



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

**Determinação de Tetrahydrocannabinol e principais
metabólitos em amostras de plasma com recurso à
microextração em seringa empacotada e análise
por cromatografia gasosa acoplada a um detetor
de espectrometria de massa em tandem.
Experiência Profissionalizante na Vertente de Farmácia
Comunitária, Hospitalar e Investigação**

Luís Miguel Loureiro Fernandes

Relatório de Estágio para a obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Farmacêuticas
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Professora Doutora María Eugenia Gallardo Alba
Co-orientador: Doutor Mário Jorge Dinis Barroso
Co-orientador: Mestre Beatriz Marques da Fonseca

Covilhã, Outubro de 2013

Folha em branco

Dedicatória

Aos meus Pais.

Às minhas Irmãs.

Ao meu pequeno grande sobrinho.

À minha Família.

Amo-vos!

Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar às pessoas que me prestaram o maior auxílio nesta longa caminhada, Professora Eugénia, Doutor Mário, Beatriz e Ivo.

À Professora Eugenia e ao Doutor Mário agradeço a disponibilidade, a simpatia, os conhecimentos partilhados e os conselhos que tornaram esta tese realidade. Sem vós, nenhuma destas cento e poucas páginas estaria hoje escrita

Ao Ivo agradeço a ajuda prestada em laboratório, és o maior do Cics!

Beatriz, a ti agradeço tudo. A paciência e dedicação que demonstraste para comigo, não são para toda a gente. Foste sem sombra de dúvidas a pedra mais que fundamental na construção deste trabalho. Por não me teres deixado desistir, o meu obrigado.

Por fim, e não menos importante, aos meus amigos. Em primeiro lugar, aos de sempre e para sempre. Patrick, Anita, Marisa, Tânia, Alexandra, Fábio, Filipe, André, Cristiano, Ricardo, Rafael e demais. O que eu sou, também a vós o devo.

Aos meus amigos de faculdade, nunca vos esquecerei. Pedro, Ana, Alexandre, a Covilhã sabe das nossas vidas.

Aos que agora chegam. Que fiquem por muito tempo.

A Deus.

Resumo

A presente dissertação de mestrado encontra-se dividida em três capítulos. No primeiro e segundo capítulo encontram-se descritos os estágios realizados, respetivamente, em farmácia comunitária e farmácia hospitalar. São referidas as principais atividades desenvolvidas e funções assumidas no Hospital Sousa Martins e na Farmácia Tavares, com destaque para a importância crescente do farmacêutico em equipas multidisciplinares de saúde e como agente de promoção de saúde pública.

No terceiro capítulo encontra-se descrito o trabalho de investigação desenvolvido no Centro de Investigação em Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior.

A *cannabis* é a droga ilícita mais disponível e mais consumida a nível mundial, como tal torna-se necessário dotar os laboratórios de metodologias mais céleres e eficazes de forma a identificar e quantificar estas substâncias psicoativas. O objetivo do trabalho de investigação foi o desenvolvimento e validação de um método analítico usando microextração em seringa empacotada e cromatografia gasosa acoplada à espetrometria de massa em tandem, para a determinação e quantificação do delta-9-tetrahydrocannabinol, 11-hidroxi- delta-9-tetrahydrocannabinol e 11-nor-9-carboxi-delta-9-tetrahydrocannabinol em amostras de plasma humano. É de salientar que esta é a primeira vez que estes compostos são determinados em amostras de plasma com recurso à microextração em seringa empacotada.

A elevada quantidade de interferentes biológicos existentes na matriz torna a preparação das amostras um passo fundamental no processo analítico. Desta forma procedeu-se à otimização da técnica extrativa usando o planeamento fatorial, uma ferramenta estatística aplicada ao processo de decisão e que avalia de forma multivariada os fatores intervenientes na extração. As condições finais otimizadas foram: diluição da amostra (1:20), número de aspirações pelo dispositivo (26), quantidade de ácido acético numa solução de lavagem (3%), quantidade de metanol noutra solução de lavagem (5%) e quantidade de hidróxido de amónio na solução de eluição (10%).

O método foi validado seguindo critérios internacionais e os parâmetros estudados incluíram linearidade, seletividade, limites de deteção (LOD) e quantificação (LLOQ), precisão e exatidão. O procedimento foi linear para o intervalo de concentrações de 0,1 (limite inferior de quantificação - LLOQ) até 30 ng/mL, com coeficientes de determinação (R^2) superiores a 0,99 para todos os analitos. Precisão intra- e inter-dia foram tipicamente inferiores a 15% para todos os analitos a todas as concentrações estudadas, enquanto a exatidão se situou dentro do intervalo de $\pm 15\%$. As recuperações variaram entre 53% e 78%.

O método validado mostrou ser aplicável à análise de amostras reais, sendo então uma ferramenta vantajosa não só no âmbito de análises de toxicologia clínica e forense, mas também em análises de despiste de consumo de *cannabis* e derivados.

Palavras-chave

Farmácia comunitária; Farmácia Hospitalar; Microextração em seringa empacotada; Canabinóides; GC-MS/MS.

Abstract

This Master thesis is divided into three chapters. In the first and second chapters the conducted internships are described, respectively, in community pharmacy and hospital pharmacy. Here the main activities developed and duties undertaken at Hospital Sousa Martins and at Farmácia Tavares are referred, with emphasis to the growing importance of the pharmacist in multidisciplinary health care teams and as a promoting agent of public health.

The third chapter describes the investigation work developed at Centro de Investigação em Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior.

Cannabis is the most available and consumed illegal drug worldwide, accordingly it becomes necessary to provide laboratories with more prompt and effective methodologies to identify and quantify these psychoactive substances. The goal of this research work was the development and validation of an analytic method using microextraction by packed sorbent and gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry, for determination and quantification of delta-9-tetrahydrocannabinol, 11-hydroxi-delta-9-tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-carboxi-delta-9-tetrahydrocannabinol in human plasma samples. It should be noted that this is the first time that these compounds are determined in plasma samples through microextraction by packed sorbent.

The high quantity of existing interfering compounds in biological matrices makes sample preparation the fundamental step in the analytic process. Thus the optimization of the extractive technique using factorial design, a statistic tool applied to the decision process and which evaluates the extraction factors in a multivaried way. The final optimized conditions were: dilution of the sample (1:20), number of strokes (26), amount of acetic acid in a washing solution (3%), amount of methanol in another washing solution (5%) and amount of ammonium hydroxide in the elution solution (10%).

The method was validated following international criteria and the studied parameters included linearity, selectivity, limits of detection (LOD) and quantification (LLOQ), precision and accuracy. The procedure was linear for concentrations ranging from 0.1 (lower limit of quantification - LLOQ) to 30 ng/mL, with determination coefficients (R^2) higher than 0.99 for all analytes. Intra- and inter-day precisions were typically lower than 15% for all analytes at all studied concentrations, while the accuracy remained between a $\pm 15\%$ interval. Recoveries ranged from 53% to 78%.

The method was shown to be applicable to real samples, therefore being a powerful tool not only within clinical and forensic toxicology, but also assessing *cannabis* and derived products consumption.

Keywords

Community pharmacy; Hospital pharmacy; Microextraction by packed sorbent; Cannabinoids; GC-MS/MS.

Índice

Resumo	vii
Palavras-chave	viii
Abstract	ix
Keywords	x
Lista de Figuras	xv
Lista de Tabelas	xvii
Parte I	1
Introdução	3
1. Organização da Farmácia	3
1.1 - Localização, espaço físico e divisões funcionais	3
1.2 - Recursos humanos	4
1.3 - Equipamentos e Material	5
1.4 - Sistema informático	5
2. Informação e documentação científica	6
2.1 - Biblioteca da farmácia e centros de informação	6
3. Medicamentos e outros produtos de Saúde	6
3.1 - Medicamentos de uso humano	6
3.2 - Medicamentos genéricos	7
3.3 - Psicotrópicos e estupefacientes	7
3.4 - Medicamentos Manipulados	7
3.5 - Medicamentos Homeopáticos	8
3.6 - Medicamentos à base de plantas	8
4. Aprovisionamento e armazenamento	8
4.1 - Gestão de <i>stocks</i> . Pedidos, receção e devoluções de encomendas	8
4.1.1 - Gestão de <i>stocks</i>	8
4.1.2 - Pedidos de encomendas	9
4.1.3 - Receção de encomendas	9
4.1.4 - Devoluções de encomendas	10
4.2 - Armazenamento	11
5. Interação Farmacêutico-Utente-Medicamento	12
6. Dispensa de medicamentos	12
6.1 - Dispensa de medicamentos sujeitos a receita médica	13
6.2 - Vendas suspensas	14
6.3 - Dispensa de psicotrópicos	15
6.4 - Dispensa de medicação não sujeita a receita médica (MNSRM)	16
7. Automedicação	16
8. Indicação farmacêutica	17
9. Aconselhamento e dispensa de outros produtos de saúde	17

9.1 - Produtos de dermofarmácia, cosmética e higiene	18
9.2 - Produtos dietéticos para alimentação especial	19
9.3 - Fitoterapia e suplementos nutricionais (nutracêuticos)	19
10. Medicamentos de uso veterinário	20
11. Dispositivos médicos	21
12. Outros cuidados de saúde prestados na Farmácia Tavares	22
13. Preparação de medicamentos	23
13.1 - Medicamentos manipulados	23
13.2 - Preparação extemporânea de especialidades farmacêuticas	25
14. Processamento do receituário e faturação de entidades participadoras	26
14.1 - Separação e conferência de receituário	26
14.2 - Emissão do verbete de identificação do lote	27
15. Formações	28
Considerações finais	29
Referências bibliográficas	31
Parte II	33
Introdução	35
1. Caracterização da ULS da Guarda, E.P.E.	35
2. Os Serviços Farmacêuticos da ULS da Guarda, E.P.E	36
2.1 - Localização e Caracterização	36
3. Organização e gestão dos Serviços Farmacêuticos	37
3.1 - Gestão de recursos humanos	37
3.2 - Gestão de existências	37
3.3 - Sistemas e critérios de seleção e aquisição	38
3.4 - Receção e conferência de produtos adquiridos	39
3.5 - Armazenamento	40
4. Distribuição	40
4.1 - Distribuição clássica	41
4.2 - Reposição de <i>stocks</i> nivelados	42
4.3 - Distribuição em dose unitária	42
4.4 - Distribuição a doentes em regime de ambulatório	43
4.5 - Distribuição de medicamentos sujeitos a legislação restritiva	44
4.5.1 - Estupefacientes, psicotrópicos e benzodiazepinas	44
4.5.2 - Hemoderivados	45
5. Produção e controlo	45
5.1 - Farmacotecnia	46
5.1.1 - Preparação de Formas Farmacêuticas não estéreis	46
5.1.2 - Reembalagem de doses unitárias sólidas	47
5.1.3 - Preparações citotóxicas individualizadas	48
6. Informação	49
7. Farmacovigilância	49
8. Ensaio clínicos	50

9. Nutrição assistida	51
9.1 - Nutrição entérica	51
9.2 - Nutrição Parentérica	52
10. Farmacocinética clínica	53
11. Acompanhamento da visita médica	53
12. Atividades farmacêuticas na enfermaria	54
13. Comissões Técnicas	54
Considerações finais	57
Referências Bibliográficas	59
Parte III	61
1. Revisão da Literatura	63
1.1 - <i>Cannabis</i>	63
1.1.1 - Formas de apresentação	63
1.1.2 - Formas de consumo	64
1.2 - Canabinóides	64
1.2.1 - Farmacocinética	65
1.2.1 - Farmacologia e farmacodinâmica	67
1.3 - Efeitos dos Canabinóides	69
1.3.1 - Efeitos a curto prazo	69
1.3.2 - Efeitos a longo prazo	70
1.3.3 - Dependência	70
1.4 - Janelas de detecção de canabinóides	71
1.5 - Amostras biológicas: Plasma	71
1.6 - Preparação da amostra	72
1.6.1 - Pré-tratamento da amostra	72
1.6.2 - Microextração em seringa empacotada	73
1.7 - Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa em tandem	74
1.8 - Análise de canabinóides em matrizes biológicas	77
2. Justificação do tema	79
3. Objetivos	79
4. Materiais e Métodos	80
4.1 - Padrões e Reagentes	80
4.2 - Preparação de soluções	81
Soluções Padrão	81
Outras soluções	81
4.3 - Equipamentos	82
4.4 - Matriz biológica	82
4.5 - Sistema e condições cromatográficas	82
4.6 - Preparação da amostra	83
4.7 - Procedimento de Extração	84
5. Resultados e discussão	84
5.1 - Identificação dos analitos em estudo	84

5.2 - Otimização do método extrativo	86
5.2.1 - Seleção do procedimento de extração	87
5.2.2 - Desenho experimental - DOE	90
5.2.3 - Avaliação de forma univariada do número de aspirações	96
5.3. Validação	98
5.3.1 - Seletividade	98
5.3.2 - Curva de calibração e linearidade	102
5.3.3 - Limites de detecção e de quantificação	104
5.3.4 - Precisão e exatidão	106
5.3.5 - Recuperação	108
5.3.6 - Estabilidade	109
5.3.6.1 - Estabilidade em amostras processadas	110
5.3.6.2 - Estabilidade de curta duração	110
5.3.6.3 - Estabilidade a ciclos de congelação/descongelação	111
5.4 - Aplicação do método a amostras reais	112
Considerações finais	115
Referências Bibliográficas	117
ANEXOS	123

Lista de Figuras

Figura 1.	Erva de <i>cannabis</i> .	63
Figura 2.	Resina de <i>cannabis</i> .	63
Figura 3.	Óleo de <i>cannabis</i> .	63
Figura 4.	Via de biossíntese dos principais canabinóides.	65
Figura 5.	Metabolismo do THC.	67
Figura 6.	Recetores de canabinóides (CB ₁) e mecanismos de transdução de sinal.	68
Figura 7.	Recetor de canabinóides (CB ₁) - efeitos da ligação de endocanabinóides e THC.	69
Figura 8.	Intervalos de detecção em várias matrizes após o consumo ocasional de <i>cannabis</i> .	71
Figura 9.	Representação do modo de funcionamento da espectrometria de massa em tandem.	76
Figura 10.	Cromatogramas de THC, THC-OH e THC-COOH a 0,1 ng/mL e respetivos padrões internos a 2 ng/mL.	86
Figura 11.	Média e desvio-padrão da área de THC/ área de THC-d ₃ para as várias técnicas estudadas.	88
Figura 12.	Média e desvio-padrão da área de THC-OH/ área de THC-OH-d ₃ para as várias técnicas estudadas	88
Figura 13.	Média e desvio-padrão da área de THC-COOH/ área de THC-COOH-d ₃ para as várias técnicas estudadas.	89
Figura 14.	Diagrama de Pareto que ilustra os fatores que influenciam o processo de extração para o THC.	91
Figura 15.	Diagrama de Pareto que ilustra os fatores que influenciam o processo de extração para o THC-OH.	92

Figura 16.	Diagrama de Pareto que ilustra os fatores que influenciam o processo de extração para o THC-COOH.	92
Figura 17.	Gráfico de efeitos principais para o TH	93
Figura 18.	Gráfico de efeitos principais para o THC-OH.	93
Figura 19.	Gráfico de efeitos principais para o THC-COOH.	93
Figura 20.	Gráfico de interações entre os vários parâmetros para o THC.	94
Figura 21.	Gráfico de interações entre os vários parâmetros para o THC-OH.	94
Figura 22.	Gráfico de interações entre os vários parâmetros para o THC-COOH.	95
Figura 23.	Resultados da avaliação de forma univariada do número de aspirações para o THC.	96
Figura 24.	Resultados da avaliação de forma univariada do número de aspirações para o THC-OH.	97
Figura 25.	Resultados da avaliação de forma univariada do número de aspirações para o THC-COOH.	97
Figura 26.	Cromatograma de uma amostra branca.	100
Figura 27.	Cromatograma de uma amostra fortificada com os analitos de estudo a 0,1 ng/mL e padrões internos a 2ng/mL.	101
Figura 28.	Cromatograma da amostra real.	113

Lista de Tabelas

Tabela 1.	BIN's e fases estacionárias de MEPS existentes.	73
Tabela 2.	Métodos analíticos para determinação de canabinóides em amostras biológicas, usando técnicas microextrativas para a preparação da amostra.	77
Tabela 3.	Parâmetros do método desenvolvido (GC-MS/MS).	83
Tabela 4.	Transições monitorizadas em modo MRM).	85
Tabela 5.	Técnicas extrativas estudadas para seleção da extração a otimizar.	87
Tabela 6.	Matriz experimental e resultados das extrações do DOE.	91
Tabela 7.	Condições extrativas usadas na avaliação de forma univariada do número de aspirações	96
Tabela 8.	Condições finais de extração	98
Tabela 9.	Janelas máximas de tolerância permitidas para as abundâncias relativas dos iões monitorizados. ^[57]	99
Tabela 10.	Dados de linearidade para os compostos em estudo (n=5).	103
Tabela 11.	Características dos LLOQ de cada composto (n=5).	104
Tabela 12.	Resumo das principais características de alguns métodos de determinação quantitativa de canabinóides em plasma.	105
Tabela 13.	Precisão intradia e exatidão (n=6).	107
Tabela 14.	Precisão interdia e exatidão (n=5).	108
Tabela 15.	Percentagem de recuperação de cada um dos compostos em estudo, calculada em 3 níveis de concentração (n=3).	109
Tabela 16.	Resumo dos resultados do estudo de estabilidade de amostras processadas (n=3).	110

Tabela 17.	Resumo dos resultados do estudo de estabilidade de curta duração (n=3).	111
Tabela 18.	Resumo dos resultados do estudo da estabilidade a ciclos de congelação e descongelação (n=3).	112
Tabela 19.	Compostos identificados na amostra e respetiva quantificação.	112

Lista de Acrónimos

®	Original
2-AG	2-Araquidonilglicerol
2D- GC	<i>Two-dimensional gas Chromatography</i> - (Cromatografia gasosa bidimensional)
5-HT	Serotonina
Ach	Acetilcolina
AEA	Anandamida
AIM	Autorização de Introdução no Mercado
ANF	Associação Nacional de Farmácias
AUE	Autorização de Utilização Especial
AVC	Acidente Vascular Cerebral
BIN	<i>Barrel Insert and Needle Assembly</i>
CV	Coeficiente de variação
CB ₁	Recetor de canabinóides Um
CB ₂	Recetor de canabinóides Dois
CBD	Canabidiol
CBD	Canabidiol
CBDA	Ácido canabidiólico
CBG	Canabigerol
CBGA	Ácido Canabigerólico
CBN	Canabinol
CEDINE	Centro de Informação de Medicamentos
CIM	Centro de Informação de Medicamentos
DLLME	<i>Dispersive liquid-liquid microextraction</i> - (Microextração líquido-líquido dispersiva)
DOE	<i>Design of Experiments</i> - (Desenho Experimental)
ERM	Erro relativo médio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FHNM	Formulário Hospitalar Nacional do Medicamento
GABA	Ácido Gama - Aminobutírico.
GC	<i>Gas chromatography</i> - (Cromatografia gasosa)
Glu	Glutamato
HBP	Hiperplasia Benigna da Próstata
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> - (Cromatografia líquida de alta eficiência)
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
INFARMED	Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde I.P

LC	<i>Liquid chromatography</i> - (Cromatografia líquida)
LLE	<i>Liquid-liquid extraction</i> - (Extração líquido-líquido)
LLOQ	Lower limit of quantification - (Limite inferior de quantificação)
LOD	Limit of detection - (Limite de detecção)
LPME	<i>Liquid phase microextraction</i> - (Microextração em fase líquida)
m/z	Massa/Carga
MEPS	<i>Microextraction by packed sorbent</i> - (Microextração em seringa empacotada)
MNSRM	Medicamento Não Sujeito a Receita Médica
MRM	<i>Multiple reaction monitoring</i> - (Monitorização de múltiplas reações)
MS/MS	<i>Tandem mass spectrometry</i> - (Espectrometria de massa em tandem)
MS	<i>Mass spectrometry</i> - (Espectrometria de Massa)
MSRM	Medicamento Sujeito a Receita Médica
MSTFA	N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida
NA	Noradrenalina
OF	Ordem dos Farmacêuticos
PMME	<i>Polymer monolith microextraction</i> - (Microextração em polímero monolítico)
PRM	Problemas Relacionados com os Medicamentos
R ²	Coefficiente de determinação
RCM	Resumo das Características do Medicamento
RE	Receita especial
SA	<i>Surfactant assisted</i> - (Assistida por surfactante)
SD:	Desvio padrão
SIM	Serviço de Informação de Medicamentos
SNS	Sistema Nacional de Saúde
SPDE	<i>Solid phase dynamic extraction</i> - (Extração dinâmica em fase sólida)
SPE	<i>Solid phase extraction</i> - (Extração em fase sólida)
SPME	<i>Solid phase microextraction</i> - (Microextração em fase sólida)
THC	Delta-9-tetrahydrocannabinol
THCA	Ácido 9- tetrahydrocannabinólico A
THC-COOH	11- <i>nor</i> -9-carboxi-delta-9-tetrahydrocannabinol
THC-OH	11-hidroxi-delta-9-tetrahydrocannabinol
TMCS	Trimetilclorosilano
TrR	Tempo de Retenção Relativo
ULS	Unidade Local de Saúde

Determinação de Tetrahydrocannabinol e principais metabolitos em amostras de plasma com recurso à microextração em seringa empacotada e análise por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de espectrometria de massa em tandem.

PARTE I

Relatório de estágio em farmácia comunitária

Introdução

Um estágio pode ser compreendido como um período de ensinamento que permite ao estagiário ter contato com os conhecimentos práticos das suas funções profissionais, favorecendo assim a articulação dos conhecimentos teóricos adquiridos com a sua aplicação prática.

De entre todas as áreas de atividade farmacêutica, a farmácia comunitária além de ser a área que engloba um maior número de farmacêuticos, é também a face mais visível da profissão. As funções assumidas pelo farmacêutico comunitário na sociedade portuguesa traduzem-se numa afirmação crescente que ultrapassa o seu papel enquanto especialista do medicamento. Em farmácia comunitária o farmacêutico não dispensa apenas medicamentos, o aconselhamento sobre o uso racional dos fármacos e a monitorização dos utentes são conceitos indissociáveis da boa prática farmacêutica.

O estágio a que este relatório se reporta foi realizado entre os dias 25 de março e 28 de junho de 2013, na Farmácia Tavares, sob a direção técnica da Doutora Joana Cabral. É da maior importância para os alunos do mestrado integrado em Ciências Farmacêuticas realizarem um período de estágio em farmácia comunitária, pois é através dele que se completa o ciclo académico e se faz a ligação entre este e a vida profissional.

Neste relatório não se pretende fazer uma descrição exaustiva do que é o farmacêutico comunitário e das leis que delimitam o seu trabalho, mas sim mostrar os conhecimentos adquiridos, tarefas realizadas e experiências sentidas durante o decorrer do estágio em farmácia comunitária.

1. Organização da Farmácia

1.1 - Localização, espaço físico e divisões funcionais

A Farmácia Tavares está situada na Avenida Cidade de Saffed, na cidade da Guarda, encontrando-se devidamente sinalizada por um letreiro com a inscrição “Farmácia Tavares” e uma cruz verde que se encontra iluminada nos horários de serviço da mesma. Na generalidade, as características, os equipamentos e os espaços da farmácia estão de acordo com o manual de boas práticas farmacêuticas para a farmácia comunitária, ^[1] sendo no entanto de salientar a não implementação de um circuito fechado de imagens por vídeo, para segurança quer dos profissionais envolvidos, quer dos utentes.

Em termos de divisões funcionais, esta é constituída pela área de atendimento ao público e um espaço interior, que não é acessível aos utentes, exceto em caso de necessidade.

Na área de atendimento ao público, além de se encontrarem expostos todos os produtos de venda na farmácia que não são considerados medicamentos, existem três balcões de atendimento devidamente equipados, um serviço sanitário (Wc) e uma sala de atendimento farmacêutico, que permite privacidade e confidencialidade para a prestação de serviços farmacêuticos (medição de parâmetros bioquímicos e biológicos e administração de vacinas), ou outros serviços prestados pela farmácia (consultas de nutrição e massagens de relaxamento corporal).

Na zona mais interior da farmácia encontram-se as áreas de armazenamento dos medicamentos de uso humano sujeitos a receita média, as áreas de armazenamento de medicamentos de uso humano não sujeitos a receita média, a área de armazenamento de medicamentos de uso veterinário, a área de armazenamento dos excessos de produtos de venda livre bem como a câmara fria para armazenamento de medicamentos de uso humano que requerem temperaturas de armazenamento entre dois e oito graus celsius. Ainda se encontra nesta parte a área de receção e conferência de encomendas, o laboratório, os vestiários e uma zona ampla que engloba o gabinete da diretora técnica, a copa, biblioteca e zona de descanso do pessoal.

1.2 - Recursos humanos

É nos recursos humanos que assenta a base do bom funcionamento de qualquer farmácia, sendo de extrema importância que estes se encontrem ajustados à realidade da mesma quer em número, quer em conhecimentos.

A propriedade e direção técnica pertence à Doutora Joana Cabral, sendo da sua responsabilidade assegurar um correto e adequado funcionamento da farmácia. Fazem também parte das competências específicas do diretor técnico os seguintes pontos: ^[2]

- Assumir a responsabilidade pelos atos farmacêuticos praticados na farmácia;
- Garantir a prestação de esclarecimentos aos utentes sobre o modo de utilização dos medicamentos;
- Promover o uso racional do medicamento;
- Assegurar que os medicamentos sujeitos a receita médica só são dispensados aos utentes que a não apresentem em casos de força maior, devidamente justificados;
- Manter os medicamentos e demais produtos fornecidos em bom estado de conservação;
- Garantir que a farmácia se encontre em condições de adequada higiene e segurança;

Determinação de Tetrahydrocannabinol e principais metabolitos em amostras de plasma com recurso à microextração em seringa empacotada e análise por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de espectrometria de massa em tandem.

- Assegurar que a farmácia disponha de um aprovisionamento suficiente de medicamentos;
- Zelar para que o pessoal que trabalha na farmácia mantenha, em permanência, o asseio e a higiene;
- Verificar o cumprimento das regras deontológicas da atividade farmacêutica;
- Assegurar o cumprimento dos princípios e deveres previstos na legislação reguladora da atividade farmacêutica.

O diretor técnico pode ser coadjuvado por farmacêuticos e por pessoal devidamente habilitado, sob a sua direção e responsabilidade. ^[2] A farmácia conta ainda com duas técnicas de diagnóstico e terapêutica e duas auxiliares técnicas.

É de salientar que, dentro das competências e conhecimentos de cada um, todas as pessoas que trabalham na Farmácia Tavares são dotadas de polivalência dentro da farmácia, colaborando não só nas funções de atendimento, mas também na arrumação dos medicamentos.

1.3 - Equipamentos e Material

Todas as farmácias devem possuir equipamentos necessários às funções e serviços que desempenham. Tendo em conta as suas atividades específicas, a Farmácia Tavares possui material de laboratório (balança analítica, material de vidro, pedra mármore e espátulas), material necessário para as medições dos parâmetros bioquímicos e fisiológicos efetuadas na farmácia (colesterol total, triglicéridos, ácido úrico, índice de glicémia e tensão arterial) e restante material necessário ao atendimento. Por fim, podemos ainda referir os equipamentos existentes em várias secções da farmácia que permitem a monitorização da temperatura e humidade, bem como a câmara fria, na qual se armazenam os produtos que devem ser mantidos sob refrigeração.

1.4 - Sistema informático

O sistema informático utilizado na farmácia Tavares é o Sifarma 2000, da Associação Nacional de Farmácias (ANF). Este sistema facilita o atendimento através da consulta de informação sobre contraindicações, interações, efeitos secundários, posologias habituais e outros dados científicos considerados relevantes para uma eficiente dispensa do medicamento. É através deste sistema que se realiza a gestão de encomendas, *stocks*, devoluções e prazos de validade.

O Sifarma 2000 permite ainda a análise de vendas, o fecho do receituário mensal e outras funções que não foram possíveis de observar no decorrer do estágio.

2. Informação e documentação científica

2.1 - Biblioteca da farmácia e centros de informação

No processo de cedência de medicamentos o farmacêutico deve obrigatoriamente dispor de acesso físico ou eletrónico que contenha informação sobre indicações, contraindicações, interações, posologia e precauções a ter em conta com a utilização dos medicamentos. ^[1]

De forma a completar as informações disponíveis no Sifarma 200, a Farmácia Tavares possui uma “mini” biblioteca constituída por fontes de informação científica credíveis. Entre os livros e documentos existentes são de destacar a Farmacopeia Portuguesa, o Prontuário Terapêutico, o Índice Nacional Terapêutico e o Formulário Galénico Português. A Biblioteca possui ainda diversas obras nos domínios da dermatologia, veterinária, nutrição e pediatria.

Apesar de toda a panóplia de fontes de informação existentes, o trabalho multivariado prestado na farmácia leva, pontualmente, à ocorrência de situações que necessitam de informação mais específica ou detalhada, que é facultada pelos centros de documentação e informação disponibilizados pela Autoridade Nacional do Medicamento (INFARMED), ANF e Ordem dos Farmacêuticos (OF).

No decorrer do estágio foi necessário recorrer a um destes centros de informação para verificar se uma determinada associação de Paracetamol e Codeína era comercializada no nosso país, tendo-me sido dado o privilégio de proceder ao contato com o Centro de Informação de Medicamentos (CEDIME) da ANF, para proceder ao esclarecimento da dúvida.

3. Medicamentos e outros produtos de Saúde

3.1 - Medicamentos de uso humano

Segundo o Decreto-Lei n.º 176/2006, de 30 de Agosto, um medicamento é definido “*como toda a substância ou associação de substâncias apresentada como possuindo propriedades curativas ou preventivas de doenças em seres humanos ou dos seus sintomas ou que possa ser utilizada ou administrada no ser humano com vista a estabelecer um diagnóstico médico ou, exercendo uma ação farmacológica, imunológica ou metabólica, a restaurar, corrigir ou modificar funções fisiológicas.*” ^[3]

Os medicamentos podem ser classificados, quanto à dispensa ao público, em: ^[3]

Determinação de Tetrahydrocannabinol e principais metabolitos em amostras de plasma com recurso à microextração em seringa empacotada e análise por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de espectrometria de massa em tandem.

- Medicamentos sujeitos a receita médica;
- Medicamentos não sujeitos a receita médica.

Dentro dos medicamentos para uso humano existem determinadas categorias que apresentam algumas especificidades e que se encontram devidamente enquadradas por legislação própria. As categorias de medicamentos para uso humano mais importantes encontram-se descritas nos seguintes pontos.

3.2 - Medicamentos genéricos

Os medicamentos genéricos podem ser definidos como *“medicamentos com a mesma composição qualitativa e quantitativa em substâncias ativas, a mesma forma farmacêutica e cuja bioequivalência com os medicamentos de referência haja sido demonstrada por estudos de biodisponibilidade apropriados.”* [3]

3.3 - Psicotrópicos e estupefacientes

Os psicotrópicos e estupefacientes são uma classe de medicamentos utilizados na terapêutica de diversas doenças, algumas com elevada incidência na população. São no entanto produtos associados a atos ilícitos, recebendo especial atenção por parte das autoridades competentes, que os tornam num dos tipos de substâncias mais controlados em todo o mundo. [4]

Apesar das suas propriedades benéficas, estas substâncias apresentam alguns riscos, podendo induzir quer habituação quer dependência física ou psíquica. Por esta razão, é fundamental que sejam utilizadas no âmbito clínico e de acordo com indicação médica. [4]

3.4 - Medicamentos Manipulados

Um medicamento manipulado *“é qualquer fórmula magistral ou preparado oficial preparado e dispensado sob a responsabilidade de um farmacêutico”*, correspondendo uma fórmula magistral *“a qualquer medicamento preparado numa farmácia de oficina ou serviços farmacêuticos hospitalares, segundo uma receita médica e destinado a um doente determinado,* e um preparado oficial a *“qualquer medicamento preparado segundo as indicações compendiais de uma farmacopeia ou de um formulário oficial, numa farmácia de oficina ou em serviços farmacêuticos hospitalares, destinado a ser dispensado diretamente aos doentes assistidos por essa farmácia ou serviço.”* [5, 6]

3.5 - Medicamentos Homeopáticos

Medicamento homeopático é um *“medicamento obtido a partir de produtos ou composições denominadas “matérias-primas homeopáticas”, de acordo com o processo de fabrico homeopático descrito na Farmacopeia Europeia ou, quando dela não conste, nas farmacopeias de qualquer Estado Membro da União Europeia.”* [7]

3.6 - Medicamentos à base de plantas

Entende-se por medicamento à base de plantas, *“qualquer medicamento que tenha exclusivamente como substâncias ativas uma ou mais substâncias derivadas de plantas, uma ou mais preparações à base de plantas ou uma ou mais substâncias derivadas de plantas em associação com uma ou mais preparações à base de plantas.”* [6]

4. Aprovisionamento e armazenamento

4.1 - Gestão de *stocks*. Pedidos, receção e devoluções de encomendas

4.1.1 - Gestão de *stocks*

A gestão de *stocks* é um processo fundamental para o bom funcionamento da farmácia, pois se esta não for corretamente efetuada poderá existir excesso ou falta de medicamentos. Para que a gestão de *stocks* seja bem efetuada é essencial um conhecimento dos medicamentos com maior e menor rotação, bem como a capacidade de prever os períodos em que um determinado medicamento poderá ter um aumento de vendas.

Na Farmácia Tavares, o procedimento normal de gestão de *stocks* dos produtos existentes é feito de forma automática, pelo programa Sifarma 2000. Com base na rotatividade de cada produto são estabelecidos os *stocks* mínimos e máximos necessários, para o normal funcionamento da farmácia e é definido o ponto de encomenda de cada produto. A exceção a esta regra acontece nos dias anteriores aos serviços, em que ocorre um reforço dos níveis de certos produtos, como acontece com os antibióticos.

Alguns *stocks* também sofrem variação sazonal, são disto exemplo os medicamentos utilizados para diminuir os sinais e sintomas associados a gripes e constipações.

4.1.2 - Pedidos de encomendas

As farmácias podem adquirir produtos junto de diferentes entidades, nomeadamente armazéns de distribuição grossista de medicamentos e produtos sanitários, ou diretamente ao laboratório responsável pelo fabrico ou importação dos mesmos.

Na Farmácia Tavares a reposição diária de *stocks*, feita em função do movimento da farmácia, é feita geralmente ao fim do dia pela diretora técnica para os dois principais grossistas com quem a farmácia trabalha (Udifar e Cooprofar), sendo que a preferência por um ou outro depende muitas vezes dos preços praticados e de campanhas existentes. Para efetuar a encomenda é gerada, de forma automática pelo Sifarma 2000, uma lista com os produtos que se encontram abaixo do ponto de encomenda, que é enviada por *modem* aos armazéns de distribuição grossista após aprovação pela diretora técnica. Além das encomendas diárias são também efetuadas várias encomendas pontuais, maioritariamente por telefone, de forma a suprimir necessidades mais urgentes de aprovisionamento.

Apesar de se trabalhar em conjunto com vários grossistas, nem sempre os produtos requeridos na nota de encomenda chegam à farmácia no número pretendido. Desta forma, também são efetuadas encomendas diretamente aos laboratórios de forma a evitar rutura de *stocks*, ou mesmo para aproveitar condições vantajosas que estes oferecem aquando da compra de um grande número de unidades de um certo produto.

Durante o estágio, a realidade das encomendas foi algo com o qual me familiarizei de forma particular, visto que todos os dias era responsável por contactar telefonicamente os armazéns de distribuição grossista, com vista a conseguir assegurar o fornecimento de produtos essenciais que, por variadas razões, não eram enviados na encomenda. Também me foi permitido, com supervisão da Doutora Joana, analisar e aprovar várias notas de encomenda diárias.

4.1.3 - Receção de encomendas

A Receção das encomendas é quase sempre a primeira etapa de qualquer estagiário que chega à farmácia, já que permite a familiarização com marcas, nomes comerciais, formas farmacêuticas, dosagens e tamanhos das embalagens de medicamentos existentes no mercado. O meu estágio não foi exceção.

Sempre que uma encomenda chega à farmácia é necessário dar entrada da mesma. Todas as encomendas têm de ser acompanhadas pela respetiva guia ou fatura, onde se deve confirmar que a encomenda é mesmo destinada à farmácia em questão. No caso dos fornecedores habituais, das encomendas diárias, o colaborador das entregas deixa a encomenda na

farmácia para ser dada entrada da mesma. No caso de encomendas excepcionais e entregues em mão, é necessário assinar e carimbar a guia ou fatura.

De seguida, o Sifarma 2000 possibilita um menu de receção de encomendas, e a mesma é feita através da leitura ótica dos produtos. É necessário confirmar a data de validade, o preço de custo e o preço impresso na cartonagem de cada medicamento. Tem sempre de se confirmar se a quantidade real enviada pelo fornecedor é a mesma que vem descrita na fatura, pois pode haver discrepâncias.

Se o produto existe na farmácia pela primeira vez, é necessário criar a ficha do produto, para que se possa dar entrada do mesmo. Ao criar a ficha, coloca-se o *stock* mínimo e máximo e o ponto de encomenda, para que esse produto possa ser encomendado quando necessário.

Depois de todos os produtos terem sido rececionados, confirma-se o preço de custo da fatura com o calculado pelo programa. Qualquer não conformidade detetada deve ser comunicada imediatamente ao fornecedor em questão.

É também importante verificar se os medicamentos que entram na farmácia têm um prazo de validade razoável, se as matérias-primas para manipulação vêm acompanhadas de boletim de análise e se os psicotrópicos e estupefacientes vêm com a respetiva requisição (original e duplicado). No fim de se rececionar a encomenda, o duplicado da fatura é assinado e posteriormente arquivado, enquanto o original segue para a contabilidade.

4.1.4 - Devoluções de encomendas

Há situações em que é preciso proceder à devolução de produtos após a sua receção. É o caso de produtos não pedidos que são enviados, produtos danificados ou com prazo de validade muito curto. São também efetuadas devoluções de produtos existentes na farmácia cujo prazo de validade é igual ou inferior a três meses e produtos/lotos retirados de mercado.

Para proceder à devolução, é necessário discriminar qual o motivo, o fornecedor e o número da fatura/guia. As devoluções são efetuadas mediante uma nota de devolução que é emitida em quadruplicado (carimbada e rubricada pelo operador), sendo que duas cópias permanecem na farmácia e duas são encaminhadas para o fornecedor.

O fornecedor pode aceitar ou não o pedido. Se aceitar, a regularização pode ser realizada mediante o produto conforme, ou mediante uma nota de crédito. Se não aceitar, os produtos em questão são devolvidos à farmácia e posteriormente são entregues às finanças para estas procederem ao reembolso do Imposto sobre o Valor Acrescentado (IVA).

4.2 - Armazenamento

Devido ao elevado número de produtos existentes na farmácia, o armazenamento dos mesmos é de bastante importância para o bom funcionamento diário da mesma. O armazenamento deve ser feito de forma cuidada e deve ter em conta as especificidades inerentes a cada produto. As condições de iluminação, temperatura, humidade e ventilação das zonas de armazenamento devem respeitar as exigências específicas dos medicamentos, químicos, matérias-primas, materiais de embalagem e outros produtos farmacêuticos. ^[1] Estas condições são medidas e registadas, de forma contínua, pelos equipamentos de monitorização da temperatura e humidade anteriormente referidos.

Existem na Farmácia Tavares zonas chave de armazenamento, estando os produtos armazenados por categorias e por formas farmacêuticas.

Na zona de atendimento ao público encontram-se expostos os produtos de venda livre que não são medicamentos, alguns dispositivos médicos, bem como as diferentes gamas de cosmética e dermocosmética, dermocosmética infantil e puericultura. Algum excesso destes produtos que não se consiga expor é armazenado em local próprio na zona mais interior da farmácia.

Logo atrás dos balcões de atendimento encontram-se expostos e armazenados os produtos fitoterapêuticos, os suplementos alimentares, os produtos homeopáticos e os medicamentos não sujeitos a receita média. Esta é uma zona que se encontra à vista dos utentes mas não ao seu alcance. Também os produtos expostos nesta área possuem por excesso de *stock* que é armazenado em áreas específicas no interior da farmácia.

Com relação aos medicamentos sujeitos a receita médica, estes são guardados dentro de prateleiras próprias, sendo que os medicamentos “originais” ou de “marca” se encontram armazenados numa zona e os medicamentos genéricos noutra. Em ambos os casos encontram-se organizados por ordem alfabética (por nome comercial e denominação comum internacional respetivamente) e separados por formas farmacêuticas. Os excessos de *stock* encontram-se também armazenados em zonas específicas do interior da farmácia, seguindo as mesmas premissas aqui apresentadas. Nesta mesma zona, separados dos demais, também se encontram armazenados os medicamentos de uso veterinário.

Os estupefacientes encontram-se armazenados num local à parte que não se encontra identificado devido à possibilidade de furto. As matérias-primas utilizadas no fabrico de manipulados, o soro fisiológico, o álcool, a água destilada e a betadine, encontram-se armazenados em lugares distintos do laboratório. É também importante voltar a referir o frigorífico existente que serve de local de armazenamento para os medicamentos que necessitam de ser armazenados a uma temperatura de dois a oito graus celsius.

5. Interação Farmacêutico-Utente-Medicamento

Para que o farmacêutico preste um bom atendimento necessita sentir-se seguro e confiante daquilo que está a fazer. Um atendimento nunca é igual ao anterior, devendo o farmacêutico mostrar versatilidade e adaptabilidade às necessidades de cada utente de forma a agradá-lo e conseguir assim que este se fidelize naquela farmácia.

Quando o utente chega à farmácia com uma prescrição médica o atendimento é mais simples, já que “apenas” temos de dispensar o que o médico prescreveu e educar o utente para uma toma responsável da medicação, esclarecendo também as dúvidas por este apresentadas.

Quando chega à farmácia um utente que não tem prescrição médica ou que recorre em primeiro lugar à farmácia, temos de aconselhá-lo da melhor forma. Temos de questionar o utente acerca dos seus sintomas para poder efetuar a dispensa do medicamento mais apropriado, tendo sempre em conta que a automedicação é algo a ser evitado.

Em ambas as situações, a dispensa de medicação não deve ser vista como um ato fechado em si, mas como um ato praticado por um profissional de saúde e cujas implicações ao nível de saúde pública são de importância comprovada. Desta forma o farmacêutico deve adequar a sua linguagem ao nível sociocultural de cada utente. Deve ser transmitida informação verbal e escrita, relativamente à posologia e ao modo de administração dos medicamentos. Sempre que o estado fisiológico ou patológico do utente ou o medicamento em questão o exigirem, deve ainda ser transmitida ao utente informação relativa a preocupações de utilização, contraindicações e reações adversas. A informação prestada deve ser simples, clara, compreensível e respeitar a capacidade de decisão do utente. ^[1]

6. Dispensa de medicamentos

A dispensa, ou cedência, de medicamentos é o ato profissional em que o farmacêutico, após avaliação da medicação, cede medicamentos ou substâncias medicamentosas aos doentes mediante prescrição médica ou em regime de automedicação ou indicação farmacêutica, acompanhada de toda a informação indispensável para o correto uso dos medicamentos. Na cedência de medicamentos o farmacêutico avalia a medicação dispensada, com o objetivo de identificar e resolver problemas relacionados com os medicamentos (PRM), protegendo o doente de possíveis resultados negativos associados à medicação. ^[1]

O procedimento geral para uma correta cedência de medicamentos é o seguinte: ^[1]

- Receção da prescrição e confirmação da sua validade/autenticidade;
- Avaliação farmacoterapêutica da prescrição, indicação/automedicação pelo farmacêutico;

Determinação de Tetrahydrocannabinol e principais metabolitos em amostras de plasma com recurso à microextração em seringa empacotada e análise por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de espectrometria de massa em tandem.

- Intervenção para resolver eventual PRM identificado;
- Entrega do medicamento/produto prescrito, indicado ou em automedicação;
- Prestação de informações clínicas para garantir que o utente recebe e compreende a informação oral e escrita de modo a retirar o máximo benefício do tratamento;
- Revisão do processo de uso da medicação;
- Oferta de outros Serviços Farmacêuticos;
- Documentação da atividade profissional.

Apesar de se poder aplicar este processo de dispensa tanto a medicação sujeita a receita médica (MSRM) como a medicação não sujeita a receita médica (MNSRM), existem pequenas diferenças na aplicação prática do mesmo. Em seguida apresenta-se de forma mais pormenorizada os passos a efetuar na cedência de medicação destas duas categorias.

6.1 - Dispensa de medicamentos sujeitos a receita médica

Quando se está a aviar uma receita deve-se seguir uma série de critérios de modo a evitar erros. Em primeiro lugar deve verificar-se todos os dados essenciais estão presentes, tais como:

- Nome do utente;
- Subsistema de saúde com respetivo número de beneficiário (quando este não estiver presente, ou não for perceptível, deve-se pedir o cartão de utente e anexar uma fotocópia à receita);
- Identificação do local onde foi feita a prescrição;
- Identificação do médico prescriptor com respetiva assinatura;
- Data de prescrição e verificação da validade da receita.

Após se verificar que todos estes campos se encontram preenchidos em conformidade, o farmacêutico deve proceder à análise do campo prescrição. Deve-se identificar os medicamentos prescritos, a sua forma farmacêutica, posologia, apresentação, método de administração e duração do tratamento. ^[1] Em cada receita, podem ser prescritas até quatro embalagens, com um limite de duas embalagens correspondendo ao mesmo princípio ativo. Caso exista discrepância entre as embalagens prescritas e as comercializadas, deve-se ter em conta que a dimensão da embalagem deve ser o mais próximo possível da embalagem prescrita.

Efetuada a análise da receita, o farmacêutico deve em seguida fazer uma interpretação farmacoterapêutica da mesma. Com base em informação recolhida junto do doente, de fontes bibliográficas, do prescriptor ou junto dos centros de informação disponíveis, o

farmacêutico deve questionar-se acerca da necessidade do medicamento, da adequação deste ao doente e da adequação da posologia, ^[1] tendo sempre em conta outros fatores legais, sociais e económicos que podem influenciar o ato da dispensa.

Efetuada toda a análise, o profissional encontra-se então habilitado a selecionar o medicamento a ceder. A seleção deve ser feita de forma conjunta com o utente, visto que dentro das várias possibilidades existentes (genérico ou não e laboratórios disponíveis), a preferência deste por um medicamento em específico deve ser levada em conta.

Após a seleção, no momento da cedência dos medicamentos, o farmacêutico deve assegurar-se da qualidade e bom estado dos produtos dispensados. Deve também assegurar-se que toda a informação necessária é transmitida ao utente e que este a compreende, garantindo um uso correto, seguro e eficaz dos medicamentos de acordo com as necessidades individuais de cada um. ^[1]

Por fim emite-se o recibo, que deve ser carimbado e assinado e imprime-se o verso da receita, para que o utente possa assinar, de modo a declarar que lhe foram dispensadas as embalagens de medicamentos ali indicadas. As receitas têm também de ser carimbadas, datadas e assinadas.

Durante o estágio na Farmácia Tavares, foi-me possível fazer a dispensa de inúmeros medicamentos sujeitos a receita médica. Contrariando algumas ideias pré-concebidas, dei conta que este processo é de uma natureza algo complexa e que exige a aplicação de inúmeros conhecimentos e conceitos adquiridos ao longo dos cinco anos de curso. A cedência da “caixinha”, como é chamada por muitos utentes, é um pormenor dentro de todo o processo de avaliação farmacoterapêutico e aconselhamento farmacêutico que é necessário prestar de forma a garantir o uso ótimo da medicação por parte do utente.

6.2 - Vendas suspensas

Uma venda suspensa é uma venda de um MSRM que é efetuada sem a apresentação da receita no ato da dispensa. A maioria destas situações acontece com utentes que fazem medicação crónica e que acaba sem que estes tenham disponível a receita médica para proceder ao levantamento da mesma. É um tipo de dispensa que possui procedimentos específicos e a sua aplicação, apesar de uniformizada pelo Sifarma 2000, possui diferenças de farmácia para farmácia.

Na Farmácia Tavares só se efetuam vendas suspensas a utentes habituais, com ficha atualizada na farmácia e cuja medicação é de conhecimento do farmacêutico. De forma a confirmar as dosagens e laboratórios que este costuma levar, procede-se à consulta de vendas anteriores que tenham sido efetuadas mediante apresentação de receita médica. Selecionado

Determinação de Tetrahydrocannabinol e principais metabolitos em amostras de plasma com recurso à microextração em seringa empacotada e análise por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de espectrometria de massa em tandem.

o medicamento a dispensar e após aconselhamento, é feita uma venda suspensa em nome do utente e impresso o respetivo talão.

O pagamento nesta situação pode ser feito de duas formas. O utente pode pagar na totalidade o medicamento, fazendo-se a respetiva comparticipação e reembolso aquando da regularização da venda com a receita, ou pode pagar apenas a sua parte, ficando desta forma a faltar à farmácia apenas a receita. Esta última modalidade de pagamento é efetuada quando o utente é cliente fidelizado na farmácia.

6.3 - Dispensa de psicotrópicos

Devido às características dos medicamentos inseridos nesta categoria, a sua prescrição e dispensa possui regras específicas que são importantes referir.

Os medicamentos contendo uma substância classificada como estupefaciente ou psicotrópica têm que ser prescritos isoladamente (sem outros medicamentos na receita). As receitas eletrónicas para este tipo de substâncias são identificadas com RE - receita especial, sendo o resto das regras de prescrição iguais ao que já foi anteriormente descrito. ^[8]

Após introdução no sistema informático do medicamento a dispensar, o Sifarma 2000 reconhece-o de imediato como produto de dispensa controlada, sendo necessário preencher uma série de dados relativos ao doente e ao adquirente que vem aviar a receita (todos os campos têm de ser preenchidos). O farmacêutico deve ainda anotar no verso da receita a seguinte informação do adquirente: ^[8]

- Nome;
- Número e data do bilhete de identidade, ou da carta de condução, ou número do cartão de cidadão;
- Número do passaporte, no caso de cidadãos estrangeiros;
- Na ausência dos documentos mencionados, o farmacêutico pode aceitar outros documentos com fotografia mas, nestes casos, deve solicitar a assinatura do adquirente; no caso deste não saber assinar, o farmacêutico consigna essa menção;
- Se a receita se destinar a um menor, a pessoa que diz ter o menor a seu cargo ou estar incumbida da sua educação ou vigilância tem que assinar a cópia da receita que permanece na farmácia; no caso do adquirente não saber assinar, o farmacêutico consigna essa menção;
- Data da dispensa;
- Assinatura legível do farmacêutico.

É também necessário tirar uma cópia destas receitas que deve ser mantida na farmácia por um período mínimo de 3 anos. A farmácia tem de enviar ao INFARMED a listagem de todas as receitas aviadas da qual constem os dados do adquirente e as cópias das receitas manuais.^[8] Por questões de organização interna, na Farmácia Tavares estas listagens são enviadas ao INFARMED até ao dia oito do mês seguinte à dispensa.

Apesar de não ter autorização para proceder à dispensa, foi possível assistir à dispensa de medicamentos psicotrópicos durante o estágio.

6.4 - Dispensa de medicação não sujeita a receita médica (MNSRM)

A dispensa de MNSRM não pode ser feita sem qualquer cuidado, tem de ser precedida de várias questões ao utente de modo a perceber qual será o medicamento mais correto para a situação em questão. Apesar dos MNSRM serem de venda livre, não deixam de conter um princípio ativo que terá efeitos farmacológicos, não só esperados, mas também não desejados (reações adversas), que devem ser minimizados.

A dispensa de medicação não sujeita a receita médica pode acontecer por dois motivos: por indicação farmacêutica ou por iniciativa própria do utente (automedicação). Em ambos os casos o farmacêutico deve assumir sempre uma postura ativa na obtenção de informações que permitam a dispensa do medicamento mais adequado às situações relatadas.

7. Automedicação

A automedicação é a instauração de um tratamento medicamentoso por iniciativa própria do doente. É o processo que conduz a que o doente se assuma e se responsabilize pela melhoria da sua saúde, através da toma de MNSRM, destinados à prevenção e ao alívio de queixas autolimitadas, sem recurso à consulta médica.

A prática da automedicação, cada vez mais instalada, deve ser feita com a orientação de um profissional de saúde e de forma cuidada, já que tanto pode representar uma mais-valia para o doente, como ser-lhe prejudicial.

Nesta situação o farmacêutico encontra-se numa posição privilegiada de aconselhamento e deve orientar a utilização, ou não, do medicamento solicitado pelo doente, contribuindo para que a automedicação se realize sob uma indicação adequada e segundo o uso racional do medicamento. ^[4]

Determinação de Tetrahydrocannabinol e principais metabolitos em amostras de plasma com recurso à microextração em seringa empacotada e análise por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de espectrometria de massa em tandem.

Antes da dispensa deve fazer-se uma análise das necessidades do doente. Perguntas sobre o problema, sintomas, duração dos sintomas, outra medicação já tomada e problemas de saúde diagnosticados, devem fazer parte do processo de avaliação da situação em causa. Após a avaliação deverá ser dada informação adequada ao utente e nos casos de necessidade comprovada, dispensada a medicação.

8. Indicação farmacêutica

Na cedência de medicamentos em indicação farmacêutica, o farmacêutico responsabiliza-se pela *“seleção de um medicamento não sujeito a receita médica, ou de eventual tratamento não farmacológico, com o objetivo de aliviar ou resolver um problema de saúde considerado como um transtorno menor ou sintoma menor, ou entendido como problema de saúde de carácter não grave, autolimitante, de curta duração e que não apresenta relação com manifestações clínicas de outros problemas de saúde do doente.”* [1]

Esta é uma situação que acontece por norma quando um utente vai pedir aconselhamento à farmácia ou quando o farmacêutico, no decorrer de uma dispensa de MSRM, deteta a necessidade de complementar a terapêutica instituída com um MNRSM (ou tratamento não farmacológico). A indicação deve ser efetuada depois da recolha de toda a informação relevante sobre o doente (estado de saúde, sintomas, medicação concomitante, patologias crónicas, entre outras), para que assim estejam garantidas as condições de segurança e necessidade requeridas para a dispensa por indicação/aconselhamento farmacêutico.

Tendo em conta a época do ano em que decorreu o estágio e o prolongamento do tempo frio até quase ao final do mesmo, a medicação para tratamento da sintomatologia associada a gripes e constipações foi a MNSRM mais pedida e aconselhada nos atendimentos efetuados. Em segundo lugar é de destacar a medicação utilizada no tratamento da sintomatologia relacionada com situações alérgicas a par de MNSRM utilizados para controlo da dor e da inflamação.

9. Aconselhamento e dispensa de outros produtos de saúde

Para além dos medicamentos de uso humano, a farmácia é também um ponto de venda e dispensa de outros produtos de saúde, como produtos de dermofarmácia, cosmética e

higiene, produtos dietéticos para alimentação especial, produtos dietéticos infantis, fitoterapia, suplementos nutricionais, dispositivos médicos e medicamentos de uso veterinário.

Apesar de toda a panóplia de produtos vendidos na farmácia, é de extrema importância que o farmacêutico possua conhecimento sobre todos eles, pois só assim consegue responder aos pedidos e dúvidas dos utentes e fornecer, sem qualquer hesitação, a melhor opção para o seu pedido.

9.1 - Produtos de dermofarmácia, cosmética e higiene

Entende-se por produto cosmético *“qualquer substância, ou mistura, destinada a ser posta em contato com as partes externas do corpo humano ou com os dentes e as mucosas bucais, tendo em vista limpá-los, perfumá-los, modificar-lhes o aspeto, protege-los, mantê-los em bom estado ou de corrigir odores corporais.”* [9]

O fabrico, o controlo, a segurança e o cumprimento da legislação aplicável aos produtos cosméticos são da exclusiva responsabilidade do fabricante, do importador ou do responsável pela introdução dos produtos no mercado, sendo que ao INFARMED apenas compete regular e supervisionar o mercado de produtos cosméticos, garantindo o acesso a produtos cosméticos de qualidade e seguros. [9]

Entre as marcas de dermocosmética existentes na Farmácia Tavares, as mais trabalhadas e vendidas são a Avène®, La-Roche Posay®, Aderma®, Vichy®, Mustela® e Caudalie®. Cada uma destas marcas divide-se em inúmeras linhas com características e públicos-alvo diferentes.

Na Farmácia Tavares são principalmente dispensadas preparações para o banho, cremes, loções e mousses para hidratar a pele, produtos para cuidados dentários e bucais e cremes solares. É também de destacar a elevada procura e aconselhamento efetuado sobre linhas de produtos cosméticos à base de aveia, uma substância com efeitos calmantes e hidratantes sobre a pele. Aquando da dispensa do produto são prestadas informações acerca do correto modo de aplicação e o utente é alertado para eventuais efeitos adversos que podem ocorrer pela utilização deste.

Apesar de possuírem eficácia comprovada em algumas áreas, o farmacêutico deve estar sempre atento ao aparecimento de situações mais graves (psoríase, dermatites, acne severo, entre outras), que requerem referenciação para tratamento médico.

O aconselhamento/dispensa de produtos cosméticos foi dos maiores desafios encontrados durante o decorrer do estágio. O elevado número de produtos existentes na farmácia aliado a

Determinação de Tetrahydrocannabinol e principais metabolitos em amostras de plasma com recurso à microextração em seringa empacotada e análise por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de espectrometria de massa em tandem.

um fraco conhecimento prévio da área, fez com que fosse quase sempre necessário pedir ajuda aos outros colaboradores da farmácia para proceder à correta cedência dos mesmos.

9.2 - Produtos dietéticos para alimentação especial

Os produtos dietéticos para alimentação especial são géneros alimentícios destinados à alimentação em casos específicos e que, devido à sua composição ou a processos diferenciados de fabrico, se distinguem claramente dos géneros alimentícios de consumo corrente. São adequados ao objetivo nutricional pretendido e são comercializados com a indicação de que correspondem a esse objetivo. Considera-se alimentação especial a que corresponde às necessidades nutricionais das seguintes categorias de pessoas: ^[10]

- Aquelas cujo processo de assimilação ou cujo metabolismo se encontra perturbado;
- As que se encontram em condições fisiológicas especiais e que, por esse facto, podem retirar particulares benefícios da ingestão controlada de certas substâncias contidas nos alimentos;
- Lactentes ou crianças de um a três anos de idade em bom estado de saúde.

Apesar de não ser incomum a dispensa de produtos adaptados a necessidades nutricionais especiais (produtos híper ou hipocalóricos, entre outros), os produtos adaptados às necessidades nutricionais de lactentes são os que possuem uma maior expressão na Farmácia Tavares. Entre os disponíveis é de destacar os leites e farinhas infantis.

Os leites infantis dividem-se em três categorias: leites para latentes, leites e fórmulas de transição e leites adaptados a fins medicinais específicos (anti-regurgitantes, hipoalergénicos, entre outros). Como o leque de leites e fórmulas infantis disponível é bastante diversificado, a escolha é normalmente feita com base em indicações dadas pelo pediatra da criança, tendo em conta que nenhuma das fórmulas existentes substitui plenamente a amamentação materna e que o encorajamento à mesma deve ser sempre realizado.

Já ao nível das farinhas infantis, existem farinhas lácteas (para preparar com leite) e farinhas com leite adaptado que complementam as necessidades nutricionais dos quatro aos doze meses. Estas podem conter ou não glúten.

9.3 - Fitoterapia e suplementos nutricionais (nutracêuticos)

Etimologicamente a fitoterapia pode ser definida como a ciência que estuda as plantas medicinais e a sua aplicação na cura e prevenção de doenças. ^[11] Apesar de não possuírem procura significativa, os medicamentos à base de plantas são, em alguns casos, uma

alternativa viável para as pessoas que procuram um tratamento que não seja baseado em produtos químicos.

Apesar de serem considerados produtos naturais, os medicamentos à base de plantas não se encontram isentos de efeitos adversos ou de interação farmacológica com medicação concomitante. É por isso importante que o farmacêutico, como profissional do medicamento, esteja atento a esta questão muito comumente esquecida por outros profissionais de saúde e que, dentro das suas capacidades, tente identificar potenciais problemas com génese em produtos fitoterápicos.

Na Farmácia Tavares, a procura por este tipo de produto tem pouca expressão, estando circunscrita, na maior parte das vezes, para tratamento de situações de obstipação, rouquidão, irritação da garganta, insónias e ansiedade ligeira.

Por sua vez, os suplementos alimentares são produtos que servem de adjuvantes de uma dieta equilibrada, não sendo no entanto substitutos da mesma. Possuem como finalidade ajudar o organismo a restabelecer as necessidades eletrolíticas e nutricionais, em épocas de intenso esforço físico ou psicológico. Existem ainda suplementos alimentares cuja principal função é ajudar a alcançar uma diminuição de peso de forma rápida e relativamente saudável.

A procura destes produtos é significativa ao longo do ano, apresentando picos de consumo durante as épocas tipicamente de exames e início do verão. Tal como acontece na dispensa dos produtos fitoterápicos, o farmacêutico deve também ter em atenção que o uso de suplementos alimentares não é inócuo de efeitos adversos, devendo promover junto dos utentes um uso responsável dos mesmos.

A Farmácia Tavares trabalha com bastante sucesso três linhas distintas de suplementos alimentares: a linha Easyslim®, a Advancis® e a Absorvit®. O sucesso destas linhas na farmácia pode ser explicado pela satisfação demonstrada pelos utentes que experimentam, pela possibilidade dos produtos serem tomados tanto por hipertensos como por diabéticos e pela existência na farmácia de um programa de emagrecimento (coordenado e supervisionado por uma nutricionista) que usa estes produtos como base de um plano saudável de perda de peso.

10. Medicamentos de uso veterinário

Um medicamento de uso veterinário pode ser entendido como *“toda a substância ou associação de substâncias, apresentada como possuindo propriedades curativas ou preventivas de doenças em animais ou dos seus sintomas, ou que possa ser utilizada ou*

Determinação de Tetrahydrocannabinol e principais metabolitos em amostras de plasma com recurso à microextração em seringa empacotada e análise por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de espectrometria de massa em tandem.

administrada no animal com vista a estabelecer um diagnóstico médico-veterinário ou, exercendo uma ação farmacológica, imunológica ou metabólica, a restaurar, corrigir ou modificar funções fisiológicas." [11]

A maior parte dos medicamentos de uso veterinário cedidos na Farmácia Tavares destinam-se à desparasitação interna e externa e ao controlo reprodutivo dos animais de companhia, sobretudo cães e gatos. Antibióticos de largo espetro, como a Terramicina® em pó e em spray, são esporadicamente dispensados para combater e prevenir a progressão de infeções em animais de explorações agropecuárias.

Na dispensa deste tipo de produtos, o farmacêutico deve alertar o utente para as posologias aconselhadas, forma de utilização e outros pormenores que devem ser tidos em conta aquando da administração de substâncias medicamentosas a animais. É também importante desencorajar a administração de medicamentos de uso humano a animais sem acompanhamento clínico.

11. Dispositivos médicos

Um dispositivo médico é *“qualquer instrumento, aparelho, equipamento, software, material ou artigo utilizado isoladamente ou em combinação, incluindo o software destinado pelo seu fabricante a ser utilizado especificamente para fins de diagnóstico ou terapêuticos e que seja necessário para o bom funcionamento do dispositivo médico, cujo principal efeito pretendido no corpo humano não seja alcançado por meios farmacológicos, imunológicos ou metabólicos, embora a sua função possa ser apoiada por esses meios, destinado pelo fabricante a ser utilizado em seres humanos para fins de:* [13]

- *Diagnóstico, prevenção, controlo, tratamento ou atenuação de uma doença;*
- *Diagnóstico, controlo, tratamento, atenuação ou compensação de uma lesão ou de uma deficiência;*
- *Estudo, substituição ou alteração da anatomia ou de um processo fisiológico;*
- *Controlo da conceção”.*

Os dispositivos médicos são ainda integrados em classes (I, IIa, IIb e III), tendo em conta a duração do contacto com o corpo humano, a invasibilidade do corpo humano, a anatomia afetada pela utilização e os potenciais riscos decorrentes da conceção, técnica e fabrico destes. [13] Assim temos:

- Dispositivos médicos de classe I - dispositivos de baixo risco (meias de compressão, fraldas para incontinência, canadianas e muletas, ligaduras, entre outros);
- Dispositivos médicos de classe IIa e IIb - dispositivos de médio risco, sendo os de classe IIa de baixo médio risco (pessários vaginais, lancetas, agulhas das seringas, entre outros) e os de classe IIb de alto médio risco (canetas de insulina, preservativos masculinos, diafragmas e outros);
- Dispositivos médicos de classe III - dispositivos de alto risco (pensos com medicamentos, preservativos com espermicida, entre outros);

Na Farmácia Tavares existe uma vasta gama de dispositivos médicos, sendo de grande importância conhecer as suas especificidades, pois só assim é possível um correto aconselhamento e dispensa ao utente. Os mais frequentemente dispensados são fraldas masculinas para incontinência, pulsos, meias e joelheiras elásticas, corretores de joanetes, protetores de calos, frascos para colheita de urina asséptica, ligaduras, preservativos masculinos, testes de gravidez, tiras para determinação da glicémia e lancetas.

12. Outros cuidados de saúde prestados na Farmácia Tavares

Encontra-se estabelecido no regime jurídico das farmácias comunitárias a possibilidade destas prestarem serviços farmacêuticos de promoção de saúde e do bem-estar dos utentes. Os serviços farmacêuticos que podem ser prestados pelas farmácias são os seguintes: ^[14]

- Apoio domiciliário;
- Prestação de primeiros socorros;
- Administração de medicamentos;
- Utilização de meios auxiliares de diagnóstico e terapêutica;
- Administração de vacinas não incluídas no Plano Nacional de Vacinação;
- Programas de cuidados farmacêuticos;
- Campanhas de informação;
- Colaboração em programas de educação para a saúde.

Para proceder à prestação destes serviços, as farmácias precisam de dispor não só de instalações específicas e apropriadas, mas também de profissionais de saúde legalmente habilitados.

Determinação de Tetrahydrocannabinol e principais metabolitos em amostras de plasma com recurso à microextração em seringa empacotada e análise por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de espectrometria de massa em tandem.

Esta é a grande área de aposta das farmácias comunitárias hoje em dia, com o farmacêutico a assumir um papel cada vez mais ativo e responsável na promoção da saúde pública. No que concerne à Farmácia Tavares a avaliação do índice de glicémia, de colesterol total, de triglicéridos, de ácido úrico, a avaliação da tensão arterial e a administração de vacinas são os Serviços Farmacêuticos mais frequentemente prestados.

Para cada uma das determinações acima inumeradas existem intervalos de valores considerados normais, devendo o farmacêutico conhecer esse intervalo e detetar os casos em que os valores medidos se afastam do mesmo. Quando tal acontece, a diferença do valor obtido em relação aos valores médios determina as ações a empreender, se a diferença for mínima deve-se prestar aconselhamento, tal como enfatizar a importância de uma dieta saudável e da adesão à terapêutica. Por outro lado, se o valor obtido se afastar muito dos valores considerados de referência, o farmacêutico deve proceder não só ao aconselhamento mas também à referenciação médica.

Todos os valores obtidos são registados num cartão unipessoal que a farmácia oferece aos utentes e que permite seguir a evolução dos parâmetros medidos ao longo do tempo.

Durante o meu estágio tive a oportunidade de prestar todos estes serviços, com exceção da administração de injetáveis, sendo a avaliação da tensão arterial e da glicémia capilar os que mais vezes realizei.

13. Preparação de medicamentos

13.1 - Medicamentos manipulados

Não obstante à industrialização generalizada do mundo atual, os medicamentos preparados em pequena escala nas farmácias comunitárias e hospitalares - habitualmente designados medicamentos manipulados - têm importância na terapêutica. Apesar de os tempos da preparação exclusiva em escala oficial se encontrarem já muito distantes, reservam-se inúmeras situações para as quais os medicamentos manipulados são imprescindíveis. Estes medicamentos ocupam um lugar próprio no arsenal terapêutico moderno, complementando os disponibilizados pela indústria farmacêutica. ^[15]

Entende-se por medicamento manipulado *“qualquer fórmula magistral ou preparado oficial, preparado e dispensado sob a responsabilidade de um farmacêutico”*, sendo que uma fórmula magistral *“é um medicamento preparado em farmácia comunitária ou nos serviços farmacêuticos hospitalares segundo receita médica que especifica o doente a quem o medicamento se destina,”* e um preparado oficial *“é um medicamento preparado segundo as indicações compendiais, de uma farmacopeia ou de um formulário, em farmácia de oficina*

ou nos Serviços Farmacêuticos hospitalares, destinado a ser dispensado diretamente aos doentes assistidos por essa farmácia ou serviço.” ^[5]

O descondicionamento de especialidades farmacêuticas para preparação de manipulados pode realizar-se apenas se não existir no mercado especialidade farmacêutica com igual dosagem, ou apresentada sob a forma farmacêutica pretendida, e só nos seguintes casos: ^[5]

- Medicamentos manipulados de aplicação cutânea;
- Medicamentos manipulados preparados com vista à adequação de uma dose destinada a uso pediátrico;
- Medicamentos manipulados destinados a grupos de doentes em que as condições de administração ou de farmacocinética se encontrem alteradas.

Aquando da preparação de um medicamento manipulado, o farmacêutico deve assegurar-se da qualidade da preparação e deve ainda verificar a segurança do medicamento, no que concerne às doses da ou das substâncias ativas e à existência de interações que ponham em causa a ação ou segurança do medicamento. ^[5]

É também da responsabilidade do farmacêutico a verificação e garantia da qualidade de todas as matérias-primas utilizadas na preparação de um medicamento manipulado. Para tal, no ato da receção da encomenda este deve: ^[16]

- Verificar o boletim de análise;
- Verificar se a matéria-prima rececionada corresponde à encomendada;
- Verificar a embalagem quanto à sua integridade e quanto à satisfação das condições de higiene e das exigências de conservação estabelecidas para a matéria-prima em causa.

É ainda necessário manter na farmácia uma ficha de receção de matérias-primas onde se encontra indicando o seu nome, data de encomenda, nome do fornecedor, lote, origem, prazo de validade e características analíticas. Todas as matérias-primas devem ser armazenadas em local próprio, ao abrigo da luz e com condições de temperatura e humidade controladas.

Quando se prepara um manipulado tem de se preencher e assinar a ficha de preparação de manipulado, que irá ficar arquivada na farmácia com uma cópia da receita e do rótulo.

Após a preparação deve-se proceder a algumas verificações necessárias de forma a garantir a boa qualidade do medicamento manipulado, estas análises devem incluir, no mínimo, uma verificação das suas características organoléticas.

Determinação de Tetrahydrocannabinol e principais metabolitos em amostras de plasma com recurso à microextração em seringa empacotada e análise por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de espectrometria de massa em tandem.

O preço do manipulado é calculado através de uma fórmula determinada por lei. Para calcular o preço final do manipulado tem de se ter em conta o valor das matérias-primas, o valor do material de acondicionamento e o valor dos honorários. A esse somatório temos ainda de acrescentar o imposto sobre o valor acrescentado (IVA).

O cálculo do valor das matérias-primas, do material de acondicionamento e do material de rotulagem depende do valor de aquisição destes. O valor dos honorários é um fator fixo que é multiplicado em função da forma farmacêutica e quantidade preparada.

Depois de completamente preenchida a ficha de preparação do manipulado, procede-se à preparação do rótulo, que deve conter: ^[16]

- Nome do doente (no caso de se tratar de uma fórmula magistral);
- Fórmula do medicamento manipulado prescrita pelo médico;
- Número do lote atribuído ao medicamento preparado;
- Prazo de utilização do medicamento preparado;
- Condições de conservação do medicamento preparado;
- Instruções especiais, eventualmente indispensáveis para a utilização do medicamento, como por exemplo, “agite antes de usar”, “uso externo” (em fundo vermelho), etc.;
- Via de administração;
- Posologia;
- Identificação da farmácia;
- Identificação do farmacêutico diretor técnico.

Na Farmácia Tavares a preparação de medicamentos manipulados é residual, tendo sido preparadas apenas duas vaselinas saliciladas e um álcool boricado à saturação durante todo o tempo de estágio.

13.2 - Preparação extemporânea de especialidades farmacêuticas

Também as preparações extemporâneas são efetuadas na farmácia no momento da dispensa. Durante o decorrer do meu estágio tive a oportunidade de realizar inúmeras preparações extemporâneas de suspensões orais de antibióticos.

Nestas situações é importante garantir que o produto se encontra uniformemente suspenso na correta quantidade de água destilada. É também necessário facultar ao utente alguns conselhos adicionais no momento da dispensa, como alertar para o prazo de utilização, forma

de acondicionamento (preferencialmente sobre refrigeração) e forma de uso (agitar antes de usar).

14. Processamento do receituário e faturação de entidades participadoras

Para que a farmácia seja reembolsada dos valores da participação dos medicamentos dispensados com receita médica, é necessário que sejam dispensados os medicamentos prescritos, com o organismo correspondente e que a receita esteja válida.

O Sifarma 2000 numera as receitas, à medida que vão sendo aviadas, por número de receita e lote de organismo. Quando um lote atinge as 30 receitas, é iniciado um novo lote nesse organismo.

14.1 - Separação e conferência de receituário

As receitas são primeiro separadas por organismos e posteriormente por lotes, para facilitar a conferência.

A conferência das receitas é muito importante, pois é nessa tarefa que se podem detetar eventuais erros, com os quais a farmácia não ia obter participação. Aqui, todos os pontos da receita são verificados, como identificação do doente e número de beneficiário, identificação do médico e local de prescrição, validade da receita, assinatura do médico, assinatura do utente, participação aplicada (organismo) e ainda se os medicamentos prescritos foram os dispensados. Face à deteção de alguma não conformidade que seja prejudicial para o utente, este deverá ser contactado de forma a reverter a situação o mais brevemente possível, evitando-se as consequências negativas que poderiam advir do erro cometido.

As receitas de cada lote são ordenadas, para ser mais fácil perceber se alguma receita está em falta. Se for o caso, é necessário proceder a uma averiguação para determinar o motivo da falta da receita, ou simplesmente procurar a mesma de forma a coloca-la no respetivo lote.

Só após o envio e aceitação do receituário é que as farmácias recebem o reembolso com as participações respetivas. Caso tenha ocorrido algum problema com as receitas, são devolvidas à farmácia, não se procedendo ao reembolso da participação.

14.2 - Emissão do verbete de identificação do lote

Após a conferência e organização das receitas por lote é emitido um verbete de identificação do lote. Este possui informações acerca da entidade de faturação, o nome e código da farmácia, ano e mês respetivos, número sequencial do lote, quantidade total de receitas, preço de venda ao público (PVP) total do lote, total do lote pago pelo utente e total de participação do lote.

É extremamente necessário confirmar se o número total de receitas está correto, sendo depois o verbete carimbado e anexado às receitas daquele lote.

Após emissão de todos os verbetes é emitida, no final do mês, a relação resumo dos lotes conjuntamente com a fatura, em quadruplicado. Uma destas cópias fica arquivada na farmácia.

As receitas do Sistema Nacional de Saúde são levantadas por um estafeta dos correios, no dia 5 de cada mês, e têm como destino o centro de conferências de faturas da Maia. Dos documentos enviados, são devolvidos à farmácia uma via da relação resumo de lotes e duas vias da fatura mensal, devidamente carimbadas. Uma das faturas é arquivada na farmácia, enquanto outra segue para a ANF para que seja processado o reembolso respeitante às participações.

As receitas das restantes entidades de saúde são enviadas para a ANF, que reembolsa as farmácias pelas participações efetuadas, interagindo assim com os organismos responsáveis em representação das farmácias.

Apesar de serem verificadas várias vezes e por várias pessoas, algumas receitas não são aceites como válidas, sendo devolvidas à farmácia para que sejam corrigidas e reintroduzidas, dentro do possível.

Apesar de extremamente importante para a saúde económica das farmácias, o processamento de receituário foi sem qualquer dúvida a tarefa que menos gostei de realizar. Não obstante, todo este processo esteve presente em todos os dias do meu estágio e foi-me dada a oportunidade de conhecer e realizar todos os passos anteriormente descritos.

15. Formações

Devido às constantes alterações de produtos no mercado farmacêutico e avanço nos conhecimentos de saúde, a formação contínua é algo essencial para o bom desempenho das funções que nos são confiadas enquanto profissionais de saúde e do medicamento.

Durante o meu estágio na Farmácia Tavares foi-me dada a oportunidade de assistir a palestras, ações de formação e sessões de esclarecimento sobre vários produtos. Destaco as ações de formação dadas pela Glintt, sobre o sifarma 2000; pela Nestlé®, sobre a importância da alimentação no primeiro ano de vida, na gravidez, na população geriátrica e outras populações especiais; pela Caudalie®, uma breve explicação sobre as várias linhas dos seus produtos; pela Lilly®, sobre a utilização do Cialis® 5mg para tratamento dos sinais e sintomas da Hiperplasia Benigna da próstata (HBP) e da Zambon®, sobre os benefícios do Spidifen®.

Considerações finais

Durante o período de estágio realizado na Farmácia Tavares foi-me dada a oportunidade de conhecer e de me familiarizar com os procedimentos mais comuns numa farmácia.

Durante este tempo fui capaz de me aperceber que os conhecimentos adquiridos ao longo dos cinco anos do curso, apesar de extremamente importantes, não são suficientes para preparar um farmacêutico para o mundo de trabalho.

Os constantes desafios encontrados e as diferentes situações com as quais fui confrontado, mostraram que a ideia existente de um farmacêutico a dispensar uma “caixa”, não é de todo a que melhor espelha o importante trabalho por nós realizado. O aconselhamento farmacêutico é talvez o ato que mais distingue a profissão farmacêutica, sendo a farmácia um local chave e de enorme importância para a promoção da saúde pública.

Todo o estágio foi para mim uma enorme e prazerosa aventura, tendo sido um período de grande assimilação de conhecimentos e experiências. Realizei com o maior empenho possível todas as tarefas que me foram propostas, tendo as minhas expectativas sido superadas em muitos aspetos.

De uma forma geral posso afirmar, sem qualquer sombra de dúvidas, que o tempo passado na Farmácia Tavares fez de mim melhor pessoa e melhor profissional.

Referências bibliográficas

1. Ordem dos farmacêuticos - Conselho nacional da qualidade. *Boas Práticas Farmacêuticas para a farmácia comunitária*, 2009.
2. Decreto-Lei nº 307/2007, de 31 de Agosto. Reorganização jurídica do sector das farmácias.
3. INFARMED. Legislação Farmacêutica Compilada, Decreto-Lei nº 176/2006, de 30 de Agosto. Estatuto do Medicamento.
4. INFARMED. *Psicotrópicos e Estupefacientes*. [Online]. 2010 [Citação: 3 de Outubro de 2010]. Disponível em: http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/PUBLICACOES/TEMATICOS/SAIBA_MAISSOBRE/SAIBA_MAISSOBRE_ARQUIVO/22_Psicotropicos_Estupefacientes.pdf.
5. INFARMED. Legislação Farmacêutica Compilada, Decreto-Lei nº 95/2004, de 22 de Abril. Regulação da prescrição e da preparação de medicamentos manipulados.
6. INFARMED. Legislação Farmacêutica Compilada, Decreto-Lei nº 176/2006, de 30 de Agosto. Estatuto do Medicamento.
7. INFARMED. *Produtos Farmacêuticos Homeopáticos*. [Online]. [Citação: 18 de Outubro de 2013]. Disponível em: http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/MEDICAMENTOS_USO_HUMANO/AUTORIZACAO_DE_INTRODUCAO_NO_MERCADO/PRODUTOS_FARMACEUTICOS_HOMEOPATICOS.
8. INFARMED. *Normas relativas à dispensa de medicamentos e produtos de saúde*. [Online]. 2012 [Citação: 17 de Outubro de 2013]. Disponível em: http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/MEDICAMENTOS_USO_HUMANO/PRESCRICAO_DISPENSA_E_UTILIZACAO/20130117_NORMAS_DISPENSA_vFINAL.pdf.
9. INFARMED. *Produtos Cosméticos*. [Online]. [Citação: 10 de Outubro de 2013]. Disponível em: <http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/COSMETICOS>.
10. Decreto-Lei nº 307/2007, de 22 de Junho. Aperfeiçoamento do regime jurídico aplicável aos géneros alimentícios destinados a uma alimentação especial.
11. Fitoterapia. [Online]. [Citação: 10 de Outubro de 2013]. Disponível em: http://www.fitoterapia.net/portada/portada_editor.php
12. Decreto-Lei nº 148/2008, de 29 de Julho. Aperfeiçoamento do regime jurídico aplicável aos medicamentos veterinários.
13. Decreto-Lei nº 145/2009, de 14 de Junho. Aperfeiçoamento do regime jurídico aplicável aos dispositivos médicos.
14. Portaria nº 1429/2007, de 2 de Novembro. Definição dos Serviços Farmacêuticos que podem ser prestados pelas farmácias.

15. Ordem dos Farmacêuticos. *Boletim do Centro de informação do medicamento - Março/Abril 2009*. [online]. 2009 [Citação: 11 de Outubro de 2013]. Disponível em: http://www.ordemfarmaceuticos.pt/xFiles/scContentDeployer_pt/docs/Doc6263.pdf
16. INFARMED. Legislação Farmacêutica Compilada, Portaria nº 594/2004, de 2 de Junho. Boas práticas a observar na preparação de medicamentos manipulados em farmácia de oficina e hospitalar.

Determinação de Tetrahydrocannabinol e principais metabolitos em amostras de plasma com recurso à microextração em seringa empacotada e análise por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de espectrometria de massa em tandem.

PARTE II

Relatório de estágio em farmácia hospitalar

Introdução

Os Serviços Farmacêuticos Hospitalares, vulgarmente referidos como farmácia hospitalar, são uma estrutura importante dos cuidados de saúde dispensados em meio hospitalar. Designa-se por farmácia hospitalar “o conjunto de atividades farmacêuticas exercidas em organismos hospitalares ou serviços a eles ligados para colaborar nas funções de assistência que pertencem a esses organismos e serviços e promover a ação de investigação científica e de ensino que lhes couber.” [1]

Entre as responsabilidades dos Serviços Farmacêuticos Hospitalares encontram-se:[2]

- A gestão (seleção, aquisição, armazenamento e distribuição) dos medicamentos;
- A gestão de outros produtos farmacêuticos (dispositivos médicos, reagentes, gases medicinais, etc.);
- A implementação e monitorização da política de medicamentos, definida no Formulário Hospitalar Nacional de Medicamentos e pela Comissão de Farmácia e Terapêutica;
- A gestão dos medicamentos experimentais e dos dispositivos utilizados para a sua administração, bem como os demais medicamentos já autorizados, eventualmente necessários ou complementares à realização dos ensaios.

De forma a compreender melhor todas as responsabilidades, obrigações e tarefas desempenhadas por um farmacêutico hospitalar, foi realizado, no âmbito do estágio curricular do 5º ano do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade da Beira Interior, um estágio em Farmácia Hospitalar na Unidade Local de Saúde (ULS) da Guarda, mais concretamente no Hospital Sousa Martins, entre os dias 4 de Fevereiro e 22 de Março de 2013.

O presente relatório descreve as atividades realizadas e os conhecimentos adquiridos durante a realização do mesmo.

1. Caracterização da ULS da Guarda, E.P.E.

A ULS da Guarda foi criada, por decreto lei, a 1 de Outubro de 2008 [3] como parte integrante de um processo de remodelação do Sistema Nacional de Saúde (SNS), que permitiu a integração numa única entidade pública empresarial dos Hospitais de Sousa Martins, Guarda,

de Nossa Senhora da Assunção, Seia, e dos centros de saúde do distrito da Guarda, com exceção dos centros de saúde de Vila Nova de Foz Côa e de Aguiar da Beira. [3]

Possui como missão proporcionar e prestar, à população de abrangência, cuidados de saúde de qualidade, em tempo oportuno e em ambiente humanizado, num projeto partilhado e global que visa a obtenção de qualidade, acessibilidade, eficácia e eficiência sustentáveis. [4]

2. Os Serviços Farmacêuticos da ULS da Guarda, E.P.E

2.1 - Localização e Caracterização

Aquando da implementação de Serviços Farmacêuticos numa unidade de saúde é necessário ter em conta a localização dos mesmos. Esta deverá, sempre que possível, observar os seguintes pressupostos: [2]

- Facilidade de acesso externo e interno;
- Implantação de todas as áreas, incluindo os armazéns, no mesmo piso;
- O setor de distribuição de medicamentos a doentes de ambulatório, se existir, deverá localizar-se próximo da circulação normal dos doentes;
- Proximidade com os sistemas de circulação vertical como monta-cargas e elevadores.

Os Serviços Farmacêuticos da ULS da Guarda localizam-se no piso inferior do edifício principal do Hospital Sousa Martins. Facilmente acessíveis a partir das traseiras, são constituídos por: sala de ambulatório (que é também a sala de trabalho dos farmacêuticos); gabinete do diretor do serviço; sala de arquivos e biblioteca; vestiário; laboratório destinado à preparação de manipulados; área suja; serviços administrativos; zona de receção de encomendas; sala de reembalagem; sala de distribuição; sala de convívio do pessoal e dois armazéns.

O horário de funcionamento e atendimento ao público é das 9:00 até às 18:00 horas, sendo destacado um farmacêutico durante a noite, feriados e fins-de-semana, que assegura os serviços essenciais da farmácia.

3. Organização e gestão dos Serviços Farmacêuticos

3.1 - Gestão de recursos humanos

Os recursos humanos são a base essencial dos Serviços Farmacêuticos Hospitalares, pelo que é necessária a dotação destes serviços em meios humanos adequados, quer em número, quer em qualidade. ^[2]

Nos Serviços Farmacêuticos do Hospital Sousa Martins cada profissional possui funções específicas, podendo ocorrer uma alteração das mesmas, dentro das responsabilidades e capacidades de cada classe profissional, em casos de necessidade pontuais.

A equipa que faz parte do serviço é constituída por sete farmacêuticos, cinco técnicos de diagnóstico e terapêutica, dois auxiliares e três administrativos.

O cargo de diretor é assegurado por um farmacêutico, o Doutor Jorge Aperta, que responde de forma hierárquica ao conselho de administração. Para garantir o funcionamento ininterrupto dos serviços farmacêuticos, na ausência deste as suas funções são desempenhadas pela Doutora Célia Bidarra.

3.2 - Gestão de existências

A gestão de medicamentos é o conjunto de procedimentos realizados pelos Serviços Farmacêuticos Hospitalares, que garantem o bom uso e dispensa dos medicamentos em perfeitas condições aos doentes do hospital. Esta possui várias fases, começando na seleção dos medicamentos, aquisição, receção e armazenagem, passando pela distribuição e acabando na administração do mesmo ao doente. ^[2]

Os Serviços Farmacêuticos hospitalares possuem um papel preponderante ao longo de todo o processo de gestão dos medicamentos, competindo também a estes, entre outras funções, a seleção e aquisição dos demais produtos farmacêuticos e dispositivos médicos. ^[2]

De forma a facilitar todos estes processos, o Hospital Sousa Martins disponibiliza para os farmacêuticos hospitalares o *software* de gestão ALERT[®], que é um programa informático que permite facilitar o controlo do aprovisionamento nos Serviços Farmacêuticos.

3.3 - Sistemas e critérios de seleção e aquisição

A seleção de medicamentos a adquirir pelo hospital deve ter por base o Formulário Hospitalar Nacional de Medicamentos (FHNM) e as necessidades terapêuticas dos doentes do hospital.

Os medicamentos não incluídos no FHNM e que sejam considerados necessários, devem ser incluídos na adenda ao FHNM do hospital, sendo que a sua inclusão é feita pela Comissão de Farmácia e Terapêutica, baseada nas necessidades terapêuticas dos doentes, melhoria da sua qualidade de via e em critérios fármaco-económicos.^[2] Outros critérios como a classificação ABC e a regularidade do consumo devem ser também tomados em conta aquando da seleção dos medicamentos a adquirir.

Com base no histórico de consumos, *stock* de segurança, preço unitário do produto e outras condições impostas pelos fornecedores, é definido, para cada produto, um ponto de encomenda (momento em que se deverá efetuar uma nova encomenda).

No Hospital Sousa Martins o farmacêutico responsável pelas encomendas, ou o seu substituto em caso de ausência do primeiro, analisa todos os dias quais os medicamentos cuja aquisição é necessária. Para isto é gerada pelo ALERT[®], de forma automática, uma lista com todos os produtos que se encontram abaixo do ponto de encomenda, que é rigorosamente analisada pelo farmacêutico de forma a determinar os produtos e quantidades dos mesmos a adquirir.

Concluída a análise e definidos os produtos e quantidades a encomendar é gerada uma lista final que é entregue nos serviços administrativos, que por sua vez elaboram os pedidos. Após a validação dos pedidos pelo farmacêutico responsável, estes são encaminhados para a contabilidade para assim se obter um número de compromisso da encomenda e se poder efetuar a compra.

Todo o processo de aquisição de produtos acima referido pressupõe uma escolha prévia dos fornecedores a quem efetuar os pedidos. Todos os anos os Serviços Farmacêuticos do Hospital Sousa Martins elaboram uma lista com as previsões de consumo dos vários produtos a cargo da farmácia hospitalar. Posto isto, são enviados a vários fornecedores pedidos de orçamento, sendo cada proposta analisada e feita a adjudicação àquela que melhor reflete os interesses do hospital.

Existem no entanto algumas exceções a este procedimento de aquisição. Certos produtos, como é o caso dos medicamentos com Autorização de Utilização Especial (AUE), os estupefacientes, os psicotrópicos, as benzodiazepinas, os hemoderivados e os gases medicinais, requerem aquisições especiais.

A dispensa e comercialização de medicamentos que não possuem Autorização de Introdução no Mercado (AIM) ou registo válido em Portugal pode ser autorizada pelo INFARMED, por

Determinação de Tetrahydrocannabinol e principais metabolitos em amostras de plasma com recurso à microextração em seringa empacotada e análise por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de espectrometria de massa em tandem.

razões fundamentadas de saúde pública, através da conceção de uma AUE. ^[5] Uma cópia da AUE deve ser enviada ao fornecedor, juntamente com o pedido de encomenda, para que este possa então proceder à entrega do medicamento.

Para a aquisição de substâncias e suas preparações compreendidas nas tabelas I, II, III e IV, com exceção da II-A, anexas ao Decreto-Lei nº15/93 de 22 de Janeiro, é necessário, segundo a portaria nº 981/98 de 8 de Junho ^[6], proceder ao preenchimento de uma folha de requisição destas substâncias (ver Anexo I), que deve ser entregue juntamente com a nota de encomenda.

Foi ainda possível acompanhar, durante a realização do estágio, o procedimento de aquisição de gases medicinais. Apesar de ser uma área que apenas recentemente passou a domínio farmacêutico, encontra-se já aplicado no Hospital Sousa Martins um procedimento bem definido de aquisição dos mesmos. O farmacêutico responsável por esta área verifica todos os dias o nível dos gases nos reservatórios do hospital, bem como o número de unidades móveis (botijas) existentes. Quando os níveis dos gases se encontram abaixo de um limite anteriormente definido, procede-se, com o apoio dos administrativos, à realização da encomenda junto do fornecedor.

É também de salientar que em situações especiais ou de urgência comprovada, é possível a aquisição de produtos por empréstimo com outros hospitais ou por compra a fornecedores locais, como por exemplo à farmácia comunitária. Esta última situação foi particularmente visível durante a realização do estágio, em que a farmácia hospitalar procedeu, com relativa frequência, à compra de produtos junto de uma farmácia localizada perto do hospital.

3.4 - Receção e conferência de produtos adquiridos

Atendendo ao circuito do medicamento, a receção de encomendas no Hospital Sousa Martins é feita numa área específica que possui acesso direto ao exterior e ligação facilitada aos locais de armazenamento.

A receção é feita por um técnico de diagnóstico e terapêutica, que tem por responsabilidade a conferência qualitativa e quantitativa da mesma, devendo comparar as informações contidas na fatura ou guia de transporte com as da nota de encomenda. O registo informático das encomendas rececionadas é feito pelos administrativos.

Este é o procedimento geral de receção, no entanto existem produtos cuja receção é da responsabilidade do farmacêutico hospitalar. Entre estes encontram-se os psicotrópicos, os estupefacientes, as benzodiazepinas, os hemoderivados e os fármacos de ensaios clínicos. As encomendas relativas a psicotrópicos, estupefacientes e benzodiazepinas devem vir acompanhadas da folha de requisição (ver Anexo I) devidamente preenchida, sendo

posteriormente arquivada pelos Serviços Farmacêuticos. Por sua vez, os hemoderivados, devem vir obrigatoriamente acompanhados dos boletins de análise e certificados de aprovação emitidos pelo INFARMED.

3.5 - Armazenamento

O armazenamento de medicamentos, produtos farmacêuticos e dispositivos médicos deve ser feito de modo a garantir as condições necessárias de espaço, luz, temperatura, humidade e segurança que estes necessitam para um correto armazenamento. [2]

No Hospital Sousa Martins, os Serviços Farmacêuticos possuem dois espaços principais de armazenamento. Num armazém são guardados os medicamentos, os antídotos, os suplementos dietéticos, a alimentação parentérica e entérica, os pensos terapêuticos e os anticoncepcionais. Neste armazém, existem ainda áreas reservadas ao armazenamento dos medicamentos psiquiátricos, dos medicamentos com elevado nível de rotação e/ou volumosos, uma arca para armazenamento de plasma e frigoríficos de armazenamento de hemoderivados, citotóxicos, medicamentos termolábeis e vacinas. Tanto a arca como os vários frigoríficos possuem um sistema de controlo de temperaturas. No segundo armazém encontram-se armazenados os soros, água destilada e desinfetantes.

Todos os produtos encontram-se armazenados por ordem alfabética da sua denominação comum internacional, quando aplicável.

A farmácia dispõe ainda de um cofre para armazenamento dos estupefacientes e psicotrópicos, um armário com chave para armazenamento de benzodiazepinas e outros armários individuais onde são guardados os produtos com AUE e citotóxicos que não precisam de refrigeração. Os gases medicinais encontram-se armazenados à parte, numa outra zona do hospital. Apesar de estar contemplado por lei, o armazenamento e arrumação de produtos inflamáveis não é feito em separado.

Em todos os casos a arrumação dos produtos segue a regra *first in first out*, de forma a ser evitado o seu desperdício por expiração da data de validade.

4. Distribuição

A distribuição de medicamentos envolve um conjunto de processos específicos que asseguram de forma imediata e eficaz a disponibilidade dos produtos farmacêuticos, tanto para os serviços hospitalares como para o regime de ambulatório.

Determinação de Tetrahydrocannabinol e principais metabolitos em amostras de plasma com recurso à microextração em seringa empacotada e análise por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de espectrometria de massa em tandem.

A distribuição de medicamentos tem como objetivos: ^[2]

- Garantir o cumprimento da prescrição;
- Racionalizar a distribuição dos medicamentos;
- Garantir a administração correta do medicamento;
- Diminuir os erros relacionados com a medicação (administração de medicamentos não prescritos, troca da via de administração, erros de doses, entre outros.);
- Monitorizar a terapêutica;
- Reduzir o tempo de enfermaria dedicado às tarefas administrativas e manipulação dos medicamentos;
- Racionalizar os custos com a terapêutica.

Nos Serviços Farmacêuticos hospitalares existem diferentes sistemas de distribuição e dispensa, sendo necessária a distinção entre: ^[2]

- Distribuição a doentes em regime de internamento:
 - Sistema de distribuição clássica;
 - Sistema de reposição de *stocks* nivelados;
 - Sistema de distribuição em dose unitária e/ou individual.
- Distribuição a doentes em regime de ambulatório;
- Dispensa de medicamentos e dispositivos médicos ao público;
- Dispensa de medicamentos sujeitos a legislação restritiva, como:
 - Estupefacientes, psicotrópicos e benzodiazepinas;
 - Hemoderivados.

4.1 - Distribuição clássica

A distribuição clássica consiste da dispensa periódica de medicamentos aos serviços, num período de tempo previamente acordado entre o enfermeiro chefe e o farmacêutico responsáveis pelo serviço. Pela aplicação deste modelo, cada enfermaria dispõe de um *stock* de medicamentos e outros produtos farmacêuticos, que é controlado pelo pessoal de enfermagem. ^[7]

Este modelo de distribuição possui alguns inconvenientes associados, nomeadamente a acumulação desnecessária de determinados produtos em *stock*, o desperdício não controlado e a falta de intervenção do farmacêutico no perfil farmacoterapêutico do doente. ^[7]

No Hospital Sousa Martins, este tipo de distribuição é aplicada aos antissépticos, desinfetantes, soros e injetáveis de grande volume.

4.2 - Reposição de *stocks* nivelados

A reposição de *stocks* nivelados, ou por níveis, é um sistema de distribuição mais avançado do que a distribuição clássica. Cada enfermaria possui um *stock* de medicamentos, fixo e controlado, adaptado às patologias habitualmente tratadas ^[7] e aos consumos habituais.

A constituição desses *stocks*, quanto aos medicamentos selecionados e respetiva quantidade, é feita por acordo entre os médicos, farmacêuticos e enfermeiros responsáveis pelo serviço. ^[2]

No Hospital Sousa Martins, a reposição de *stocks* nivelados é feita semanalmente. Após a verificação de existências na enfermaria, o enfermeiro chefe faz o pedido das faltas informaticamente, que é posteriormente validado pelo farmacêutico e aviado pelo técnico de diagnóstico e terapêutica responsável pelo serviço. Os serviços de obstetria, ginecologia, oftalmologia, otorrinolaringologia, pediatria, urgência e unidade de cuidados intensivos de cardiologia são abastecidos por este modelo de distribuição.

4.3 - Distribuição em dose unitária

A distribuição de medicamentos em sistema de dose unitária surge pela à necessidade de: ^[2]

- Aumentar a segurança no circuito do medicamento;
- Conhecer melhor o perfil farmacoterapêutico dos doentes;
- Diminuir o risco de interações;
- Racionalizar melhor a terapêutica;
- Atribuir mais corretamente os custos;
- Redução dos desperdícios.

Neste sistema de distribuição, o farmacêutico é responsável pela interpretação e validação da prescrição médica, dando origem ao perfil farmacoterapêutico de cada doente. É dada especial atenção a parâmetros como a dose, a frequência, a via de administração, as interações, a duplicação de terapêutica, a duração e a adequação do tratamento ao doente.

No Hospital Sousa Martins, chegam todas as manhãs à farmácia os duplicados das prescrições médicas em formato de papel. Após a avaliação dos parâmetros anteriormente referidos e introdução dos mesmos num sistema informático próprio do hospital, é construído, pelo farmacêutico responsável do serviço, o perfil farmacoterapêutico dos doentes. Este, depois de validado, é impresso e entregue aos técnicos de diagnóstico e terapêutica que preparam a dose unitária para um período de 24 horas. Como a farmácia do hospital não funciona em pleno durante o fim-de-semana, à sexta-feira são preparadas as doses unitárias para um período de 72 horas.

Determinação de Tetrahydrocannabinol e principais metabolitos em amostras de plasma com recurso à microextração em seringa empacotada e análise por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de espectrometria de massa em tandem.

As cassetes onde são colocadas as doses unitárias, são formadas por compartimentos individualizados, correspondendo cada um a um número de cama e doente em específico. Cada compartimento encontra-se dividido em quatro divisórias, correspondendo cada uma a um momento de administração específico (pequeno almoço, almoço, jantar e ceia). Após o preenchimento das cassetes, baseado nos perfis farmacoterapêuticos, estas são enviadas para os respetivos serviços pelos auxiliares.

É importante referir que o acondicionamento de medicamentos em embalagem unidose deve seguir determinados critérios. Têm de permanecer identificáveis até ao momento da sua administração, devendo ser possível determinar o seu nome genérico, lote de fabrico, dosagem e prazo de validade.

No Hospital Sousa Martins são fornecidos por dose unitária os serviços de ortopedia homens e mulheres, cirurgia homens e mulheres, cardiologia, pneumologia, unidade de cuidados intensivos, medicina A e B e unidade de Acidentes Vasculares Cerebrais (AVC's). Foi possível realizar, durante o período de estágio, perfis farmacoterapêuticos para todos estes serviços. Destaco a complexidade e exigência de cooperação entre classes profissionais necessária à correta formulação da dose unitária para a unidade de cuidados intensivos.

4.4 - Distribuição a doentes em regime de ambulatório

A dispensa de medicamentos a doentes em regime de ambulatório por parte dos Serviços Farmacêuticos hospitalares, surge da necessidade de vigilância e controlo de determinadas patologias crónicas, da necessidade de vigilância da terapêutica prescrita para as referidas patologias e do facto de a comparticipação de certos medicamentos só ser a 100% se forem dispensados por estes serviços. ^[2, 7]

Em situações de emergência, em que o fornecimento dos medicamentos não possa ser assegurado pelas farmácias comunitárias, ou quando não existe na localidade uma farmácia particular, os Serviços Farmacêuticos hospitalares podem efetuar a dispensa de medicamentos em regime de ambulatório, ^[2] desde que não fiquem comprometidas as necessidades do hospital.

Para que essa dispensa seja realizada em condições apropriadas e alcance os objetivos desejados, é necessário que seja efetuada por farmacêuticos hospitalares e em instalações próprias para o efeito, que assegurem as condições técnicas e de privacidade adequadas. ^[2]

Apesar das recomendações anteriores, no Hospital Sousa Martins a dispensa de medicamentos em ambulatório é realizada na área de trabalho dos farmacêuticos, sendo a mesma efetuada pelo farmacêutico que se encontrar disponível no momento.

A dispensa só ocorre mediante a apresentação de uma prescrição médica em suporte de papel, sendo dispensada a quantidade de medicamento necessária para 30 dias de tratamento. Como o hospital não possui um sistema informático para ajuda no ambulatório, o farmacêutico que procede à dispensa deve anotar na receita a quantidade de produto dispensado e a data em que foi efetuada a dispensa. Caso a receita seja só parcialmente aviada, esta é arquivada como pendente.

Juntamente com a medicação deverá ser fornecida ao doente informação complementar, quer oral quer escrita, de forma a garantir que este conhece a forma correta de administração da medicação. O farmacêutico deve também assegurar-se que o transporte e armazenamento será efetuado nas condições requeridas, com especial ênfase nos medicamentos que necessitam de ser armazenados em condições de refrigeração.

Aquando da dispensa de medicamentos biológicos deve ser anotado o seu lote e validade. Nos Serviços Farmacêuticos são também elaborados e mantidos registos acerca da dispensa deste tipo de medicação, com o objetivo de assegurar efetividade e o acompanhamento da adesão dos doentes à terapêutica.

Todos os dias a farmacêutica responsável pelo controlo administrativo desta área verifica as receitas aviadas, dando baixa informática dos produtos cedidos.

4.5 - Distribuição de medicamentos sujeitos a legislação restritiva

4.5.1 - Estupefacientes, psicotrópicos e benzodiazepinas

Esta classe de substâncias abrange um conjunto variado de fármacos capazes de conduzir a abuso, com subsequente dependência psicológica e física. As substâncias pertencentes a esta classe encontram-se legisladas pelo Decreto-Lei nº15/93 de 22 de Janeiro. ^[8] Para prevenir o seu uso incorreto, foram instituídas medidas que visam um controlo rigoroso desde a encomenda, passando pelo armazenamento e distribuição e terminando na sua administração.

No Hospital Sousa Martins, a distribuição destes medicamentos inicia-se com um pedido feito à farmácia por parte do enfermeiro chefe do serviço requerente. De seguida o farmacêutico procede ao preenchimento da ficha de requisição (ver Anexo II) constante no anexo X da Portaria nº 981/98 de 8 de Junho ^[6], onde são descritas as características do medicamento dispensado bem como o seu número. Essa ficha é assinada pelo farmacêutico e pelo enfermeiro que recebe a medicação, ficando o duplicado arquivado na farmácia enquanto o original acompanha o medicamento, sendo preenchido consoante a administração deste.

Determinação de Tetrahydrocannabinol e principais metabolitos em amostras de plasma com recurso à microextração em seringa empacotada e análise por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de espectrometria de massa em tandem.

Após a administração de todas as unidades dispensadas, o original da ficha de requisição é enviado de volta aos Serviços Farmacêuticos, onde é arquivado junto do duplicado. Aquando da receção do original é importante verificar se o número de unidades administradas corresponde ao número de unidades dispensadas, se tal não acontecer é importante verificar a existência de alguma informação escrita que dê conta das unidades desperdiçadas.

4.5.2 - Hemoderivados

Este grupo engloba todas as substâncias que são derivadas do sangue ou plasma humano.

A possibilidade de transmissão de doença infecciosa a partir da administração terapêutica destes medicamentos levou a uma necessidade de organizar e uniformizar os ficheiros hospitalares de registo de identificação dos lotes, fabricantes e distribuidores dos medicamentos hemoderivados e dos doentes aos quais são administradas unidades medicamentosas dos mesmos. ^[7]

Todos os atos de requisição clínica, distribuição aos serviços e administração aos doentes de produtos hemoderivados ^[9] devem ser registados em ficha própria (Anexo III).

Após verificação da justificação clínica, cabe ao farmacêutico o preenchimento do quadro C da referida requisição. Neste quadro é descrito o tipo de hemoderivado dispensado, a quantidade, o lote, a origem e o número de certificado do INFARMED. São também necessárias as assinaturas do farmacêutico que dispensa o produto e do enfermeiro que o recebe. O original da ficha é arquivado nos Serviços Farmacêuticos, enquanto o duplicado é entregue ao serviço requisitante e arquivado junto do processo clínico do doente.

5. Produção e controlo

Apesar de ter sido uma área muito importante nos Serviços Farmacêuticos hospitalares, com o crescimento e desenvolvimento da indústria farmacêutica são poucos os medicamentos que se produzem nos hospitais.

As preparações que se fazem atualmente, destinam-se essencialmente a: ^[2]

- Doentes individuais e específicos (fórmulas pediátricas por ex.);
- Reembalagem de doses unitárias sólidas;
- Preparações assépticas (soluções e diluições de desinfetantes);
- Preparações estéreis ou citotóxicas individualizadas.

Apesar da preparação de medicamentos se ter alterado, mantém-se a exigência de produzir preparações farmacêuticas seguras e eficazes. Para que esse objetivo seja alcançado é necessário haver uma estrutura adequada e um sistema de procedimentos que assegure um “Sistema de Qualidade na Preparação de Formulações Farmacêuticas”.^[2]

No Hospital Sousa Martins, um pouco à imagem do que acontece no resto dos hospitais do país, a área de produção encontra-se limitada a algumas preparações de medicamentos manipulados, reembalagem de doses unitárias sólidas e preparação de alguns citotóxicos.

5.1 - Farmacotecnia

O objetivo primordial da farmacotecnia é produzir preparações farmacêuticas eficazes e seguras para todos os doentes, sendo para isso necessário definir responsabilidades, procedimentos e processos e implementar um sistema de gestão de qualidade.^[10]

5.1.1 - Preparação de Formas Farmacêuticas não estéreis

A preparação de formas farmacêuticas não estéreis pode incluir a mistura de matérias-primas, a adição de matérias-primas a medicamentos e a mistura ou diluição com produtos-base.^[10]

A área de armazenamento de material deve ter controlo sobre a luz e humidade e deve ser separada dos medicamentos e outros produtos farmacêuticos.^[10]

No Hospital Sousa Martins a preparação de formas farmacêuticas é uma atividade pouco desenvolvida e que envolve a realização de um conjunto de formulações tais como: xarope comum; xarope de trimetoprim a 1%; papéis de nitrofurantoína; álcool boricado a 70; ácido acético a 5%; tetracaína a 2%; soluto de Lugol; pomada de vaselina salicilada a 5%; frascos de sulfato de magnésio e frascos de sulfato de zinco.

O processo de preparação de formas farmacêuticas não estéreis inicia-se com a interpretação da prescrição, garantindo a segurança do fármaco relativamente à dose, exclusão de incompatibilidades e interações que influenciem a ação do medicamento e segurança do doente. A técnica de preparação e cálculos necessários são previamente determinados e verificados por um par. A preparação é feita pelo farmacêutico responsável por esta área, ou sob sua orientação.

Após a preparação e embalamento dos preparados deve-se proceder à sua rotulagem, indicando o nome do doente/serviço, nome da preparação, prazo de validade, posologia, modo de conservação e de uso.

Determinação de Tetrahydrocannabinol e principais metabolitos em amostras de plasma com recurso à microextração em seringa empacotada e análise por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de espectrometria de massa em tandem.

O farmacêutico também é o responsável por assegurar, dentro de boas condições, a disponibilidade de todas as matérias-primas, equipamentos e materiais necessários à preparação destes produtos.

A elaboração de medicamentos manipulados pelos farmacêuticos hospitalares é regulada pela Portaria n.º 594/2004 de 2 de Junho, ^[11] que aprova as “*Boas Práticas a Observar na Preparação de Medicamentos Manipulados em Farmácia de Oficina e Hospitalar*”. Esta portaria descreve as condições necessárias a nível de pessoal, instalações e equipamentos, documentação, matérias-primas, materiais de embalagem, manipulação, controlo de qualidade e rotulagem, para ser obtido um elevado padrão de qualidade dos medicamentos manipulados. ^[11]

5.1.2 - Reembalagem de doses unitárias sólidas

A dispensa de medicamentos em dose unitária determina muitas vezes a necessidade do seu reembalamento, ajustando assim a oferta da indústria farmacêutica ao serviço prestado pelos Serviços Farmacêuticos hospitalares. ^[7]

A reembalagem e rotulagem de medicamentos unidos devem ser efetuadas de maneira a assegurar a segurança e qualidade do medicamento.

Esta área dos serviços farmacêuticos, quando devidamente equipada, consegue cumprir os seus objetivos principais, que são ^[2]:

- Permitir aos Serviços Farmacêuticos disporem do medicamento, na dose prescrita e de forma individualizada; reduzindo assim o tempo de enfermagem dedicado à preparação da medicação a administrar, os riscos de contaminação do medicamento, os erros de administração e garantindo uma melhor gestão económica;
- Garantir a identificação do medicamento reembalado (nome genérico, dose, lote, prazo de validade);
- Proteger o medicamento reembalado dos agentes ambientais;
- Assegurar que o medicamento reembalado pode ser utilizado com segurança, rapidez e comodidade.

Apesar de não ser função específica do farmacêutico, foi possível observar o processo de reembalamento no Hospital Sousa Martins. Este é efetuado numa sala própria, que se encontra equipada com uma máquina automática de reembalamento de formas sólidas. Este processo é sobretudo aplicado quando a prescrição requer fracionamento da forma farmacêutica, visto que sempre que possível opta-se, para a dose unitária, por corte e rotulagem dos blisters com rótulos autocolantes.

O prazo de validade do medicamento reembalado tem de ter em conta o prazo de validade inicial desse medicamento, sendo a validade máxima atribuída de seis meses. É também importante referir que entre reembalagem de fármacos, o material tem de ser todo limpo e desinfetado, para evitar contaminações cruzadas.

5.1.3 - Preparações citotóxicas individualizadas

A manipulação de fármacos citotóxicos deve efetuar-se de forma centralizada nos Serviços Farmacêuticos, o que permite ^[7]:

- Racionalizar a utilização destes fármacos;
- Uma melhor gestão do risco;
- Integrar o farmacêutico na equipa de oncologia;
- Disponibilizar o tempo dos médicos e enfermeiros para tarefas para as quais estão mais vocacionados;
- Uma gestão de stocks mais eficaz.

Nas preparações citotóxicas individualizadas o farmacêutico é responsável por interpretar e validar protocolos de quimioterapia; elaborar um manual com os procedimentos de trabalho; preparar, supervisionar e distribuir os medicamentos; estabelecer normas de atuação em situações de derrame acidental, extravasão e eliminação; implementar procedimentos de limpeza e elaborar guias de manipulação de citotóxicos, estabelecendo desta forma normas e procedimentos que garantam o cumprimento dos padrões de qualidade, higiene e segurança necessários a este tipo de preparações. ^[2]

Todo o processo de trabalho deve ser efetuado numa área de acesso restrito, em câmara de fluxo de ar laminar vertical da Classe II B, com preferência para as da Classe II B2, de exaustão total ou sistemas isoladores (cabines fechadas, com acesso do manipulador por mangas de borracha), que deve ser destinada somente à preparação deste tipo de produtos. ^[2]

O pessoal que prepara os citotóxicos deverá estar equipado com vestuário protetor, luvas, touca, óculos de proteção e máscara. ^[2]

De uma forma geral o processo de preparação de citotóxicos começa com a receção, verificação e validação da prescrição médica por parte do farmacêutico. Neste ponto o farmacêutico avalia os protocolos, o perfil farmacoterapêutico, a posologia, a estabilidade e a compatibilidade dos medicamentos, seguindo-se a emissão dos rótulos que servem de base para a preparação dos citotóxicos. Após a preparação, estes são devidamente acondicionados e dispensados, sendo a administração da responsabilidade do pessoal de enfermagem.

Determinação de Tetrahydrocannabinol e principais metabolitos em amostras de plasma com recurso à microextração em seringa empacotada e análise por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de espectrometria de massa em tandem.

No Hospital Sousa Martins, devido à ausência de condições nos Serviços Farmacêuticos, a preparação de citotóxicos é realizada por enfermeiros no hospital de dia, cabendo ao farmacêutico responsável pela área da farmacotecnia a preparação de mitomicina C.

6. Informação

A atividade de informação é uma tarefa complexa que exige seleção e avaliação de informação. Muitas vezes o farmacêutico é solicitado para emitir opinião crítica e resolver questões relacionadas a uma situação clínica de um doente concreto. ^[7]

Apesar de não se encontrar implementado nos Serviços Farmacêuticos do Hospital Sousa Martins um Centro de Informação de Medicamentos (CIM), ou um Serviço de Informação de Medicamentos (SIM), são vários os profissionais de saúde que recorrem à farmácia hospitalar para esclarecerem questões respetivas a posologias, indicações e forma de administração de medicamentos. Os pedidos de informação são realizados, na sua maioria, pessoalmente ou por via telefónica.

Após a análise do pedido de informação procede-se ao esclarecimento das questões levantadas, esclarecimento esse que pode ser prestado na hora, caso o farmacêutico possua a informação necessária, ou prestado após consulta de fontes bibliográficas fidedignas, como por exemplo o *Prontuário Terapêutico*, *Resumo das Características do Medicamento (RCM)*, entre outras.

7. Farmacovigilância

A introdução de um novo fármaco no mercado implica a realização prévia de uma série de ensaios que fornecem a informação mais relevante sobre o seu perfil farmacológico, tanto terapêutico como tóxico. Pelo contrário, certos aspetos da sua atividade farmacológica não são detetados, visto que durante a realização dos ensaios clínicos, a população estudada nem sempre coincide com aquela na qual o medicamento vai ser administrado. ^[7]

Assim torna-se importante desenvolver um programa de acompanhamento pós comercialização do medicamento que permita comunicar os efeitos inesperados ou tóxicos causados por este. ^[7]

Em Portugal, o INFARMED é a entidade responsável pelo acompanhamento, coordenação e aplicação do Sistema Nacional de Farmacovigilância. Todos os profissionais de saúde, farmacêuticos hospitalares incluídos, integram a estrutura do Sistema Nacional de

Farmacovigilância, tendo a obrigação de enviar informação sobre reações adversas graves ou não esperadas, que ocorram com o uso de medicamentos. [2]

As unidades de farmacovigilância hospitalares revestem-se de particular importância, dada a complexidade e multiplicidade das terapêuticas instituídas, que aumentam a probabilidade de ocorrência de uma reação adversa exagerada, ou não esperada ao medicamento.

Perante a identificação de uma reação adversa, o farmacêutico hospitalar deve notificar o INFARMED através do preenchimento de uma ficha de notificação específica, onde se descreve a utilização do medicamento pelo doente e o efeito adverso detetado.

8. Ensaio clínico

Os ensaios clínicos são, atualmente, uma das únicas fontes disponíveis no combate a algumas patologias para as quais a terapêutica atual não se revela eficaz.

Um ensaio clínico pode ser entendido como *“qualquer investigação conduzida no ser humano, destinada a descobrir ou verificar os efeitos clínicos, farmacológicos ou os outros efeitos farmacodinâmicos de um ou mais medicamentos experimentais, ou identificar os efeitos indesejáveis de um ou mais medicamentos experimentais, ou analisar a absorção, a distribuição, o metabolismo e a eliminação de um ou mais medicamentos experimentais, a fim de apurar a respetiva segurança ou eficácia.”* [12]

Para a realização de investigação clínica num hospital é necessária a presença de uma equipa multidisciplinar que permita um desenvolvimento eficaz do ensaio. Os Serviços Farmacêuticos hospitalares constituem um dos elementos básicos que permitem otimizar a gestão dos medicamentos em investigação, assim como garantir a máxima segurança e eficácia dos estudos. [7]

Após a aprovação do ensaio pelo INFARMED, os medicamentos experimentais a serem utilizados devem ser armazenados e cedidos pelos Serviços Farmacêuticos do estabelecimento de saúde onde decorre o estudo.

Os ensaios clínicos possuem um farmacêutico responsável que deve estar a par de toda a informação cedida pelo promotor. Deve também conhecer o protocolo do ensaio e estar envolvido no estabelecimento de *guidelines* que garantam o controlo de todo o circuito que envolve o medicamento experimental, sendo da sua competência a receção, armazenamento, dispensa e devolução da medicação ao promotor.

Determinação de Tetrahydrocannabinol e principais metabolitos em amostras de plasma com recurso à microextração em seringa empacotada e análise por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de espectrometria de massa em tandem.

É de destacar que todos os ensaios clínicos devem ser realizados segundo as Boas Práticas Clínicas, nomeadamente no que respeita a requisitos de qualidade ética e científica a cumprir na conceção, realização, registo e notificação dos ensaios que envolvam a participação de seres humanos. É também necessário assegurar a proteção dos direitos, da segurança e do bem-estar dos indivíduos envolvidos. ^[12]

9. Nutrição assistida

A nutrição engloba o acesso, a ingestão, a digestão, a absorção e a metabolização de substâncias bioquímicas, os nutrientes, em quantidades e proporções que possibilitem a normal morfologia e funcionamento das estruturas subcelulares e celulares, bem como adequado desenvolvimento e maturação. ^[13]

Nos indivíduos saudáveis e maioria dos doentes, os nutrientes são veiculados pelos alimentos correntes. Cada indivíduo, saudável ou doente, tem necessidades individuais em macro e micronutrientes que devem ser adquiridas de forma equilibrada de modo a manter a homeostasia ou a corrigir desequilíbrios nutricionais por défice ou excesso. ^[13]

A maioria dos doentes pode e deve receber nutrição oral. No entanto existem casos, sobretudo em doentes hospitalizados, em que é necessário recorrer a alternativas destinadas ao doente que não quer, não pode, ou não consegue receber os nutrientes necessários através de dietas de alimentos correntes. ^[13] Quando isto acontece surgem duas opções para a obtenção dos nutrientes necessários, a administração por via entérica ou por via parentérica.

Apesar de ser considerada uma terapêutica segura é necessário ter em conta a adequação do esquema nutritivo à situação clínica do doente, que deve ser monitorizado clínica e laboratorialmente de forma a ser possível a correção dos aportes de macro e micronutrientes, em função da evolução clínica deste. ^[7]

No Hospital Sousa Martins a farmácia apenas se encarrega do seu armazenamento e dispensa. Não obstante, foi efetuada durante o estágio, pela Doutora Célia Bidarra, uma pequena apresentação sobre nutrição parentérica e entérica, onde foi possível obter alguns dos conhecimentos a seguir apresentados.

9.1 - Nutrição entérica

A nutrição entérica consiste na administração de uma fórmula ou produto por via oral (se possível), ou pelo tubo digestivo através de uma sonda de alimentação. É o método de eleição

para a administração de nutrição artificial. ^[14] Pode ser administrada como suplemento de uma dieta normal ou como forma de nutrição única.

É indicada para situações em que o doente não consegue ingerir os alimentos de forma normal, por via oral, mas possui um tubo digestivo funcional. É um método mais fisiológico e económico que, comparativamente, a nutrição parentérica, possuindo ainda um menor número de complicações associadas, como por exemplo infeções.

Nos casos em que o doente consegue deglutir, a alimentação é feita por via oral com recurso a suplementos dietéticos orais, que podem ser completos ou modulares, sendo que estes últimos servem apenas para fortificar dietas de alimentos correntes. ^[13]

Quando o doente não consegue deglutir opta-se pela utilização de uma sonda para a administração da nutrição entérica. Nesta situação são utilizadas dietas poliméricas ou poliméricas modificadas, que visam substituir na totalidade a alimentação oral. ^[13]

Existem ainda, ao nível da nutrição entérica, dietas específicas para algumas patologias metabólicas, autoimunes, hepáticas e renais.

9.2 - Nutrição Parentérica

A nutrição parentérica corresponde às formulações injetáveis de administração de nutrientes diretamente na circulação sanguínea do doente, através de um veia periférica ou central. Apresentam-se como preparações injetáveis prontas ou de preparação extemporânea. ^[13]

Os macronutrientes são veiculados por soluções concentradas de glucose, de aminoácidos essenciais e não essenciais e emulsões lipídicas. As formulações de micronutrientes (eletrólitos, oligoelementos e vitaminas) específicas para nutrição parentérica são adicionadas às formulações isoladas ou a qualquer tipo de misturas, segundo regras rigorosas de estabilidade e assépsia. ^[13]

No Hospital Sousa Martins a nutrição parentérica é obtida sob a forma de bolsas bi ou tri compartimentadas, previamente formuladas pela indústria, em que a mistura dos macronutrientes é feita por aplicação de força aos vários compartimentos.

10. Farmacocinética clínica

A farmacocinética clínica é um ramo da farmácia hospitalar, cujo objetivo primordial é a correta administração de fármacos tendo como base a medição dos seus níveis séricos, o que se traduz por um controlo terapêutico individualizado. [2]

A medição dos níveis séricos é especialmente importante para aqueles fármacos com janela terapêutica estreita ou comportamento cinético variável.

No Hospital Sousa Martins, esta função não está inserida no trabalho diário dos Serviços Farmacêuticos, sendo que em nenhuma altura do estágio foi possível observar qualquer atividade em farmacocinética clínica.

11. Acompanhamento da visita médica

Além de especialista do medicamento, cada vez mais o farmacêutico assume-se na sociedade como um importante profissional de saúde pública, com formação e conhecimentos que podem ser bastante úteis em situações específicas.

A integração do farmacêutico hospitalar em equipas multidisciplinares de saúde obriga à sua participação na designada visita médica. Esta participação permite maximizar a sua intervenção direta através da emissão de opinião sobre a terapêutica instituída a um doente, esquemas posológicos, formas e vias de administração de fármacos, deteção e ou prevenção de efeitos secundários e interações fármaco-fármaco ou fármaco-nutriente, vigilância do cumprimento de protocolos terapêuticos instituídos ou deteção da necessidade da sua implementação, entre outros. Esta participação permite ainda uma contribuição mais eficaz do farmacêutico para a racionalização da terapêutica e a melhoria da qualidade dos cuidados prestados ao doente. [7]

O Hospital Sousa Martins encontra-se entre os primeiros hospitais a instituir a participação farmacêutica na visita médica. Depois de um longo período de batalha entre classes, a presença do farmacêutico na visita é hoje vista como uma mais-valia para o doente, encontrando-se implementado na ortopedia homens e mulheres, medicina A e B, pneumologia e cirurgia homens e mulheres.

12. Atividades farmacêuticas na enfermaria

No seguimento da integração do farmacêutico em equipas de saúde multidisciplinares é também importante a visita deste às enfermarias.

A presença do farmacêutico na enfermaria permite a vigilância da conservação dos *stocks* de medicamentos, bem como a verificação do cumprimento de protocolos e linhas orientadoras de terapêutica. ^[7]

Diariamente, cada farmacêutico do Hospital Sousa Martins visita as enfermarias dos serviços que tem a seu cargo, obtendo informações sobre os internamentos, altas e alterações efetuadas às terapêuticas dos doentes internados. Este momento serve também para o farmacêutico verificar os *stocks* e validade de medicamentos existentes nas enfermarias e facultar informação à equipa de enfermagem.

Além do referido anteriormente, o farmacêutico verifica também o mapa individual de cada doente, onde os enfermeiros anotam a hora, quantidade e nome dos medicamentos administrados. Com isto pretende-se contribuir para o aumento de segurança do doente e diminuição do número de erros associados à medicação.

13. Comissões Técnicas

As comissões técnicas visam a implementação de regras, normas e procedimentos, contribuindo para uma melhoria na qualidade dos cuidados de saúde prestados pelo hospital em causa. ^[7]

Entre as comissões técnicas hospitalares, o farmacêutico toma parte ativa na Comissão de Farmácia e Terapêutica, Comissão de Ética e Comissão de Controlo da Infecção Hospitalar.

Todas estas comissões encontram-se reguladas por legislação específica, que determina a sua composição e regula o seu funcionamento.

O funcionamento e composição da Comissão de Farmácia e Terapêutica deve ter em conta o disposto pelo Despacho n.º 1083/2004, de 1 de Dezembro, ^[15] já o Decreto-Lei n.º 97/95, de 10 de Maio, ^[16] regulamenta as Comissões de Ética para a saúde, enquanto as Comissões de Controlo de Infecção são regidas pela Circular Normativa n.º 18/DSQC/DS, de 15 de Outubro de 2007. ^[17]

Durante o decorrer do estágio não foi prestado qualquer esclarecimento sobre o funcionamento destas comissões, nem sobre o papel dos Serviços Farmacêuticos do Hospital

Determinação de Tetrahydrocannabinol e principais metabolitos em amostras de plasma com recurso à microextração em seringa empacotada e análise por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de espectrometria de massa em tandem.

Sousa Martins nestas. Desta forma, nenhum conhecimento adicional foi adquirido neste âmbito, optando-se assim pela omissão da descrição exaustiva da composição e funcionamento das comissões supracitadas.

Considerações finais

Ao longo do estágio realizado nos Serviços Farmacêuticos do Hospital Sousa Martins, foi-me possível contatar de perto com a realidade do trabalho do farmacêutico em ambiente hospitalar.

Penso que esta experiência foi muito importante para o meu processo de aprendizagem, pois para além de colocar em prática os conhecimentos teóricos adquiridos ao longo das aulas, o contato com esta nova realidade permitiu obter uma noção realista do trabalho do farmacêutico em ambiente hospitalar.

Os objetivos propostos para este estágio foram, na minha opinião, atingidos com sucesso. No entanto, a falta de valências ao nível da preparação de citotóxicos, nutrição parentérica, formas farmacêuticas estéreis e a não participação por parte dos farmacêuticos do Hospital Sousa Martins em comissões técnicas hospitalares, impossibilitou a expansão dos conhecimentos adquiridos sobre estas áreas ao longo dos anos curriculares.

Procurei neste relatório descrever todas as atividades desenvolvidas, para assim demonstrar todos os esforços realizados para atingir as metas pretendidas, as quais acredito terem sido transpostas com dedicação.

O estágio deve ser visto como uma janela para o mundo do trabalho e foi nesta linha de pensamento que enfrentei todas as dificuldades inerentes ao processo de aprendizagem com que me deparei.

Como tal, a experiência foi agradável, não só pelo contato com a realidade hospitalar, mas também pela possibilidade de adquirir novos conhecimentos e de completar outros pré-adquiridos, não descorando o ambiente relacional proporcionado, que me permitiu uma boa adaptação e integração na equipa multidisciplinar.

Referências Bibliográficas

1. INFARMED. Legislação Farmacêutica Compilada, Decreto-Lei nº 44 204, de 22 de Fevereiro de 1962. Regulamento geral da Farmácia hospitalar.
2. Ministério da Saúde, Conselho Executivo da Farmácia Hospitalar. *Manual da Farmácia Hospitalar*, 2005.
3. INFARMED. Legislação Farmacêutica Compilada, Decreto-Lei nº 183/2008, de 4 de Setembro. Regulamento geral de criação das Unidades locais de Saúde do Alto Minho, Baixo Alentejo e da Guarda.
4. Unidade Local de Saúde da Guarda. Missão e Visão da ULS Guarda [Online]. 2011 [Citação: 10 de Abril de 2013]. Disponível em: <http://www.ulsguarda.min-saude.pt/index.php>.
5. Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde. Autorização de Utilização Especial. [Online]. 2007 [Citação: 10 de Abril de 2013]. Disponível em: http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/MEDICAMENTOS_USO_HUMANO/AUTORIZACAO_DE_INTRODUCAO_NO_MERCADO/AUTORIZACAO_DE_UTILIZACAO_ESPECIAL/Delib_105CA_2007.pdf.
6. INFARMED. Legislação Farmacêutica Compilada, Portaria nº 981/98, de 8 de Junho. Execução das medidas de controlo de estupefacientes e psicotrópicos.
7. Universidade de Lisboa, Faculdade de Farmácia. *Manual de apoio ao estágio de Licenciatura*. [Online]. 2002 [Citação: 14 de Outubro de 2013]. Disponível em: <http://pt.scribd.com/doc/39060832/Manual-Apoio-Estagio>.
8. INFARMED. Legislação Farmacêutica Compilada, Decreto-Lei nº 15/93, de 22 de Janeiro. Regime jurídico do tráfico e consumo de estupefacientes e psicotrópicos. 1993
9. INFARMED. Legislação Farmacêutica Compilada, Despacho conjunto nº 1051/2000, de 14 de Setembro. Registo de medicamentos derivados de plasma.
10. Ordem dos farmacêuticos. Conselho do Colégio da Especialidade em Farmácia Hospitalar. *Boas Práticas de Farmácia Hospitalar*, 1999.
11. INFARMED. Legislação Farmacêutica Compilada, Portaria nº 594/2004, de 2 de Junho. Boas práticas a observar na preparação de medicamentos manipulados em farmácia de oficina e hospitalar.
12. INFARMED. Legislação Farmacêutica Compilada, Lei nº 46/2004, de 19 de Agosto. Regime jurídico aplicável à realização de ensaios clínicos com medicamentos de uso humano.
13. INFARMED. Nutrição. [Online]. [Citação: 14 de Outubro de 2013]. Disponível em: <http://infarmed.pt/formulario/navegacao.php?paiid=187>.

14. Associação Portuguesa de Nutrição Entérica e Parentérica. Curso de nutrição artificial para enfermeiros, nutrição artificial entérica. [Online]. 2011 [Citação: 14 de Outubro de 2013]. Disponível em: http://www.slideshare.net/enf_apnep/3-nutrio-entrica.
15. INFARMED. Legislação Farmacêutica Compilada, Despacho nº 1083/2004, de 1 de Dezembro de 2003. Regulamentação das comissões de farmácia e de terapêutica dos hospitais do sector publico administrativo (SPA) integrados na rede de prestação de cuidados de saúde referidos na alínea a) do nº 1 do artigo 2º do regime jurídico da gestão hospitalar, aprovado pela Lei nº 27/2002, de 8 de Novembro.
16. INFARMED. Legislação Farmacêutica Compilada, Decreto-Lei nº 97/95, de 10 de Maio. Regulamentação das comissões de ética para a saúde.
17. Direção-Geral da Saúde. Circular Normativa Nº 18/DSQC/DSC, de 15 de Outubro. 2007

Determinação de Tetrahydrocannabinol e principais metabolitos em amostras de plasma com recurso à microextração em seringa empacotada e análise por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de espectrometria de massa em tandem.

PARTE III

Determinação de Tetrahydrocannabinol e principais metabolitos em amostras de plasma com recurso à microextração em seringa empacotada e análise por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de espectrometria de massa em tandem.

1. Revisão da Literatura

1.1 - *Cannabis*

A *Cannabis* é uma planta do género das angiospérmicas e que pode ser dividida em três espécies distintas: *Cannabis sativa*, *Cannabis indica* e *Cannabis ruderalis*.^[1] Com origem nos vales fluviais da Ásia Central ou no sul Asiático ao longo do sopé dos Himalaias, foi cultivada primeiramente em larga escala na China para a obtenção de fibra, sendo assim uma das mais antigas plantas utilizada pelo Homem, quer para obtenção de fibra bem como de papel, sementes e resinas aromáticas.^[2] A concentração dos canabinóides é o fator que em grande parte determina as várias utilizações dadas à planta e depende em larga escala das condições de cultivo, climatéricas e de fatores genéticos inerentes à *cannabis*.^[3]

Não obstante de todas as aplicações e utilizações, a *cannabis* é primeiramente conhecida pelos seus efeitos medicinais e euforizantes, efeitos esses que são conhecidos há mais de 4 mil anos, existindo registos históricos das suas ações medicinais desde o século III a. C.^[4]

Com relação aos seus efeitos euforizantes, várias culturas têm tradicionalmente usado a *cannabis* pelas suas propriedades psicoativas como foi relatado em algumas comunidades do Médio Oriente, Sul e Sudeste Asiático.^[2] No entanto, no início do século passado, passou a ser considerada um “problema social”, sendo banida legalmente na década de 30.^[4] Hoje em dia é uma das mais prevalentes drogas ilícitas de lazer, existindo entre 119 a 224 milhões de consumidores em todo o mundo.^[5]

1.1.1 - Formas de apresentação

No que concerne ao consumo, a *cannabis* pode-se apresentar sob várias formas, existindo três tipos principais de apresentação: resina (haxixe), erva ou óleo. Além do aspeto físico, a principal diferença entre estas formas de apresentação é o seu conteúdo em delta-9-tetrahydrocannabinol (THC).^[6]

A erva de *cannabis* possui por norma um conteúdo de 5 a 10% de THC, já a resina pode possuir até 20%. No entanto, o óleo de *cannabis* é a forma de apresentação que possui um maior conteúdo em THC, podendo chegar aos 60%.^[6]



Figura 1. Erva de *cannabis*.^[7]



Figura 2. Resina de *cannabis*.^[7]



Figura 3. Óleo de *cannabis*.^[7]

1.1.2 - Formas de consumo

Fumar é a forma mais habitual de consumir *cannabis* e embora os cigarros, vulgarmente conhecidos como "charros", sejam a mais usual, existem outras formas de consumo: pura, em cachimbos próprios, em cachimbos de água e, apesar de menos comum, a *cannabis* pode também ser ingerida.^[8]

1.2 - Canabinóides

Muitos trabalhos de investigação têm sido efetuados ao longo das últimas décadas de forma a determinar que compostos existem na planta de *cannabis*, tendo sido identificados até à data aproximadamente 500 compostos, entre os quais podemos destacar: terpenos, açúcares, hidrocarbonetos, esteróides, flavonoides e aminoácidos, entre outros.^[2, 9, 10] Alguns destes compostos, como é o caso dos terpenos, são comuns no reino vegetal, enquanto outros, como é o caso dos canabinóides, são únicos para esta planta.^[2]

Os canabinóides são compostos terpenofenólicos constituídos por 21 átomos de carbono e são os compostos existentes em maior número na *cannabis*,^[2] tendo até à data sido identificados cerca de 86 canabinóides.^[11] Estes são responsáveis pelos efeitos psicoativos e podem ser classificados em dois grupos: os canabinóides psicoativos (por exemplo o delta-8-THC, THC e o seu metabolito ativo, conhecido como 11-hidroxi-delta-9-THC) e os não-psycoativos (por exemplo o canabidiol e o canabinol). O THC é o mais abundante e potente destes compostos.^[4]

Ao nível da sua síntese, os canabinóides são sintetizados primeiramente pela planta sob a forma de ácidos carboxílicos, sendo o ácido 9- tetrahidrocanabinólico A (THCA), o ácido canabidiólico (CBDA) e o ácido canabigerólico (CBGA) os mais comuns.^[10]

Posteriormente, e sob influência da luz, calor (como acontece aquando do consumo) ou armazenagem prolongada, ocorre uma perda do grupo carboxílico sob a forma de CO₂, levando à formação de THC, canabidiol (CBD) e canabigerol (CBG).^[10]

Determinação de Tetrahydrocannabinol e principais metabolitos em amostras de plasma com recurso à microextração em seringa empacotada e análise por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de espectrometria de massa em tandem.

Estes mecanismos químicos de conversão são de elevada importância, pois é assim que se forma o THC, que tal como referido anteriormente, é o principal responsável pelos efeitos psicoativos que resultam do consumo de *cannabis*. [2] A figura 4 mostra a via de biossíntese dos principais canabinóides.

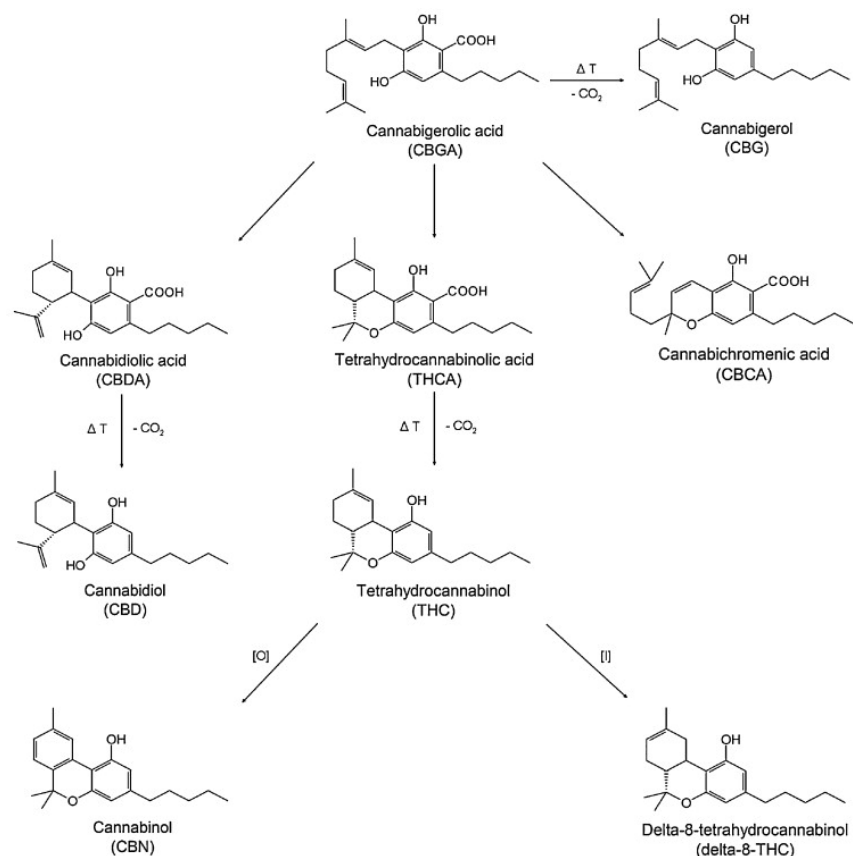


Figura 4. Via de biossíntese dos principais canabinóides. ΔT = aquecimento, [O] = oxidação, [I] = isomerização. [10]

1.2.1 - Farmacocinética

A farmacocinética de um composto pode ser descrita como o estudo da sua absorção, distribuição, metabolismo e eliminação do organismo, bem como o comportamento destes processos ao longo do tempo. [2]

Em relação aos compostos da *cannabis*, o THC é aquele cuja farmacocinética se encontra melhor descrita, talvez devido ao facto de este ser o principal componente psicoativo da planta. [2]

A maioria do THC presente na planta encontra-se sob a forma de dois ácidos carboxílicos, sendo que apenas 5% se encontra na sua forma livre. A conversão destes a THC ocorre através de aquecimento. [2]

Fumar é a principal via de consumo de *cannabis*, e proporciona um método rápido e altamente eficiente de administração da droga. Nesta situação, ocorre uma rápida absorção de THC, com o pico plasmático a ser atingido em 7 a 8 minutos e onde as concentrações plasmáticas atingidas são apenas ligeiramente inferiores às encontradas após a administração intravenosa. A biodisponibilidade do THC quando fumado é cerca de 18 a 50% da quantidade total, em parte como resultado da variabilidade intra e inter-individual, o que contribui para a incerteza na entrega de dose. O número, a duração, o espaçamento, o tempo de retenção, e volume de inalação podem influenciar grandemente o grau de exposição à droga. [2]

Quando a *cannabis* é ingerida por via oral, a absorção é mais lenta e as concentrações plasmáticas de THC atingidas são mais baixas. [2] A biodisponibilidade oral é de cerca de 4-20% da biodisponibilidade intravenosa. Isto pode ser explicado em parte como resultado da degradação do composto no estômago e do significativo metabolismo de primeira passagem, em que o THC é convertido ao metabolito ativo 11-hidroxi-delta-9-tetrahydrocannabinol (THC-OH) e outros metabólitos inativos. Os efeitos manifestam-se 30 - 60 minutos após a ingestão, podendo durar cinco ou mais horas (sintomas mais tardios e de maior duração, comparativamente aos resultantes da inalação). [12]

Ao nível da distribuição, o THC possui um elevado volume de distribuição (10 L/Kg), sendo que 97% a 98% se encontra ligado a proteínas plasmáticas, principalmente lipoproteínas. Órgãos altamente irrigados, como é o caso do cérebro são rapidamente expostos ao composto. [2]

Devido à sua elevada lipofilicidade, o THC concentra-se ao nível do tecido adiposo, pulmão, fígado, rim, coração, baço e glândulas mamárias, de onde é libertado lentamente. Isto, juntamente com uma circulação entero-hepática significativa, contribui para uma eliminação lenta do composto, possuindo esta um tempo de meia-vida de cerca de 4 dias. [2]

No Homem a principal via de metabolização do THC é a sua hidroxilação, pelo citocromo P450, a THC-OH, um metabolito ativo. Outros órgãos que também contribuem para a metabolização do THC são o cérebro, intestino e pulmões, onde vias de hidroxilação alternativas podem ser mais proeminentes. [2] No entanto, como as concentrações plasmáticas e o tempo de meia vida destes compostos hidroxilados são muito baixas, estes não contribuem de forma significativa para os efeitos farmacológicos da *cannabis*. [13]

Posteriormente, o THC-OH sofre oxidação com subsequente formação do 11-*nor*-9-carboxi-delta-9-tetrahydrocannabinol (THC-COOH), um metabolito desprovido de qualquer atividade

Determinação de Tetrahydrocannabinol e principais metabolitos em amostras de plasma com recurso à microextração em seringa empacotada e análise por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de espectrometria de massa em tandem.

psicotrópica. O THC-COOH sofre posterior conjugação com ácido glucurónico, sendo este o principal produto da biotransformação do THC no Homem. [2]

Após a fase de distribuição inicial, o passo limitante da taxa de eliminação do THC é a sua redistribuição a partir dos tecidos onde se encontra acumulado para o sangue. Embora a eliminação dos canabinóides ocorra essencialmente através da bÍlis e das fezes, a urina, o suor, o leite materno e o cabelo são igualmente meios importantes de excreção dos compostos. [2, 14,15]

Um total de 80% a 90% do composto é excretado dentro de 5 dias, a maior parte como metabolitos hidroxilados e carboxilados. [16] Muitos destes metabolitos são conjugados com ácido glucurónico, aumentando a solubilidade dos compostos em água. O metabolito principal a nível urinário é o THC-COOH, enquanto o THC-OH predomina nas fezes. [17] Na figura número 5 encontram-se representados os principais produtos originados no metabolismo do THC. [18]

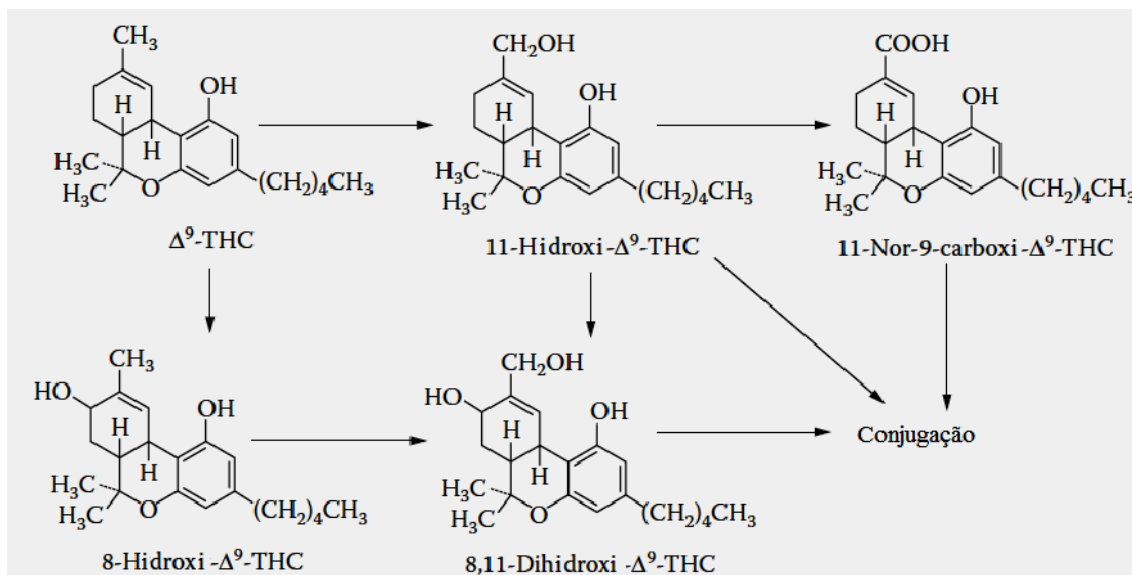


Figura 5. Metabolismo do THC. [18]

1.2.1 - Farmacologia e farmacodinâmica

Desde a clonagem de 2 tipos de recetores de canabinóides distintos e da descoberta de lípidos derivados do ácido araquidónico como ligandos endógenos, que a farmacologia dos canabinóides tem recebido maior atenção, levando a um melhor conhecimento dos efeitos inerentes ao consumo de *cannabis*. [2]

Dois recetores de canabinóides, CB₁ e CB₂, foram clonados a partir de várias espécies, incluindo o Homem. ^[19, 20] Estes recetores pertencem à superfamília dos recetores acoplados à proteína G e permitem a transdução do sinal desde o exterior da célula, onde o ligando se liga ao recetor, até ao interior da mesma, onde alterações moleculares em proteínas alvo resultam numa resposta biológica. ^[21]

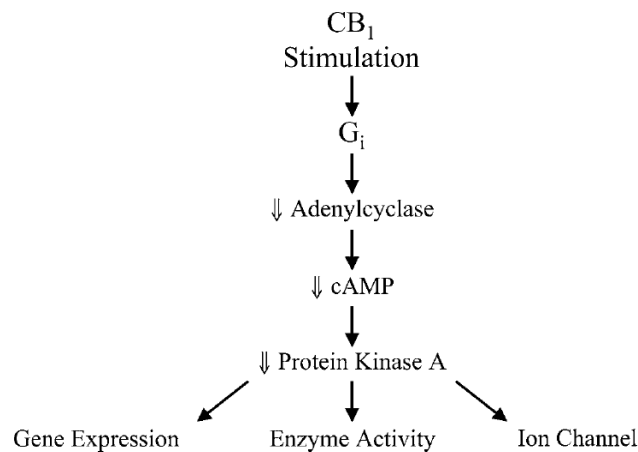


Figura 6. Recetores de canabinóides (CB₁) e mecanismos de transdução de sinal. ^[21]

Os recetores de canabinóides encontram-se, mais especificamente, acoplados a uma proteína G inibitória (G_i), que quando ativada inibe a enzima adenilato ciclase, que por sua vez leva a um decréscimo da concentração do cAMP intracelular e a uma diminuição da função celular ^[2] (figura 6). Os ligandos endógenos destes recetores são conhecidos como endocanabinóides e são considerados tanto neurotransmissores como neuromoduladores. ^[2] Os mais conhecidos e estudados são a anandamida (AEA) e o 2-Araquidonilglicerol (2-AG), ^[2] que ajudam a manter a homeostase na sinapse e a prevenir uma atividade neuronal excessiva. ^[21]

No cérebro, os recetores CB₁, são encontrados na pré-sinapse onde medeiam uma ação inibitória sobre a libertação permanente de dopamina, ácido gama-aminobutírico (GABA), glutamato (Glu), serotonina (5-HT), noradrenalina (NA) e acetilcolina (Ach). Quando a *cannabis* é consumida, o THC, como agonista parcial, liga-se aos recetores CB₁ e origina uma inibição da libertação de neurotransmissores menos efetiva que aquela proporcionada pelos endocanabinóides, levando a um aumento das concentrações destes na fenda sináptica (figura 7). Também tem sido sugerido que o consumo de THC pode aumentar a libertação de dopamina, acetilcolina e glutamato, em certas regiões cerebrais, por inibição da libertação de um neurotransmissor inibitório para os neurónios secretores destas substâncias. ^[21, 22]

Determinação de Tetrahydrocannabinol e principais metabolitos em amostras de plasma com recurso à microextração em seringa empacotada e análise por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de espectrometria de massa em tandem.

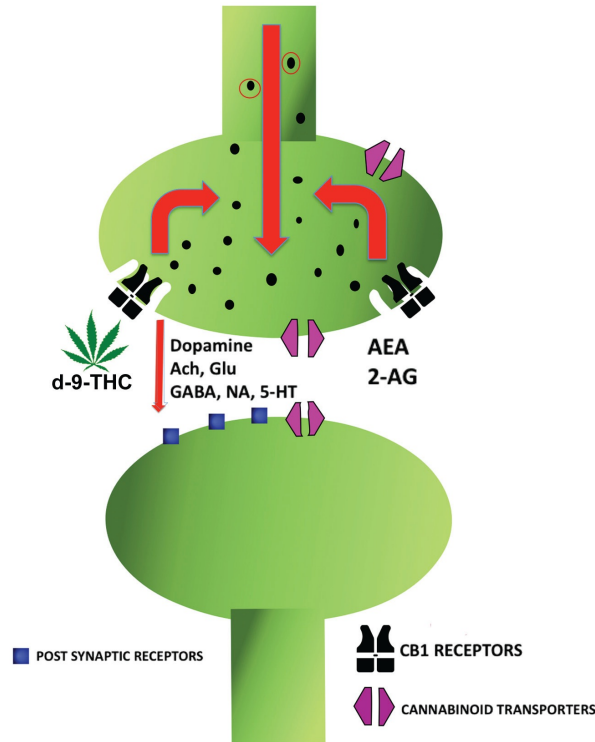


Figura 7. Recetor de canabinóides (CB₁) - efeitos da ligação de endocanabinóides e THC. [21]

Já os recetores CB2 são recetores periféricos e são encontrados particularmente em células B maduras, macrófagos e em tecidos relacionados com a imunidade, tais como as amígdalas e o baço. [2]

1.3 - Efeitos dos Canabinóides

Os canabinóides afetam tanto as funções cognitivas como motoras. Os efeitos variam em função da quantidade consumida, qualidade do produto, tolerância, personalidade e estado de espírito do individuo no momento do consumo, o contexto do consumo e a forma de consumo (isoladamente ou em associação com outras drogas). [12, 13] Os efeitos do consumo de *cannabis* podem ser divididos em efeitos a curto e a longo prazo. [2]

1.3.1 - Efeitos a curto prazo

Nos efeitos a curto prazo decorrentes do uso de cannabis é importante separar os efeitos fisiológicos do uso (objetivos) dos efeitos subjetivos do consumo.

Os efeitos subjetivos são bem definidos pelos usuários crónicos e incluem alterações ao nível das sensações (auditivas, visuais e gustativas), alterações das noções de tempo e espaço, instabilidade emocional (euforia numa fase inicial e relaxamento numa fase mais tardia), impulsos irresistíveis, ilusões e mesmo alucinações. [2, 23]

Ao nível de efeitos objetivos temos uma diminuição da performance psico-motora, interferências com a capacidade de atenção e com a memória a curto prazo. Também provocam uma série de efeitos periféricos tais como vasodilatação, broncodilatação e taquicardia. [2, 23]

Do consumo de elevadas doses pode ocorrer diminuição da coordenação motora, da força muscular, da concentração e do tempo de reação. É também de esperar hipotensão postural, letargia, fala arrastada e congestão ocular. [2]

1.3.2 - Efeitos a longo prazo

O consumo crónico de *cannabis* tem sido associado tanto a problemas psicossociais como a problemas de saúde. [2]

As consequências psicossociais do consumo - tais como fraco aproveitamento escolar, abandono precoce da escola e comportamentos anti-sociais - têm sido largamente discutidas e encontram-se bem documentadas. [2]

Ao nível da saúde, o consumo possui efeitos adversos importantes e essencialmente centrados ao nível do sistema cardiovascular, endócrino, respiratório, imunológico e sistema nervoso central. [24]

O abuso da *cannabis* resulta num comprometimento da função cognitiva tanto em adultos como em crianças. São também de esperar consequências ao nível do desenvolvimento fetal (malformações e danos cognitivos), alteração da taxa e fluxo sanguíneo, complicações respiratórias que podem variar desde tosse crónica até enfisema, enfraquecimento da função imunitária e aumento do risco de desenvolvimento de cancro no pescoço, cabeça e/ou pulmões. [2]

Alguns casos de infeções oportunistas, infertilidade, desordens de sono, eventos ateroscleróticos, arritmias e cancro de próstata têm sido reportados com o uso crónico, no entanto são necessários mais estudos que comprovem e apoiem estes casos. [2]

1.3.3 - Dependência

A dependência resultante do consumo de *cannabis* tem sido diagnosticada nos mesmos padrões de outras substâncias. O risco de dependência aumenta conforme a extensão do consumo. No entanto, a maioria dos usuários habituais não se tornam dependentes e conseguem interromper o uso se assim o desejarem. [4]

Apenas uma minoria desenvolve sintomas de abstinência, nomeadamente irritabilidade, nervosismo, inquietação, insónias, sintomas depressivos, redução do apetite e cefaleias. [4]

Determinação de Tetrahydrocannabinol e principais metabolitos em amostras de plasma com recurso à microextração em seringa empacotada e análise por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de espectrometria de massa em tandem.

1.4 - Janelas de deteção de canabinóides

Como já foi anteriormente referido, as concentrações plasmáticas do THC e consequentemente dos seus metabolitos são dependentes de vários fatores. Além da dose também a via e forma de administração são bastante influentes na construção do perfil de concentração *versus* tempo após consumo. Na figura 8 apresentam-se as janelas de deteção de diversas matrizes biológicas onde podemos detetar os produtos resultantes do consumo de *cannabis*.

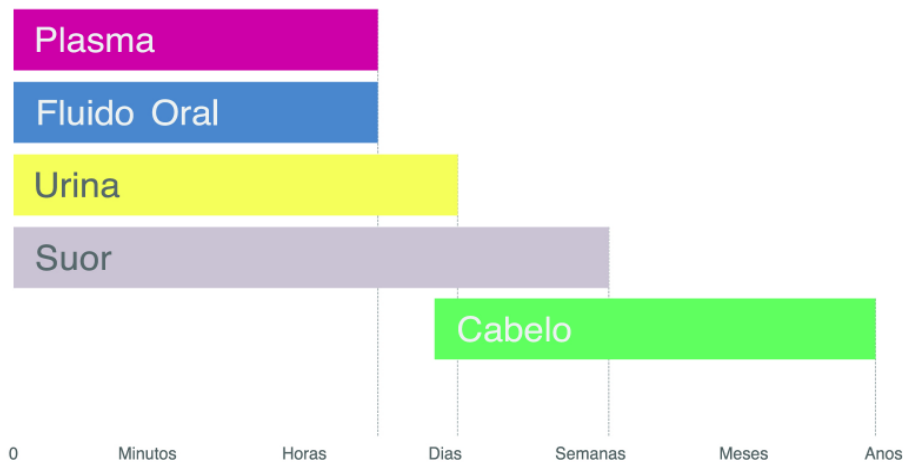


Figura 8. Intervalos de deteção em várias matrizes após o consumo ocasional de *cannabis*. [2] Adaptado

1.5 - Amostras biológicas: Plasma

A determinação de drogas de abuso, nomeadamente dos compostos de estudo neste trabalho pode ser efetuada em diferentes matrizes biológicas, sendo que cada uma delas apresenta vantagens e desvantagens. A escolha do material biológico para a realização de análises toxicológicas deve ter em consideração as características toxicocinéticas dos agentes investigados e a finalidade da análise. [25]

O plasma, uma matriz convencional, é das amostras mais comumente utilizadas e possui como principais vantagens [25]:

- Correlação direta, para a maioria dos fármacos e drogas, entre as concentrações e os seus efeitos biológicos;
- Fácil manuseamento;

- Dificuldade de adulteração;
- Possibilidade de obter um razoável volume;

Na eventualidade de cruzamento entre os dados resultantes das análises em plasma de um xenobiótico e os seus dados toxicocinéticos é possível inferir sobre o momento de uso e quantidade de substância administrada, ^[25] uma mais-valia da escolha do plasma como amostra e que é particularmente importante em casos de legitimidade legal.

Apesar das diversas vantagens que suportam a elevada taxa de utilização de plasma como amostra, o seu uso também está ligado a algumas desvantagens ^[25]:

- Processo de recolha invasivo, sendo necessário pessoal e material especializado para a sua obtenção;
- Curta janela de deteção quando comparado com outras matrizes não convencionais (Ex: cabelo)
- O seu elevado conteúdo proteico (7-8%) pode dificultar o processo extrativo.

1.6 - Preparação da amostra

1.6.1 - Pré-tratamento da amostra

Apesar da existência de instrumentação analítica altamente sensível e específica, um processo pré-analítico de tratamento da amostra é normalmente necessário para a extração e concentração dos compostos de interesse a partir da matriz ^[26] antes de se efetuar a análise cromatográfica.

Este passo pré-analítico ajuda a melhorar a sensibilidade da metodologia e é muitas vezes necessário devido à incompatibilidade da amostra com os sistemas cromatográficos, complexidade das matrizes biológicas e ainda devido ao facto de algumas substâncias em análise se encontrarem na amostra em concentrações vestigiais. ^[27, 28] É um processo fundamental em todos os laboratórios, representando a maioria do tempo e recursos gastos pelos mesmos.

Nos últimos anos tem-se procurado o desenvolvimento de técnicas extrativas que sejam mais céleres, mais simples e que utilizem uma menor quantidade de solventes orgânicos, diminuindo desta forma os custos e tempo gastos com esta etapa em laboratório.

Entre as várias técnicas de preparação de amostras as mais comumente utilizadas estão a extração líquido-líquido (LLE) e a extração em fase sólida (SPE). No entanto, devido às razões anteriormente referidas, existe uma tendência crescente para usar algumas técnicas mais recentemente introduzidas, como é o caso da microextração em fase sólida (SPME), a microextração em seringa empacotada (MEPS), a extração dinâmica em fase sólida (SPDE), a

Determinação de Tetrahydrocannabinol e principais metabolitos em amostras de plasma com recurso à microextração em seringa empacotada e análise por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de espectrometria de massa em tandem.

microextração em polímero monolítico (PMME), microextração em gota suspensa (SDME), [26] entre outras.

1.6.2 - Microextração em seringa empacotada

A microextração em seringa empacotada (MEPS) é uma técnica recente de preparação de amostras desenvolvida por Abdel-Rehim nos laboratórios da AstraZeneca em 2004. [26] É uma técnica extrativa miniaturizada baseada nos princípios da SPE, no entanto difere desta devido ao facto da amostra passar através da coluna não uma, mas múltiplas vezes, como parte de um esforço para aumentar a recuperação dos compostos de interesse. [26] Outra diferença importante em relação à SPE é a possibilidade de acoplamento *on-line* da MEPS a diversos sistemas cromatográficos, como a cromatografia gasosa (GC) e cromatografia líquida (LC). [26] É assim possível a obter um processo extrativo simples, robusto e rápido, com consumo mínimo de solventes orgânicos e diminuição do custo de análise. [26,29, 30]

O sistema de MEPS pode ser definido como um conjunto de duas partes, a seringa e o dispositivo BIN (*Barrel Insert and Needle Assembly*) onde se encontram comprimidos aproximadamente 2 mg da fase estacionária. As fases estacionárias, ou BIN's, mais utilizadas são constituídas por adsorventes baseados em sílica (SIL) ou em sílicas modificadas (C₂, C₈, C₁₈ e M₁). [26] Na tabela 1 encontra-se alguma informação sobre os BIN's existentes atualmente no mercado.

Tabela 1. BIN's e fases estacionárias de MEPS existentes. [27] Adaptado

Nome BIN	Adsorvente (s)	Estrutura química
SIL	Sílica	$\equiv \text{Si} - \text{OH}$
C ₂	Etilsilano	$\equiv \text{Si} - \text{CH}_2 - \text{CH}_3$
C ₈	Octilsilano	$\equiv \text{Si} - (\text{CH}_2)_7 - \text{CH}_3$
C ₁₈	Octadecilsilano	$\equiv \text{Si} - (\text{CH}_2)_{17} - \text{CH}_3$
M ₁	Octilsilano + Benzenossulfonilpropilsilano	$\equiv \text{Si} - (\text{CH}_2)_7 - \text{CH}_3$ + $\equiv \text{Si} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{SO}_3\text{H}^+$

A aplicação da microextração em seringa empacotada como processo extrativo é compreendida por uma sucessão de passos que permitem de forma geral reter e concentrar os analitos de interesse e eliminar os possíveis interferentes, ficando os primeiros dissolvidos num eluato. [26] As etapas aplicadas numa extração por MEPS são normalmente as seguintes:

- Acondicionamento da fase estacionária;
- Aspiração da amostra;
- Lavagem da fase estacionária;
- Eluição dos analitos.

Na fase de acondicionamento a coluna é ativada com um solvente orgânico, normalmente metanol, de forma a facilitar a retenção dos analitos. ^[26] Após a ativação faz-se passar pela coluna água (ou tampões aquosos) de forma a equilibrar a mesma. ^[31] Terminado o acondicionamento a amostra é aspirada e os analitos são retidos, podendo este processo ser repetido várias vezes de forma a concentrar os compostos no interior da coluna. A coluna é depois lavada com a finalidade de eliminar proteínas e outros interferentes presentes na amostra, sendo a eluição dos compostos realizada com recurso a solventes orgânicos. ^[26] Em alguns casos os compostos são eluídos e injetados diretamente no sistema cromatográfico, diminuindo assim os passos na preparação da amostra e aumentando a resposta do método.

Existem inúmeros fatores que podem afetar o desempenho da MEPS, entre os quais o volume e composição das soluções de lavagem e eluição e o tipo e quantidade de adsorvente usado. Uma otimização destes fatores é normalmente necessária e efetuada durante o desenvolvimento do método. ^[26]

A utilização desta técnica para preparação de amostras é muito promissora. De facto, como referido anteriormente, em comparação com a SPE ou LLE, a MEPS reduz o tempo de preparação da amostra e o consumo de solventes orgânicos, sendo o custo de análise mínimo. Se compararmos com a SPME, a MEPS possui, em geral, recuperações absolutas muito superiores (>50%). Quando comparada com SPE, possui a vantagem de poder ser utilizada várias vezes, entre 50 e 100 extrações em plasma, ou 400 extrações em amostras de água, enquanto uma coluna de SPE convencional só é utilizada uma vez. ^[26]

1.7 - Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa em tandem

O princípio básico da cromatografia gasosa envolve a volatilização da amostra após a injeção e uma separação dos componentes baseada na sua distribuição e interação entre as fases móvel (gás de arraste) e a estacionária, com subsequente deteção de cada composto. ^[32]

A eluição dos compostos é dependente da sua pressão de vapor dentro do cromatografo de gases, que por sua vez depende da vaporização do composto e da força das interações moleculares que se estabelecem entre este e a fase estacionária. Temperaturas mais elevadas aumentam a pressão de vapor do composto, enquanto interações moleculares mais fortes com a fase estacionária a diminuem. É a combinação destas duas forças que determina,

Determinação de Tetrahydrocannabinol e principais metabolitos em amostras de plasma com recurso à microextração em seringa empacotada e análise por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de espectrometria de massa em tandem.

em qualquer momento, que parte do composto injetado se encontra na fase móvel e que parte se encontra na fase estacionária. [33]

Visto que a eluição através da coluna só é possível se o composto se encontrar na fase móvel, é a pressão de vapor que determina o tempo de retenção do mesmo. O controlo da pressão de vapor pode ser alcançado pelo estabelecimento de um programa de temperaturas no forno do cromatógrafo, permitindo assim ao operador manipular os tempos de retenção dos compostos em análise. [33]

É uma técnica útil para análise de substâncias que são suscetíveis de serem volatilizadas sem sofrerem decomposição a altas temperaturas, sendo particularmente interessante quando o volume de amostra disponível para análise é muito pequeno. [32]

A cromatografia pode ser combinada a diferentes sistemas de deteção, tornando-se uma das técnicas analíticas mais utilizadas e de melhor desempenho. [34] Entre os sistemas de deteção que podem ser acoplados ao cromatógrafo encontra-se a espectrometria de massa em tandem (detetor triplo quadrupolo), um sistema de deteção que aumenta de forma considerável a seletividade das análises. É uma técnica normalmente utilizada para confirmação na identificação de compostos, estando cada vez mais a ser utilizada para quantificação de substâncias em amostras de carácter forense. [35]

Esta espectrometria de massa sequencial, também chamada tandem ou MS/MS, é uma técnica que utiliza dois estágios de análise de massa. No primeiro estágio ocorre uma seleção dos iões precursores (primeiro quadrupolo) que são depois focados na célula de colisão (segundo quadrupolo) na qual são fragmentados em produtos iónicos ou iões filho que são caracterizados no segundo estágio de análise de massa (terceiro quadrupolo), estabelecendo-se assim uma relação entre o ião precursor isolado e os produtos iónicos gerados a partir da fragmentação induzida. [36] Da totalidade de iões filho são selecionados um ião quantificador, que vai permitir a quantificação do composto mediante a construção de curvas de calibração, e um ou vários iões qualificadores que permitem, para além do ião quantificador, confirmar a identidade do composto. O sinal oriundo do detetor é função da abundância dos iões para cada uma das relações massa/carga (m/z). [32, 36, 37]

A figura 9 ilustra de forma esquemática o modo de funcionamento do sistema de deteção triplo quadrupolo (MS/MS).

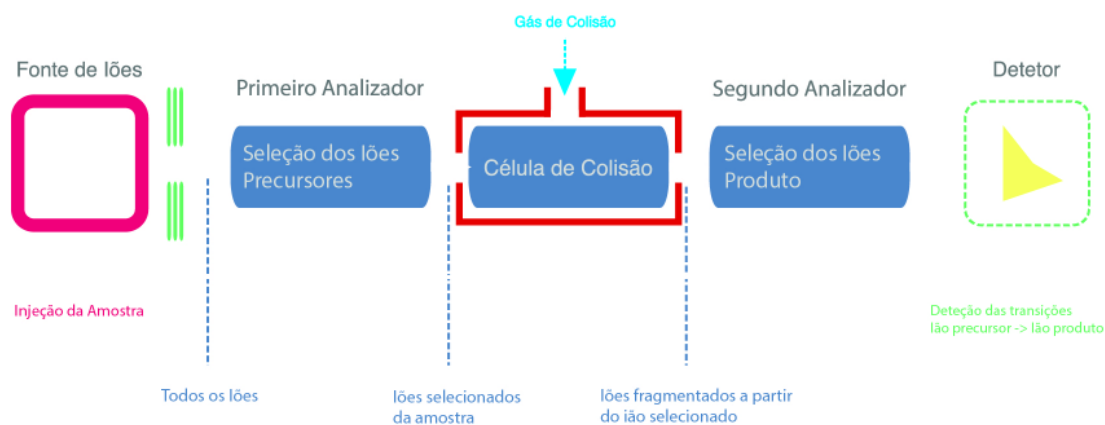


Figura 9. Representação do modo de funcionamento da espectrometria de massa em tandem. ^[36]
Adaptado

A utilização de um sistema de cromatografia gasosa acoplada a um detetor de massa em tandem apresenta algumas vantagens. O seu elevado poder de resolução assegura a identificação dos compostos com uma maior exatidão, permitindo assim a análise de amostras mais complexas. Quando se usa GC-MS/MS é possível obter melhores limites de deteção e de quantificação quando comparados com outros métodos (Ex: GC-MS), visto que a utilização do detetor MS/MS aumenta a sensibilidade e seletividade do método mesmo a baixas concentrações. A espectrometria de massa em tandem também permite com maior seletividade a identificação individual de compostos que não foram completamente separados pela técnica cromatográfica, desde que os compostos em questão apresentem massas ou espectros de massas diferentes. ^[34]

De forma a assegurar uma boa *performance* do GC-MS/MS é necessário definir alguns fatores que podem influenciar o processo analítico. Entre estes são de destacar a coluna, a temperatura dos vários componentes (especialmente do forno), a pressão e natureza química do gás de arraste, modo de injeção utilizado e as energias de colisão aplicadas para deteção dos compostos. ^[32, 37]

1.8 - Análise de canabinóides em matrizes biológicas

A *cannabis* é a substância ilícita mais consumida a nível mundial. [5] Como tal, existem inúmeros métodos analíticos de deteção e quantificação de canabinóides e metabolitos efetuados em diferentes matrizes biológicas com recurso aos mais variados sistemas de extração e análise. Esta análise focar-se-á, de forma sucinta, no que já se encontra publicado ao nível da deteção e quantificação dos compostos em estudo em amostras biológicas com recurso à extração por técnicas microextrativas.

A pesquisa foi efetuada na base de dados pública *Pubmed* (base de dados bibliográficos da *National Library of Medicine*), limitada a artigos científicos publicados entre janeiro de 2000 e agosto de 2013. Foram utilizadas as seguintes palavras-chave: “*tetrahydrocannabinol and microextraction*” e “*cannabinoids and microextraction*”. A tabela seguinte resume as principais características dos trabalhos que obedeceram a estes critérios de seleção, úteis à posterior contextualização dos resultados obtidos neste trabalho.

Tabela 2. Métodos analíticos para determinação de canabinóides em amostras biológicas, usando técnicas microextrativas para a preparação da amostra.

Referência	Analito(s)	Amostra (volume)	Técnica de extração	Método analítico - sistema de deteção	LLOQ	Recuperação (%)
Sporkert <i>et al.</i> (2000) [38]	THC CBN CBD	Cabelo (0,1 g)	HS-SPME	GC-MS	n.d.	n.d.
Kramer <i>et al.</i> (2001) [39]	THC-COOH	Urina (n.d.)	HF-MSME	GC-MS	n.d.	n.d.
Musshoff <i>et al.</i> (2002) [40]	THC CBN CBD	Cabelo (0,1 g)	HS-SPME	GC-MS	0,27 ng/mg 0,51 ng/mg 0,27 ng/mg	7,5 0,3 1,9
Musshoff <i>et al.</i> (2003) [41]	THC CBN CBD	Cabelo (0,1 g)	HS-SPDE	GC-MS	0,45 ng/mg 0,44 ng/mg 0,44 ng/mg	8,4 0,6 1,7
Fucci <i>et al.</i> (2003) [42]	THC CBN CBD	Saliva (0.2 mL)	HS-SPME e DI-SPME	GC-MS	n.d.	n.d.
Lachenmeier <i>et al.</i> (2003) [43]	THC CBN CBD	Cabelo (0,1 g)	HS-SPDE	GC-MS/MS	0,14 ng/mg 0,22 ng/mg 0,19 ng/mg	8,5 0,5 1,5

<i>Yonamine et al. (2003)</i> ^[44]	THC	Saliva (1 mL)	SPME	GC-FID	5 ng/mL	28,7 - 57,7
<i>Yang et al. (2006)</i> ^[45]	THC CBD	Sangue (1,2 g) Urina (2 mL) Tecido cerebral (0,5 g)	SPMEM	LC-MS	n.d.	n.d.
<i>Rodrigues de Oliveira et al. (2007)</i> ^[46]	THC CBD CBN	Cabelo (0,1 g)	HS-SPME	GC-MS	0,07 ng/mg	n.d.
<i>Nadulski et al. (2007)</i> ^[47]	THC CBD CBN	Cabelo (1,5 - 3 g)	HS-SPME	GC-MS	0,037 ng/mg 0,038 ng/mg 0,048 ng/mg	29 66 14
<i>Luo et al. (2009)</i> ^[48]	THC	Saliva (1 mL)	PMME	GC-MS	2,26 ng/mL	89,8 - 96,5
<i>Emidio et al. (2010)</i> ^[49]	THC CBD CBN	Cabelo (0,1 g)	HS-SPME	GC-MS/MS	0,062 ng/mg 0,12 ng/mg 0,030 ng/mg	1,1 - 1,7 2,4 - 8,7 2,8 - 3,2
<i>Emidio et al. (2010)</i> ^[50]	THC CBD CBN	Cabelo (0,1 g)	HF-LPME	GC-MS/MS	0,02 ng/mg 0,01 ng/mg 0,01 ng/mg	7,6 - 8,9 4,4 - 4,8 7,7 - 8,2
<i>Merola et al. (2010)</i> ^[51]	THC	Cabelo (0,1 g)	HS-SPME	GC-MS	0,02 ng/mg	3.5
<i>Moradi et al. (2011)</i> ^[52]	CBD CBN THC	Urina (10 mL)	SA-DLLME	HPLC-UV	1,0 ng/mL 1,0 ng/mL 2,0 ng/mL	73 58,7 47,5
<i>Sergi et al. (2013)</i> ^[53]	THC THC-OH THC-COOH CBD CBN	Saliva (0,125 mL)	MEPS	LC-MS/MS	0,25 ng/mL 0,40 ng/mL 0,020 ng/mL 0,30 ng/mL 0,30 ng/mL	50 - 56 74 - 78 98 - 105 70 - 72 51 - 54

CBD, canabidiol; CBN, canabinol; DI (direct immersion), imersão direta; DLLME (dispersive liquid-liquid microextraction), microextração líquido-líquido dispersiva; FID (flame ionization detector), detetor de ionização de chama; GC (gas chromatography), cromatografia gasosa; HF (hollow fiber), fibra oca; HPLC (high performance liquid chromatography), cromatografia líquida de alta resolução; HS, *Headspace*; LC (liquid chromatography), cromatografia líquida; LPME (liquid phase microextraction), microextração em fase líquida; MEPS (microextraction by packed sorbent), microextração em seringa empacotada; MS (mass spectrometry), espectrometria de massas; MS/MS (tandem mass spectrometry), espectrometria de massas em tandem; MSME (membrane solvent microextraction), microextração por membrana; n.d., não definido; PMME (polymer monolith microextraction), microextração em polímero monolítico; SA (surfactant assisted), assistida por surfactante; SPDE (solid phase dynamic extraction), extração dinâmica em fase sólida; SPME (solid phase microextraction), microextração em fase sólida; SPMEM (solid phase microextraction membrane), microextração por membrana em fase sólida; THC, delta-9-tetrahydrocannabinol; THC-COOH, 11-Nor-9-carboxi-delta-9-tetrahydrocannabinol; THC-OH, 11-hidroxi-delta-9-tetrahydrocannabinol; UV (ultraviolet), ultravioleta.

2. Justificação do tema

O consumo de *cannabis* é uma prática comum na sociedade atual. Apesar de não causar, de forma direta, graves problemas comportamentais e de saúde, a utilização de *cannabis* para fins recreativos não é isenta de riscos.

O seu consumo, muitas vezes associado a outras substâncias, pode levar a problemas de memória, aprendizagem, concentração e agravamento de problemas psíquicos, além de afetar as capacidades motoras e de condução e poder dar origem a episódios de violência e de marginalização.

Sendo assim, muitas vezes os laboratórios são solicitados pelas autoridades a avaliar o possível consumo desta substância por parte de um indivíduo, tornando-se então essencial dotar os laboratórios de metodologias mais céleres e eficazes de forma a identificar e quantificar estas substâncias psicoativas.

A análise de amostras biológicas por técnicas cromatográficas exige regra geral um pré-tratamento da amostra, uma etapa laboratorial que consome muito tempo e recursos. Desta forma torna-se imperativo o desenvolvimento de novos métodos que diminuam os custos e tempo associados à análise e que sejam simultaneamente confiáveis e de fácil execução.

A microextração em seringa empacotada é uma das novas técnicas extrativas que melhor responde aos desafios apresentados. Entre os prós apontados à sua utilização encontram-se o baixo volume de amostra necessário, o baixo consumo de solventes orgânicos, o tempo de extração reduzido e a possibilidade de automatização de todo o processo.

3. Objetivos

O objetivo geral deste trabalho é a deteção e quantificação de THC, 11-OH-THC e THC-COOH em amostras de plasma. Como objetivos específicos podemos referir:

- Desenvolvimento e otimização de uma metodologia analítica de fácil utilização, rápida e que permita a deteção específica e sensível de THC, 11-OH-THC e do THC-COOH por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa em tandem;
- Desenvolvimento e otimização de um método de extração (microextração em seringa empacotada) em amostras de plasma;

- Validação do método desenvolvido segundo normas internacionalmente aceites, nomeadamente da Food and Drug Administration (FDA) e da International Conference on Harmonisation (ICH);
- Análise de amostras reais através da metodologia desenvolvida.

4. Materiais e Métodos

4.1 - Padrões e Reagentes

- Água desionizada Milli-Q;
- Metanol LiChrosolv®, Merck (Alemanha);
- Acetonitrilo PROLABO®, VWR (Portugal);
- Hidróxido de amónio (NH₄OH) (pro-analysis), J.T. Baker (Holanda);
- Ácido acético (HPLC-grade), Sigma-Aldrich (Portugal);
- Acetado de etilo (Analytical grade), Fisher chemical (Reino Unido);
- N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida (MSTFA), Macherey-Nagel (Alemanha);
- Trimetilclorosilano (TMCS), Macherey-Nagel (Alemanha);
- Dihidrogenofosfato de potássio (KH₂PO₄), Sigma Aldrich (Portugal);
- Delta-9-tetrahydrocannabinol a 1 mg/mL em metanol, LGC Promochem (Espanha);
- 11-Hidroxi-delta-9-tetrahydrocannabinol a 100 µg/mL em metanol, LGC Promochem (Espanha);
- 11-nor-9-carboxi-delta-9-tetrahydrocannabinol 10 µg/mL em metanol, LGC Promochem (Espanha);
- Delta-9-tetrahydrocannabinol-d₃ a 100 µg/mL em metanol, LGC Promochem (Espanha);
- 11-Hidroxi- delta-9-tetrahydrocannabinol-d₃ a 100 µg/mL em metanol, LGC Promochem (Espanha);
- 11-nor-9-carboxi-delta-9-tetrahydrocannabinol-d₃ a 100 µg/mL em metanol, LGC Promochem (Espanha);

Os padrões analíticos dos canabinóides e respetivos deuterados foram gentilmente oferecidos pelo Instituto de Medicina Legal Luís Concheiro, Universidade de Santiago de Compostela (Espanha).

Determinação de Tetrahydrocannabinol e principais metabolitos em amostras de plasma com recurso à microextração em seringa empacotada e análise por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de espectrometria de massa em tandem.

4.2 - Preparação de soluções

Soluções Padrão

As soluções padrão de trabalho foram preparadas por diluições sucessivas com metanol a partir das soluções *stock* anteriormente referidas.

Dependendo do analito foram preparadas soluções individuais a 1 µg/mL e a 100 ng/mL, tendo-se ainda preparado uma solução com mistura de todos os analitos às concentrações de 50 ng/mL e 1 ng/mL.

No caso dos padrões internos, para o THC-d₃ e THC-COOH-d₃ foram preparadas, também por diluições sucessivas com metanol, soluções de trabalho individuais de concentração 1 µg/mL e de 100 ng/mL. No caso do THC-OH-d₃ foi preparada uma solução de concentração 100 ng/mL. Além das soluções individuais foi também preparada uma solução de mistura de padrões internos à concentração de 10 ng/mL.

Todas as soluções foram armazenadas a 4 °C ao abrigo da luz.

Outras soluções

Reagente de derivatização

Foram misturados os reagentes de forma a se obter uma concentração de 5% de TMCS em MSTFA. A solução foi protegida da luz e armazenada a 4 °C.

Solução de dihidrogenofosfato de potássio (KH₂PO₄) 0,1 M, pH=6

Para preparar um volume final de 200 mL foram pesados 2,72 g de KH₂PO₄ e dissolvidos em água Milli-Q que foi adicionada até perfazer o volume final de 200 mL. A solução foi homogeneizada e posteriormente transferida para um copo de precipitação onde se adicionou NaOH 1 M até se atingir um pH de 6. A solução foi armazenada a 4 °C.

3% de ácido acético em água

Para um volume final de 10 mL foram medidos 0,3 mL de ácido acético para um balão volumétrico de 10 mL, sendo o volume aferido com água Milli-Q. A solução foi homogeneizada em seguida e armazenada a 4 °C.

5% de metanol em água

Para um volume final de 10 mL foram medidos para um balão volumétrico 0,5 mL de metanol e perpez-se o volume com água Milli-Q, seguido de homogeneização e armazenamento a 4 °C.

10% de hidróxido de amónio em metanol

Para um balão volumétrico de 100 mL foram medidos 10 mL de hidróxido de amónia e 90 mL de metanol, tendo-se homogeneizado em seguida. A solução foi armazenada a 4°C.

4.3 - Equipamentos

- Seringa de MEPS (100-250 µL) da SGE - Analytical Science;
- Colunas de MEPS SGE - Analytical Science;
- Micropipetas automáticas da Gilson (10 e 1000 µL) e da Eppendorf (200 µL);
- Vortex Mixer da Labnet International - modelo 230V;
- Câmara frigorífica da Dagard - Refrigeração a 4 ° C;
- Medidor de pH da Metrohm - modelo 744;
- Sistema de purificação de água Mili-Q Advantage A10® system da Millipore;
- Bomba de vácuo da GAST - modelo DOA-P505-BN;
- Câmara de congelação da Electrolux - modelo Inspire;
- Bloco de aquecimento “Tembloc” da J. P. Selecta;
- Centrífuga Heraeus Multifuge IS-R- Thermo Electron Corporation;
- Balança analítica da Sartorius - modelo CP225;
- Agitador rotativo - modelo Movil-Rod da J.P. Selecta.

4.4 - Matriz biológica

A matriz utilizada no presente trabalho foi plasma humano proveniente do excedente de transfusões sanguíneas que se encontravam fora do prazo do Instituto Português do Sangue e da Transplantação (Centro de Coimbra). Estas amostras foram armazenadas a -21 °C até à sua utilização.

4.5 - Sistema e condições cromatográficas

Para este estudo foi utilizado um sistema de cromatografia gasosa HP7890A (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha), equipado com um detetor de espectrometria de massa triplo quadropolo modelo 7000B (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha). O sistema encontra-se acoplado a um injetor automático modelo MPS2 *autosampler* da Gerstel (Mülheim an der Ruhr, Alemanha). Foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida (30m x 0.25-mm I.D., 0.25-µm) com 5% de fenilmetilsiloxano (J & W Scientific, Folsom, EUA).

A eficiência separativa de um analito por um método cromatográfico depende, além das características do sistema e do analito, das condições cromatográficas utilizadas no ensaio. Com o objetivo de se obter uma eficiência separativa adequada ao estudo em causa, foi

Determinação de Tetrahydrocannabinol e principais metabolitos em amostras de plasma com recurso à microextração em seringa empacotada e análise por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de espectrometria de massa em tandem.

estabelecida a temperatura inicial do forno a 120 °C durante 1,85 minutos, seguido de um aumento de 20 °C por minuto durante 9 minutos até se atingir a temperatura final de 300 °C que foi mantida durante 9,10 minutos. O tempo total de corrida foi de 19,95 minutos. Foram ainda estabelecidas as temperaturas de 250 °C no injetor e de 280 °C no detetor.

O volume de injeção de amostra foi de 2 µL em modo *splitless* e foi utilizado hélio como gás de arraste a um fluxo constante de 0,8 mL/min. Ao nível do espectrómetro de massa estabeleceu-se um fluxo de 1,5 mL/min de hélio e de 2,5 mL/min de azoto na célula de colisão em modo de impacto eletrónico, com uma corrente de trabalho de 35 µA e energia de 70 eV.

Os dados foram adquiridos com o sistema a operar em modo MRM (*multiple reaction monitoring*) com auxílio do programa *MassHunter WorkStation Acquisition Software* (Agilent Technologies). Foram escolhidas as transições que melhor identificavam e caracterizavam cada um dos analitos. A tabela 3 recolhe os parâmetros do método MRM utilizado, sendo que se encontra sublinhado o ião quantificador utilizado para cada composto.

Tabela 3. Parâmetros do método desenvolvido (GC-MS/MS). Iões quantitativos sublinhados

Tempo do segmento (min)	Composto	Tempo de retenção (min)	Ião precursor (m/z)	Ião produto (m/z)	Energia de colisão (eV)
9	THC	10,67	313,9	<u>219,1</u> 273,2	15 10
	THC-d ₃	10,67	374,3	<u>374,3</u>	10
11.3	THC-OH	11,74	371,3	<u>371,3</u> 289,2	10 15
	THC-OH-d ₃	11,72	374,3	<u>374,3</u>	10
12.1	THC-COOH	12,45	370,8	<u>289,2</u> 305,2	15 15
	THC-COOH-d ₃	12,43	374,3	374,2	10

4.6 - Preparação da amostra

Para diminuir a quantidade de interferentes e o conteúdo proteico das amostras, sujeitou-se o plasma a um pré-tratamento que consistiu na adição de acetonitrilo às amostras numa razão de 3:1 (acetonitrilo:plasma) com subsequente centrifugação a 4500 rotações por minuto durante 15 minutos. O sobrenadante foi em seguida exposto a evaporação sob corrente de azoto para assim eliminar o acetonitrilo adicionado anteriormente. Salienta-se que este acetonitrilo encontrava-se refrigerado a -14 °C.

4.7 - Procedimento de Extração

A 250 µL de plasma adicionaram-se 5 mL de solução KH_2PO_4 0,1 M (pH = 6) e 50 µL de padrão interno a 10 ng/mL, seguido de agitação no sistema de agitação em rolos durante 10 minutos.

Tendo em conta as diferenças no comportamento químico entre os três compostos e de forma a obter um compromisso viável na extração de todos eles, optou-se por utilizar uma coluna de modo misto (M1) para todas as extrações. Este tipo de coluna engloba a separação por interação hidrofóbica com a separação por troca catiónica.

Após o acondicionamento da coluna com metanol (4 vezes 250 µL) e água (4 vezes 250 µL), procedeu-se à aspiração da amostra a uma velocidade de cerca de 10 µL/s (26 vezes 250 µL). A lavagem foi realizada pela passagem através da coluna de 100 µL de uma solução de 3% de ácido acético em água seguido de aspiração de 100 µL de uma solução de 5% de metanol em água. Os analitos foram eluídos com 600 µL (6 vezes 100 µL) de uma solução de 10% de hidróxido de amónio em metanol, tendo-se procedido no fim à lavagem da coluna com metanol (4 vezes 200 µL).

Por fim, o extrato obtido foi evaporado à secura sob corrente de azoto e adicionaram-se 65 µL de reagente de derivatização (MSTFA com 5% de TMCS). O processo de derivatização foi realizado a 85 °C durante 40 minutos e uma alíquota de 2 µL foi injetada no sistema cromatográfico nas condições anteriormente referidas.

5. Resultados e discussão

5.1 - Identificação dos analitos em estudo

O primeiro passo no desenvolvimento do método analítico prende-se com a identificação qualitativa dos compostos.

Após a definição dos parâmetros cromatográficos a utilizar, tais como o fluxo do gás de arraste e o programa de temperaturas, os padrões analíticos foram injetados no sistema cromatográfico em modo de varrimento contínuo (modo *scan*) de forma a detetar e identificar os iões característicos de cada molécula. Posteriormente, por comparação dos espectros de massa obtidos em modo *scan* com os existentes na biblioteca de espectros para o THC, THC-OH e THC-COOH, procedeu-se à identificação dos analitos no cromatograma com definição dos respetivos tempos de retenção.

Com base no espectro de massa obtido para cada composto e tendo em conta a abundância relativa de cada ião, foi escolhido para cada analito um ião precursor, efetuando-se em

Determinação de Tetrahydrocannabinol e principais metabolitos em amostras de plasma com recurso à microextração em seringa empacotada e análise por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de espectrometria de massa em tandem.

seguida a sua fragmentação, em modo *product ion* (PI), sob diferentes energias de colisão (10; 15; 20 e 30 eV).

A fragmentação dos iões precursores sob as várias energias de colisão originou espectros de massas (em modo PI) com diferentes iões filho ou produto e abundâncias relativas dos mesmos, sendo que se selecionou para cada analito as transições que melhor representam os seguintes critérios:

- Bom sinal cromatográfico;
- Poucos interferentes no cromatograma;
- Ausência de contribuições cruzadas com os outros analitos do estudo.

Todo o processo anteriormente descrito de construção do método cromatográfico foi repetido para os análogos deuterados dos compostos que foram utilizados como padrões internos para controlo de todo o processo extrativo e analítico.

Após a seleção das transições mais adequadas para cada um dos compostos em estudo, foram definidos os segmentos de análise a utilizar em modo de operação de monitorização de múltiplas reações (MRM), visto que o estabelecimento de segmento ajuda ao aumento da precisão do instrumento durante a análise das amostras.

Na tabela 4 encontra-se resumido o método em MRM criado e utilizado no decorrer deste estudo. As transições assinaladas foram as selecionadas para a quantificação dos compostos.

Tabela 4. Transições monitorizadas em modo MRM (a transição utilizada para quantificação encontra-se sublinhada)

Tempo do segmento (min)	Composto	Tempo de retenção (min)	lão precursor (m/z)	lão produto (m/z)	Energia de colisão (eV)
9	THC	10,67	313,9	<u>219,1</u> <u>273,2</u>	15 10
	THC-d ₃	10,67	374,3	<u>374,3</u>	10
11.3	THC-OH	11,74	371,3	<u>371,3</u> <u>289,2</u>	10 15
	THC-OH-d ₃	11,72	374,3	<u>374,3</u>	10
12.1	THC-COOH	12,45	370,8	<u>289,2</u> <u>305,2</u>	15 15
	THC-COOH-d ₃	12,43	374,3	374,2	10

Devido à semelhança estrutural entre os compostos e os padrões internos utilizados não foi possível, só pela escolha das transições, eliminar todas as contribuições cruzadas entre estes e os compostos. Após se verificar que apenas a injeção dos padrões internos originava sinal nas transições selecionadas para os compostos (o contrário não ocorreu), foram injetadas no equipamento soluções de várias concentrações de uma mistura de deuterados e após a análise dos cromatogramas optou-se por trabalhar com os padrões internos a 2 ng/mL, uma

concentração à qual é possível a sua deteção sem dificuldade e onde já não ocorrem contribuições ao nível das transições dos compostos.

Outro parâmetro estudado foi o modo de injeção. De forma a obter uma maior sensibilidade e assim conseguir detetar baixas concentrações, optou-se por trabalhar em modo *splitless*, uma vez que não existiam diferenças ao nível da presença de interferentes procedentes da técnica de extração entre este modo de injeção e o modo *split*.

Na figura 10 apresenta-se o cromatograma obtido por análise de uma amostra fortificada com os compostos de estudo a 0,1 ng/mL e padrões internos a 2 ng/mL, utilizando o método cromatográfico anteriormente descrito.

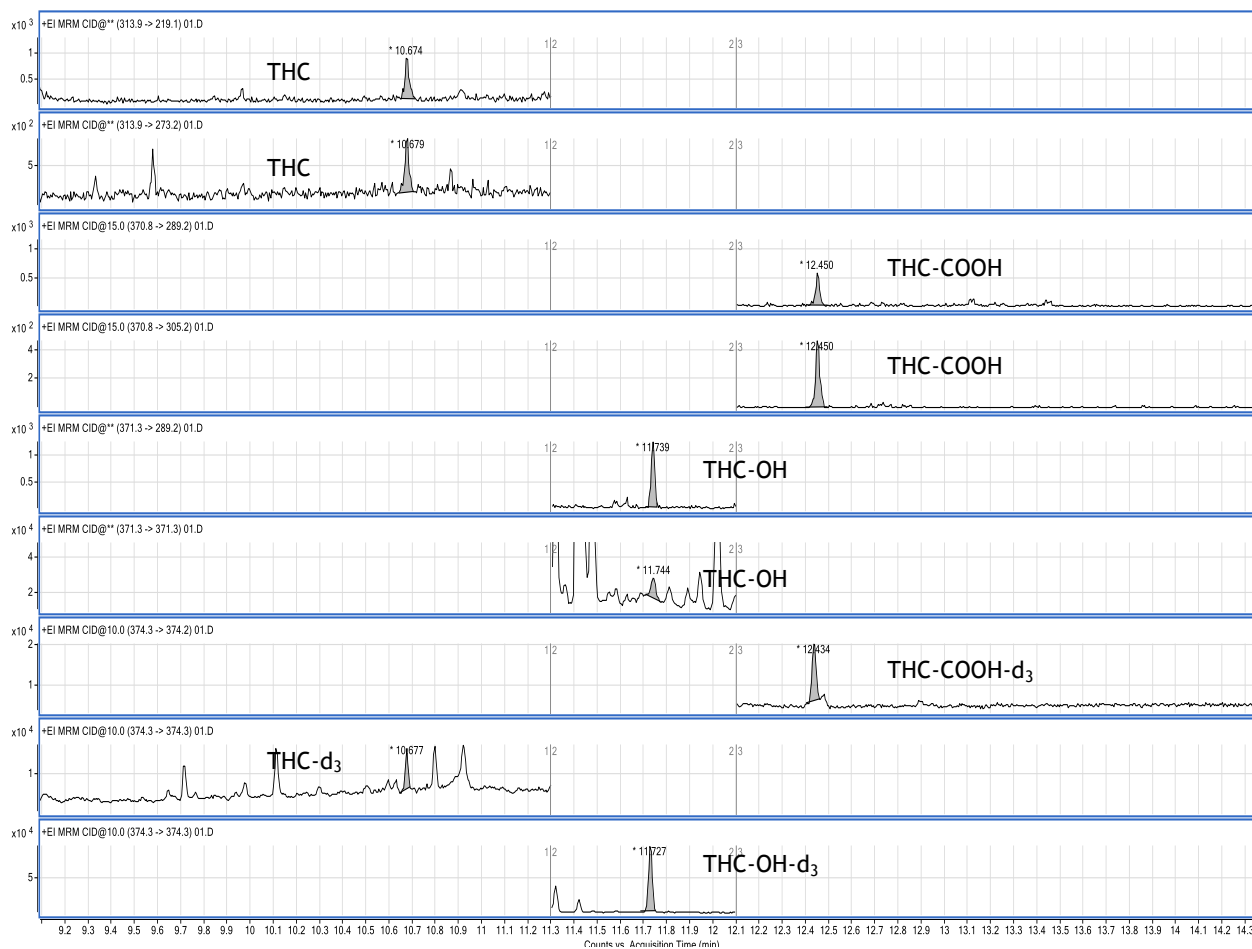


Figura 10. Cromatogramas de THC, THC-OH e THC-COOH a 0,1 ng/mL e respetivos padrões internos a 2 ng/mL

5.2 - Otimização do método extrativo

Com o objetivo de minimizar o número de interferentes e aumentar a eficácia do processo analítico, foi utilizada como técnica extrativa a microextração em seringa empacotada.

Determinação de Tetrahydrocannabinol e principais metabolitos em amostras de plasma com recurso à microextração em seringa empacotada e análise por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de espectrometria de massa em tandem.

Durante toda a seleção e otimização do processo extrativo foi utilizada uma coluna de modo misto (M1) e um volume de plasma de 250 µL, fortificado com os compostos de estudo a uma concentração de 20 ng/ml. Às amostras foram posteriormente adicionados 5 mL de KH_2PO_4 0,1 M (pH=6) de forma a obtermos um fator de diluição para o plasma de 1:20. Este fator é aconselhado quando se trabalha com amostras de plasma e MEPS. O acondicionamento para todas as extrações foi efetuado com metanol (4 vezes 250 uL) e água (4 vezes 250 uL). Após a eluição a coluna foi lavada com água (4 vezes 200 uL). No final do processo extrativo foram adicionados ao eluato os padrões internos a uma concentração de 20 ng/mL.

5.2.1 - Seleção do procedimento de extração

Tendo em conta as características dos compostos, a coluna a utilizar e bibliografia já publicada relacionada com outros métodos extrativos e os compostos em estudo, foram sujeitas a estudo, para seleção da técnica a otimizar, as propostas extrativas referenciadas na tabela 5.

Tabela 5. Técnicas extrativas estudadas para seleção da extração a otimizar.

Técnica	Lavagem (1 vez com 100 µ L)	Eluição (6 vezes 100 µL)
1.	<ul style="list-style-type: none">• Acetato de Amónio 25 Mm• 5% de metanol em água	<ul style="list-style-type: none">• Ácido fórmico em metanol (5:95)
2.	<ul style="list-style-type: none">• Água:acetonitrilo:amónia (84:15:1)	<ul style="list-style-type: none">• Hexano:acetato de etilo:ácido acético (75:20:5)
3.	<ul style="list-style-type: none">• 5 % de hidróxido de amónio em água	<ul style="list-style-type: none">• Diclorometano:Isopropanol (75:25)
4.	<ul style="list-style-type: none">• 1% de ácido acético em água• 10% de metanol em água	<ul style="list-style-type: none">• 5% de hidróxido de amónio em metanol
5.	<ul style="list-style-type: none">• 8% de isopropanol em 2% de ácido fórmico	<ul style="list-style-type: none">• Metanol:acetonitrilo (70:30)
6.	<ul style="list-style-type: none">• 5% iso-propanol em 1% de hidróxido de amónio	<ul style="list-style-type: none">• 3% de ácido fórmico em acetonitrilo + metanol (6:4)
7.	<ul style="list-style-type: none">• 10 mM de ácido fórmico em água	<ul style="list-style-type: none">• 50 mM de hidróxido de amónio em metanol

Cada uma das técnicas foi efetuada em triplicado, tendo-se expresso os resultados em termos de média e desvio padrão da razão área do composto/área do padrão interno (figuras 11 - 13).

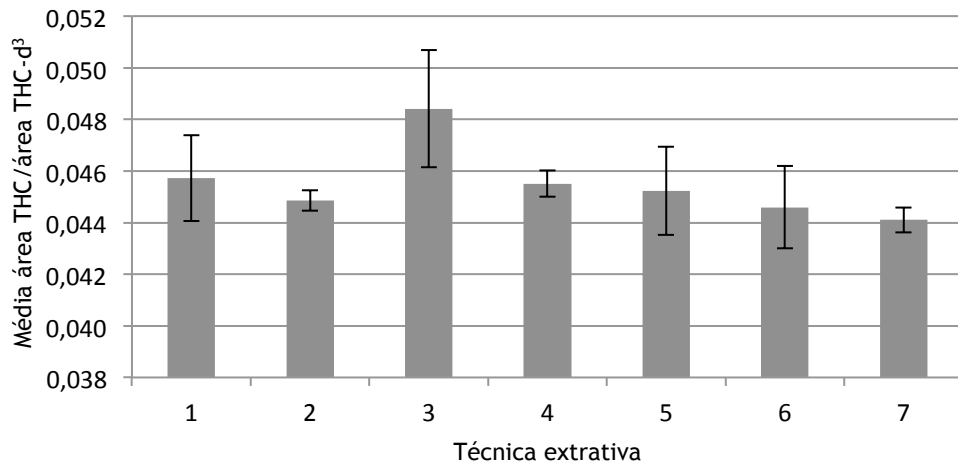


Figura 11. Média e desvio-padrão da área de THC/ área de THC-d₃ para as várias técnicas estudadas.

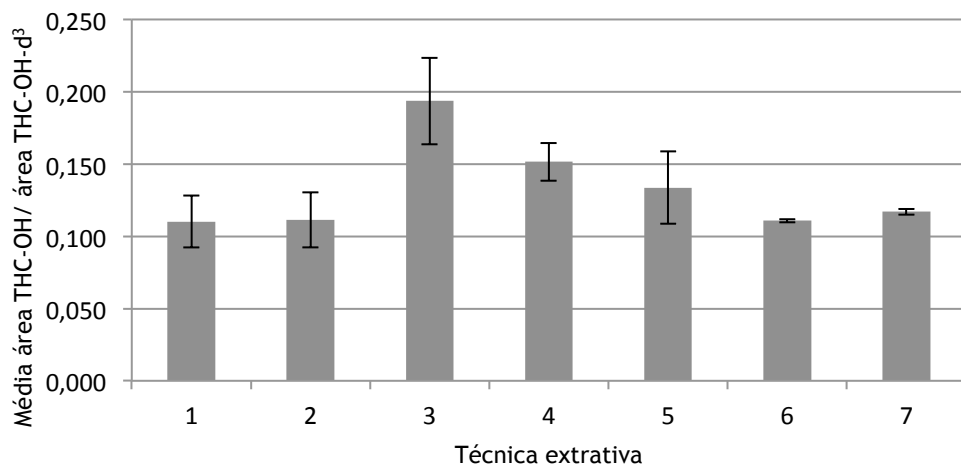


Figura 12. Média e desvio-padrão da área de THC-OH/ área de THC-OH-d₃ para as várias técnicas estudadas.

Determinação de Tetrahydrocannabinol e principais metabolitos em amostras de plasma com recurso à microextração em seringa empacotada e análise por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de espectrometria de massa em tandem.

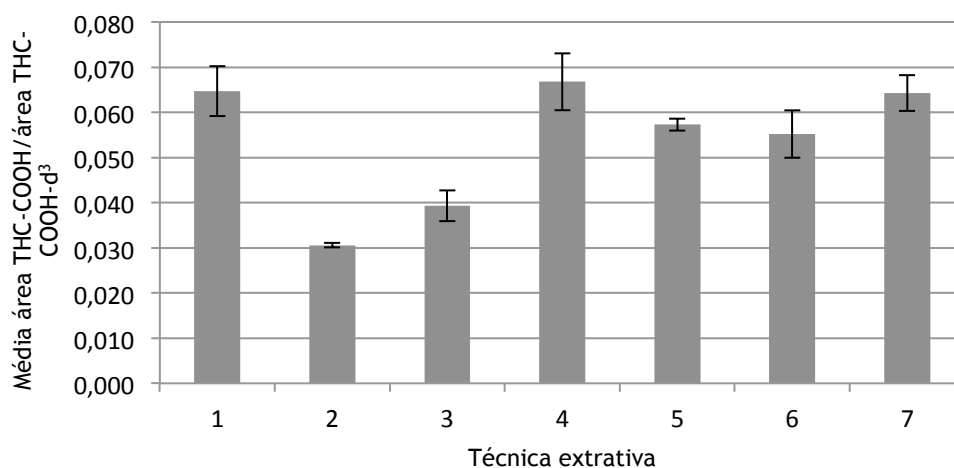


Figura 13. Média e desvio-padrão da área de THC-COOH/ área de THC-COOH-d₃ para as várias técnicas estudadas.

A seleção da técnica extrativa a otimizar tem que ter em conta não só o compromisso necessário para com a recuperação de todos os compostos em estudo, mas também deve refletir outras premissas que apontem para uma maior necessidade de recuperação de um determinado composto em detrimento de outros.

Por análise dos gráficos anteriores (figuras 11-13) podemos concluir que as técnicas extrativas que apresentaram melhores recuperações foram a técnica 3 para o THC e THC-OH e a técnica número 4 para o THC-COOH, sendo que a técnica número 4 foi a segunda melhor técnica extrativa para o THC-OH e para o THC (neste último a par da técnica número 1). A baixa *performance* da técnica número 3 para o THC-COOH, aliada à importância analítica deste composto, leva-nos a considerar que a melhor técnica extrativa é a técnica número 4.

De forma a confirmar estas conclusões, retiradas de forma empírica, foram aplicados métodos estatísticos (ANOVA, Teste t e Teste F) de comparação de variáveis de forma a verificar se existem ou não diferenças estatisticamente significativas entre as técnicas 3 e 4 para cada um dos compostos.

Da análise estatística (ver Anexo IV) é possível concluir que a diferença entre as técnicas 3 e 4 para o THC e o THC-OH não é estatisticamente significativa. Já em relação ao THC-COOH, a diferença entre as duas técnicas possui relevância estatística, o que corrobora as conclusões anteriormente discutidas.

Após esta análise foi então selecionada a técnica número 4 como técnica extrativa a utilizar no decurso do resto do trabalho.

5.2.2 - Desenho experimental - DOE

A performance extrativa da microextração em seringa empacotada pode ser afetada por vários fatores, tais como volumes e/ou composição das soluções de lavagem e de eluição, coluna utilizada ^[26] e pelo número de vezes que a amostra é aspirada através da coluna. De forma a otimizar o processo extrativo e aumentar o rendimento de extração do mesmo, recorreu-se ao desenho experimental ou *Design of Experiments* (DOE).

O DOE é uma ferramenta estatística aplicada ao processo de decisão. Ajuda a planejar todo o processo de otimização, minimizando-se assim a subjetividade inerente à tomada de decisão por parte do operador. Como avalia de forma multivariada os fatores intervenientes, a otimização é conseguida num menor número de experiências, poupando assim tempo e recursos essenciais ao laboratório.

Para a realização do DOE neste trabalho foi utilizado o programa estatístico MINITAB®, versão 15.

Os fatores analisados durante este estudo foram o número de aspirações, a percentagem de ácido acético e de metanol nas soluções de lavagem e a percentagem de hidróxido de amónio utilizada na solução de eluição. Para a avaliação das interações entre estes fatores foi feito um planeamento fatorial completo com 2 níveis (2^4) e controlo por ponto intermédio (em triplicado). Quando comparada com uma avaliação univariada, esta abordagem permite uma diminuição do número total de experiências, já que pela utilização de um planeamento fatorial é possível avaliar de forma simultânea os efeitos de um elevado número de variáveis a partir de um número reduzido de ensaios experimentais.

O procedimento extrativo a utilizar foi o anteriormente indicado. A seguir apresenta-se a matriz experimental utilizada (tabela 6) neste estudo bem como a resposta obtida para cada composto.

Determinação de Tetrahydrocannabinol e principais metabolitos em amostras de plasma com recurso à microextração em seringa empacotada e análise por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de espectrometria de massa em tandem.

Tabela 6. Matriz experimental e resultados das extracções do DOE.

Ordem da experiência	Aspirações	Percentagem de ácido acético	Percentagem de metanol	Percentagem de hidróxido de amónia	Resposta		
					THC	THC-OH	THC-COOH
1	6	1	0	5	0,056	0,347	0,099
2	12	3	5	10	0,071	0,664	0,201
3	6	5	10	5	0,058	0,329	0,107
4	6	1	0	15	0,056	0,351	0,111
5	18	1	0	15	0,075	0,797	0,242
6	6	5	10	15	0,056	0,365	0,111
7	12	3	5	10	0,062	0,650	0,189
8	18	5	10	5	0,075	0,852	0,255
9	6	5	0	15	0,053	0,376	0,109
10	18	5	10	15	0,071	0,786	0,243
11	6	5	0	5	0,056	0,333	0,106
12	18	5	0	15	0,071	0,755	0,270
13	6	1	10	15	0,056	0,353	0,108
14	18	5	0	5	0,075	0,742	0,259
15	18	1	10	5	0,076	0,744	0,260
16	18	1	0	5	0,075	0,807	0,260
17	18	1	10	15	0,075	0,745	0,247
18	12	3	5	10	0,064	0,598	0,191
19	6	1	10	5	0,057	0,333	0,104

A resposta foi obtida como razão entre a área do íão quantificador de cada composto e a área do íão quantificador do padrão interno (n=1). Apresentam-se em seguida os diagramas de Pareto (figuras 14-16) obtidos por análise dos resultados do DOE.

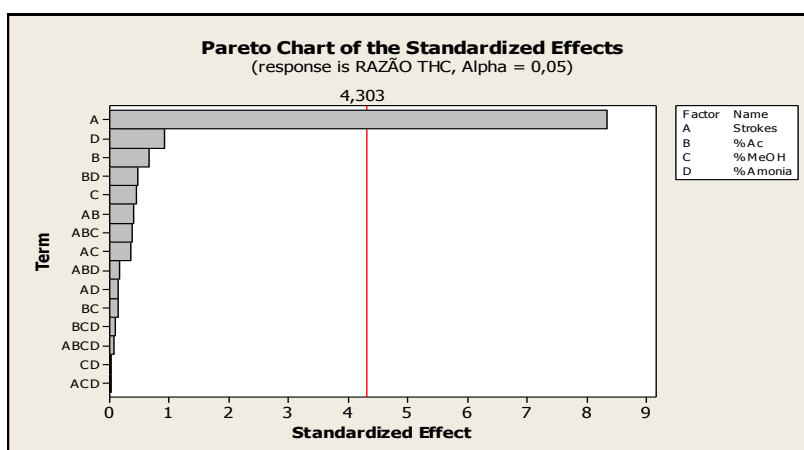


Figura 14. Diagrama de Pareto que ilustra os fatores que influenciam o processo de extração para o THC.

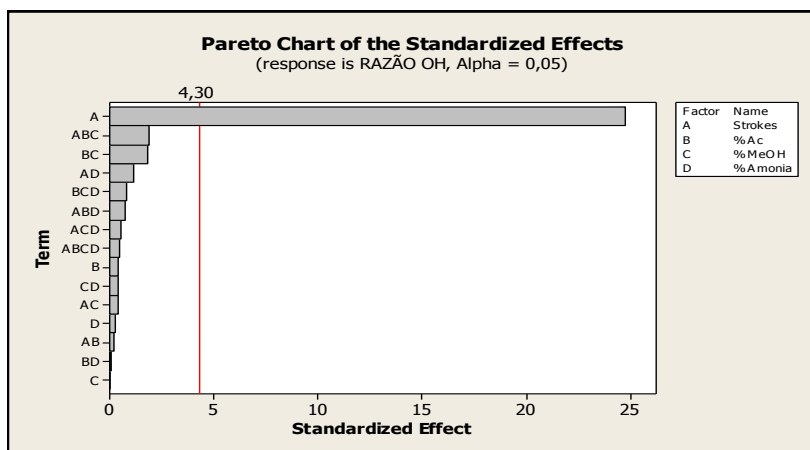


Figura 15. Diagrama de Pareto que ilustra os fatores que influenciam o processo de extração para o THC-OH.

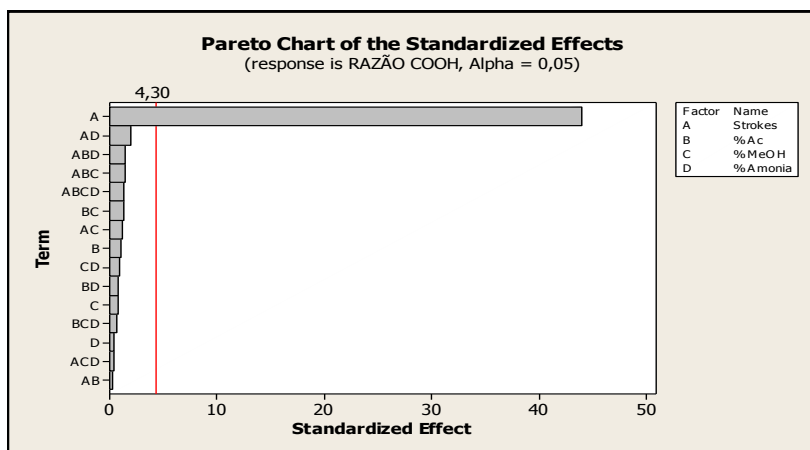


Figura 16. Diagrama de Pareto que ilustra os fatores que influenciam o processo de extração para o THC-COOH.

Nestes diagramas os efeitos de cada um dos fatores são apresentados por ordem decrescente de magnitude e só os fatores que ultrapassam a linha traçada a vermelho (nível de significância de 5%) são considerados estatisticamente significativos, assumindo-se que têm influência na resposta.

Pela análise dos diagramas podemos ver o único parâmetro estatisticamente significativo para os 3 compostos em estudo é o número de aspirações (*strokes*). Esta mesma interpretação é reforçada pela análise dos gráficos de efeitos principais, representados nas figuras 17, 18 e 19, onde o aumento do número de aspirações origina melhores respostas.

Determinação de Tetrahydrocannabinol e principais metabolitos em amostras de plasma com recurso à microextração em seringa empacotada e análise por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de espectrometria de massa em tandem.

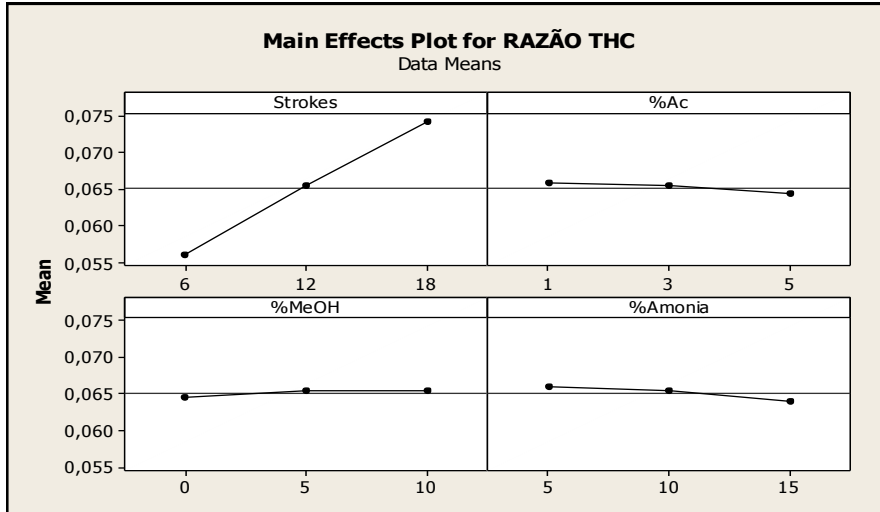


Figura 17. Gráfico de efeitos principais para o THC.

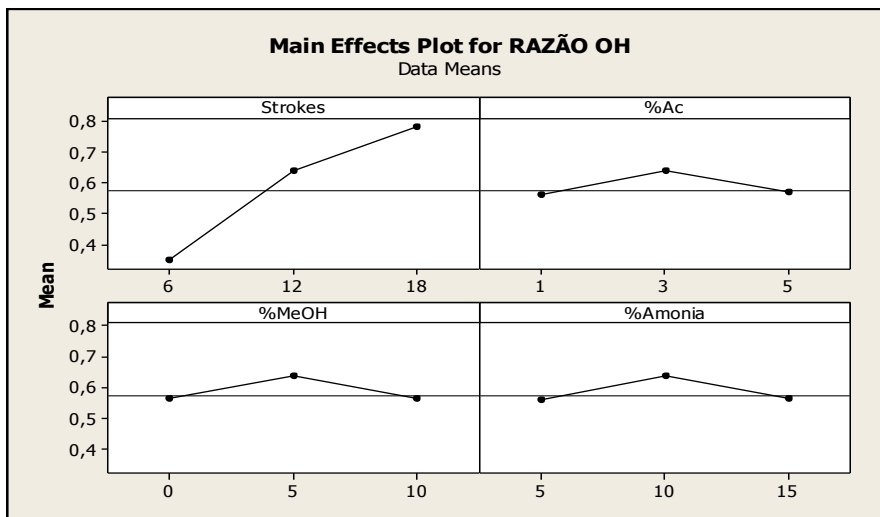


Figura 18. Gráfico de efeitos principais para o THC-OH.

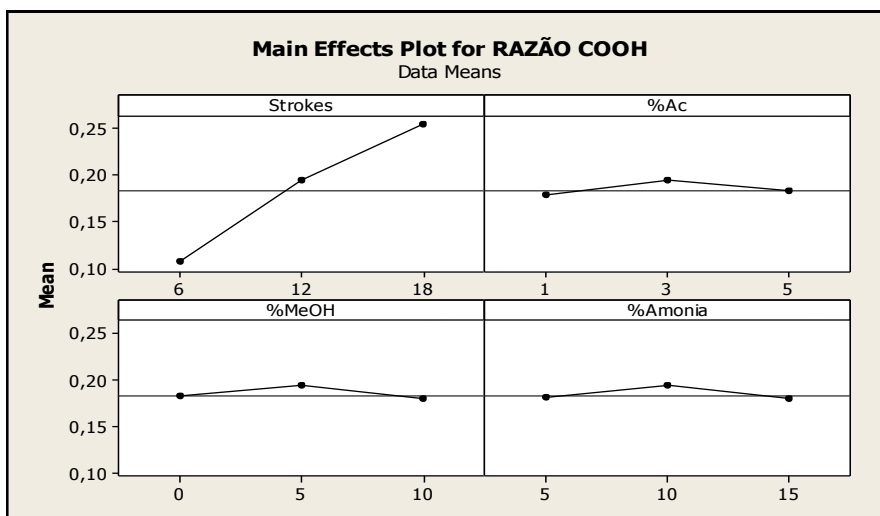


Figura 19. Gráfico de efeitos principais para o THC-COOH.

Ainda por análise dos gráficos de efeitos principais, verificamos que para as percentagens de ácido acético, metanol e hidróxido de amónio as melhores respostas, ainda que sem significância estatística, são obtidas com a utilização das percentagens correspondentes ao ponto intermédio (3%, 5% e 10% respetivamente) para o THC-OH e THC-COOH. A exceção neste ponto é o THC, em que as respostas apresentaram ligeiras melhorias às concentrações de 1% de ácido acético, 10% de metanol e 5% de amónia.

A influência na resposta originada em interações entre os vários fatores também foi estudada. Estes resultados encontram-se apresentados nos seguintes gráficos (figuras 20-22)

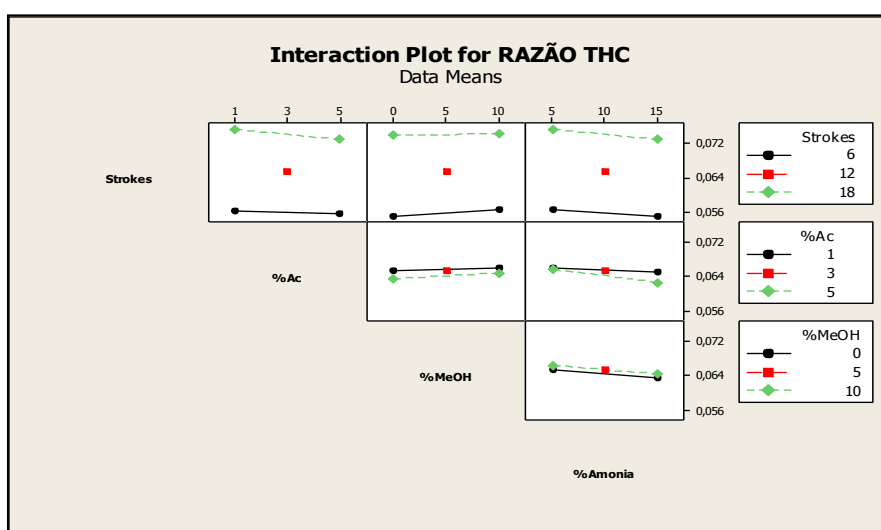


Figura 20. Gráfico de interações entre os vários parâmetros para o THC.

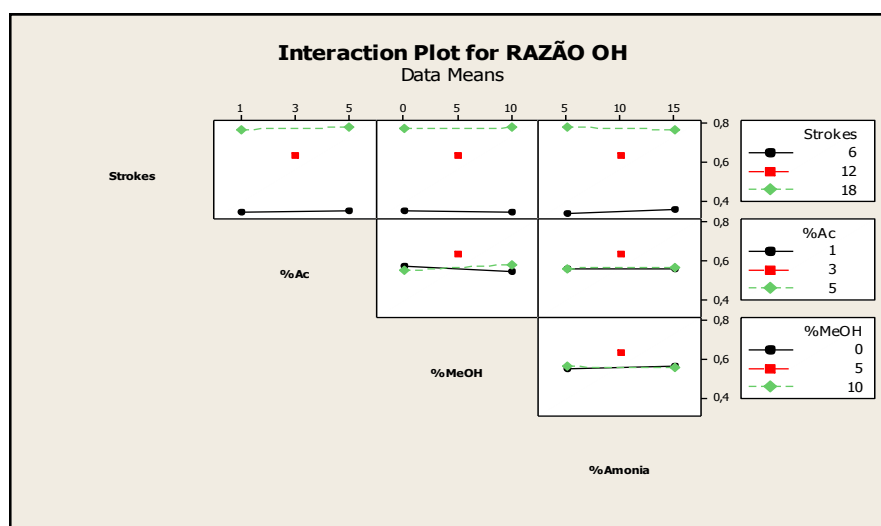


Figura 21. Gráfico de interações entre os vários parâmetros para o THC-OH.

Determinação de Tetrahydrocannabinol e principais metabolitos em amostras de plasma com recurso à microextração em seringa empacotada e análise por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de espectrometria de massa em tandem.

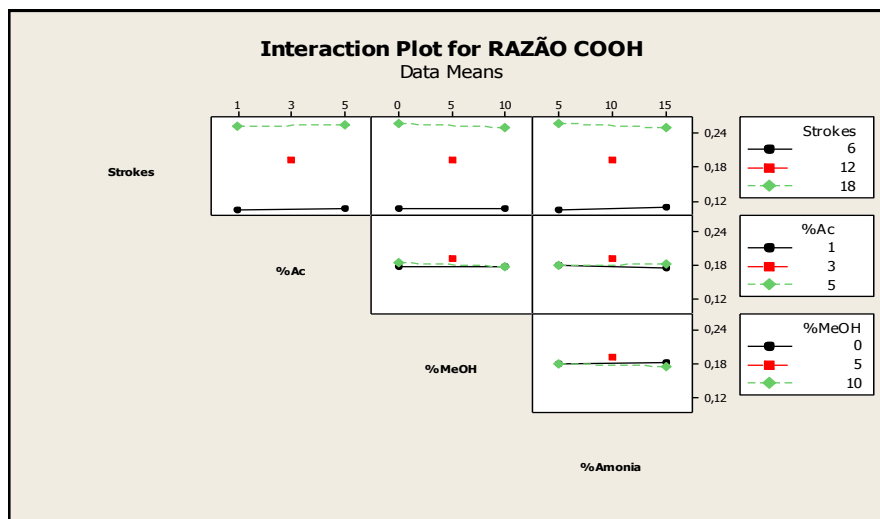


Figura 22. Gráfico de interações entre os vários parâmetros para o THC-COOH.

Nos gráficos de interações apresentados para os 3 compostos é possível denotar pequenas sobreposições entre alguns fatores, no entanto nenhuma destas interações possui relevância suficiente para colocar em causa as conclusões retiradas da análise dos diagramas de Pareto e dos gráficos de efeitos principais. Podemos então afirmar que o fator que verdadeiramente afeta o processo extrativo é o número de aspirações da amostra, onde se verifica um aumento da resposta com um maior número de aspirações. Para o THC-OH e THC-COOH verificou-se uma ligeira melhoria quando se usaram as soluções de lavagem com 3% de ácido acético e 5% de metanol e a solução de eluição com 10% de hidróxido de amónio.

No decorrer do DOE foi também observado que a etapa de lavagem da coluna com água após a eluição, leva a um entupimento precoce do cartucho de extração que se verifica de forma mais acentuada quando a lavagem ocorre depois da utilização de uma solução de eluição com percentagens elevadas de hidróxido de amónio (10 e 15% de hidróxido de hidróxido de amónio em metanol). Para resolver este problema optou-se por efetuar a lavagem das colunas com metanol (4 vezes 200 uL) após a eluição dos compostos.

De 4 fatores inicialmente estudados foram eliminados 3. Deste modo, demonstra-se o enorme potencial de *screening* do planeamento fatorial no desenvolvimento e otimização do método extrativo, já que com um número reduzido de experiências permitiu otimizar o processo de extração com a finalidade de obter o maior rendimento de extração possível.

5.2.3 - Avaliação de forma univariada do número de aspirações

De forma a completar o estudo da otimização do processo extrativo e tendo em conta que nos resultados do DOE o fator que mais influencia a resposta é o número de aspirações, foi efetuada uma avaliação de forma univariada do número de aspirações (os restantes fatores foram mantidos constantes). As condições usadas neste estudo estão descritas na tabela seguinte.

Tabela 7. Condições extrativas usadas na avaliação de forma univariada do número de aspirações

Número de aspirações	16; 18; 20; 22; 24 e 26
Soluções de lavagem	3% de ácido acético em água (100 µL) 5% de metanol em água (100 µL)
Solução de eluição	10% de hidróxido de amónio em metanol (6 x 100 µL)

Os resultados encontram-se descritos nos gráficos seguintes (figuras 23-25) sob a forma de razão entre a área do ião quantificador do composto em estudo e a área ião quantificador do padrão interno, adicionado após a extração. Não foram testadas aspirações acima de 26 uma vez que um número superior de aspirações tornaria o processo de extração mais complicado, por se tratar de um processo manual e porque eram perdidas algumas das vantagens tradicionalmente associadas à microextração em seringa empacotada, nomeadamente a rapidez do procedimento.

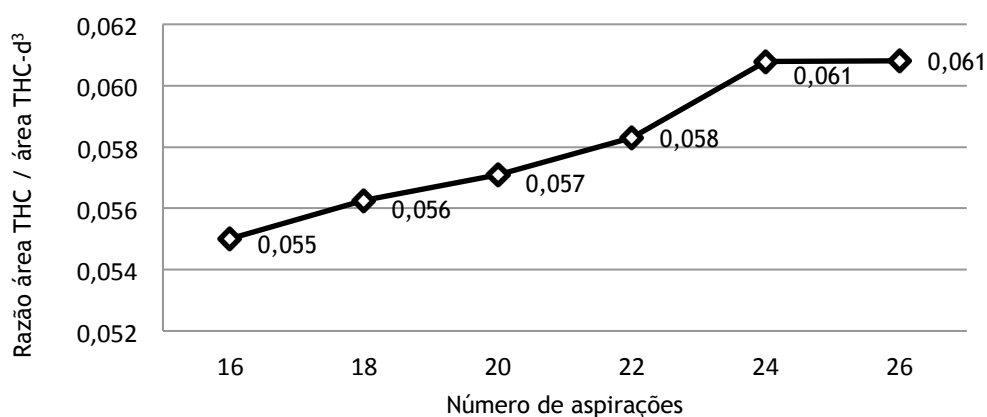


Figura 23. Resultados da avaliação de forma univariada do número de aspirações para o THC.

Determinação de Tetrahydrocannabinol e principais metabolitos em amostras de plasma com recurso à microextração em seringa empacotada e análise por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de espectrometria de massa em tandem.

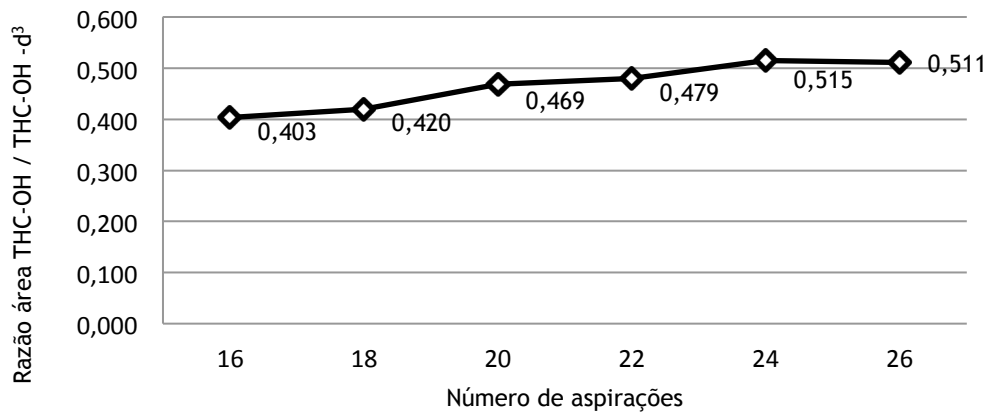


Figura 24. Resultados da avaliação de forma univariada do número de aspirações para o THC-OH.

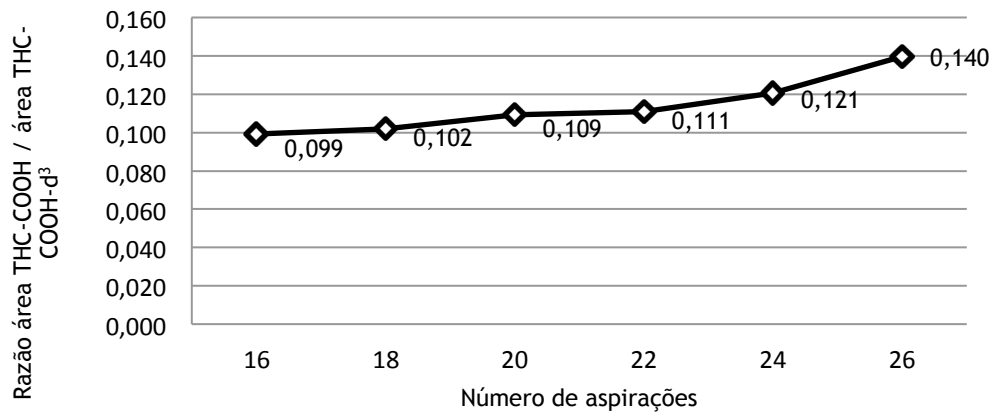


Figura 15. Resultados da avaliação de forma univariada do número de aspirações para o THC-COOH.

Pela análise dos gráficos anteriores, podemos verificar que com o aumento do número de aspirações até 26, ocorre também um aumento da resposta no processo de extração.

Tendo em conta estes resultados e aqueles obtidos na etapa do DOE, apresentam-se na tabela 8 as condições finais do método extrativo a serem usadas durante o processo de validação.

Tabela 8. Condições finais de extração

Acondicionamento	Metanol (4 vezes 250 µL) Água (4 vezes 250 µL)
Número de aspirações	26
Soluções de lavagem	3% de ácido acético em água (100 µL) 5% de metanol em água (100 µL)
Solução de eluição	10% de hidróxido de amônio em metanol (6 vezes 100 µL)
Lavagem após eluição	Metanol (4 vezes 200 µL)

5.3. Validação

A validação de um método analítico é um processo pelo qual se demonstra que um método particular para a determinação quantitativa de analitos numa dada amostra biológica é de confiança, reproduzível ^[54] e se adapta perfeitamente ao fim pretendido.

Desta forma, pretende-se demonstrar pela validação que o presente método se ajusta ao propósito para o qual foi criado, a quantificação de THC, THC-OH e THC-COOH em amostras de plasma, com extração por MEPS e análise por GC-MS/MS.

Para isto foram então avaliados os parâmetros que a *Food and Drug Administration* ^[54] (FDA) e a *International Conference on Harmonisation* ^[55] (ICH) consideram fundamentais no decorrer da avaliação, visando assim garantir a exatidão e precisão, seletividade, linearidade, recuperação, limites e estabilidade ^[54, 55] do método.

5.3.1 - Seletividade

A seletividade pode ser descrita como a capacidade de um método analítico para diferenciar e quantificar de forma inequívoca os analitos de interesse na presença de outros componentes da amostra. ^[54]

Para além de se avaliar a existência de alguma interferência endógena, é importante monitorizar as intensidades relativas de cada composto e por isso existe a necessidade de se estabelecer quais os critérios de aceitação admitidos para as abundâncias relativas dos seus sinais iónicos. A abundância relativa de um ião diagnóstico, expressa como percentagem da intensidade do pico base, é determinada por integração da área do pico cromatográfico selecionado normalizada ao pico base. ^[56] A tabela 9 descreve as janelas máximas de tolerância permitidas para as abundâncias relativas dos iões monitorizados de forma a garantir uma confiança adequada na sua identificação.

Determinação de Tetrahydrocannabinol e principais metabolitos em amostras de plasma com recurso à microextração em seringa empacotada e análise por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de espectrometria de massa em tandem.

Tabela 9. Janelas máximas de tolerância permitidas para as abundâncias relativas dos iões monitorizados. ^[57]

Abundância relativa (% do pico base)	Janela máxima de tolerância permitida
> 50%	±10% (intervalo absoluto)
25% a 50%	±20% (intervalo relativo)
5% a <25%	±5% (intervalo absoluto)
<5%	±50% (intervalo relativo)

A razão entre a magnitude da resposta do instrumento para o ião de diagnóstico menos intenso e a magnitude da resposta ao ruído da linha base (razão sinal/ruído) deve ser superior a 3:1. ^[56]

Os critérios de confirmação qualitativa podem incluir ainda a avaliação do tempo de retenção relativo do composto (TrR), onde o tempo de retenção do pico de interesse é medido relativamente ao tempo de retenção de um composto de referência cromatográfica (padrão interno). O TrR do composto em análise não deve diferir mais de ± 1% daquele do padrão interno. ^[56]

Por forma a avaliar a seletividade do método proposto, foram processadas *pools* de amostras em branco (n=6) procedentes do *staff* do laboratório e de diferentes origens, de forma a verificar a existência de alguma interferência, quer devido a componentes endógenos ou outros produtos exógenos contidos na matriz. Na figura 26 encontra-se um exemplo de um cromatograma da amostra em branco, com destaque nos tempos de retenção dos compostos. Já na figura 27 encontra-se o cromatograma de uma amostra fortificada com os compostos de estudo a 0,1 ng/mL e padrões internos a 2 ng/mL.

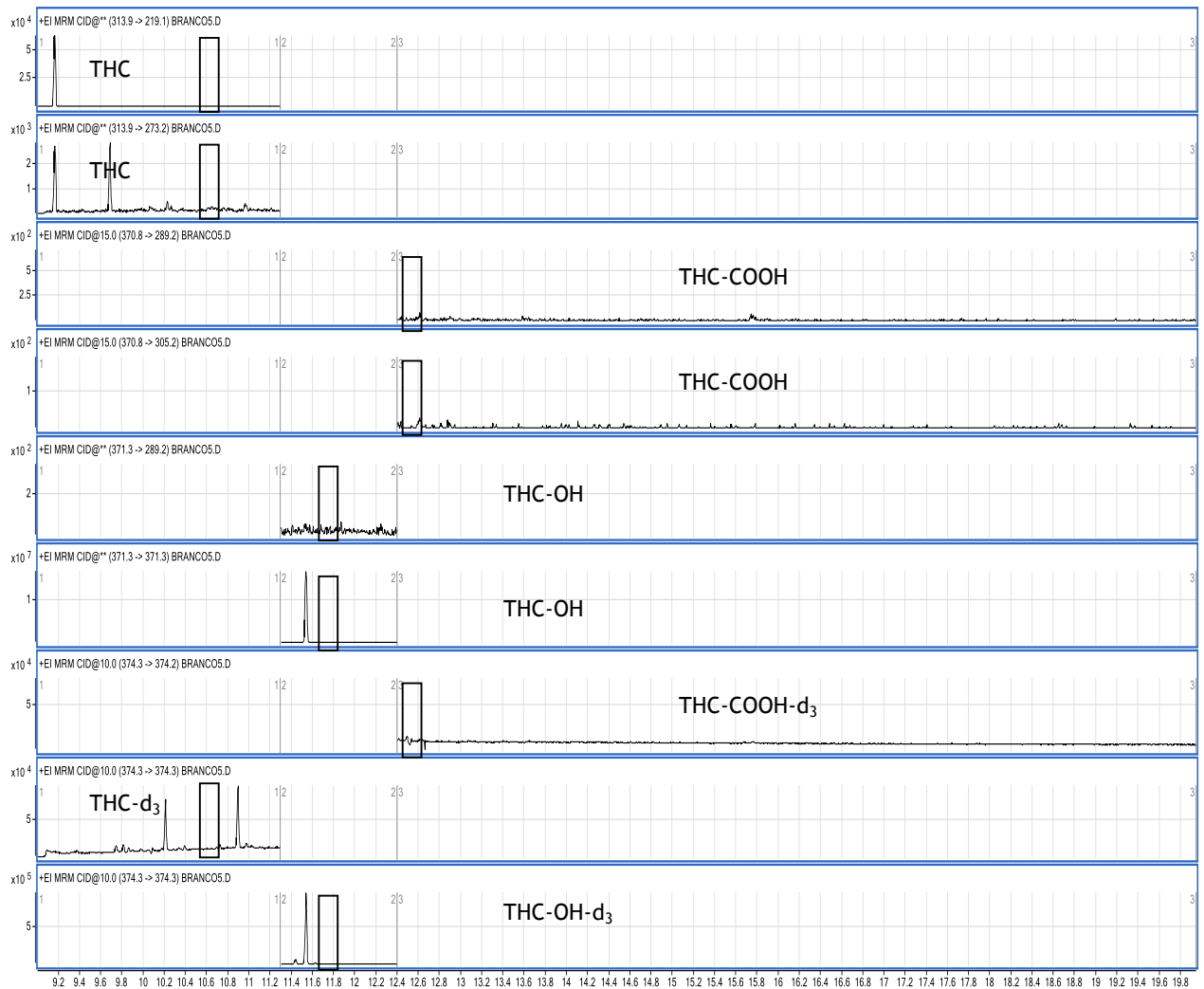


Figura 26. Cromatograma de uma amostra branca.

Determinação de Tetrahydrocannabinol e principais metabolitos em amostras de plasma com recurso à microextração em seringa empacotada e análise por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de espectrometria de massa em tandem.

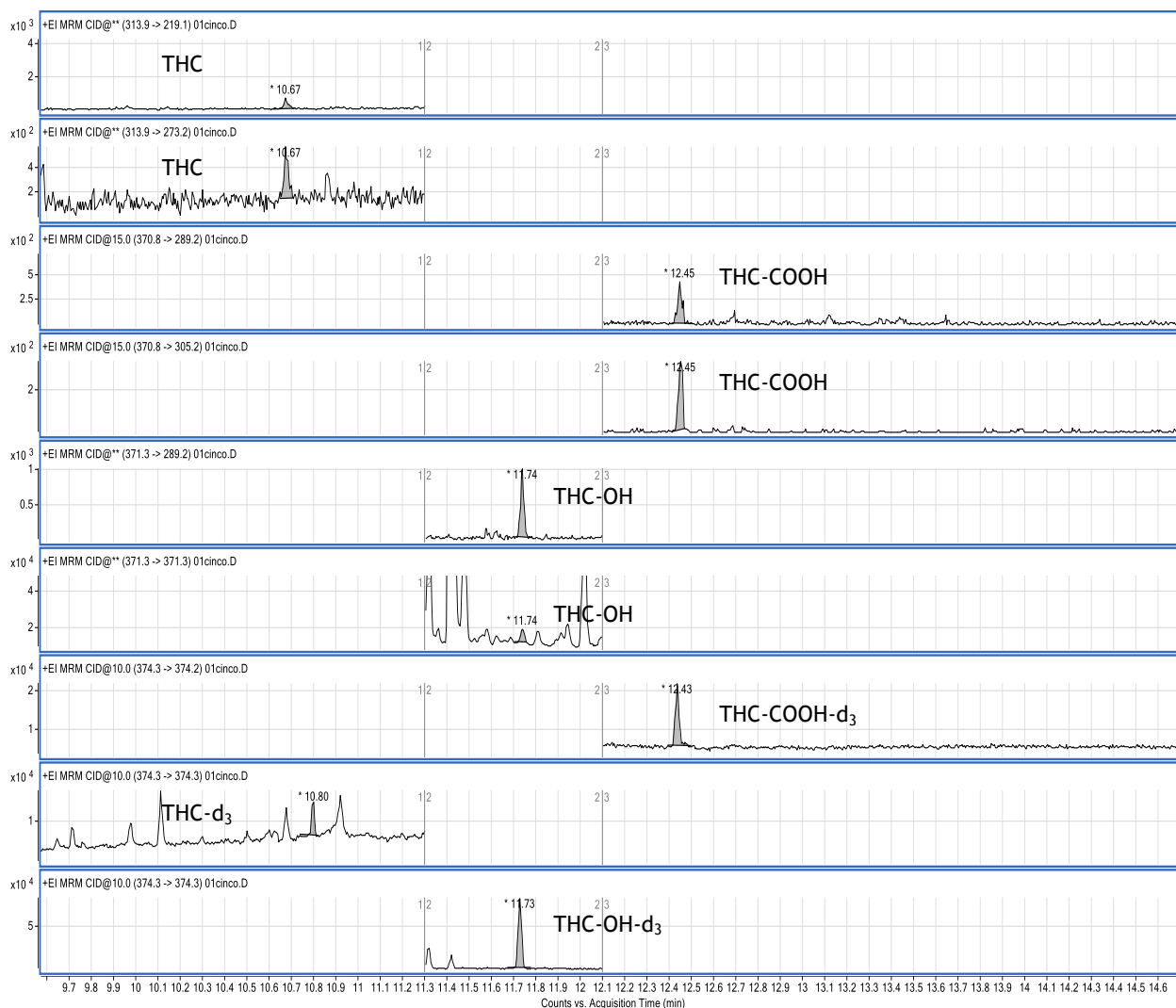


Figura 27. Cromatograma de uma amostra fortificada com os analitos de estudo a 0,1 ng/mL e padrões internos a 2ng/mL.

Pela análise das amostras branco, de acordo com os critérios acima descritos, podemos afirmar que o método é seletivo para a deteção dos compostos pretendidos, pois ao tempo de retenção dos compostos e dos padrões internos não se verifica resposta no cromatograma que tenha sido gerada por algum composto existente na amostra

5.3.2 - Curva de calibração e linearidade

A linearidade de um método corresponde à capacidade deste fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, dentro de uma determinada faixa de concentrações. ^[57]

O intervalo de linearidade de um método é definido como os valores para os quais se demonstrou ser possível a determinação dos valores do analito com precisão e exatidão requeridas para o método. ^[58]

A obtenção da linearidade é feita com recurso a amostras de analito padronizadas e é formulada como uma função matemática - Curva de Calibração - ^[57] que pode ser descrita pela equação 1:

$$y = mx + b \quad (1)$$

Onde:

- y é a resposta medida pelo detetor;
- x é a concentração do analito;
- m é o declive da Curva de Calibração;
- b é a interseção com o eixo dos yy .

Uma curva de calibração descreve a relação entre o valor da resposta experimental e a concentração teórica dos analitos na amostra. ^[54] Pode também ser definida como a função que descreve a resposta do detetor numa determinada gama de concentrações, tendo como finalidade prever a concentração do analito numa amostra de concentração desconhecida.

Para a construção da curva de calibração é necessário ter em conta o intervalo antecipado de valores analíticos espectáveis e a natureza da relação entre o analito/resposta do estudo ^[54], pois estes dois fatores são decisivos na escolha das concentrações e número de padrões a utilizar para a construção da curva.

Para o estabelecimento das curvas de calibração foram preparadas e analisadas, pelo procedimento anteriormente descrito, amostras brancas fortificadas com todos os analitos em estudo ($n=5$). Foram preparados 8 calibradores distribuídos uniformemente numa gama de concentrações entre 0,1 e 30 ng/mL. As concentrações estudadas foram 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 15; 25 e 30 ng/mL. A exatidão dos dados, ao longo do intervalo de concentrações descritas, foi estudada em termos de erro relativo médio (ERM) ou *BIAS* (equação 2).

Determinação de Tetrahydrocannabinol e principais metabolitos em amostras de plasma com recurso à microextração em seringa empacotada e análise por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de espectrometria de massa em tandem.

$$BIAS = \frac{\text{Concentração calculada} - \text{concentração teórica}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad (2)$$

Ao estudar a linearidade assume-se que a variância é constante ao longo da gama de trabalho. No entanto, em grande parte dos casos, pelo facto de estarmos perante intervalos de concentrações amplos é de esperar que a variância em cada ponto da reta seja diferente, pelo que, a condição de homogeneidade de variâncias, designada por homoscedasticidade, não é cumprida. Consequentemente, as concentrações mais elevadas tendem a influenciar mais a reta de calibração, resultando na perda de exatidão, especialmente nos seus pontos mais baixos. [59]

Desta forma, procedeu-se neste trabalho, à utilização do modelo de regressão linear ponderada, uma forma simples e efetiva de harmonizar as discrepâncias entre as variâncias dos diferentes pontos que constituem a reta. [59]

Dos fatores de ponderação estudados ($\frac{1}{x}$; $\frac{1}{x^2}$; $\frac{1}{y}$; $\frac{1}{y^2}$; $\frac{1}{\sqrt{x}}$; $\frac{1}{\sqrt{y}}$) foi determinado o mais adequado para cada analito, tendo em conta o *BIAS* para as várias concentrações estudadas.

Os melhores valores de *BIAS* foram obtidos com a ponderação $\frac{1}{x}$ para o THC e com a $\frac{1}{x^2}$ para o THC-OH e THC-COOH. Os resultados do estudo da linearidade encontram-se sumariados na tabela 10.

Tabela 90. Dados de linearidade para os compostos em estudo (n=5).

Composto	Regressão	Gama de trabalho (ng/mL)	Linearidade (média ± SD)		R ² (média ± SD)
			Declive	Ordenada na origem	
THC	$\frac{1}{x}$	0,1 - 30	0,030 ± 0,01	0,128 ± 0,039	0,996 ± 0,003
THC-OH	$\frac{1}{x^2}$	0,1 - 30	0,889 ± 0,065	0,036 ± 0,017	0,996 ± 0,003
THC-COOH	$\frac{1}{x^2}$	0,1 - 30	0,20 ± 0,025	0,013 ± 0,009	0,996 ± 0,005

Foram obtidos valores de R² acima de 0,99 para todos os analitos. A concentração calculada para cada calibrador também se encontrou dentro do intervalo de ± 15% da concentração nominal, exceto para o LLOQ, em que os valores se enquadraram dentro do intervalo de ± 20%.

De forma a completar o estudo de linearidade, foram analisadas diariamente 3 amostras controlo em triplicado a baixa (0,3ng/mL), média (5ng/mL) e alta (25ng/mL) concentração.

5.3.3 - Limites de detecção e de quantificação

O limite de detecção (LOD) é a mínima concentração do analito na amostra que o processo analítico pode diferenciar, de forma confiável, do ruído de fundo. Já o limite inferior de quantificação (LLOQ) é a menor quantidade do analito na amostra que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão adequadas. ^[54]

Ainda segundo a FDA, para a aceitação do padrão mais baixo da curva de calibração como limite de detecção, devem estar reunidas as seguintes condições: ^[54]

- A resposta do analito no LLOQ deve ser pelo menos 5 vezes a resposta à amostra branca;
- A resposta ao analito deve ser identificável, discreta e reprodutível com uma precisão de $\pm 20\%$ e exatidão entre 80 - 120%.

Para a determinação do LOD foram analisadas 6 *pools* de amostras fortificadas com os compostos de estudo a 0,1 ng/mL e padrões internos a 2 ng/mL. Em relação aos LLOQ, foram considerados como a concentração mais baixa das curvas de calibração de cada composto, de acordo com as condições anteriormente referidas. Apresenta-se na tabela 11 um resumo das características dos LLOQ de cada composto.

Tabela 11. Características dos LLOQ de cada composto (n=5).

Composto	LLOQ (ng/mL)	Concentração nominal (média ng/mL \pm SD)	C.V (%)	BIAS (%)
THC	0,1	0,11 \pm 0,014	13,19	7,20
THC-OH	0,1	0,10 \pm 0	0	-1,87
THC-COOH	0,1	0,10 \pm 0,002	1,99	1.27

Os limites de quantificação e detecção foram de 0,1 ng/mL para todos os compostos.

Na bibliografia disponível não se encontram publicados trabalhos que apresentem a junção da MEPS como técnica extrativa e GC-MS/MS como técnica analítica para análise dos compostos estudados neste trabalho. Desta forma e como MEPS é uma versão miniaturizada da SPE, optou-se por comparar os resultados obtidos no presente trabalho com os publicados na literatura.

Assim, comparando os limites de detecção com os publicados por Ferreirós *et al.* (2012) ^[60], que quantificaram o THC, THC-OH e THC-COOH em amostras de plasma com recurso a extração em fase sólida (SPE) e análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS), foi possível verificar que os LODs obtidos no presente trabalho são superiores para o THC e THC-COOH (0,1 ng/mL contra 0,05 ng/mL) mas

Determinação de Tetrahydrocannabinol e principais metabolitos em amostras de plasma com recurso à microextração em seringa empacotada e análise por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de espectrometria de massa em tandem.

inferiores para o THC-OH (0,1 ng/mL face aos 0,2 ng/mL). Karschner *et al.* (2010) ^[61] quantificaram também o THC, THC-OH e THC-COOH em amostras de plasma, com recurso a extração por SPE e análise por cromatografia gasosa bidimensional acoplada a espectrometria de massa (2D-GCMS), obtendo limites de quantificação de 0,25 ng/mL para o THC e THC-COOH e de 0,125 ng/mL para o THC-OH. Nadulski *et al.* (2005) ^[62] quantificaram os mesmos compostos em amostras de plasma, com extração por SPE e análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS), obtendo limites de deteção de 0,80; 0,15; e 0,26 ng/mL para o THC, THC-OH e THC-COOH, respetivamente. Já Mercolini *et al.* (2007) ^[63] quantificaram o THC e o THC-COOH em amostras de plasma, com recurso a extração por SPE e análise por cromatografia líquida de alta resolução, com limites de quantificação de 2 e 0,8 ng/mL respetivamente.

A tabela 12 reúne as informações mais relevantes dos trabalhos supracitados.

Tabela 12. Resumo das principais características de alguns métodos de determinação quantitativa de canabinóides em plasma.

Referência	Analito	Amostra (Volume)	Técnica de extração	Método analítico - sistema de deteção	LLOQ (ng/mL)	LOD (ng/mL)
Ferreirós <i>et al.</i> (2012) ^[60]	THC THC-OH THC-COOH	Plasma (0,2 mL)	SPE	LC-MS/MS	0,05 0,20 0,05	n.d.
Karschner <i>et al.</i> (2010) ^[61]	THC THC-OH THC-COOH	Plasma (1 mL)	SPE	2D-GCMS	0,250 0,125 0,250	0,250 0,125 0,125
Mercolini <i>et al.</i> (2007) ^[63]	THC THC-COOH	Plasma (2,5 mL)	SPE	HPLC-UV	2,0 0,8	0,8 0,3
Nadulski <i>et al.</i> (2005) ^[62]	THC THC-OH THC-COOH	Plasma (1 mL)	SPE	GC-MS	0,80 0,51 0,88	0,24 0,15 0,26

2D-GC (two-dimensional gas chromatography), cromatografia gasosa bidimensional; GC (gas chromatography), cromatografia gasosa; HPLC (high performance liquid chromatography), cromatografia líquida de alta resolução; LC (liquid chromatography), cromatografia líquida; MS (mass spectrometry), espectrometria de massas; MS/MS (tandem mass spectrometry), espectrometria de massas em tandem; SPE (solid phase extraction), extração em fase sólida; THC, delta-9-tetrahydrocannabinol; THC-COOH, 11-Nor-9-carboxi-deslta-9-tetrahydrocannabinol; THC-OH, 11-hidroxi-delta-9-tetrahydrocannabinol; UV (ultraviolet), ultravioleta.

Por análise da tabela anterior, quando comparados com outros autores, os nossos limites encontram-se de forma geral abaixo dos publicados. A exceção ocorre em comparação com os resultados de Ferreirós *et al.* (2012) ^[60], para o THC e THC-COOH.

Podemos então afirmar que a sensibilidade do método criado é notória, especialmente se tivermos em consideração o baixo volume de amostra utilizado (250 µL).

5.3.4 - Precisão e exatidão

A precisão de um método analítico expressa o grau de concordância entre medições individuais de um analito, quando o procedimento é aplicado de forma repetida a múltiplas alíquotas de um único volume homogêneo da matriz. ^[54; 55] No decorrer da validação foram estudadas a precisão intradia e a precisão interdia.

A precisão intradia, ou repetibilidade, representa o grau de concordância entre resultados de medições sucessivas de várias amostras efetuadas sob as mesmas condições (Ex: operador, dia, equipamento e laboratório). Já a avaliação da precisão interdia, ou reprodutibilidade, envolve a variação de certas condições previamente definidas, tais como: diferentes dias, analistas ou equipamentos. A precisão é expressa habitualmente em termos de coeficiente de variação (CV; %).

A exatidão de um método descreve o grau de proximidade entre as médias dos resultados obtidos com o método e o verdadeiro valor de concentração dos analitos na amostra. É determinada pela análise de réplicas de amostras que contêm quantidades conhecidas do analito. O resultado da exatidão é apresentado em termos de erro relativo médio (ERM) ou *BIAS*. ^[54]

Assim, para a análise da precisão intradia e exatidão, foram fortificadas amostras de plasma com todos os analitos de estudo às concentrações de 0,1; 0,5; 1; 10 e 30 ng/mL. Para cada uma das concentrações foram efetuadas seis réplicas, procedendo-se em seguida à extração e avaliação da concordância entre as medições efetuadas no mesmo dia. Os resultados encontram-se expressos na tabela 13.

Determinação de Tetrahydrocannabinol e principais metabolitos em amostras de plasma com recurso à microextração em seringa empacotada e análise por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de espectrometria de massa em tandem.

Tabela 13. Precisão intradia e exatidão (n=6)

Composto	Concentração nominal (ng/ml)	Concentração calculada (ng/mL ± SD)	CV(%)	BIAS%
THC	0,1	0,11 ± 0,006	5,41	8,01
	0,5	0,49 ± 0,047	9,50	-1,01
	1	1,06 ± 0,074	7,02	5,56
	10	9,19 ± 0,771	8,34	-8,07
	30	28,46 ± 1,131	4,01	-5,13
THC-OH	0,1	0,10 ± 0,006	6,55	-4,83
	0,5	0,53 ± 0,028	5,18	6,99
	1	1,00 ± 0,061	5,98	0,36
	10	9,45 ± 0,272	2,83	-5,54
	30	29,14 ± 0,491	1,69	-2,86
THC-COOH	0,1	0,09 ± 0,007	8,12	-8,87
	0,5	0,51 ± 0,037	7,31	2,25
	1	0,94 ± 0,056	5,99	-5,93
	10	9,82 ± 0,472	4,74	-1,76
	30	27,51 ± 1,681	6,11	-8,29

O coeficiente de variação obtido na análise intradia foi abaixo de 10% para todas as concentrações testadas nos vários compostos. Em relação à exatidão, os valores de *BIAS* encontram-se todos dentro do intervalo de ±15 % da concentração nominal, que é o intervalo de valores que a FDA ^[55] considera como aceitáveis no estudo da exatidão.

Para a análise da precisão interdia e exatidão, foram preparadas e analisadas em 5 dias diferentes, amostras de plasma fortificadas com os analitos de estudo às concentrações de 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 15; 25 e 30 ng/mL. Foram efetuadas cinco réplicas para cada uma das concentrações avaliadas. Os resultados encontram-se na tabela 14.

Tabela 14. Precisão interdia e exatidão (n=5)

Composto	Concentração nominal (ng/ml)	Concentração calculada (ng/mL ± SD)	CV(%)	BIAS%
THC	0,1	0,11 ± 0,014	13,19	7,20
	0,5	0,50 ± 0,045	8,96	0,76
	1	1,00 ± 0,080	7,97	-0,11
	5	4,79 ± 0,681	14,25	-4,13
	10	10,19 ± 0,552	5,43	1,87
	15	15,10 ± 0,800	5,32	0,68
	25	24,47 ± 0,761	3,12	-2,12
	30	30,45 ± 2,101	6,90	1,49
THC-OH	0,1	0,10 ± 0	0	-1,87
	0,5	0,54 ± 0,032	6,01	7,37
	1	1,06 ± 0,060	5,99	6,12
	5	5,03 ± 0,281	5,63	0,64
	10	10,16 ± 0,571	5,66	1,60
	15	14,94 ± 0,400	2,66	-0,43
	25	23,75 ± 0,941	3,97	-4,99
	30	28,37 ± 0,920	3,26	-5,44
THC-COOH	0,1	0,10 ± 0,002	1,99	1,27
	0,5	0,48 ± 0,040	8,34	-4,23
	1	0,97 ± 0,049	5,03	-3,39
	5	4,88 ± 0,161	3,19	-2,39
	10	10,55 ± 0,270	2,55	5,51
	15	15,52 ± 0,431	2,77	3,49
	25	25,37 ± 1,600	6,30	1,49
	30	29,54 ± 0,942	3,17	-1,55

Os coeficientes de variação foram inferiores a 15 % para todos os compostos a todos os níveis de concentração estudados, enquanto os valores da exatidão se encontram todos dentro do intervalo de ± 8 % da concentração nominal. Em ambos os casos os valores obtidos estão dentro das gamas de valores definidas como aceitáveis pela FDA. ^[54]

5.3.5 - Recuperação

A recuperação de um analito a partir de uma amostra, ou rendimento de extração, descreve a relação em porcentagem entre a resposta obtida pelo detetor na análise de uma quantidade de analito adicionado e extraído da matriz biológica e a resposta obtida para a quantidade de analito teoricamente presente na matriz, servindo desta forma para avaliar a eficiência de extração de um método analítico. ^[54]

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{\text{Área do pico do analito sujeito a extração}}{\text{Área do pico do analito não sujeito a extração}} \times 100 \quad (3)$$

Para calcular a recuperação foram fortificadas, com os analitos alvo de estudo, três amostras de plasma às concentrações de 0,5; 10 e 30 ng/mL, seguindo-se a extração e posterior adição dos padrões internos. Para as amostras correspondentes ao cem por cento de recuperação, a análise foi efetuada em extratos de matriz aos quais só posteriormente foram adicionados os compostos e padrões internos. Em ambos os casos cada uma das concentrações foi preparada e analisada em triplicado.

Determinação de Tetrahydrocannabinol e principais metabolitos em amostras de plasma com recurso à microextração em seringa empacotada e análise por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de espectrometria de massa em tandem.

Os resultados do estudo da recuperação encontram-se na tabela 15.

Tabela 15. Percentagem de recuperação de cada um dos compostos em estudo, calculada em 3 níveis de concentração (n=3).

Concentração (ng/mL)	Recuperação (% ± SD %)		
	THC	THC-OH	THC-COOH
0,5	78 ± 1,8	66 ± 2,0	63 ± 5,3
10	76 ± 0,5	57 ± 2,6	62 ± 1,4
30	53 ± 1,3	58 ± 1,0	65 ± 2,4

As recuperações do método apresentam, de forma geral, valores ligeiramente inferiores aos reportados por outros autores que utilizaram outras técnicas de extração. Sergi *et al.* (2013)^[53], os únicos autores a aplicarem até agora a MEPS para extração de canabinóides em saliva, apresentam recuperações entre 50 e 56% para o THC, entre 74 e 78% para o THC-OH e entre 98 e 105% para o THC-COOH. É no entanto de referir, que as diferenças entre os estudos ao nível da matriz e do BIN utilizado, podem influenciar a recuperação dos compostos.

Por sua vez, Ferreirós *et al.* (2012)^[60] apresentam recuperações na ordem dos 85% para todos os compostos, enquanto Karschner *et al.* (2010)^[61] apresentam recuperações entre 72,9 e 83,9% para o THC, entre 94,2 e 99,6% para o THC-OH e entre 78,8 e 91,4% para o THC-COOH. As recuperações superiores apresentadas nas extrações com SPE beneficiam no entanto dos inúmeros anos de otimização de processos extrativos de canabinóides com esta técnica.

5.3.6 - Estabilidade

A estabilidade dos analitos em amostras biológicas depende de diversos fatores, tais como:^[54]

- Condições de armazenamento;
- Propriedades físicas e químicas do analito;
- Propriedades da matriz;
- Recipiente de armazenamento.

As condições utilizadas para avaliar a estabilidade do analito devem refletir as situações que poderão ser encontradas durante o manuseamento e análise de amostras reais.^[54] Desta forma, foram avaliadas no decorrer da validação a estabilidade em amostras processadas, a estabilidade de curta duração e ainda a estabilidade a ciclos de congelação/descongelação.

5.3.6.1 - Estabilidade em amostras processadas

A estabilidade em amostras processadas foi estudada em três níveis de concentrações: 0,3; 5 e 25 ng/mL (triplicado para cada uma das concentrações). Após todo o procedimento extrativo, os extratos foram deixados no injetor durante vinte e quatro horas e re-injetados após este tempo.

Os resultados procedentes destas amostras foram então avaliados e comparados (em termos de CV e *BIAS*) com os resultados obtidos pela análise de amostras nas mesmas concentrações, mas extraídas e injetadas no sistema cromatográfico no mesmo dia. Os coeficientes de variação obtidos foram inferiores a 7% e os *BIAS* situaram-se num intervalo de $\pm 13\%$ para todos os compostos nas três concentrações testadas. Podemos assim afirmar que estes são estáveis em amostras processadas pelo menos durante um período de vinte e quatro horas.

Os resultados encontram-se sumariados na tabela 16.

Tabela 16. Resumo dos resultados do estudo de estabilidade de amostras processadas (n=3).

Composto	Concentração (ng/mL)	Concentração Calculada (ng/mL \pm SD)	CV(%)	<i>BIAS</i> (%)
THC	0,3	0,31 \pm 0,020	6,4	4,92
	5	5,25 \pm 0,307	5,8	4,94
	25	26,81 \pm 0,790	3,0	6,33
THC-OH	0,3	0,34 \pm 0,007	2,1	12,25
	5	5,13 \pm 0,048	0,9	2,50
	25	24,69 \pm 0,288	1,2	-1,26
THC-COOH	0,3	0,29 \pm 0,010	3,4	-4,32
	5	4,93 \pm 0,054	1,1	-1,38
	25	26,98 \pm 0,789	2,9	7,91

5.3.6.2 - Estabilidade de curta duração

A estabilidade de curta duração das amostras foi estudada em três níveis de concentrações: 0,3; 5 e 25 ng/mL (triplicado para cada uma das concentrações). As amostras previamente fortificadas foram deixadas vinte e quatro horas na bancada do laboratório, à temperatura ambiente e protegidas da luz. Após este tempo foram adicionados os padrões internos e as amostras foram extraídas e analisadas.

Os resultados provenientes da análise destas amostras foram então comparados, em termos de coeficiente de variação e *BIAS*, com os resultados obtidos na análise de amostras processadas no mesmo dia. Os coeficientes de variação obtidos foram inferiores a 14% e os *BIAS* situaram-se num intervalo de $\pm 15\%$ para as várias concentrações estudadas, pelo que podemos afirmar que os compostos são estáveis à temperatura ambiente pelo menos durante vinte e quatro horas.

Determinação de Tetrahydrocannabinol e principais metabolitos em amostras de plasma com recurso à microextração em seringa empacotada e análise por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de espectrometria de massa em tandem.

Os resultados encontram-se na tabela 17.

Tabela 17. Resumo dos resultados do estudo de estabilidade de curta duração (n=3).

Composto	Concentração (ng/mL)	Concentração Calculada (ng/mL \pm SD)	CV(%)	BIAS (%)
THC	0,3	0,31 \pm 0,041	13,1	3,62
	5	5,30 \pm 0,526	9,9	5,97
	25	24,39 \pm 1,352	5,5	-2,45
THC-OH	0,3	0,32 \pm 0,008	2,6	7,37
	5	4,83 \pm 0,101	2,1	-3,44
	25	24,19 \pm 1,216	5,0	-3,24
THC-COOH	0,3	0,26 \pm 0,024	9,3	-14,87
	5	4,79 \pm 0,165	3,4	-4,30
	25	25,33 \pm 1,864	7,4	1,33

5.3.6.3 - Estabilidade a ciclos de congelação/descongelação

A determinação da estabilidade a ciclos de congelação/descongelação foi estudada em três níveis de concentrações: 0,3; 5 e 25 ng/mL (triplicado para cada uma das concentrações). Estas amostras foram posteriormente submetidas a três ciclos de congelação/descongelação, com cada um dos processos a demorar cerca de doze horas, após os quais se adicionaram os padrões internos e se processaram as amostras. Ao analisarmos os CV e BIAS obtidos deparamo-nos com dois comportamentos distintos. Ao nível do CV o THC apresenta na generalidade das concentrações estudadas coeficientes de variação e BIAS elevados pelo que podemos dizer que este composto não é estável a três ciclos de congelação/descongelação. Já em relação ao THC-OH e THC-COOH, os CV obtidos foram inferiores a 10% e os BIAS situaram-se num intervalo de \pm 15%, logo será de esperar que estes compostos sejam estáveis a pelo menos três ciclos de congelação/descongelação.

Os resultados foram comparados, em termos de CV e BIAS, com os provenientes da análise de amostras frescas.

Os resultados encontram-se tratados na tabela 18.

Tabela 18. Resumo dos resultados do estudo da estabilidade a ciclos de congelação e descongelação (n=3).

Composto	Concentração (ng/mL)	Concentração Calculada (ng/mL \pm SD)	CV(%)	BIAS (%)
THC	0,3	4,35 \pm 0,702	16,1	1349,79
	5	3,84 \pm 1,313	34,2	-23,18
	25	13,11 \pm 0,983	7,5	-47,55
THC-OH	0,3	0,26 \pm 0,008	3,0	-14,62
	5	4,50 \pm 0,106	2,3	-10,02
	25	22,66 \pm 1,377	6,1	-9,36
THC-COOH	0,3	0,26 \pm 0,007	2,7	-12,61
	5	4,46 \pm 0,141	3,2	-10,87
	25	22,85 \pm 2,171	9,5	-8,60

5.4 - Aplicação do método a amostras reais

Uma parte integrante e fundamental do processo de validação é a aplicação do método em amostras reais para deteção e quantificação dos analitos de interesse.

Foram obtidas 4 amostras, recolhidas por pessoal especializado, de indivíduos voluntários consumidores deste tipo de drogas de abuso. No entanto, devido a problemas alheios de acondicionamento durante o transporte das mesmas, apenas uma das amostras se encontrava em condições para ser processada. Apresentam-se na tabela 19 e na figura 28 os resultados e cromatograma, respetivamente, obtidos pela análise dessa amostra.

Tabela 19. Compostos identificados na amostra e respetiva quantificação.

Composto	Concentração na Amostra (ng/mL)
THC	4,01
THC-OH	0,83
THC-COOH	10,46

Determinação de Tetrahydrocannabinol e principais metabolitos em amostras de plasma com recurso à microextração em seringa empacotada e análise por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de espectrometria de massa em tandem.

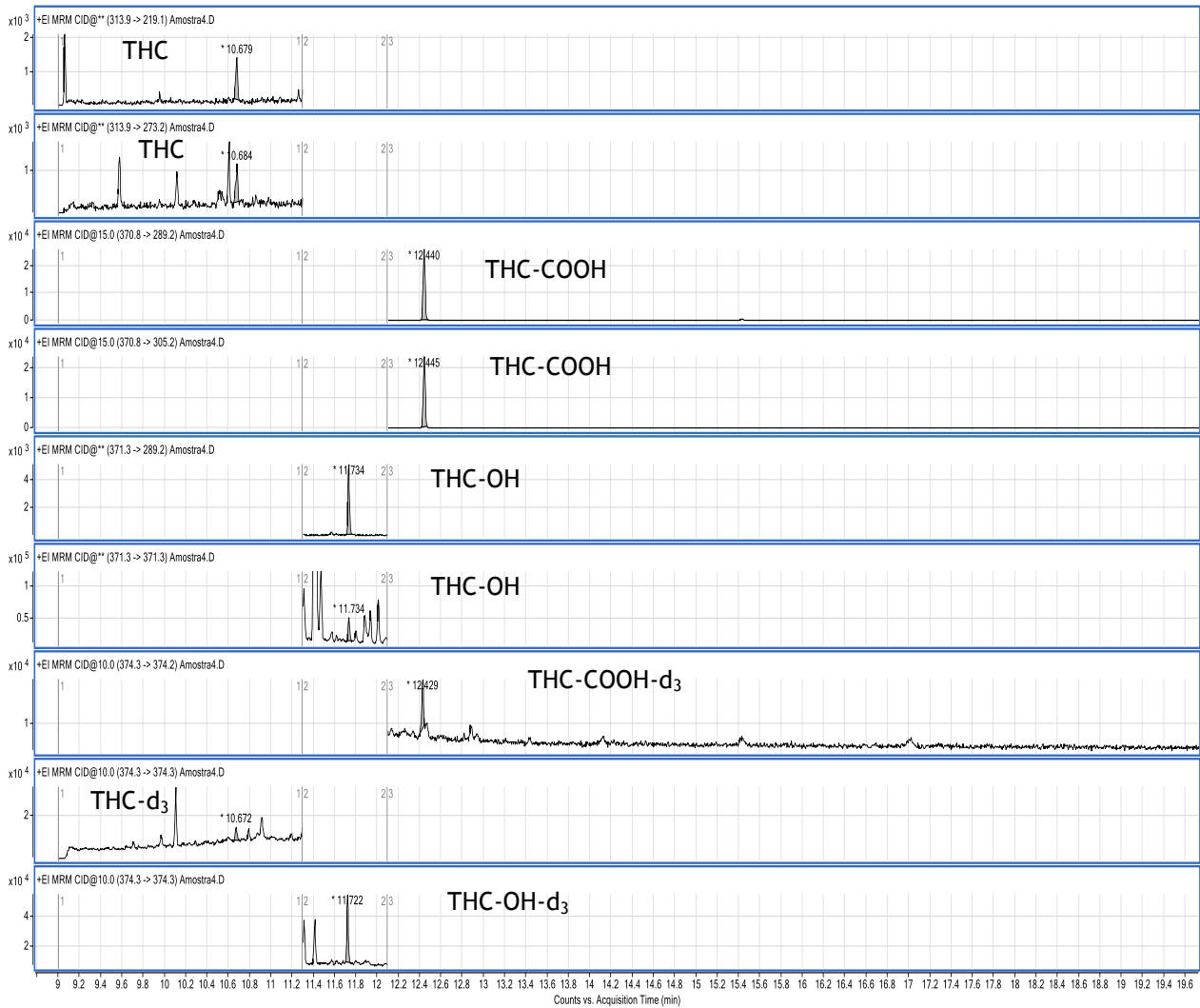


Figura 28. Cromatograma da amostra real.

Considerações finais

1. Apresenta-se um método analítico de fácil e rápida execução, baseado na microextração em seringa empacotada e análise por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de espectrometria de massa em tandem para a determinação quantitativa e qualitativa de delta-9-tetrahydrocannabinol, 11-hidroxi- delta-9-tetrahydrocannabinol e 11-*nor*-9-carboxi-delta-9-tetrahydrocannabinol em amostras de plasma.
2. A metodologia apresentada revelou ser seletiva, sensível, precisa, exata e linear dentro do intervalo de concentrações estudado, segundo os critérios internacionalmente aceites (FDA e ICH) para a validação de métodos bioanalíticos.
3. Os principais fatores suscetíveis de influenciar o processo extrativo foram otimizados com o objetivo de maximizar a recuperação e assim obter baixos limites de deteção e quantificação. Neste contexto, o planeamento fatorial fracionado revelou ser uma ferramenta útil na otimização da extração, diminuindo o número de experiências a realizar.
4. O método proposto é sensível, obtendo-se limites de deteção de 0,1 ng/mL para todos os compostos analisados utilizando apenas 250 µL de amostra.
5. Esta técnica revelou ser uma alternativa com potencial para a quantificação dos analitos na rotina laboratorial, devido à rapidez do processo de extração (10 minutos), à redução significativa do volume de amostra (250 µL) e à diminuição do consumo de solventes orgânicos.
6. Com os resultados apresentados, podemos afirmar que a metodologia aqui proposta pode tornar-se uma ferramenta vantajosa não só no âmbito de análises de toxicologia clínica e forense, mas também em análises de despiste de consumo de *cannabis* e derivados.
7. É de salientar ainda que este é o primeiro estudo que permite identificar e quantificar estes compostos em amostras de plasma com recurso à MEPS.

Referências Bibliográficas

1. Schultes RE, Klein WM, Plowman T, Lockwood TE. *Cannabis: An example of taxonomic neglect*. Botanical Museum Leaflets, Harvard University, 1974. 23:337-367.
2. Elsohly MA. *Marijuana and the cannabinoids*. Humana Press Inc, 2007. Cap.1-12.
3. Mehmedic Z, Chandra S, Slade D, Denham H, Foster S, Patel AS, Ross SA, Khan IA, Elsohly MA. *Potency trends of Δ^9 -THC and other cannabinoids in confiscated cannabis preparations from 1993 to 2008*. Journal of Forensic Sciences, 2010. 55:1209-1217.
4. Ribeiro M, Marques A, Laranjeira R, Alves H, Araújo M, Baltieri D, Bernardo W, Lagp C, Karniol I, Kerr-Corrêa F, Nicastrri S, Nobre M, Oliveira R, Romano M, Seibel S, Silva J. *Abuso e dependência da maconha*. Revista da Associação Médica Brasileira, 2005. 51:247-249.
5. Gabinete das Nações Unidas para a Droga e a Criminalidade (UNODC). Relatório Anual de drogas 2012. [Online]. 2012 [Citação: 22 de Maio de 2013]. Disponível em: http://www.unodc.org/documents/data-and-analysis/WDR2012/WDR_2012_web_small.pdf.
6. Gabinete das Nações Unidas para a Droga e a Criminalidade (UNODC). World Drug Report 2009 Series. Why does cannabis potency matter? [Online]. 2009 [Citação: 22 de Maio de 2013]. Disponível em: <http://www.unodc.org/unodc/en/frontpage/2009/June/why-does-cannabis-potency-matter.html>.
7. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. Drug profiles: Cannabis. [Online]. [Citação: 22 de Maio de 2013]. Disponível em: <http://www.emcdda.europa.eu/publications/drug-profiles/cannabis>.
8. Instituto da Droga e da Toxicodependência (I.D.T.). Desdobrável Cannabis-Efeitos da droga. [Online]. [Citação: 16 de Maio de 2013]. Disponível em: http://www.idt.pt/PT/CentroDocumentacao/MateriaisPrevencao/Documents/Desdob_ravel/2008/12/desdob_ravel_cannabis.pdf.
9. Radwan MM, Elsohly MA, Slade D, Ahmed SA, Wilson L, El-Alfy AT, Khan IA, Ross SA. *Non-cannabinoid constituents from a high potency Cannabis sativa variety*. Phytochemistry, 2008. 69:2627-2633.
10. De Backer B, Debrus B, Lebrun P, Theunis L, Dubois N, Decock L, Verstraete A, Hubert P, Charlier C. *Innovative development and validation of an HPLC/DAD method for the qualitative and quantitative determination of major cannabinoids in cannabis plant material*. Journal of Chromatography B, 2009. 877:4115-4124.

11. Ahmed SA, Ross SA, Slade D, Radwan MM, Zulfiqar F, Matsumoto RR, Xu YT, Viard E, Speth RC, Karamyan VT, Elsohly MA. *Cannabinoid ester constituents from high-potency Cannabis sativa*. Journal of Natural Products, 2008. 71:536-542.
12. Baptista MJ. *Determinação de drogas terapêuticas e não terapêuticas e de alguns metabolitos em cabelo*, in [Dissertação de Mestrado]. 2005, Universidade de Aveiro.
13. Mura P, Piriou A. *Le Cannabis*. [Online]. [Citação: 17 de Outubro de 2013]. Disponível em: <http://www.association-mariou.org/20/doc/Cannabis/professionnels/sante2.pdf>.
14. Sharma P, Murthy P, Bharath MM. *Chemistry, metabolism, and toxicology of cannabis: clinical implications*. Iranian Journal of Psychiatry, 2012. 7:149-156.
15. Bronner WE, Xu AS. *Gas chromatographic-mass spectrometric methods of analysis for detection of 11-nor-delta-9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in biological matrices*. Journal of Chromatography, 1992. 580:63-75.
16. Nahas GG, Sutin KM, Harvey DJ, Agurell S. *Marihuana and Medicine*. Humana Press Inc, 1999. Cap.2
17. Williams PL, Moffat AC. *Identification in human urine of delta-9-tetrahydrocannabinol-11-oic acid glucuronide: a tetrahydrocannabinol metabolite*. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 1980. 32:445-448.
18. Karch SB. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Abused Drugs*. CRC Press, 2007. Cap. 4.
19. Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. *Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA*. Nature, 1990. 346:561-564.
20. Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. *Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids*. Nature, 1993. 365:61-65.
21. Atakan Z. *Cannabis, a complex plant: different compounds and different effects on individuals*. Therapeutic Advances in Psychopharmacology, 2012. 2:241-254.
22. Schlicker E, Kathmann M. *Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors*. Trends in Pharmacological Sciences, 2001. 22:565-572.
23. Fernández PL, Ladero JM, Cerro JCL, Hernández IL. *Drogodependencias*. Editora Médica Panamericana. 3ª edição, 2009. Cap. 21.
24. Mechoulam R, Parker LA, Gallily R. *Cannabidiol: an overview of some pharmacological aspects*. Journal of Clinical Pharmacology, 2002. 42:115-195.
25. Bulcão R, Garcia SC, Limberger RP, Baierle M, Arbo MD, da Matta Chasin AA, Thiesen FV, Tavares R. *Designer Drugs: analytical and biological aspects*. Química Nova, 2012. 35:149-158.
26. Barroso M, Moreno I, da Fonseca B, Queiroz JA, Gallardo E. *Role of microextraction sampling procedures in forensic toxicology*. Bioanalysis, 2012. 4:1805-1826.
27. Queiroz SCN, Collins CH, Jardim IC. *Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica*. Química Nova, 2001. 24:68-76.

28. Kataoka H. *Recent Advances in Solid-Phase Microextraction and Related Techniques for Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Current Pharmaceutical Analysis, 2005. 1:65-84.
29. Jönsson S, Hagberg J, van Bavel B. *Determination of 2,4,6-trichloroanisole and 2,4,6-tribromoanisole in wine using microextraction in packed syringe and gas chromatography-mass spectrometry*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008. 56:4962-4967.
30. Mandrioli R, Mercolini L, Lateana D, Boncompagni G, Raggi MA. *Analysis of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in human plasma, urine and saliva by MEPS-LC-UV*. Journal of Chromatography B, 2011. 879:167-173.
31. Thurman EM, Mills MS. *Solid-phase extraction: principles and practice*. John Wiley and Sons, 1998.
32. Kitson F, Larsen B, McEwen C. *Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A practical guide*. Academic Press, 1996. Cap. 1.
33. Trass M. *The effect of Temperature on Compound Elution Order in Gas Chromatography*. [Online]. [Citação: 10 de Outubro de 2013]. Disponível em: http://phx.phenomenex.com/lib/TN63470808_L.pdf.
34. Emídio ES. *Desenvolvimento, validação e aplicação de microextração em fase líquida para determinação de canabinóides em cabelo humano por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas no modo tandem*, in [Dissertação de Mestrado]. 2010, Universidade Federal de Sergipe.
35. Sebben VC. *Análise de efedrinas e anfetamina em urina empregando SPE e SPME por CG/EM/EM*, in [Dissertação de Mestrado]. 2007, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
36. Chromatography Online. *GC Spectrometers*. [Online]. [Citação: 11 de Setembro de 2013]. Disponível em: <http://www.chromatography-online.org/GC-Tandem/Quadrupole-Mass-Spectrometer/MS-MS/rs39.html>.
37. Béguin S, Jadas-Hécart A, Tabet JC, Communal PY. *Protocols for optimizing MS/MS parameters with an ion-trap GC-MS instrument*. Journal of Mass Spectrometry, 2006. 41:1304-1314.
38. Sporkert F, Pragst F. *Use of headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) in hair analysis for organic compounds*. Forensic Science International, 2000. 107:129-148.
39. Kramer KE, Andrews AR. *Screening method for 11-nor-delta-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in urine using hollow fiber membrane solvent microextraction with in-tube derivatization*. Journal of Chromatography B, 2001. 760:27-36
40. Musshoff F, Junker HP, Lachenmeier DW, Kroener L, Madea B. *Fully automated determination of cannabinoids in hair samples using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry*. Journal of Analytical Toxicology, 2002. 26:554-560.

41. Musshoff F, Lachenmeier DW, Kroener L, Madea B. *Automated headspace solid-phase dynamic extraction for the determination of cannabinoids in hair*. Forensic Science International, 2003. 133:32-38.
42. Fucci N, De Giovanni N, Chiarotti M. *Simultaneous detection of some drugs of abuse in saliva samples by SPME technique*. Forensic Science International, 2003. 134:40-45.
43. Lachenmeier DW, Kroener L, Musshoff F, Madea B. *Application of tandem mass spectrometry combined with gas chromatography and headspace solid-phase dynamic extraction for the determination of drugs of abuse in hair samples*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2003. 17:472-478.
44. Yonamine M, Tawil N, Moreau RL, Silva OA. *Solid-phase micro-extraction-gas chromatography-mass spectrometry and headspace-gas chromatography of tetrahydrocannabinol, amphetamine, methamphetamine, cocaine and ethanol in saliva samples*. Journal of Chromatography B, 2003. 789:73-78.
45. Yang R, Xie W. *Determination of cannabinoids in biological samples using a new solid phase micro-extraction membrane and liquid chromatography-mass spectrometry*. Forensic Science International, 2006. 162:135-139.
46. Dizioli Rodrigues de Oliveira C, Yonamine M, Lucia de Moraes Moreau R. *Headspace solid-phase microextraction of cannabinoids in human head hair samples*. Journal of Separation Science, 2007. 30:128-134.
47. Nadulski T, Pragst F. *Simple and Sensitive determination of delta(9)-tetrahydrocannabinol in hair by combined silylation, headspace solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry*. Journal of Chromatography B, 2007. 846:78:85.
48. Luo D, Chen F, Xiao K, Feng YQ. *Rapid determination of delta9-tetrahydrocannabinol in saliva by polymer monolith microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry*. Talanta, 2009. 77:1701-1706.
49. Emidio ES, Prata Vde M, Dorea HS. *Validation of an analytical method for analysis of cannabinoids in hair by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta, 2010. 670:63-71.
50. Emidio ES, de Menezes Prata V, de Santana FJ, Dorea HS. *Hollow fiber-based liquid phase microextraction with factorial design optimization and gas chromatography-tandem mass spectrometry for determination of cannabinoids in human hair*. Journal of Chromatography B, 2010. 878:2175-2183.
51. Merola G, Gentili S, Tagliaro F, Macchia T. *Determination of different recreational drugs in hair by HS-SPME and GC/MS*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2010. 397:2987-2995.
52. Moradi M, Yamini Y, Baheri T. *Analysis of abuse drugs in urine surfactant-assisted dispersive liquid-liquid microextraction*. Journal of Separation Science, 2011. 34:1722-1729.

53. Sergi M, Montesano C, Odoari S, Mainero Rocca L, Fabrizi G, Compagnone D, Curini R. *Micro extraction by packed sorbent coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry for the rapid and sensitive determination of cannabinoids in oral fluids*. Journal of Chromatography A, 2013. 1301:139-146.
54. Food and Drug Administration. *Guidance for industry - Bioanalytical Method Validation*. [Online]. 2001 [Citação: 10 de Outubro de 2013]. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070107.pdf>.
55. International Conference on Harmonization. *Validation of Analytical Procedures: Methodology ICH Q2 B*. [Online]. 2005 [Citação: 10 de Outubro de 2013]. Disponível em: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf.
56. World Anti-doping Agency (WADA). *Identification Criteria for Qualitative Assays Incorporating Column Chromatography and Mass Spectrometry*. [Online]. 2010 [Citação: 12 de Outubro de 2013]. Disponível em: http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-IS-Laboratories/Technical_Documents/WADA_TD2010IDCRv1.0_Identification_Criteria_for_Qualitative_Assays_May_08_2010_EN.doc.pdf.
57. Nunes AM. *Validação de Métodos Analíticos*. [Online]. 2010 [Citação: 9 de Outubro de 2013]. Disponível em: http://www.cpact.embrapa.br/eventos/2010/met/palestras/26/261010_PALESTRA3_ADRIANE_NUNES.pdf.
58. Chiaradia MC. *Desenvolvimento, Validação e Aplicação de Métodos para Análise Multiresidual de Agrotóxicos em suco de laranja e tangerina utilizando CLAE-DAD, CL-EM-EM e CLUE-DAD*, in [Tese de Doutoramento]. 2009, Universidade Estadual de Campinas.
59. De Almeida Francisco AM. *Estudo da Lamotrigina em Doentes Epilépticos Submetidos a Monitorização Video-Electroencefalográfica*, in [Tese de Doutoramento]. 2008, Universidade de Coimbra.
60. Ferreirós N, Labocha S, Walter C, Lötsch J, Geisslinger G. *Simultaneous and Sensitive LC-MS/MS determination of tetrahydrocannabinol and metabolites in human plasma*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2013. 405:1399-1406.
61. Karschner EL, Barnes AJ, Lowe RH, Scheidweiler KB, Huestis MA. *Validation of a two-dimensional gas chromatography mass spectrometry method for the simultaneous quantification of cannabidiol, Delta(9)-tetrahydrocannabinol (THC), 11-hydroxy-THC, and 11-nor-9-carboxy-THC in plasma*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2010. 397:603-611.

62. Nadulski T, Sporkert F, Schnelle M, Stadelmann AM, Roser P, Scheffer T, Pragst F. *Simultaneous and sensitive analysis of THC, 11-OH-THC, THC-COOH, CBD, and CBN by GC-MS in plasma after oral application of small doses of THC and cannabis extract.* Journal of Analytical Toxicology, 2005. 29:782-789.
63. Mercolini L, Musenga A, Comin I, Baccini C, Conti M, Raggi MA. Determination of plasma and urine levels of Delta9-tetrahydrocannabinol and its main metabolite by liquid chromatography after solid-phase extraction. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2008. 47:156-163.

Determinação de Tetrahydrocannabinol e principais metabolitos em amostras de plasma com recurso à microextração em seringa empacotada e análise por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de espectrometria de massa em tandem.

ANEXOS

Determinação de Tetrahydrocannabinol e principais metabolitos em amostras de plasma com recurso à microextração em seringa empacotada e análise por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de espectrometria de massa em tandem.

Anexo I

**REQUISIÇÃO DE SUBSTÂNCIAS E SUAS PREPARAÇÕES
COMPREENDIDAS NAS TABELAS I, II, III E IV, COM EXCEÇÃO DA II-A,
ANEXAS AO DECRETO-LEI N.º 15/93, DE 22 DE JANEIRO, COM
RECTIFICAÇÃO DE 20 DE FEVEREIRO**

N.º _____/_____
Nota de encomenda N.º _____/_____

(Nos termos do art.º 18.º do Decreto Regulamentar n.º 61/94, de 12 de outubro)

Requisita-se a _____

SUBSTÂNCIAS ACTIVAS E SUAS PREPARAÇÕES				QUANTIDADE	
N.º de Código	Designação	Forma Farmac.	Dosagem	Pedida	Fornecida
Carimbo da entidade requisitante			D.T. ou Farmac. Responsável _____		
			N.º de insc na O. F. _/_/_/_/_/_		
			Data _/_/_/___		
			Ass. legível _____		
Carimbo da entidade fornecedora			Director Técnico _____		
			N.º de insc na O. F. _/_/_/_/_/_		
			Data _/_/_/___		
			Ass. legível _____		

Determinação de Tetrahydrocannabinol e principais metabolitos em amostras de plasma com recurso à microextração em seringa empacotada e análise por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de espectrometria de massa em tandem.

Anexo II

REQUISIÇÃO DE SUBSTÂNCIAS SUAS PREPARAÇÕES COMPREENDIDAS NAS TABELAS I, II, III E IV, COM EXCEÇÃO DA II-A, ANEXAS AO DECRETO-LEI N.º 15/93, DE 22 DE JANEIRO, COM RECTIFICAÇÃO DE 20 DE FEVEREIRO

N.º

Serviços Farmacêuticos
do

Código
SERVIÇO
SALA

Medicamento (D.C.I.)	Forma Farmacêutica	Dosagem	Código

Nome do Doente	Cama/ Processo	Quantidade Pedida Ou Prescrita	Enfermeiro que administra o Medicamento		Quantidade Fornecida	Observações
			Rubrica	Data		
		Total			Total	

Assinatura legível do director de serviço ou legal substituto	Assinatura legível do director do serviço farmacêutico ou legal substituto.	Entregue por (ass. Legível) _____
Data ___/___/___ N.º Mec. _____	Data ___/___/___ N.º Mec. _____	N.º Mec. _____ Data ___/___/___
		Recebido por (ass. Legível) _____
		N.º Mec. _____ Data ___/___/___

Determinação de Tetrahydrocannabinol e principais metabolitos em amostras de plasma com recurso à microextração em seringa empacotada e análise por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de espectrometria de massa em tandem.

Anexo IV

Análise ANOVA: Comparação das técnicas número 3 e 4

- THC

	Área composto / Área padrão interno	Área média
Técnica 3	0.047	0.048
	0.047	
	0.051	
Técnica 4	0.045	0.046
	0.046	
	0.046	

Teste F: duas amostras para variâncias

Anova: fator único

SUMÁRIO

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
Coluna 1	3	0,145	0,048333333	5,33333E-06
Coluna 2	3	0,137	0,045666667	3,33333E-07

ANOVA

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	1,06667E-05	1	1,06667E-05	3,764705882	0,12433664	7,708647
Dentro de grupos	1,13333E-05	4	2,83333E-06			
Total	0,000022	5				

P alfa
12,43% 5%
Variâncias Iguais

Teste t: duas amostras com variâncias iguais

	Variável 1	Variável 2
Média	0,048333333	0,045666667
Variância	5,33333E-06	3,33333E-07
Observações	3	3
Variância agrupada	2,83333E-06	
Hipótese de diferença de média	0	
gl	4	
Stat t	1,940285	
P(T<=t) uni-caudal	0,06216832	
t crítico uni-caudal	2,131846782	
P(T<=t) bi-caudal	0,12433664	
t crítico bi-caudal	2,776445105	

P alfa
12,43% 5%

O método não é estatisticamente diferente

- THC-OH

	Área composto / Área padrão interno	Área média
Técnica 3	0.175	0.194
	0.175	
	0.228	
Técnica 4	0.158	0.152
	0.161	
	0.137	

Teste F: duas amostras para variâncias

Anova: fator único

SUMÁRIO

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
Coluna 1	3	0,581	0,193666667	0,000886333
Coluna 2	3	0,456	0,152	0,000171

ANOVA

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	0,002604167	1	0,002604167	4,92591425	0,090668688	7,708647
Dentro de grupos	0,002114667	4	0,000528667			
Total	0,004718833	5				

P alfa

9,07% 5%

Variâncias
Iguais

Teste t: duas amostras com variâncias iguais

	Variável 1	Variável 2
Média	0,193666667	0,152
Variância	0,000886333	0,000171
Observações	3	3
Variância agrupada	0,000528667	
Hipótese de diferença de média	0	
gl	4	
Stat t	2,219440076	
P(T<=t) uni-caudal	0,045334344	
t crítico uni-caudal	2,131846782	
P(T<=t) bi-caudal	0,090668688	
t crítico bi-caudal	2,776445105	

P alfa

9,07% 5%

O método não é estatisticamente diferente

- **THC-COOH**

	Área composto / Área padrão interno	Área média
Técnica 3	0.036	0.039
	0.039	
	0.043	

