UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Determinação de endocanabinóides e canabinóides em amostras biológicas de pacientes com a doença de Parkinson por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas em *tandem*

Camila Marchioni

Ribeirão Preto
2018

CAMILA MARCHIONI

Determinação de endocanabinóides e canabinóides em amostras biológicas de pacientes com a doença de Parkinson por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas em *tandem*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientadora: Prof(a). Dr(a). Maria Eugênia Queiroz Nassur

Coorientador: Prof. Dr. José Alexandre de Souza Crippa

Ribeirão Preto
2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Marchioni, Camila.

Determinação de endocanabinóides e canabinóides em amostras biológicas de pacientes com a doença de Parkinson por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas em *tandem*. Ribeirão Preto, 2018.
148 p.: il.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia

Orientador: Nassur, Maria Eugênia Queiroz
Coorientador: Crippa, José Alexandre de Souza

1. Anandamida. 2. 2-araquidonoglicerol. 3. Canabidiol. 4. Δ9–tetraidrocanabinol. 5. Doença de Parkinson. 6. UHPLC-MS/MS no modo *column switching*. 7. *in-tube* SPME. 8. Polímero Molecularmente Impresso.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: Camila Marchioni
Título do trabalho: Determinação de endocanabinóides e canabinóides em amostras biológicas de pacientes com a doença de Parkinson por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas em *tandem*.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr. _____
Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr. _____
Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr. _____
Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr. _____
Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr. _____
Instituição:_____Assinatura:_____

Dedico este trabalho a todos que, direta ou indiretamente, me motivaram ao longo dessa jornada.

Agradecimentos

*Agradeço, inicialmente, à minha orientadora, **Profa. Dra. María Eugênia Queiroz Nassur**, por ter confiado em mim e aberto às portas de seu laboratório há quatro anos. Ao longo destes anos, pude confirmar a decisão acertada de ter escolhido como orientadora uma profissional ímpar, que dedicou seu tempo, atenção, paciência, apoio e compreensão. Sou grata por todos os ensinamento e pela exemplar orientação.*

*Ao **Prof. Dr. José Alexandre Crippa**, agradeço a parceria e a co-orientação ao longo de todo este trabalho.*

*Ao **Prof. Dr. Vitor Tumas** agradeço pelo auxílio com as amostras biológicas, esclarecimentos, disponibilidade e simpatia a mim dispensados.*

*Ao **Prof. Dr. Antonio Eduardo Miller Crotti** e a **Tatiana Vieira**, agradeço pelo suporte com a redução do canabidiol.*

*Aos amigos do **Laboratório de Cromatografia**, Caroline, Mônia, Tamires, Luis Felippe, Israel, Igor, Lídia, Jonas, Vinícius, Diego e Mércia, pelo companheirismo ao logo destes anos, pelos auxílios nas tarefas diárias e por tornar meus dias mais harmoniosos e agradáveis.*

*Às funcionárias e ao discente do **Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto,** Larissa, Sandra e Dr. Bruno por não medirem esforços nas coletas e transportes das amostras, e por se disponibilizarem a ajudar sempre que necessário.*

*À **Faculdade de Ciências Farmacêuticas** e a **Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto** e seus funcionários pelo apoio institucional e instalações necessárias para a realização deste trabalho.*

*Pelo apoio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho, agradeço à **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** (Processo nº 2015/07619-1 e 2016/13639-8), à **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – código*

de financiamento 001) e ao ***CNPq*** (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, processo N° 26/2014, 466805/2014-4).

Agradeço aos meus primeiros orientadores, ***Prof. Dr. Pedro Oríval Luccas***, à ***Profa. Dr. Sandra Veiga*** e à ***Profa. Dr. Márcia Helena Miranda Cardoso***. Meu muito obrigada pelo carinho que depositaram a mim no início da minha caminhada na vida acadêmica.

Agradeço aos meus amigos do ***Laboratório de Límnologia***, em especial à Ayla, Fagner e Pedro Frugeri, por terem me ensinado na prática o que é e como contornar as dificuldades da pesquisa científica.

Aos ***pacientes e seus familiares***, que mesmo passando por um período conturbado e aprendendo a lidar com a Doença de Parkinson, aceitaram contribuir com a pesquisa.

Agradeço ao meu marido, ***Thiago,*** uns dos meus primeiros incentivadores da vida acadêmica, por toda paciência, companheirismo e confiança a mim depositados.

Aos meus pais, ***Patrícia e Mário Lúcio***, agradeço pela vida, pelo carinho, amor, por me incentivarem sempre na busca dos meus objetivos e compreenderem minhas ausências.

Aos meus irmãos, ***Júlio, Artur e Paulo***, agradeço o companheirismo, amor e confiança.

Aos meus avós, ***Anna, Ilda, Domingos e Mauro***, meu muito obrigada por me transmitirem valores tão importantes e principalmente por me ensinarem que doença alguma é capaz de matar sentimentos tão ricos como o amor.

À toda a minha ***família***, tios, primos, cunhados, sogro e sogra, gostaria de agradecer os incentivos constantes.

À Deus por me dar forças e fazer meu caminho se cruzar com o de pessoas tão queridas, eu agradeço.

E por fim, a todos os que não referi nominalmente, mas que de algum modo me ajudaram na concretização deste trabalho, para eles uma palavra de carinho e agradecimento.

“Não gaste muito tempo imaginando o pior cenário. Ele raramente vai acontecer como você imagina, e se por algum acaso vier acontecer, você terá vivido duas vezes”.
(Michael J. Fox, ator e portador de *Parkinson*)

RESUMO

Marchioni, C. **Determinação de endocanabinóides e canabinóides em amostras biológicas de pacientes com a doença de Parkinson por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas em *tandem***. 2018. 148f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Os endocanabinóides são neurotransmissores derivados do ácido araquidônico que se ligam aos receptores canabinóides participando de diversas funções cerebrais, tais como memória, aprendizado e controle motor. Os principais endocanabinóides são a anandamida (AEA) e o 2-araquidonilglicerol (2-AG). A Doença de Parkinson (DP) é considerada a segunda patologia neurodegenerativa mais comum na população, sendo caracterizada pela redução da influência dopaminérgica. Indícios mostram um aumento de AEA e uma diminuição nos níveis de 2-AG em pacientes portadores da DP e em modelos animais induzidos ao parkinsonismo. O canabidiol (CBD) é um promissor fármaco para o tratamento da DP, pois acredita-se que apresenta um efeito neuroprotetor na degeneração de neurônios dopaminérgicos. Entretanto, o uso do Δ9–Tetraidrocanabinol (Δ9-THC) não é indicado, pois pode apresentar efeitos psicotrópicos e dependência. A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em *tandem* (HPLC-MS/MS) tem sido considerada a técnica analítica de referência para a determinação de endocanabinóides e canabinóides em amostras biológicas. A cromatografia líquida no modo *column switching* permite a automação das análises através da hifenação da etapa de preparo de amostras biológicas (pré-concentração dos analitos e remoção de grande parte dos componentes endógenos) com o sistema cromatográfico (separação cromatográfica e detecção). Neste contexto, dois métodos analíticos *online* utilizando o UHPLC-MS/MS no modo *column switching* foram desenvolvidos para determinação de (a) AEA e 2-AG; (b) CBD e Δ9-THC em amostras biológicas de pacientes com DP. Os endocanabinóides foram determinados em amostras de plasma e de líquido cefalorraquidiano (LCR). O método UHPLC-MS/MS no modo *column switching* para determinação dos endocanabinóides com uma coluna de material de acesso restrito na primeira dimensão apresentou linearidade entre 0,100 (LIQ) a 6,00 ng mL^{-1} para AEA e 0,04 (LIQ) a 10,00 ng mL^{-1} para 2-AG nas amostras de plasma. Para as amostras de LCR a faixa linear foi de 0,45 (LIQ) a 9,00 ng mL^{-1} para AEA e 1,40 (LIQ) a 180 ng mL^{-1} para o 2-AG. Os valores de exatidão ficaram abaixo de 14,2% e de precisão abaixo de 11,1% (excluindo LIQ) para os dois analitos. Os métodos não apresentaram efeito residual e nem efeito matriz. Os analitos mostraram ser estáveis após ciclos de congelamento/descongelamento e no teste a curto e longo prazo. Estes métodos foram empregados para análise 70 amostras de plasma e 66 de LCR. Para a determinação (UHPLC-MS/MS no modo *column switching)* de CBD e Δ9-THC em amostras de plasma foi sintetizada a fase molecularmente impressa (MIP) monolítica em capilar de sílica fundida (*in situ*). A síntese apresentou boa rentabilidade utilizando pequena massa da molécula molde (CBD reduzido). O método *online*, utilizando o capilar MIP na primeira dimensão, apresentou linearidade entre 10 e 300 ng mL^{-1} (CBD e Δ9-THC). A precisão variou entre 0,2 e 10,3% para os dois analitos e a exatidão

foi inferior a 4,4% (excluindo o LIQ). O efeito residual e o efeito matriz ficaram dentro dos parâmetros estabelecidos pela ANVISA. Por fim, o método foi aplicado satisfatoriamente na determinação de CBD e Δ9-THC em amostras de plasma de pacientes em terapia com CBD.

Palavra-chave: Anandamida. 2-araquidonilglicerol. Canabidiol. Δ9–tetraidrocanabinol. Doença de Parkinson. UHPLC-MS/MS no *modo column switching. In-tube* SPME. Polímero Molecularmente Impresso.

ABSTRACT

Marchioni, C. **Determination of endocannabinoids and cannabinoids in biological samples from patients with Parkinson`s disease by ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry**. 2018. 148f. Thesis (Ph.D. –Degree). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Endocannabinoids are neurotransmitters derived from arachidonic acid; they bind to cannabinoid receptors and participate in various brain functions, such as memory, learning, and motor control. Anandamide (AEA) and 2-arachidonoylglycerol (2-AG) are the main endocannabinoids. Parkinson's disease (PD) is considered the second most common neurodegenerative pathology in the population, being characterized by reduced dopaminergic influence. Evidence shows an increase in AEA and a decrease in 2-AG levels in patients with PD and in animal models with induced parkinsonism. Cannabidiol (CBD) is a promising drug to treat PD: it is believed to have a neuroprotective effect on dopaminergic degeneration. However, the use of Δ9-Tetrahydrocannabinol (Δ9-THC) is not indicated because it may lead to psychotropic effects and dependence. High-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (HPLC–MS/MS) has been considered the benchmark analytical technique to determine endocannabinoids and cannabinoids in biological samples. Column switching allows analysis to be automated through hyphenation of the biological sample preparation stage (analytes pre-concentration and removal of most endogenous components) with the chromatographic system (chromatographic separation and detection). In this context, we have developed two online analytical methods based on UHPLC–MS/MS in the column switching mode to determine (a) AEA and 2-AG and (b) CBD and Δ9-THC in biological samples from patients with PD. Endocannabinoids were determined in plasma and cerebrospinal fluid (CSF) samples. The UHPLC–MS/MS method in the column switching mode for determination of endocannabinoids with a column of restricted access material in the first dimension showed linearity between 0.100 (LIQ) and 6.00 ng mL^{-1} for AEA and 0.04 (LIQ) to 10.00 ng mL^{-1} for 2-AG in plasma samples. For CSF samples, the linear range was from 0.45 (LIQ) to 9.00 ng mL^{-1} for AEA and from 1.40 (LIQ) to 180 ng mL^{-1} for 2-AG. The accuracy values were below 14.2% and precision below 11.1% (excluding LIQ) for the two analytes. The methods had no residual effect or matrix effect. The analytes were stable after freeze/thaw cycles and in the short- and long-term test. These methods were used to analyze 70 plasma and 66 CSF samples. To determine CBD and Δ9-THC in plasma samples (UHPLC–MS/MS in column switching mode), we synthesized a molecularly imprinted polymer (MIP) in the fused silica capillary (in situ). The synthesis showed good profitability because it required small mass of the template molecule (reduced CBD). The online method based on the MIP capillary in the first dimension showed linearity between 10 and 300 ng mL^{-1} (CBD and Δ9-THC). Precision ranged from 0.2 to 10.3% for the two analytes and the accuracy was less than 4.4% (excluding LIQ). The residual effect and the matrix effect were within the parameters established by ANVISA. Finally, the method was

satisfactorily applied to determine CBD and Δ9-THC in plasma samples from patients on CBD therapy.

Keywords: Anandamide. 2-arachidonoylglycerol. Cannabidiol. Δ9-Tetrahydrocannabinol. Parkinson's disease. Column switching UHPLC–MS/MS. In-tube SPME. Molecularly imprinted polymer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da interação do sistema dopaminérgico e endocanabinóide na DP 3
Figura 2. Estrutura química dos endocanabinóides 7
Figura 3. Coluna 1D RAM-C8 RP-8 ADS 17
Figura 4. Configuração do sistema UHPLC-MS/MS no modo *column switching* 22
Figura 5. Fragmentação das moléculas de AEA e 2-AG 30
Figura 6. Influência da porcentagem de ACN na limpeza da coluna 1D 31
Figura 7. Configuração final do sistema UHPLC-MS/MS no modo *column switching* para análise de endocanabinóides em amostras de plasma e LCR . 32
Figura 8. Cromatograma da infusão pós-coluna da AEA e 2-AG para o método UHPLC-MS/MS no modo *column switching* 37
Figura 9. Cromatograma das amostras de plasma enriquecida com AEA e 2-AG no LIQ e de plasma branco (superior) empregando o método UHPLC-MS/MS no modo *column switching* 38
Figura 10. Comparação do método LLE-UHPLC-MS/MS e UHPLC-MS/MS no modo *column switching* (n = 15) para a determinação de AEA e 2-AG em amostras de LCR 42
Figura 11. Gráfico Box-Plot das concentrações AEA e 2-AG em amostras de plasma e LCR..... 46
Figura 12. Estrutura química CBD e Δ9-THC..... 50
Figura 13. Síntese do polímero molecularmente impresso (MIP)..... 60
Figura 14. Fragmentação das moléculas de CBD e Δ9-THC..... 77
Figura 15. Espectro de RMN de 1H do (a) CBD; (b) CBD reduzido (clorofórmio-d, 400 MHz)..... 78
Figura 16. Funcionalização do interior do capilar 79
Figura 17. Avaliação da razão molar monômero funcional: molécula molde ... 81
Figura 18. Esquema do procedimento de síntese do MIP..... 82
Figura 19. Espectros FTIR para MIP e NIP 83
Figura 20. Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura. (a) NIP (Mag = 10.00 kX); (b) NIP (Mag = 30.00 kX); (c) MIP (Mag = 10.00 kX); (b) MIP (Mag = 30.00 kX)..... 84

Figura 21. Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão. (a) NIP (Mag = 50.00 kX); (b) MIP (Mag = 50.00 kX) 85
Figura 22. Avaliação da capacidade de sorção, para CBD e Δ9-THC, nos capilares MIP e NIP 86
Figura 23. Avaliação da seletividade do MIP, para CBD e THC, em amostras de plasma enriquecidas com os analitos e fármacos antidepressivos, anticonvulsivantes e antipsicóticos (500 ng mL^{-1}). 87
Figura 24. Capacidade de sorção do capilar MIP para CBD e THC 88
Figura 25. Avaliação do solvente de sorção 89
Figura 26. Avaliação do solvente de dessorção 90
Figura 27. Avaliação da vazão de sorção e dessorção 91
Figura 28. Avaliação da lavagem da fase MIP após sorção dos analitos 92
Figura 29. Configuração final do sistema *in-tube* SPME/UHPLC-MS/MS (eluição no modo reverso) para a determinação de canabinóides em amostras de plasma 93
Figura 30. Avaliação do volume de amostra inicial 95
Figura 31. Avaliação do pH da amostra 96
Figura 32. Avaliação do comprimento do MIP 97
Figura 33. Cromatograma da infusão pós-coluna do CBD e Δ9-THC para o método *in-tube* SPME/UHPLC-MS/MS 99
Figura 34. Cromatogramas das amostras de plasma enriquecido com CBD e Δ9-THC no LIQ e de plasma branco (superior) empregando o método *in-tube* SPME/UHPLC-MS/MS 100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Técnicas analíticas para a determinação de endocanabinóides em amostras biológicas 10
Tabela 2. Aplicações do *column switching* na análise de diferentes substâncias 15
Tabela 3. Transições MS/MS (MRM), voltagem do cone e energia de colisão avaliada para os endocanabinóides 29
Tabela 4. Condições da análise LC-MS/MS no modo *column switching* para amostras de plasma 33
Tabela 5. Condições da análise LC-MS/MS no modo *column switching* para amostras de LCR 34
Tabela 6. Parâmetros de validação analítica para o método UHPLC-MS/MS no modo *column switching* para amostra de plasma 36
Tabela 7. Validação analítica do método UHPLC-MS/MS no modo *column switching* e método de LLE-UHPLC-MS/MS para amostras de LCR 41
Tabela 8. Comparação de métodos analíticos para quantificação de AEA e 2-AG 43
Tabela 9. Faixas das concentrações, médias e correlações das concentrações de AEA e 2-AG em amostras biológicas 44
Tabela 10. Técnicas analíticas para a determinação de canabinóides em amostras biológicas 53
Tabela 11. Aplicações do *in-tube* SPME na análise de diferentes substâncias 58
Tabela 12. Procedimentos de síntese avaliados para obtenção do MIP 68
Tabela 13. Transições MS/MS (MRM), voltagem do cone e energia de colisão para os canabinóides 76
Tabela 14. Condições da análise *in-tube* SPME/UHPC-MS/MS para amostras de plasma 94
Tabela 15. Parâmetros de validação analítica para o método *in-tube* SPME/UHPC-MS/MS para amostra de plasma 98
Tabela 16. Concentrações plasmáticas determinadas (n=3) em amostras de plasma de pacientes em terapia com o CBD 100

Tabela 17. Comparação de métodos analíticos para a determinação de CBD e Δ9-THC em amostras biológicas 102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1D	Primeira Dimensão
2-AG	2-araquidonilglicerol
2D	Segunda Dimensão
AEA	Anandamida / N-araquidonoil etanolamina
AIBN	2,2’ Azo-bis-isso-butironitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AR	Agente Reticulante
BSM	Bomba Binária
CB1	Receptor Canabinóide do Tipo 1
CB2	Receptor Canabinóide do Tipo 2
CBD	Canabidiol
CBD_R	Canabidiol Reduzido
CQA	Controle de Qualidade Alto
CQB	Controle de Qualidade Baixo
CQM	Controle de Qualidade Médio
CV	Coeficiente de Variação
D1	Receptores Dopaminérgicos do Tipo 1
D2	Receptores Dopaminérgicos do Tipo 2
DP	Doença de Parkinson
EGDMA	Etilenoglicol Dimetacrilato
LLE	Extração Líquido-Líquido
EPR	Erro Padrão Relativo
ESI	Ionização por Eletrospray
FMN	Fator de Matriz Normalizado
FTIR	Microscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance
IF	Fator de Impressão
In-tube SPME	Microextração em Fase Sólida no Capilar
IR	Iniciador Radicalar
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
LC	Cromatografia Líquida
LCR	Líquido cefalorraquidiano

LIQ	Limite Inferior de Quantificação
LSQ	Limite Superior de Quantificação
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MF	Monômero Funcional
MIP	Polímero Molecularmente Impresso
MMA	Ácido Metacrílico
MRM	Monitoramento de Reações Múltiplas
MS	Espectrometria de Massas
MS/MS	Espectrometria de Massas em *tandem*
NIP	Polímero não impresso molecularmente
OMS	Organização Mundial de Saúde
Q	Capacidade de Sorção
QSM	Bomba Quaternária
RAM	Material de Acesso Restrito
SPE	Extração em Fase Sólida
UHPLC	Cromatografia Líquida de Ultra Performance
Δ9-THC	Δ9-Tetraidrocanabinol

SUMÁRIO

Resumo i
Abstract iii
Lista de figuras v
Lista de tabelas vii
Lista de abreviações e siglas ix

INTRODUÇÃO GERAL 1
I.1 Doença de Parkinson 2

CAPÍTULO 1 6

1.I Introdução 7
1.I.1 Endocanabinóides 7
1.I.2 Métodos analíticos para a determinação de endocanabinóides em amostras biológicas 8
1.I.3 Cromatografia líquida no modo *column switching* 14
1.I.4 Sorvente para a cromatografia líquida no modo *column switching*: Material de Acesso Restrito 16

1.II Objetivos 18

1.III Materiais e Métodos 19
1.III.1 Reagentes e padrões analíticos 19
1.III.2 Casuística e Amostras Biológicas 19
1.III.3 Avaliação das condições UHPLC-MS/MS 20
1.III.4 Avaliação das condições UHPLC-MS/MS no modo *column switching* ... 20
1.III.5 Pré-preparo das amostras biológicas 22
1.III.6 Volume da amostra diluída injetada no sistema UHPLC-MS/MS no modo *column switching* 23
1.III.7 Validação Analítica do método UHPLC-MS/MS no modo *column switching* 23
1.III.8 Comparação método clássico (extração Líquido-Líquido) *versus* método UHPLC-MS/MS no modo *column switching* para a determinação de AEA e 2-AG em amostras de LCR 27

1.IV Resultados e Discussão 29
1.IV.1 Avaliação das condições MS/MS 29
1.IV.2 Avaliação das condições UHPLC no modo *column switching* 30
1.IV.3 Pré-preparo das amostras biológicas 34
1.IV.4 Volume da amostra diluída injetada no sistema UHPLC-MS/MS no modo *column switching* 35
1.IV.5 Validação Analítica do método UHPLC-MS/MS no modo *column switching* 35
1.IV.6 Comparação método clássico (extração Líquido-Líquido) *versus* método UHPLC-MS/MS no modo *column switching* para a determinação de AEA e 2-AG em amostras de LCR 39
1.IV.7 Comparação com métodos descritos na literatura 42

1.IV.8 Amostras de plasma de pacientes DP analisadas 44

1.V Conclusão..... 48

CAPÍTULO 2 49

2.I Introdução..... 50
2.I.1 Canabinóides 50
2.I.2 Métodos analíticos para a determinação de canabinóides em amostras biológicas 52
2.I.3 Microextração em fase sólida no capilar (*in-tube* SPME)..... 57
2.I.4 Polímeros Molecularmente Impressos (MIP)..... 59

2.II Objetivos..... 64

2.III Materiais e Métodos 65
2.III.1 Reagentes e padrões analíticos 65
2.III.2 Avaliação das condições UHPLC-MS/MS 65
2.III.3 Síntese do Polímero Molecularmente Impresso (MIP) 66
2.III.4 Caracterização morfológica dos polímeros sintetizados..... 69
2.III.5 Desempenho analítico do MIP 69
2.III.6 Capacidade de sorção..... 70
2.III.7 Pré-preparo das amostras biológicas 71
2.III.8 Avaliação dos parâmetros de extração por *in-tube* SPME 71
2.III.9 Validação Analítica do método *in-tube* SPME/UHPLC-MS/MS 72
2.III.10. Análise de amostras de plasma 75

2.IV Resultados e Discussões..... 76
2.IV.1 Avaliação das condições UHPLC-MS/MS..... 76
2.IV.2 Síntese do Polímero Molecularmente Impresso (MIP)..... 77
2.IV.3 Caracterização morfológica dos polímeros sintetizados 82
2.IV.4 Desempenho analítico do MIP 85
2.IV.5 Capacidade de sorção 87
2.IV.6 Avaliação dos parâmetros *in-tube SPME*..... 88
2.IV.7 Validação Analítica do método *in-tube* SPME..... 97
2.IV.8. Amostras reais 100
2.IV.9. Comparação com demais métodos da literatura..... 101

2.V Conclusões..... 104

CONCLUSÃO FINAL..... 105

REFERÊNCIAS..... 107

Anexo I 126

INTRODUÇÃO GERAL

INTRODUÇÃO GERAL

I.1 Doença de Parkinson

A Doença de Parkinson (DP), descrita por James Parkinson, em 1817, tem sido considerada a segunda patologia neurodegenerativa mais frequente na população, afetando cerca de um por cento dos adultos com mais de 65 anos de idade, segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) (CHRISTIAN R. BAUMANN, 2012). No Brasil, os dados epidemiológicos são escassos, mas acredita-se que 200 mil pessoas sejam acometidas pela doença (VALCARENGHI et al., 2018).

A DP é caracterizada pela redução da influência dopaminérgica nigroestriatal e cortical. As características histopatológicas da doença incluem a perda neuronal, despigmentação da substância *nigra* compacta e a presença de corpúsculos de Lewy, que são inclusões citoplasmáticas eosinofílicas nos neurônios remanescentes (SCHRAG, 2004).

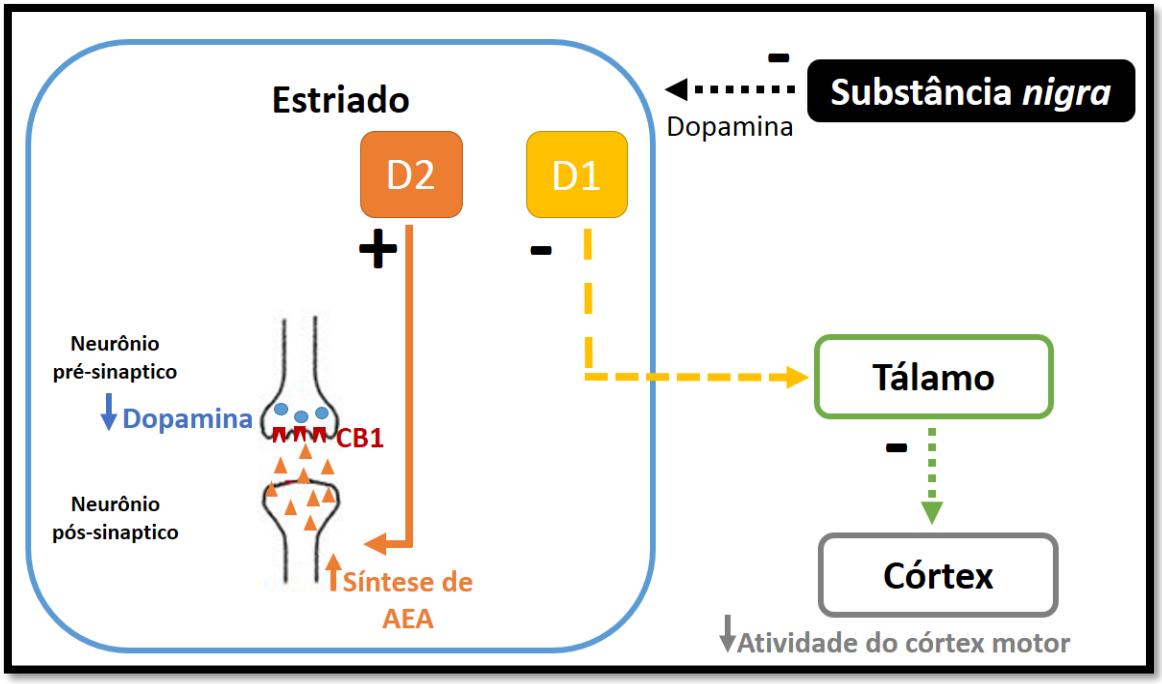
A DP é caracterizada por quatro sintomas clássicos: (1) tremor em repouso; (2) bradicinesia; (3) rigidez e (4) instabilidade postural. Além dessas alterações motoras, os pacientes apresentam inúmeros sinais e sintomas não motores como: distúrbios do sono, perda do olfato, alterações neuropsiquiátricas, entre outros. As anormalidades neuropsiquiátricas mais comumente observadas são transtornos de humor e de ansiedade, alterações de personalidade, perda cognitiva, delírios e alucinações (SCHRAG, 2004).

A prevenção primária da DP não tem sido realizada devido à ausência de marcadores biológicos (SAÚDE, 2017), por isso estudos de biomarcadores da DP têm sido realizados para o diagnóstico precoce desta patologia. Neste contexto, os endocanabinóides, neurotransmissores que se ligam aos receptores canabinóides, principalmente a anandamida (AEA) e o 2-araquidonilglicerol (2-AG), têm sido avaliados em amostras biológicas. Inovadores métodos analíticos de alta sensibilidade têm sido desenvolvidos para a determinação destes endógenos presentes amostras biológicas em níveis de sub-traços.

A influência dos endocanabinóides na fisiopatologia da DP ainda é pouco compreendida. O que se tem conhecimento é que os receptores canabinóides e dopaminérgicos estão localizados nos neurônios estriatais. A deficiência de

dopamina na DP causaria uma hiperatividade dos receptores dopaminérgicos do tipo 2 (D2), gerando um aumento na produção de AEA. Ao mesmo tempo, os endocanabinóides, que são sintetizados em neurônios pós-sinápticos após ativação dos receptores dopaminérgicos (D2), agiriam nos neurônios pré-sinápticos como moduladores da liberação de dopamina. A deficiência de dopamina, por outro lado, provoca uma hipoatividade dos receptores dopaminérgicos do tipo 1 (D1), inibindo excessivamente áreas do cérebro que controlam o sistema motor, sendo responsável pelo início do Parkinson (Figura 1). (GIUFFRIDA; MARTINEZ, 2017; GIUFFRIDA; MCMAHON, 2010).

Figura 1. Esquema da interação do sistema dopaminérgico e endocanabinóide na DP



Fonte: próprio autor

Alguns estudos realizados em modelos de animais (roedores) induzidos ao parkinsonismo mostraram que há um aumento dos níveis de endocanabinóides, principalmente AEA (DI MARZO, 2000; KLUGER et al., 2015). Segundo Obeso et al. (2004), a estimulação do sistema dopaminérgico resulta na diminuição dos níveis dos endocanabinóides, contribuindo para o desenvolvimento de discinesias associadas ao tratamento da DP (OBESO et al., 2004).

Pisani et al. (2010) comprovaram que pacientes portadores de DP sem tratamento apresentaram um aumento de AEA (6 a 17 pmol mL^{-1} no grupo PD,

enquanto no grupo controle variou de 2 a 9 pmol mL^{-1}). Contudo, quando em tratamento crônico com reposição de dopamina, os níveis de AEA voltaram ao normal (PISANI et al., 2010).

Quanto à influência do 2-AG na PD, um estudo mais recente em modelo de camundongo induzidos com a doença, mostrou que o 2-AG tem um potencial efeito neuroprotetor. Inicialmente, os autores observaram uma diminuição do nível de 2-AG quando a PD foi induzida em camundongos. Após a adição exógena de 2-AG ou a adição de um inibidor específico da enzima monoacilglicerol lipase, que controla o metabolismo dos endocanabinóides, o efeito protetor do 2-AG foi pronunciado (MOUNSEY et al., 2015).

O tratamento medicamentoso da DP tem como principal objetivo a redução da progressão da doença e controle dos sintomas. Segundo Protocolo Clínico, os medicamentos que vêm sendo utilizados são: levodopa, agonistas dopaminérgicos, inibidores da monoamino-oxidase B, inibidores da catecol-O-metiltransferase, anticolinérgicos e antiglutamatérgicos (SAÚDE, 2017).

O medicamento de primeira escolha, e o mais utilizado, é a levodopa. Este fármaco promove melhora acentuada dos sintomas motores, porém o tratamento prolongado não interrompe a progressão da doença e o aparecimento de complicações motoras, que incluem as discinesias e as falhas no efeito sintomático motor (FERRAZ, H.B., BORGES, 2002). Devido a estes efeitos adversos, sobretudo aos causados em longo prazo, terapias alternativas vêm sendo avaliadas. As possibilidades medicamentosas incluem utilização de pramipexol, tolcapona, entacapona ou associações de fármacos agonistas de dopamina com doses reduzidas de levodopa (SAÚDE, 2017).

Devido às crescentes evidências que confirmam a estreita relação entre o sistema dopaminérgico e endocanabinóide, os derivados da *Cannabis* têm sido avaliados como alternativas não-dopaminérgicas para o tratamento da DP. Alguns estudos clínicos indicam que o canabidiol (CBD) é um promissor fármaco para o tratamento da DP, pois melhora os sintomas psicóticos e a qualidade de vida dos pacientes (CHAGAS et al., 2014a, 2014b; JOSE MARTINEZ-ORGADO et al., 2007; MECHOULAM; PARKER; GALLILY, 2002; SAGREDO et al., 2007; ZUARDI et al., 2009).

No entanto, existem pouco estudos sobre o mecanismo de ação e a farmacocinética do CBD. Assim, métodos analíticos de alta sensibilidade para

determinação deste fármaco alternativo em amostras biológicas têm sido desenvolvidos.

CAPÍTULO 1

Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas em *tandem* no modo *column switching* para a análise direta de endocanabinóides em amostras de plasma e líquido cefalorraquidiano

CAPÍTULO 1

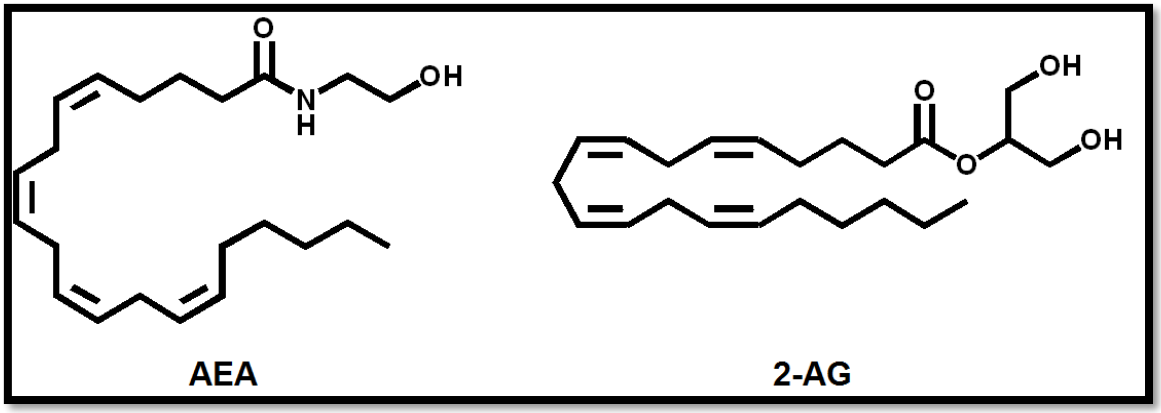
1.I Introdução

1.I.1 Endocanabinóides

Os endocanabinóides são substâncias endógenas derivadas do ácido araquidônico que se ligam aos receptores canabinóides do tipo 1 e 2 (CB1 e CB2), agindo como agonistas. Os receptores CB1 são altamente abundantes no sistema nervoso central nas terminações dos neurônios, participando da regulação da neurotransmissão. Os CB2 aparecem associados ao sistema imune periférico, aos neurônios do tronco cerebral e à microglia (FAGAN; CAMPBLLE, 2014).

Os principais endocanabinóides são N-araquidonoil etanolamina ou como também é conhecida, anandamida (AEA) e o 2-araquidonilglicerol (2-AG) (Figura 2). Esses neurotransmissores participam de diversas funções cerebrais, tais como memória, aprendizado e controle motor (FERNÁNDEZ-RUIZ et al., 2000).

Figura 2. Estrutura química dos endocanabinóides



Fonte: próprio autor

Os endocanabinóides têm sido determinados em diversas matrizes biológicas, como: plasma, líquido (LCR), sêmen, tecidos neurais, soro, placenta e cabelo (AMOAKO et al., 2010; BALVERS; VERHOECKX; WITKAMP, 2009; BALVERS et al., 2013; IVANOV; BORCHERT; HINZ, 2015; JUNG et al., 2012; LAM; MARCZYLO; KONJE, 2010; LAM et al., 2008; LEHTONEN et al., 2011; LEWEKE et al., 2007; LIPUT et al., 2014; MARCZYLO et al., 2009; OBATA et

al., 2003; OTTRIA et al., 2014; SCHREIBER et al., 2007; SERGI et al., 2013b; ZOERNER et al., 2012). Entretanto, as concentrações encontradas nessas amostras são muito distintas. No LCR, por exemplo, em pacientes saudáveis, as concentrações determinadas têm sido de aproximadamente 0,83 ng mL^{-1} para AEA e 26 ng mL^{-1} para 2-AG (CENTONZE et al., 2007). Já para amostras de plasma (pacientes saudáveis) as concentrações têm sido de 0,14 ng mL^{-1} para AEA e 0,23 ng mL^{-1} para 2-AG (BALVERS et al., 2013).

Em determinações quantitativas, o material biológico a ser utilizado depende, principalmente, de dois fatores: a finalidade da análise e a natureza do analito (MOREAU; SIQUEIRA, 2008). Dessa forma, ao se tratar de endocanabinóides relacionado à doença neurológica é de praxe optar pela utilização do LCR, uma vez que este material faz parte do sistema nervoso central. No entanto, a coleta desta amostra é invasiva, dolorosa, necessita de profissionais especializados para coleta e ambiente hospitalar. Até o presente momento não há estudos que correlacionem as concentrações plasmáticas de AEA e 2-AG com as obtidas em LCR.

1.I.2 Métodos analíticos para a determinação de endocanabinóides em amostras biológicas

A determinação de endocanabinóides tem sido realizada, nos últimos anos, por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) com detecção de ultravioleta (UV), fluorescência (FL) e espectrometria de massas (MS); ou cromatografia líquida de ultra performance acoplada com espectrometria de massas em *tandem* (UHPLC-MS/MS). A detecção MS/MS fornece identificação inequívoca dos analitos (Tabela 1).

Os trabalhos mais recentes descritos na literatura empregam a técnica LC-MS/MS, em razão da alta sensibilidade, seletividade, frequência analítica e não requer a etapa de derivatização (BALVERS et al., 2013; GACHET et al., 2015; HAN et al., 2013; OTTRIA et al., 2014; QI et al., 2015).

A cromatografia líquida de ultraeficiência (UHPLC) surgiu com o advento da coluna com partículas porosas sub-2 µm. Essa inovação resulta em altas velocidades lineares da fase móvel que favorecem a resolução e sensibilidade do método, além de reduzir o tempo de análise e o consumo de solventes, em

comparação com a HPLC convencional (KUCEROVA, B., KRCMOVA, L., SOLICHOVA, D., PLISEK, J., SOLICH, P., 2013).

Em razão da complexidade dos fluidos biológicos, eles não são introduzidos em seu estado *in natura* em sistemas LC-MS/MS, pois apresentam interferentes, principalmente as proteínas que podem (i) adsorver de forma irreversível junto à coluna analítica, modificando a retenção dos analitos, (ii) coeluir com os analitos durante a separação cromatográfica ou (iii) suprimir a ionização dos analitos. Portanto, a etapa de preparo de amostras tem sido requerida no desenvolvimento de métodos analíticos, para eliminar os interferentes e pré-concentrar os analitos, quase sempre presentes em níveis de traços em amostras biológicas (QUEIROZ, 2011).

As técnicas de preparo de amostras: precipitação de proteínas, extração líquido-líquido (LLE) e extração em fase sólida (SPE) têm sido as técnicas mais utilizadas no desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação dos endocanabinóides e canabinóides naturais em diferentes amostras, como plasma, soro, cérebro, células tronco, LCR, urina, cabelo, dentre outras (Tabela 1).

A precipitação de proteínas com solvente orgânico (principalmente acetonitrila) é a abordagem de preparo de amostras mais simples para a exclusão de proteínas. A precipitação de proteínas geralmente é realizada a baixa temperatura (NIESSEN, 2006).

Com base na lipofilicidade dos endocanabinóides, a LLE tem sido conduzida com solventes imiscíveis em água, incluindo clorofórmio, tolueno e misturas de clorofórmio / metanol e de acetato de etila / hexano (ZOERNER et al., 2011).

A SPE para a determinação de endocanabinóides em amostras biológicas tem sido realizada com a utilização de fases estacionárias octadecil sílica (C18) (ZOERNER et al., 2011).

Além das técnicas de preparo de amostra convencional, alguns autores têm trabalhado no desenvolvimento de técnicas analíticas que requerem menor tempo de análise, permitem a automação do processo e demandam menor volume de solvente orgânico e de amostra biológica. Essas metodologias incluem: microextração em fase sólida e *column switching* (Tabela 1).

Tabela 1. Técnicas analíticas para a determinação de endocanabinóides em amostras biológicas

Analitos	Amostra	Descrição do Método			LIQ	Referências
		Extração	Condições cromatográficas	Sistema de Detecção		
AEA	LCR (1 mL)	SPE	FE:ODS FM: metanol:água. (Eluição por gradiente)	LC-MS	LOD:0,025 pmol mL^{-1}	(SCHREIBER et al., 2007)
AEA	Soro, plasma, líquido aminiótico, leite, urina, saliva, líquido peritoneal, fluído de cisto ovariano. (2 mL)	SPE	FE = C18 FM = 2 mM de acetato de amônio + 0,1% de ácido fórmico:acetonitrila + 0,1% de ácido fórmico. (Eluição por gradiente)	UHPLC – MS/MS	8 pM	(MARCZYLO et al., 2009)
AEA	Placenta (100 mg)	SPE	FE = C18 FM = 2 mM de acetato de amônio + 0,1% de ácido fórmico:acetonitrila + 0,1% de ácido fórmico. (Eluição por gradiente)	UHPLC – MS/MS	0,22 fmol	(LAM et al., 2008; MARCZYLO et al., 2010)
AEA e NAEs	Sêmen (0,5 mL SPE ou 2mL LLE)	SPE e LLE	FE: C18 FM: 2 mmol acetato de amônio + 0,1% ác. Fórmico + 5% acetonitrila: acetonitrila + 0,1% ác. fórmico. (Eluição por gradiente)	UHPLC – MS/MS	100 - 200 fmol mL^{-1}	(AMOAKO et al., 2010)
AEA, DHEA, LEA, PEA, OEA e 2-AG	Cérebro humano (1-3 mg)	LLE	FE: C18 FM: água: acetonitrila: ácido fórmico (33:67:0,1) (Isocrático)	LC-MS/MS	0,5 nM - 189 nM	(LEHTONEN et al., 2011)
AEA	Cérebro humano	LLE	FE: C18 FM: metanol + 0,25% de ácido acético + 5mM de acetato de amônio: 5mM de acetato de amônio + 0,25% de ácido acético. (Eluição por gradiente)	LC-MS	-	(JUNG et al., 2012)

Tabela 1 continua...

Continuação da Tabela 1...

Analitos	Amostra	Descrição do Método			LIQ	Referências
		Extração	Condições cromatográficas	Sistema de Detecção		
2-AG e AEA	Plasma humano (250 µL)	LLE	FE: C18 FM: acetato de amônio 2mmol:metanol com 2mmol de acetato de amônio. (Eluição por gradiente)	LC-MS/MS	0,5 nM	(ZOERNER et al., 2012)
AEA, PEA, LEA, OEA, DHEA and LNEA	Sangue humano (150 µL) e fígado de Hamster (0,1 g)	SPE e LLE	FE = Kinetex XB e C18 FM = água com 0,1% de ácido fórmico: acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (Eluição por gradiente)	UHPLC-MS/MS	0,03 - 0,2 ng mL^{-1}	(LIN; YANG; JONES, 2012)
AEA, 2-AG, DHEA, DLE, OEA, PEA e SEA	Plasma humano (100 µL)	Precipitação de proteínas	FE = C8 FM = água/metanol/acetonitrila (40/40/20) com 0,1% ácido fórmico: metanol/acetonitrila (70/30) com 0,1% ácido fórmico. (Eluição por gradiente)	LC–MS/MS	0,019 - 0,771 ng mL^{-1}	(BALVERS et al., 2013)
2-AG e AEA	Plasma humano (100 µL)	µ-SPE	FE = C18 FM = água/ metanol com 2,5 mM ácido fórmico (80/20) (Eluição por gradiente)	UHPLC-MS/MS	0,29 – 2,9 ng mL^{-1}	(SERGI et al., 2013b)
2-AG, AEA, LEA DHEA, PEA e OEA	Cérebro *pos-mortem* (0,5 – 1,0 g)	SLE	FE = C18 FM = água/ acetonitrila/ ácido fórmico (33:67:0,1, v/v/v) (Eluição isocrática)	UHPLC-MS/MS	0,4 - 40 ng mL^{-1}	(MUGURUZA et al., 2013)
2-AG, AEA e N-araquidonoil aminoácidos	Cérebro de rato (10 mg)	SLE	FE = Zorbax SB-CN FM = acetato de amônio 10 mM/ metanol (Eluição isocrática)	LC-MS/MS	0,7 – 7,.5 ng mL^{-1}	(HAN et al., 2013)
AEA e 2-AG	Plasma humano (0,5 mL)	LLE	FE = Zorbax C18 FM = água com 5mM de formiato de amônio/ metanol (Eluição por gradiente)	LC-MS/MS	0,1 - 0,5 ng mL^{-1}	(THIEME et al., 2014)
AEA, 2-AG e outros	Leite (10 µL) Plasma humano (10 µL) Cultura de células (10 µL) Tecido (10 µL)	SPE	FE = BEH C18 FM = água / metanol com 10 Mm acetato de amônio (Eluição por gradiente)	UHPLC-MS/MS	7,3 - 18 pg	(GOUVEIA-FIGUEIRA; NORDING, 2014)

Tabela 1 continua...

Continuação da Tabela 1...

Analitos	Amostra	Descrição do Método			LIQ	Referências
		Extração	Condições cromatográficas	Sistema de Detecção		
AEA, 2-AG, OEA, PEA, and LEA	Cérebro de rato (10 mg)	SLE	FE = C18 FM = ácido fórmico (0,02M) em acetonitrila / ácido fórmico (0,02M) em água (Eluição por gradiente)	LC-MS/MS	0,2 – 0,8 ng g^{-1}	(BYSTROWSKA; SMAGA, 2014)
2-AG e AEA	Plasma humano (100 µL)	µ-SPE	FE = C18 FM = Água (80%); ácido fórmico 2,5mM em metanol (20%). (Eluição por gradiente)	LC – MS/MS	0,29 - 2,9 ng mL^{-1}	(BATTISTA et al., 2014)
AEA, OEA e PEA	Cérebro de roedores (50 mg)	Precipitação de proteínas	FE: C18 FM: 1 mM de acetato de amônio + 0,1% de ácido acético em metanol:1 mM de acetato de amônio, 0,1% de ácido acético e 5% de metanol em água. (Eluição por gradiente)	LC-MS	0,5 -1,4 ng mL^{-1}	(LIPUT et al., 2014)
AEA, OEA, LEA, LNEA, PEA e SEA	Plasma, Urina e Cultura de Célula 1% (1 mL plasma e 2mL urina)	SPE	FE: HSST3 FM: 0,1% de ácido fórmico:acetonitrila + 5% água + 0,1% ácido fórmico. (Eluição por gradiente)	UHPLC-MS	0,106 - 0,273 ng mL^{-1}	(OTTRIA et al., 2014)
AEA e 2-AG	Cérebro de rato	SLE	FE = 10 mM amônio FM = acetate / acetonitrila (Eluição isocrática)	LC-MS/MS	25 - 50 fmol	(QI et al., 2015)
AEA e 2-AG	Plasma e cérebro	LLE	FE: C18 FM: 0,1% de ácido fórmico + acetonitrila. (Eluição isocrática)	LC-MS/MS	0,325 - 11 ng mL^{-1}	(GONG et al., 2015)
AEA,LEA, 2-AG e outros	Plasma humano	SPE	FE: C18 FM: metanol com 2mM de acetato de amônio + água com 2mM de acetato de amônio e 0,1% ácido fórmico. (Eluição por gradiente)	LC-MS/MS	0,1 – 190 ng mL^{-1}	(GACHET et al., 2015)
2-AG e outros EC	Plasma humano (0,5 mL)	LLE	FE: C18 Zorbax FM: 0,1% de ácido fórmico:água + acetonitrila: isopropanol: ácido fórmico. (Eluição por gradiente)	LC-MS/MS	-	(BILGIN et al., 2015)
AEA, 2-AG, OEA e PEA	Células tronco (1 mL)	LLE	FE: C18 FM: 0,2% de ácido fórmico:acetonitrila/2-propanol (60:40) com 0,2% de ácido fórmico. (Eluição por gradiente)	LC-MS	0,3 - 5 ng mL^{-1}	(IVANOV; BORCHERT; HINZ, 2015)

Tabela 1 continua...

Continuação da Tabela 1...

Analitos	Amostra	Descrição do Método			LIQ	Referências
		Extração	Condições cromatográficas	Sistema de Detecção		
AEA, 2-AG, OEA, DEA and SEA	Plasma humano (300 – 500 µL)	SPE	FE = C18 FM = água/ CH_3COONH_4 em metanol (Eluição por gradiente)	UHPLC-MS/MS	0,0005 - 2.1 pg	(GOUVEIA-FIGUEIRA; NORDING, 2015)
AEA e virodhamine	Plasma humano (100 µL)	SALLE	FE = C18 FM = 0,1% de ácido fórmico em água/ acetonitrila (65:35, v/v) (Eluição isocrática)	LC-MS/MS	0,1 ng mL^{-1}	(XIONG et al., 2015)
AEA e 2-AG	Plasma humano Tecido de aorta (500 mL)	LLE, SPE and SLE	FE = Kinetex C18 FM = 0,2% ácido acético em água/ 0,1% ácido fórmico em acetonitrila (Eluição por gradiente)	LC-MS	0,5 - 1,0 mg mL^{-1}	(GARST et al., 2016)
AEA, 2-AG, e glucocorticóides	Cérebro humano (1 cm)	SPE	FE = ODS C18 FM = metanol / água (90%/10%, v/v) com 2,0 mM de acetato de amônio em água (pH 4,5) (Eluição isocrática)	LC-MS/MS	3,0 - 15,0 pg mg^{-1}	(MWANZA et al., 2016)
AEA, 2-AG e outros	Plasma humano (650 – 750 µL)	SPE	FE = BEH C18 FM = água / metanol com 10 mM de acetate de amônio (Eluição por gradiente)	LC-MS/MS	7,3 pg - 18 pg	(CLAESON et al., 2017)
AEA e outros	Plasma humano (0,5 mL)	SPE	FE = BEH C18 FM = água com 0,1% de ácido acético / acetonitrile:isopropanol (Eluição por gradiente)	LC-MS/MS	-	(GOUVEIA-FIGUEIRA et al., 2017)
NADA, AEA, DEA, DHEA, DGLEA, 2-AGE, LEA, O-AEA, 2-AG, SEA, OEA, and PEA	LCR (1,5 mL)	LLE	FE = Agilent Polaris-HR-Chip C18 FM = 10 mM ácido fórmico/ água: acetonitrila (Eluição por gradiente)	nano LC-MS/MS	0,9 – 61,2 pM	(KANTAE et al., 2017)
O-AEA, DHEA, AEA, NAGLy e NADA	Soro humano (200 µL)	SPE	FE = C18 FM = 70% de acetonitrila em água contendo 0,1% de ácido fórmico (Eluição por gradiente)	LC-MS/MS	10 – 100 pg mL^{-1}	(LUQUE-CÓRDOBA et al., 2018)

Tabela 1 continua...

Continuação da Tabela 1...

Analitos	Amostra	Descrição do Método			LIQ	Referências
		Extração	Condições cromatográficas	Sistema de Detecção		
AEA e 2-AG	Plasma humano (400 µL)	*In-tube* SPME	Coluna 1D FE = capilar de líquido iônico polimérico FM = água Coluna 2D FE = Kinetex C18 FM = água com 0,5% de ácido fórmico/ acetonitrila (30:70, v/v) (Eluição isocrática)	UHPLC-MS/MS	0,05 - 0,1 ng mL^{-1}	(SOUZA; HANTAO; QUEIROZ, 2018)

Sendo: LIQ = limite de quantificação; AEA = anandamida/ N-araquidonoiletanolamina; LCR= líquido cefalorraquidiano; SPE = extração em fase sólida; FE = fase estacionária; FM = fase móvel; LC-MS = cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas; LOD = limite de determinação; UHPLC-MS/MS = cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas em *tandem*; NAEs = N-aciletanolaminas; LLE = extração líquido-líquido; DHEA = docosahexaenoil etanolamida; LEA = N-linoleoiletanolamida; PEA = palmitoil etanolamida; OEA = oleoil etanolamida; 2-AG = 2-araquidonilglicerol; LC-MS/MS = cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em *tandem*; LNEA = N- α – linoleoiletanolamida; DLE = dihomo-linolenoil etanolamida; SEA = etanolamida stearoil; µ-SPE = micro extração em fase sólida; SLE = extração sólido-líquido; EC = endocanabinóides; DEA = docosatetraenoil etanolamida; SALLE = extração líquido-líquido auxiliada por *salting-out*; NADA = N-araquidonoilopopamina; DGLEA = N-dihomo-γ-linolenoil etanolamida; 2-AGE = 2-araquidonilglicerol ether; O-AEA = O-araquidonoil etanolamida ; NaGLy = N-araquidonil-glicina ; *in-tube* SPME = microextração em fase sólida no capilar.

1.I.3 Cromatografia líquida no modo *column switching*

Visando minimizar o consumo de solvente orgânico, do volume da amostra, a miniaturização dos sistemas analíticos, a hifenação de técnicas e a automação (*high-throughput performance*), a química analítica moderna tem sido direcionada para o desenvolvimento de novas técnicas analíticas. Nesse contexto, podemos destacar a cromatografia líquida no modo *column switching* (KATAOKA; SAITO, 2012; MOLINER-MARTINEZ et al., 2015).

A cromatografia líquida no modo *column switching* permite a automação das análises através da hifenação da etapa de preparo de amostras biológicas (pré-concentração dos analitos e remoção de grande parte dos interferentes) com o sistema cromatográfico (separação cromatográfica e detecção), reduzindo o tempo da análise, o volume das amostras biológicas e de solventes orgânicos. Os sistemas automatizados favorecem a precisão e exatidão dos métodos.

O sistema multidimensional de cromatografia líquida no modo *column switching*, geralmente, é constituído por duas colunas com diferentes dimensões e fases estacionárias com distintos mecanismos de sorção; uma válvula com

múltiplos pórticos e uma ou mais bombas HPLC de alta pressão (CAMPÍNS-FALCÓ; HERRÁEZ-HERNÁNDEZ; SEVILLANO-CABEZA, 1993; KATAOKA; SAITO, 2012). O preparo da amostra é realizado na primeira dimensão do sistema (coluna 1D) e na segunda dimensão (coluna 2D), a separação cromatográfica.

Diferentes sorventes seletivos têm sido utilizados na primeira dimensão, como, por exemplo, os materiais de acesso restrito (RAM), imunosorventes, polímero molecularmente impresso (MIP), fases monolíticas, líquidos iônicos, dentre outros (KATAOKA; SAITO, 2012).

As técnicas *column* switching têm sido utilizadas em diversas áreas, tais como: ambiental, alimentos, farmacêutica, forense e análises biológicas. Na Tabela 2, estão exemplificadas algumas dessas aplicações.

Tabela 2. Aplicações do *column switching* na análise de diferentes substâncias

Column swtiching					
Analito	**Amostra**	**Coluna 1D**	**Coluna 2D**	**Sistema de detecção**	**Referência**
DL-tetrahidropalmatine	Erva Chinesa	MIP monolítico (50 mm x 4 mm i.d.)	ODS	HPLC-UV	(OU et al., 2006)
Sulfonamidas	Leite bovino	RAM-MIP-SG (40 mm x 4,6 mm i.d.)	C18	LC-UV	(XU et al., 2010)
Inibidor da topoisomerase	Plasma humano	C18 (10 cm x 2,1 mm i.d.)	C18	LC-MS/MS	(KAMEI et al., 2011)
Clorpromazina	Plasma humano	RAM-MIP-BSA (10 cm x 4,6 mm i.d.)	C18	LC-UV	(DE OLIVEIRA ISAC MORAES, G., DA SILVA, L.M., DOS SANTOS-NETO, A.J., FLORENZANO, F.H., FIGUEIREDO, 2013)
Quimioterápico	Plasma humano	C18 (3 mm x 20 mm i.d.)	C18	LC-MS/MS	(WICKREMSINHE et al., 2013)
Xantina oxidadase	Leite bovino	RAM-C18 (20 mm x 2 mm i.d.)	C18	LC-DAD	(LI et al., 2014)
11-nor-9-carboxi-tetra-hidrocanabinol	Cabelo humano	C18 (50 mm x 3 mm i.d.)	C18	LC-MS^3	(PARK et al., 2014)
Estatinas	Plasma humano	RAM-BSA (30 mm x 4,6 mm)	C18	LC-UV	(FAGUNDES et al., 2014)
Ácidos alquil mercaptúricos	Urina Humana	RAM-ADS-C18 (4mm x 25 mm i.d.)	C18	LC-MS/MS	(ECKERT; GÖEN, 2014)
Antidepressivos, anticonvulsivante, ansiolíticos e antipsicóticos	Plasma humano	Coluna monolítica (4,5 cm x 530 µm i.d.)	C18	LC-MS/MS	(DOMINGUES et al., 2015)
Bisfenol A	Água	Nanofibra de poliamida (5mm x 4,6 mm)	C18	HPLC-FD	(PARMOVÁ et al., 2017)
Benzodiazepinos	Plasma humano	Oasis HLB (20 mm x 2.1 mm i.d.)	Sumipax ODS	UHPLC-MS/MS	(LEE et al., 2017)
Tetraciclinas	Leite bovino	Nanotubo de carbono (10 mm x 4 mm i.d.)	C18	LC-UV	(DE FARIA et al., 2017)

Sendo: MIP = polímero molecularmente impresso; HPLC-UV = cromatografia líquida de alta performance acoplada com detector de ultravioleta; LC-UV = cromatografia líquida acoplada com detector de ultravioleta; RAM-MIP-SG = material de acesso restrito- polímero molecularmente

impresso- sílica gel; LC-MS/MS = cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em *tandem*; RAM-MIP-BSA = material de acesso restrito- polímero molecularmente impresso- albumina sérica bovina; LC-DAD = cromatografia líquida acoplada ao detector de arranjo de diodo; HPLC = cromatografia líquida de alta performance; UHPLC-MS/MS = cromatografia líquida de ultra performance acoplada a espectrometria de massas em *tandem*; LC-FD = cromatografia líquisa acoplada ao detector de fluorescência.

1.I.4 Sorvente para a cromatografia líquida no modo *column switching*: Material de Acesso Restrito

A cromatografia líquida no modo *column switching* tem utilizado como sorvente da primeira dimensão diferentes materiais, entre eles os RAM.

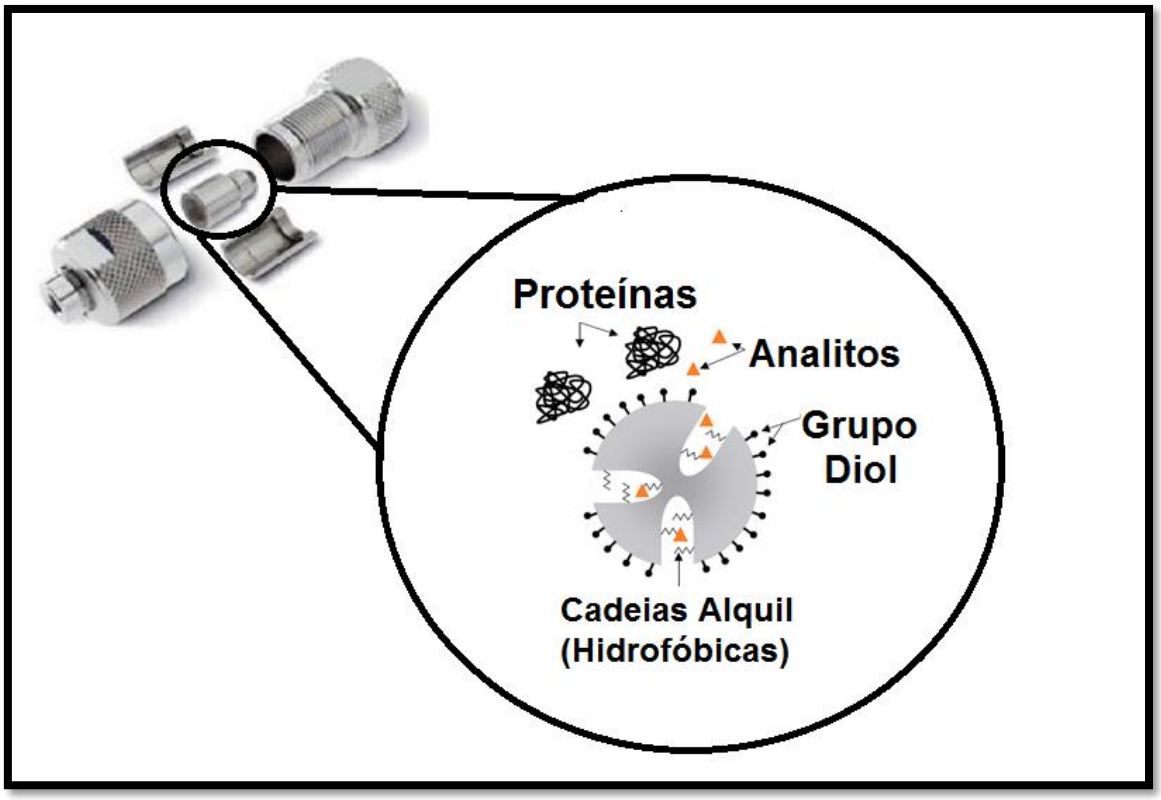
O desenvolvimento dessas fases estacionárias permite, na maioria das vezes, a introdução (injeção) direta das amostras biológicas em sistemas cromatográficos. A automação das análises permite o aumento da frequência analítica e minimiza tanto a exposição dos analistas aos fluidos biológicos, quanto os erros humanos decorrentes da análise manual.

As fases estacionárias combinam os princípios da cromatografia de exclusão e da cromatografia em fase reversa. A superfície hidrofílica biocompatível das partículas hidrofóbicas impede a adsorção de macromoléculas da matriz biológica na fase estacionária, e as partículas hidrofóbicas (suportes de sílica, C8 ou C18) são responsáveis pela pré-concentração (partição) das micromoléculas (neurotransmissores).

As macromoléculas podem ser excluídas por barreira de difusão física, considerando o diâmetro do poro, ou por barreira de difusão química criada por uma cadeia proteica (ou polimérica), na superfície externa da partícula (SOUVERAIN; RUDAZ; VEUTHEY, 2004b).

Algumas colunas (1D) com fases estacionárias à base de RAM encontram-se disponíveis comercialmente, como é o caso da RAM-C8 RP-8 ADS (25 mm x 4 mm x 25 µm) (Merck®, EUA). Essa fase apresenta partículas de sílica gel esféricas (25 µm) com modificação alquil (C8) na superfície interna e modificação diol na superfície externa dos poros (Figura 3). A coluna RAM-C18 (1D), junto ao sistema *column switching*, permite a exclusão (barreira de difusão física) das proteínas da amostra de plasma/ LCR e pré-concentração dos analitos em fase reversa através da partição (MERCK MILLIPORE, [s.d.]).

Figura 3. Coluna 1D RAM-C8 RP-8 ADS



Fonte: próprio autor

1.II Objetivos

Objetivo Geral

Desenvolver um método *online* por UHPLC-MS/MS, no modo *column switching*, para a determinação de endocanabinóides, AEA e 2-AG, em níveis de traços em amostras de plasma e LCR de pacientes com a DP.

Objetivos Específicos

- Avaliar as condições MS/MS para monitoramento dos endocanabinóides em fase reversa.
- Desenvolver o método *online* por UHPLC-MS/MS, no modo *column switching*, com a coluna RAM-C8 RP-8 ADS, na primeira dimensão e fase reversa na segunda dimensão, para a determinação de AEA e 2-AG em amostras de plasma de pacientes com a DP.
- Validar os métodos desenvolvidos baseado nas normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (RDC nº 27/2012).
- Desenvolver o método *online* por UHPLC-MS/MS, no modo *column switching*, com a coluna RAM-C8 RP-8 ADS na primeira dimensão e fase reversa na segunda dimensão para a determinação de AEA e 2-AG em amostras de LCR de pacientes com a DP.
- Determinar os endocanabinóides, AEA e 2-AG, em amostras de plasma de pacientes com a DP.
- Comparar as concentrações plasmáticas de AEA e 2-AG de pacientes com a DP com as determinadas para o grupo controle (sujeitos que não apresentam doenças neurológicas).
- Comparar as concentrações plasmáticas de endocanabinóides com as encontradas em amostras de LCR, a fim de avaliar a correlação.

1.III Materiais e Métodos

1.III.1 Reagentes e padrões analíticos

Os padrões analíticos de AEA, AEA d_4, 2-AG e 2-AG d_5 foram adquiridas da Cayman Chemical (Michigan, USA). Foram preparadas as soluções estoques na concentração de 1000 ng mL^{-1} para AEA e 2-AG. Essas soluções estoques foram preparadas em acetonitrila e armazenadas a - 80ºC, em frascos âmbar. A partir destas soluções, foram preparadas as soluções diluídas em água: acetonitrila (90:10, v/v). A solução de padrão interno foi preparada com AEA d_4 e 2-AG d_5, nas concentrações de 3,75 ng mL^{-1} e 18,75 ng mL^{-1}, respectivamente. A acetonitrila, grau HPLC, acetato de amônio e ácido fórmico foram adquiridos do fornecedor JT Baker (Phillipsburg, EUA). A água utilizada para preparar a fase móvel foi purificada em sistema Milli-Q (18MΩ) (Millipore, São Paulo, Brasil).

1.III.2 Casuística e Amostras Biológicas

Foram obtidas amostras de plasma e de LCR de pacientes acompanhados no Ambulatório de Doenças Extrapiramidais (EXP) e Neurologia Comportamental (NCP) do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (HCRP) sob responsabilidade do Prof. Dr. Vitor Tumas, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Foram examinadas amostras de plasma de 50 pacientes com DP e de 20 sujeitos controles sem doença neurológica (aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa no Anexo I).

O sangue foi coletado por punção venosa, em tubos contendo anticoagulantes, EDTA. Foi centrifugado imediatamente após a coleta e o plasma foi armazenado a -80ºC.

O LCR foi coletado através de uma punção lombar entre a terceira e quarta vértebras. Imediatamente após a coleta, o material foi transferido para um tubo cônico âmbar e armazenado a - 80ºC. Foram coletadas 46 amostras de LCR de pacientes com DP e 20 amostras de pacientes controle.

As amostras de plasma e LCR (branco) foram enriquecidas com a solução do padrão interno (AEA d_4 e 2-AG d_5) e com a solução dos padrões dos endocanabinóides (AEA e 2-AG) em diferentes concentrações para a avaliação

das condições UHPLC-MS/MS no modo *column switching* e para a validação analítica do método.

1.III.3 Avaliação das condições UHPLC-MS/MS

O sistema cromatográfico utilizado no desenvolvimento do método foi o Waters® UHPLC MS/MS bidimensional (Waters Corporation, Milford, MA, USA). A separação cromatográfica dos analitos foi realizada em fase reversa, com eluição no modo isocrático. Dentre várias fases móveis avaliadas, a fase móvel descrita a seguir resultou em maior detectabilidade (sinal analítico) e menor tempo de análise. Fase móvel: A) Solução aquosa de ácido fórmico (0,5%) e B) Acetonitrila (30:70 v/v), na vazão de 0,4 mL min^{-1}. A coluna analítica utilizada foi a Kinetex C18 (100 mm x 2,1 mm x 1,7 µm) (Phenomenex®, EUA), a 40º C. Para as determinações quantitativas UHPLC-MS/MS foi utilizado a padronização interna, empregando padrões isotópicos (AEA d_4 e 2-AG d_5).

As análises MS/MS foram realizadas em sistema de espectrometria de massas em *tandem* - triplo quadrupolo Xevo® TQ-D (Waters, Milford, MA, USA). A ionização por eletrospray (ESI) foi avaliada no modo negativo e positivo. As análises foram realizadas no modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM), em razão da alta seletividade e detectabilidade.

A análise MS/MS foi avaliada através de infusão direta de soluções padrão dos analitos preparados em água contendo 0,1% de ácido fórmico: acetonitrila (30:70, v/v). Os padrões foram preparados isoladamente na concentração de 200 ng mL^{-1}. Os fragmentos, a energia do cone e a energia de colisão foram determinados de maneira automática, sendo definidos dois fragmentos: um de quantificação e o outro de confirmação. Os demais parâmetros, como voltagem do capilar, fluxo dos gases e temperatura de dessolvatação foram avaliados manualmente.

1.III.4 Avaliação das condições UHPLC-MS/MS no modo *column switching*

Os analitos foram pré-concentrados na coluna 1D RAM-C8 RP-8 ADS (25 mm x 4 mm x 25 µm) (Merck®, EUA) e os componentes endógenos da matriz foram eluídos para o descarte com uma fase móvel fraca. Com a troca de

posição da válvula de injeção, um eluente mais forte eluiu os endocanabinóides para a coluna analítica 2D.

Inicialmente, foi avaliada a fase móvel para a pré-concentração e para dessorção dos analitos. Nesse teste, uma das extremidades da coluna RAM-C8 RP-8 ADS foi conectada no pórtico 2 da válvula de seis pórticos e a outra extremidade no detector DAD (diode array detector), que por sua vez estava ligado ao espectrômetro de massas. A varredura foi realizada na faixa de comprimento de onda de 190 a 800 nm.

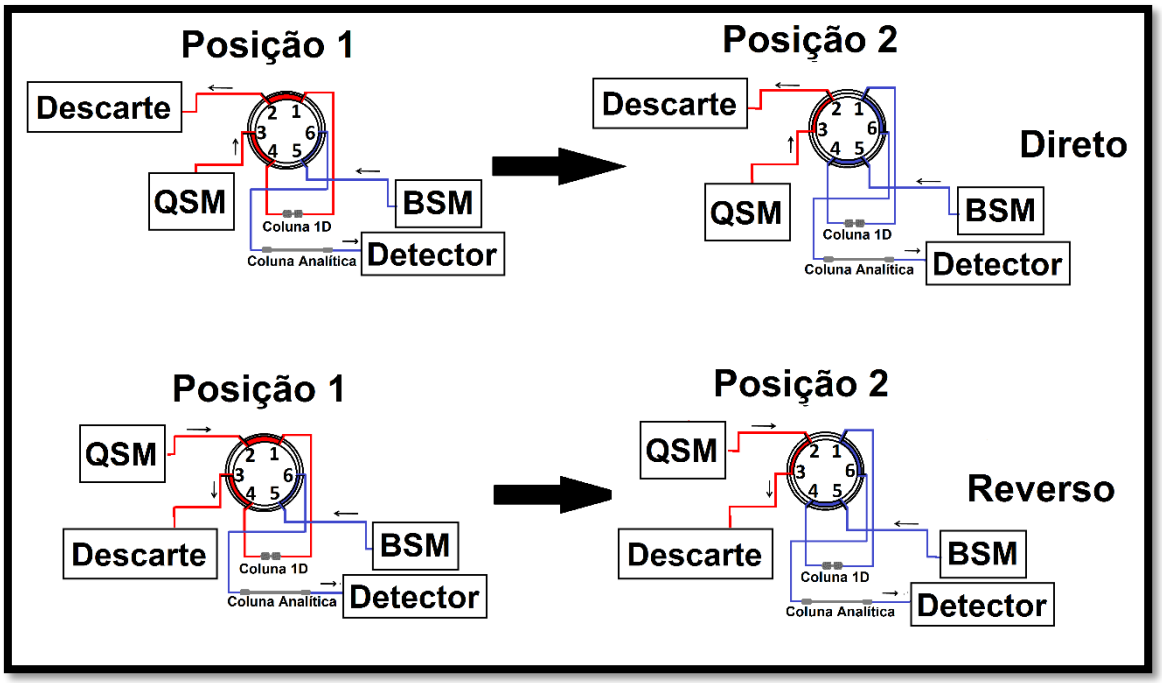
Foi preparada uma solução diluída dos padrões de endocanabinóides na concentração de 200 ng mL^{-1}. Os analitos foram injetados (10 µL) utilizando como fase móvel água e para dessorção foi utilizado acetonitrila. A vazão de sorção dos analitos também foi avaliada, variando de 0,5 a 1,0 mL min^{-1}.

A segunda etapa da avaliação do modo *column switching* consistiu no aprimoramento da exclusão dos interferentes da matriz biológica. Para avaliar essa etapa, diferentes concentrações de acetonitrila (10 a 60%) foram adicionadas à fase móvel (água). Foram utilizadas amostra de plasma enriquecida com os analitos nas concentrações de 17 ng mL^{-1} para AEA e 302 ng mL^{-1} para 2-AG.

Definido a concentração de acetonitrila na fase móvel, sem perda dos analitos, foi avaliada a exclusão das proteínas, utilizando o detector DAD (λ= 280 nm). Para o teste, foi utilizada amostra de plasma branco e foram injetados no sistema *column switching* 10 µL de plasma após precipitação prévia de proteínas. Nesse teste foi utilizada como fase móvel nos primeiros minutos da análise (2 min) a água. Com 2 minutos a fase móvel foi alterada para acetonitrila: água (40:60, v/v), e após 7 minutos, acetonitrila:água (70:30, v/v).

Por fim, foi avaliada a configuração do sistema UHPLC-MS/MS no modo *column switching*. Os modos de fluxo reverso (pré-concentração e eluição dos analitos ocorrem em fluxo inverso) e direto (pré-concentração e eluição dos analitos acontecem no mesmo sentido), Figura 4, foram avaliados para a pré-concentração e eluição dos analitos. Esses ensaios foram realizados com solução dos analitos em água: acetonitrila (90:10, v/v) nas concentrações de 7 ng mL^{-1} para AEA e 120 ng mL^{-1} para 2-AG. Foram injetados 10 µL da solução dos analitos no sistema *column switching*.

Figura 4. Configuração do sistema UHPLC-MS/MS no modo *column switching*



Fonte: próprio autor

Para a avaliação do método UHPLC-MS/MS no modo *column switching* para as amostras de LCR foi utilizada a mesma metodologia. No entanto, as soluções padrão utilizadas foram na concentração de 200 ng mL^{-1} para AEA e 2-AG preparadas em LCR.

1.III.5 Pré-preparo das amostras biológicas

Em um tubo Eppendorf de 2,0 mL, 500 µL de acetonitrila foram adicionados a 250 µL de plasma. O tubo foi centrifugado por 15 min (9000 rpm / 15ºC), o sobrenadante (500 µL) foi coletado, seco (Concentrator plus, Eppendorf®, Hamburg, Germany) e reconstituído em 150 µL de solução água:acetonitrila. Devido à baixa solubilidade dos analitos em água, a adição de acetonitrila, em diferentes concentrações (0, 5, 10, 15 ou 20%), foi avaliada.

As amostras de LCR foram injetadas diretamente no sistema cromatográfico UHPLC-MS/MS no modo *column switching*. Essa amostra vem sendo considerada como um plasma ultrafiltrado, em razão da baixa concentração de proteínas (SPECTOR; SNODGRASS; JOHANSON, 2015). Além disso, este material biológico é menos viscoso que o plasma, permitindo a injeção direta no sistema UHPLC-MS/MS no modo *column switching*.

1.III.6 Volume da amostra diluída injetada no sistema UHPLC-MS/MS no modo *column switching*

Diferentes volumes de amostra diluída (50, 70, 100 e 150 µL) foram injetados e avaliados no sistema UHPLC-MS/MS, a fim de obter adequada sensibilidade para determinar os endocanabinóides nas amostras biológicas. Esses ensaios foram realizados com o extrato seco reconstituído provenientes de amostras de plasma enriquecidas na concentração de 17 ng mL^{-1} para AEA e 302 ng mL^{-1} para 2-AG.

Para o método utilizado amostras de LCR, foram testados volumes de injeção de 10, 100 e 200 µL de amostra. Nesse caso, como a amostra biológica *in natura* é injetada no sistema cromatográfico, é preciso aumentar a sensibilidade do método utilizando o menor volume possível de amostra, uma vez que o LCR não está disponível em grande quantidade. O teste foi realizado com amostras de LCR enriquecidas nas concentrações de 50 ng mL^{-1} para AEA e para 2-AG.

1.III.7 Validação Analítica do método UHPLC-MS/MS no modo *column switching*

A validação dos métodos analíticos foi realizada com amostras de plasma e LCR enriquecidas com os analitos estudados em diferentes concentrações, baseado nos critérios estabelecidos pela ANVISA - RESOLUÇÃO RDC Nº 27, DE 17 de maio de 2012. Os parâmetros de validação analítica analisados foram os seguintes: linearidade, limite de quantificação, precisão, exatidão, efeito matriz, efeito residual, seletividade e estabilidade (ANVISA, 2012).

1.III.7.1 Linearidade

Para avaliar a linearidade do método desenvolvido, amostras de plasma (250 µL) foram enriquecidas com as soluções dos padrões internos e dos endocanabinóides, resultando em concentrações plasmáticas de 0,10 ng mL^{-1} a 6,00 ng mL^{-1} para AEA e 0,04 ng mL^{-1} a 10,00 ng mL^{-1} para 2-AG. Já as amostras de LCR (200 µL) foram enriquecidas com os analitos nas concentrações de 0,45 a 9,00 ng mL^{-1} para AEA e 1,40 a 180 ng mL^{-1} para o 2-AG. Essas faixas de

concentrações foram definidas com base nos valores normalmente determinados em amostras biológicas.

As amostras de plasma e LCR (*pool* de amostra) sem adição dos padrões (n=6) foram analisadas para determinar as concentrações endógenas dos endocanabinóides. Para a elaboração das curvas analíticas, os valores médios das áreas obtidos para AEA e 2-AG foram subtraídos dos valores de área das amostras enriquecidas com os analitos. Três curvas analíticas foram traçadas por meio da regressão linear da razão entre a área do pico dos endocanabinóides pela área do pico do padrão interno (Y) *versus* concentrações nominais dos neurotransmissores (X).

Para a utilização destas curvas analíticas nas análises quantitativas, foi calculado o coeficiente de variação (CV) para cada calibrador, sendo que o valor obtido deve ser menor ou igual a 20 para o calibrador correspondente à concentração nominal do limite inferior de quantificação (LIQ), já para os outros calibradores, incluindo o limite superior de quantificação (LSQ), o CV deve ser menor do que 15% em relação à concentração nominal.

A falta de ajuste (*Lack-of-Fit*) foi também determinada para avaliar se existe algum valor anormal nos resíduos e verificar o ajuste do modelo. Para o cálculo foi utilizado o programa *Statistica* 6.0. Para o modelo matemático gerado ser bem ajustado, o valor de *p* deve ser maior que 0,05 (RAMSEY, F.L., SCHAFER, 1997).

1.III.7.2 Precisão e Exatidão

A exatidão e precisão intra e interensaios foram determinadas por meio das quintuplicatas (n = 5) das análises de amostras de plasma e LCR enriquecidas com os endocanabinóides em cinco concentrações diferentes:

<u>• Para as amostras de plasma:</u>

- Limite Inferior de Quantificação (LIQ) = 0,1 ng mL^{-1} para AEA e 0,04 ng mL^{-1} para 2-AG;
- Controle de Qualidade Baixo (CQB) = 0,3 ng mL^{-1} para AEA e 0,12 ng mL^{-1} para 2-AG;

- Controle de Qualidade Médio (CQM) = 3,0 ng mL^{-1} para AEA e 5,0 ng mL^{-1} para 2-AG;
- Controle de Qualidade Alto (CQA) = 4,8 ng mL^{-1} para AEA e 8,0 ng mL^{-1} para 2-AG;
- Limite Superior de Quantificação (LSQ) = 6,0 ng mL^{-1} para AEA e 10,0 ng mL^{-1} para 2-AG.

• Para as amostras de LCR:

- Limite Inferior de Quantificação (LIQ) = 0,45 ng mL^{-1} para AEA e 1,40 ng mL^{-1} para 2-AG;
- Controle de Qualidade Baixo (CQB) = 1,35 ng mL^{-1} para AEA e 4,20 ng mL^{-1} para 2-AG;
- Controle de Qualidade Médio (CQM) = 5,0 ng mL^{-1} para AEA e 90 ng mL^{-1} 2-AG;
- Controle de Qualidade Alto (CQA) = 7,2 ng mL^{-1} para AEA e 144 ng mL^{-1} para 2-AG;
- Limite Superior de Quantificação (LSQ) = 9,0 ng mL^{-1} para AEA e 180 ng mL^{-1} para 2-AG.

Para determinar a precisão foi calculado o CV e para a exatidão foi calculado o erro padrão relativo (EPR, Equação 1). Ambos valores devem ser menores ou iguais a 15%, exceto para o LIQ que é permitido uma variação de ±20%.

$$EPR = \frac{(\text{Concentração prevista-Concentração real})\text{x } 100}{\text{Concentração real}} \qquad (1)$$

1.III.7.3 Efeito residual

O efeito residual foi avaliado comparando os cromatogramas das amostras biológicas sem adição de endocanabinóides com o cromatograma correspondente ao LIQ, sendo que 01 amostras sem endocanabinóides foram injetadas antes da análise da amostra biológica corresponde à concentração

LSQ e 02 amostra (sem endocanabinóides) após esta análise. Os sinais analíticos de interferentes nos tempos de retenção dos analitos devem ser menores que 20% da resposta dos analitos em concentração correspondente ao LIQ.

1.III.7.4 Efeito da matriz biológica

Para avaliar o efeito da matriz biológica no método UHPLC-MS/MS no modo *column switching*, foram injtetadas oito diferentes amostras de matriz biológica enriquecidas com os analitos em concentrações correspondentes ao CQB e CQA. Em todas as amostras, foram adicionadas o padrão interno. Com os resultados foram calculados os fatores de matriz normalizado (FMN, Equação 2). Os valores dos CV dos FMNs devem ser inferiores a 15%.

$$\text{FMN} = \frac{\text{Resposta do analito na matriz /Respostado PI na matriz}}{\text{Resposta do analito em solução/Respostado PI em solução}} \quad (2)$$

O efeito matriz também foi avaliado pelo modo de infusão pós-coluna. Nessa análise, foi introduzido, via UHPLC-MS/MS no modo *column switching*, a amostra de plasma após pré-processamento (100 µL) e, ao mesmo tempo, via infusão direta, foram introduzidas as soluções padrões dos analitos preparadas em fase móvel (7 ng mL^{-1} para AEA e 120 ng mL^{-1} para 2 AG). No cromatograma obtido, é possível avaliar a interferência dos interferentes da matriz no tempo de retenção dos analitos (SOUVERAIN; RUDAZ; VEUTHEY, 2004a).

1.III.7.5 Seletividade

A seletividade do método UHPLC-MS/MS, no modo *column switching*, foi realizada através da comparação dos cromatogramas de amostras de plasma branco de seis diferentes procedências e das amostras enriquecidas com os analitos (AEA e 2-AG) na concentração do LIQ.

1.III.7.6 Estabilidade

Para avaliar a estabilidade dos analitos, foram preparadas amostras de plasma, em triplicata, enriquecidas com os analitos em duas concentrações (LIQ e CQB). Inicialmente, as amostras foram submetidas a três ciclos de congelamento a -80 ° C e descongelamento em temperatura ambiente. Após o terceiro ciclo as amostras, foram analisadas e a estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento foi determinada.

A estabilidade a curto prazo foi verificada em temperatura ambiente por 6 horas nos mesmos níveis de concentração. E, por fim, foi avaliada a estabilidade a longo prazo. Nesse teste, as amostras foram mantidas a uma temperatura de -80 °C e analisadas, semanalmente, por um período total de 6 meses.

1.III.8 Comparação método clássico (extração Líquido-Líquido) *versus* método UHPLC-MS/MS no modo *column switching* para a determinação de AEA e 2-AG em amostras de LCR

Foi desenvolvido e validado um método clássico, de LLE com análise por cromatografia líquida de ultra eficiência (LLE-UHPLC-MS/MS), a fim de comparar as concentrações obtidas com o método inovador, UHPLC-MS/MS no modo *column switching*.

Para a LLE, o método de Leweke e colaboradores (2007) foi modificado (LEWEKE et al., 2007). Foram utilizados 1000 µL de LCR e, inicialmente, as poucas proteínas, foram precipitadas com acetona gelada, seguido de extração (partição) com tolueno. O extrato seco foi reconstituído em 50 µL de solução de água: acetonitrila (30:70 v/v) e 10 µL foram injetados no sistema Waters ACQUITY UHPLC acoplado a espectrômetro de massas Xevo® TQ-D triploquadrupolo (Waters Corporation, Milford, MA, USA). A separação foi realizada em coluna superficialmente porosa Kinetex C18 (100 mm x 2,1 mm x 1,7 µm) a 40 ºC. A fase móvel foi composta por: A) solução aquosa contendo 0,5% de ácido fórmico e B) acetonitrila (30:70, v/v), com vazão de 0,4 mL min^{-1}, no modo isocrático.

Foram utilizadas as mesmas condições MS/MS definidas para o método UHPLC-MS/MS no modo *column switching*. Para comparar os métodos LLE-UHPLC-MS/MS e UHPLC-MS/MS, no modo *column switching*, foram analisadas 15 amostras de LCR enriquecidos com AEA e 2-AG em concentração de 0,5 a 50,0 ng mL^{-1} para AEA e 1,5 a 50,0 ng mL^{-1} para 2-AG. Posteriormente, foram realizadas as análises estatísticas de regressão dos métodos e análise de *Bland-Altmann* (BABLOK, 1983).

1.IV Resultados e Discussão

1.IV.1 Avaliação das condições MS/MS

Com as infusões diretas das soluções padrão dos endocanabinóides, as condições MS/MS foram determinadas no modo MRM com ionização no modo positivo, devido às características dos analitos. As condições de ionização estabelecidas foram as seguintes: voltagem do capilar de 3,20 kV, temperatura da fonte de íons: 150°C, gás de dessolvatação: nitrogênio, fluxo de 700 L h^{-1}, 350ºC, gás de colisão: argônio. A voltagem do cone e energia de colisão foram determinadas separadamente para cada analito (Tabela 3).

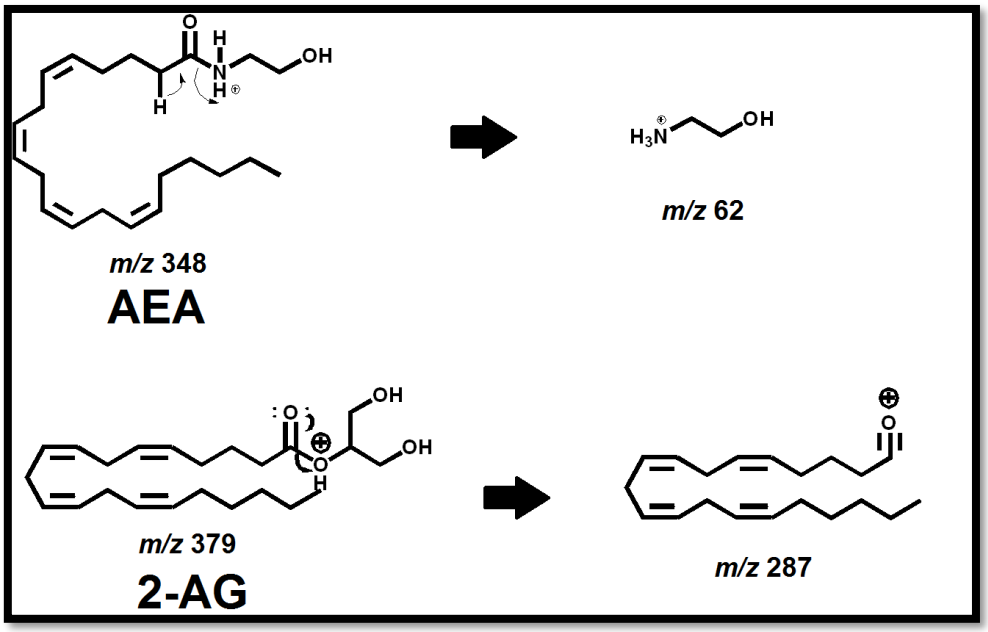
Foram selecionados dois íons-produto no modo MRM Daughter Scan, um para análise quantitativa e outro para análise qualitativa. As duas transições específicas foram determinadas de maneira automática (Tabela 3). Para a coleta de dados foi utilizado o sistema *MassLynx* 4.1 e para processamentos dos dados e quantificação o software *QuanLynx*.

Tabela 3. Transições MS/MS (MRM), voltagem do cone e energia de colisão avaliada para os endocanabinóides

Analito	Precurssor	Íon Produto	Cone (V)	Energia de Colisão
AEA	348	62 / 91	14	18 / 50
2-AG	379	287 / 91	24	14 / 44
AEA d_4	352	66 / 48	26	18 / 34
2-AG d_5	385	91 / 287	28	52 / 16

A AEA apresenta como pico base o de razão massa carga (m/z) 62 que corresponde à protonação da etanolamina após a clivagem da molécula de AEA. Para o 2-AG, o íon de quantificação é o de m/z 287, que é relacionado com a protonação do grupo araquidonoil, conforme representado na Figura 5 (QI et al., 2015).

Figura 5. Fragmentação das moléculas de AEA e 2-AG



Fonte: próprio autor

1.IV.2 Avaliação das condições UHPLC no modo *column switching*

Em razão da baixa solubilidade dos analitos em água, esse solvente foi utilizado com sucesso como fase móvel (FM) para a sorção dos analitos na coluna 1D. A água, também, é o solvente de escolha para a pré-concentração de analitos quando se utiliza a cromatografia reversa, pois evita alargamento de pico quando se acopla as colunas (CAMPÍNS-FALCÓ; HERRÁEZ-HERNÁNDEZ; SEVILLANO-CABEZA, 1993).

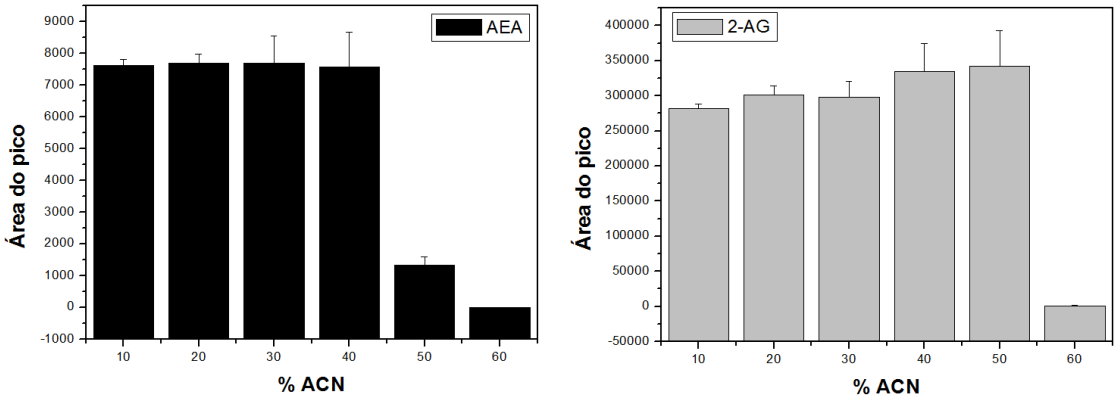
Dentre as vazões de FM avaliadas, a vazão de 0,5 mL min^{-1} foi a que apresentou sorção mais eficiente dos analitos. Essa vazão foi estabelecida para que os endocanabinóides apresentassem tempo hábil para interagirem com a fase estacionária. Ademais, a vazão elevada pode gerar a não reprodutibilidade dos picos (KATAOKA; SAITO, 2012). A dessorção dos analitos da coluna RAM só ocorreu com a adição de acetonitrila na fase móvel, o que era esperado devido a solubilidade dos analitos.

A segunda etapa avaliada foi a lavagem da coluna 1D. No método *column switching*, essa etapa é imprescindível e visa eliminar ao máximo os interferentes endógenos da matriz biológica. Normalmente, o solvente utilizado apresenta menor força do que o requerido para eluir o analito, assim eliminaria apenas os interferentes (KATAOKA; SAITO, 2012).

O plasma humano é um material biológico complexo do ponto de vista químico, apresentando componentes de diversas polaridades, inclusive interferentes com características físico-químicas semelhantes aos endocanabinóides (BROWN, 1984). Dessa forma, para excluí-los, foi necessário utilizar um solvente com polaridade média, no caso, a escolha foi pela acetonitrila.

Em razão da solubilidade dos analitos em acetonitrila, foi avaliado a concentração máxima deste solvente que poderia ser utilizada sem que afetasse a pré-concentração da AEA e do 2-AG. Como apresentado na Figura 6, com 50% de acetonitrila houve uma diminuição na sorção de AEA e com 60% houve perda significativa para o 2-AG. A fase móvel água: acetonitrila (60:40 v/v) foi selecionada para os ensaios subsequentes. Para as amostras de LCR, uma fase móvel composta por água: acetonitrila (90:10 v/v) foi suficiente para a adequada exclusão de macromoléculas.

Figura 6. Influência da porcentagem de ACN na limpeza da coluna 1D



Fonte: próprio autor

A exclusão das proteínas também foi confirmada através do detector DAD (λ = 280 nm). O pico referente as proteínas saem com aproximadamente 3 min, ou seja, após a adição de 40% de acetonitrila. Esse pico é excluído totalmente com cerca de 5 min, portanto, a etapa de limpeza estendeu-se por 5 min.

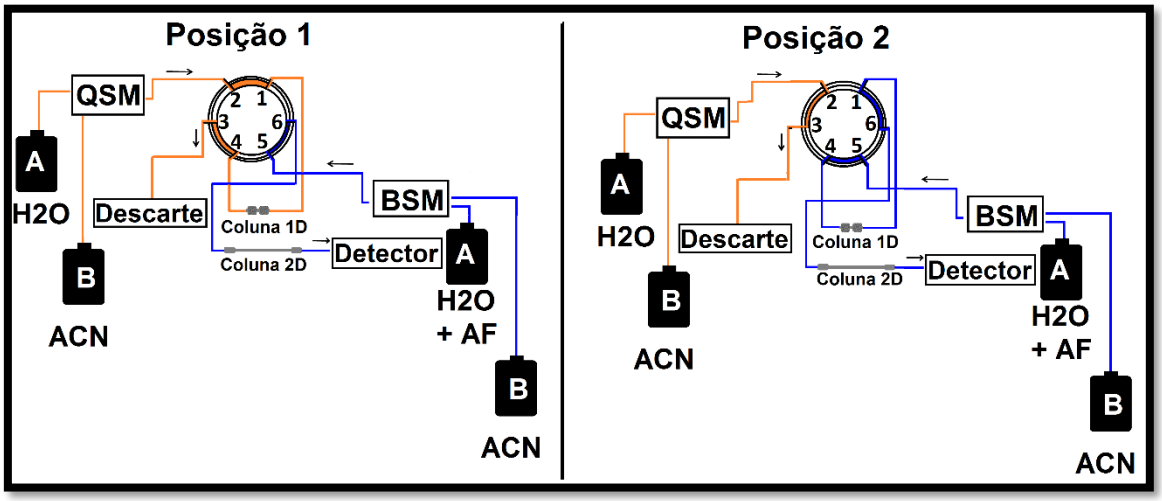
Foram testadas duas configurações: reversa e direta. No modo reverso, foi observado que os analitos são eluídos no tempo de 9,40 min e o pico gerado é mais estreito e mais simétrico (número de pratos teóricos = 1701). Já quando se analisa o modo direto, os analitos são eluídos com maior tempo de retenção (aproximadamente 9,9 minutos) e o pico é mais largo (número de pratos teóricos

= 662), mostrando maior dispersão dos endocanabinóides. Assim sendo, o modo reverso foi selecionado para os ensaios subsequentes.

O resultado observado está de acordo com o que era esperado: os analitos apresentam caráter apolar, a coluna RAM-C8 RP-8 ADS, por sua vez, é mais apolar do que a água, logo, o analito apresenta maior afinidade com a fase estacionária, ficando retido logo no início. Portanto, se o fluxo é invertido o analito é eluído em menor tempo de retenção e com menor dispersão (CAMPÍNS-FALCÓ; HERRÁEZ-HERNÁNDEZ; SEVILLANO-CABEZA, 1993). Além disso, o fluxo reverso também remove os interferentes fortemente ligados à fase estacionária (1D), após a eluição da fração de interesse (CAMPÍNS-FALCÓ; HERRÁEZ-HERNÁNDEZ; SEVILLANO-CABEZA, 1993; KATAOKA; SAITO, 2012).

A configuração final do sistema foi estabelecida nas seguintes condições: a coluna 1D foi conectada nos canais 1 e 4 do injetor, a bomba quaternária (QSM) no canal 2, a bomba binária (BSM) no canal 5 e a entrada da coluna analítica no canal 6. A bomba quaternária foi conectada à coluna 1D e a bomba binária à coluna analítica (2D) (Figura 7)

Figura 7. Configuração final do sistema UHPLC-MS/MS no modo *column switching* para análise de endocanabinóides em amostras de plasma e LCR



Fonte: próprio autor

Quando a válvula está na Posição 1, as duas colunas são condicionadas com a composição inicial das fases móveis. Em seguida, a amostra é injetada e a fase móvel, composta por água (solvente fraco) é percolada pelo capilar 1D

com vazão de 0,5 mL min^{-1}, para a sorção dos analitos. Em seguida, ocorre a remoção de macromoléculas da matriz biológica. Quando a válvula do injetor muda para a Posição 2, ocorre a eluição dos endocanabinóides da coluna 1D e os analitos são transportados para a coluna analítica, com a fase móvel. Em seguida, a válvula do injetor retorna à Posição 1. Nesta etapa ocorre a separação cromatográfica e detecção dos analitos (coluna 2D), ao mesmo tempo ocorre a limpeza da coluna 1D. As proporções das fases móveis, bem como o tempo de viragem da válvula estão descritos na Tabela 4 (plasma) e Tabela 5 (LCR).

Tabela 4. Condições da análise LC-MS/MS no modo *column switching* para amostras de plasma

	Bomba Binária (BSM)			**Bomba Quaternária (QSM)**				
	A = Água + 0,5% ácido fórmico B = Acetonitrila			A = Água B = Acetonitrila				
Tempo (min)	Vazão	%A	%B	Vazão	%A	%B	Posição da válvula	Etapas
Inicial	0,400	30	70	0,500	100	0	1	Pré-concentração dos endocanabinóides e condicionamento da coluna analítica
2.00	0,400	30	70	0,500	60	40	1	Remoção dos interferentes
7.00	0,400	30	70	0,500	60	40	2	Eluição dos endocanabinóides (1D) para a coluna analítica (2D)
8.50	0,400	30	70	0,500	60	40	1	Separação cromatográfica (2D)
8.50 – 15.00	0,400	30	70	0,500	60-10	40-100	1	Limpeza coluna RAM (1D)
15.00 - 23.00	0,400	30	70	0,500	0-100	90-0	1	Reequilíbrio do sistema

Tabela 5. Condições da análise LC-MS/MS no modo *column switching* para amostras de LCR

	Bomba Binária (BSM)			**Bomba Quaternária (QSM)**				
	A = Água + 0,5% ácido fórmico B = Acetonitrila			A = Água B = Acetonitrila				
Tempo (min)	Vazão	%A	%B	Vazão	%A	%B	Posição da válvula	Etapas
Inicial	0,400	30	70	0,500	100	0	1	Pré-concentração dos endocanabinóides e condicionamento da coluna analítica
2.00	0,400	30	70	0,500	90	10	1	Remoção dos interferentes
4.00	0,400	30	70	0,500	90	10	2	Eluição dos endocanabinóides (1D) para a coluna analítica (2D)
4.50	0,400	30	70	0,500	90	10	1	Separação cromatográfica (2D)
4.50 – 15.00	0,400	30	70	0,500	90-0	10-100	1	Limpeza coluna RAM (1D)
15.00 - 17.00	0,400	30	70	0,500	0-100	100-0	1	Reequilíbrio do sistema

Na configuração final, o tempo de retenção dos analitos em plasma foi: 9,40 min para AEA; 10,05 para o 2-AG; 9,40 para AEA d_4 e 10,05 para 2-AG d_5. No LCR, os tempos de retenção foram menores devido ao tempo da viragem da válvula (5,39 min para AEA e 6,01 para 2-AG).

1.IV.3 Pré-preparo das amostras biológicas

Devido à solubilidade dos analitos (CENTONZE et al., 2007; JARHO et al., 1996), a adição de acetonitrila em solução aquosa para a reconstituição do extrato seco, após a precipitação das proteínas do plasma, como esperado, aumentou (de até 66% para AEA e de 80% para 2-AG em relação às soluções aquosas).

Após avaliar as concentrações de 5, 10, 15 e 20% de acetonitrila, foi estabelecido que com 10% do solvente houve a maior recuperação dos endocanabinóides, não sendo observada diferença significativa com adição de maiores volumes.

1.IV.4 Volume da amostra diluída injetada no sistema UHPLC-MS/MS no modo *column switching*

Com o aumento do volume da amostra diluída injetada no sistema UHPLC-MS/SM no modo *column swithcing*, foi observado um aumento linear na área do pico de AEA. Já para 2-AG, a partir de 70 µL, houve pouca variação na área dos picos. O volume final definido foi de 100 µL, pois foi detectada adequada área dos analitos para a determinação de endocanabinóides nas amostras de plasma.

Já o volume de LCR foi definido em 200 µL. As amostras de LCR, apesar de apresentarem maiores concentrações de endocanabinóides, quando comparadas às concentrações plasmáticas, necessitam de injeção de maior volume, pois não passam por tratamento prévio, não ocorrendo prévia pré-concentração dos analitos.

1.IV.5 Validação Analítica do método UHPLC-MS/MS no modo *column switching*

Os parâmetros de validação analítica do método UHPLC-MS/MS no modo *column switching* para a determinação de AEA e 2-AG em amostras de plasma estão demonstrados na Tabela 6.

O método UHPLC-MS/MS, no modo *column switching* para amostras de plasma, apresentou linearidade na faixa de concentração de 0,100 (LIQ) a 6,00 ng mL^{-1} para AEA e 0,04 (LIQ) a 10,00 ng mL^{-1} para 2-AG. Já para as amostras de LCR, a faixa linear foi de 0,45 (LIQ) a 9,00 ng mL^{-1} para AEA e 1,40 (LIQ) a 180 ng mL^{-1} para o 2-AG. O teste de falta de ajuste mostrou não ser significativo ao nível de 5% ($p < 0,05$), indicando que os modelos estão bem ajustados.

Para as amostras de plasma, os valores de exatidão variaram entre -9,5 e -0,6% para AEA e entre -1,9 a 14,2% para 2-AG, excluindo o LIQ. A precisão apresentou valores de CV que variaram de 0,1 a 8,0% para AEA e 1,5 a 5,77% para 2-AG, excluindo o LIQ. Para as amostras de LCR, os valores de exatidão variaram entre -11,4 a 5,0% para AEA e -4,6 a 0,5% para 2-AG. Quanto aos valores de precisão, o CV ficou entre 0,7 a 6,2% para AEA e 1,3 a 11,1% para 2-AG.

Tabela 6. Parâmetros de validação analítica para o método UHPLC-MS/MS no modo *column switching* para amostra de plasma

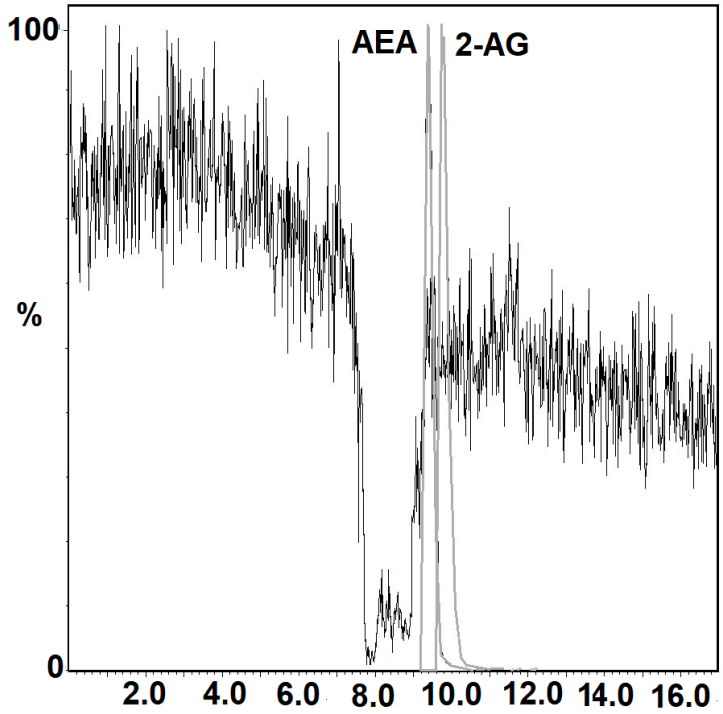
Analito	Linearidade			Conc. (ng mL^{-1})	Exatidão (EPR)		Precisão (CV)		Efeito Matriz (CV)
	Equação da reta	R	*Lack-of-Fit*		Intra	Inter	Intra	Inter	
AEA	y = 0,6935 x – 0,0005	0,9978	0,9944	0,1 (LIQ)	-17,3	-15,0	20,0	19,9	
				0,3 (CQB)	-9,5	-8,5	8,0	7,1	5,9
				3,0 (CQM)	-1,7	-0,6	2,8	7,4	
				4,8 (CQA)	-3,7	-1,2	0,1	4,3	5,4
				6,0 (LSQ)	-7,0	-2,9	1,2	4,8	
2-AG	y = 2,1346 x + 1,0027	0,9978	0,1123	0,04 (LIQ)	17,2	16,4	20,0	13,9	
				0,12 (CQB)	10,6	14,2	1,5	5,77	9,4
				5,0 (CQM)	2,2	0,9	1,5	3,1	
				8,0 (CQA)	2,3	11	3,2	3,4	14
				10,0 (LSQ)	-1,9	-0,9	1,7	2,8	

Sendo: R= Coeficiente de correlação; *Lack-of-fit* = valor *p* para o nível de significância de 0,05; CV = coeficiente de variação; EPR = erro padrão relativo.

O efeito residual apresentou valores de 11,1% para AEA e 6,6% para o 2-AG em amostras de plasma. Nas amostras de LCR, os valores foram ainda inferiores: 3,1% para AEA e 5,4% para 2-AG. Esses dados comprovam a ausência de efeito residual.

O efeito matriz calculado pelo CV dos FMNs ficou dentro dos parâmetros estabelecidos pela ANVISA, ou seja, não foi superior a 15%. A ausência do efeito matriz também foi confirmada pela infusão pós-coluna (Figura 8). No cromatograma, é possível observar que até 7,5 min não há interferência nenhuma no sinal dos analitos. Entretanto, com a comutação da válvula e alteração da fase móvel, há uma supressão iônica. Esse mesmo perfil é observado, quando a infusão pós-coluna é realizada com acetonitrila. Na Figura 8, fica evidente, entretanto, que a supressão iônica ocorre entre 7,5 – 9 minutos, aproximadamente, não afetando os sinais dos analitos, uma vez que o tempo de retenção é de 9,40 min (AEA) e 10,05 min (2 AG).

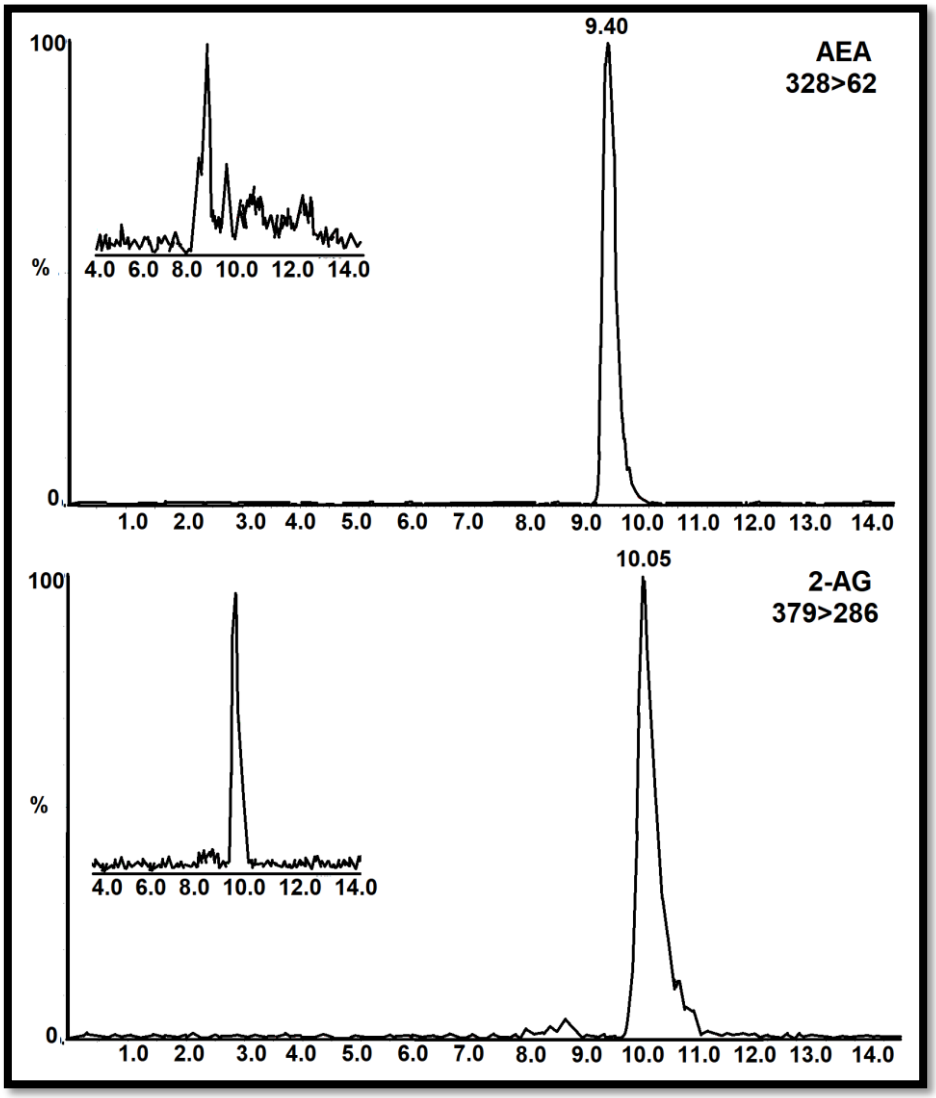
Figura 8. Cromatograma da infusão pós-coluna da AEA e 2-AG para o método UHPLC-MS/MS no modo *column switching*



Fonte: próprio autor

A seletividade do método foi comprovada através do cromatograma da amostra de plasma branco e do plasma enriquecido com AEA e 2-AG, processadas nas condições de extração determinadas previamente. Não foram observados interferentes no tempo de retenção dos padrões interno. Entretanto, na Figura 9, é possível observar que no tempo de retenção dos analitos há um pico de menor intensidade no cromatograma do branco, esses picos são referentes às concentrações endógenas dos analitos.

Figura 9. Cromatograma das amostras de plasma enriquecida com AEA e 2-AG no LIQ e de plasma branco (superior) empregando o método UHPLC-MS/MS no modo *column switching*



Fonte: próprio autor

A estabilidade, após três ciclos de congelamento/descongelamento, mostrou não alterar as concentrações de AEA e 2-AG nos dois níveis de concentração estudados (valores CV de 6,9% para AEA e 10,3% para 2-AG). Considerando a estabilidade a curto prazo, as concentrações dos endocanabinóides em cada nível também foram estáveis durante 6 h em uma solução de água/ acetonitrila 90:10 (v / v), após pré-preparo das amostras. O estudo de estabilidade a longo prazo não demonstrou degradação significativa de AEA e 2-AG em amostras de plasma durante o armazenamento a longo prazo, por 6 meses, a -80 ° C (11,2% para AEA e 1,39% para 2-AG). Estudos prévios de estabilidades obtiveram resultados semelhantes (OTTRIA et al., 2014;

SCHREIBER et al., 2007; SERGI et al., 2013b). No entanto, na literatura, não há nenhum estudo de estabilidade de armazenamento a longo prazo.

1.IV.6 Comparação método clássico (extração Líquido-Líquido) *versus* método UHPLC-MS/MS no modo *column switching* para a determinação de AEA e 2-AG em amostras de LCR

O método inovador UHPLC-MS/MS no modo *column switching* foi comparado com o convencional LLE-UHPLC-MS/MS. O método LLE-UHPLC-MS/MS apresentou linearidade de 0,50 a 50 ng mL^{-1} para AEA e 0,05 a 50 ng mL^{-1} para 2-AG. A precisão apresentou CV entre 0,45 a 7,0% para AEA e de 0,6 a 11,5% para 2-AG. A exatidão apresentou valores de EPR de -5,7 a 2,1% para AEA e de -9,0 a 19,8% para 2-AG. O efeito residual foi inferior a 3% e efeito de matriz inferior a 12%. Na Tabela 7, estão demonstrados os dados de validação dos dois métodos: LLE e *column switching*.

Para comparar os métodos LLE-UHPLC-MS/MS e UHPLC-MS/MS no modo *column switching* foram analisadas 15 amostras de LCR (branco), enriquecidos com AEA e 2-AG em concentração de 0,5 a 50,0 ng mL^{-1} para AEA e 1,5 a 50,0 ng mL^{-1} para 2-AG. Não foram observadas diferenças significativas para as concentrações de AEA e 2-AG em amostras de LCR (n = 15) analisadas pelos diferentes método (desvio padrão das concentrações calculadas pelas respectivas curvas analíticas foi de 1,6% para AEA e 3,4% para 2-AG).

A análise de regressão dos métodos para cada analito mostrou uma resposta linear com valores de coeficiente de correlação de 0,9969 para AEA e 0,9723 para 2-AG (Figura 10a e 10b). O resultado mostra que a correlação entre os dois métodos é melhor para AEA, porém, para ambos os analitos, o coeficiente de correlação foi maior que 0,900, mostrando que os dois resultados foram estatisticamente semelhantes.

A análise de *Bland-Altmann* mostrou uma variação percentual dentro do limite pré-definido de 20% (Figura 10c e 10d). O método UHPLC-MS/MS no modo *column switching*, quando comparado ao LLE-UHPLC-MS/MS, apresentou as seguintes vantagens: (1) menor volume de amostra biológica, (2) menor tempo de análise, (3) hifenação da etapa do preparo de amostra com a análise

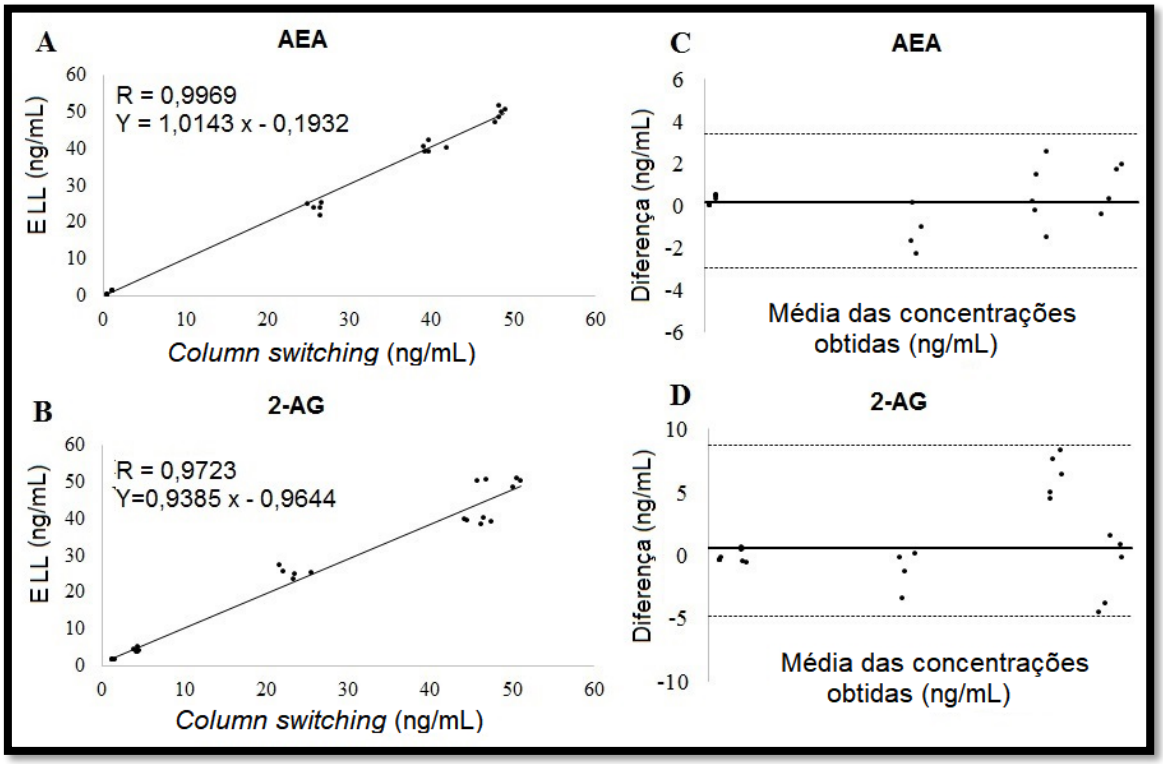
cromatográfica, (4) automação da análise, minimizando tanto as fontes de erros como a conversão de 2-AG / 1AG e (5) menor consumo de solvente orgânico.

Tabela 7. Validação analítica do método UHPLC-MS/MS no modo *column switching* e método de LLE-UHPLC-MS/MS para amostras de LCR

Parâmetros	AEA		2-AG	
	UHPLC-MS/MS *column switching*	LLE-UHPLC-MS/MS	UHPLC-MS/MS *column switching*	LLE-UHPLC-MS/MS
Equação Linear	y = 0,1491x + 0,0277	y = 0,1487x + 0,9702	y = 0,0161x + 0,0057	y = 4,3926x + 1,0126
R	0,9979	0,9983	0,9987	0,9993
Lack-of-fit	0,056	0,084	0,229	0,188
Exatidão Intra-ensaio				
LIQ (Conc.)	3,9 (0,45 ng mL^{-1})	0,1 (0,50 ng mL^{-1})	-1,7 (1,4 ng mL^{-1})	19,8 (0,05 ng mL^{-1})
CQB (Conc.)	-10,4 (1,35 ng mL^{-1})	0,3 (1,50 ng mL^{-1})	-4,6 (4,2 ng mL^{-1})	-1,5 (0,15 ng mL^{-1})
CQM (Conc.)	2,5 (5,00 ng mL^{-1})	-3,7 (25 ng mL^{-1})	0,4 (90 ng mL^{-1})	1,3 (25 ng mL^{-1})
CQA (Conc.)	-0,35 (7,20 ng mL^{-1})	1,03 (40 ng mL^{-1})	-0,2 (144 ng mL^{-1})	-1,3 (40 ng mL^{-1})
LSQ (Conc.)	-1,9 (9,0 ng mL^{-1})	-0,3 (50 ng mL^{-1})	-1,5 (180 ng mL^{-1})	0,3 (50 ng mL^{-1})
Exatidão Inter-ensaio				
LIQ (Conc.)	5,0 (0,45 ng mL^{-1})	-0,13 (0,5 ng mL^{-1})	-0,2 (1,4 ng mL^{-1})	14,6 (0,05 ng mL^{-1})
CQB (Conc.)	- 11,4(1,35 ng mL^{-1})	-0,03 (1,5 ng mL^{-1})	-1,9 (4,2 ng mL^{-1})	-9,0 (0,15 ng mL^{-1})
CQM (Conc.)	1,7 (5,00 ng mL^{-1})	-5,7 (25 ng mL^{-1})	0,5 (90 ng mL^{-1})	-1,4 (25 ng mL^{-1})
CQA (Conc.)	0,3 (7,20 ng mL^{-1})	0,26 (40 ng mL^{-1})	-0,3 (144 ng mL^{-1})	-1,2 (40 ng mL^{-1})
LSQ (Conc.)	2,3 (9,00 ng mL^{-1})	2,1 (50 ng mL^{-1})	-1,5 (180 ng mL^{-1})	0,8 (50 ng mL^{-1})
Precisão Intra-ensaio				
LIQ (Conc.)	5,0 (0,45 ng mL^{-1})	4,5 (0,50 ng mL^{-1})	9,8 (1,4 ng mL^{-1})	10,1 (0,05 ng mL^{-1})
CQB (Conc.)	6,2 (1,35 ng mL^{-1})	1,0 (1,5 ng mL^{-1})	6,0 (4,2 ng mL^{-1})	11,5 (0,15 ng mL^{-1})
CQM (Conc.)	2,9 (5,00 ng mL^{-1})	5,9 (25 ng mL^{-1})	2,6 (90 ng mL^{-1})	5,2 (25 ng mL^{-1})
CQA (Conc.)	3,2 (7,20 ng mL^{-1})	2,9 (40 ng mL^{-1})	3,0 (144 ng mL^{-1})	1,6 (40 ng mL^{-1})
LSQ (Conc.)	0,9 (9,00 ng mL^{-1})	3,7 (50 ng mL^{-1})	1,3 (180 ng mL^{-1})	1,8 (50 ng mL^{-1})
Precisão Inter-ensaio				
LIQ (Conc.)	5,4 (0,45 ng mL^{-1})	2,0 (0,50 ng mL^{-1})	11,1 (1,4 ng mL^{-1})	11,1 (0,05 ng mL^{-1})
CQB (Conc.)	3,1 (1,35 ng mL^{-1})	0,45 (1,5 ng mL^{-1})	2,7 (4,2 ng mL^{-1})	2,0 (0,15 ng mL^{-1})
CQM (Conc.)	3,0 (5,00 ng mL^{-1})	7,0 (25 ng mL^{-1})	3,9 (90 ng mL^{-1})	4,0 (25 ng mL^{-1})
CQA (Conc.)	3,5 (7,20 ng mL^{-1})	1,4 (40 ng mL^{-1})	3,9 (144 ng mL^{-1})	0,8 (40 ng mL^{-1})
LSQ (Conc.)	0,7 (9,00 ng mL^{-1})	1,7 (50 ng mL^{-1})	1,6 (180 ng mL^{-1})	0,6 (50 ng mL^{-1})

Sendo: R= Coeficiente de correlação; *Lack-of-fit* = valor *p* para o nível de significância de 0,05; LIQ = limite de quantificação; CQB = controle de qualidade baixo; CQM = controle de qualidade médio; CQA = controle de qualidade alto; LSQ = limite superior de quantificação.

Figura 10. Comparação do método LLE-UHPLC-MS/MS e UHPLC-MS/MS no modo *column switching* (n = 15) para a determinação de AEA e 2-AG em amostras de LCR



Fonte: próprio autor

1.IV.7 Comparação com métodos descritos na literatura

O método desenvolvido neste trabalho, utilizando UHPLC-MS/MS no modo *column switching*, foi comparado com artigos publicados na literatura que determinaram AEA e 2-AG em fluidos biológicos (Tabela 8).

A maioria dos métodos referidos fazem uso de processos de extração morosos, como a LLE e a SPE. Já a técnica empregada neste trabalho, *column switching*, permitiu o acoplamento da técnica de preparo da amostra e sistema cromatográfico, minimizando as fontes de erros, o volume da amostra biológica, o consumo de solvente orgânico e tempo de análise.

As concentrações plasmáticas correspondentes aos limites de quantificação do método UHPLC-MS/MS são menores que as descritas na literatura que empregam técnicas convencionais de preparo de amostra (Tabela 8). Para o 2-AG, o LIQ determinado chega a ser até 72 vezes inferior que o menor valor descrito na literatura (SERGI et al., 2013b). Já para a AEA, o valor se iguala ao obtido por Gachet et al. (2015).

Tabela 8. Comparação de métodos analíticos para quantificação de AEA e 2-AG

Analito	Volume Amostra Inicial / plasma(µL)	LIQ (ng/mL)	Extração	Condições cromatográficas	Sistema de Detecção	Referência
AEA, 2-AG	500	500	LLE e SPE	FE = Kinetex C18 FM = 0,2% ácido acético em água + 0,1% ácido fórmico e acetonitrila (Eluição em gradiente)	LC-MS/MS	(GARST et al., 2016)
AEA, 2-AG e outros	500	0,1 para AEA e 3,2 para 2-AG	SPE	FE = C18 FM = metanol com 2 mM de acetato de amônio + água com 2 mM de acetato de amônio e 0,1% ácido fórmico (Eluição em gradiente)	LC-MS/MS (íon precursor 62 para AEA e 379 para 2-AG)	(GACHET et al., 2015)
AEA, 2-AG	50	0,325 para AEA e 11 para 2-AG	LLE	FE = C18 FM = 0,1% ácido fórmico em água + acetonitrila (40:60, v/v) (Eluição isocrática)	LC-MS/MS (íon precursor 62,2 para AEA e 287,1 para 2-AG)	(GONG et al., 2015)
AEA, 2-AG e outros	-	0,300 para AEA e 5,00 para 2-AG	LLE	FE = C18 FM = água com 0,2% de ácido fórmico + acetonitrila com 2-propanol contendo 0,2% de ácido fórmico (40:60, v/v) (Eluição em gradiente)	LC-MS/MS (íon precursor 61,6 para AEA e 287,6 para 2-AG)	(IVANOV; BORCHERT ; HINZ, 2015)
AEA, 2-AG	1000	0,29 para AEA e 2,9 para 2-AG	µ-SPE	FE = C18 FM = água + 2,5 mM ácido fórmico em metanol (Eluição em gradiente)	LC – MS/MS (íon precursor 62,2 para AEA e 287.2 para 2-AG)	(SERGI et al., 2013b)
AEA, 2-AG	250	0,100 para AEA e 0,04 para 2-AG	*Column switching*	FE = C18 FM = água com 0,5% de ácido fórmico + acetonitrila (30:70, v/v) (Eluição isocrática)	UHPLC MS/MS *column switching* (íon precursor 62 para AEA e 287 para 2-AG)	Presente trabalho

Sendo: 2-AG = 2-arachidonoylglycerol; AEA = anandamida; µ-SPE = micro extração em fase sólida; LC-MS/MS = cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em *tandem*; SPE = extração em fase sólida; LLE = extração líquido-líquido; UHPLC = cromatografia líquida de ultra eficiência; LIQ = limite de quantificação; FE = fase estacionária; FM = fase móvel.

Quanto ao método de separação cromatográfica e de detecção, é constatado que são semelhantes aos reportados pelos demais autores. Nota-se, ainda, que os fragmentos de quantificação selecionados na espectroscopia de massas são idênticos ao utilizado nos demais trabalhos. Assemelha-se, também, à fase estacionária utilizada, a C18, que é a mais adequada para esta análise, uma vez que é lipofílica (ZOERNER et al., 2011).

A fase móvel utilizada varia um pouco entre os trabalhos reportados na literatura, no entanto, observa-se que todos utilizaram o ácido fórmico para favorecer a ionização dos compostos, facilitando a detecção MS/MS. Outro fator

constante é referente à polaridade da fase móvel. Os métodos mantêm uma maior porcentagem de fase orgânica, o que contribui para eluição dos endocanabinóides.

Quanto ao modo de eluição, apesar de a maioria dos autores optarem pela eluição por gradiente, no método padronizado foi utilizado o modo isocrático. Esse modo foi adequado para a determinação dos dois endocanabinóides e aumentou o tempo de vida útil da coluna analítica (ZOERNER et al., 2011).

1.IV.8 Amostras de plasma de pacientes DP analisadas

Para avaliar o sistema endocanabinóide de pacientes com DP, as concentrações de AEA e 2-AG foram determinadas em amostras de plasma e LCR do grupo controle (voluntários saudáveis) e de pacientes com DP. Para o estudo foram analisadas 50 amostras de plasma de pacientes DP e 20 amostras de plasma de voluntários saudáveis. Já para as amostras de LCR, 46 amostras de pacientes DP e 20 amostras do grupo controle. As faixas das concentrações de AEA e 2-AG determinadas em amostras de plasma e LCR, médias e correlação (razão entre as concentrações determinadas em amostras de plasma e LCR) são ilustradas na Tabela 9.

Tabela 9. Faixas das concentrações, médias e correlações das concentrações de AEA e 2-AG em amostras biológicas

Doença	Analitos	Plasma[c]		LCR[d]		Correlações LCR / Plasma
		Faixas das Concentrações (ng mL^{-1})	Médias (ng mL^{-1})	Faixas das Concentrações (ng mL^{-1})	Médias (ng mL^{-1})	
Parkinson[a]	AEA	0,097 – 0,415	0,256	0,594 – 1,044	0,819	3,199
	2-AG	0,048 – 0,610	0,329	0,126 – 0,628	0,377	1,146
Controle[b]	AEA	0,119 – 0,345	0,232	0,524 – 0,822	0,673	2,901
	2-AG	0,290 – 0,654	0,472	0,271 – 0,645	0,458	0,970

[a]Amostras (n= 50 - plasma / n= 46 - LCR); [b]Amostras (n= 20 - plasma e LCR); [c]método utilizado UHPLC-MS/MS no modo *column switching*; [d]método utilizado LLE-UHPLC-MS/MS. Todas as amostras foram processadas em triplicata.

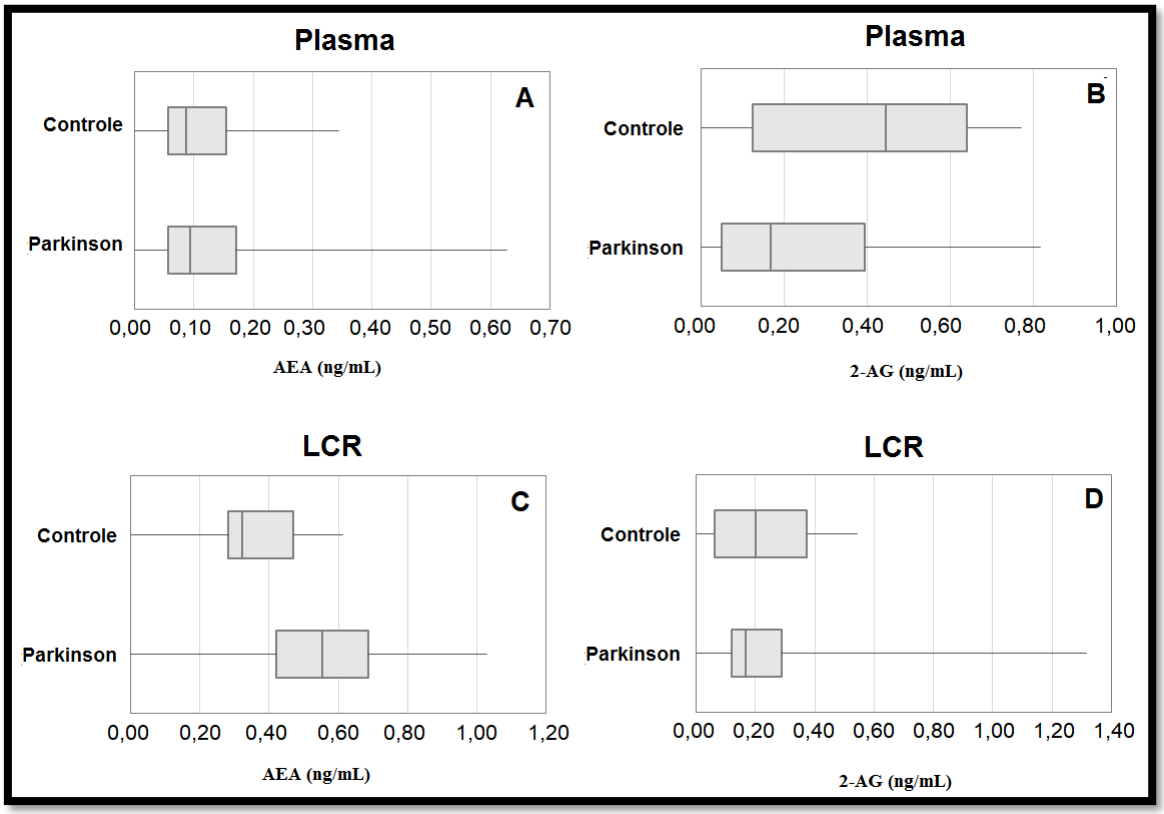
Para tratamento estatístico das concentrações determinadas, foi utilizado o programador *Python* 3.6.4 (Bibliotecas: matplotlb, pandas, scypy), *Jupyter*

Notebook, e o método estatístico Teste U de *Mann-Whitney*, devido às características da amostragem.

Ao comparar as concentrações plasmáticas determinadas nas amostras de pacientes com DP com às do grupo controle, observamos que para a AEA há um aumento na concentração plasmática média (de 0,232 ng mL^{-1} no grupo controle para 0,256 ng mL^{-1} no DP). Realizando a análise estatística, concluímos que essa diferença não é estatisticamente significante, considerando $p < 0,05$ ($p = 0,758$). Já para o 2-AG, nas amostras de plasma, há uma queda na concentração quando relacionado com o grupo controle (de 0,472 ng mL^{-1} no controle para 0,329 ng mL^{-1} para DP). Essa diferença na concentração de 2-AG mostrou ser estatisticamente diferente ($p = 0,022$).

O comportamento para as amostras de LCR é semelhante: observamos aumento na concentração de AEA no grupo DP em comparação ao controle (0,819 ng mL^{-1} para Parkinson e 0,673 ng mL^{-1} para grupo controle). Já para o 2-AG, observamos diminuição nas concentrações médias (de 0,458 ng mL^{-1} no DP para 0,377 ng mL^{-1} no grupo controle). Para as amostras de LCR, as alterações de AEA e 2-AG mostraram ser estatisticamente significativa ($p = 0,007$ – AEA e $p = 0,044$ – 2-AG) (Figura 11).

Figura 11. Gráfico Box-Plot das concentrações AEA e 2-AG em amostras de plasma e LCR



Fonte: próprio autor

Os resultados apresentados estão em concordância aos da literatura. Uma pesquisa realizada com roedores, induzidos ao Parkinson, mostrou aumento de AEA em diversas regiões do tecido cerebral, variando de 0,15 – 0,60 nmol g^{-1} nos animais induzidos ao *Parkinson* e 0,12 – 0,20 nmol g^{-1} no grupo controle (DI MARZO, 2000).

Outro estudo realizado em 2010 também confirmou o aumento de AEA em pacientes DP sem tratamento com fármacos dopaminérgicos. Nesse estudo, foi determinada as concentrações de AEA em amostras de LCR de 34 pacientes com DP e de 14 voluntários sadios. As faixas de concentrações encontradas foram : 6 - 17 pmol mL^{-1} para os pacientes DP e de 2 - 9 pmol mL^{-1} para o grupo controle (PISANI et al., 2010).

Quanto às concentrações de 2-AG, na literatura não há relatos de estudo deste analito em amostras biológicas de pacientes portadores da DP. Em um estudo realizado em cérebro de roedores, foi observado um ligeiro aumento nos níveis de 2-AG, de 1,0 – 2,3 nmol g^{-1} nos animais induzidos à DP para 1,5 – 5,0 nmol g^{-1} no controle (DI MARZO, 2000). Outro estudo mais recente, mostrou uma

diminuição do nível de 2-AG quando a PD foi induzida em camundongos (MOUNSEY et al., 2015). Nosso trabalho é pioneiro no estudo das correlações entre as concentrações de 2-AG em amostras biológicas (LCR e plasma) e a DP.

As variações nas concentrações plasmáticas de AEA e 2-AG em amostras biológicas de pacientes com DP confirmam as alterações do sistema endocanabinóide.

O sistema dopaminérgico regula a síntese de AEA. A estimulação de receptores D2 provoca um aumento na síntese de endocanabinóides. No caso da DP, a diminuição de dopamina nos neurônios estriáticos, do *globus pallidus*, ocasionada pela fisiopatologia da doença, provoca uma ação indireta (D2) levando ao aumento da síntese de AEA (GIUFFRIDA; MARTINEZ, 2017).

Adicionalmente, o sistema endocanabinóide é responsável pela ativação retrógrada dos neurônios pré-sinapticos, ou seja, a AEA e o 2-AG são produzidos nos neurônios pós-sinápticos e agem nos neurônios pré-sinápticos. Ao interagir com esses neurônios, promoveriam uma modulação negativa no sistema dopaminérgico, inibindo a liberação de dopamina. Quando em homeostase, essa interação sistema endocanabinóide – dopaminérgico não apresenta malefícios. No entanto, em portadores de Parkinson essa inibição seria exacerbada, levando a uma diminuição significativa de dopamina uma vez que há um aumento de AEA. Acredita-se, ainda, que a AEA apresente maior influência na fisiopatologia do Parkinson, uma vez que apresenta maior afinidade pelo receptor CB1 (GIUFFRIDA; MARTINEZ, 2017; OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008).

Nesse trabalho também foi avaliado a correlação entre as concentrações de AEA e 2-AG em amostras de plasma e LCR. Segundo os resultados da Tabela 9, observamos que as concentrações médias de AEA em amostras de LCR são cerca de 3 vezes maiores que as determinadas em amostras de plasma, tanto para o grupo controle, quanto para pacientes com DP. Demonstrando, assim, correlação entre as diferentes amostras biológicas. Para o analito 2-AG, a correlação LCR-plasma entre os grupos controle e Parkinson variou de 0,970 a 1,100, aproximadamente.

Portanto, as amostras de plasma poderiam substituir as amostras de LCR nos estudos de avaliação do sistema endocanabinóide.

1.V Conclusão

O método multidimensional UHPLC-MS/MS no modo *column switching* com a coluna RAM-C8 RP8-ADS, na primeira dimensão, permitiu a hifenação da etapa do preparo da amostra biológica (pré-concentração dos endocanabinóides e exclusão da maioria das macromoléculas) com o sistema cromatográfico, minimizando o volume de amostra biológica, o consumo de solvente orgânico, o tempo da análise e as fontes de erros, como a conversão de 2-AG / 1AG.

A seletividade tanto da coluna RAM-C8 RP8-ADS, quanto do sistema MS/MS favoreceu a detectabilidade, gerando baixos limites de quantificação. Segundo os parâmetros de validação analítica avaliados, o método, tanto para amostras de plasma, quanto para amostras de LCR, é adequado para a determinação de AEA e 2-AG.

O método inovador desenvolvido UHPLC-MS/MS no modo *column switching,* comparado ao consolidado LLE-UHPLC-MS/MS, não apresentou variações quantitativas estaticamente diferentes nas determinações de amostras de LCR enriquecidas com AEA e 2-AG em diferentes concentrações, demonstrando assim a equivalência entre os diferentes métodos.

Os métodos desenvolvidos, para amostras de plasma e LCR, foram adequadamente aplicados para análise de 70 amostras de plasma e 66 amostras de LCR, mostrando a aplicabilidade do método.

A comparação das concentrações plasmáticas e em LCR de AEA e 2-AG de pacientes com a DP com as determinadas para o grupo controle mostrou um aumento nas concentrações de AEA nas amostras dos portadores da DP, já para o 2-AG apresentou uma queda das concentrações. Foi possível concluir também que as amostras de plasmas podem ser utilizadas em substituição as amostras de LCR para avaliação do sistema endocanabinóide.

CAPÍTULO 2

Polímero molecularmente impresso como sorvente para *in-tube* SPME acoplada à UHPLC-MS/MS para a determinação de canabinóides em amostras de plasma de pacientes parkinsonianos

CAPÍTULO 2

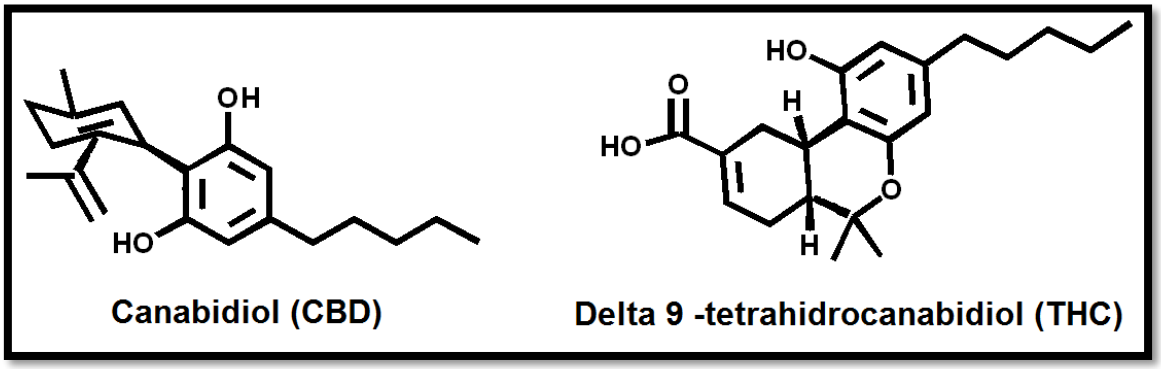
2.I Introdução

2.I.1 Canabinóides

Os derivados da *Cannabis* vêm sendo utilizados na medicina desde 2700 a.C. pelos chineses. Acreditava-se que essas substâncias eram capazes de curar diversas enfermidades, tais como gota, reumatismo, malária, constipação e até distúrbios menstruais. No início do século XX, esses derivados passaram a serem utilizados no tratamento de transtornos mentais, como sedativo e hipnótico. No entanto, em razão do advento de novos fármacos e dos efeitos adversos dos derivados da *Cannabis*, eles caíram em desuso (CRIPPA; ZUARDI; HALLAK, 2010).

Em 1960, os principais componentes da *Cannabis sativa* foram elucidados. Dentre eles, o Δ9–Tetraidrocanabinol (Δ9-THC), que é uma substância psicoativa e o canabidiol (CBD), que apresenta efeito ansiolítico, não psicoativo (DEVINSKY et al., 2014) (Figura 12). A partir da elucidação da estrutura dessas substâncias, elas passaram a ser utilizadas em diversas patologias, inclusive na DP.

Figura 12. Estrutura química CBD e Δ9-THC



Fonte: próprio autor

Os canabinóides têm sido avaliados em modelos *in vitro* e *in vivo* induzidos ao parkinsionismo. Estudos mostraram indícios que a utilização do CBD em modelos de rato induzidos a DP gera efeito neuroprotetor na degeneração de

neurônios dopaminérgicos nigrostriatais. Provavelmente, esse efeito irreversível é gerado pelas propriedades antioxidantes do CBD (GARCÍA-ARENCIBIA et al., 2007; LASTRES-BECKER et al., 2005).

Com base nos efeitos promissores observados nos modelos *in vivo* e *in vitro, o*s canabinóides têm sido avaliados em pacientes portadores da DP que apresentam sintomas psicóticos. Eles representam um terço dos pacientes parkinsonianos. O tratamento destes sintomas psicóticos com antipsicóticos atípicos pode levar a piora do quadro motor e causar efeitos adversos inaceitáveis (ZUARDI et al., 2009).

Zuardi et al. (2009) foram um dos pioneiros que avaliaram o efeito do CBD em seis pacientes portadores da DP com sintomas psicóticos. Esses pacientes receberam diferentes doses de CBD, sendo a dose inicial de 150 mg/dia, concomitantemente com os tratamentos usuais. Após um mês, os pacientes apresentaram melhora significativa nos sintomas psicóticos e não foram observados efeitos adversos (ZUARDI et al., 2009).

Em 2014, Chagas et al. demonstraram que o uso do CBD controlou sintomas associados ao transtorno do sono em quatro pacientes com DP (CHAGAS et al., 2014a).

No referido ano, os mesmos autores avaliaram o uso do CBD em vinte e um pacientes com DP, que não apresentavam demências ou sintomas psicóticos. Não foram observadas diferenças significativas entre os pacientes que receberam placebo e CBD, mas melhorias significativas foram observadas no bem-estar dos pacientes. Esse estudo concluiu que uma amostragem maior é necessária para inferências mais exatas sobre a utilização do CBD na DP (CHAGAS et al., 2014b).

Quanto ao mecanismo de ação do CBD, alguns estudos em roedores mostraram que o CBD apresenta efeito antioxidante. A substância levou a um aumento da regulação dos níveis da enzima Cu / Zn superóxido dismutase, enzima chave na defesa endógena contra estresse oxidativo. Essa propriedade antioxidante do CBD pode proporcionar a neuroproteção contra a progressiva degeneração dos neurônios dopaminérgicos, que ocorre na DP (MECHOULAM; PARKER; GALLILY, 2002; PERES et al., 2018; SAGREDO et al., 2007; SCHRÖDER et al., 2017).

Estudos de farmacocinética descrevem que o CBD administrado por via oral apresenta pico plasmático 3 h após a administração (JUNIOR, 2013). A distribuição se dá através da ligação com as proteínas plasmáticas, sendo carregado para tecidos adiposos e para cérebro. O CBD é metabolizado no fígado pelas enzimas do citrocromo P450 e é excretado em maior quantidade nas fezes (DEVINSKY et al., 2014).

O Δ9-THC, para o tratamento de efeitos psicóticos, deve ser utilizado com atenção, pois alguns autores acreditam que esta substância apresenta efeito contrário ao CBD. Assim, a utilização isolada desse composto não é indicada, pois apresenta inúmeros fatores negativos, como: efeitos psicotrópicos; possibilidade de exacerbar os sintomas; desenvolvimento de dependência; e efeitos desiguais em diferentes indivíduos (CRIPPA; ZUARDI; HALLAK, 2010).

Em estudo realizado em amostras de cabelo de usuários da *Cannabis*, foi observado que, em amostras de cabelo contendo CBD e Δ9-THC, os usuários apresentaram menor propensão para o desenvolvimento de efeitos psicóticos do que quando detectado apenas Δ9-THC nas amostras (MORGAN; CURRAN, 2008). Relatos da literatura descrevem que alta razão entre CBD: Δ9-THC apresenta menor propensão ao aparecimento de efeitos psicóticos, assim, a razão entre as essas substâncias deve ser monitorada (DEVINSKY et al., 2014).

Nesse contexto, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação das concentrações plasmáticas de CBD e Δ9-THC em pacientes com DP em terapia com CBD para fins de monitorização terapêutica.

2.I.2 Métodos analíticos para a determinação de canabinóides em amostras biológicas

Os canabinóides têm sido determinados em diversas matrizes biológicas, tais como sangue, plasma, mecônio, cabelo, urina e saliva (Tabela 10). A maioria dos métodos desenvolvidos tem como objetivo a detecção do uso de drogas ilícitas.

A etapa de preparo de amostra é bastante crítica, pois precisa ser reprodutível, eficiente, seletiva e eliminar a maior parte dos interferentes. Normalmente, as metodologias descritas inicialmente promovem a remoção das

proteínas através da precipitação com acetonitrila gelada, ácido fórmico em metanol ou de forma enzimática (CITTI et al., 2018a).

Após essa etapa, é realizado o processo de extração, usualmente com a LLE e SPE. Os solventes mais utilizados incluem metanol, hexano, acetato de etila e etanol. Já as fases estacionárias utilizadas no processo SPE incluem C18 e polímeros disponíveis comercialmente.

Visando diminuir o tempo de análise, o consumo de solvente orgânico e o volume de amostra biológica, algumas técnicas alternativas têm sido propostas, como a microextração em solvente empacotado (MEPS) e extração dinâmica em fase sólida utilizando *headspace* (HS-SPDE) (Tabela 10).

Quanto ao sistema de detecção, os dois métodos mais empregados são a GC e LC acoplados à MS ou MS/MS. A GC apresenta como desvantagem o fato da amostra necessitar de prévio aquecimento antes da separação cromatográficas, o que ocasiona a descarboxilação dos canabinoides. Uma alternativa seria o processo de derivatização, que é demorado e a reação não apresenta 100% de rendimento. Alguns autores têm ainda sugerido a cromatografia em fase gasosa acoplada em duas dimensões (2D-GC), que promove uma melhor separação cromatográfica dos analitos (CITTI et al., 2018a).

A LC tem sido a técnica de separação cromatográfica mais utilizada nos últimos anos para determinação dos canabinóides (Tabela 10). Essa metodologia permite a introdução das amostras após processo de extração, sem necessitar, na maioria das vezes, de derivatização ou volatilização da amostra. As colunas analíticas de escolha têm sido a C18 e fases com interação hidrofóbica (HILIC) (CITTI et al., 2018a).

Tabela 10. Técnicas analíticas para a determinação de canabinóides em amostras biológicas

Analitos	Amostra	Descrição do Método			LIQ	Referências
		Extração	Condições cromatográficas	Sistema de Detecção		
CBD, Δ9-THC e CBN	Cabelo humano (10 mg)	HS-SPDE	FE: sílica FM: hélio	GC–MS	0,09 -0,14 ng mL^{-1}	(MUSSHOFF et al., 2003)

Tabela 10 continua...

Continuação da Tabela 10...

Analitos	Amostra	Descrição do Método			LIQ	Referências
		Extração	Condições cromatográficas	Sistema de Detecção		
Δ9-THC, 11-OH-THC e THCCOOH	Plasma humano (1,0 mL)	SPE	FE: HP-5MS FM: hélio	GC–MS	0,50 - 1,0 ng mL^{-1}	(GUSTAFSON et al., 2003)
Δ9-THC e CBD	Sangue (1,2 g) e cérebro de rato (0,5 g); urina humana (2 mL)	SPMEM	FE: C18 FM: metanol / água (85:15)	LC–MS	-	(YANG; XIE, 2006)
CBD, Δ 9-THC, CBN, 11-OH-THC e THCCOOH	Plasma (1,0 mL) e urina humana (2,5 mL)	SPE e LLE	FE: C12 FM: 10 mM formato de amônio + 90% acetonitrila com 10% 10 mM formato de amônio (Eluição em gradiente)	LC–MS/MS	0,2 ng mL^{-1} (urina) 1 - 3 ng mL^{-1} (plasma)	(GRAUWILER; SCHOLER; DREWE, 2007)
CBD, Δ9-THC e CBN	Cabelo humano (10 mg)	HS-SPDE	FE: VF-5ms FM: hélio	GC–MS/MS	0,012 - 0,062 ng mg^{-1}	(EMÍDIO; DE MENEZES PRATA; DÓREA, 2010)
CBD, Δ9-THC, CBN, 11-OH-THC e THCCOOH	Fluído oral (0,25 mL)	SPE	FE: ZB-50 e DB-1 FM: micro fluído	2D-GCMS	0,5 - 7,5 pg mL^{-1}	(MILMAN et al., 2010)
Δ9-THC, 11-OH-THC, THCCOOH e CBD	Plasma humano (1,0 mL)	SPE	FE: ZB-50 e DB-1 FM: micro fluído	2D-GCMS	0,125 - 0,25 ng mL^{-1}	(KARSCHNER et al., 2010)
CBD e Δ9-THC	Plasma humano (0,5 mL)	LLE	FE: HP-SMS FM: hélio	GC/MS	2,5 ng mL^{-1}	(P.S. CAMARGO et al., 2011)
CBD, Δ 9-THC, CBN, 11-OH-THC e THCCOOH	Sangue *post-mortem* (1 mL)	LLE	FE: DB-17 e sílica FM: hélio	2D-GCMS	0,25 - 0,50 ng mL^{-1}	(ANDREWS; PATERSON, 2012)
Δ9-THC, 11-OH-THC, THCCOOH, CBN e CBD	Sangue, plasma ou soro (50 µL)	Pecipitação de proteína e derivatização	FE = C18 FM: agua: acetonitrila ambos com 0,2% de ácido fórmico (Eluição por gradiente)	LC-MS/MS	0,25 – 0,80 ng mL^{-1}	(LACROIX; SAUSSEREAU, 2012)

Tabela 10 continua...

Continuação da Tabela 10...

Analitos	Amostra	Descrição do Método			LIQ	Referências
		Extração	Condições cromatográficas	Sistema de Detecção		
Δ9-THC, 11-OH-THC, THCCCOOH, CBD, CBN	Urina humana (0,5 mL)	LLE	FE = Ultra Biphenil FM = acetato de amônio 10 mM (pH 6,15) / 15% de metanol em acetonitrila (Eluição por gradiente)	LC-MS/MS	0,5 – 5 ng mL^{-1}	(SCHEIDWEILER; DESROSIERS; HUESTIS, 2012)
Δ9-THC e outros sintéticos	Fluído oral (0,5 mL)	SPE	FE = Sunfire IS column FM = ácido fórmico 0,1% + acetonitrila (Eluição por gradiente)	LC-MS/MS	1 ng mL^{-1}	(DE CASTRO et al., 2013)
Δ9-THC, THCCOOH, CBD e CBN	Fluído oral (0,25 mL)	SPE	FE: Hypersil Gold FM: 10 mM acetato de amônio + 15% metanol em acetonitrila (Eluição em gradiente)	Microflow-HPLC-MS	0,015 - 0,5 ng mL^{-1}	(CONCHEIRO et al., 2013)
CBD, Δ9-THC, CBN, 11-OH-THC e THCCOOH	Fluído oral (125 µL)	MEPS	FE: Kinetex C18-XB FM: metanol com 1,25 mM de acetato de amônio + água com 1,25 mM de acetato de amônio (Eluição em gradiente)	LC–MS/MS	0,020 - 0,30 ng mL^{-1}	(SERGI et al., 2013a)
CBD, Δ9-THC, CBN, 11-OH-THC e THCCOOH	Urina humana (90 µL)	µ-SPE	FE: Kinetex C18-XB FM: metanol com 1,25 mM de acetato de amônio + água com 1,25 mM de acetato de amônio (Eluição em gradiente)	LC–MS/MS	6,0 - 10,0 ng mL^{-1}	(MONTESANO et al., 2014)
CBD, CBN e Δ9-THC	Fluído oral (100 µL)	SPME	FE = Kinetex C18 FM = Formiato de amônio 5mM com 0,05% de ácido fórmico: metanol/acetonitrila (Eluição em gradiente)	UHPLC-MS/MS e GC-MS	2 ng mL^{-1}	(ANZILLOTTI et al., 2014)
THCCCOOH e outros	Plasma humano	SPME em filme	FE = Kinetex pentafluorofenil coreshell FM = agua / acetonitrila / metanol todos com 0,1% de ácido fórmico (Eluição por gradiente)	LC-MS/MS	1 ng mL^{-1}	(REYES-GARCÉS; BOJKO; PAWLISZYN, 2014)

Tabela 10 continua...

Continuação da Tabela 10...

Analitos	Amostra	Descrição do Método			LIQ	Referências
		Extração	Condições cromatográficas	Sistema de Detecção		
Δ9-THC, CBD, CBN e 11-OH-THC	Cabelo	Hidrólise e LLE	FE = Atlantis T3 FM = 0,1% ácido fórmico em agua/ metanol (Eluição por gradeinte)	LC-MS/MS	50 pg mg^{-1}	(DULAURENT et al., 2014)
CBD e Δ9-THC	Plasma de rato (150 µL)	Precipitação de proteínas e LLE	FE = C18 FM = acetonitrila / água	HPLC-UV	10 ng mL^{-1}	(ZGAIR et al., 2015)
CBD, CBN, 11-OH-THC e outros	Saliva humana	SPME em filme	FE = Kinetex pentafluorofenil coreshell FM = água / acetonitrila ambos com 0,1% de ácido fórmico (Eluição por gradiente)	LC-MS	0,004 – 0,98 ng mL^{-1}	(BESSONNEAU et al., 2015)
Δ9-THC, CBD, CBN e outros	Urina humana (0,5 mL)	LLE	FE = Acquity UHPLC BEH Phenyl FM = 0,1% ácido fórmico em água/ acetonitrila (Eluição por gradiente)	LC-MS/MS	0,1 – 1 ng mL^{-1}	(DONG et al., 2016)
Δ9-THC, CBD, 11-OH-THC e THCCOOH	Plasma humano (200 µL)	Precipitação de proteínas	FE = C18 FM = água com 0,1% de ácido fórmico / metanol com 0,1% de ácido fórmico	UHPLC-MS/MS	1,56 ng mL^{-1}	(JAMWAL et al., 2017)
Δ9-THC, CBN, CBD e metabólitos	Mecônio (0,250 g)	SPE	FE = C18 FM = água com 0,1% de ácido fórmico / acetonitrila	LC-MS/MS	1 - 2 ng g^{-1}	(PREGO-MELEIRO et al., 2017)
CBD, Δ9-THC e metabólitos	Sangue de rato (200 µL)	SPE	FE: C18 FM: acetato de amônio 2 mM / acetonitrila	LC-MS/MS	0,5 – 5 ng mL^{-1}	(PALAZZOLI et al., 2018)
Δ9-THC, CBD, OH-THC, THC-COOH e outros	Leite materno e bovino (0,5 mL)	Precipitação de proteínas	FE = Purospher Star RP-18 FM = acetonitrila: água 20 mM ácido fórmico/ formiato de amônio (pH 3,8) (0 – 100%) (Eluição por gradiente)	LC-MS/MS	1 – 10 ng mL^{-1}	(LÓPEZ-GARCÍA et al., 2018)
Δ9-THC, CBD, CBN, THCCOOH e 11-OH-THC	Cabelo (50 mg)	SLE	FE = DB5-MS FM = hélio	GC-MS/MS	0,1 – 4,7 pg mg^{-1}	(ANGELI et al., 2018)

Tabela 10 continua...

Continuação da Tabela 10...

Analitos	Amostra	Descrição do Método			LIQ	Referências
		Extração	Condições cromatográficas	Sistema de Detecção		
Δ9-THC, CBD e metabólitos	Sangue de rato (200 µL)	LLE	FE = Kinetex EVO C18 FM = acetate de amônio 2mM/ acetonitrila (Eluição por gradiente)	LC-MS/MS	0,5 – 5 ng mL^{-1}	(PALAZZOLI et al., 2018)
Δ9-THC, CBD, 11-OH-THC e THCCOOH	Cerebro de rato	SLE	FE = Kinetex EVO C18 FM = acetate de amônio 2mM/ acetonitrila (Eluição por gradiente)	LC-MS/MS	0,5 – 1 ng g^{-1}	(CITTI et al., 2018b)

Sendo: LIQ = limite de quantificação; CBD = canabidiol; Δ9-THC = Δ9-Tetraidrocanabinol; CBN = canabinol; HS-SPDE = extração dinâmica em fase sólida utilizando headspace; FE = fase estacionária; FM = fase móvel; GC-MS = cromatrografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas; 11-OH-THC = 11-hidroxi- tetraidrocanabinol; THCCOOH = 11-nor-9-carboxi-THC metabolito; SPE = extração em fase sólida; SPMEM = micro extração em fase sólida com membrana; LC-MS = cromatografia a líquido acoplada à espectrometria de massas; LLE = extração líquido-líquido; LC-MS/MS = cromatografia a líquido acoplada à espectrometria de massas em *tandem*; 2D-GCMS = cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas em duas dimensões; MEPS = micro extração por solvente empacotado; µ-SPE = micro extração em fase sólida; SPME = micro extração em fase sólida; UHPLC-MS/MS = cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas em *tandem*; HPLC-UV = cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao ultravioleta; SLE = extração sólido-líquido; GC-MS/MS = cromatrografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas em *tandem*.

2.I.3 Microextração em fase sólida no capilar (*in-tube* SPME)

A técnica microextração no capilar acoplada diretamente à LC (*in-tube* SPME-LC) é uma das modalidades da LC no modo *column switching*. A *in-tube* SPME utiliza uma coluna capilar, geralmente um capilar de sílica fundida aberto com fino filme de fase líquida, como dispositivo de extração.

O processo de sorção da amostra na fase estacionária do capilar pode ser realizado de duas maneiras: (1) *flow-through*, no qual a amostra passa através do capilar continuamente em uma única direção; e (2) ciclos aspirar/dispensar, no qual a amostra é repetidamente aspirada e dispensada do capilar. Quando operado no modo *flow-through*, o sistema tem sido configurado com uma ou duas válvulas com múltiplos pórticos e uma ou mais bombas de alta pressão (FERNÁNDEZ-AMADO et al., 2016; KATAOKA; SAITO, 2012; MOLINER-MARTINEZ et al., 2015).

No modo ciclos aspirar e dispensar, o capilar é conectado entre a agulha do injetor automático e o loop do LC, ou no lugar do loop do LC junto à válvula

de seis pórticos. O volume da amostra, número de ciclos aspirar/dispensar, vazão da amostra são controlados pelo programa do injetor automático.

Em ambas os modos, a amostra biológica, após simples pré-tratamento, é percolada no capilar 1D para a pré-concentração (sorção) seletiva dos analitos e remoção de interferentes da amostra biológica. Em seguida, acopla-se (comutação) o capilar com a coluna analítica (2D), que estão conectadas à válvula de seis pórticos, para que os analitos sejam eluídos para a coluna (2D). Por fim, ocorre o desacoplamento do capilar da coluna, para que ocorra a separação cromatográfica na segunda coluna (2D) e simultânea regeneração do capilar (1D) (CAMPÍNS-FALCÓ; HERRÁEZ-HERNÁNDEZ; SEVILLANO-CABEZA, 1993; KATAOKA; SAITO, 2012).

A técnica *in-tube* SPME tem sido aplicada para análise de diversos analitos em diferentes amostras, incluindo material biológico e ambiental (Tabela 11). Os materiais que têm sido utilizados como capilares na primeira dimensão incluem imunosorventes, RAM-MIP, líquidos iônicos, materiais monolíticos, dentre outros.

Tabela 11. Aplicações do *in-tube* SPME na análise de diferentes substâncias

***In-tube* SPME**					
Analito	**Amostra**	**Capilar 1D**	**Coluna 2D**	**Sistema de detecção**	**Referência**
Interferon α_{2a}	Plasma humano	Imunosorvente (60 cm x 0,25 mm i.d.)	RP 18	LC-FD	(CHAVES; QUEIROZ, 2013)
Antidepressivos tricíclicos	Plasma humano	RAM-MIP-BSA (10 cm x 4,6 mm i.d.)	-	*In-tube* SPME-MS/MS	(SANTOS et al., 2017)
Estrogênio	Esgoto	Aerogel de sílica organicamente modificado (25 cm)	C18	HPLC-DAD	(BU et al., 2017)
Filtros ultravioleta	Água de rio e lago	Coluna capilar monolítica de líquido iônico com nanopartículas magnéticas (15 cm x 0,25 mm i.d.)	C18	HPLC-DAD	(MEI; HUANG, 2017)
Hidrocarbonetos policíclicos aromático	Cinza de solo e carvão	Líquido iônico (30 cm x 0,50 mm i.d.)	C18	HPLC-DAD	(FENG et al., 2017)
Triazinas	Água	Nano partículas de TEOS-MTEOS-SiO_2 (40 cm x 0,32 mm i.d.)	C18	Nano LC-DAD	(SERRA-MORA et al., 2017)
Estrogênio	Urina	Capilar monolítico (12,7 cm x 530 µm i.d)	C18	HPLC-UV	(LUO; LI; HU, 2017)
Micotoxinas	Grãos de arroz	Capilar monolítico (20 cm x 0,25 mm i.d.)	C18	HPLC-DAD	(WU et al., 2018)
Triazóis	Água de rio, lago e esgoto	Capilar monolítico (20 cm x 320 µm i.d.)	C18	HPLC-DAD	(PANG et al., 2018)
Endocanabinóides	Plasma humano	Líquido iônio polimérico (10 cm x 530 µm i.d.)	C18	UHPLC-MS/MS	(SOUZA; HANTAO; QUEIROZ, 2018)

Tabela 11 continua...

Continuação da Tabela 11...

Analito	Amostra	Capilar 1D	Coluna 2D	Sistema de detecção	Referência
Anti-inflamatório não esteroidais	Plasma humano e água	Capilar monolítico (10 cm x 0,02 mm i.d.)	C18	HPLC-UV	(WANG; LI; CHEN, 2018)
Glicoproteínas	Plasma de rato	Capilar monolítico (10 cm)	C8	HPLC-UV	(WANG; CHEN, 2018)
Hidrocarbonetos policíclicos aromático	Água de torneira e de chuva	Nanocompósitos de hidróxido bimetálico Co-Al (20 cm x 750 µm)	C18	HPLC-DAD	(WANG et al., 2018)

Sendo: HPLC-UV = cromatografia líquida de alta performance acoplada com detector de ultravioleta; RAM-MIP-BSA = material de acesso restrito- polímero molecularmente impresso-albumina sérica bovina; DAD = detector de arranjo de diodo; HPLC = cromatografia líquida de alta performance; UHPLC-MS/MS = cromatografia líquida de ultra performance acoplada a espectrometria de massas em *tandem*; LC-FD = cromatografia líquisa acoplada ao detector de fluorescência; *in-tube* SPME-MS/MS = micro extração em fase sólida no capilar diretamente acoplada ao espectrômetro de massas em *tandem*; HPLC-DAD = cromatografia líquida de alta performance acoplada com detector de arranjo de diodo.

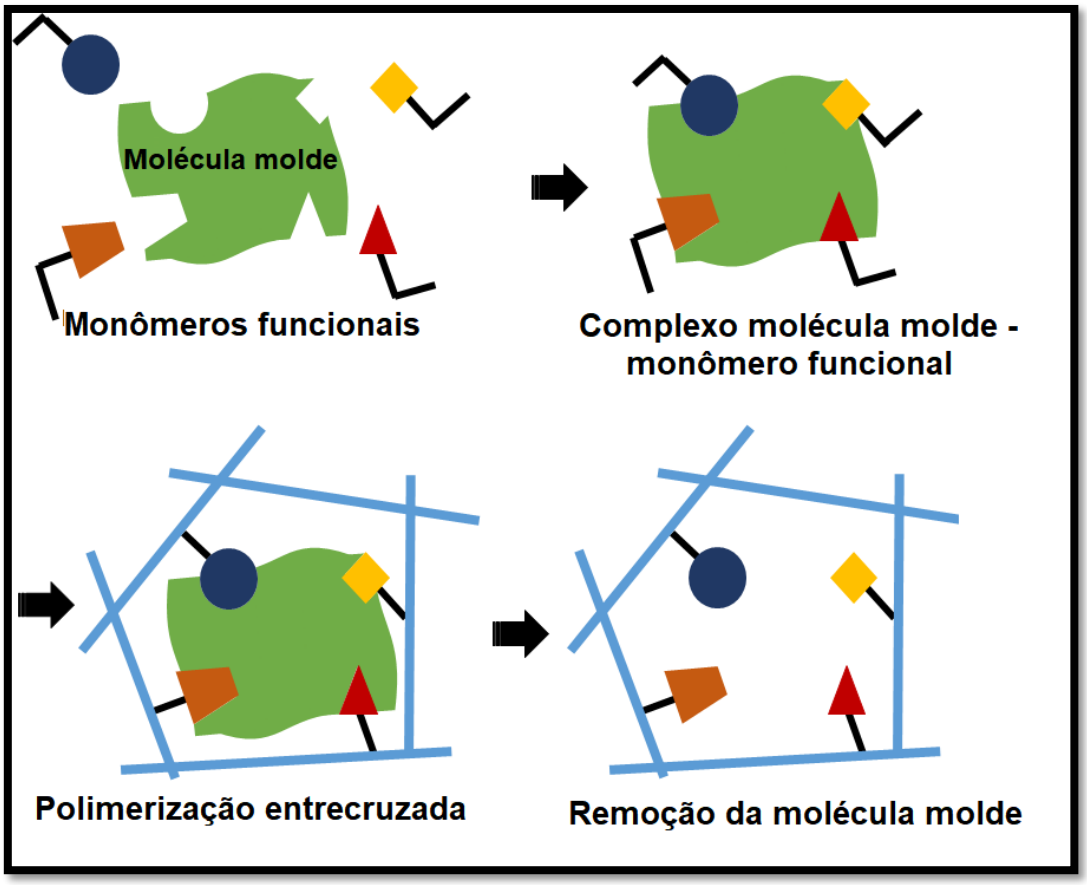
2.I.4 Polímeros Molecularmente Impressos (MIP)

O MIP é uma rede polimérica tridimensional com sítios de ligação específicos, que são obtidos pela copolimerização de monômeros funcionais e reticulantes na presença da molécula molde. São materiais sintéticos com propriedades de reconhecimento molecular, semelhante aos imunossorventes (MAYES; WHITCOMBE, 2005; YAN; ROW, 2006).

A síntese do MIP consiste em três etapas (Figura 13): (1) Formação de um complexo entre a molécula molde (analito ou molécula análoga) e o monômero funcional; (2) Polimerização entrecruzada em torno do complexo molde-monômero (3) Remoção da molécula molde das cavidades do polímero. Após a etapa de remoção da molécula molde, cavidades seletivas complementares ao molde em tamanho, forma e presença de grupos funcionais são estabelecidas garantindo a seletividade do material (MAYES; WHITCOMBE, 2005; TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005; YAN; ROW, 2006).

O reconhecimento da molécula impressa ou da molécula alvo é baseado em ligações covalentes ou não covalentes, como ligações iônicas, de hidrogênio ou de *Van der Waals*. A seleção cuidadosa de cada reagente de síntese pode aumentar significativamente a seletividade do MIP (SHAHAR; TAL; MANDLER, 2016).

Figura 13. Síntese do polímero molecularmente impresso (MIP)



Fonte: próprio autor

A síntese do MIP requer uma adequada seleção da molécula molde e do monômero funcional. A molécula molde deve conter em sua estrutura grupos funcionais capazes de interagir fortemente com os monômeros funcionais, a fim de formar um complexo estável. Além disso, a molécula molde não pode sofrer polimerização e deve ser estável nas condições de síntese (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005).

O monômero funcional deve ser escolhido tendo como base a natureza da molécula molde. Por exemplo, as moléculas molde que possuem grupos funcionais básicos interagem mais facilmente com monômeros que contenham grupos ácidos, e vice-versa. Os monômeros funcionais mais utilizados são ácido metacrílico (MMA) e 4-vinilpiridina. Normalmente os monômeros são utilizados em excesso (normalmente na proporção de 4:1) para favorecer a formação do complexo molécula molde – monômero funcional (SHAHAR; TAL; MANDLER, 2016; TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005).

O solvente de síntese também deve ser adequadamente escolhido, pois irá interferir diretamente na estabilidade de formação do complexo molécula molde – monômero funcional. O solvente também influencia diretamente nas características morfológicas do MIP. A função do solvente de síntese é solubilizar os reagentes de síntese, sem interferir nas ligações químicas. Além disso, o solvente de síntese também é responsável pela criação dos poros, por isso também são conhecidos como solventes porogênicos (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005).

Solventes apolares normalmente são os escolhidos por apresentar baixa constante dielétrica, como clorofórmio, diclorometano e tolueno. Alguns solventes com constantes dielétricas mais altas também podem ser utilizados com cautela, como é o caso da acetonitrila. Já os solventes próticos não são recomendados, pois competem no meio reacional na formação de interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio (SHAHAR; TAL; MANDLER, 2016; TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005).

Por fim, o agente de ligação cruzada e o iniciador radicalar (IR) devem ser selecionados. A escolha do agente de ligação cruzada ou agente reticulante (AR) influencia na morfologia da matriz polimérica e favorece a estabilidade mecânica. O agente de ligação cruzada é responsável por formar a estrutura tridimensional ao redor da molécula molde. O etilenoglicol dimetacrilato (EGDMA) tem sido o agente de ligação cruzada mais utilizado, pois favorece a formação de polímeros estáveis, do ponto de vista térmico e mecânico (SHAHAR; TAL; MANDLER, 2016; TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005).

O EGDMA atua como um monômero estrutural, uma vez que ele cria uma estrutura polimérica tridimensional que preserva os grupos do monômero funcional em uma posição fixa e complementar à molécula molde, garantindo rigidez e estabilidade aos sítios de ligação. Por isso, o EGDMA deve ser utilizado em excesso em relação a quantidade de monômero funcional, a fim de que a estabilidade mecânica do material seja garantida (SHAHAR; TAL; MANDLER, 2016; TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005).

O IR tem como função iniciar o processo de polimerização, por isso deve gerar radicais livres. O uso destes iniciadores deve ser associado com temperatura ou radiação UV. O 2,2`-azo-bis-isobutironitrila (AIBN) é o iniciador mais utilizado e a sua escolha se deve devido à natureza de interação do

monômero funcional – molécula molde (SHAHAR; TAL; MANDLER, 2016; TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005).

O controle da polimerização é basicamente ditado pela velocidade de formação dos radicais livres provenientes do IR, pelo ajuste de temperatura ou radiação UV e pela composição química dos compostos envolvidos. A estabilidade da temperatura é muito importante para se obter um polímero bem estruturado. Variações bruscas na temperatura podem acarretar a formação descontrolada de radicais, bem como interferir na quantidade de cavidades impressas, comprometendo o desempenho dos MIPs (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005).

Cabe ressaltar, também, a necessidade de conduzir a reação da formação do MIP na ausência de oxigênio por meio de purga de nitrogênio, argônio ou ainda empregando banho ultrassom. Pois, se presente, o oxigênio pode levar a uma diminuição de radicais que prejudicam a polimerização (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005).

Para a síntese do MIP, podem ser utilizadas diferentes estratégias, como: *in bulk*, por precipitação, sol-gel, polimerização *in situ*, dentre outras. A escolha da técnica de polimerização dependerá do tipo de aplicação pretendida do MIP nas diferentes áreas químicas. Cada um dos procedimentos de síntese envolve o controle de diferentes parâmetros durante a síntese e produz polímeros com propriedades diferentes.

A técnica de polimerização *in situ* é empregada para preparação dos MIPs monolíticos. Quando sintetizado desta maneira, o material apresentará boas propriedades hidrodinâmicas, poderá ser sintetizado diretamente no interior de coluna de aço inoxidável ou colunas capilares, sem a necessidade dos procedimentos de maceração, peneiração e empacotamento, além de menor quantidade de molécula molde no procedimento de síntese, devido à rentabilidade da técnica (LIU; ROW; YANG, 2005).

No processo de síntese do MIP monolítico, pode ser utilizada uma ampla gama de monômeros funcionais que geram uma estrutura integrada com porosidade maior do que partículas densamente compactadas em colunas. A alta porosidade leva a alta permeabilidade, e por consequência, baixa pressão (LIU; ROW; YANG, 2005).

O MIP monolítico é caracterizado por ser um único bloco que não contem espaços vazios entre as partículas. O material sintetizado apresenta grandes poros que permitem que a fase móvel flua adequadamente através do adsorvente. O mecanismo de transporte de massa predominante é a convecção, que é muito mais rápido que a difusão (LIU; ROW; YANG, 2005).

Devido as suas características, os MIPs vêm sendo utilizados como fase estacionária para o preparo tanto de cartuchos para a SPE quanto para micro colunas para HPLC no modo *column switching*. As vantagens desses materiais incluem: fácil preparo, baixo custo de síntese, seletividade, possibilidade de reutilização e resistência ao *stress* mecânico, a altas pressões, elevada temperatura, ácidos, bases e solventes orgânicos (LIU; ROW; YANG, 2005).

2.II Objetivos

Objetivo Geral

Sintetizar e avaliar MIP monolítico como sorvente para análises *in-tube* SPM/UHPLC-MS/MS para a determinação de canabinóides em amostras de plasma de pacientes com DP.

Objetivos Específicos

- Otimizar as condições UHPLC-MS/MS para a separação de CBD e Δ9-THC em fase reversa.

- Sintetizar e caracterizar fase estacionária MIP monolítico para pré-concentração de CBD e Δ9-THC.

- Avaliar a seletividade da fase MIP monolítica.

- Otimizar as variáveis para a análise de CBD e Δ9-THC por *in-tube* SPME/UHPLC-MS/MS.

- Validar do método *in-tube* SPME/UHPLC-MS/MS desenvolvido com base nas normas da ANVISA (RDC nº 27/2012 e RDC nº 166/2017).

- Aplicar o método desenvolvido para determinação de canabinóides, CBD e Δ9-THC, em amostras de plasma de pacientes em terapia com CBD.

2.III Materiais e Métodos

2.III.1 Reagentes e padrões analíticos

Os padrões analíticos de CBD, Δ9-THC, CBD d_3 e Δ9-THC d_3 foram adquiridos da BSPG (Kent, UK). Foram preparadas as soluções padrão estoques na concentração de 100 µg mL^{-1} para CBD e para Δ9-THC. As soluções estoques foram preparadas em metanol e armazenadas a - 20ºC em frascos âmbar. A partir destas soluções, foram preparadas as soluções diluídas em acetonitrila. A solução de padrão interno foi preparada com CBD d_3 e Δ9-THC d_3, na concentração de 500 ng mL^{-1}.

A acetonitrila, grau HPLC, formiato de amônio, acetato de amônio, diclorometano e o ácido fórmico foram adquiridos do fornecedor JT Baker (Phillipsburg, EUA). A água utilizada para preparar a fase móvel foi purificada em sistema Milli-Q (18MΩ) (Millipore, São Paulo, Brasil). Os reagentes de síntese do MIP: viniltrimetoxisilano (usado para silanizar o capilar), o EGDMA e MMA, foram obtidos da Sigma-Aldrich, St. Louis, USA. O AIBN foi fornecido pela Merck (São Paulo-BR). E os fármacos empregados no estudo de seletividade do MIP, foram adquiridos da Cerilliant Corporation (Texas, USA).

2.III.2 Avaliação das condições UHPLC-MS/MS

O sistema cromatográfico utilizado no desenvolvimento do método foi o Waters® UHPLC- MS/MS bidimensional (Waters Corporation, Milford, MA, USA). A separação cromatográfica dos analitos foi realizada por cromatografia em fase reversa, sendo testada a eluição no modo isocrático e gradiente. Foram testadas as seguintes fases móveis:

A) Água contendo 0,1% ácido fórmico: metanol;

B) Formiato de amônio 5 mM: metanol contendo 0,1% de ácido fórmico;

C) Água contendo 0,1% ácido fórmico: metanol contendo 0,1% de ácido fórmico;

D) Água contendo 0,1% de ácido fórmico: acetonitrila;

E) Água contendo 0,1% de ácido fórmico: acetonitrila contendo 0,1% de ácido fórmico;

F) Formiato de amônio 5 mM: acetonitrila contendo 0,1% de ácido fórmico.

A proporção das fases móveis também foi avaliada, variando de 40 a 0% da fase aquosa e de 60 a 100% da fase orgânica. As vazões testadas foram de 0,2 a 0,6 mL min^{-1}. A coluna analítica utilizada foi a Kinetex C18 (100 mm x 2,1 mm x 1,7 µm) (Phenomenex®, EUA), a 40º C. Para as determinações quantitativas UHPLC-MS/MS, foi utilizado a padronização interna, empregando o padrão isotópico (CBD d_3 e Δ9-THC d_3).

As análises MS/MS foram realizadas em sistema de espectrometria de massas em *tandem* - triplo quadrupolo Xevo® TQ-D (Waters, Milford, MA, USA). A ESI foi avaliada no modo positivo e negativo. As análises foram realizadas no modo MRM, em razão da alta seletividade e detectabilidade.

A detecção MS/MS foi avaliada através de infusão direta de soluções padrão dos analitos preparados na fase móvel (formiato de amônio: acetonitrila contendo 0,1% de ácido fórmico, 40:60, v/v). Os padrões foram preparados isoladamente na concentração de 1 µg mL^{-1}. Os fragmentos, a energia do cone e a energia de colisão foram determinados de maneira automática conforme programação do equipamento, sendo definidos três fragmentos: um de quantificação e os outros dois de confirmação. Os demais parâmetros, como voltagem do capilar, fluxo dos gases e temperatura de desolvatação, foram avaliados manualmente.

2.III.3 Síntese do Polímero Molecularmente Impresso (MIP)

A fase MIP foi sintetizada pela técnica de polimerização *in situ* em um capilar de sílica fundido aberto (0,530 mm d.i. x 30 cm de comprimento), de maneira que o capilar pudesse ser completamente preenchido pela fase. Como molécula molde foi proposto inicialmente a utilização da molécula de CBD, no entanto, esta molécula apresenta em sua estrutura dois sítios com ligações duplas capazes de sofrer polimerização. Assim, a molécula de CBD foi inicialmente reduzida, com o objetivo de remover as duplas ligações.

A redução do CBD foi realizada segundo metodologia previamente descrita por Ben-Shabat e colaboradores com algumas modificações (BEN-SHABAT et al., 2006). Nesse procedimento, o CBD (600 mg/ 1,9 mmol) foi completamente dissolvido em 30 mL de acetato de etila grau HPLC e transferido para um reator de alta pressão. Em seguida, foram adicionados aproximadamente 25 mg de Pd/C (10%) ao meio e sob agitação magnética, em atmosfera de H_2, a uma pressão de 500 psi e a temperatura ambiente, a mistura foi mantida em meio reacional por 5 horas.

A mistura foi filtrada à pressão reduzida em celite para a retirada do catalisador. Em seguida, o solvente foi removido em rotaevaporador, obtendo-se um óleo alaranjado. Para a obtenção do produto puro, o óleo foi submetido a fracionamento por cromatografia em coluna utilizando tubo de vidro de dimensões 1,8 cm x 70 cm, contendo sílica gel *flash* na proporção de 60 g/g de amostra, e eluição isocrática com hexano: éter de petróleo (9,75: 0,25, v/v). As frações coletadas foram agrupadas de acordo com seus perfis cromatográficos e concentradas em rotaevaporador, obtendo-se um óleo laranja (92% de rendimento).

Os espectros de RMN de ^{1}H e de ^{13}C tanto do CBD, como do CBD reduzido, foram registrados em espectrômetro Bruker DRX-400, operando em 400 MHz para ^{1}H e em 100 MHz para ^{13}C. Clorofórmio deuterado ($CDCl_3$, 99,9% de átomos de D) foi utilizado como solventes.

Para a síntese do MIP, o capilar foi inicialmente ativado com uma solução de HCl (0,2 mol L^{-1}, por 30 min), seguido de solução NaOH (1 mol L^{-1}, por 2 horas). Na sequência, o capilar foi lavado com água ultrapura e metanol, e por fim foi seco em estufa, a 160ºC, por 3 horas.

A segunda etapa de síntese consistiu na silanização da superfície interna do capilar. O capilar foi preenchido com viniltrimetoxisilano, vedado, e mantido em banho térmico, a 85ºC, por 2 horas. Posteriormente, o capilar foi abundantemente lavado com metanol puro (HO et al., 2014).

Na terceira etapa, foi realizada a síntese do MIP propriamente dito. O EGDMA foi utilizado como AR, o diclorometano como solvente porogênico, o MMA como monômero funcional e AIBN como IR.

Com base no MIP monolítico sintetizado por Liu e colaboradores (LIU et al., 2006), o processo de síntese propriamente dito ocorreu da seguinte maneira: a

molécula molde – CBD reduzido (CBD_R 0,114 g) foi dissolvida em diclorometano (0,9 mL), posteriormente foi adicionado o MMA (153 µL). Após agitação por 10 minutos, o EGDMA (114 µL), o solvente porogênico (CH_2CL_2, 0,6 mL) e o iniciador radicalar (AIBN, 80 µL) foram adicionados passo a passo. A mistura foi desoxigenada por corrente de nitrogênio, por 5 minutos, seguido de banho de ultrassom por 10 minutos. Por fim, o capilar de sílica foi preenchido, selado e mantido em banho térmico, a 60ºC, por 24 horas. Finalizada a síntese, o capilar foi lavado exaustivamente com acetonitrila para garantir a remoção dos resíduos e da molécula molde.

Foram avaliados diferentes procedimentos de síntese para obter o polímero com adequada taxa de extração dos canabinóides. Durante o procedimento de síntese foram avaliados: (1) solvente porogênico; (2) volume de solvente porogênico; (3) razão molar monômero funcional (MMA) e agente reticulante (EGDMA); (4) e razão molar template (CBD_R) e monômero funcional (MMA). A Tabela 12 resume os diferentes procedimentos avaliados para a síntese dos polímeros.

Tabela 12. Procedimentos de síntese avaliados para obtenção do MIP

Procedimento	MIP	CBD_R:MMA (mmol)	EGDMA:MMA (mmol)	Solvente	MMA (mmol)	EGDMA (mmol)
(1) solvente porogênico	MIP_1			ACN (1,5 mL)		
	MIP_2	1,5 : 1	3 : 1	Tolueno (1,5 mL)	2,0	6,0
	MIP_3			CH_2CL_2 (1,5 mL)		
(2) volume de solvente	MIP_4			CH_2CL_2 (4,5 mL)		
	MIP_5	1,5 : 1	3 : 1	CH_2CL_2 (2,1 mL)	2,0	6,0
	MIP_6			CH_2CL_2 (1,5 mL)		
(3) MMA: EGDMA	MIP_7		2:1		3,0	6,0
	MIP_8	1,5 : 1	1:1	CH_2CL_2 (1,5 mL)	6,0	6,0
	MIP_9		3:1		2,0	6,0
(4) CBD_R: MMA	NIP	-				
	MIP_{10}	3:1	3:1	CH_2CL_2 (1,5 mL)	2,0	6,0
	MIP_{11}	5:1				
	MIP_{12}	7:1				

O polímero não impresso (NIP), utilizado para avaliar a seletividade do MIP, foi sintetizado, segundo os procedimentos utilizados para a síntese do polímero impresso, com exceção da adição do CBD_R.

2.III.4 Caracterização morfológica dos polímeros sintetizados

A caracterização química foi realizada por microscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). O espectro de FTIR (ABB Bomem series MB 100) foi realizado de 400 a 4000 cm^{-1}, utilizando pastilhas de KBr, e coletando um ponto a cada 2 cm^{-1} e 32 varreduras.

A caracterização física do material polimérico foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As análises foram realizadas em Microscópio Eletrônico de Varredura (Zeiss EVO50, Cambrigde – UK) do Departamento de Química, FFCLRP, da Universidade de São Paulo. As medidas foram feitas sob tensão de 15.00 kV, magnitude 10.00 kX a 30.00 kX e resolução nominal de 1 µm. As análises foram realizadas utilizando pequenos pedaços dos capilares MIP e NIP.

Para complementar a caracterização física do material foi realizada a microscopia eletrônica de transmissão (MET). As análises foram realizadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão (Jeol JEM- 100 CXII equipado com câmera digital Hamamatsu ORCA-HR) do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, FMRP, da Universidade de São Paulo. As medidas foram feitas sob voltagem de aceleração de 100 kV, magnitude 10.00 kX a 100.00 kX e resolução nominal de 0.3 µm.

2.III.5 Desempenho analítico do MIP

A avaliação da seletividade do MIP pode ser realizada através de dois ensaios: (1) fator de impressão (IF) do MIP para a molécula molde (CBD) em relação ao NIP; e (2) capacidade seletiva do MIP (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005).

O IF é expresso pela razão das áreas dos picos cromatográficos dos analitos, após extrações com as fases MIP e NIP, realizadas sob as mesmas condições. Quanto maior o valor IF, maior será a seletividade do MIP

desenvolvido (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005). Para o teste foi avaliada a capacidade sortiva de uma solução padrão dos analitos na concentração de 500 ng mL^{-1}.

A seletividade do material foi avaliada através de análises de amostras de plasma branco enriquecidas com o CBD, Δ9-THC e outros 11 fármacos com estruturas diferentes dos analitos que possam estar presentes em amostras de plasma de pacientes com a DP. Os fármacos avaliados incluem antidepressivos, anticonvulsivantes e antipsicóticos, na concentração final de 500 ng mL^{-1}.

2.III.6 Capacidade de sorção

A capacidade de sorção (Q) é um fator importante para avaliar a afinidade de ligação do analito ao polímero. Para determinar a capacidade de sorção máxima ($Q_{máx}$) do MIP, foram preparadas soluções padrão dos canabinóides em diferentes concentrações, de 200 a 3000 ng mL^{-1}. As soluções foram injetadas no sistema *in-tube* SPME/UHPLC-MS/MS e a quantidade de analito adsorvida por volume de fase foi calculada (Equação 3). Ao final, o gráfico "Q *versus* concentração inicial dos analitos" foi construído e o valor de $Q_{máx}$ foi estimado (SOUZA; HANTAO; QUEIROZ, 2018).

$$Q = \frac{C \times V}{Cs} \qquad (3)$$

Onde:

Q = quantidade de analito adsorvido por volume de MIP (ng cm^{-3})

C = massa dos analitos determinada pela curva de calibração;

V = volume de solução padrão injetada (0,010 mL);

Cs = massa estimada de MIP (0,0176).

Os ensaios de capacidade de sorção foram baseados no procedimento convencional de adsorção (DE GISI et al., 2016).

2.III.7 Pré-preparo das amostras biológicas

Foi necessário um prévio preparo das amostras de plasma, objetivando reduzir a viscosidade da amostra biológica e a eliminação de proteínas que poderiam ligar irreversivelmente ao MIP. Em um eppendorf, foi adicionado o plasma (300 µL) e a acetonitrila (600 µL), mantendo a proporção de 2:1 (v/v). O sistema foi agitado em vortex, por aproximadamente 10 segundos, e, em seguida, foi centrifugado por 15 min, a 15ºC, a 9000 rpm. O sobrenadante (700 µL) foi seco em concentrador (Eppendorf, Brasil) sob vácuo. O extrato seco foi reconstituído em 50 µL de solução de acetato de amônio 5 mM e agitado em vortex por 1 minuto.

2.III.8 Avaliação dos parâmetros de extração por *in-tube* SPME

Para a avaliar as variáveis do processo de extração *in-tube* SPME foram realizados testes, em triplicata, utilizando amostras de plasma (branco) enriquecidas com CBD e Δ9-THC na concentração de 500 ng mL^{-1}.

O primeiro parâmetro avaliado foi a fase móvel utilizada para pré-concentração dos analitos. O capilar de MIP sintetizado (0,530 mm d.i x 5 cm) foi conectado na válvula de seis pórticos, no pórtico 2 e a outra extremidade foi ligada ao espectrômetro de massas. Foi avaliado como solvente de dessorção a água, acetonitrila e formiato de amônio 5 mM.

O processo de dessorção também foi verificado, a fim de obter maior recuperação dos analitos e menor efeito residual. Como solvente de dessorção foram testados formiato de amônio 5 mM, formiato de amônio 5mM + 0,1% ácido fórmico, água e uma proporção de formiato de amônio 5 mM: acetonitrila contendo 0,1% ácido fórmico (60:40, v/v). A vazão de sorção e dessorção também foram avaliadas, variando de 0,02 a 0,1 mL min^{-1}. Maiores vazões não foram testadas devido à pressão suportada pelo capilar.

Uma etapa importante da extração *in-tube* SPME é a exclusão dos interferentes presentes na matriz biológica. Após a sorção dos analitos, foi verificado o tempo de viragem da válvula de forma que ocorresse a adequada limpeza do capilar sem remoção dos analitos. O tempo verificado foi de 3, 4 e 5 min, sendo percolado 100% de acetonitrila.

A fim de comprovar a completa exclusão de interferentes, foi realizado o teste de exclusão de proteínas. O capilar MIP sintetizado foi acoplado no pórtico 2 da válvula de seis pórticos e ao detector DAD, sendo monitorado no λ= 280 nm.

A configuração do sistema *in-tube* SPME/UHPLC-MS/MS é um dos parâmetros importantes para se avaliar. Para este teste foi avaliada a posição reversa (eluição dos analitos no sentido inverso da sorção) e direta (pré-concentração e eluição dos analitos na mesma direção).

Objetivando melhorar a sensibilidade do método, a injeção de diferentes volumes de amostra (após pré-preparo) 5, 10, 20 e 30 µL foram avaliadas.

Ainda visando a obtenção de adequada sensibilidade do método e pequeno volume de amostra de plasma, diferentes volumes de plasma inicial foram avaliados (100, 200, 300 e 400 µL), mantendo a proporção de plasma: acetonitrila fixa.

O efeito do pH da solução utilizada na reconstituição do extrato seco (após precipitação de proteínas) também foi avaliado objetivando melhorar o processo de extração. O extrato seco, após precipitação das proteínas, foi reconstituído em 50 µL de solução de acetato de amônia 5mM em diferentes valores de pH: 3, 5, 7, 8, 9 e 11.

Por fim, o tamanho do capilar MIP utilizado foi avaliado. Foram testados capilares de 5 e 10 cm de comprimento. O capilar 1D foi conectado nos canais 1 e 4 do injetor, a QSM no canal 2, a BSM no canal 5 e a entrada da coluna analítica no canal 6. A bomba quaternária foi conectada ao capilar 1D e a bomba binária à coluna 2D (coluna analítica).

2.III.9 Validação Analítica do método *in-tube* SPME/UHPLC-MS/MS

Após avaliação de todas as variáveis do método *in-tube* SPME/UHPLC-MS/MS, o método foi validado com base nos critérios estabelecidos pela ANVISA - Resolução RDC Nº 27, de 17 de maio de 2012 e RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017(ANVISA, 2012, 2017).

Os parâmetros de validação analítica analisados foram: linearidade, limite de quantificação, precisão, exatidão, efeito matriz, efeito residual e seletividade.

2.III.9.1 Linearidade

A linearidade do método foi avaliada através do enriquecimento de amostras de plasma (300 µL) com soluções dos padrões internos (CBD-d_3 e Δ9-THC-d_3) e dos canabinóides (CBD e Δ9-THC). As concentrações dos canabinódes variaram de 10 a 300 ng mL^{-1}, já a concentração dos padrões internos foi de 150 ng mL^{-1}. A faixa linear foi definida com base nas concentrações que poderiam ser encontradas em amostras biológicas, tendo em vista a dosagem administrada e a farmacocinética do CBD (JUNIOR, 2013; WHO, 2017).

Três curvas analíticas foram traçadas para cada analito por regressão linear, considerando a razão entre as áreas dos picos dos analitos e dos picos dos padrões internos (Y) *versus* concentrações nominais dos canabinóides (X). Foi calculado o CV para cada calibrador, sendo que o valor obtido deveria ser menor ou igual a 20 para o calibrador correspondente à concentração nominal do LIQ, já para os outros calibradores, incluindo o LSQ, o CV deveria ser menor do que 15% em relação à concentração nominal.

A falta de ajuste (*Lack-of-Fit*) foi também determinada para avaliar a normalidade e independência da variância dos resíduos e, portanto, verificar se o modelo é linear. Para o cálculo foi utilizado o programa *Statistica* 6.0. Para a falta de ajuste não ser significativa e o modelo ser bem ajustado, o valor de p deve ser maior que 0,05 (RAMSEY, F.L., SCHAFER, 1997).

2.III.9.2 Precisão e Exatidão

A precisão e exatidão foram avaliada com ensaios realizados no mesmo dia (intraensaio) e em dias distintos (interensaio). Os ensaios foram realizados por meio das quintuplicatas (n = 5) das análises de amostras de plasma enriquecidas com os canabinóides nas seguintes concentrações:

- Limite Inferior de Quantificação (LIQ) = 10 ng mL^{-1};
- Controle de Qualidade Baixo (CQB) = 30 ng mL^{-1};
- Controle de Qualidade Médio (CQM) = 150 ng mL^{-1};

- Controle de Qualidade Alto (CQA) = 240 ng mL^{-1};
- Limite Superior de Quantificação (LSQ) = 300 ng mL^{-1}.

Para determinar a precisão foi calculado o CV e para a exatidão foi calculado o EPR. Ambos valores devem ser menores ou iguais a 15%, exceto para o LIQ que é permitido uma variação de ±20%.

2.III.9.3 Efeito residual

O efeito residual foi avaliado injetando no sistema três amostras de plasma branco, sendo: uma antes e duas após a análise de uma amostra de plasma enriquecida no LSQ. Os cromatogramas da amostra branco foram comparadas com o correspondente ao LIQ. Os sinais analíticos dos interferentes nos tempos de retenção dos analitos devem ser inferiores a 20%.

2.III.9.4 Efeito da matriz biológica

Para avaliar o efeito da matriz biológica no método desenvolvido, foram realizados dois testes: (1) FMN; e (2) Infusão pós-coluna.

O FMN foi realizado analisando oito diferentes amostras de plasma enriquecidas com os analitos em concentrações correspondentes ao CQB e CQA. Em todas as amostras, foram adicionadas o padrão interno. Com os resultados foram calculados os FMN e CV dos FMNs, que devem ser inferiores a 15%.

A infusão pós-coluna foi realizada através da infusão da solução padrão dos analitos (500 ng mL^{-1} CBD e Δ9-THC, em formiato de amônio 5 mM: acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico, 40:60, v/v). Esse fluxo foi combinado com a injeção, via *in-tube* SPME/UHPLC-MS/MS, da amostra de plasma branco (10 µL, após pré-preparo). O cromatograma obtido apresenta a variação do sinal do analito em função da mudança da posição da composição da fase móvel e da matriz (SOUVERAIN; RUDAZ; VEUTHEY, 2004a).

2.III.9.5 Seletividade

A seletividade do método *in*-tube SPME/UHPLC-MS/MS foi realizada através da comparação dos cromatogramas de amostras de plasma branco de seis diferentes procedências e das amostras enriquecidas com o CBD e o Δ9-THC na concentração do LIQ.

2.III.10. Análise de amostras de plasma

Objetivando avaliar a aplicabilidade do método *in-tube* SPME/UHPLC-MS/MS foram analisadas 4 amostras de plasma de pacientes em terapia aguda com o CBD.

Nesse estudo, foram realizadas duas sessões experimentais com cada pacientes, mantendo um intervalo de 15 dias. No primeiro encontro, foi administrado cápsulas de placebo e na outra sessão o CBD foi administrado (300 mg). A coleta da amostra de plasma foi realizada aproximadamente 3 horas após a administração das cápsulas.

2.IV Resultados e Discussões

2.IV.1 Avaliação das condições UHPLC-MS/MS

Após as infusões diretas das soluções padrão de CBD, Δ9-THC, CBD d_3 e Δ9-THC d_3 as condições MS/MS foram determinadas no modo MRM com ionização no modo positivo, devido às características dos analitos. As condições de ionização estabelecidas foram as seguintes: voltagem do capilar de 3,11 kV, temperatura da fonte de íons: 150°C, gás de dessolvatação: nitrogênio, fluxo de 800 L h-1, 400ºC, gás de colisão: argônio. A voltagem do cone e energia de colisão foram determinadas separadamente para cada analito (Tabela 13).

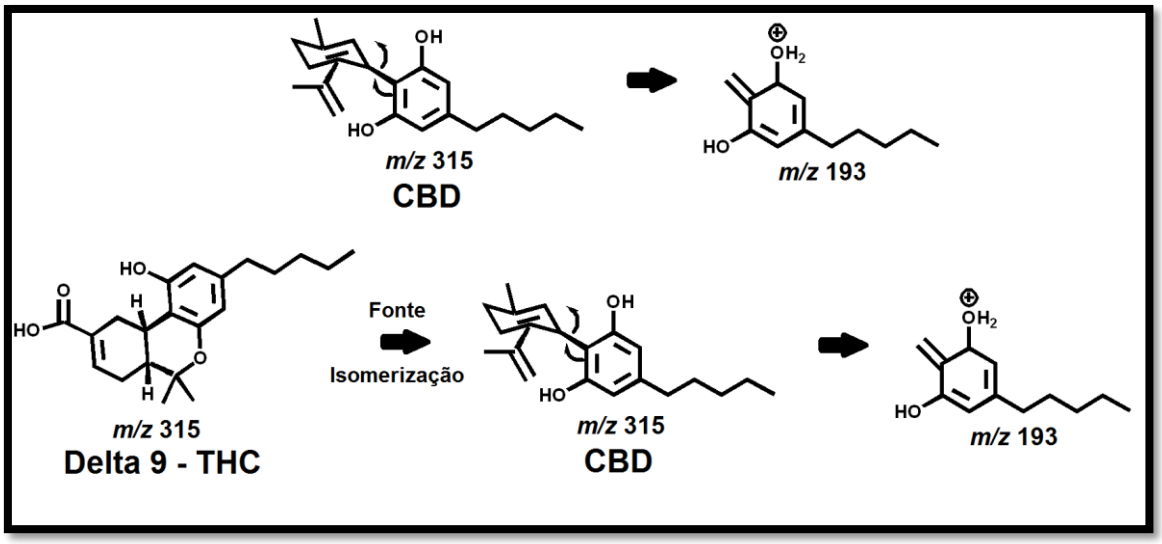
Foram selecionados três íons-produto no modo MRM *Daughter Scan*, um para análise quantitativa e dois para análise qualitativa. As três transições específicas foram determinadas de maneira automática (Tabela 13). Para a coleta de dados foi utilizado o sistema *MassLynx* 4.1 e para processamentos dos dados e quantificação o *software QuanLynx*.

Tabela 13. Transições MS/MS (MRM), voltagem do cone e energia de colisão para os canabinóides

Analito	Precurssor	Íon Produto	Cone (V)	Energia de Colisão
CBD	315	93 / 123 / 193	38	24 / 34 / 22
Δ9-THC	315	43 / 123 / 193	44	38 / 34 / 24
CBD d_3	318	43 / 88 / 256	100	38 / 32 / 22
Δ9-THC d_3	318	123 / 135 / 196	58	30 / 22 / 24

O CBD apresenta como íon de maior intensidade o de razão massa carga (m/z) 193 que é gerado após quebra do anel ciclo hexenil e mudança na posição de hidrogênio (Figura 14). A fragmentação do Δ9-THC gera fragmentos semelhantes ao do CBD (como espectro CID idêntico), sendo que o íon de maior intensidade também é o de m/z 193. Esse fator é explicado pelo fato de se acreditar que, no modo positivo, devido às condições ácidas fortes, ocorreria, na fonte, a isomerização do Δ9-THC em CBD (BROECKER; PRAGST, 2012).

Figura 14. Fragmentação das moléculas de CBD e Δ9-THC



Fonte: próprio autor

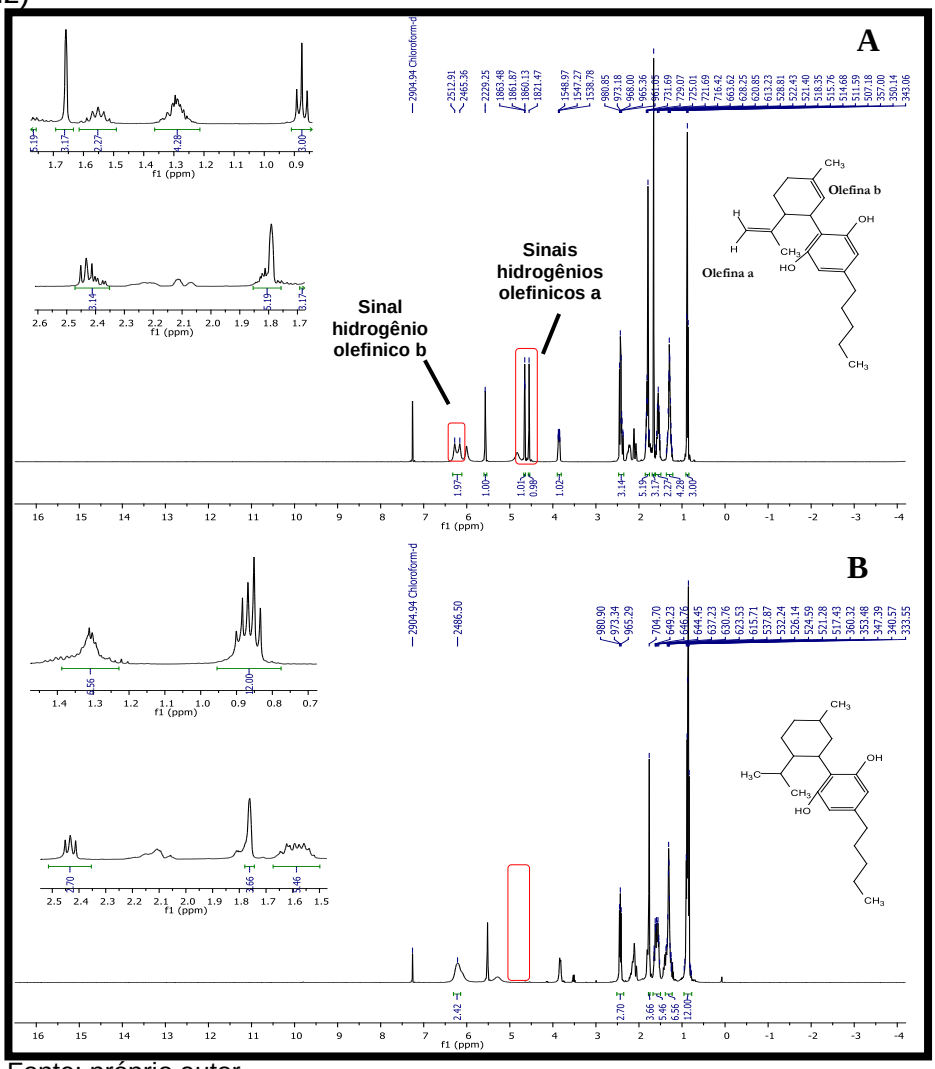
Devido aos analitos gerarem o mesmo padrão de fragmentação não foi possível discriminá-los apenas pelas condições MS/MS, por isso, a fase móvel e o modo de eluição foram avaliados de forma que ocorresse a adequada separação cromatográfica do CBD e do Δ9-THC. Dentre as fases móveis avaliadas, a fase móvel que apresentou maior detectabilidade (sinal analítico) foi: A) Formiato de amônio 5mM e B) Acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico, na vazão de 0,3 mL min^{-1}. Ao avaliar o modo isocrático e gradiente, foi obtido melhor resolução dos picos no modo gradiente, iniciando com 40%A: 60%B e finalizando com 0%A: 100%B. Nessas condições, a resolução cromatográfica entre os picos do CBD e do Δ9-THC foi de R = 1,07, originando diferentes tempos de retenção (CBD 8,15 min e Δ9-THC 8,91 min).

2.IV.2 Síntese do Polímero Molecularmente Impresso (MIP)

A elucidação estrutural do CBD e CBD reduzido (CBD_R) foi realizada a partir da comparação de seus dados de RMN de ^1H e de ^{13}C com os disponíveis na literatura. Como os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C dos CBD e CBD_R reportados na literatura foram obtidos em $CDCl_3$, os espectros de RMN dos compostos descritos nesse trabalho também foram obtidos com as amostras dissolvidas em $CDCl_3$ (CHOI et al., 2004).

Analisando o espectro de RMN de ^{1}H do CBD (Figura 15a) e do CBD-H (Figura 15b), é possível observar a diferença entre os dois, comprovando, assim, a redução das olefinas **a** e **b.** Além disso, a maioria dos sinais encontram-se na região entre δ_H 0,0 e 3,0, que é característica de hidrogênios ligados a carbonos com hibridização sp^3. Os sinais em δ_H 4,54 (1H, *d*) e δ_H 4,68 (1H, *d*) foram atribuídos aos hidrogênios olefínicos **a**, enquanto que o sinal em δ_H 6,20 (1H, *d*) é referente ao hidrogênio olefínico **b**, respectivamente (Figura 15a e 15b). Dessa maneira, a grande diferença entre os dois espectros pode ser atribuída à falta dos sinais entre δ_H 4,54 e 4,68, referentes aos hidrogênios olefínicos **a** e ao aumento do número de hidrogênios no sinal em δ_H 6,20, o que comprova a redução das duas duplas ligações presentes no CBD.

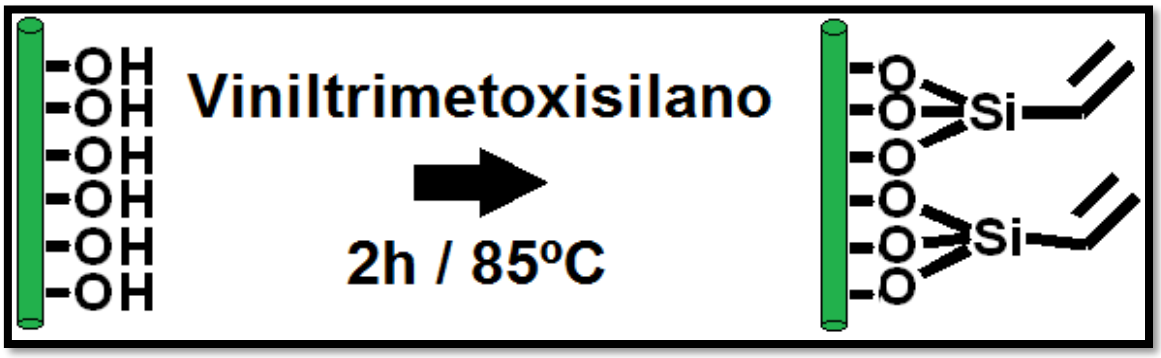
Figura 15. Espectro de RMN de 1H do (a) CBD; (b) CBD reduzido (clorofórmio-d, 400 MHz)



Fonte: próprio autor

A silanização do capilar consistiu na funcionalização do capilar de sílica com o viniltrimetoxisilano, que ocorre através da ligação do reagente com os grupamentos silanóis existentes na parede interna do capilar (HO et al., 2014). A etapa de funcionalização, que ocorreu na parede interna do capilar, gerou grupos vinil (Figura 16) que permitiram o ancoramento do polímero MIP, sintetizado *in situ*.

Figura 16. Funcionalização do interior do capilar



Fonte: próprio autor

Após a funcionalização do capilar prosseguiu-se com a síntese do MIP monolítico propriamente dito. O primeiro item da síntese avaliado foi o solvente porogênico. A natureza e o volume do solvente porogênico influência nas características morfológicas dos materiais poliméricos (CORMACK, P. A.; ELORZA, 2004). Foram testados três solventes: acetonitrila, tolueno e diclorometano. O solvente que formou o MIP com melhor estrutura física foi o sintetizado com o diclorometano. O material sintetizado com acetonitrila apresentou baixo rendimento e partículas muito pequenas, já o sintetizado com tolueno observou-se a formação de gel.

Em seguida, foram avaliados diferentes volumes do solvente porogênico. Foram testadas as proporções de aproximadamente 18, 8 e 5 vezes o volume da soma do monômero funcional (MF), IR e AR. Após a síntese, foi observado que o MIP_4 e MIP_5 (Tabela 12), com maiores volumes de solvente porogênico, não apresentaram formação adequada de monolito, apresentando partículas muito pequenas. Já o MIP_6 (menor volume de diclorometano), apresentou adequada formação do MIP, com o preenchimento total do capilar. Esse resultado era esperado, visto que na síntese utilizando polimerização *in situ*,

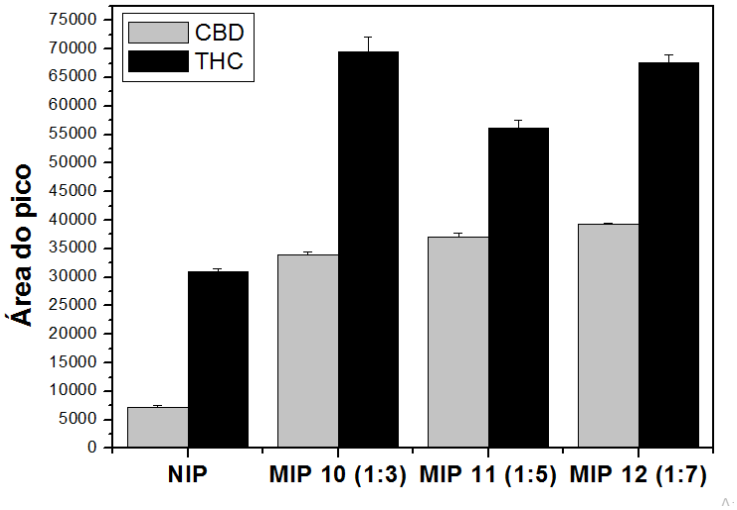
normalmente menores volumes de solvente porogênico são requeridos (LIU; ROW; YANG, 2005).

O AR utilizado foi o EGDMA, que favorece a interação entre monômero funcional e molécula molde, além de fornecer estabilidade mecânica à matriz polimérica. Por essa razão diferentes proporções de EGDMA e monômero funcional (MMA) foram avaliados. A razão 2:1 (MIP_7), 1:1 (MIP_8) e 3:1 (MIP_9) foram verificadas e o polímero que apresentou maior estabilidade, com partículas mais rígidas e menos quebradiças, foi o MIP_9, com maior quantidade de AR. As razões elevadas da relação EGDMA e MMA resultam em polímeros com maior permeabilidade e maior estabilidade mecânica, portanto, a razão EGDMA:MMA obtida está de acordo com o esperado (MAYES; WHITCOMBE, 2005).

Como monômero funcional foi eleito o MMA. A escolha foi devida ao fato do MMA possuir grupos funcionais que interagem de forma complementar e em tamanho, através de ligações de hidrogênio, com os grupos funcionais da molécula molde (CBD_R). Baixas concentrações de monômero funcional, em relação à molécula molde, podem causar problemas por insuficiência de monômeros para formação do complexo monômero-molde, diminuindo, assim, a quantidade de sítios específicos no polímero final.

Por outro lado, o excesso de monômeros funcionais é incorporado de forma randômica na cadeia polimérica, interagindo de forma não específica com os compostos endógenos da amostra biológica, durante o procedimento de extração, podendo adsorvê-los (RACHKOV; MINOURA, 2000). Diferentes proporções MMA: CBD reduzido foram avaliadas quanto à capacidade de sorção de CBD e Δ9-THC (Figura 17).

Figura 17. Avaliação da razão molar monômero funcional: molécula molde



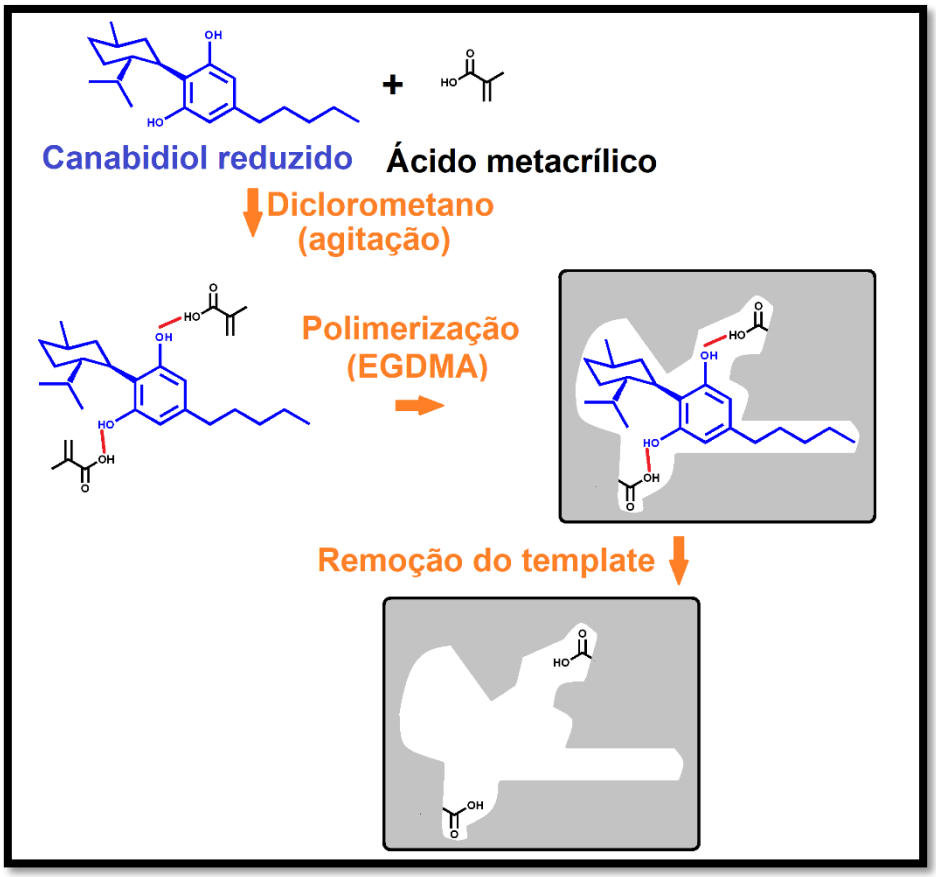
Fonte: próprio autor

Dentre as razões MMA: CBD avaliadas, não houveram diferenças tão significativas nas áreas obtidas. No entanto, no MIP 12 observa-se um leve aumento da área de pico para o CBD e Δ9-THC, quando comparado com o NIP e os demais polímeros sintetizados. Ou seja, o MIP que foi sintetizado com maior razão molar entre monômero funcional: template foi utilizado nos ensaios subsequentes. O material, ainda, apresentou adequada permeabilidade para percolação do sorvente e alta seletividade.

O AIBN foi utilizado como IR por apresentar alta eficiência nas polimerizações radicalares, ter baixo custo e por permitir o uso de condições brandas de síntese. A Figura 18 resume o esquema de síntese do MIP, utilizando o CBD_R como molécula molde.

Após a síntese dos materiais, e antes de utilizá-los nos processos de extração, foi realizada a lavagem do polímero objetivando a remoção da molécula molde das cavidades específicas do MIP. O polímero foi lavado com acetonitrila, devido à solubilidade da molécula molde, durante 4 horas, com o auxílio de uma bomba HPLC. Alíquotas dessa solução foram coletadas e injetadas, em sistema UHPLC-MS/MS, para a avaliação da eficiência do processo de remoção da molécula molde. Após 4 horas, não foi observado resquício da síntese.

Figura 18. Esquema do procedimento de síntese do MIP

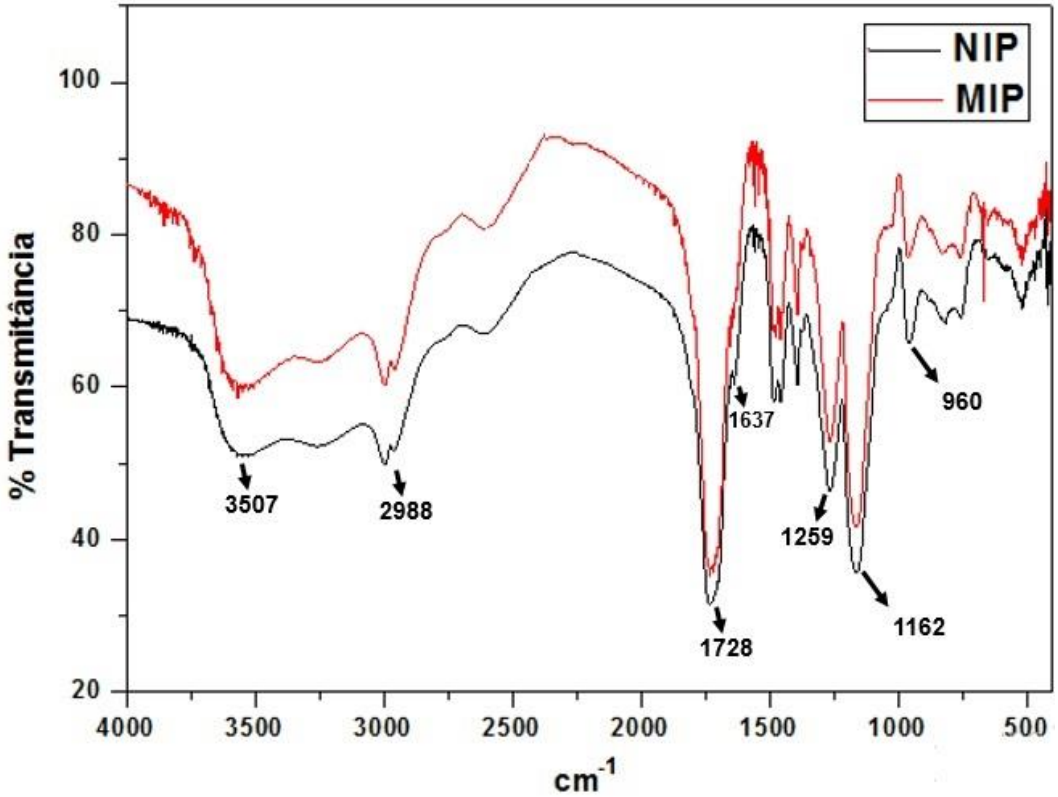


Fonte: próprio autor

2.IV.3 Caracterização morfológica dos polímeros sintetizados

Os espectros vibracionais na região do infravermelho (FTIR) das amostras de NIP e MIP estão representados na Figura 19. Os espectros obtidos para os dois materiais não apresentam diferenças químicas significativas do ponto de vista de presença ou ausência de grupos funcionais específicos.

Figura 19. Espectros FTIR para MIP e NIP



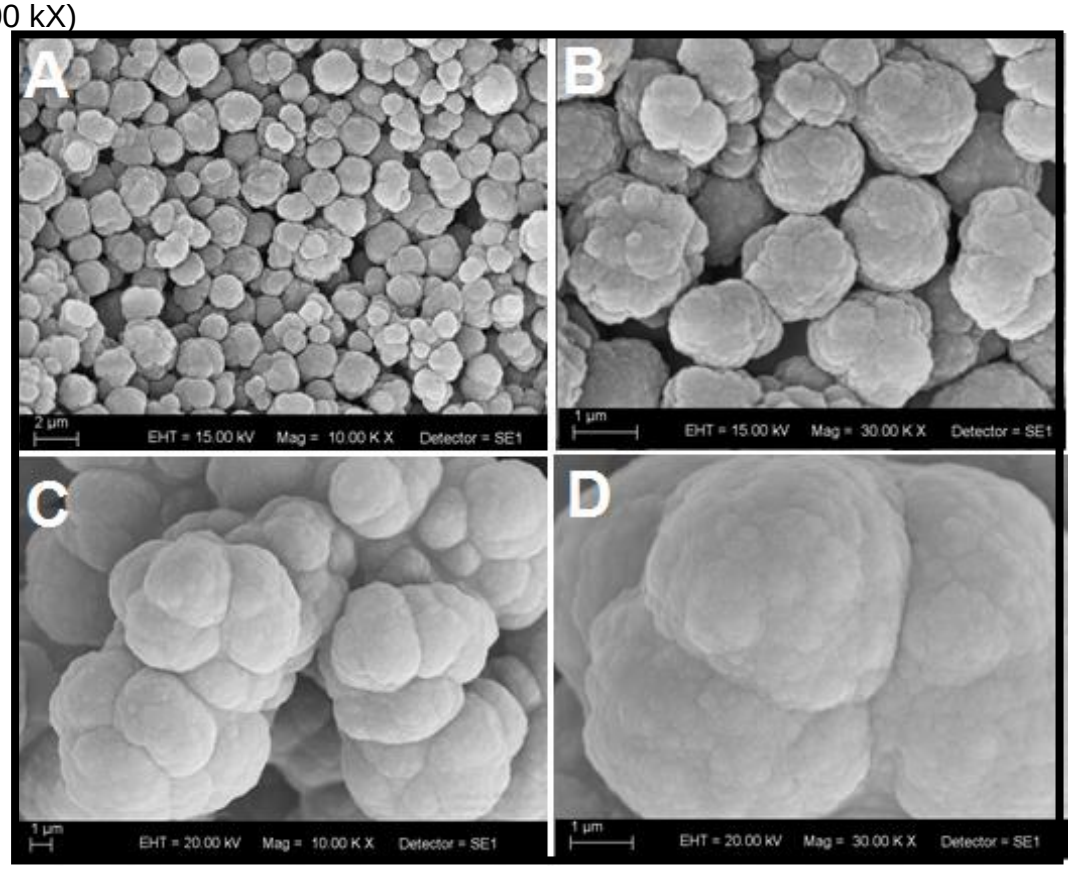
Fonte: próprio autor

Os espectros FTIR das amostras NIP e MIP apresentam bandas características dos grupos funcionais presentes nos reagentes de síntese, mostrando que foram incorporados na cadeia polimérica. Bandas características do grupamento carbonila (C=O) e hidroxila (OH) aparecem em 1728 e 3507 cm^{-1}, indicando a ligação de hidrogênio com o grupo carboxílico (-COOH) do MMA. Ligações de C-O de grupo ésteres, que são provenientes do AR (EGDMA), estão presentes em 1259 cm^{-1} (ligação simétrica) e 1162 cm^{-1} (ligação assimétrica). Bandas representativas de ligação C-H polimérica também são observadas em 2688 cm^{-1}. A associação do monômero funcional com o AR gera a presença de grupos vinílicos, representando pelos picos em 1637 cm^{-1} (O-H) e em 960 cm^{-1} (C-H vinílica) (COATES, 2006; MIRANDA; DOMINGUES; QUEIROZ, 2016).

A técnica MEV foi utilizada para fornecer informações acerca das características morfológicas externas dos polímeros sintetizados. As Figuras 20a e 20b mostram a morfologia do NIP, e as Figuras 20c e 20d do MIP, com uma magnitude de 10.00 kX e 30.00 kX. Pode ser observado que ambos os polímero apresentam estrutura relativamente homogênea e com partículas interconectadas entre si, formando uma rede contínua. Nota-se, ainda, a

presença de algumas cavidades e canais evidenciando o caráter poroso do material. Quando comparado os dois materiais, é possível verificar partículas maiores no MIP (aproximadamente 4 µm) do que no NIP (cerca de 2 µm), sugerindo uma maior área superficial no material que foi molecularmente impresso.

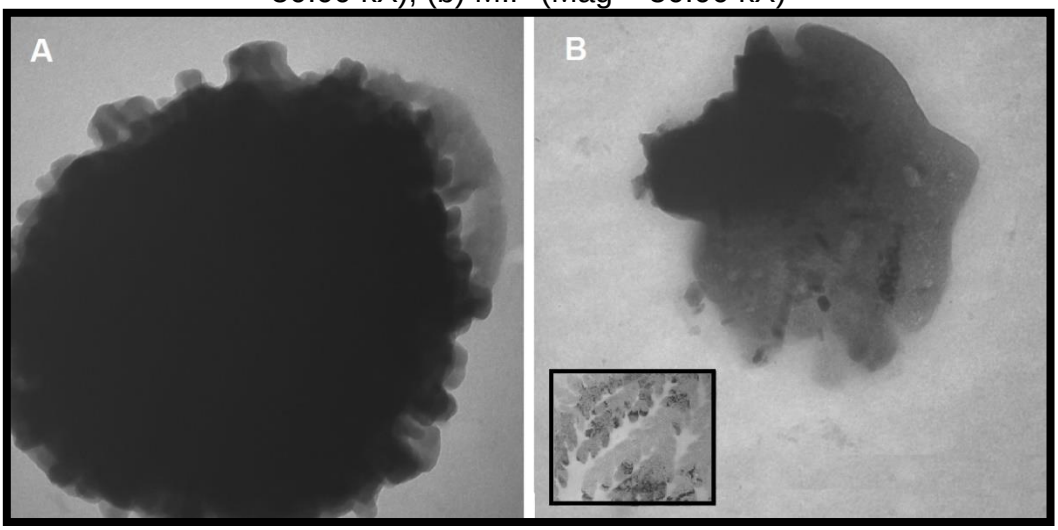
Figura 20. Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura. (a) NIP (Mag = 10.00 kX); (b) NIP (Mag = 30.00 kX); (c) MIP (Mag = 10.00 kX); (b) MIP (Mag = 30.00 kX)



Fonte: próprio autor

A técnica MET foi utilizada para obter informações complementares sobre as características morfológicas internas do polímero. A Figura 21a mostra a morfologia do NIP e a Figura 21b do MIP com uma magnitude de 50.00 kX. Como mostrado na Figura 21a, o NIP apresenta uma estrutura rígida e densa, assemelhando-se à uma esfera. O MIP, mostrado na Figura 21b, apresenta uma estrutura mais porosa, com regiões mais claras e canais bem definidos (imagem inferior). A diferença de porosidade observada pelas imagens do MEV e do MET dos dois materiais pode ser atribuída a presença da molécula molde na síntese do MIP.

Figura 21. Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão. (a) NIP (Mag = 50.00 kX); (b) MIP (Mag = 50.00 kX)



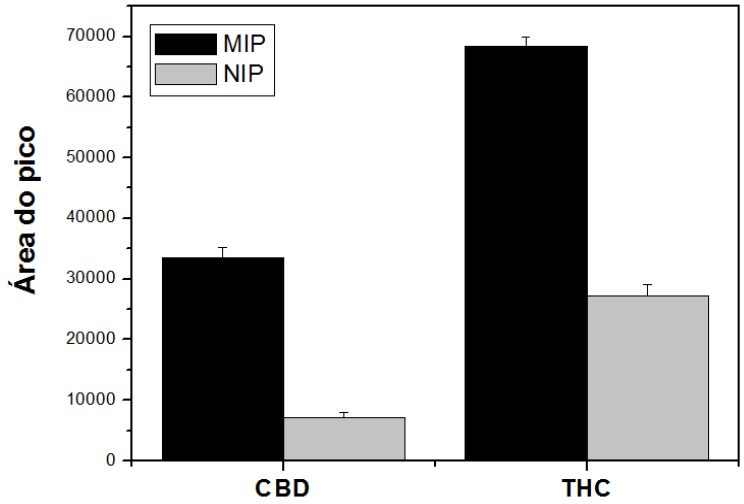
Fonte: próprio autor

2.IV.4 Desempenho analítico do MIP

A Figura 22 ilustra o gráfico que apresenta a capacidade de sorção dos analitos, CBD e Δ9-THC, nos capilares MIP e NIP. O IF calculado para o CBD foi de aproximadamente 5 e para o Δ9-THC cerca de 2,5. O IF deve ser obrigatoriamente maior que 1 para indicar adequada impressão do MIP (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005).

O IF do CBD é 2 vezes maior que o do Δ9-THC, indicando que, mesmo as duas moléculas pertencendo a mesma classe, a utilizada como molécula molde mostrou melhor desempenho seletivo. Os dados sugerem que a ligação do analito com a fase impressa ocorre por meio de interações específicas. Na literatura, os valores de IF encontrados para materiais impressos têm sido bastante variável, podendo encontrar valores de 1,1 até 14 (BELTRAN et al., 2009; LIN et al., 2013; LULIŃSKI et al., 2014; NICOARA et al., 2015; SOUZA et al., 2016).

Figura 22. Avaliação da capacidade de sorção, para CBD e Δ9-THC, nos capilares MIP e NIP



Fonte: próprio autor

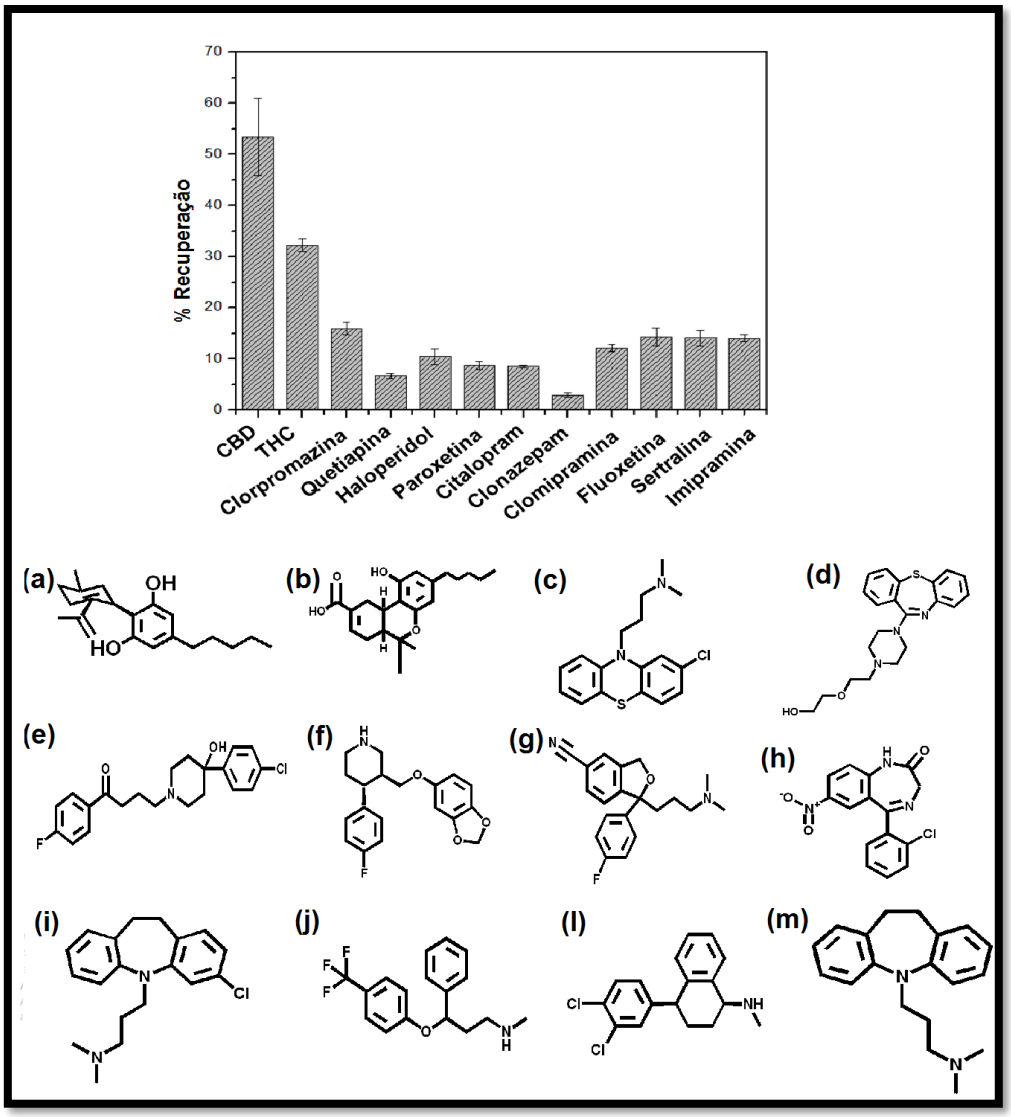
As ligações seletivas dos analitos com o MIP podem ser comprovadas adicionalmente pela avaliação da seletividade (Figura 23). As extrações realizadas com o MIP apresentaram taxas de recuperação de 53% para o CBD e 32% para o Δ9-THC, já para os demais fármacos analisados, as taxas variaram de 3 a 15%. A sorção dos outros fármacos junto ao MIP, apesar de pequena, pode ser atribuída a interações não específicas com polímero.

As taxas de recuperação do CBD foram maiores quando comparadas às obtidas para o Δ9-THC, pois o MIP foi sintetizado com molécula de CBD$_R$ como *template*. Portanto, o MIP desenvolvido é mais seletivo para o CBD.

As porcentagens de recuperação encontradas no trabalho para os analitos e os fármacos (substâncias com estruturas não análogas) são similares às determinadas por Souza et al. (2016). Os autores avaliaram a seletividade do MIP para a extração de parabenos em amostras de leite na presença de outros 7 fármacos. As taxas de recuperação para os fármacos variaram de 4 a 28% (SOUZA et al., 2016).

Miranda et al. (2016) também avaliaram a seletividade do MIP sintetizado para extração de venlafaxina em amostras de plasma na presença de outros 7 compostos de estrutura diferente da molécula molde. A recuperação dos fármacos variou entre 5 e 30% (MIRANDA; DOMINGUES; QUEIROZ, 2016).

Figura 23. Avaliação da seletividade do MIP, para CBD e THC, em amostras de plasma enriquecidas com os analitos e fármacos antidepressivos, anticonvulsivantes e antipsicóticos (500 ng mL^{-1}). Estrutura química: (a) CBD; (b) Δ9-THC; (c) clorpromazina; (d) quetiapina; (e) haloperidol; (f) paroxetina; (g) citalopram; (h) clonazepam; (i) clomipramina; (j) fluoxetina; (l) sertralina; (m) imipramina



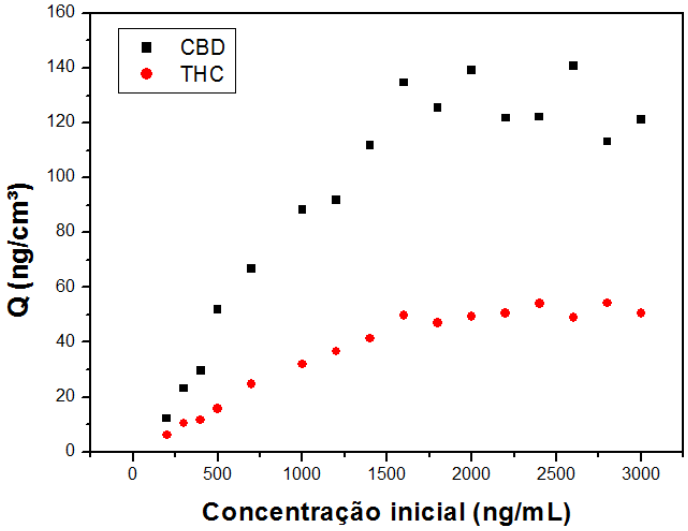
Fonte: próprio autor

2.IV.5 Capacidade de sorção

A Figura 24 ilustra um perfil de isoterma de adsorção do tipo I (segundo classificação IUPAC), ou seja, que o aumento da massa dos analitos sorvida junto ao MIP (ng cm^{-3}) é proporcional ao da concentração da solução padrão (ng mL^{-1}), até atingir a máxima capacidade de sorção do capilar MIP, patamar constante. Este perfil indica que o processo de adsorção ocorre possivelmente

em monocamada e que o processo é considerado reversível (S. J. GREGG, 1982).

Figura 24. Capacidade de sorção do capilar MIP para CBD e THC



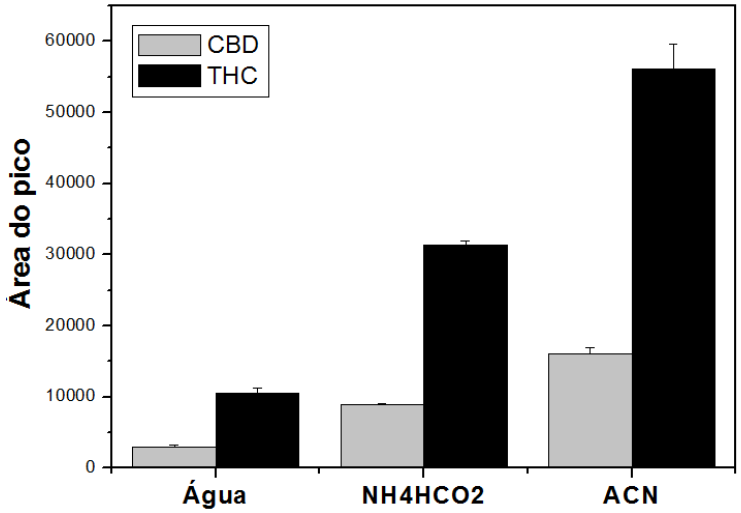
Fonte: próprio autor

Para ambos os analitos (CBD e Δ9-THC), o equilíbrio de adsorção é atingido aproximadamente com a concentração de solução padrão inicial de cerca de 1600 ng mL^{-1}. Entretanto, a quantidade de analito adsorvido por volume de MIP é diferente para cada analito. Os valores de $Q_{máx}$ foram de 148,05 ng cm^{-3} para CBD e 44,49 ng cm^{-3} para o Δ9-THC. Ou seja, o material consegue adsorver uma maior quantidade de CBD do que Δ9-THC, indicando mais uma vez o reconhecimento seletivo do CBD pelo MIP.

2.IV.6 Avaliação dos parâmetros *in-tube SPME*

Na Figura 25, é possível observar que as maiores taxas de sorção dos analitos junto ao capilar 1D foram obtida utilizando a acetonitrila como fase móvel, por ser um solvente aprótico. As soluções aquosas, por serem próticas, podem solvatar fortemente as hidroxilas dos analitos, deixando-as menos livre para sorver junto à fase MIP (SOLOMONS, T.W.G., FRYHLE, 2000). Esse fato também justifica os melhores resultados de dessorção com o de formiato de amônio.

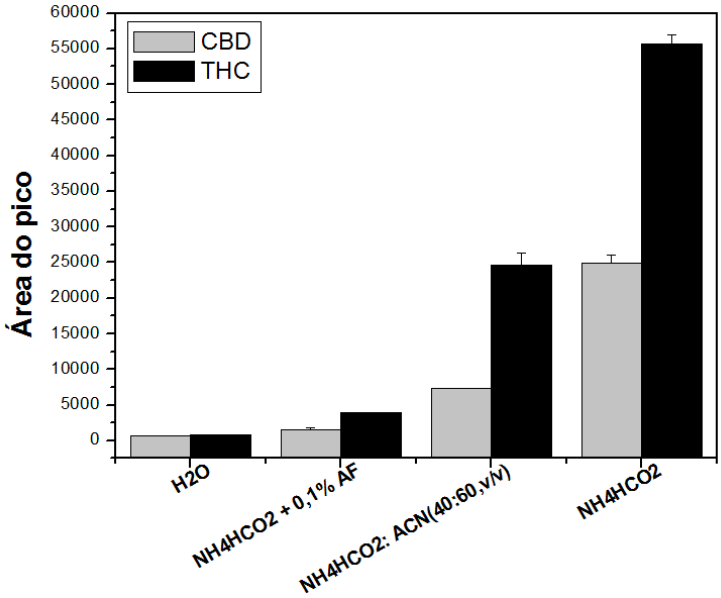
Figura 25. Avaliação do solvente de sorção



Demais parâmetros: 200 µL de plasma; 10 µL de amostra ressuspendida em acetonitrila injetada no sistema *in-tube* SPME; 3 min de limpeza; dessorção com água ou acetonitrila na vazão de 0,02 mL min^{-1}. Fonte: próprio autor

Para a dessorção dos analitos do capilar 1D para a coluna 2D o melhor resultado foi obtido com a utilização do formiato de amônio 5 mM (Figura 26). Com a utilização de água a dessorção dos analitos foi baixa, o que pode ser justificado pela solubilidade dos analitos (WHO, 2017). Quando adicionado ácido ou acetonitrila na fase de dessorção, a eluição dos canabinóides também não foi completa, uma vez que tanto o pH ácido quanto o solvente aprótico favorecem a sorção do analito. Assim, a utilização de 100% de formiato de amônio 5 mM mostrou não apresentar efeito residual dos analitos no capilar, o que comprova a completa eluição dos analitos.

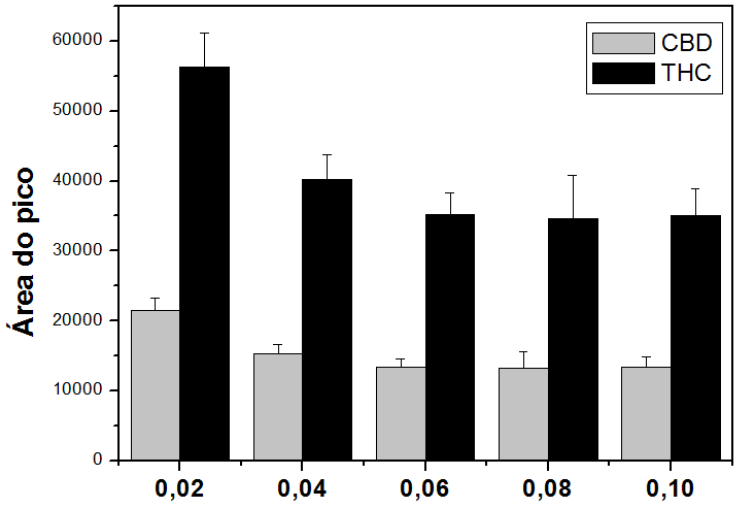
Figura 26. Avaliação do solvente de dessorção



Demais parâmetros: 200 µL de plasma; 10 µL de amostra ressuspendida em acetonitrila injetada no sistema *in-tube* SPME; 3 min de limpeza; sorção com água ou acetonitrila na vazão de 0,02 mL min^{-1}. Fonte: próprio autor

Quanto à vazão do fluxo da fase móvel de sorção e dessorção, o resultado mais favorável foi obtido com a menor vazão, de 0,02 mL min^{-1} (Figura 27). Quanto mais baixa a vazão da fase móvel mais tempo hábil os analitos terão para interagirem com a fase estacionária (KATAOKA; SAITO, 2012). A vazão alta poderia encurtar o tempo de extração e gerar uma análise mais rápida, mas, em contrapartida, geraria uma pressão excessiva, afetando a vida útil do capilar (WANG et al., 2018). Assim, o fluxo de 0,02 mL min^{-1} permitiu um equilíbrio entre o tempo e eficiência de sorção.

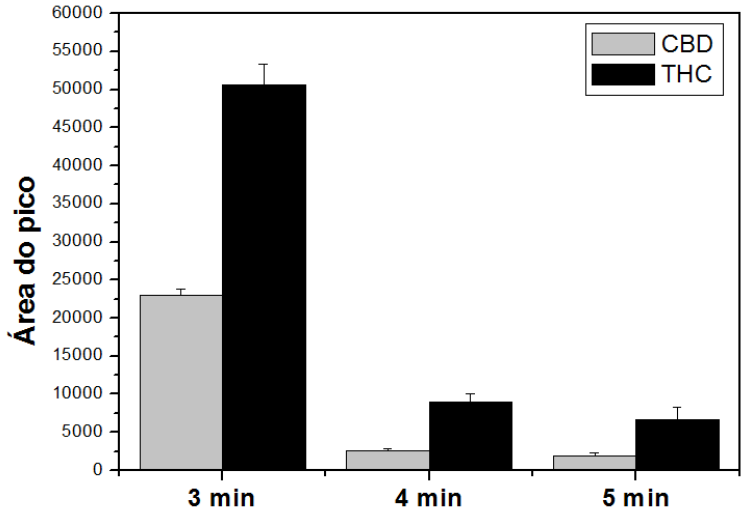
Figura 27. Avaliação da vazão de sorção e dessorção



Demais parâmetros: 200 µL de plasma; 10 µL de amostra ressuspendida em acetonitrila injetada no sistema *in-tube* SPME; 3 min de limpeza; sorção com acetonitrila e dessorção com formiato de amônio. Fonte: próprio autor

O plasma humano é um material biológico bastante complexo (BROWN, 1984), por isso a etapa de lavagem do capilar para exclusão de interferentes, antes da dessorção das analitos, é imprescindível. Usualmente, a acetonitrila tem sido utilizada nesta etapa, por ser um solvente de média polaridade capaz de excluir as macromoléculas. Como esse solvente já é utilizado para pré-concentrar os analitos foi avaliado o tempo necessário para minimizar o efeito da matriz. Como demonstrado na Figura 28, o tempo de 3 minutos foi o adequado para eliminar os interferentes sem eluir os canabinóides.

Figura 28. Avaliação da lavagem da fase MIP após sorção dos analitos



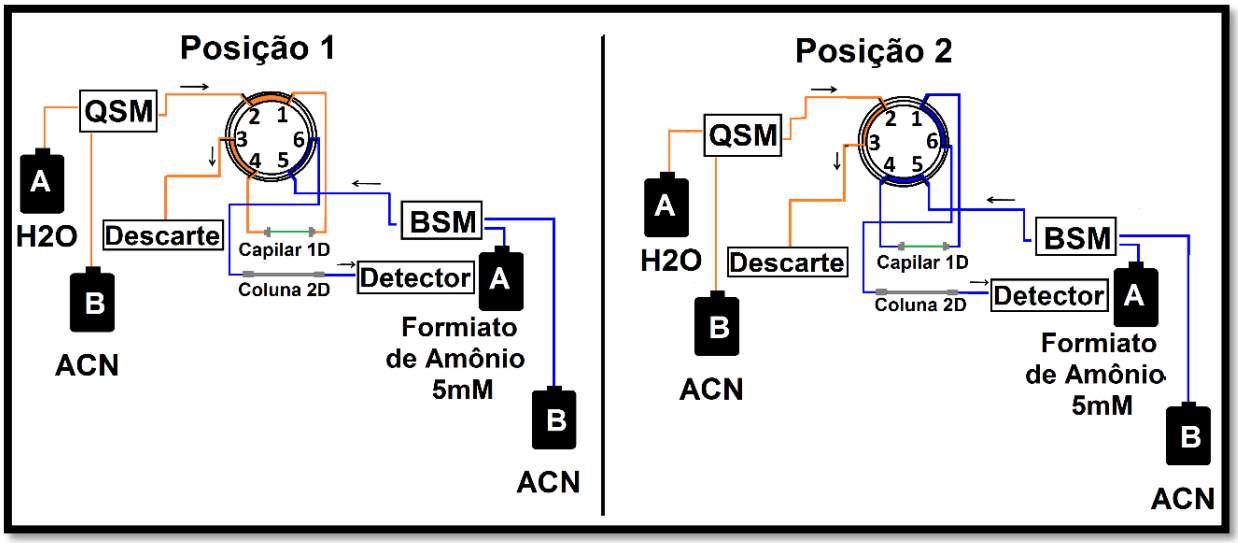
Demais parâmetros: 200 µL de plasma; 10 µL de amostra ressuspendida em acetonitrila injetada no sistema *in-tube* SPME; sorção com acetonitrila e dessorção com formiato de amônio na vazão de 0,02 mL min^{-1}. Fonte: próprio autor

A exclusão das macromoléculas também foi confirmada através do detector DAD (λ = 280 nm). O pico referente às proteínas começou a sair com 1 minuto e com 3 minutos foi completamente excluído (pico em 1,72 min). Dessa forma, a viragem da válvula foi realizada em 3 minutos.

A configuração do sistema de eluição no modo reverso e direto também foi avaliada. O modo reverso eluiu os analitos com menor tempo de retenção (8,15 min para CBD e 8,91 para Δ9-THC), enquanto o modo direto dessorveu os canabinóides com um maior tempo (8,35 min para CBD e 9,04 para Δ9-THC). As áreas dos picos obtidas nos dois modos também foram diferentes: a área obtida no modo reverso foi, aproximadamente, 3 vezes maior para o CBD e o Δ9-THC. Assim, a eluição no modo reverso foi utilizado nos ensaios posteriores.

A configuração final do sistema *in*-tube SPME/UHPLC-MS/MS foi estabelecida nas seguintes condições: o capilar MIP (1D) foi conectado nos canais 1 e 4 do injetor, a QSM no canal 2, a BSM no canal 5 e a entrada da coluna analítica no canal 6. A bomba quaternária foi conectada ao capilar (1D) e a bomba binária à coluna analítica (2D) (Figura 29).

Figura 29. Configuração final do sistema *in-tube* SPME/UHPLC-MS/MS (eluição no modo reverso) para a determinação de canabinóides em amostras de plasma



Fonte: próprio autor

No início da extração, a válvula está na Posição 1. Nessa etapa, a amostra injetada é percolada pelo capilar 1D com a fase móvel acetonitrila, na vazão de 0,02 mL min^{-1}. Ao mesmo tempo, a coluna analítica é equilibrada com a fase móvel (formiato de amônio 5 mM: acetonitrila com 0,1% AF, 40:60, v/v), na vazão de 0,30 mL min^{-1}. Com 3 minutos, ocorre a comutação da válvula para a Posição 2. Na segunda etapa os canabinóides são eluídos do capilar (1D) para a coluna analítica (2D). Aos 5 minutos, a válvula retorna na Posição 1 e ocorre a separação cromatográfica com posterior detecção no espectrômetro de massas. Ao mesmo tempo ocorre a limpeza da coluna 1D. As proporções das fases móveis, bem como o tempo de viragem da válvula estão descrito na Tabela 14.

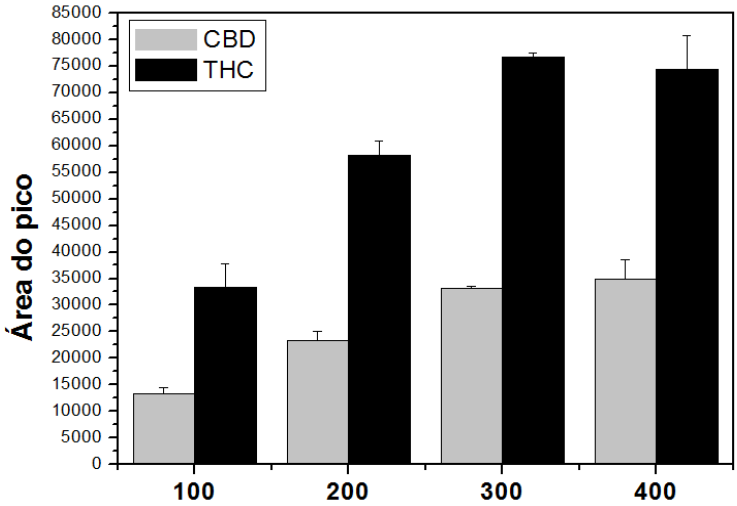
Tabela 14. Condições da análise *in-tube* SPME/UHPC-MS/MS para amostras de plasma

	Bomba Binária (BSM)			**Bomba Quaternária (QSM)**				
	A = Formiato de Amônio 5mM B = Acetonitrila + 0,1% Ácido Fórmico			A = Água B = Acetonitrila				
Tempo (min)	Vazão	%A	%B	Vazão	%A	%B	Posição da válvula	Etapas
Inicial	0,300	40	60	0,020	0	100	1	Pré-concentração dos canabinóides e condicionamento da coluna analítica
3.00	0,020	100	0	0,020	0	100	2	Eluição dos canabinóides (1D) para a coluna analítica (2D)
5.00 – 12.00	0,300	40 - 0	60 - 100	0,020	100	0	1	Separação cromatográfica (2D) e limpeza do capilar (2D)
12.00 - 13.00	0,300	0 - 40	100 - 60	0,020	0	100	1	Reequilíbrio do sistema

Quanto ao volume da amostra diluída injetada no sistema *in-tube* SPME/UHPLC-MS/MS, quando injetado 10 µL, houve um aumento de aproximadamente 1,7 vezes da área dos picos de CBD e Δ9-THC quando comparadas com a injeção de 5 µL. Já ao injetar maiores volume (20 e 30 µL) houve uma queda significativa das áreas, provavelmente ocasionada pelo efeito matriz mais pronunciado. Assim, optou-se por injetar 10 µL da amostra diluída (após-preparo).

Foram testados os volumes de 100, 200, 300 e 400 µL de amostra de plasma (inicial) enriquecida com os analitos. No gráfico representado na Figura 30, observa-se aumento crescente (linear) da área do pico com o aumento do volume de amostra até 300 µL plasma. A partir desse valor, os valores de área são constantes.

Figura 30. Avaliação do volume de amostra inicial



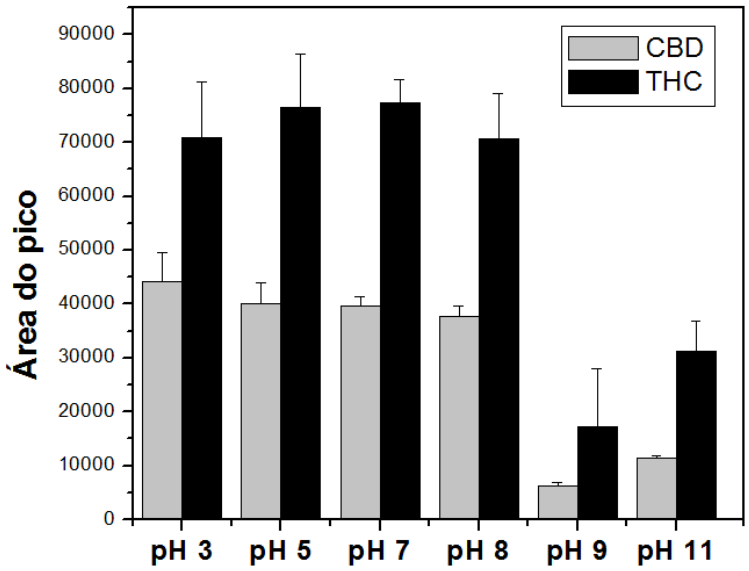
Demais parâmetros: 10 µL de amostra ressuspendida em acetonitrila injetada no sistema *in-tube* SPME; 3 min de limpeza; sorção com acetonitrila e dessorção com formiato de amônio na vazão de 0,02 mL min^{-1}. Fonte: próprio autor

O pH da amostra é um parâmetro importante, pois influencia diretamente na ionização dos grupos funcionais dos analitos, e consequentemente nas interações com o polímero.

Considerando o efeito do pH da amostra na eficiência do processo de extração *in-tube* SPME/UHPLC-MS/MS, as extração realizadas em pH abaixo de 8,0 apresentaram as maiores áreas de pico, Figura 31. Foi observado que na faixa de pH entre 3 e 8 não houve uma diferença tão pronunciada nas áreas obtidas, no entanto, em pH 3 é possível verificar uma leve tendência de aumento de área do pico para o CBD. Em pH mais básico (pH 9 e 11) o efeito é o oposto, pode ser observado uma brusca queda na área obtida.

Segundo os valores de pKa do CBD (pKa = 9,64) (GROTENHERMEN, 2003) e do MMA (pKa = 4,65) (DONG; DU; QIAN, 2008), os ensaios realizados em pH 3 favoreceram as ligações hidrogênio entre os grupos funcionais do CBD e MMA, uma vez que ambos estão em suas formas não ionizadas. Assim, o extrato seco foi ressuspendido em acetato de amônio 5 mM pH 3,0.

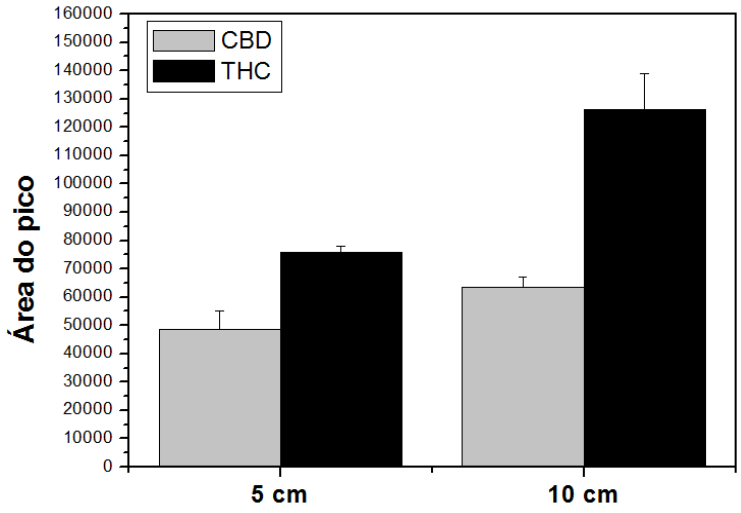
Figura 31. Avaliação do pH da amostra



Demais parâmetros: 200 µL de plasma; 10 µL de amostra ressuspendida injetada no sistema *in-tube* SPME; 3 min de limpeza; sorção com acetonitrila e dessorção com formiato de amônio na vazão de 0,02 mL min^{-1}. Fonte: próprio autor

Por fim, foi avaliado o comprimento do capilar MIP de extração da primeira dimensão. Capilares de 5 e 10 cm foram testados (Figura 32). A área do pico cromatográfico nitidamente aumentou com o comprimento do capilar, e isso pode ser explicado pelo aumento do volume da fase extrativa e consequentemente da capacidade sortiva. Capilares ainda maiores poderiam ser avaliados, no entanto, maiores comprimentos de capilar poderiam aumentar a pressão do sistema (HAKOBYAN et al., 2018). Portanto, o capilar de 10 cm foi utilizado nos ensaios posteriores.

Figura 32. Avaliação do comprimento do MIP



Demais parâmetros: 300 µL de plasma; 10 µL de amostra ressuspendida em solução pH 3 injetada no sistema *in-tube* SPME; 3 min de limpeza; sorção com acetonitrila e dessorção com formiato de amônio na vazão de 0,02 mL min^{-1}. Fonte: próprio autor

2.IV.7 Validação Analítica do método *in-tube* SPME

A Tabela 15 apresenta os parâmetros de validação analítica do método *in-tube* SPME/UHPLC-MS/MS para determinação de CBD e Δ9-THC em amostras de plasma.

A linearidade do método variou de 10 a 300 ng mL^{-1} com coeficientes de determinação superiores a 0,996 para ambos os analitos. A falta de ajuste foi superior a 0,05, indicando que os modelos matemáticos estavam bem ajustados ao nível de 5%.

Quanto aos ensaios de precisão os CV ficaram entre 0,2 % e 9,7% para o CBD e entre 0,7 e 19,1% (LIQ) para o Δ9-THC. Para a exatidão o EPR oscilou de -7,7 a 19,6% (LIQ) para o CBD e de -9,3 a 4,4% para o Δ9-THC. Os valores de precisão e exatião foram satisfatórios pois estão em concordância com o estabelecido pela ANVISA.

Tabela 15. Parâmetros de validação analítica para o método *in-tube* SPME/UHPC-MS/MS para amostra de plasma

Analito	Linearidade			Conc. (ng mL^{-1})	Exatidão (EPR)		Precisão (CV)		Efeito Matriz (CV)
	Equação da reta	R	*Lack-of-Fit* [a]		Intra	Inter	Intra	Inter	
CBD	y = 0,0381 x – 0,0426	0,997	0,196	10 (LIQ)	11,8	19,6	3,2	9,7	
				30 (CQB)	-3,3	-3,5	0,2	2,3	13,9
				150 (CQM)	-7,7	-4,2	3,0	5,6	
				240 (CQA)	0,4	3,1	0,9	3,9	11,7
				300 (LSQ)	1,3	-0,6	0,4	2,6	
Δ9-THC	y = 0,0209 x – 0,3332	0,996	0,168	10 (LIQ)	-9,3	-3,7	19,1	17,8	
				30 (CQB)	-3,6	-0,3	10,3	8,7	14,5
				150 (CQM)	4,4	1,1	2,1	4,7	
				240 (CQA)	3,2	1,5	0,9	2,6	8,6
				300 (LSQ)	-2,7	-1,1	0,7	2,3	

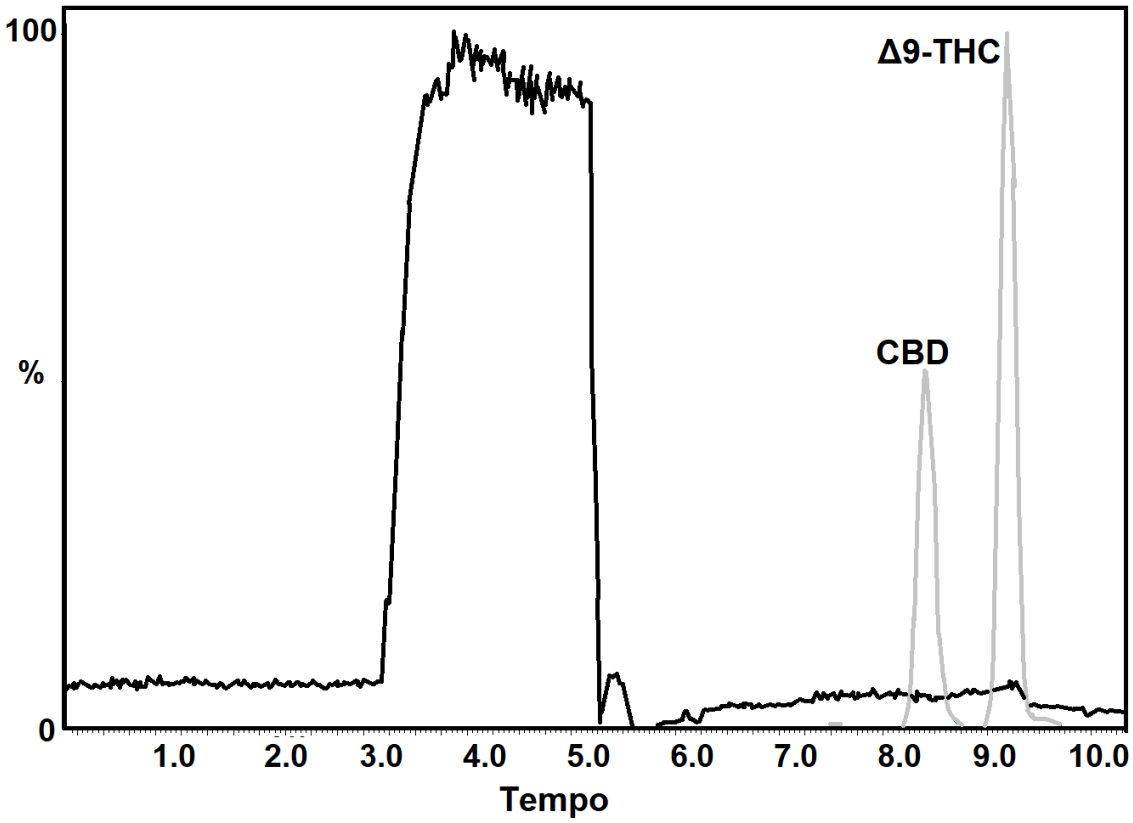
[a]valor p para o nível de significância de 0,05.

O efeito residual foi de 4,4% para o CBD e de 1,7% para o Δ9-THC, portanto não houve pico residual no tempo de retenção dos analitos. Ademais, a resposta de picos residuais no tempo de retenção dos padrões internos também foi inferior a 5%.

Como apresentado na Tabela 15, os CVs dos FMNs foram 13,9 e 14,5% para o CQB e 11,7 e 8,6% para o CQA. Os valores mostraram ausência de efeito matriz significativo do método, conforme estabelecido pelos critérios da ANVISA.

O baixo efeito matriz no tempo de retenção dos analitos também foi comprovado pela infusão pós-coluna. Na Figura 33, é possível observar que há um incremento no sinal analítico entre 3 e 5 min, tempo em que ocorre a viragem da válvula e por consequência modificação na composição da fase móvel. O mesmo comportamento foi também observado quando se injetou acetonitrila pura. Portanto, essa instabilidade na linha de base foi devido à mudança da válvula de 6 pórticos e consequentemente da fase móvel. Além disso, no tempo de retenção dos analitos não foi observado variações na linha de base, ou seja, interferentes capazes de causar supressão ou incremento do sinal.

Figura 33. Cromatograma da infusão pós-coluna do CBD e Δ9-THC para o método *in-tube* SPME/UHPLC-MS/MS



Fonte: próprio autor

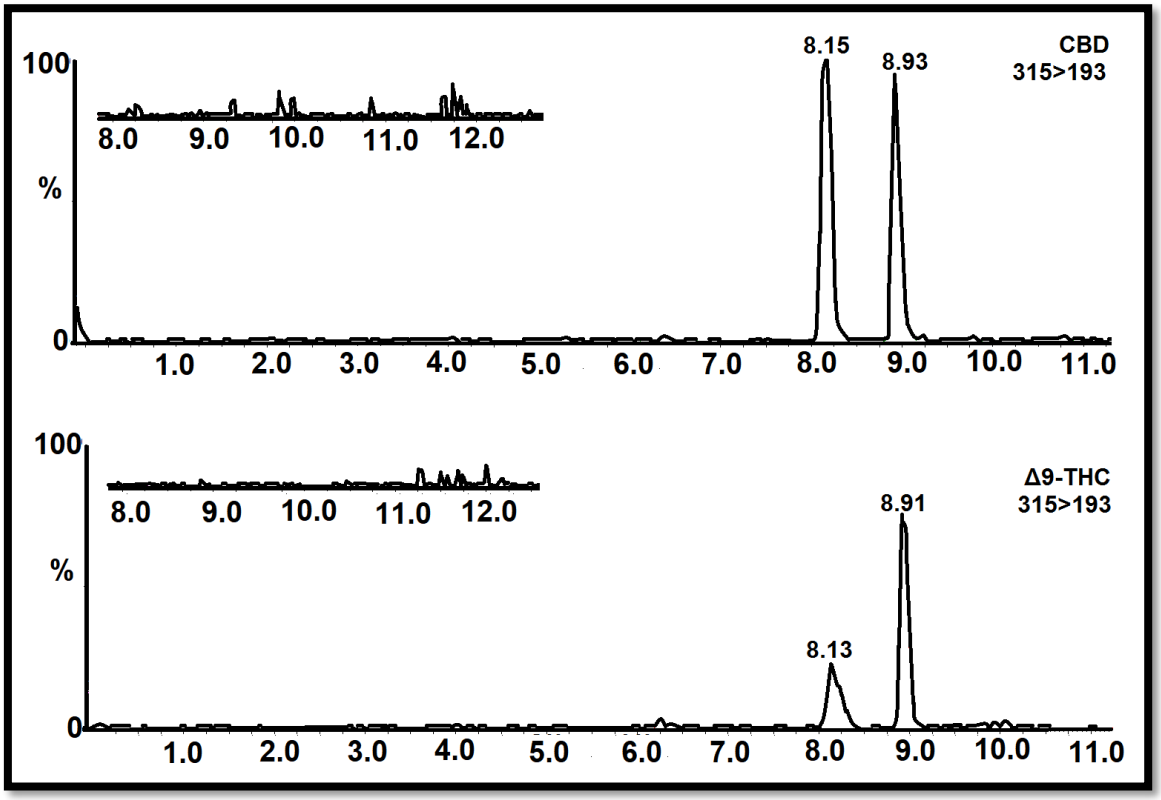
A seletividade do método foi comprovada através do cromatograma da amostra de plasma branco e do plasma enriquecido com os analitos (CBD e Δ9-THC), processadas nas condições de extração determinadas previamente. Na Figura 34, é comprovado que não há interferentes no tempo de retenção dos analitos.

Os estudos de estabilidade do CBD e do Δ9-THC não foram realizados, pois já existem dados na literatura que compravam a estabilidade dos analitos em amostras de plasma. Quando as amostras foram armazenadas ao abrigo da luz, os analitos mostraram ser estáveis nos testes de curto prazo (24 horas) e de congelamento/descongelamento (3 ciclos). Além disso, as amostras processadas também foram estáveis após 24 horas mantidas a temperatura ambiente e protegidas da luz (LUÍS MIGUEL LOUREIRO FERNANDES, 2013).

A reprodutibilidade do procedimento de síntese do capilar MIP também foi avaliada. Nesse teste, três capilares MIP foram sintetizados e avaliados com amostras de plasma branco enriquecidas com CBD e Δ9-THC na concentração

de 150 ng mL^{-1} (n=3). Os valores de CV encontrados foram de 11,4% para CBD e 8,6% para o Δ9-THC.

Figura 34. Cromatogramas das amostras de plasma enriquecido com CBD e Δ9-THC no LIQ e de plasma branco (superior) empregando o método *in-tube* SPME/UHPLC-MS/MS



Fonte: próprio autor

2.IV.8. Amostras reais

A Tabela 16 apresenta as concentrações de CBD determinadas nas amostras dos pacientes em terapia com o CBD (300 mg). O CV das triplicatas (n=3) foram inferiores a 8% e não foi observada nenhuma substância interferente no tempo de retenção dos analitos.

Tabela 16. Concentrações plasmáticas determinadas (n=3) em amostras de plasma de pacientes em terapia com o CBD

Analito	Concentração plasmática (ng mL^{-1}) (CV)			
	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3	Paciente 4
CBD	48,9 (7,1%)	100,9 (5,3%)	201,8 (7,5%)	35,9 (4,1%)
Δ9-THC	< LIQ	< LIQ	< LIQ	< LIQ

*Todas as amostras foram processadas em triplicata.

As concentrações plasmáticas variam de 35,9 a 201,8 ng mL^{-1} para CBD. Apesar de todos os pacientes terem recebido a mesma dosagem do fármaco e as coletas terem sido realizadas em intervalos de tempo semelhante, foi possível observar diferenças nas concentrações plasmáticas determinadas.

Essas variações encontradas podem ser atribuídas ao fato que cada paciente apresentar metabolismo singular. É possível encontrar neste grupo de estudo, metabolizadores lento, normais ou rápidos. Ademais, seria necessário investigar os medicamentos de uso concomitantemente com o CBD, que poderiam interferir nas vias de farmacocinética. Para fazer inferências acerca dessas variáveis, seria necessário um estudo mais detalhado, incluindo dados sobre estilo de vida e medicamentos utilizados.

Cabe ressaltar que, devido à utilização e aprovação recente do CBD, até o presente momento, ainda não foi determinado o intervalo terapêutico. Segundo a OMS, as doses orais que tem sido administradas variam de 100 – 800 mg / dia (WHO, 2017). A farmacocinética do fármaco ainda é pouco estudada, mas acredita-se que o pico plasmático é atingido com cerca de 3 horas após a administração e quando utilizada uma concentração de 150 mg foram encontradas concentrações plasmáticas de 75 – 95 ng mL^{-1} (JUNIOR, 2013).

As concentrações de Δ9-THC não foram determinadas, pois as áreas obtidas foram inferiores ao LIQ. Este resultado era o esperado, pois o fármaco administrado aos pacientes apresenta pureza de 99,9% de CBD, ou seja, não apresenta o Δ9-THC em sua composição. Ademais, com esses resultados é possível inferir que os pacientes não utilizaram, recentemente, a *Cannabis* de forma recreativa.

2.IV.9. Comparação com demais métodos da literatura

A LLE e SPE têm sido as técnicas mais utilizadas para a determinação de CBD e Δ9-THC em amostras biológicas (Tabela 17).

Os métodos descritos na literatura apresentaram menores valores de LIQ. No entanto, o método on-line *in-tube* SPME/UHPLC-MS/MS padronizado utilizou fase extratora seletiva e apresentou menor tempo de análise, utilização de menores volumes de solventes orgânicos e de amostra biológica.

Tabela 17. Comparação de métodos analíticos para a determinação de CBD e Δ9-THC em amostras biológicas

Analito	Volume Amostra Inicial	LIQ (ng mL^{-1})	Extração	Volume de Solvente Orgânico	Sorvente	Detecção	Ref.
Δ9 -THC, 11-OH-THC, THCCOOH e CBD	Plasma humano (1000 µL)	0,500	SPE	7 mL (hexano + metanol + acetonitrila)	SPE polimérico	GC-MS	(KARSCHNER et al., 2010)
CBD, Δ9-THC, CBN, 11-OH-THC e THCCOOH	Fluído oral (250 µL)	0,500	SPE	10 mL (metanol + acetonitrila + hexano + acetona)	CEREX® PolycromTM	GC-MS	(MILMAN et al., 2010)
Δ9-THC, THCCOOH, CBD e CBN	Fluído oral (250 µL)	0,500	SPE	7 mL (metanol + acetonitrila + hexano)	CEREX® PolycromTM	microLC-MS/MS	(CONCHEIRO et al., 2013)
CBD, Δ9-THC, CBN, 11-OH-THC e THCCOOH	Sangue *post-mortem* (1000 µL)	0,500	LLE	10 mL (hexano + acetato de etil)	-	GC-MS	(ANDREWS; PATERSON, 2012)
CBD, Δ9-THC, CBN, 11-OH-THC e THCCOOH	Fluído oral (125 µL)	0,300	MEPS	800 µL (metanol)	C18	LC-MS/MS	(SERGI et al., 2013a)
CBD, Δ9-THC, CBN, 11-OH-THC e THCCOOH	Urina humana (90 µL)	3,000	µ-SPE	550 µL (acetonitrila +metanol)	Omix C18	LC-MS/MS	(MONTESANO et al., 2014)
Δ9-THC, CBD, CBN e outros	Urina humana (0,5 mL)	1,000	LLE	3 mL (éter + n-hexano + acetato de etila)	-	LC-MS/MS	(DONG et al., 2016)
Δ9-THC, CBD, 11-OH THC e THCCOOH	Plasma humano (200 µL)	1,560	Precipitação de proteínas	1 mL (acetonitrila)	-	UHPLC-MS/MS	(JAMWAL et al., 2017)
CBD, Δ9- THC e outros	Sangue de rato (200 µL)	5,000	SPE	1 mL (acetonitrila)	Tubo de remoção de fosfolipídios (Phree™)	LC-MS/MS	(PALAZZOLI et al., 2018)
Δ9-THC, CBD e outros	Tecido de cerebro (500 µL)	0,5 ng g^{-1}	SPE	2,5 mL (acetonitrila + metanol)	Tubo de remoção de fosfolipídios (Phree™)	LC-MS/MS	(CITTI et al., 2018b)
CBD e Δ9-THC	Plasma humano (300 µL)	10	*In-tube* SPME	150 µL (acetonitrila)	MIP monolítico	UHPLC-MS/MS	Presente trabalho

A extração seletiva da fase MIP e a etapa de exclusão dos componentes endógenos, anterior à eluição dos analitos, certamente atenuou o efeito matriz do método *in-tube* SPME/UHPLC-MS/MS.

Adicionalmente, a fase MIP apresentou resistência ao *stress* mecânico e aos solventes orgânicos utilizados no processo de extração, podendo ser utilizado em mais de 50 extrações sem perda significativa na eficiência da extração.

O método proposto, ainda, apresenta como vantagem o fato de ser totalmente automatizado, permitindo a hifenação do preparo da amostra e da separação cromatográfica. Com isso, obtivemos um método rápido (14 min) com menores fontes de erro. Adicionalmente, a faixa linear estabelecida permitiu determinar os analitos em amostras de plasma de pacientes em terapia com o CBD.

2.V Conclusões

O método UHPLC-MS/MS, inicialmente desenvolvido para análise de CBD e Δ9-THC, apresentou adequada separação dos analitos após avaliação das diferentes fases móveis e otimização das condições MS/MS.

A fase MIP monolítica sintetizada com a utilização do CBD_R apresentou adequada resistência ao *stress* mecânico e aos solventes orgânicos utilizados no processo de extração. A síntese do MIP apresentou boa rentabilidade e utilização de pequena massa da molécula molde.

A fase MIP monolítica sintetizada apresentou bandas características dos grupos funcionais dos reagentes de síntese nos espectros FTIR, mostrando que foram incorporados na cadeia polimérica. A caracterização obtida pelas imagens do MEV e do MET, mostraram que o MIP apresenta uma maior estrutura porosa do que o NIP. Também foi avaliando a capacidade de sorção, sendo observado que uma maior quantidade de CBD é adsorvida do que de Δ9-THC. Além disso, a fase mostrou ser seletiva quando avaliada a extração de canabinóides concomitante com demais fármacos.

O método *in-tube* SPME/UHPLC-MS/MS com o capilar MIP monolítico, na primeira dimensão, possibilitou o acoplamento da etapa de preparo da amostra com a análise cromatográfica, diminuindo as fontes de erro e o tempo de análise. Em razão das dimensões da coluna RAM da primeira dimensão, foi possível a utilização de pequenos volumes de amostra biológica e de solvente orgânico.

A validação do método *in-tube* SPME/UHPLC-MS/MS para determinação de CBD e Δ9-THC mostrou ser adequada na faixa linear para determinação dos analitos em amostras biológicas, com satisfatória precisão e exatidão. A determinação de CBD e Δ9-THC, em amostras de plasma de 4 pacientes, comprovou que o método desenvolvido pode ser adequadamente utilizado para fins de farmacocinética, monitorização terapêutica ou para auxiliar na determinação do mecanismo de ação do fármaco.

CONCUSÃO FINAL

CONCLUSÃO FINAL

O desenvolvimento e validação dos dois métodos UHPLC-MS/MS no modo *column switching* para determinação de AEA e 2-AG e de CBD e Δ9-THC em amostras biológicas confirmaram as vantagens dos métodos *online*, ou seja, a diminuição do consumo de solvente orgânico, do tempo de análise, das fontes de erro e da exposição do analista às amostras biológicas.

Em razão das dimensões das colunas 1D do sistema *column switching*, foi possível utilizar pequenos volumes de amostras biológicas e solvente orgânico.

As fases avaliadas na primeira dimensão (RAM e MIP) apresentaram seletividade, capacidade sortiva, estabilidade mecânica e química adequadas para diferentes aplicações na área de neurociências. A caracterização química e física da fase MIP monolítica comprovou distinta superfície porosa entre o MIP e NIP e incorporação dos grupos funcionais dos reagentes de síntese.

Os métodos desenvolvidos foram aplicados com sucesso para as análises de amostras biológicas de pacientes com a DP.

Os resultados obtidos em amostras de plasma e LCR são semelhantes aos da literatura, os quais indicavam alterações do sistema endocanabinóide na DP. Portanto, os endocanabinódes podem ser potenciais biomarcadores para o diagnóstico precoce da DP.

Ademais, as alterações confirmadas do sistema endocanabinóide na DP reforçam a necessidade de estudos que utilizem como tratamento alternativo não-dopaminérgico os derivados da *Cannabis*.

Assim, o método desenvolvido para a determinação de CBD em amostras de plasma poderá ser utilizado para fins de monitorização terapêutica, elucidação do mecanismo de ação, ou estudos de farmacocinética nas avaliações do CBD como fármaco alternativo no tratamento da DP.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ANVISA (AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). **Resolução RDC Nº 27, DE 17 de maio de 2012**, 2012.

ANVISA (AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). **Resolução RDC Nº 166, DE 24 de julho de 2017**, 2017.

AMOAKO, A. A. et al. Quantitative analysis of anandamide and related acylethanolamides in human seminal plasma by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 878, n. 31, p. 3231–3237, 2010.

ANDREWS, R.; PATERSON, S. A validated method for the analysis of cannabinoids in post-mortem blood using liquid – liquid extraction and two-dimensional gas chromatography – mass spectrometry. **Forensic Science International**, v. 222, n. 1-3, p. 111–117, 2012.

ANGELI, I. et al. A novel single-step GC–MS/MS method for cannabinoids and 11-OH-THC metabolite analysis in hair. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 155, p. 1–6, 2018.

ANZILLOTTI, L. et al. Cannabinoids determination in oral fluid by SPME-GC/MS and UHPLC-MS/MS and its application on suspected drivers. **Science and Justice**, v. 54, n. 6, p. 421–426, 2014.

BABLOK, H. P. W. A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. **Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, v. 21, p. 709–720, 1983.

BALVERS, M. G. J. et al. Liquid chromatography – tandem mass spectrometry analysis of free and esterified fatty acid N -acyl ethanolamines in plasma and blood cells. **Analytical Biochemistry**, v. 434, n. 2, p. 275–283, 2013.

BALVERS, M. G. J.; VERHOECKX, K. C. M.; WITKAMP, R. F. Development and validation of a quantitative method for the determination of 12 endocannabinoids and related compounds in human plasma using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 877, n. 14-15, p. 1583–1590, 2009.

BATTISTA, N. et al. Analytical approaches for the determination of

phytocannabinoids and endocannabinoids in human matrices. **Drug Testing and Analysis**, v. 6, n. 1-2, p. 7–16, 2014.

BELTRAN, A. et al. Synthesis by precipitation polymerisation of molecularly imprinted polymer microspheres for the selective extraction of carbamazepine and oxcarbazepine from human urine. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 12, p. 2248–2253, 2009.

BEN-SHABAT, S. et al. New Cannabidiol Derivatives: Synthesis, Binding to Cannabinoid Receptor, and Evaluation of Their Antiinflammatory Activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 3, p. 1113–1117, 2006.

BESSONNEAU, V. et al. In vivo solid phase microextraction sampling of human saliva for non-invasive and on-site monitoring. **Analytica Chimica Acta**, v. 856, p. 35–45, 2015.

BILGIN, M. et al. Quantitative profiling of endocannabinoids in lipoproteins by LC – MS / MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, p. 5125–5131, 2015.

BROECKER, S.; PRAGST, F. Isomerization of cannabidiol and Δ9-tetrahydrocannabinol during positive electrospray ionization. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 26, p. 1407–1414, 2012.

BROWN, B. **Hematology: Principles and Procedures.** 6ª edição. Michigan: Lea & Febiger, 1973 .

BU, Y. et al. An organically modified silica aerogel for online in-tube solid-phase microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1517, p. 203–208, 2017.

BYSTROWSKA, B.; SMAGA, I. Troubleshooting in LC-MS/MS method for determining endocannabinoid and endocannabinoid-like molecules in rat brain structures applied to assessing the brain endocannabinoid/endovanilloid system significance. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 6516, n. 4, p. 315–322, 2014.

CAMPÍNS-FALCÓ, P.; HERRÁEZ-HERNÁNDEZ, R.; SEVILLANO-CABEZA, A. Column-switching techniques for high-performance liquid chromatography of drugs in biological samples. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 619, n. 2, p. 177–190, 1993.

CENTONZE, D. et al. The endocannabinoid system is dysregulated in multiple sclerosis and in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Brain**, v. 130, n. 10, p. 2543–2553, 2007.

CHAGAS, M. H. N. et al. Cannabidiol can improve complex sleep-related behaviours associated with rapid eye movement sleep behaviour disorder in Parkinson's disease patients: a case series. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 39, n. 5, p. 564–566, 2014a.

CHAGAS, M. H. N. et al. Effects of cannabidiol in the treatment of patients with Parkinson's disease: An exploratory double-blind trial. **Journal of Psychopharmacology**, v. 28, n. 11, p. 1088–1098, 2014b.

CHAVES, A. R.; QUEIROZ, M. E. C. Immunoaffinity in-tube solid phase microextraction coupled with liquid chromatography with fluorescence detection for determination of interferon α in plasma samples. **Journal of Chromatography B**, v. 928, p. 37–43, 2013.

CHOI, Y. H. et al. NMR assignments of the major cannabinoids and cannabiflavonoids isolated from flowers of Cannabis sativa. **Phytochemical Analysis**, v. 15, n. 6, p. 345–354, 2004.

CHRISTIAN, R. B. Epidemiology, diagnosis and differential diagnosis in Parkinson's disease tremor. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 18S1, p. S90–S92, 2012.

CITTI, C. et al. Pharmaceutical and biomedical analysis of cannabinoids: A critical review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 147, p. 565–579, 2018a.

CITTI, C. et al. Untargeted rat brain metabolomics after oral administration of a single high dose of cannabidiol. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 161, p. 1–11, 2018b.

CLAESON, A.-S. et al. Levels of oxylipins, endocannabinoids and related lipids in plasma before and after low-level exposure to acrolein in healthy individuals and individuals with chemical intolerance. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)**, v. 121, p. 60–67, 2017.

COATES, J. Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach. In: **Encyclopedia of Analytical Chemistry**. Chichester, UK: John Wiley & Sons,

Ltd, 2006.

CONCHEIRO, M. et al. Simultaneous quantification of Δ9-tetrahydrocannabinol, 11-nor-9-carboxy-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and cannabinol in oral fluid by microflow-liquid chromatography–high resolution mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1297, p. 123–130, 2013.

CORMACK, P. A.; ELORZA, A. Z. Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterisation. **Journal of Chromatography B**, v. 804, n. 1, p. 173–182, 2004.

CRIPPA, J. A. S.; ZUARDI, A. W.; HALLAK, J. E. C. Uso terapêutico dos canabinoides em psiquiatria. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 32, 2010.

DE CASTRO, A. et al. Quantification of selected synthetic cannabinoids and Δ9-tetrahydrocannabinol in oral fluid by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1295, p. 99–106, 2013.

DE FARIA, H. D. et al. Direct extraction of tetracyclines from bovine milk using restricted access carbon nanotubes in a column switching liquid chromatography system. **Food Chemistry**, v. 225, p. 98–106, 2017.

DE GISI, S. et al. Characteristics and adsorption capacities of low-cost sorbents for wastewater treatment: A review. **Sustainable Materials and Technologies**, v. 9, p. 10–40, 2016.

DE OLIVEIRA ISAC MORAES, G., DA SILVA, L.M., DOS SANTOS-NETO, A.J., FLORENZANO, F.H., FIGUEIREDO, E. C. A new restricted access molecularly imprinted polymer capped with albumin for direct extraction of drugs from biological matrices: the case of chlorpromazine in human plasma. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, p. 7687–7696, 2013.

DEVINSKY, O. et al. Cannabidiol: Pharmacology and potential therapeutic role in epilepsy and other neuropsychiatric disorders. **Epilepsia**, v. 55, n. 6, p. 791–802, 2014.

DI MARZO, V. Enhanced levels of endogenous cannabinoids in the globus pallidus are associated with a reduction in movement in an animal model of Parkinson’s disease. **The FASEB Journal**, v. 14, n. 10, p. 1432–1438, 2000.

DOMINGUES, D. S. et al. Analysis of drugs in plasma samples from schizophrenic patients by column-switching liquid chromatography-tandem mass spectrometry with organic – inorganic hybrid cyanopropyl monolithic column. **Journal of Chromatography B**, v. 993-994, p. 26–35, 2015.

DONG, H.; DU, H.; QIAN, X. Theoretical Prediction of p K a Values for Methacrylic Acid Oligomers Using Combined Quantum Mechanical and Continuum Solvation Methods. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 112, n. 49, p. 12687–12694, 2008.

DONG, X. et al. Simultaneous determination of major phytocannabinoids, their main metabolites, and common synthetic cannabinoids in urine samples by LC-MS/MS. **Journal of Chromatography B**, v. 1033-1034, p. 55–64, 2016.

DULAURENT, S. et al. Simultaneous determination of Δ9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol, cannabinol and 11-nor-Δ9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in hair using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Forensic Science International**, v. 236, p. 151–156, 2014.

ECKERT, E.; GÖEN, T. Rapid determination of four short-chain alkyl mercapturic acids in human urine by column-switching liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 965, p. 54–60, 2014.

EMÍDIO, E. S.; DE MENEZES PRATA, V.; DÓREA, H. S. 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**, v. 670, n. 1-2, p. 63–71, 2010.

FAGAN, S. G.; CAMPBELL, V. A. The influence of cannabinoids on generic traits of neurodegeneration. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, n. 6, p. 1347–1360, 2014.

FAGUNDES, V. F. et al. Rapid and direct analysis of statins in human plasma by column-switching liquid chromatography with restricted-access material. **Journal of Chromatography B**, v. 947-948, p. 8–16, 2014.

FENG, J. et al. Poly(ionic liquids)-coated stainless-steel wires packed into a polyether ether ketone tube for in-tube solid-phase microextraction. **Journal of Separation Science**, v. 40, n. 24, p. 4773–4779, 2017.

FERNÁNDEZ-AMADO, M. et al. Strengths and weaknesses of in-tube solid-phase microextraction: A scoping review. **Analytica Chimica Acta**, v. 906, p. 41–57, 2016.

FERNÁNDEZ-RUIZ, J. et al. The endogenous cannabinoid system and brain development. **Trends in Neurosciences**, v. 23, n. 1, p. 14–20, 2000.

FERRAZ, H.B., BORGES, V. Doença de Parkinson. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 59, p. 207–219, 2002.

GACHET, M. S. et al. A quantitiative LC-MS/MS method for the measurement of arachidonic acid, prostanoids, endocannabinoids, N-acylethanolamines and steroids in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 976-977, p. 6–18, 2015.

GARCÍA-ARENCIBIA, M. et al. Evaluation of the neuroprotective effect of cannabinoids in a rat model of Parkinson's disease: Importance of antioxidant and cannabinoid receptor-independent properties. **Brain Research**, v. 1134, p. 162–170, 2007.

GARST, C. et al. Optimized extraction of 2-arachidonyl glycerol and anandamide from aortic tissue and plasma for quantification by LC-MS/MS. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 118, n. 5, p. 814–820, 2016.

IUFFRIDA, A.; MARTINEZ, A. The Endocannabinoid System and Parkinson Disease. In: **The Endocannabinoid System**. Elsevier, 2017. p. 63–81.

GIUFFRIDA, A.; MCMAHON, L. R. In vivo pharmacology of endocannabinoids and their metabolic inhibitors: Therapeutic implications in Parkinson's disease and abuse liability. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 91, n. 3-4, p. 90–103, 2010.

GONG, Y. et al. Simultaneous determination of endocannabinoids in murine plasma and brain substructures by surrogate-based LC–MS/MS: Application in tumor-bearing mice. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 111, p. 57–63, 2015.

GOUVEIA-FIGUEIRA, S. et al. Plasma levels of the endocannabinoid anandamide, related N -acylethanolamines and linoleic acid-derived oxylipins in patients with migraine. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty**

Acids (PLEFA), v. 120, p. 15–24, 2017.

GOUVEIA-FIGUEIRA, S.; NORDING, M. L. Development and validation of a Sensitive UPLC-ESI-MS/MS Method for the simultaneous quantification of 15 endocannabinoids and related compounds in milk and other biofluids. **Analytical Chemistry**, v. 86, n.2, p. 1186-1195, 2014.

GOUVEIA-FIGUEIRA, S.; NORDING, M. L. Validation of a tandem mass spectrometry method using combined extraction of 37 oxylipins and 14 endocannabinoid-related compounds including prostamides from biological matrices. **Prostaglandins and other lipid mediators**, v. 121, p. 110–121, 2015.

GRAUWILER, S. B.; SCHOLER, A.; DREWE, J. Development of a LC/MS/MS method for the analysis of cannabinoids in human EDTA-plasma and urine after small doses of Cannabis sativa extracts. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 850, n. 1-2, p. 515–522, 2007.

GROTENHERMEN, F. Clinical Pharmacokinetics of Cannabinoids. **Journal of Cannabis Therapeutics**, v. 3, n. 1, p. 3–51, 2003.

GUSTAFSON, R. et al. Validated method for the simultaneous determination of Δ9-tetrahydrocannabinol (THC), 11-hydroxy-THC and 11-nor-9-carboxy-THC in human plasma using solid phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry with positive chemical ionization. **Journal of Chromatography B**, v. 798, n. 1, p. 145–154, 2003.

HAKOBYAN, L. et al. Determination of meropenem in endotracheal tubes by in-tube solid phase microextraction coupled to capillary liquid chromatography with diode array detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 151, p. 170–177, 2018.

HAN, B. et al. Quantitative LC – MS / MS analysis of arachidonoyl amino acids in mouse brain with treatment of FAAH inhibitor. **Analytical Biochemistry**, v. 432, n. 2, p. 74–81, 2013.

HO, T. D. et al. Chemical immobilization of crosslinked polymeric ionic liquids on nitinol wires produces highly robust sorbent coatings for solid-phase microextraction. **Analytica Chimica Acta**, v. 843, p. 18–26, 2014.

IVANOV, I.; BORCHERT, P.; HINZ, B. A simple method for simultaneous determination of N-arachidonoylethanolamine, N-oleoylethanolamine, N-palmitoylethanolamine and 2-arachidonoylglycerol in human cells. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 6, p. 1781–1787, 2015.

JAMWAL, R. et al. Ultra-high performance liquid chromatography tandem mass-spectrometry for simple and simultaneous quantification of cannabinoids. **Journal of Chromatography B**, v. 1048, p. 10–18, 2017.

JARHO, P. et al. Hydroxypropyl-β-cyclodextrin increases aqueous solubility and stability of anandamide. **Life Sciences**, v. 58, n. 10, p. 181–185, 1996.

MARTINEZ-ORGADO, J. B. S. P. et al. The Seek of Neuroprotection: Introducing Cannabinoids. **Recent Patents on CNS Drug Discovery**, v. 2, n. 2, p. 131–139, 2007.

JUNG, K. et al. An amyloid β42-dependent deficit in anandamide mobilization is associated with cognitive dysfunction in Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 33, n. 8, p. 1522–1532, 2012.

JUNIOR, L. C. P. **Avaliação da Administração Oral do Cannabidiol em voluntários sadios**. Dissertação (Mestrado em Toxicologia) – Faculdade de Ciências Farmaceuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, p. 86. 2013.

KAMEI, T. et al. Method development and validation of the simultaneous determination of a novel topoisomerase 1 inhibitor, the prodrug, and the active metabolite in human plasma using column-switching LC–MS/MS, and its application in a clinical trial. **Journal of Chromatography B**, v. 879, n. 30, p. 3415–3422, 2011.

KANTAE, V. et al. Quantitative profiling of endocannabinoids and related N -acylethanolamines in human CSF using nano LC-MS/MS. **Journal of Lipid Research**, v. 58, n. 3, p. 615–624, 2017.

KARSCHNER, E. L. et al. Validation of a two-dimensional gas chromatography mass spectrometry method for the simultaneous quantification of cannabidiol, Δ9- tetrahydrocannabinol (THC), 11-hydroxy-THC, and 11-nor-9-carboxy-THC in plasma. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, n. 2, p. 603–611, 2010.

KATAOKA, H.; SAITO, K. Recent advances in column switching sample preparation in bioanalysis. **Bioanalysis**, v. 4, n. 7, p. 809–832, 2012.

KLUGER, B. et al. The therapeutic potential of cannabinoids for movement disorders. **Movement Disorders**, v. 30, n. 3, p. 313–327, 2015.

KUCEROVA, B. et al. Comparison of a new high-resolution monolithic column with core-shell and fully porous columns for the analysis of retinol and α-tocopherol in human serum and breast milk by ultra-high-performance liquid chromatography. **Journal of separation science**, v. 36, p. 2223–2230, 2013.

LACROIX, C.; SAUSSEREAU, E. Fast liquid chromatography/tandem mass spectrometry determination of cannabinoids in micro volume blood samples after dabsyl derivatization. **Journal of Chromatography B**, v. 905, p. 85–95, 2012

LAM, P. M. W. et al. Ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the measurement of anandamide in human plasma. **Analytical Biochemistry**, v. 380, n. 2, p. 195–201, 2008.

LAM, P. M. W.; MARCZYLO, T. H.; KONJE, J. C. Simultaneous measurement of three N -acylethanolamides in human bio-matrices using ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, p. 2089–2097, 2010.

LASTRES-BECKER, I. et al. Cannabinoids provide neuroprotection against 6-hydroxydopamine toxicity in vivo and in vitro: relevance to Parkinson's disease. **Neurobiology of Disease**, v. 19, n. 1-2, p. 96–107, 2005.

LEE, X.-P. et al. Rapid and highly sensitive analysis of benzodiazepines and tandospirone in human plasma by automated on-line column-switching UFLC-MS/MS. **Legal medicine**, v. 24, p. 36–55, 2017.

LEHTONEN, M. et al. Determination of endocannabinoids in nematodes and human brain tissue by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 879, n. 11-12, p. 677–694, 2011.

LEWEKE, F. M. et al. Anandamide levels in cerebrospinal fluid of first-episode schizophrenic patients: impact of cannabis use. **Schizophrenia Research**, v. 94, n. 1-3, p. 29–36, 2007.

LI, D. et al. Discovery of xanthine oxidase inhibitors from a complex mixture using an online, restricted-access material coupled with column-switching liquid chromatography with a diode-array detection system. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, n. 7, p. 1975–1984, 2014.

LIN, L.; YANG, H.; JONES, P. J. H. Prostaglandins , Leukotrienes and Essential Fatty Acids Quantitative analysis of multiple fatty acid ethanolamides using ultra- performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 87, n. 6, p. 189–195, 2012.

LIN, Z. et al. Preparation of boronate-functionalized molecularly imprinted monolithic column with polydopamine coating for glycoprotein recognition and enrichment. **Journal of Chromatography A**, v. 1319, p. 141–147, 2013.

LIPUT, D. J. et al. Quantification of anandamide, oleoylethanolamide and palmitoylethanolamide in rodent brain tissue using high performance liquid chromatography–electrospray mass spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 4, n. 4, p. 234–241, 2014.

LIU, H.; ROW, K. H.; YANG, G. Monolithic Molecularly Imprinted Columns for Chromatographic Separation. **Chromatographia**, v. 61, n. 9-10, p. 429–432, 2005.

LIU, X. et al. Monolithic molecularly imprinted polymer for sulfamethoxazole and molecular recognition properties in aqueous mobile phase. **Analytica Chimica Acta**, v. 571, n. 2, p. 235–241, 2006.

LÓPEZ-GARCÍA, E. et al. Simultaneous LC–MS/MS determination of 40 legal and illegal psychoactive drugs in breast and bovine milk. **Food Chemistry**, v. 245, p. 159–167, 2018.

LUÍS MIGUEL LOUREIRO FERNANDES. **Determinação de tetrahidrocanabinol 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**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior. Covilhã, p. 153. 2013.

LULIŃSKI, P. et al. A separation of tyramine on a 2-(4-methoxyphenyl)

ethylamine imprinted polymer: an answer from theoretical and experimental studies. **Talanta**, v. 129, p. 155–164, 2014.

LUO, X.; LI, G.; HU, Y. In-tube solid-phase microextraction based on NH 2 - MIL-53(Al)-polymer monolithic column for online coupling with high-performance liquid chromatography for directly sensitive analysis of estrogens in human urine. **Talanta**, v. 165, p. 377–383, 2017.

LUQUE-CÓRDOBA, D. et al. Study of sample preparation for determination of endocannabinoids and analogous compounds in human serum by LC–MS/MS in MRM mode. **Talanta**, v. 185, p. 602–610, 2018.

MARCZYLO, T. H. et al. A solid-phase method for the extraction and measurement of anandamide from multiple human biomatrices. **Analytical Biochemistry**, v. 384, n. 1, p. 106–113, 2009.

MARCZYLO, T. H. et al. Anandamide levels in human female reproductive tissues: Solid-phase extraction and measurement by ultraperformance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, v. 400, n. 2, p. 155–162, 2010.

MAYES, A.; WHITCOMBE, M. Synthetic strategies for the generation of molecularly imprinted organic polymers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 12, p. 1742–1778, 2005.

MECHOULAM, R.; PARKER, L. A.; GALLILY, R. Cannabidiol: an overview of some pharmacological aspects. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 42, n. S1, p. 11S–19S, 2002.

MEI, M.; HUANG, X. Online analysis of five organic ultraviolet filters in environmental water samples using magnetism-enhanced monolith-based in-tube solid phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1525, p. 1–9, 2017.

MERCK MILLIPORE. **Manual LiChroCART® 25-4 LiChrospher® RP-8 ADS.** Disponível em: <http://www.merckmillipore.com/BR/pt/product/LiChroCART-25-4-LiChrospher-RP-8-ADS,MDA_CHEM-150209#relations>. Acesso em: 1 dez. 2015.

MILMAN, G. et al. Simultaneous quantification of cannabinoids and metabolites in oral fluid by two-dimensional gas chromatography mass spectrometry.

Journal of Chromatography A, v. 1217, n. 9, p. 1513–1521, 2010.

MIRANDA, L. F. C.; DOMINGUES, D. S.; QUEIROZ, M. E. C. Selective solid-phase extraction using molecularly imprinted polymers for analysis of venlafaxine, O-desmethylvenlafaxine, and N-desmethylvenlafaxine in plasma samples by LC-MS/MS. **Journal of Chromatography A**, v. 458, p. 46-53, 2016.

MOLINER-MARTINEZ, Y. et al. Recent advances of in-tube solid-phase microextraction. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 205–213, 2015.

MONTESANO, C. et al. A µ-SPE procedure for the determination of cannabinoids and their metabolites in urine by LC–MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 91, p. 169–175, 2014.

MOREAU, R. L. M.; SIQUEIRA, M. E. P. B. **Toxicologia Analítica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,2016.

MORGAN, C. J. A.; CURRAN, H. V. Effects of cannabidiol on schizophrenia-like symptoms in people who use cannabis. **The British Journal of Psychiatry**, v. 192, n. 4, p. 306–307, 2008.

MOUNSEY, R. B. et al. Increasing levels of the endocannabinoid 2-AG is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson’s disease. **Experimental Neurology**, v. 273, p. 36–44, 2015.

MUGURUZA, C. et al. Quantification of endocannabinoids in postmortem brain of schizophrenic subjects. **Schizophrenia Research**, v. 148, n. 1-3, p. 145–150, 2013.

MUSSHOFF, F. et al. Automated headspace solid-phase dynamic extraction for the determination of cannabinoids in hair samples. **Forensic Science International**, v. 133, n. 1-2, p. 32–38, 2003.

MWANZA, C. et al. Simultaneous HPLC-APCI-MS/MS quantification of endogenous cannabinoids and glucocorticoids in hair. **Journal of Chromatography B**, v. 1028, p. 1–10, 2016.

NICOARA, S. C. et al. Development of sample clean up methods for the analysis of Mycobacterium tuberculosis methyl mycocerosate biomarkers in sputum extracts by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 986-987, p. 135–142, 2015.

NIESSEN, W. M. A. **Liquid Chromatography-Mass Spectrometry**. 3ed. Nova Iorque: Springer-verlag, 2014.

OBATA, T. et al. Simultaneous determination of endocannabinoids (arachidonylethanolamide and 2-arachidonylglycerol) and isoprostane (8-epiprostaglandin F2α) by gas chromatography–mass spectrometry-selected ion monitoring for medical samples. **Journal of Chromatography B**, v. 792, n. 1, p. 131–140, 2003.

OBESO, J. A. et al. The origin of motor fluctuations in Parkinson's disease: Importance of dopaminergic innervation and basal ganglia circuits. **Neurology**, v. 62, n. Issue 1, Supplement 1, p. S17–S30, 2004.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de Toxicologia**. 4 ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2014.

OTTRIA, R. et al. Simultaneous ultra-high performance liquid chromathograpy-electrospray ionization-quadrupole-time of flight mass spectrometry quantification of endogenous anandamide and related N-acylethanolamides in bio-matrices. **Journal of Chromatography B**, v. 958, p. 83–89, 2014.

OU, J. et al. Determination of dl-tetrahydropalmatine in Corydalis yanhusuo by l-tetrahydropalmatine imprinted monolithic column coupling with reversed-phase high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1117, n. 2, p. 163–169, 2006.

P.S. CAMARGO, S. et al. Development and Validation of a Liquid-Liquid Extraction and Gas Chromatography/Mass Spectrometry Methodology for Cannabidiol Analysis in Human Plasma. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 7, n. 4, p. 228–234, 2011.

PALAZZOLI, F. et al. Development of a simple and sensitive liquid chromatography triple quadrupole mass spectrometry (LC–MS/MS) method for the determination of cannabidiol (CBD), Δ 9 -tetrahydrocannabinol (THC) and its metabolites in rat whole blood after oral administration. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 150, p. 25–32, 2018.

PANG, J. et al. Development of on-line monolith-based in-tube solid phase microextraction for the sensitive determination of triazoles in environmental waters. **Talanta**, v. 184, p. 411–417, 2018.

PARK, M. et al. Quantitative determination of 11-nor-9-carboxy-tetrahydrocannabinol in hair by column switching LC–ESI-MS3. **Journal of Chromatography B**, v. 947-948, p. 179–185, 2014.

PARMOVÁ, M. et al. An on-line coupling of nanofibrous extraction with column-switching high performance liquid chromatography - a case study on the determination of bisphenol A in environmental water samples. **Talanta**, v. 178, p. 141-146, 2018.

PERES, F. F. et al. Cannabidiol as a Promising Strategy to Treat and Prevent Movement Disorders? **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, 2018.

PISANI, V. et al. Dynamic changes of anandamide in the cerebrospinal fluid of Parkinson's disease patients. **Movement Disorders**, v. 25, n. 7, p. 920–924, 2010.

PREGO-MELEIRO, P. et al. Development and validation of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the determination of cannabinoids and phase I and II metabolites in meconium. **Journal of Chromatography A**, v. 1497, p. 118–126, 2017.

QI, M. et al. A robust capillary liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for quantitation of neuromodulatory endocannabinoids. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 29, n. 20, p. 1889–1897, 2015.

QUEIROZ, M. E. C. Microextração em sorvente empacotado (MEPS) para a determinação de fármacos em fluidos biológicos. **Scientia Chromatographica**, v. 3, n. 3, p. 223–229, 2011.

RACHKOV, A.; MINOURA, N. Recognition of oxytocin and oxytocin-related peptides in aqueous media using a molecularly imprinted polymer synthesized by the epitope approach. **Journal of Chromatography A**, v. 889, n. 1-2, p. 111–118, 2000.

RAMSEY, F.L., SCHAFER, D. W. **The statistical sleuth - a course in**

methods od data analysis. Belmont: Duxbury Press, 1997.

REYES-GARCÉS, N.; BOJKO, B.; PAWLISZYN, J. High throughput quantification of prohibited substances in plasma using thin film solid phase microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1374, p. 40–49, 2014.

S. J. GREGG, K. S. W. S. Adsorption, Surface Area and Porosity. **Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie**, v. 86, n. 10, p. 957–957, 1982.

SAGREDO, O. et al. Cannabinoids and Neuroprotection in Basal Ganglia Disorders. **Molecular Neurobiology**, v. 36, n. 1, p. 82–91, 2007.

SANTOS, M. G. et al. Analysis of tricyclic antidepressants in human plasma using online-restricted access molecularly imprinted solid phase extraction followed by direct mass spectrometry identification/quantification. **Talanta**, v. 163, p. 8–16, 2017.

SAÚDE, Ministério da Saude. Gabinete do Ministro. Portaria conjunta nº10: Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Doença de Parkinson, 2017.

SCHEIDWEILER, K. B.; DESROSIERS, N. A.; HUESTIS, M. A. Simultaneous quantification of free and glucuronidated cannabinoids in human urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Clinica Chimica Acta**, v. 413, n. 23-24, p. 1839–1847, 2012.

SCHRAG, A. Psychiatric aspects of Parkinson`s disease. **Journal of Neurology**, v. 251, n. 7, p. 795–804, 2004.

SCHREIBER, D. et al. Determination of anandamide and other fatty acyl ethanolamides in human serum by electrospray tandem mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, v. 361, n. 2, p. 162–168, 2007.

SCHRÖDER, N. et al. Cannabidiol and Neuroprotection: Evidence from Preclinical Studies. In: **Handbook of Cannabis and Related Pathologies**. Elsevier, 2017. p. 802–812.

SERGI, M. et al. Microextraction 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**, v.

1301, p. 139–146, 2013a.

SERGI, M. et al. Determination of the two major endocannabinoids in human plasma by µ-SPE followed by HPLC-MS/MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 2-3, p. 785–793, 2013b.

SERRA-MORA, P. et al. In tube-solid phase microextraction-nano liquid chromatography: Application to the determination of intact and degraded polar triazines in waters and recovered struvite. **Journal of Chromatography A**, v. 1513, p. 51–58, 2017.

SHAHAR, T.; TAL, N.; MANDLER, D. Molecularly imprinted polymer particles: Formation, characterization and application. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 495, p. 11–19, 2016.

SOLOMONS, T.W.G., FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**. 7. ed. Rio De Janeiro: Editora LT, 2000.

SOUVERAIN, S.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J. Matrix effect in LC-ESI-MS and LC-APCI-MS with off-line and on-line extraction procedures. **Journal of Chromatography A**, v. 1058, n. 1-2, p. 61–66, 2004a.

SOUVERAIN, S.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J.-L. Restricted access materials and large particle supports for on-line sample preparation: an attractive approach for biological fluids analysis. **Journal of Chromatography B**, v. 801, n. 2, p. 141–156, 2004b.

SOUZA, I. D. et al. Selective molecularly imprinted polymer combined with restricted access material for in-tube SPME/UHPLC-MS/MS of parabens in breast milk samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 932, n.17, p. 49–59, 2016.

SOUZA, I. D.; HANTAO, L. W.; QUEIROZ, M. E. C. Polymeric ionic liquid open tubular capillary column for on-line in-tube SPME coupled with UHPLC-MS/MS to determine endocannabinoids in plasma samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 1045, n.3, p. 108–116, 2018.

SPECTOR, R.; SNODGRASS, S. R.; JOHANSON, C. E. A balanced view of the cerebrospinal fl uid composition and functions : Focus on adult humans. **Experimental Neurology**, v. 273, p. 57–68, 2015.

TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, L. T. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 1: preparo e aplicações de MIP (“Moleculary imprinted polymers”) em técnicas de extração e separação. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1076–1086, 2005.

THIEME, U. et al. Quantification of anandamide and 2-arachidonoylglycerol plasma levels to examine potential influences of tetrahydrocannabinol application on the endocannabinoid system in humans. **Drug Testing and Analysis**, v. 6, n. 1-2, p. 17–23, 2014.

VALCARENGHI, R. V. et al. The daily lives of people with Parkinson’s disease. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 71, n. 2, p. 272–279, 2018.

WANG, R.; CHEN, Z. Boronate affinity monolithic column incorporated with graphene oxide for the in-tube solid-phase microextraction of glycoproteins. **Journal of Separation Science**, v. 41, n. 13, p. 2767–2773, 2018.

WANG, R.; LI, W.; CHEN, Z. Solid phase microextraction with poly(deep eutectic solvent) monolithic column online coupled to HPLC for determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Analytica Chimica Acta**, v. 1018, p. 111–118, 2018.

WANG, X. et al. Co-Al bimetallic hydroxide nanocomposites coating for online in-tube solid-phase microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1550, p. 1–7, 2018.

WHO, W. H. O. Cannabidiol (CBD): pre-review report. **Expert Committee on Drug Dependence**, v. 39, p. 1–27, 2017.

WICKREMSINHE, E. R. et al. High sensitive assay employing column switching chromatography to enable simultaneous quantification of an amide prodrug of gemcitabine (LY2334737), gemcitabine, and its metabolite dFdU in human plasma by LC–MS/MS. **Journal of Chromatography B**, v. 932, n. 22, p. 117–122, 2013.

WU, F. et al. Poly (methacrylic acid- co -diethenyl-benzene) monolithic microextraction column and its application to simultaneous enrichment and analysis of mycotoxins. **Talanta**, v. 178, p. 1–8, 2018.

XIONG, X. et al. High-throughput salting-out assisted liquid – liquid extraction with acetonitrile for the determination of anandamide in plasma of hemodialysis

patients with liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Biomedical Chromatography**, v. 29, n. 9, p. 1317–1324, 2015.

XU, W. et al. Determination of sulfonamides in bovine milk with column-switching high performance liquid chromatography using surface imprinted silica with hydrophilic external layer as restricted access and selective extraction material. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 46, p. 7198–7207, 2010.

YAN, H.; ROW, K. H. Characteristic and Synthetic Approach of Molecularly Imprinted Polymer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 7, n. 5, p. 155–178, 2006.

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**, v. 162, n. 1-3, p. 135–139, 2006.

ZGAIR, A. et al. Development of a simple and sensitive HPLC–UV method for the simultaneous determination of cannabidiol and Δ9-tetrahydrocannabinol in rat plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 114, p. 145–151, 2015.

ZOERNER, A. A. et al. Quantification of endocannabinoids in biological systems by chromatography and mass spectrometry: a comprehensive review from an analytical and biological perspective. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1811, n. 11, p. 706–723, 2011.

ZOERNER, A. A. et al. Simultaneous UPLC–MS/MS quantification of the endocannabinoids 2-arachidonoyl glycerol (2AG), 1-arachidonoyl glycerol (1AG), and anandamide in human plasma: Minimization of matrix-effects, 2AG/1AG isomerization and degradation by toluene solvent extraction. **Journal of Chromatography B**, v. 883-884, p. 161–171, 2012.

ZUARDI, A. et al. Cannabidiol for the treatment of psychosis in Parkinson’s disease. **Journal of Psychopharmacology**, v. 23, n. 8, p. 979–983, 2009.

Anexo I – Parecer consubstanciado do CEP

USP - FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO DA USP-

Plataforma Brasil

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Determinação de endocanabinóides e canabinóides naturais em amostras biológicas de pacientes com a doença de Parkinson por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas em tandem

Pesquisador: Camila Marchioni

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 89120418.7.0000.5403

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.036.243

Apresentação do Projeto:

Não houve modificações.

Objetivo da Pesquisa:

Não houve modificações.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não houve modificações.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Não houve modificações.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foi acrescentada à documentação a aprovação do Biorrepositório BIOMARCADORES PARKINSON pelo CEP/HC.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Com relação à pendência apontada no parecer anterior, o pesquisador responsável pelo projeto (ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE O ÓXIDO NÍTRICO E A DISCINESIA INDUZIDA PELA LEVODOPA NA DOENÇA DE PARKINSON), que coletou o material a ser cedido para a presente pesquisa, registrou este material em biorrepositório junto ao CEP do HCFMRP-USP que apreciou e aprovou a solicitação de emenda de criação de biorrepositório BIOMARCADORES PARKINSON, assim como o

Endereço: Avenida do Café s/nº
Bairro: Monte Alegre **CEP:** 14.040-903
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3315-4213 **Fax:** (16)3315-4892 **E-mail:** cep@fcfrp.usp.br

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Guarda de Material Biológico versão 2 data nov/2018, conforme documento apresentado - parecer nº: 3.031.618.

Projeto APROVADO.

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado "ad referendum" do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP/USP) em sua 23-11-2018. Em atendimento às Resoluções vigentes, deverá ser encaminhado ao CEP/FCFRP, através da Plataforma Brasil, o relatório final da pesquisa conforme modelo de Relatório aprovado pelo CEP, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção da mesma. Cabe ao pesquisador responsável manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	PARECER_emenda_aprovada.pdf	23/11/2018 17:31:25	Cleni Mara Marzocchi Machado	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1111076.pdf	22/11/2018 09:29:39		Aceito
Outros	Carta_justificativa_inadequacoes.pdf	31/08/2018 11:55:40	Camila Marchioni	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Versao_2.pdf	30/08/2018 17:43:23	Camila Marchioni	Aceito
Outros	Carta_Tumas_versao_2.pdf	30/08/2018 17:40:52	Camila Marchioni	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_Bruno_novo.pdf	30/08/2018 17:26:31	Camila Marchioni	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Dispensa_TCLE.pdf	23/04/2018 11:53:21	Camila Marchioni	Aceito
Outros	Aprovacao_CEP_HCRP.pdf	23/04/2018 11:52:17	Camila Marchioni	Aceito
Outros	TCLE_anterior.pdf	23/04/2018 11:51:44	Camila Marchioni	Aceito
Orçamento	Orcamento_detalhado.pdf	23/04/2018 11:50:43	Camila Marchioni	Aceito
Declaração de	Declaracao_Tumas.pdf	23/04/2018	Camila Marchioni	Aceito

USP - FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO DA USP-

Continuação do Parecer: 3.036.243

Pesquisadores	Declaracao_Tumas.pdf	11:50:10	Camila Marchioni	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_ME.pdf	23/04/2018 11:49:58	Camila Marchioni	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_Crippa.pdf	23/04/2018 11:49:50	Camila Marchioni	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_Camila.pdf	23/04/2018 11:49:41	Camila Marchioni	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Infraestrutura.pdf	23/04/2018 11:49:21	Camila Marchioni	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	23/04/2018 11:49:09	Camila Marchioni	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

RIBEIRAO PRETO, 23 de Novembro de 2018

Assinado por:
Cleni Mara Marzocchi Machado
(Coordenador(a))

Endereço: Avenida do Café s/nº
Bairro: Monte Alegre **CEP:** 14.040-903
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3315-4213 **Fax:** (16)3315-4892 **E-mail:** cep@fcfrp.usp.br