

VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE CANABINÓIDES EM URINA UTILIZANDO CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Jordana Quaglia Pereira da Silva (PIBIC/FA/UEM), Kleber Ota de Oliveira, Simone Aparecida Galerani Mossini (Orientadora), e-mail: sagmossini@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde / Maringá, PR.

Área e subárea: Ciências da Saúde / Farmácia / Toxicologia

Palavras-chave: Cannabis, Validação, CG-EM

Resumo

A *cannabis* é uma droga ilícita, psicoativa, de amplo consumo devido à grande oferta e disponibilidade. Sendo assim, é recorrente encontrar resíduos metabólicos desta substância em amostras clínicas. A concentração do seu composto principal, Δ 9-Tetrahydrocannabinol (Δ 9-THC), é a maior responsável por seus efeitos psicológicos, sendo estes, potencializados quando o uso é em conjunto de outras substâncias como o álcool e cocaína, levando a uma maior probabilidade de ocorrência de acidentes. Diante disso, torna-se importante a detecção de Δ 9-THC-COOH na urina, produto de biotransformação mais abundante da *cannabis*. À vista disto, o objetivo deste projeto foi a validação de um método eficaz – de acordo com critérios estabelecidos pela ANVISA - para a detecção de *cannabis* e subprodutos de biotransformação em matriz biológica usando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

Introdução

A planta *Cannabis sativa*, popularmente conhecida como “maconha”, é amplamente disseminada em contexto mundial. O desconhecimento do senso comum sobre seus efeitos maléficos como a capacidade de intoxicação de 6 meses após o uso podendo gerar transtornos psicóticos graves como esquizofrenia (APDM, 2015).

O desenvolvimento de técnicas que tornem possível a determinação da presença de substâncias no organismo são cada vez mais estudadas por pesquisadores utilizando diversas matrizes biológicas.

Um dos principais órgãos responsáveis pela validação de métodos de detecção de substâncias psicoativas no Brasil é a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) a qual fornece critérios específicos para aprovação da técnica. Diante do exposto, este projeto teve como objetivo a validação de metodologia para análise de canabinóides em urina utilizando técnica de Cromatografia em fase Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas.

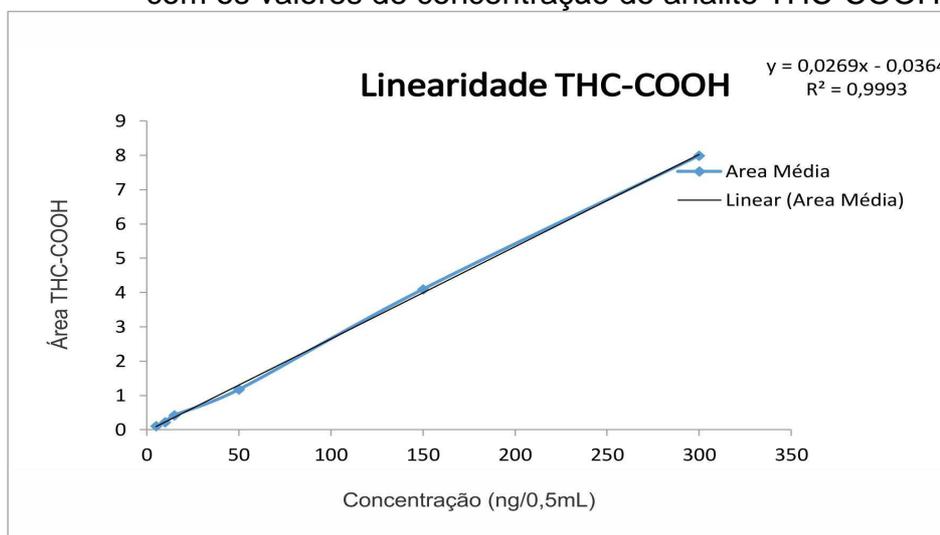
Materiais e métodos

A matriz biológica utilizada como amostra foi a urina devido sua facilidade de obtenção e armazenamento. Para o pré-tratamento da amostra foi utilizada a técnica de extração líquido-líquido, onde foram retirados possíveis interferentes como proteínas e sais. Os procedimentos de validação analítica da técnica foram realizados utilizando o equipamento Cromatógrafo Gasoso Focus CG, acoplado a um Espectrômetro de Massas (CG-EM) DSQ II, ambos da marca ThermoScientific (EUA), com coluna capilar para cromatografia a gás HP-5MS e injetor Triplus AS. Para o processo de validação da técnica analítica foram analisados os parâmetros de linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), ensaios de recuperação e estabilidade, segundo normas da ANVISA. Estudo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos/UEM (CAAE nº 06218713.0.0000.0104, parecer nº 458.185).

Resultados e Discussão

Obteve-se como coeficiente de determinação (r^2): 0,9993, equação de regressão linear, $y = 0,0269x - 0,0364$ para THC-COOH (figura 1), o que nos permitiu concluir que o ensaio de linearidade possui um resultado satisfatório de acordo com parâmetros pré-estabelecidos da ANVISA (2012).

Figura 1 – Gráfico do parâmetro de linearidade obtido a partir da equação de reta com os valores de concentração do analito THC-COOH



Os ensaios para os parâmetros de precisão intra e interensaio mostraram-se satisfatórios, adequados às normas preconizadas pelos órgãos de fiscalização, sendo eles menores que 20% em baixas concentrações do analito e nas concentrações médias e altas, menores que 15% (tabela 1).

Tabela 1 - Parâmetros analíticos do método de detecção e quantificação de maconha e produtos de biotransformação, avaliados por ELL/CG-EM*

ANALITO	THC - COOH
Recuperação (%)	73,5 a 85,2%
Precisão Intraensaio (CV%)	
CB	3,66%
CM	4,46%
CA	9,04%
Precisão Interensaio (CV%)	
CB	3,38%
CM	6,01%
CA	8,96%
LOD (ng/mL) (CV%)	15 (CV: 2,17%)
LOQ (ng/mL) (CV%)	10 (CV: 2,63%)

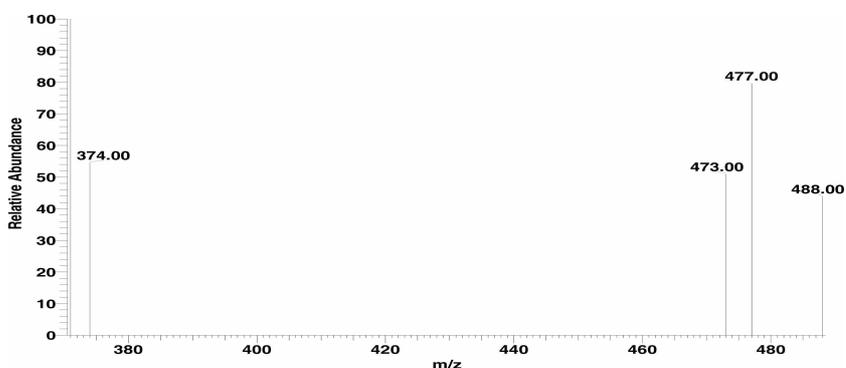
*ELL/CG-EM: Extração Líquido-Líquido/Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massas
THC-COOH: CB: Controle Baixo: 10ng/mL, CM: Controle Médio: 40ng/mL, CA: Controle Alto: 100ng/mL. CV: coeficiente de variação; LOQ: limite de quantificação; LOD: limite de detecção.

LOD e LOQ obtidos no experimento (tabela 1) são coerentes com o método realizado, com valores que se enquadram dentro dos padrões determinados por órgãos internacionais, como o Grupo de Trabalho de Especialistas em Toxicologia da União Europeia.

O método de extração apresentou índices de recuperação média que variam entre 73,5 a 85,2% para o THC-COOH (tabela 1). De acordo com as normas estabelecidas, valores de recuperação entre 70 a 120% são aceitáveis, desde que o método em questão se mostre preciso e exato, além de apresentar valores de LOD e LOQ dentro dos parâmetros previstos para a técnica de extração.

A espectrometria de massas é essencial e efetiva para a identificação dos fragmentos (m/z) como é possível observar na Figura 2, onde temos o pico de 374,0 e 477,0 atribuídos ao analito THC-COOH.

Figura 2 - Espectros de massas do THC-COOH em urina



*Amostra de referência positiva com íon (m/z) quantificador e qualificadores do THC-COOH (374,00/477,00).

Além disso, a partir dos valores encontrados na literatura, é possível a confirmação da presença da substância na amostra (TSADIK, 2007).

Conclusões

A técnica de extração líquido-líquido seguida da avaliação por CG-EM, mostrou-se eficaz diante dos resultados encontrados, para análise de THC-COOH em amostras de urina. Os resultados obtidos se enquadram nos valores de referência analisados e todas as análises seguiram critérios pré-estabelecidos pelos órgãos responsáveis.

Agradecimentos

Ao Decit/SCTIE/MS; CNPq; Fundação Araucária e SESA-PR pelo apoio e financiamento. À Fundação Araucária (FA/UEM) pela concessão de bolsa.

Referências

ANVISA. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Resolução – RE nº 899 de 27 de maio de 2012. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2012; P. 1–25.

SPDM, Associação Paulista para o Desenvolvimento da Medicina. Maconha e “novas” psicoses, 2015. Disponível em: <<https://www.spdm.org.br/blogs/alcool-e-drogas/item/1427-maconha-e-%E2%80%98novas%E2%80%99-psicoses>> Acessado em: 15 de julho de 2018.

TSADIK, T.A. et al. Simultaneous CG-EI-MS determination of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol, and 11-Hydroxy- Δ^9 -Tetrahydrocannabinol, and 11-nor-9-Carboxy- Δ^9 -Tetrahydrocannabinol in Human Urine Following Tandem Enzyme-Alkaline Hydrolysis. **Jornal de Toxicologia Analítica**, Vol. 31 Outubro, 2007.

YANG, R.Q.; XIE, W.L. Determination of cannabinoids in biological samples using a new solid phase micro-extraction membrane and liquid chromatography – mass spectrometry. **Forensic Science International**, 135-39, 2006.