostra de cabelo de massa igual a 10mg, 20mg, 50mg e 100mg foram descontaminadas com diclorometano e adicionadas com 50ng de cada um dos canabinóides. Em seguida, as amostras foram submetidas ao método descrito em **4.2.4.1** e **4.2.4.2**. Para cada uma das massas de cabelo utilizadas, as análises foram conduzidas em triplicata.

4.2.4.3.4. Estudo do tempo de adsorção dos analitos

Alíquotas de amostra de cabelo (10mg) foram descontaminadas com diclorometano e adicionadas com 50ng de cada um dos canabinóides de interesse (THC, CBN, CBD) e submetidas ao método descrito em **4.2.4.1** e **4.2.4.2**, variando-se o tempo exposição da fibra para adsorção dos analitos em 20, 40 ou 60 minutos. Para cada período de tempo determinado, análises foram conduzidas em triplicata.

4.2.5. Validação do método

A validação de um método analítico é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência (RIBANI *et al*, 2004). A validação de um método deve garantir através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando aplicabilidade dos resultados (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003).

Para validação do método determinaram-se os seguintes parâmetros para todos os analitos de interesse (THC, CBN e CND): limite de detecção, limite de quantificação, linearidade e precisão intra e interensaio

4.2.5.1. Limite de Detecção e Quantificação

A obtenção dos limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foi feita através do método empírico, que consiste na análise de uma série de amostras de cabelo negativas às quais foram adicionadas as soluções-padrão de canabinóides em concentrações decrescentes.

O limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003), porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas, no qual apresenta um coeficiente de variação que não exceda 20% para seis replicatas.

O limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003), apresentando um coeficiente de variação abaixo de 10% para seis replicatas. O LOD e o LOQ deveriam ainda satisfazer um critério de aceitação de qualificação pré-determinado (tempos de retenção com variação menor que 1% e razão de íons menor que 20%, quando comparados com os padrões dos analitos) (PEAT & DAVIS, 1998).

4.2.5.2. Linearidade

É a capacidade de um método analítica de demonstrar resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (RIBANI *et al*, 2004).

O estudo de linearidade foi realizado pela análise de amostras de cabelo com 6 (seis) pontos em triplicata, submetidas ao método proposto nas seguintes concentrações: 0; 0,5 ; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 e 12,0 ng/mg (para canabinol e delta-9-THC) e 0; 0,75 ; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 e 12,0 ng/mg (para canabidiol).

As concentrações foram inseridas no eixo das abscissas (eixo X) e a razão obtida entre as áreas de cada fármaco e do padrão interno no eixo das ordenadas (eixo Y); através de regressão linear, o coeficiente de determinação (r^2) foi calculado e valores acima de 0,99 foram considerados satisfatórios para este estudo.

4.2.5.3. Precisão intraensaio e interensaio

As precisões intraensaio e interensaio foram determinadas indiretamente pelo cálculo de imprecisão através da determinação do coeficiente de variação do método (CV). O estudo foi conduzido analisando-se amostras cabelo em três dias diferentes. As análises foram conduzidas em seis replicatas para cada concentração de controle de qualidade (CQ), onde foram utilizadas concentrações de 1,5ng/mg de cabelo para o controle de qualidade baixo (CQ1); 4,5ng/mg de cabelo para o controle de qualidade médio (CQ2) e 7,5ng/mg de cabelo para o controle de qualidade alto (CQ3).

4.2.5.4. Recuperação

O estudo de recuperação foi realizado para avaliar a quantidade de analito recuperado pelo procedimento analítico descrito em 4.2.4.1 e 4.2.4.2, comparando as respostas obtidas quando as soluções-padrão de canabinóides são adicionadas nas amostras de cabelo negativas, antes e após a hidrólise alcalina, em seis replicatas para os canabinóides CBD, CBN e THC, para cada concentração de controle de qualidade (CQ), onde foram utilizadas concentrações de 1,5ng/mg de cabelo para o controle de

qualidade baixo (CQ1); 4,5ng/mg de cabelo para o controle de qualidade médio (CQ2) e 7,5ng/mg de cabelo para o controle de qualidade alto (CQ3).

Para calcular as proporções dos analitos recuperadas, foram utilizadas as médias das razões entre as áreas obtidas, tomando-se como 100% (cem por cento) a média das áreas dos analitos adicionados após a hidrólise.

Resultados

5. RESULTADOS

5.1. Resultados da otimização do método

5.1.1. Estudo do pH ótimo para extração dos analitos

A Figura 7 mostra as abundâncias absolutas obtidas pelos canabinóides em diferentes valores de pH, conforme descrito no item 4.2.4.3.1.

Figura 7 – Estudo do pH ótimo para extração dos analitos em cabelo adicionado dos padrões de canabidiol (CBD), canabinol, (CBN) e tetraidrocanabinol (THC) na concentração de 5,0ng/mg.

5.1.2. Estudo da influência da temperatura no rendimento da análise

A Figura 8 mostra o comportamento apresentado pelos canabinóides em diferentes temperaturas de incubação para realização do *headspace*, conforme procedimento descrito o item 4.2.4.3.2.

Figura 8 – Estudo da influência da temperatura no rendimento da análise. Cabelo adicionado dos padrões de canabidiol (CBD), canabinol, (CBN) e tetraidrocanabinol (THC) na concentração de 5,0ng/mg.

5.1.3. Estudo da influência da massa de cabelo para análise dos canabinóides

A Figura 9 mostra a influência no rendimento da massa de cabelo utilizada para análise dos canabinóides conforme procedimento descrito o item 4.2.4.3.3.

Figura 9 – Estudo da influência da quantidade de cabelo no rendimento da análise. Massas de cabelo adicionadas 50ng dos padrões de canabidiol (CBD), canabinol, (CBN) e tetraidrocanabinol (THC) nas amostras.

5.1.4. Estudo do tempo de adsorção dos analitos

A Figura 10 mostra as abundâncias absolutas obtidas pelos canabinóides em diferentes tempos de adsorção dos analitos, conforme descrito o item 4.2.4.3.4.

Figura 10 – Estudo do tempo de exposição para adsorção dos analitos na fibra em cabelo adicionado dos padrões de canabidiol (CBD), canabinol, (CBN) e tetraidrocanabinol (THC) na concentração de 5,0ng/mg.

5.2. Cromatograma característico da análise de canabinóides em cabelo

O cromatograma a seguir (Figura 11) apresenta o perfil da análise de cabelo adicionada de canabidiol (CBD), canabinol (CBN) e Δ^9 -tetraidrocanabinol (THC) e do padrão interno Δ^9 -tetraidrocanabinol deuterado (THCd3).

Figura 11 - Cromatograma obtido pela análise por HS-SPME-GC/MS de cabelo adicionado dos padrões de canabinóides na concentração de 7,5ng/mg. (A-canabidiol, B-delta-9-tetraidrocanabinol, C-delta-9-tetraidrocanabinol deuterado, D- canabinol)

5.3. Resultados da validação do método para determinação de canabinóides no cabelo

5.3.1. Limites de Detecção e Quantificação

Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ), obtidos pelo método empírico, estão descritos na TABELA 4.

Canabinóide	LOD (ng/mg)	CV(%)	LOQ (ng/mg)	CV(%)
CBD	0,07	12,2	0,12	3,2
CBN	0,07	15,5	0,12	6,9
THC	0,07	15,1	0,12	8,3

TABELA 4 – LOD (Limite de detecção) e LOQ (Limite de quantificação) para canabidiol (CBD), canabinol (CBN) e tetraidrocanabinol (THC) e seus respectivos CV% (coeficiente de variação).

5.3.2. Linearidade

Nas faixas de concentração estudadas – 0,75 a 12ng/mg para CBD e 0,5 a 12ng/mg para CBN e THC, obtiveram-se curvas lineares, com coeficientes de correlação linear calculados pela equação de regressão linear dentro dos limites estabelecidos ($R^2 > 0,9800$).

Nos gráficos apresentados a seguir (Figuras 12, 13 e 14), o eixo Y representa a área relativa calculada pela relação entre a área absoluta do pico do canabinóide (respectivamente CBD, CBN ou THC) e a área do pico do padrão interno. O eixo X corresponde às diferentes concentrações dos canabinóides.

Figura 12 – Estudo da linearidade do canabidiol (CBD) na faixa de concentração de 0,75 a 12ng/mg. Curva de calibração, equação da reta e coeficiente de correlação linear.

Figura 13 – Estudo da linearidade do canabinol (CBN) na faixa de concentração de 0,5 a 12ng/mg. Curva de calibração, equação da reta e coeficiente de correlação linear.

Figura 14 – Estudo da linearidade do tetraidrocanabinol (THC) na faixa de concentração de 0,5 a 12ng/mg. Curva de calibração, equação da reta e coeficiente de correlação linear.

5.3.3. Precisão Intra-ensaio e Interensaio

As precisões intra e interensaio analisadas para CBD, CBN e THC, com método descrito nos itens 4.2.4.1. e 4.2.4.2. estão apresentadas na TABELA 5, através do coeficiente de variação do método.

Canabinóide	Precisão Intra-ensaio (%)			Precisão Interensaio (%)		
	CQ1	CQ2	CQ3	CQ1	CQ2	CQ3
CBD	6,0	4,78	8,9	18,0	17,8	10,4
CBN	8,3	7,1	3,4	10,2	14,6	17,12
THC	8,3	6,4	6,0	2,5	8,17	14,0

TABELA 5 – Coeficientes de variação para canabidiol (CBD), canabinol (CBN) e tetraidrocannabinol (THC), onde CQ1 corresponde ao controle de qualidade baixo (concentração de 1,5ng/mg de cabelo), CQ2 corresponde ao controle de qualidade médio (concentração de 4,5ng/mg de cabelo) e CQ3 corresponde ao controle de qualidade alto (concentração de 7,5ng/mg de cabelo).

5.3.4. Recuperação

O método apresentou recuperação média dos controles de qualidade alto, médio e baixo, de 44% para CBD, de 85% para CBN e de 89% para THC, com método descrito nos itens 4.2.4.1. e 4.2.4.2.. Os valores de recuperação para cada um dos controles estão apresentados na TABELA 6.

Canabinóide	CQ1%	CQ2%	CQ3%
CBD	51	36	44
CBN	85	81	88
THC	92	92	83

TABELA 6 – Recuperação média para canabidiol (CBD), canabinol (CBN) e tetraidrocannabinol (THC), onde CQ1 corresponde ao controle de qualidade baixo (concentração de 1,5ng/mg de cabelo), CQ2 corresponde ao controle de qualidade médio (concentração de 4,5ng/mg de cabelo) e CQ3 corresponde ao controle de qualidade alto (concentração de 7,5ng/mg de cabelo).

5.4. Resultados obtidos com a análise toxicológica de amostras de usuários de *Cannabis*

A Figura 15 mostra o perfil cromatográfico da análise de uma amostra de cabelo de um voluntário no qual há concentração de 0,19ng/mg de canabinol, 0,49ng/mg de Δ^9 -tetraidrocanabinol e 0,12ng/mg de canabidiol.

Figura 15 - Cromatograma obtido pela análise por HS-SPME-GC/MS de cabelo de voluntário contendo canabidiol na concentração de 0,12ng/mg (A), Δ^9 -tetraidrocanabinol (B) na concentração de 0,19 ng/mg e canabinol (D) na concentração de 0,48 ng/mg. Padrão interno (C): Δ^9 -tetraidrocanabinol deuterado).

As amostras de cabelo dos voluntários da clínica de tratamento de dependentes que relataram uso de *Cannabis* foram submetidas a análise utilizando-se o método padronizado. Os resultados das análises e as informações obtidas através da aplicação do questionário estão apresentadas na TABELA 7.

Voluntário	Idade (anos)	Sexo	Último uso		Penúltimo Uso		Frequência de uso (cigarro/semana)	Tempo de exposição (anos)	Outras drogas	Resultados				
			Período	Quantidade (cigarro)	Período	Quantidade (cigarro)				U1	U2	U3	C1 (ng/mg)	C2 (ng/mg)
01	33	M	48-72 h	8	1 semana	3	56	14	Cocaína/crack	+			THC – 0,13	
02	37	F	72h	1	1 semana	1	4	5	Álcool	+			–	
03	25	M	48-72h	1	1 semana	2	35	3	-----	+	–	–	CBD – 0,12 CBN – 0,48 THC – 0,19	CBN – 0,21 THC – 0,18
08	20	M	168h	2	1 semana	2	10	4	Álcool/cocaína	+	–	–	CBD < LOQ CBN – 0,16 THC – 0,31	CBN < LOQ THC < LOQ
09	49	M	1 mês	1	1 mês e 7 dias	1	8	1	Cocaína	–	–	–	–	–
10	42	M	48-72h	1	1 semana	1	4-5	2	Cocaína	+			–	
12	26	F	120h	1	1 semana	1	3	2	Álcool	–			–	
13	25	F	96h	1	1 semana	1	3	1	Cocaína	+			–	

TABELA 7 – Resultados da análise dos questionários e das amostras de cabelo de voluntários - **LEGENDA:** U1, U2, U3 – urina coletada no início da internação, após 15 dias e após 30 dias, respectivamente, C1, C2 – cabelo coletado no início da internação e após 30 dias, respectivamente, – CBD – canabidiol, CBN – canabinol, THC – Δ^9 -tetraidrocanabinol, LOQ – limite de quantificação.

Discussão

6. DISCUSSÃO

O uso de drogas é um problema de saúde e segurança pública.

No Brasil, qualquer produto derivado da *Cannabis sativa* L. é de uso proscrito. Em 1976, a lei que regulamentava esta proibição é duvidosa em relação a distinção entre o padrão de uso, o porte ou o tráfico da *Cannabis* ou de qualquer outra droga de abuso. Assim, tanto um usuário ocasional, quanto um dependente, um traficante, seja este usuário ou não, poderiam estar enquadrados.

(Lei Federal 6.368 de 21 de outubro de 1976: “É proibido em todo o território brasileiro o plantio, cultura, colheita e a exploração de todas as plantas das quais possa ser extraída substância entorpecente ou que determine dependência física ou psíquica, sob pena de reclusão de 3 a 15 anos e pagamento de 50 a 360 dias-multa”).

Visando a atualização e o aprimoramento desta lei, tramitou no Congresso Nacional, durante 11 anos, o que atualmente se conhece como a Lei nº 10.409, promulgada em 11 de janeiro de 2002. Originalmente continha cinquenta e nove artigos; sofreu inúmeros vetos por parte da Presidência da República, restando menos da metade de seu texto. Entretanto, esta nova lei, que deveria ser inovadora e completa, dispendo sobre prevenção, tratamento, fiscalização, controle e repressão à produção, ao uso e ao tráfico de produtos, substâncias ou drogas ilícitas que causem dependência,

continuou igual à anterior, não diferenciando a intensidade de padrão de uso, dando a ambos tratamento igualitário.

O cabelo é uma matriz alternativa que vem ganhando grande espaço para estudo de diferentes substâncias em diversas situações (MOELLER, 1996; KLEIN, 2000). Por exemplo, a realização da análise de canabinóides no cabelo poderia ser útil na distinção entre usuário e não usuário da *Cannabis*, fornecendo um subsídio importante em processos criminais. KLEIN *et al* (2000), no Canadá, MOELLER (1996), na Alemanha e WONG (2000) no Brasil analisaram, no cabelo, a presença de fármacos e seus produtos de biotransformação, em diversas situações práticas:

- casos de mães que negavam ter consumido drogas durante a gravidez. Verificaram resultados negativos na urina, mas ao realizar análise no cabelo obtiveram resultados positivos para cocaína, maconha, nicotina, ou codeína;
- casos de dependentes em recuperação;
- casos de rastreamento de consumo de drogas por atletas;
- casos de investigação criminal ou acidentes de trânsito, ou até anulação da carteira de habilitação de motoristas, não por julgamento, mas pelas autoridades rodoviárias e de trânsito. Em casos onde o sujeito é acusado mais de uma vez de dirigir sobre o efeito da droga, a análise no cabelo pode ser usada como evidência adicional do uso crônico da droga.

Além dos casos acima citados, a análise no cabelo pode também estabelecer e verificar a cronicidade do uso em casos de custódia de crianças, divórcio, tratamento, entre outros (KLEIN, 2000).

Contudo, a interpretação de seus resultados ainda gera inúmeras discussões devido à falta de conhecimento de diferentes aspectos, tais como o exato mecanismo de incorporação de fármacos (HENDERSON, 1993; CONE, 1996; MOELLER, 1996; STAUB, 1999; NAKAHARA, 1999b), a real

interferência do suor, do sebo, da contaminação externa dos tratamentos cosméticos, das diferentes cores e etnias (HENDERSON, 1993; CONE, 1996; PÖTSCH, SKOPP & MOELLER, 1997; NAKAHARA, 1999b; KINTZ, 2004), a relação entre a dose da droga ingerida (MIECZKOWSKI, 1996; SOCIETY OF HAIR, 1997) e a quantidade de incorporada nas diferentes regiões do corpo (OFFIDANI, STRANO-ROSSI & CHIAROTTI, 1993, NAKAHARA, 1999a; WENNIG, 2000).

Um fator que motivou a decisão de realizar este estudo foi a demanda forense relativa ao questionamento sobre qual seria o tempo necessário para os canabinóides incorporarem no cabelo após exposição a *Cannabis*. Foram analisados diferentes procedimentos descritos na literatura especializada (TABELA 2) empregando o cabelo para a detecção de canabinóides, no sentido de avaliar o mais adequado para esta finalidade.

Como os canabinóides são estáveis em meio básico, são utilizadas técnicas de hidrólise alcalina para promover a digestão do cabelo e a remoção dos fármacos de interesse. Hidrólise ácida e enzimática são ineficientes na remoção dos canabinóides, além de não possibilitarem a digestão completa do cabelo, conforme mencionado por CIRIMELE *et al* (1995).

A maioria dos trabalhos emprega, para digestão do cabelo, NaOH 1 M (KINTZ *et al*, 1992; CIRIMELE *et al*, 1995; KINTZ *et al*, 1995; WILKINS *et al*, 1995; MIECZKOWSKI, 1995; KAUERT & ROHRICH, 1996; STRANO-ROSSI & CHIAROTTI, 1999; MUSSHOF *et al*, 2002) ou NaOH 2 M (MOLLER, 1992), com exceção de JURADO *et al* (1995) e UHL (1997) que utilizam, solução de hidróxido de potássio.

Após a digestão completa do cabelo, é necessário um procedimento de extração dos canabinóides. Ensaio iniciais empregando-se a extração em fase sólida e líquido-líquido não são satisfatórios devido à baixa recuperação e presença de muitos interferentes endógenos no

cromatograma obtido (CIRIMELE *et al*, 1995). Neste sentido, a técnica relativamente nova de microextração em fase sólida (SPME) oferece vantagem pela sensibilidade, praticidade, rapidez e não necessidade do uso de solventes orgânicos para extração.

Desta forma, optou-se em se utilizar, inicialmente, a técnica de SPME para determinação de canabinóides em cabelo, no presente projeto de pesquisa.

STRANO-ROSSI e CHIAROTTI (1998), um dos primeiros trabalhos na qual se empregou a SPME na detecção de canabinóides em cabelo, padronizaram o método utilizando 200 μ L de solução de NaOH para a digestão de 50mg de amostra a 90°C por 10 minutos. Na tentativa de se reproduzir este método, verificou-se que o volume proposto era insuficiente para a promoção da dissolução completa do cabelo no tempo e na temperatura selecionados. Assim, experimentou-se um volume maior de NaOH (1mL) por um período de tempo mais prolongado (20 minutos); nestas condições, o cabelo foi completamente dissolvido. Contudo, ao adicionar-se HCl 6M na solução, conforme indicação dos autores, ocorreu uma precipitação das proteínas de tal forma que se tornou impossível expor a fibra de SPME na solução, já que o precipitado se ligaria à fibra, prejudicando ou até mesmo impossibilitando a análise cromatográfica. Portanto, tentou-se filtrar e centrifugar a solução, mas analisando-se o sobrenadante, nenhum canabinóide foi detectado, provavelmente por permaneceram ligados ao precipitado. Diferentes temperaturas e tempos de hidrólise também foram verificados, mas a formação do precipitado continuou.

MUSSHOFF *et al*. (2002) utilizaram a SPME para extração de canabinóides do cabelo, empregando alíquotas de 10mg, hidrólise com NaOH 1M, mas sem adição de ácido para neutralização do meio. Em seguida, a fibra foi exposta ao *headspace* a 90°C por 30 minutos.

Como a técnica preconizada por STRANO-ROSSI e CHIAROTTI (1998) não deu resultados satisfatórios, nem com as modificações empregadas, optou-se por utilizar a técnica recentemente sugerida por microextração em fase sólida por *headspace* no sentido de se obter um método eficaz e adequado, que possibilitasse a extração dos canabinóides incorporados no cabelo.

A técnica de MUSSHOF *et al.* (2002) foi reproduzida, obtendo resultados satisfatórios, porém, após poucas análises (cerca de 10 a 20), ocorria um descolamento das fibras que se perdiam na solução ou no injetor do cromatógrafo. Embora as fibras tenham sido expostas somente ao vapor da solução, de alguma forma seu elevado pH pode ter contribuído para danificá-las, uma vez que, segundo o fabricante, recomenda-se que a fibra de polidimetilsiloxano seja utilizada num pH na faixa de 2 – 10, quando utilizada a extração por imersão direta. Desta forma, tentou-se empregar extração em meio ácido conforme utilizado por diversos autores que propuseram métodos para detectar canabinóides em cabelo com o uso da SPME ou extração líquido-líquido (CIRIMELE *et al.*; 1995; JURADO *et al.*; 1995; KINTZ *et al.*, 1995; STRANO-ROSSI & CHIAROTTI, 1998). De fato, teoricamente, este seria o meio mais adequado para extração de canabinóides, uma vez que estes compostos possuem caráter ácido e ficariam na forma não-ionizada (apolar) nessa condição. Entretanto, a adição de ácido na solução (cabelo digerido), também não forneceu resultados satisfatórios, pois verificou-se baixa eficiência de extração. Esse fato pode estar relacionado com a formação de precipitado em meio ácido, conforme mencionado anteriormente, no qual os canabinóides devem se ligar fortemente, mesmo com a utilização de alta temperatura para o procedimento de *headspace* (90°C).

Frente ao exposto, decidiu-se pesquisar além de outros diferentes valores de pH (4,0; 7,0 e 10,0) outros parâmetros que pudessem influenciar na eficiência de extração. Neste sentido, também foram avaliadas diferentes massas de cabelo (10mg, 20mg, 50mg e 100mg), temperaturas para

realização do *headspace* (60°C, 80°C e 90°C) e tempos de adsorção da fibra (20, 40 e 60 minutos).

Conforme mostra a Figura 7, no pH =10 ocorreu maior eficiência de extração dos canabinóides, verificada pela maior abundância absoluta obtida. Esse fenômeno é intrigante, uma vez que em condições alcalinas, ocorreria desprotonação das hidroxilas fenólicas, o que tornaria a molécula bastante hidrossolúvel e, portanto pouco volátil para realização do *headspace*. Além disso, também teria pouca afinidade pela fibra de polidimetilsiloxano, que é relativamente apolar. Esse fenômeno também foi observado por MUSSHOF *et al.* (2002).

Dentre as diferentes massas de cabelo testadas a que apresentou maior abundância absoluta foi a de massa de 10 mg. Poderia-se pensar que utilizando-se massas maiores de cabelo menores valores de limites de detecção seriam obtidos. Entretanto, a complexidade protéica do cabelo (MOELLER, 1996; STAUB, 1999; GENTILI, CORNETTA & MACCHIA, 2004) provavelmente faz com que quanto maior a quantidade de cabelo, maior a ligação dos canabinóides a essa matriz, promovendo resultados menos favoráveis.

Com relação às diferentes temperaturas analisadas, observou-se que a de 90°C foi a mais eficiente para extração dos analitos. Esses resultados estão de acordos com MUSSHOF *et al.* (2002) que verificou em seu trabalho que baixas temperaturas são ineficientes para uma adequada volatilização dos analitos a ser utilizado no procedimento de *headspace*. Poderia-se pensar na possibilidade de se aumentar ainda mais a temperatura para o intervalo de 110-120°C, porém nessas condições, o sistema entra em ebulição, ocorrendo o rompimento do lacre de alumínio devido a excessiva pressão fornecida, causando perda de amostra.

Por fim, diferentes tempos de adsorção dos analitos na fibra foram avaliados. No geral, para todos os canabinóides, o melhor tempo de

exposição da fibra foi 40 minutos (Figura 10). Surpreendentemente, com o tempo de 60 minutos, a eficiência de extração foi menor. Assim, o tempo de 40 minutos foi escolhido para o método proposto.

Além desses parâmetros testados observou-se que a utilização de um sal para a promoção do efeito de *salting out* também é um fator que influencia de forma relevante o rendimento. A adição de sal permite o aumento da força iônica e da polaridade, promovendo um aumento da sensibilidade, quando comparado com a mesma análise sem a adição do sal.

MUSSHOFF *et al.* (2002) observaram que dentre diferentes sais, o carbonato de sódio foi aquele que promovia maior efeito de *salting out*. Neste presente trabalho, também obteve-se bons resultados com carbonato de sódio, comparado com outros sais (cloreto de sódio, sulfato de amônio, sulfato de sódio) e da análise sem a adição de sal.

Observou-se que cada um dos parâmetros analisados é fundamental na extração dos canabinóides no cabelo, de forma que, se um deles não estiver na situação mais adequada verificada, pode haver grande prejuízo no resultado final.

Após a fase de extração, é necessário que a substância a ser analisada por cromatografia em fase gasosa seja apolar, volátil e possua estabilidade térmica. Quando os compostos não possuem essas propriedades físico-químicas, a etapa de derivação é fundamental para se obter um cromatograma com picos bem definidos e simétricos (YONAMINE, 2000).

No caso dos canabinóides, apesar da maioria dos trabalhos verificados na literatura utilizarem a derivação, inclusive o de MUSSHOFF *et al.* (2002), não se considerou necessário acrescentar esta etapa ao método, pois, como se pode observar na figura 11, conseguiu-se picos bem definidos e simétricos para todos os canabinóides. A ausência de derivação no

método desenvolvido é vantajosa em termos de custo e de tempo gasto, por permitir uma análise mais rápida, sem a necessidade de se preocupar com interferentes, sensibilidade e estabilidade dos compostos formados após o processo de derivação.

O monitoramento seletivo de íons (SIM) é um modo de operação do GC/MS que possibilita o instrumento monitorar dois, três ou mais fragmentos específicos de cada uma das substâncias a serem analisadas. Esse modo possibilita detectar concentrações bem menores de substância que quando o espectrofotômetro de massa está selecionado no modo *Full Scan*, modo em que o equipamento gera um espectro completo da substância, fornecendo melhor informação para sua identificação (YONAMINE, 2000). No caso da determinação de canabinóides no cabelo, utilizou-se o modo SIM, pois se desejou maior sensibilidade na análise.

Para quantificação de uma substância por GC/MS, o uso de padrões internos deuterados é recomendado, já que ele é um composto com características físico-químicas idênticas à substância a ser investigada, possui mesma recuperação analítica.

No caso do THC, há disponível no mercado o padrão deuterado THCd_3 , porém ainda não há padrões deuterados para o CBD e o CBN. Teoricamente, poder-se-ia pensar num prejuízo dos resultados dos ensaios de precisão intra e interensaio do CBD e do CBN em relação aos obtidos pelo THC. Porém, observou-se na prática que não houve um prejuízo significativo na precisão interensaio (ver tabela 5). Na precisão intra-ensaio o THC apresentou bons resultados para os controles de qualidade baixo e médio, mas comparando o controle de qualidade alto (CQ3) do CBD com o CQ3 do THC, o CBD apresentou melhores resultados, mostrando, neste caso, que a ausência dos padrões deuterados de CBD e CBN não foi um fator que prejudicou a análise de forma relevante.

Estabelecidas as condições de extração, pôde-se iniciar os estudos para validação do método. Foram efetuadas curvas de calibração com amostras de referência negativa adicionadas de concentrações conhecidas de soluções-padrão, antes do processo de digestão e extração.

Observando os gráficos das curvas de calibração construídos, verificou-se adequada linearidade para os três canabinóides analisados, mostrando que na faixa de concentração estudada, o cabelo, como matriz biológica, não interferiu nos resultados das análises, onde todas as curvas obtiveram coeficientes de regressão linear maiores que 0,9800.

Os resultados da precisão intra-ensaio e interensaio também foram adequados, obtendo-se valores de coeficientes de variação menores que 10% para a precisão inter-ensaio e menores que 20% para a precisão intra-ensaio.

Estudos de recuperação foram feitos para se avaliar a quantidade de analito que se consegue recuperar pelo procedimento analítico desenvolvido, comparando a resposta obtida quando soluções-padrão de canabinóides forem adicionadas nas amostras de cabelo negativas antes e após a hidrólise alcalina, em diferentes concentrações. O THC foi o fármaco que obteve melhores resultados (recuperação média de 89%), seguido do CBN (recuperação média de 85%). O CBD obteve baixos índices de recuperação em todas as concentrações de controle de qualidade estudadas (recuperação média de 44%).

Além do THC, substância mais encontrada no cabelo, e os principais canabinóides existentes na droga (CBD e CBN), seria recomendada a determinação do principal produto de biotransformação, o carboxi-THC, pois sua presença em amostras de cabelo seria considerada como evidência do uso de *Cannabis*, enquanto a presença dos outros canabinóides poderia ser também devido à contaminação externa do cabelo (MUSSHOFF, 2002; UHL & SACHS, 2004). Todavia, é conhecido que o carboxi-THC tem uma taxa de

incorporação ao cabelo muito pequena, ao redor de 3600 vezes menor que a da cocaína (MUSSHOFF, 2005). Portanto é detectado somente em concentrações muito baixas, da ordem de picogramas. A fraca incorporação do carboxi-THC no cabelo não é surpresa, levando-se em consideração os três principais fatores que influenciam na incorporação de substâncias no cabelo: lipofilicidade, afinidade à melanina e permeabilidade à membrana. O carboxi-THC é menos incorporado ao cabelo que outros fármacos, uma vez que a permeabilidade à membrana é baseada no gradiente de pH entre o sangue (pH7,4) e o cabelo pH (pH<5). Em contraste com outras matrizes biológicas, CBD e CBN também foram detectados em concentrações significantes em amostras de cabelo (STAUB, 1999 MUSSHOFF, 2002). Adicionado à desvantagem da baixa incorporação do carboxi-THC, outro fator que fez com que fosse excluído deste estudo foi o fato de ser um composto não volátil, impossibilitando sua análise por *headspace*, importante diferencial do método desenvolvido. Além disso, se de alguma forma o carboxi-THC fosse extraído, seria necessário que se acrescentasse a etapa de derivação ao método, tornando a análise mais prolongada.

Conforme protocolo proposto neste trabalho, a coleta de amostra de cabelo e urina foram provenientes de pacientes internados no Centro de Dependência Química Vila Serena, durante o período de julho de 2004 a abril de 2005. Portanto, não foi fixado o número de voluntários e sim, o período de coleta; ou seja, durante 9 meses, foram selecionados dentre todos os pacientes recém internados, aqueles que eram usuários de *Cannabis* e que concordassem em participar do estudo. No entanto, foi uma surpresa bastante negativa constatar a possibilidade de contar com apenas 8 pacientes. Ainda assim, somente 3 participaram do protocolo completo (voluntários 3,8 e 9); dos outros 5 não foram coletadas amostras de cabelo 30 dias após a primeira coleta, nem tampouco amostras de urina 15 dias e 30 dias após a primeira coleta; apenas amostras de cabelo e urina no início da internação clínica. A equipe médica relatou que muitos pacientes do sexo masculino, durante o período de internação, cortam seus cabelos rente ao

couro cabeludo, inclusive os que faziam parte do estudo, tornando-se inviável a segunda coleta de cabelo. Outros abandonaram o estudo sem nenhuma explicação, ou até mesmo abandonaram o tratamento na clínica. Mesmo assim, foram incluídos no estudo pela dificuldade de obtenção de amostras e porque também serviram para mostrar parcialmente os resultados do objetivo proposto. Infelizmente, parece que entre nós, não é bem visto a coleta de cabelo havendo pouca adesão de voluntários. Na literatura internacional parece que a compreensão é maior, uma vez que MUSSHOF, 2005 conseguiu, 47 amostras de cabelo (100 %) e até 36 amostras de pêlo púbico de pacientes provenientes de clínica psiquiátrica.

Foram analisadas 8 amostras de cabelo e de urina provenientes dos pacientes selecionados na ocasião da internação. As amostras de urina foram analisadas com a intenção de comprovar uso recente, em um período não superior a uma semana, devido a janela de detecção desta amostra biológica. Nesta situação, o resultado referente ao voluntário 12 foi o único que apresentou negativo; de acordo com seu relato, havia feito último uso nos últimos 5 dias. O resultado referente ao voluntário 9 também apresentou negativo, mas, nesse caso, era de se esperar, uma vez que havia feito uso há um mês, de acordo com seu relato. Foi incluído no estudo porque foi um dos 3 que participaram do protocolo completo.

As 8 amostras de cabelo foram analisadas no momento da internação como uma referência basal. Somente as amostras dos voluntários 1, 3 e 8 mostraram resultado positivo pelo menos para algum canabinóide, revelando que estes já haviam incorporado no cabelo de exposições anteriores. De fato, dentre todos, estes 3 voluntários eram os que haviam feito uso de *Cannabis* de uma forma mais freqüente e há mais tempo, conforme relatado pelos próprios.

A intenção de coletar uma 2ª amostra de cabelo, um mês após a internação teve por objetivo primário avaliar, caso o resultado da 1ª amostra de cabelo fosse negativo, se 1 mês seria um tempo suficiente para os

canabinóides incorporarem no cabelo, partindo da certeza que o indivíduo se expôs à *Cannabis*, fato confirmado pelo resultado positivo na amostra de urina. Infelizmente, esta situação não ocorreu, não podendo ser avaliada.

Um fato importante de comentar é que nesta clínica, há poucos casos de internação exclusivamente pela dependência por *Cannabis*; normalmente o paciente é internado porque é dependente de álcool ou cocaína. O único voluntário que foi internado apenas pelo uso de *Cannabis*, foi o único cujas amostras mostraram positivas nas 2 coletas de cabelo e apresentava uma frequência alta de uso, 35 cigarros por semana. Infelizmente o voluntário no.1 que relatou maior frequência de uso (56 cigarros/semana) e maior tempo de exposição (14 anos) não coletou a 2ª amostra de cabelo, mas seria de se esperar um resultado positivo. O voluntário número 8 mostrou valores abaixo do limite de quantificação na 2ª amostra de cabelo, porém acima do limite de detecção.

Apesar de serem poucos os voluntários para uma análise mais apurada, os resultados mostraram que, a partir de uma exposição de 10 cigarros por semana, amostras de cabelo mostram positivas. As amostras de cabelo do voluntário número 9 que fazia uso de 8 cigarros por semana, apresentaram valores negativos nas 2 coletas. Isto pode ser possível, pois, de acordo com VERSTRAETE, 2004, o consumo de um cigarro diário de *Cannabis* por semana promove concentrações no cabelo que varia de 0,02 a 3 ng/mg, ou seja valores abaixo dos valores de LQ e LD. Os outros 4 voluntários (2,10, 12 e 13) tinham uma frequência de uso até 5 cigarros por semana, talvez insuficiente para apresentarem resultados positivos na amostra de cabelo.

Com relação à interpretação quantitativa, os dados são insuficientes. Além do mais, de acordo com WILKINS *et al* (1995) que analisaram THC e seus produtos de biotransformação, a frequência de uso determinada por preenchimento de questionário e o número de urinas positivas para canabinóides não tinham correlação com a concentração de canabinóides

no cabelo. A mais alta concentração de canabinóides encontrada no cabelo não indicava maior frequência de uso. Como o valor exato da dose de cada exposição para cada indivíduo não pode ser conhecida não conseguiu-se estabelecer uma relação entre a dose e a concentração dos canabinóides no cabelo.

Amostra de cabelo pode ser muito útil como indicador de exposição à *Cannabis*, principalmente para os usuários com alta frequência de consumo.

Conclusão

7. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que:

- a técnica de microextração em fase sólida por *headspace* (HS-SPME) fornece extratos com poucos interferentes, dada a complexidade da amostra de cabelo.
- O método proposto apresentou limites de detecção de 0,07ng/mg e limites de quantificação de 0,12ng/mg para os três canabinóides estudados: Δ^9 -tetraidrocanabinol, canabinol e canabidiol). Estes e os resultados obtidos na validação mostram que trata-se de um método rápido, preciso, prático e linear, que pode ser aplicado para a determinação quantitativa de canabinóides em amostras de cabelo de usuários de *Cannabis*.
- O Δ^9 -tetraidrocanabinol foi o canabinóide encontrado em todas as amostras de cabelo positivas.
- A partir de uma exposição de 10 cigarros por semana, amostras de cabelo mostram positivas.
- Amostra de cabelo pode ser muito útil como indicador de exposição à *Cannabis*, principalmente para os usuários com alta frequência de consumo.

Referências Bibliográficas

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADIALA, J.C. *O problema da maconha no Brasil*. Rio de Janeiro: IUERJ, 1986. p.1-12.

ADAMS, I.B.; MARTIN, B.R. *Cannabis*: pharmacology and toxicology in animals and humans. *Addiction*, Abingdon, v.91, n.11, p.1585-1614, 1996.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Legislação. VISALEGIS. *Resolução RE n.899*, de 29 de maio de 2003. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=5745&word=>. Acesso em: 11 nov. 2004.

ALBERY, I.P.; STRANG, J.; GOSSOP, M.; GRIFFITHS, P. Illicit drugs and driving: prevalence, beliefs and accident involvement among a cohort of current out-of-treatment drug users. *Drug Alcohol Depend.*, Amsterdam, v.58, n.1/2, p.197-204, 2000.

AMERI, A. The effects of cannabinoids on the brain. *Prog. Neurobiol.*, Oxford, v.58, p.315-348, 1999.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*: DSM-IV. 4.ed. Washington, 1994, 886p.

ANDREASSON, S.; ALLEBECK, P.; ENGSTROM, A.; RYDBERG, U. Cannabis and schizophrenia: a longitudinal study of Swedish conscripts. *Lancet*, London, v.26, n.2, p.1483-1486, 1987.

- AQUINO NETO, F.R.; MARQUES, M.A.S.; PEREIRA, H.M.G. Controle da dopagem no esporte: aspectos químicos e farmacológicos que afetam a detecção de drogas no cabelo. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, São Paulo, v.38, p.259-271, 2002.
- BAPTISTA, M.J.; MONSANTO, P.V.; PINHO-MARQUES, E.G.; BERMEJO, A.; AVILA, S.; CASTANHEIRA, A.M.; MARGALHO, C.; BARROSO, M.; VIEIRA, D.N. Hair analysis for Δ^9 -THC, Δ^9 -THC-COOH, CBN, CBD, by GC/MS-EI: comparison with GC/MS-NCI for Δ^9 -THC-COOH. *Forensic Sci. Int.*, Amsterdam, v.128, n.1/2, p.66-78, 2002.
- BARRERA, A.M.B.; STRANO-ROSSI, S. Hair and urine analysis: relative distribution of drugs and their metabolites. *Forensic Sci. Int.*, Amsterdam, v.70, p.203-210, 1995.
- BONO, J.P. Criminalistics: introduction to controlled substances. In: KARCH, S.B., ed. *Drug abuse handbook*. Boca Raton: CRC Press, 1998. p.1-76.
- CAMPOS, D.R.; YONAMINE, M.; MORAES MOREAU, R.L. Marijuana as doping in sports. *Sports Med.*, Baltimore, v.33, p.395-399, 2003.
- CENTRO BRASILEIRO DE INFORMAÇÕES SOBRE DROGAS PSICOTRÓPICAS. *IV levantamento sobre o uso de drogas entre estudantes de 1º e 2º graus em dez capitais brasileiras*. São Paulo: CEBRID, 1997. 130p.
- CHAN, P.; SILLS, R.; BRAUN, A.; HASEMAN, J.; BUCHER, J. Toxicity and carcinogenicity of delta-9-tetrahydrocannabinol in Fischer rats and B6C2F1 mice. *Fundam. Appl. Toxicol.*, Akron, v.30, p.109-117, 1996.
- CIRIMELE, V.; KINTZ, P.; MANGIN P. Testing human hair for cannabis. *Forensic Sci. Int.*, Amsterdam, v.70, p.175-182, 1995.
- CIRIMELE, V.; SACHS, H.; KINTZ, P.; MANGIN, P. Testing human hair for Cannabis. III. Rapid screening procedure for the simultaneous

identification of delta 9-tetrahydrocannabinol, cannabinol, and cannabidiol. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.1, p.13-16, 1996.

CHIANG, C.N.; RAPAKA, R.S. Pharmacokinetics and disposition of cannabinoids. In: RAPAKA, R.S.; MAKRIVANNIS, A., eds. *Structure-activity relations of the cannabinoids*. Rockville: NIDA, 1987. p.173-188. (NIDA Monograph Series, 79).

CLARK, R.C.; WATSON, D.P. Botany of natural Cannabis medicines. In: GROTENHERMEN, F.; RUSSO, E. *Cannabis e cannabinoids: pharmacology, toxicology and therapeutic potencial*. New York: Haworth Integrative Healing Press, 2002. p.3-13.

CONE, E.J. Mechanisms of drug incorporation into hair. *Ther. Drug Monit.*, Hagerstown, v.18, n.4, p.438-443, 1996.

CONE, E.J. Legal, workplace, and treatment drug testing with alternate biological on a global scale. *Forensic Sci. Int.*, Amsterdam, v.121, p.7-15, 2001.

CHRISTOPHERSEN, A.S.; MORLAND, J. Drug analysis for control purposes in forensic toxicology, workplace testing, sports medicine and related areas. *Pharmacol. Toxicol.*, Copenhagen, v.74, p.202-210, 1994.

DE LA TORRE, R.; SEGURA, J.; DE ZEEUW, R.; WILLIAMS, J. Recommendations for the reliable detection of illicit drugs in urine in the European Union, with special attention to the workplace. *Ann. Clin. Biochem.*, London, v.34, p.339-44, 1997.

DEGENHARDT, L.; HALL, W.; LYNSKEY, M. Exploring the association between cannabis use and depression. *Addiction*, Abingdon, v.98, p.1493-1504, 2003.

DEVEAUX, M.; KINTZ, P.; GOULLÉ, J.; BESSARD, J.; PÉPIN, G.; GOSSET, D. The hair analysis proficiency testing program of the French of

analytical toxicology. *Forensic Sci. Int.*, Amsterdam, v.107, p.389-394, 2000.

DRUMMER, O.H. *The forensic pharmacology of drugs of abuse*. London: Arnold, 2001. p.178-217.

DRUMMER, O.H.; GEROSTAMOULOS, J.; BATZIRIS, H.; CHU, M.; CAPLEHORN, J.R.; ROBERTSON, M.D.; SWANN, P. The incidence of drugs in drivers killed in Australian road traffic crashes. *Forensic Sci. Int.*, Amsterdam, v.134, n.2/3, p.154-162, 2003.

DU PONT, R.L.; BAUMGARTENER, W.A. Drug testing by urine and hair analysis: complementary features and scientific issues. *Forensic Sci. Int.*, Amsterdam, v.70, p.63-76, 1995.

EPSTEIN, D.H.; PRESTON, K.L. Does cannabis use predict poor outcome for heroin-dependent patients on maintenance treatment? Past findings and more evidence against. *Addiction*, Abingdon, v.98, p.269-279, 2003.

EUROPEAN MONITORING CENTRE FOR DRUGS AND DRUG ADDICTION. Publications. Annual Report. PT. *Relatório anual 2004: A evolução do fenómeno da droga na União Europeia e na Noruega*. 2004. 120p. Disponível em: <http://annualreport.emcdda.eu.int/pt/home-pt.html>
Acesso em: 05 abr. 2005.

FOLLADOR, M. J. D. ; YONAMINE, M. ; MOREAU, R. L. M. ; SILVA, O. A. Detection of cocaine and cocaethylene in sweat by solid-phase microextraction and gas chromatography / mass spectrometry. *J. Chromatogr., B*. Amsterdam, v.789, p. 73-78, 2003.

FONT QUER, P. *Plantas medicinales: el dioscórides renovado*. Barcelona: Editorial Labor. 1962. 1036p.

GENTILI, S.; CORNETTA, M.; MACCHIA, T. Rapid screening procedure based on headspace solid-phase microextraction and gas

chromatography-mass spectrometry for the detection of many recreational drugs in hair. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, Amsterdam, v.801, p.289-96, 2004.

GROTENHERMEN, F. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids. *Clin. Pharmacokinet.*, Auckland, v.42, p.327-360, 2003.

GYGI, S.P.; JOSEPH Jr., R.E.; CONE, E.J.; WILKINS D.G.; ROLLINS D.E. Incorporation of codeine and metabolites into hair: role of pigmentation. *Drug Metab. Dispos.*, Bethesda, v.24, p.495-501, 1996.

HALL, W.; MACPHEE, D. Cannabis use and cancer. *Addiction*, Abingdon, v.97, p.243-247, 2002.

HARKEY, M.R. Anatomy and physiology of hair. *Forensic Sci. Int.*, Amsterdam, v.63, n.1/3, p.9-18, 1993.

HENDERSON, G.L. Mechanisms of drug incorporation into hair. *Forensic Sci. Int.*, Amsterdam, v.63, n.1/3, p.19-29, 1993.

HUBBARD, D.L.; WILKINS, D.G.; ROLLINS, D.E. The incorporation of cocaine and metabolites into hair: effects of dose and hair pigmentation. *Drug Metab Dispos.*, Bethesda, v. 28, p.1464-1469, 2000.

JONES, R.T.; BENOWITZ, N.L.; HERNING, R.I. Clinical relevance of cannabis tolerance and dependence. *J. Clin. Pharmacol.*, Thousand Oaks, v.21, p.144S-152S, 1981.

JOSEPH Jr., R.E.; HOLD, K.M.; WILKINS, D.G.; ROLLINS, D.E.; CONE, E.J. Drug testing with alternative matrices. II. Mechanisms of cocaine and codeine deposition in hair. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.23, p.396-408, 1999.

JULIEN, R.M. *A primer of drug action: a concise, nontechnical guide to the actions, uses, and side effects of psychoactive drugs*. 8.ed. New York: W.H. Freeman, 1997. 548p.

- JURADO, C.; GIMENÉZ, M.P.; MENÉNDEZ, M.; REPETTO, M.
Simultaneous quantification of opiates, cocaine and cannabinoids in hair.
Forensic Sci. Int., Amsterdam, v.70, p.165-174, 1995.
- JURADO, C.; RODRIGUEZ-VICENTE, C.; MENÉNDEZ, M.; REPETTO, M.
Time course of cocaine in rabbit hair. *Forensic Sci. Int.*, Amsterdam, v.84,
p.61-66, 1997.
- KALANT, H. Adverse effects of cannabis on health: an update of the
literature since 1996. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry*,
Amsterdam, v.28, p.849-63, 2004. [Review].
- KAUERT, G.; ROHRICH, J. Concentrations of delta 9-tetrahydrocannabinol,
cocaine and 6-monoacetylmorphine in hair of drug abusers. *Int. J. Legal
Med.*, Heidelberg, v.108, n.6, p.294-299, 1996.
- KELLY, R.C.; MIECZKOWSKI, T.; SWEENEY, S.A.; BOURLAND, J.A. Hair
analysis for drugs of abuse. Hair color and race differentials or systematic
differences in drug preferences? *Forensic Sci. Int.*, Amsterdam, v.107,
p.63-86, 2000.
- KIDWELL, D.A.; BLANCO, M.A.; SMITH, F.P. Cocaine detection in a
university population by hair analysis and skin swab testing. *Forensic Sci.
Int.*, Amsterdam, v.84, p.75-86, 1997.
- KIDWELL, D.A.; HOLLAND, J.C.; ATHANASELIS, S. Testing for drugs of
abuse in saliva and sweat. *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.*,
Amsterdam, v.713, n.1, p.111-135, 1998.
- KINTZ, P. Drug testing addicts: a comparison between urine, sweat, hair.
Ther. Drug Monit., Hagerstown, v.18, p.450-455, 1996.
- KINTZ, P. Hair analysis. In: MOFFAT, A.C.; OSSELTON, M.D.; WIDDOP, B.,
eds. *Clarke's analysis of drugs and poisons: in pharmaceuticals, body*

fluids and postmortem material. 3.ed. London: Pharmaceutical Press, 2004. p.124-133.

KINTZ, P.; LUDES, B.; MANGIN, P. Detection of drugs in human hair using Abbott ADx, with confirmation by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). *J. Forensic Sci.*, West Conshohocken, v.37, n.1, p.328-331, 1992.

KINTZ, P.; CIRIMELE, V.; MANGIN, P. Testing human hair for cannabis. II. Identification of THC-COOH by GC-MS-NCI as a unique proof. *J. Forensic Sci.*, West Conshohocken, v.40, n.4, p.619-622, 1995.

KINTZ, P.; MANGIN, P. What constitutes a positive result in hair analysis: proposal for the establishment of cut-off values. *Forensic Sci. Int.*, Amsterdam, v.70, p.3-11, 1995.

KINTZ, P.; SAMYN, N. Use of alternative specimens: drugs of abuse in saliva and doping agents in hair. *Ther. Drug Monit.*, Hagerstown, v.24, p.239-246, 2002.

KLEIN, J.; KARASKOV, T.; KOREN, G. Clinical application of hair testing for drugs of abuse: the Canadian experience. *Forensic Sci. Int.*, Amsterdam, v.107, n.1/3, p.281-288, 2000.

LEMOS, N.P.; ANDERSON, R.A.; ROBERTSON, J.R. Nail analysis for drugs of abuse: extraction and determination of Cannabis in fingernails by RIA and GC-MS. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.23, p.147-152, 1999.

LORD, H.; PAWLISZYN, J. Microextraction of drugs. *J. Chromatogr., A*, Amsterdam, v.902, p.17-63, 2000.

MAGURA, S.; FREEMAN, R.C.; SIDDIQI, Q.; LIPTON, D.S. The validity of hair analysis for detecting cocaine and heroin use among addicts. *Int. J. Addict.*, New York, v.27, p.51-69, 1992.

- McBAY, A.J. Comparison of urine and hair testing for drugs of abuse. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.19, p.201-204, 1995.
- McRAE, A.L.; BUDNEY, A.J.; BRADY, K.T. Treatment of marijuana dependence: a review of the literature. *J. Subst. Abuse Treat.*, New York, v.24, p.369-376, 2003. [Review].
- MIDIO, A.F.; MORAES MOREAU, R.L.; SILVA, O.A. The possibilities of hair analysis in the determination of involuntary doping in sports. *Sports Med.*, Baltimore, v.31, p.321-324, 2001.
- MIECZKOWSKI, T. A research note: the outcome of GC/MS/MS confirmation of hair assays on 93 cannabinoid (+) cases. *Forensic Sci. Int.*, Amsterdam, v.70, n.1/3, p.83-91, 1995.
- MIECZKOWSKI, T. The use of hair analysis for the detection of drugs: an overview. *J. Clin. Forensic Med.*, Edinburgh, v.3, p.59-71, 1996.
- MIECZKOWSKI, T. Assessing the potential of a "color effect" for hair analysis of 11-nor-9-carboxy-delta(9)-tetrahydrocannabinol: analysis of a large sample of hair specimens. *Life Sci.*, Amsterdam, v.74, p.463-469, 2003.
- MILLS, G.A.; WALKER, V. Headspace solid-phase microextraction procedures for gas chromatographic analysis of biological fluids and materials. *J. Chromatogr., A*, Amsterdam, v.902, p.267-287, 2000.
- MOELLER, M.R. Drug detection in hair by chromatographic procedures. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.580, n.1/2, p.125-134, 1992.
- MOELLER, M.R. Hair analysis as evidence in forensic cases. *Ther. Drug Monit.*, Hagerstown, v.18, p.444-449, 1996.
- MOORE, C.; LEWIS, D.; BECKER, J.; LEIKIN, J. The determination of 11-nor-delta-9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid (THCCOOH) in meconium. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.20, p.50-51, 1996.

- MOREAU, R.L.M. Cannabis. In: OGA, S. *Fundamentos de toxicologia*. São Paulo: Atheneu, 1996. p.317-328.
- MUSSHOFF, F.; JUNKER, H.P.; LACHENMEIER, D.W.; KROENER, L.; MAEDA, B. Fully automated determination of cannabinoids in hair samples using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.26, p.554-560, 2002.
- MUSSHOFF, F.; DRIEVER, F.; LACHENMEIER, K.; LACHENMEIER, D.W.; BANGER, M.; MAEDA, B. Results of hair analyses for drug of abuse and comparison with self-reports and urine tests. *Forensic Sci. Int.*, Amsterdam, Article in Press, 2005.
- MUSTY, R.E.; REGGIO, P.; CONSROE, P. A review of recent advances in cannabinoid research and the 1994 International Symposium on Cannabis and the Cannabinoids. *Life Sci.*, Amsterdam, v.56, p.1933-1940, 1995.
- NAKAHARA, Y. Hair analysis for abused and therapeutic drugs. *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.*, Amsterdam, v.733, n.1/2, p.161-180, 1999a.
- NAKAHARA, Y. The effects of physiochemical factors on incorporation of drugs into hair and behavior of drugs hair root. In: MIECZKOWSKI, T. *Drug testing technology: assessment of field applications*. Boca Raton: CRC Press, 1999b. p.49-72.
- O'BRIEN, C.P. Drug addiction and drug abuse. In: HARDMAN, J.G.; LIMBERD, L.E.; GILMAN, A.G.; GOODMAN, L.S.; RALL, T.W.; MURAD, F. *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 10.ed. New York: MacGraw Hill, 2001. p.621-644.

- OFFIDANI, C.; STRANO-ROSSI, S.; CHIAROTTI, M. Drug distribution in the head, axillary and pubic hair of chronic addicts. *Forensic Sci. Int.*, Amsterdam, v.63, n1/3, p.171-174, 1993.
- OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K. Farmacognosia. São Paulo: Atheneu, 1991. p.402-405.
- OVIEDO, A.; GLAM, J.; HERKENHAM, M. Chronic cannabinoid administration alters cannabinoid receptor binding in rat brain: a quantitative autoradiographic study. *Brain Res.*, Amsterdam, v.616, p.293-302, 1993.
- PEAT, M.; DAVIS, A. Analytical considerations and approaches for drugs. In: KARCH, S.B., ed. *Drug abuse handbook*. Boca Raton, London: CRC Press, 1998. p.751-764.
- PEREZ-REYES, M. Marijuana smoking: factors that influence the bioavailability of tetrahydrocannabinol. In: CHIANG, C.N.; HAWKS, R.L., eds. *Research findings on smoking of abused substances*. Rockville: NIDA, 1990. p.42-62. (NIDA Monograph Series, 99).
- PÖTSCH, L.; SKOPP, G.; MOELLER, M.R. Biochemical approach on the conservation of drug molecules during hair fiber formation. *Forensic Sci. Int.*, Amsterdam, v.84, p.25-35, 1997.
- RAMAEKERS, J.G.; BERGHAUS, G.; VAN LAAR, M.; DRUMMER, O.H. Dose related risk of motor vehicle crashes after cannabis use. *Drug Alcohol Depend.*, Amsterdam, v.73, p.109-119, 2004.
- REINHARDT, V.E.D. *Aspectos da análise toxicológica forense para identificação de usuários de Cannabis*. São Paulo, 1993. 133p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

- REINHARDT, V.E.D.; MIDIO, A.F. Características botânicas, químicas e produtos obtidos da *Cannabis*. *Rev. Farm. Bioquim. Univ. São Paulo*, São Paulo, v.29, p.55-61, 1993.
- RIVIER, L. Is there place for hair analysis in doping controls? *Forensic Sci. Int.*, Amsterdam, v.107, p.309-323, 2000.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim. Nova*, São Paulo, v.27, n.5, p.771-780, 2004.
- RIBEIRO, M.; MARQUES, A.C.P.R. Maconha: abuso e dependência. In: LARANJEIRA, R., coord. *Usuários de substâncias psicoativas: abordagem, diagnóstico e tratamento*. São Paulo: Conselho Regional de Medicina do Estado de São Paulo, 2002. 119p.
- RODRÍGUEZ DE FONSECA, F.; GORROTI, M.; FERNANDÉZ-RUIZ, J.J.; PALOMO, T.; RAMOS, J.A. Down-regulation of rat brain cannabinoid binding sites after chronic delta-9-tetrahydrocannabinol treatment. *Pharmacol., Biochem. Behav.*, New York, v.47, p.33-40, 1994.
- ROTH, M.D.; MARQUES-MAGALLANES, J.A.; YUAN, M.; SUN, W.; TASHKIN, D.P.; HANKINSON O. Induction and regulation of the carcinogen-metabolizing enzyme CYP1A1 by Marijuana smoke and Δ^9 -Tetrahydrocannabinol. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, New York, v.24, p.339-344, 2001.
- SACHS, H. History of hair analysis. *Forensic Sci. Int.*, Amsterdam, v.84, p.7-16, 1997.
- SACHS, H.; KINTZ, P. Testing for drugs in hair: critical review of chromatographic procedures since 1992. *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.*, Amsterdam, v.713, p.147-161, 1998.

- SILVA, J.O. *Determinação dos teores de delta-9-tetraidrocanabinol em amostras de Cannabis sativa L. por microextração em fase sólida e cromatografia gasosa/espectrometria de massa*. São Paulo, 2004. 82p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
- SILVA, O.A.; YONAMINE, M. Drug abuse among workers in Brazilian regions. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo, v. 38, p. 552-556, 2004.
- SLAWSON, M.H.; WILKINS, D.G.; FOLTZ, R.L.; ROLLINS, D.E. Quantitative determination of phencyclidine in pigmented and nonpigmented hair by ion-trap mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.20, p.350-354, 1996.
- SMITH, N.T. A review of the published literature into cannabis withdrawal symptoms in human, users. *Addiction*, Abingdon, v.97, p.621-632, 2002.
- STAUB, C. Chromatographic procedures for determination of cannabinoids in biological samples, with special attention to blood and alternative matrices like hair, saliva, sweat and meconium. *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.*, Amsterdam, v.733, p.119-126, 1999.
- SOARES-WEISER, K.; WEISER, M.; DAVIDSON, M. Uso de maconha na adolescência e risco de esquizofrenia. *Rev. Bras. Psiquiatr.*, São Paulo, v.25, p.131-132, 2003.
- SOCIETY of hair testing. *Forensic Sci. Int.*, Amsterdam, v.84, n.1/3, p.3-6, 1997.
- SOLINAS, M.; PANLILIO, L.V.; GOLDBERG, S.R. Exposure to delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) increases subsequent heroin taking but not heroin's reinforcing efficacy: a self-administration study in rats. *Neuropsychopharmacology*, New York, v.29, p.1301-1311, 2004.

- SOUBHIA, P.C. *Período de detecção de canabinóides urinários por imunofluorescência polarizada em população usuária de Cannabis*. São Paulo, 1999. 80p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
- SPORKET, F.; PRAGST, P. Use of headspace solid-phase micropextraction (HS-SPME) in hair analysis for organic compounds. *Forensic Sci. Int.*, Amsterdam, v.107, p.129-148, 2000.
- STEFANIDOU, M.; DONA, A.; ATHANASELIS, S.; PAPOUTSIS, I.; KOUTSELINIS, A. The cannabinoid content of marijuana samples seized in Greece and its forensic application. *Forensic Sci. Int.*, Amsterdam, v.957, p.153-162, 1998.
- STRANO-ROSSI, S.; CHIAROTT, M. Solid phase microextraction for cannabinoids analysis in hair and its possible application to other drugs. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.23, p.7-10, 1999.
- THORSPECKEN, J.; SKOPP, G.; PÖTSCH, L. *In vitro* contamination of hair by marijuana smoke. *Clin. Chem.*, Washington, v.50, p.596-602, 2004.
- TOLEDO, F.C.P. *Identificação de benzoilecgonina por imunofluorescência polarizada em cabelo de usuários de cocaína*. São Paulo, 1999. 97p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
- TURNER, C.E. Chemistry in metabolism. In: PETERSEN, R.C., ed. *Marijuana research: 1980*. Rockville: NIDA, 1980. p.81-97. (NIDA Monograph Series, 31).
- UHL, M. Determination of drugs in hair GC/MS/MS. *Forensic Sci. Int.*, Amsterdam, v.84, p.281-294, 1997.

- UHL, M.; SACHS, H. Cannabinoids in hair: strategy to prove marijuana/hashish consumption. *Forensic Sci. Int.*, Amsterdam, v.29, p.143-147, 2004.
- ULRICH, S. Solid-phase microextraction in biomedical analysis. *J. Chromatogr., A*, Amsterdam, v.902, p.167-194, 2000.
- UNITED NATIONS OFFICE ON DRUG AND CRIME. *2004 World drug report: analysis*. S.I.: United Nations Publication, 2004. v.1, 210p. Disponível em: http://www.unodc.org/pdf/WDR_2004/volume_1.pdf Acesso em: 17 dez. 2004.
- UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Substance Abuse and Mental Health Services Administration. *Overview of findings from the 2003, National Survey on Drug Use and Health*. 2003. 45p. Disponível em: <http://www.drugabusestatistics.samhsa.gov/NHSDA/2k3NSDUH/2k3OverviewW.pdf>. Acesso em: 05 abr. 2005.
- VAN OS, J.; BAK, M.; HANSSEN, M.; BIJL, R.V.; DE GRAAF, R.; VERDOUX, H. Cannabis use and psychosis: a longitudinal population-based study. *Am. J. Epidemiol.*, Baltimore, v.156, n.4, p.319-327, 2002.
- VAS, G., VEKEY, K. Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *J. Mass Spectrom.*, Chichester, v.39, p.233-254, 2004. [Review].
- VERSTRAETE, A.G. Detection times of drugs of abuse in blood, urine, and oral fluid. *Ther. Drug Monit.*, Hagerstown, v.26, p.200-205, 2004. [Review].
- VOTH, E.A.; SCHWARTZ, R.H. Medicinal applications of delta-9-tetrahydrocannabinol and marijuana. *Ann. Intern. Med.*, Philadelphia, v.126, n.10, p.791-798, 1997.

- WENNIG, R. Potential problems with the interpretation of hair analysis results. *Forensic Sci. Int.*, Amsterdam, v.107, p.5-12, 2000.
- WIESBECK, G.A.; SCHUCKIT, M.A.; KALMIJN, J.A.; TIPP, J.E.; BUCHOLZ, K.K.; SMITH, T. An evaluation of the history of a marijuana withdrawal syndrome in a large population. *Addiction*, Abingdon, v.91, p.1469-1478, 1996.
- WILKINS, D.; HAUGHEY, H.; CONE, E.; HUESTIS, M.; FOLTZ, R.; ROLLINS, D. Quantitative analysis of THC, 11-OH-THC, and THCCOOH in human hair by negative ion chemical ionization mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.19, n.6, p.483-491, 1995.
- WILKINS, D.G.; VALDEZ, A.S.; NAGASAWA, P.R.; GYGI, S.P.; ROLLINS, D.E. Incorporation of drugs for the treatment of substance abuse into pigmented and nonpigmented hair. *J. Pharm. Sci.*, Hoboken, v.87, p.435-440, 1998.
- WILKINSON, J.B.; MOORE, R.J. *Cosmetología de Harry*. Madrid: Díaz de Santos, 1990. p.441-474.
- WILLIAMSON, E.M.; EVANS, F.J. Cannabinoids in clinical practice. *Drugs*, Auckland, v.60, p.1303-1314, 2000. [Review].
- WONG, A. *Cocaína/crack, canabinóides, anfetaminas e opiáceos no cabelo, urina e mecônio de recém-nascidos de baixo peso e a correlação destes no cabelo e urina das mães*. São Paulo, 2001. 141p. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina – Universidade de São Paulo.
- YONAMINE, M. *Derivação de benzoliecgonina urinária com diazometano para verificação da exposição à cocaína por técnicas cromatográficas*. São Paulo, 2000. 96p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

YONAMINE, M.; TAWIL, N.; MOREAU, R.L.; SILVA, O.A. Solid-phase micro-extraction-gas chromatography-mass spectrometry and headspace-gas chromatography of tetrahydrocannabinol, amphetamine, methamphetamine, cocaine and ethanol in saliva samples. *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, Amsterdam, v.789, p.73-78, 2003.

YONAMINE, M. Saliva como espécime biológico para monitorar o uso de álcool, afetamina, metanfetamina, cocaína e maconha por motoristas profissionais. São Paulo, 2004. (Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo).

Anexos

9. ANEXO A

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Ofício CEP nº 114/2004

São Paulo, 09 de novembro de 2004.

Ilmo(a). Sr(a).
Carolina Dizioli Rodrigues de Oliveira

Vimos informar que o Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 08 de novembro p.p., **APROVOU** o projeto "Determinação e estudo da incorporação de canabinóides em cabelo de usuários de *Cannabis* utilizando a técnica de IIS-SPME-GC/MS" (Protocolo nº 260) apresentado por Vossa Senhoria.

Lembramos que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 18 – item C, da Portaria FCF-111/97.

Atenciosamente,

Prof. Dr.ª Valentina Porta
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa da FCF/USP,

Orientador: Prof. Regina Lúcia de Moraes Moreau
FBC

ANEXO B

LABORATÓRIO DE ANÁLISES TOXICOLÓGICAS-FCF/USP

PROCEDIMENTO PARA COLETA DE CABELO

INSTRUÇÕES PARA O RESPONSÁVEL PELA COLETA

1. Verificar a identidade do doador através de documento oficial.
2. Com o auxílio de uma tesoura, corte uma mecha de cabelo com diâmetro de aproximadamente 6mm (mais ou menos a espessura de um lápis), o mais próximo possível da raiz, da região do vértice posterior da cabeça.
3. Acondicionar cada uma das partes no saco plástico existente no envelope do seguinte modo:
 - Retirar o papel cartão com o lacre numerado do saco plástico.
 - Retirar o papel protetor da fita adesiva do plástico e colar a extremidade do cabelo mais próxima à raiz neste adesivo.

- Retirar o papel protetor do lacre numerado.
 - Dobrar cuidadosamente o plástico ao meio de forma que este envolva e proteja a amostra, colando também o lacre numerado no papel.
 - Colocar o papel com a amostra de cabelo dentro do saco plástico.
 - Retirar o papel protetor do adesivo da aba do saco plástico.
 - Dobrar a aba, fechando o saco plástico.
4. Colocar o saco plástico com a amostra no envelope.
 5. Anotar no **Questionário** os medicamentos utilizados a longo prazo e a finalidade da análise.
 6. No **Questionário** colocar a data, a hora, o nome e assinar no local responsável pela coleta. **Não colocar o nome do doador da amostra no Questionário.**
 7. Lacrar o envelope e enviar para o Laboratório.

ANEXO C**QUESTIONÁRIO**Amostra nº **XXX****1. Dados pessoais:**

- Idade:.....anos
- Sexo: () Masculino () Feminino

2. Quando usou maconha pela última vez?

- () Últimas 12 horas
- () Entre 12 e 24 horas
- () Entre 24 e 48 horas
- () Entre 48 e 72 horas
- () Mais de 72 horas. Quando? _____

3. Quando usou maconha pela penúltima vez?

- () Últimas 24 horas
- () Há 1 semana
- () Há 15 dias
- () Há 1 mês
- () Há mais de 1 mês. Quando? _____

4. Que quantidade foi consumida no último uso de maconha?

_____ cigarros.

5. Que quantidade foi consumida no penúltimo uso de maconha?

_____ cigarros.

6. Qual a frequência de uso?

_____ cigarros/dia _____ cigarros/ semana

Outros? Qual? _____

7. Há quanto tempo faz utilização com esta frequência?

8. Utiliza outras drogas? Quais?

9. Cor do cabelo:

() Branco

() Castanho claro

() Preto

() Loiro

() Grisalho

() Ruivo

() Castanho escuro

() Outro. Qual? _____

() Castanho médio

10. Fez algum tratamento cosmético no último mês?

() Sim

() Não

Se a resposta foi sim, qual? (* exemplos de tratamento: tingimento, alisamento, permanente...) _____

11. Comentários:

AMOSTRA	DATA DA COLETA	OBSERVAÇÃO
C1		C1
U1		U1
U2		U2
C2		C2
U3		U3

ANEXO D

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU LEGAL RESPONSÁVEL

1. Nome :

.....

Documento de Identidade Nº :.....Sexo: ()M ()F

Data de Nascimento:...../...../.....

Endereço:.....Nº:.....Apto:.....

Bairro:.....Cidade:.....

CEP:.....Telefone:.....

2. Responsável legal:

.....

Natureza (grau de parentesco, tutor, curador,
etc.):.....

Documento de Identidade Nº:.....Sexo: ()M ()F

Data de Nascimento:...../...../..... Tel:.....

Endereço:.....Nº:.....Apto:.....

Bairro:.....Cidade:.....CEP:.....

II – DADOS SOBRE A PESQUISA

1. Título do Protocolo de Pesquisa: *"Determinação e estudo da incorporação de canabinóides em cabelo de usuários de maconha por HS-SPME-GC/MS"*

2. Pesquisadora: Carolina Dizioli Rodrigues de Oliveira.

Cargo/Função: Farmacêutica-Bioquímica.

Inscrição Conselho Regional Nº 33.453

Departamento FCF/USP: Análises Clínicas e Toxicológicas.

3. Avaliação do risco da pesquisa:

Sem Risco () Risco Mínimo (x) Risco Médio ()
 Risco Baixo () Risco Maior ()

Obtenção de amostra de urina e cabelo consideradas não invasivas.

**III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO SUJEITO
 DA PESQUISA OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE
 A PESQUISA CONSIGNANDO:**

Esta pesquisa tem o objetivo de padronizar uma metodologia para a determinação de canabinóides no cabelo uma vez que no Brasil esta análise não é realizada. Trará benefícios no sentido de ajudar no esclarecimento de casos onde é necessário comprovar o uso de Cannabis realizado meses atrás

O voluntário irá fornecer amostra de urina, coletada em frasco plástico fornecido pela pesquisadora responsável, este tipo de coleta não apresenta risco ou desconforto para o voluntário, por se tratar de um procedimento seguro e não invasivo. O voluntário irá fornecer também amostra de cabelo, coletada em kit e procedimento fornecido pela pesquisadora responsável.

**IV – ESCLARECIMENTOS DADO PELO PESQUISADOR SOBRE
 GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA**

1. Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
2. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
3. Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.

**V – INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS
 RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA:**

Pesquisadoras responsáveis: Prof^a. Dr^a. Regina Lúcia de Moraes Moreau
 Carolina Dizioli Rodrigues de Oliveira

Endereço: Universidade de São Paulo
 Faculdade de Ciências Farmacêuticas
 Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - São Paulo - SP
 CEP: 05508-900
 Fone: 3091-2194 / 3031-9055

VI – OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

.....
.....
.....
.....
.....
.....

VII – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, ____ de _____ de _____.

Assinatura do sujeito de pesquisa
ou responsável legal

Assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)