Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química

Desenvolvimento do método *in-tube* SPME-UHPLC-MS/MS para a determinação de antipsicóticos e seus metabólitos em amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos

Luiz Gabriel Masson Beloti

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: Química

Ribeirão Preto - SP
2020

Ribeirão Preto
Segundo semestre/2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Luiz Gabriel Masson Beloti

Desenvolvimento do método *in-tube* SPME-UHPLC-MS/MS para a determinação de antipsicóticos e seus metabólitos em amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos

Dissertação apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão
Preto da Universidade de São Paulo,
como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre em
Ciências, obtido no Programa de Pós-
Graduação em
Química

Orientadora: Profa. Dra. Maria Eugênia Queiroz Nassur

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação no dia 08/01/2020. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/SP.

Ribeirão Preto - SP
2020

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.

FICHA CATALOGRÁFICA

Beloti, Luiz Gabriel Masson

Desenvolvimento do método in-tube SPME-UHPLC-MS/MS para a determinação de antipsicóticos e seus metabólitos em amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos. Ribeirão Preto, 2020
90 p. il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP –
Área de concentração: Química.

Orientador: Nassur, Maria Eugênia Queiroz

1. in-tube SPME.
2. UHPLC-MS/MS.
3. Monolitos orgânicos.
4. Antipsicóticos.
5. Amostras de plasma
6. Pacientes esquizofrênicos.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: Luiz Gabriel Masson Beloti

Título: **Desenvolvimento do método *in-tube* SPME-UHPLC-MS/MS para a determinação de antipsicóticos e seus metabólitos em amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos.**

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP,
como parte das exigências para a obtenção do título
de Mestre em Ciências, Área: **Química**

Aprovado em: __/__/__

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Dedico este trabalho à todas as pessoas que
contribuíram para a sua realização.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Profa. Dra. Maria Eugênia Queiroz Nassur pela orientação, por ter me aceitado como aluno de Mestrado mesmo sabendo de meus compromissos com outro trabalho, pela confiança e credibilidade depositada em mim e pela vivência durante estes anos de trabalho.

À minha banca de qualificação: Prof. Dr. Jonas Augusto Rizzato Paschoal e Prof. Dr. Luiz Alberto de Moraes pelos conselhos e críticas ao trabalho.

À Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto e a todos os funcionários do Departamento de Química desta faculdade pelo apoio institucional e instalações necessárias para a realização deste trabalho.

Aos pacientes e familiares que aceitaram contribuir com este estudo.

À CAPES pela concessão de bolsa de mestrado e apoio financeiro durante a realização da pesquisa.

Aos amigos de laboratório Luís Felipe, Israel, Lídia, Igor, Caroline, Jonas, Mônia e Camila pela vivência, momentos de lazer, de trabalho, pelo companheirismo e pelo auxílio com os trabalhos.

À minha família por todo o incentivo, companheirismo em todos os momentos, antes e durante a realização deste mestrado, e pela presença constante em minha vida. Pelos conselhos e pelo apoio em todas as decisões tomadas ao longo destes anos.

À minha namorada Ana Helena que esteve junto comigo durante todos estes anos apoiando cada decisão minha, auxiliando em todas as etapas do meu trabalho, estando sempre ao lado nos momentos de necessidade, pela paciência e por suas críticas que ajudaram na realização do meu trabalho.

À Deus, acima de tudo, por ser o pilar de minha vida social e profissional e me proporcionar forças para a realização deste trabalho.

Resumo

Beloti, L.G.M. Desenvolvimento do método *in-tube* SPME-UHPLC-MS/MS para a determinação de antipsicóticos e seus metabólitos em amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos. 2019, 89f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

A esquizofrenia, doença crônica e debilitante, tem sido caracterizada principalmente pela diminuição das capacidades mentais (embotamento emocional), alucinações (percepções irreais, sobretudo auditivas) e delírios. Os antipsicóticos são prescritos na psiquiatria clínica como tratamento de primeira linha, tanto na fase aguda da esquizofrenia, quanto na fase da manutenção para a prevenção de possíveis recaídas. Tendo como base os intervalos terapêuticos, a determinação das concentrações de antipsicóticos e seus metabólitos em amostras de plasma permite o ajuste das doses administradas, favorecendo a eficácia do tratamento e efeitos adversos mais brandos. A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em *tandem* (LC-MS/MS) tem sido considerada a técnica analítica de referência para a determinação de fármacos em fluidos biológicos. A etapa de preparo de amostras tem sido requerida no desenvolvimento de métodos cromatográficos para eliminar grande parte dos componentes endógenos e pré-concentrar os fármacos, quase sempre presentes em níveis de traços em amostras biológicas. Dentre os recentes avanços das técnicas de preparo de amostras, destacamos a miniaturização dos sistemas analíticos, o acoplamento on-line com sistemas cromatográficos e o desenvolvimento de fases extratoras seletivas. Neste contexto, o método de microextração em fase sólida no capilar acoplada à cromatografia líquida de ultra-eficiência com o sistema de espectrometria de massas em *tandem* (*in-tube* SPME-UHPLC-MS/MS) foi desenvolvido para a determinação dos fármacos (clozapina, clorpromazina, olanzapina e quetiapina) e metabólitos (N-desmetilclozapina, desmetilclorpromazina, 7-hidroxi-clorpromazina, N-desmetilolanzapina e norquetiapina) em amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos para fins de monitorização terapêutica. O capilar à base de monolito orgânico poli(butil metacrilato-co-etilenoglicol dimetacrilato) foi desenvolvido para a pré-concentração seletiva dos analitos. Esta fase inovadora foi caracterizada química e morfologicamente através das técnicas de Espectroscopia vibracional na região do infravermelho por transformada de Fourrier (FTIR) e por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Os resultados obtidos indicaram a incorporação dos grupos funcionais na estrutura característica de monolito, constituído de macro, meso e micro poros. O método *in-tube* SPME-UHPLC-MS/MS desenvolvido apresentou linearidade adequada para todos os antipsicóticos e metabólitos estudados com coeficiente de determinação (R^2) maiores que 0,9975, com limite inferior de quantificação (LIQ) de 10 ng mL⁻¹ para todos os analitos. Os valores de precisão apresentaram valores de coeficiente de variação menores que 14,2% e exatidão com valores de erro padrão relativos variando de -13,5% a 14,6% com exceção para os valores de LIQ. O método desenvolvido foi aplicado com sucesso para a determinação de antipsicóticos e seus metabólitos em amostra de plasma de pacientes esquizofrênicos.

Palavras chave: *in-tube* SPME; UHPLC-MS/MS; monolitos orgânicos; antipsicóticos; amostras de plasma; pacientes esquizofrênicos.

Abstract

Beloti, L.G.M. Development of the in-tube SPME-UHPLC-MS/MS method for the determination of antipsychotics and their metabolites in plasma samples of schizophrenic patients. 2019, 89f. Dissertation (Master) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Schizophrenia, a chronic and debilitating disease, has been characterized mainly by decreased mental abilities (emotional dullness), hallucinations (unreal perceptions, especially auditory) and delusions. Antipsychotics are prescribed in clinical psychiatry as first-line treatment, both in the acute phase of schizophrenia and in the maintenance phase to prevent possible relapses. Based on therapeutic intervals, the determination of antipsychotic concentrations and their metabolites in plasma samples allows adjustment of the administered doses, favoring treatment efficacy and milder adverse effects. High performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) has been considered the reference analytical technique for the determination of drugs in biological fluids. The sample preparation step has been required in the development of chromatographic methods to eliminate most endogenous components and pre-concentrate the drugs, almost always present at trace levels in biological samples. Recent advances in sample preparation techniques include the miniaturization of analytical systems, on-line coupling with chromatographic systems, and the development of selective extractor phases. In this context, the capillary solid phase microextraction method coupled with ultra-efficient liquid chromatography in tandem mass spectrometry system (in-tube SPME-UHPLC – MS/MS) was developed for the determination of drugs (clozapine, chlorpromazine, olanzapine and quetiapine) and metabolites (N-desmethylozapine, desmethylochlorpromazine, 7-hydroxylochlorpromazine, N-desmethyloanzapine and norquetiapine) in plasma samples from schizophrenic patients for therapeutic monitoring purposes. The poly (butyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) organic monolith capillary was developed for the selective pre-concentration of the analytes. This innovative phase was chemically and morphologically characterized by Fourier Transform Infrared Vibration Spectroscopy (FTIR) and Scanning Electron Microscopy (SEM) techniques. The obtained results indicated the incorporation of the functional groups in the characteristic structure of monolith consisted by macro, meso and micro pores. The in-tube SPME-UHPLC-MS/MS method developed showed adequate linearity for all antipsychotics and metabolites studied with coefficient of determination (R^2) greater than 0.9975, with lower limit of quantification (LLOQ) of 10 ng mL⁻¹ for all analytes. Precision values presented coefficient of variation values less than 14.2% and accuracy with relative standard error values ranging from -13.5% to 14.6% except for the LLOQ values. The developed method was successfully applied for the determination of antipsychotics and their metabolites in a plasma sample of schizophrenic patients.

Keywords: in-tube SPME; UHPLC-MS/MS; organic monoliths; antipsychotics; plasma samples; schizophrenic patients.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estrutural de (a) clorpromazina, (b) clozapina, (c) olanzapina, (d) quetiapina e seus respectivos metabólitos	22
Figura 2. Esquema do processo <i>in-tube</i> SPME com ciclos de aspirar/dispensar. (a) extração e (b) dessorção ⁵⁴	30
Figura 3. Esquema do processo <i>in-tube</i> SPME no modo direto. 1) Extração e pré concentração dos analitos e 2) Dessorção	30
Figura 4. Capacidade de sorção das diferentes fases monolíticas no procedimento <i>in-tube</i> SPME. Os ensaios foram realizados com soluções padrões dos analitos na concentração de 50 ng mL ⁻¹	55
Figura 5. Microscopia eletrônica de varredura do capilar monolítico de Metacrilato de Butila-co-Dimetacrilato de Etilenoglicol ampliada em 1000 vezes.....	56
Figura 6. Microscopia eletrônica de varredura do capilar monolítico de Metacrilato de Butila-co-Dimetacrilato de Etilenoglicol ampliada em 10000 vezes.....	57
Figura 7. Espectro de infravermelho do capilar monolítico de Metacrilato de Butila-co-Dimetacrilato de Etilenoglicol	58
Figura 8. Cromatogramas de íons totais (TIC) obtidos por injeção de solução padrão dos analitos a 50 ng mL ⁻¹ separados por ACQUITY UPLC CSH C18 (1.7 µm, 2.1 x 100mm) com vazão de 300 µL min ⁻¹ . Condição B: Solvente A = NH ₄ Ac 10 mM (0,1% Acido fórmico), solvente B = ACN com gradiente: 10-65% B (0-2,50 min), 65-85% B (2,50-3,0 min), 85% B (3,0-4,50 min), 85%-65% B (4,50-6,0min), 65%-10% B (6,0-15,0); Condição C: Solvente A = NH ₄ Ac 10 mM (0,1% Acido fórmico), solvente B = ACN com gradiente: 20-65% B (0-2,50 minutos), 65-85% B (2,50-3,0 min), 85% B (3,0-4,50 minutos), 85%-65% B (4,50-5,0min), 65%-20% B (5,0-6,0 min), 20% B (6,0-15,0min).	59
Figura 9. Cromatogramas de íons totais (TIC) obtidos por injeção de 10 µL solução padrão dos analitos a 50 ng mL ⁻¹ , onde utilizou-se água como solução de pré concentração em pH: (A) 4,00, (B) 7,00 e (C) 10,00.	62
Figura 10. Cromatogramas da soma de íons totais (TIC) obtidos pelo procedimento <i>in-tube</i> SPME com acoplamento em 2,0 min e desacoplamento em 4,0 min, utilizando solução aquosa com NH ₄ Ac 10mmol L ⁻¹ (0,1% ácido fórmico):ACN nas proporções (A) 90:10; B) 80:20 e C) 70:30.	64

Figura 11. Sinais analíticos obtidos utilizando a eluição com a fase móvel B (NH ₄ Ac e ACN 80:20 v/v) e fase móvel C (NH ₄ Ac e ACN 70:30 v/v)	65
Figura 12. Cromatogramas da soma de íons totais (TIC) obtidos pelo procedimento <i>in-tube</i> SPME com acoplamento em (A) 2,0 minutos e desacoplamento em 4,0 minutos e (B) 2,0 minutos e desacoplamento em 5,0 minutos	66
Figura 13. Sinais analíticos obtidos variando-se o comprimento dos capilares monolíticos	67
Figura 14. Cromatogramas da soma de íons totais (TIC) obtidos pelo procedimento <i>in-tube</i> SPME no modo (A) inverso e (B) direto.	68
Figura 15. Cromatogramas de amostra de plasma branco (subscrito à esquerda) e amostra de plasma branco enriquecido com os fármacos nas concentrações do LIQ. ⁹⁸	71
Figura 16. Cromatogramas obtidos através da análise do plasma do paciente 1 pelo método <i>in-tube</i> SPME-UHPLC-MS/MS determinando o fármaco olanzapina (acima) na concentração de 85,86 ng mL ⁻¹ e seu metabólito N-desmetil-olanzapina (abaixo) na concentração de 20,13 ng mL ⁻¹	76

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Intervalos terapêuticos dos antipsicóticos utilizados no tratamento da esquizofrenia ²⁹	23
Tabela 2. Métodos cromatográficos para a determinação de antipsicóticos e metabólitos em amostras biológicas	26
Tabela 3. Métodos in-tube SPME para a determinação de fármacos em fluidos biológicos	32
Tabela 4. Diferentes técnicas de microextração utilizando monolitos orgânicos como fase extratora	38
Tabela 5. Procedimentos para síntese do capilar monolítico orgânico de poli(Metacrilato de Butila-co-Dimetacrilato de Etilenoglicol).....	44
Tabela 6. Diferentes composições de fases móveis avaliadas para separação simultânea dos fármacos e metabólitos	47
Tabela 7. Transições iônicas, configurações do instrumento e tempos de retenção do método <i>in-tube</i> SPME-UHPLC-MS/MS para cada antipsicótico e seus metabólitos.	48
Tabela 8. Otimização do procedimento de síntese do capilar monolítico orgânico de poli (Metracilato de Butila-co-Dimetacrilato de Etilenoglicol)	55
Tabela 9. Valores de pKa dos fármacos e metabólitos analisados neste projeto.....	60
Tabela 10. Condições cromatográficas para a análise por <i>in-tube</i> SPME-UHPLC-MS/MS	69
Tabela 11. Linearidade do método <i>in-tube</i> SPME-UHPLC-MS/MS.....	70
Tabela 12. Exatidão, precisão e efeito matriz do método <i>in-tube</i> SPME SPME-UHPLC-MS/MS	72
Tabela 13. Comparação do método <i>in-tube</i> SPME-UHPLC-MS/MS com demais métodos para a determinação de antipsicóticos e seus metabólitos em amostras biológicas	74
Tabela 14. Concentrações dos antipsicóticos e metabólitos analisados em plasma de pacientes esquizofrênicos	75

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AIBN	2,2-azobisisobutílnitrila
ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BMA	Buthyl Methacrylate (Dimetacrilato de Butila)
BSM	Binary Solvent Manager (Bomba Binária)
BUT	1,4-butanodiol
CE	Colision Energy (Energia de Colisão)
CID	Colisão Induzida por Dissociação
Cid-10	Classificação Internacional das Doenças
CQA	Controle de Qualidade Alto
CQB	Controle de Qualidade Baixo
CQM	Controle de Qualidade Médio
CV	Coeficiente de Variação
DF	Detector de Fluorescência
DP	Declustering Potential (Potencial de Cone)
EGDMA	Ethyleneglycol Dimethacrylate (Dimetacrilato de Etilenoglicol)
EFS	Extração em Fase Sólida
ELL	Extração Líquido Líquido
EPR	Erro Padrão Relativo
ESI	Electrospray Source Ionization (Fonte de Ionização por Eletrospray)
FE	Fase Estacionária
FM	Fase Móvel
FMN	Fator de Matriz Normalizado
FTIR	Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier)
HCl	Ácido Clorídrico
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
ID	Internal Diameter (Diâmetro Interno)
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry (União Internacional de Química Pura e Aplicada)

KBr	Brometo de Potássio
LC-DAD	Liquid Chromatography Couple to Diode Array Detector (Cromatografia Líquida Acoplada a Sistema de Diodos)
LC-MS/MS	Liquid Chromatography Couple to Mass Spectrometry in tandem (Cromatografia Líquida Acoplada ao Espectômetro de Massas em <i>tandem</i>)
LIQ	Limite Inferior de Quantificação
LSQ	Limite Superior de Quantificação
MeOH	Metanol
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MIP	Molecularly Imprinted Polymers (Polímeros Molecularmente Impressos)
N ₂	Gás Nitrogênio
NH ₄ Ac	Acetato de Amônio
NaOH	Hidróxido de Sódio
PEEK	Poly Ether Ether Ketone (Poli-Éter-Éter Cetona)
pH	Potencial de Hidrogenação
pKa	Logaritmo da constante de acidez
PP	Precipitação de Proteínas
PMME	Polymer Monolith Microextraction (Microextração em Monolito Polimérico)
PRO	1-propanol
QSM	Quaternary Solvente Manager (Bomba Quaternária)
RAM	Restricted Access Material (Material de Acesso Restrito)
RP	Reversed Phase (Fase Reversa)
SPME	Solid Phase Microextraction (Microextração em Fase Sólida)
SRM	Selected Monitoring Reaction (Monitoramento de Reações Seleccionadas)
TDM	Therapeutic Drug Monitoring (Monitoração Terapêutica)
TFA	Trifluoroacetic Acid (Ácido Trifluoroacético)
TIC	Total Ions Current (Corrente de Íons Totais)
UFLC	Ultrafast Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Ultra Velocidade)
UHPLC	Ultrahigh Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência)

UV

Ultravioleta

VTNS

Viniltrimetoxisilano

LISTA DE SÍMBOLOS

1D	Primeira dimensão
2D	Segunda dimensão
°C	Grau Celsius
%m/m	Porcentagem massa/massa
µg mL ⁻¹	Microgramas/mililitro
µL	Microlitro
cm	Centímetro
cm ⁻¹	Centímetro ⁻¹
EV	Eletron-volt
g	Grama
kV	Quilovolt
L h ⁻¹	Litro/hora
M	Molar
m/z	Massa/carga
m s ⁻¹ pa ⁻¹	Metro/segundo pascal
mg	Miligrama
mg mL ⁻¹	Miligrama/mililitro
min	Minuto
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mΩ	Miliohm
ng	Nanograma
ng mL ⁻¹	Nanogramas/mililitro
nm	Nanômetro
pg/mg	Picograma/miligrama
rpm	Rotação por minuto
s	Segundo
v	Volts
v/v	Volume/volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Esquizofrenia	19
1.2. Esquizofrenia e antipsicóticos	20
1.3. Antipsicóticos e metabólitos	21
1.4. Monitorização terapêutica de fármacos	22
1.5. Análise de antipsicóticos em fluidos biológicos	23
1.6. Procedimento <i>in-tube</i> SPME	29
1.7. Fases monolíticas	33
1.8. Fases monolíticas poliméricas	34
1.8.1. Monômeros	35
1.8.2. Agente reticulante	36
1.8.3. Solventes porogênicos	36
1.8.4. Iniciador radicalar	37
1.8.5. Temperatura	37
1.9. Aplicações das fases monolíticas orgânicas	38
2. OBJETIVOS	41
2.1. Objetivo principal	41
2.2. Objetivos específicos	41
3. Materiais e Métodos	43
3.1. Materiais	43
3.2. Métodos Analíticos	43
3.2.1. Síntese do capilar monolito orgânico poli(butyl metacrilato-co-etilenoglicol dimetacrilato)	43
3.2.2. Caracterização do capilar monolítico orgânico de poli(BMA-co-EGDMA)	45
3.2.3. Amostras de plasma	46
3.2.4. Preparo das amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos	46
3.2.5. Condições cromatográficas e espectrométricas	46
3.2.6. Condições de sorção dos analitos junto à fase monolítica	48
3.2.7. Procedimento <i>In-tube</i> SPME-UHPLC-MS/MS	49
3.2.8. Validação analítica do método <i>In-tube</i> SPME-UHPLC-MS/MS	50
4. Resultados	54
4.1. Síntese do capilar monolítico orgânico poli(butyl metacrilato-co-etilenoglicol dimetacrilato)	54

4.2. Caracterização do capilar monolítico orgânico de poli(BMA-co-EGDMA)	55
4.3. Condições cromatográficas e espectrométricas	58
4.4. Condições de sorção dos analitos junto à fase monolítica	60
4.5. Procedimento <i>In-tube</i> SPME-UHPLC-MS/MS	63
4.6. Validação analítica do método <i>In-tube</i> SPME-UHPLC-MS/MS	69
4.6.1. Linearidade e LOQ	69
4.6.2. Seletividade	70
4.6.3. Precisão, exatidão e efeito matriz.....	71
4.6.4. Efeito residual.....	73
4.6.7. Comparação do método <i>In-tube</i> SPME-UHPLC-MS/MS desenvolvido com trabalhos da literatura	73
4.7. Análise de amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos	75
5. Conclusão	79
6. Referências	81

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Esquizofrenia

A esquizofrenia é um transtorno psiquiátrico que atinge cerca de 1% da população mundial¹ e aproximadamente um terço destes pacientes tentam suicídio, sendo que 5% destes chegam efetivamente ao óbito.²

De acordo com um estudo realizado pela Global Burden of Diseases, GBD (2016) em 195 países, a esquizofrenia foi classificada como a 12º enfermidade mais incapacitante entre 310 doenças e lesões.³

Os primeiros estudos sobre a esquizofrenia foram realizados por Emil Kraepelin (1865 – 1926) e Eugen Bleuler (1857 – 1939). Kraepelin introduziu, primeiramente, a distinção entre transtornos de humor e psicose e utilizou o termo *demência precoce* para se referir a esquizofrenia.

Em 1908, Bleuler introduz o termo esquizofrenia (divisão da mente) devido a dados de pacientes mostrarem que a demência não necessariamente era própria do transtorno⁴, citando sintomas primários e secundários do transtorno, no qual os sintomas primários poderiam ser sumarizados nos 4 As – associação anormal, autismo, afeto anormal e ambivalência.⁵

Kurt Schneider (1887 – 1967) em 1959 definiu 11 sintomas majoritários que hoje são considerados os sintomas positivos do transtorno.

As definições atuais da esquizofrenia, incluindo a Classificação Internacional das Doenças (CID-10) da World Health Organization (WHO, 1992) e o *Diagnostical and Statiscal Manual of Mental Diseases 4th edition text review* (DSM-IV-TR, 2000), incorporam as idéias de Kraepelin, Bleuler e Schneider.⁶

A esquizofrenia apresenta diversas características clínicas, as quais foram agrupadas como sintomas positivos, negativos e cognitivos. Os sintomas positivos são relacionados diretamente ao transtorno psicótico, incluem alucinações e delírios. Já os sintomas negativos, são aqueles relacionados à perda de alguma capacidade mental, incluem isolamento social, embotamento afetivo e desmotivação.⁷ As alterações cognitivas estão relacionados à dificuldade de abstração, déficit de atenção, memória, comprometimento na linguagem e na resolução de problemas.^{8,9}

Em uma busca realizada no banco de dados Pubmed, utilizando-se “schizophrenia” como palavra-chave, obtém-se 135.782 trabalhos publicados, dos

quais 6.254 trabalhos foram publicados no ano de 2018. Embora estudada a mais de 100 anos, nem todos os campos desta doença estão totalmente compreendidos, desta maneira, estudos relacionados a esta doença continuam sendo de essencial importância.

Dentre estes estudos, podemos destacar os relacionados à elucidação das causas da esquizofrenia. A hipótese mais aceita para a explicação da doença está atrelada a hipótese dopaminérgica. Esta hipótese indica um excesso de atividade dopaminérgica em indivíduos esquizofrênicos.¹⁰ No entanto, a hipótese apresenta suas limitações, principalmente na explicação da complexidade dos sintomas, desta forma, outras hipóteses são avaliadas, defendendo que a esquizofrenia também é causada por disfunções serotoninérgicas e glutamatérgicas, além de outros neurotransmissores envolvidos na fisiopatologia do transtorno.¹¹

Embora a esquizofrenia se apresente como uma doença incurável, a abordagem farmacológica para o tratamento da esquizofrenia consiste de medicamentos antipsicóticos associados à psicoterapia e socioterapia que são prescritos na psiquiatria clínica como tratamento de primeira linha, tanto na fase aguda da esquizofrenia, quanto na fase da manutenção, para a prevenção de possíveis recaídas.

1.2. Esquizofrenia e antipsicóticos

Os antipsicóticos são os principais medicamentos utilizados para o tratamento da esquizofrenia.¹²

Em 1950, Charpentier sintetizou a substância clorpromazina no laboratório Rhône-Poulenc. Com o apoio de Delay e outros psiquiatras testaram este fármaco em pacientes esquizofrênicos e, com os seus resultados clínicos, a clorpromazina representou um avanço na psiquiatria por tratar os efeitos psicóticos desta doença.¹³

No entanto, com a introdução dos primeiros antipsicóticos também apareceram os primeiros efeitos adversos, denominados como efeitos extrapiramidais.¹⁴

Com o sucesso obtido através da clorpromazina, a indústria farmacêutica foi estimulada a procurar por novos antipsicóticos.¹³ Dentre estes, está a clozapina, descoberta em 1960. A clozapina, diferentemente dos antigos antipsicóticos, não

apresentou o perfil farmacológico típico, nem mesmo os seus efeitos extrapiramidais.¹⁵

Desta forma, os antipsicóticos foram divididos em duas classes: os antipsicóticos de primeira (típicos) e de segunda geração (atípicos). Os da primeira geração atuam sobre os sintomas positivos (alucinações e delírios), sendo os mais comuns o haloperidol, trioridazina e clorpromazina. Já os de segunda geração atuam nos sintomas negativos e também produzem efeitos adversos mais brandos, prevenindo as recaídas e melhorando o prognóstico da doença, sendo os mais comuns a clozapina, olanzapina e quetiapina.¹⁶

1.3. Antipsicóticos e metabólitos

A variabilidade interindividual na resposta dos pacientes aos medicamentos administrados representa um grande desafio na terapia medicamentosa. Desta maneira, é importante compreender a farmacocinética e a farmacodinâmica para prever o destino de um fármaco e sua resposta no indivíduo.¹⁷

A maioria dos fármacos tem sua biotransformação realizada pelas enzimas do citocromo P450 (Figura 1).¹⁸

A clozapina é transformada através das enzimas CYP1A2 e CYP3A4 em seu metabólito desmetil-clozapina; a clorpromazina é metabolizada em 7-hidroxi-clorpromazina através da CYP2D6 e metabolizada em desmetil-clorpromazina através da CYP1A2; a olanzapina é metabolizada em desmetil-olanzapina através da CYP1A2 e a quetiapina é metabolizada em norquetiapina através da CYP3A4¹⁹, sendo todas estas enzimas pertencentes a citocromo P450.

Figura 1. Fórmula estrutural da (a) clorpromazina, (b) clozapina, (c) olanzapina, (d) quetiapina e seus respectivos metabólitos

A desmetil-clozapina, 7-hidroxi-clorpromazina, desmetil-clorpromazina e norquetiapina apresentam-se farmacologicamente ativos²⁰⁻²² enquanto a desmetil-olanzapina é menos ativa que seu precursor e não contribui significativamente com efeitos clínicos in vivo.²³

As mesmas proporções do fármaco e seu metabólito no plasma podem refletir concentrações ativas diferentes no cérebro, como é o caso da risperidona e seu metabólito 9-hidroxi-risperidona.²⁴

1.4. Monitorização terapêutica de fármacos

A monitorização terapêutica de fármacos (TDM) é um recurso que, na psiquiatria, é utilizada especialmente para o lítio, antidepressivos e antipsicóticos. A TDM permite a individualização da dose administrada dos fármacos de acordo com as concentrações plasmáticas e resposta clínica.²⁵

A monitorização terapêutica se utiliza da determinação da concentração dos fármacos e metabólitos ativos em amostras de plasma para manter os níveis destes fármacos na mesma faixa de concentração do intervalo terapêutico. Desta forma, os pacientes apresentarão maior eficácia no tratamento e efeitos adversos mais brandos. A TDM torna-se importante para fármacos que possuem intervalo terapêutico estreito (faixa terapêutica próxima da tóxica) ou uma farmacocinética de

forma não-linear, além do surgimento de sintomas relacionados a superdosagem ou quando os efeitos clínicos esperados não são observados.^{26,27}

A monitorização terapêutica de antipsicóticos pode auxiliar o indivíduo no monitoramento de sua adesão ao tratamento, ajuste da dose, minimizar o risco de toxicidade e melhorar a relação custo-efetividade do tratamento.²⁸

A Tabela 1 descreve os intervalos terapêuticos preconizados para os antipsicóticos utilizados no tratamento da esquizofrenia e abordados nesta dissertação.

Tabela 1. Intervalos terapêuticos dos antipsicóticos utilizados no tratamento da esquizofrenia²⁹

Fármaco	Intervalo terapêutico (ng fármaco mL ⁻¹)*
Clorpromazina	30 – 300
Clozapina	350 – 600
Olanzapina	20 – 80
Quetiapina	100 – 500

*ng de fármaco por mL de plasma

Para a utilização deste tão importante recurso na psiquiatria, faz-se necessário o uso de metodologias analíticas robustas e de alta sensibilidade analítica para a determinação dos fármacos e metabólitos em amostras de plasma. A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em *Tandem* (LC-MS/MS), em razão da alta seletividade e sensibilidade analítica tem sido considerada a técnica analítica de referência para a determinação de fármacos em fluidos biológicos.

1.5. Análise de antipsicóticos em fluidos biológicos

A determinação de fármacos, metabólitos e biomarcadores em amostras de sangue, urina, saliva, soro e plasma são consideradas como bioanálises. Os analitos de interesse, muitas vezes, apresentam-se em níveis de traços nos fluidos biológicos (matriz complexa). Para a TDM, o plasma e o soro são os fluidos biológicos indicados, pois a concentração máxima é atingida mais rapidamente após a administração do fármaco.

O plasma contém vários componentes endógenos (macromoléculas) como sais, proteínas, células, lipídeos e ácidos graxos que podem ser incompatíveis com

os sistemas cromatográficos.^{30,31} Estes componentes endógenos podem suprimir a ionização (*eletrospray*) dos analitos nas análises LC-MS/MS, co-eluir com os analitos durante a separação cromatográfica ou adsorver de forma irreversível junto à coluna analítica, diminuindo o tempo de vida útil da coluna e modificando a retenção dos analitos.

Dessa maneira, a etapa de preparo de amostra é uma etapa imprescindível no desenvolvimento de métodos cromatográficos. É a etapa mais trabalhosa, mais propensa a erros e que contribui para maior tempo de análise quando se utilizam os métodos bioanalíticos.³²

A precipitação de proteínas (PP), a extração líquido-líquido (ELL) e a extração em fase sólida (EFS) têm sido as técnicas convencionalmente utilizadas para as bioanálises.

A PP se baseia no processo de desnaturação das proteínas presentes na matriz da amostra. A maioria dos métodos bioanalíticos empregam a utilização de solventes orgânicos em uma razão de três para um de matriz da amostra seguidos de uma centrifugação da mistura. Com a desnaturação das proteínas, as moléculas de interesse passam a estar livres no solvente e não mais ligadas as proteínas, enquanto a centrifugação ocasiona na precipitação das mesmas, permitindo a separação dos analitos de interesse. Apesar da simplicidade do método, a PP apresenta-se como uma técnica não seletiva e com alta efeito da matriz nos métodos cromatográficos.

A ELL é um processo simples de extração baseado na partição da amostra entre duas fases imiscíveis, onde a eficiência de separação depende da afinidade do soluto pelo solvente. Apesar de sua vantagem pela simplicidade, e pela precipitação das proteínas pelo uso de solventes orgânicos, a ELL apresenta uma série de desvantagens como: a utilização de grandes volumes de solventes e suscetível formação de emulsões, alguns solventes são tóxicos, há a complicação no descarte destes solventes, além de o processo ser de difícil automação e baixa seletividade.³⁰

A EFS é um processo baseado na partição dos analitos entre uma fase líquida (amostra) e uma fase sólida, onde os analitos apresentam uma maior afinidade pela fase sólida.³³ Tradicionalmente, a EFS se apresenta disponível na forma de cartuchos de fase normal, fase reversa e fase de troca iônica, contudo, avanços no desenvolvimento de novos materiais tem proporcionado novas fases para a EFS. Apesar de ser uma técnica seletiva e apresentar baixa efeito da matriz, o procedimento analítico requer várias etapas (moroso).³⁴

A fim de superar essas dificuldades, as técnicas de preparo de amostras têm sido convergidas para a miniaturização dos sistemas analíticos, automação (acoplamento *on-line* com sistemas cromatográficos) e desenvolvimento de fases extratoras seletivas. Estas técnicas possibilitam a redução do consumo de solventes orgânicos (atendendo os requisitos propostos pela química verde), utilização de menores volumes de amostras biológicas (diminui o desconforto do paciente no momento da coleta) e a diminuição do número de etapas do procedimento analítico, favorecendo a exatidão, precisão e menor tempo da análise (consequentemente, o custo).³⁵

A detecção no modo MS/MS possui alta sensibilidade, precisão, reprodutibilidade e seletividade, principalmente quando utilizada no modo de monitoramento de reações selecionadas (SRM).

A interface mais utilizada atualmente para a hifenação da cromatografia líquida ao espectrômetro de massas é a fonte de ionização por *eletrospray*. Esta fonte produz íons com uma ou mais cargas através da mistura do solvente aquoso-orgânico utilizado na separação cromatográfica.³⁶ No modo SRM, os íons de interesse formados na fonte de *eletrospray* serão selecionados no primeiro quadrupolo. No próximo quadrupolo, os íons selecionados serão fragmentados através do processo de colisão induzida por dissociação (CID) e, estes íons produtos, resultantes deste processo, serão monitorados no terceiro quadrupolo. O íon com sinal analítico de maior intensidade será utilizado para a quantificação do analito, enquanto os demais íons produtos formados serão utilizados para a confirmação do analito.

Utilizando-se o modo SRM é possível realizar a análise de vários analitos em uma mesma corrida em curto espaço de tempo. Os analitos são monitorados em canais distintos no espectrômetro de massas, dessa forma, é possível a quantificação simultânea de vários analitos ao mesmo tempo.

A cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC) atua juntamente com o espectrômetro de massas permitindo análises mais rápidas e mais eficientes. A UHPLC utiliza partículas porosas com tamanhos menores ou iguais a 2 µm como fase estacionária associadas às colunas de menores dimensões e com altas fases lineares de fase móvel. Desta forma, a técnica utiliza menores volumes, resulta em análises mais rápidas, sem que haja o comprometimento da eficiência e da resolução da corrida cromatográfica.³⁷

A Tabela 2 ilustra diferentes métodos cromatográficos para a determinação de diferentes antipsicóticos e seus metabólitos em amostras biológicas.

Tabela 2. Métodos cromatográficos para a determinação de antipsicóticos e metabólitos em amostras biológicas

Analito	Matriz biológica	Preparo de amostra	Sistema de Detecção	Limite de quantificação	Referências
Risperidona	Soro humano	ELL	LC-DAD FM: água ACN trietilamina ácido acético glacial (70:29,16:0,52:0,33 v/v) FE:Purosphere STAR RP-18e 250x4,5 mm	0,87 ng mL ⁻¹	Mennickent et al. 2019 ³⁸
Clorpromazina, haloperidol, zuclopenthixol, clozapina, N-desmetilclozapina, risperidona, 9-OH-risperidona, quetiapina, aripiprazol, dehydroaripiprazol e olanzapina	Soro humano	ELL	LC-MS/MS FM: acetonitrila e solução de ácido fórmico 0,2% FE: Zorbax SB-C18 150 mm x 4,6 mm, 5 µm	0,5 – 1 ng mL ⁻¹	Miroshnichenko et al. 2018 ³⁹
18 agentes psicóticos e 6 metabólitos	Plasma humano	PP	LC-MS/MS FM: solução de formiato de amônio 2 mM com 0,2% ácido fórmico em água e solução de formiato de amônio 2 mM com 0,2% ácido fórmico em acetonitrila FE: Kinetex XB-C18 column 50x3,0 mm, 2,6mm	0,005 – 0,01 µg mL ⁻¹	Park et al. 2018 ⁴⁰
Aripiprazol, dehydroaripiprazol, clozapina, N-desmetilclozapina, olanzapina, N-desmetilolanzapina, quetiapina, norquetiapina, risperidona, 9-OH-risperidona, carbamazepina, epoxi-10,11-carbamazepina	Saliva	EFS	UHPLC-DAD FM: água com ácido fórmico com 0,1% trietilamina e ACN FE: Phenomenex 150 x 3,0 mm ID	-	Dziurkowska et al. 2018 ⁴¹

(a tabela 2 continua...)

(continuação da tabela 2)

Analito	Matriz biológica	Preparo de amostra	Sistema de Detecção	Limite de quantificação	Referências
Clorpromazina, haloperidol, levomepromazina, olanzapina, risperidona, sulpirida	Plasma Humano	EFS	LC-MS/MS FM: formiato de amônio 2mM, pH 2,7 e ACN FE: Propyl C18 50 mm x 2,1 mm	1,19 – 13,17 ng mL ⁻¹	Khelfi et al. 2018 ⁴²
Haloperidol, olanzapina, clonazepam, mirtazapina, paroxetina, citalopram, sertralina, clorpromazina, imipramina, clomipramina, quetiapina, diazepam, fluoxetina, clozapina, carbamazepina e lamotrigina	Plasma humano	Column-switching C ₈ -ADS 25 µm (25 x 4mm)	UHPLC-MS/MS FM: solução de NH ₄ AC 4 mmol L ⁻¹ (com 0,1% ácido fórmico) e ACN (63:37 v/v) FE: Kinetex C18 1,7 µm 100 x 2,1 mm	0,025 – 1,25 ng mL ⁻¹	Acquaro et al. 2017 ⁴³
Clozapina e norclozapina	Plasma humano	Extração em água e metanol (9:1 v/v)	LC-MS/MS FM: solução de ácido fórmico 0,1% (v/v) e solução de ácido fórmico 0,1% (v/v) em ACN:metanol (1+1) FE: Raptor 5,0 x 3,0 mm, 2.7 µm	1 ng mL ⁻¹	Couchman et al. 2017 ⁴⁴
15 antipsicóticos e 2 metabólitos	Cabelo humano e cabelo de rato	Extração em metanol	LC-MS/MS FM: solução de formiato de amônio 2 mM com 0,2% de ácido fórmico em água e solução de formiato de amônio 2 mM com 0,2% de ácido fórmico em ACN FE: Kinetex C18 100Å 3,0 x 50 mm, 2,6 µm	0,2 – 200 pg/mg	Sim et al. 2017 ⁴⁵
Aripipazol, dehidroaripipazol, quetiapina, paliperidona, 7-OH-risperidona, olanzapina e risperidona	Plasma e sangue	Extração em metanol	HILIC-ESI/MS/MS FM: ACN: água: TFA e ácido acético (85:15:0,025:0,5) FE: Betasil Silica-100 column 100 mm x 3,0 mm ID, 5 µm e XBridge BEH HILIC XP column (100 mm x 3,0 mm ID 2,5 µm	0,1 – 1,0 ng mL ⁻¹	De Meulder et al. 2016 ⁴⁶
Ziprasidona	Plasma humano	ELL	LC-MS/MS FM: ACN: NH ₄ Ac 5mM (85:15 v/v) FE: Zorbax Eclipse XDB-C18 100 x 4,6 mm	0,298 ng mL ⁻¹	Dhiman et al. 2016 ⁴⁷

(a tabela 2 continua...)

(continuação da tabela 2)

Analito	Matriz biológica	Preparo de amostra	Sistema de Detecção	Limite de quantificação	Referências
Risperidona, ziprasidona, quetiapina, haloperidol, aripiprazole, clorpromazina, sertralina, perfenazina, clonazepam e alprazolam	Plasma humano	EFS	UHPLC-MS/MS FM: NH ₄ Ac 5 mM com 0,1% ácido fórmico (v/v) e ACN FE: Shim-pack XR-ODS III (2,0 x 50 mm)	0,00321 – 2,75 µg mL ⁻¹	Zhong et al. 2016 ⁴⁸
Olanzapina, risperidona e 9-OH-risperidona	Plasma humano	ELL	UHPLC-DAD FM: NH ₄ Ac 10mM, pH 3,5 e ACN (70:30) FE: UPLC BEH C ₁₈ (2,1 x 100mm)	1,0 ng mL ⁻¹	Kumar et a. 2016 ⁴⁹
Risperidona, 9-OH-risperidona, aripiprazol, dehidroaripiprazol, pipamperona	Plasma humano	PP	UHPLC-MS/MS FM: NH ₄ Ac 2 M em ácido fórmico em metanol e NH ₄ Ac 2 M em ácido fórmico em água FE: C18 RP (2,1 x 50 mm)	2 – 15 µg mL ⁻¹	Wijma et al. 2016 ⁵⁰
Aripiprazol, clorpromazina, paliperidona, quetiapina, risperidona, ziprasidona, clozapina, olanzapina, citalopram, escitalopram, mirtazapina, fluoxetina, paroxetina, sertralina, venlafaxina, O-desmetilvenlafaxina, fluvoxamina e donepezil	Plasma	PP	UFLC-MS/MS FM: água com ácido fórmico 0,1% (v/v) e ACN com ácido fórmico 0,1% (v/v) FE: Synergy 3u-Hydro-RP (2,0 x 50 mm)	2 – 25 ng mL ⁻¹	Wang et al. 2015 ⁵¹
Haloperidol Flupentixol Levopromazina e promazina Cis-cloroprotixeno	Plasma	PP	UHPLC-MS/MS FM: formiato de amônio 20 mM pH 4,0 (ácido fórmico): ACN FE: Acquity UPLC BEH C18 2,1mm x 50mm	0,2 ng/mL 0,5 ng/mL 1 ng/mL 2 ng/mL	Gradinaru et al. 2014 ⁵²
Clozapina Haloperdiol Quetiapina Olanzapina Risperidona	Soro	ELL	UHPLC-MS/MS FM: NH ₄ Ac 10 mM pH 3,7: ACN FE: Agilent SB C18 2,1 x 50 mm	50,7 ng/mL 0,73 ng/mL 10,01 ng/mL 12,3 ng/mL 7,12 ng/mL	Patteet et al. 2014 ⁵³

Face as novas tecnologias estudadas e os avanços obtidos nas áreas de novos materiais para o preparo de amostra e para a análise dos fármacos, pode-se destacar a técnica de microextração em fase sólida no capilar (*in-tube* SPME) acoplada a cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC), a qual pré-concentra os analitos e excluiu os componentes endógenos em uma coluna capilar na primeira dimensão do sistema multidimensional e separa os analitos na coluna analítica na segunda dimensão, permitindo assim a automatização do procedimento analítico.

1.6. Microextração em fase sólida no capilar (*in-tube* SPME) acoplada à cromatografia líquida

A técnica *in-tube* SPME permite a hifenação da etapa de preparo da amostra com a análise cromatográfica (automação da análise), favorecendo a exatidão, precisão, menor consumo de solvente orgânico e do tempo de análise, além da diminuição da manipulação da amostra biológica pelo analista. Como é uma técnica de microextração, requer menor volume de amostra biológica (diminui o efeito da matriz).⁵⁴

A extração pelo procedimento *in-tube* SPME tem sido realizado por dois modos distintos: no primeiro modo, os analitos são concentrados na fase estacionária da coluna capilar por ciclos aspirar/dispensar da amostra diluída (Figura 2); no segundo, a amostra é percolada pelo capilar continuamente em uma única direção.⁵⁵

No primeiro modo, o capilar pode ser acoplado entre a alça de amostragem e a agulha do injetor automático do HPLC. Com a válvula de seis pórticos do injetor na posição carregar, a amostra será aspirada para o capilar a uma velocidade linear constante e em seguida, o mesmo volume aspirado é dispensado novamente no frasco do injetor automático. Na coluna capilar ocorre a partição ou sorção do analito de interesse. O processo é realizado diversas vezes, caracterizando-se ciclos aspirar/dispensar, até que ocorra o equilíbrio deste processo de sorção. Em seguida, a válvula de seis pórticos é colocada na posição injetar e, através de fase móvel ou adição de solvente orgânico, o analito é eluído do capilar e transferido para a coluna analítica para separação e detecção.

Figura 2. Esquema do processo *in-tube* SPME com ciclos de aspirar/dispensar. (a) extração e (b) dessorção⁵⁴

No segundo modo, a coluna capilar é posicionada após o injetor automático e conectada a uma válvula de seis a oito pórlicos para ser hifenada a coluna analítica. Alguns microlitos da amostra são percolados em uma única direção na coluna capilar (1º dimensão) para sorção seletiva dos analitos e remoção dos componentes endógenos. Estes componentes endógenos são direcionados ao descarte. Após este procedimento, altera-se a posição da válvula para que os analitos sejam eluídos para a coluna analítica (2º dimensão) para a separação cromatográfica e posterior detecção (Figura 3).

A eluição dos analitos da primeira coluna para a segunda dimensão pode ser realizada no modo direto (*straight-flush*), ou seja, com o fluxo de fase móvel no mesmo sentido da etapa de sorção ou no modo reverso (*back flush*), sentido contrário à pré concentração dos analitos.

Figura 3. Esquema do processo *in-tube* SPME no modo direto. 1) Extração e pré concentração dos analitos e 2) Dessorção

A técnica *in-tube* SPME, no entanto, necessita de amostras sem partículas em suspensão e pouco viscosas, para evitar o bloqueio do capilar e minimizar o efeito da matriz.⁵⁶ Desta forma, uma etapa anterior ao procedimento de extração tem sido requerida, especialmente para a remoção das proteínas presentes na amostra biológica. Procedimentos como a ultrafiltração ou precipitação através de sais inorgânicos, ácidos ou pequenas quantidades de solvente orgânico são empregados.

Geralmente, são utilizados capilares de sílica fundida revestidos internamente com fase estacionária quimicamente ligada, capilares de poli-éter-éter cetona (PEEK) recheados com partículas sólidas adsorventes e capilares de sílica fundida com fase monolítica.⁵⁷

A técnica *in-tube* SPME-LC tem sido empregada para a determinação de diferentes analitos presentes em diversas matrizes.

Em razão da alta seletividade do sistema MS/MS e do capilar à base de fase monolítica de sílica híbrida com os grupos ciano e amino incorporados, a técnica *in-tube* SPME foi acoplada diretamente ao sistema MS/MS para a determinação de aminoácidos em amostras de plasma.⁵⁸

A Tabela 3 apresenta os trabalhos utilizando a técnica para a determinação de fármacos em amostras biológicas.

Tabela 3. Métodos in-tube SPME para a determinação de fármacos em fluidos biológicos

Analito	Matriz biológica	Sistema de Detecção	Limite quantificação	Fase monolítica	Referências
Triptofano, metionina, tirosina, leucina, isoleucina, GABA, serotonina, ácido glutâmico, lisina, ácido aspártico, serina, alanina	Plasma humano	MS/MS	6 – 45 nmol mL ⁻¹	Sílica híbrida com grupos ciano e amino	Miranda et al. 2019 ⁵⁸
Anadaminda e 2-araquinodoil glicerol	Plasma humano	UHPLC-MS/MS	0,05 – 0,1 ng mL ⁻¹	Líquidos iônicos poliméricos (Cloreto de 1-vinil-3-hexilimidazólio Dibrometo de 1,12-di (3-vinilimidazólio) dodecano)	Souza et al. 2019 ⁵⁹
Anfetamina, metanfetamina e efedrina	Sílica	HPLC-fluorimétrico	0,5 – 0,8 µg mL ⁻¹	Nanotubos de carbono	Argente-garcía et al. 2016 ⁶⁰
Enrofloxacina, ciprofloxacina e ofloxacina	Água e urina	HPLC-UV	0,1 – 0,5 µg L ⁻¹	Dodecil sulfato de sódio revestido com nanopartículas de Fe ₃ O ₄	Manboni et al. 2015 ⁶¹

Inovadoras colunas capilares têm sido desenvolvidas para a técnica *in-tube* SPME para o aumento da seletividade, capacidade de sorção (eficiência da extração) e estabilidade mecânica.⁶² Dentre essas novas fases extratoras podemos destacar os materiais de acesso restrito (RAM), polímeros molecularmente impressos (MIP), fases imunossorventes e as fases monolíticas, que podem se apresentar como fases monolíticas à base de sílica, orgânica e sílica híbridas.⁵⁶

1.7. Fases monolíticas

O termo monolito origina-se do grego pela combinação das palavras mono (única) e lito (pedra) e de acordo com a definição da IUPAC é um artigo moldado, intrincado com uma microestrutura homogênea que não exhibe nenhum componente estrutural distinguível por microscopia óptica.⁶³ A fase monolítica constitui-se então de um meio contínuo de sorção que possui uma estrutura sólida altamente porosa, de pequenos domínios (mesoporos, 2 – 50 nm) e canais relativamente grandes (macroporos, > 50 nm), que fornecem altas permeabilidades para as amostras biológicas sem perda da eficiência da sorção.⁶⁴

As fases monolíticas tornaram-se impactantes nos anos 1990, no entanto, as tentativas de se preparar um meio de sorção formado por uma peça única datam de 1950.

Kubín, Špaček e Chromeček foram os primeiros a publicar a preparação de uma matriz polimérica contínua⁶⁵ e seu uso para uma separação cromatográfica por exclusão. Os autores utilizaram-se de uma solução aquosa de 2-hidroxi-etilmetacrilato contendo 0,2% de etileno dimetacrilato em um tubo de vidro de 25 mm de diâmetro interno.

No começo dos anos 1970, espumas de poliuretanos foram preparadas “in-situ” dentro de grandes colunas cromatográficas. A espuma foi produzida através de uma mistura contendo 4,4'-difeníl-metanodiisocianato e um poliál. Pelos padrões atuais, a performance das colunas monolíticas de poliuretano é pequena.⁶⁶

Após essas duas tentativas, o interesse em um meio de sorção monolítico desapareceu durante 20 anos. Hjertén utilizou-se de uma solução diluída de N,N'-metilenobisacrilamida e ácido acrílico em tampão fosfato, originando um polímero de leito macio, definidos como, leitos contínuos. Esse material foi comprimido em uma coluna com funcionalidade de troca iônica e se tornou comercialmente disponível pelo nome de UNO®.⁶⁶

Em 1990, Svec e Frechet realizaram a síntese de uma fase monolítica orgânica co-polimerizando glicidil metacrilato e etileno metacrilato com solventes orgânicos em um molde de coluna cromatográfica. Os autores obtiveram êxito na formação de um monolito poroso, o qual denominaram como um leito contínuo de separação.

Os trabalhos continuaram posteriormente no grupo de pesquisa do professor Tanaka (1993) com o desenvolvimento de fases monolíticas a base de sílica. Em 2000, a primeira coluna a base de sílica é vendida sob o nome Chromolith® pela empresa Merck.

Os desenvolvimentos nesta área se tornaram constantes desde então, passando a ser usadas não somente como materiais para colunas cromatográficas como também para eletrocromatografia capilar e preparo de amostra, como a microextração.

Dependendo da natureza do material monolítico, três categorias podem ser identificadas: monolitos de polímeros orgânicos, sílica ou sílica híbrida.

As colunas monolíticas a base de sílica tem boa resistência aos solventes orgânicos e boa estabilidade mecânica, no entanto, possui um difícil controle do processo de preparação e apresentam pequena faixa de trabalho de pH (2 a 8).⁶⁷

Os monolitos de polímeros orgânicos podem ser facilmente preparados por polimerização *in situ* e apresentam boa estabilidade química entre pH 2 a 12, não adsorvem biomoléculas, grande variedade de polímeros disponíveis e facilidade de incorporação de diferentes grupos funcionais (moléculas hidrofóbicas, moléculas carregadas, moléculas para interações específicas, etc.).⁶⁸

As colunas monolíticas a base de sílica híbrida apresentam características comuns aos dois monolitos acima citados.

Nesta dissertação empregamos as colunas monolíticas orgânicas, portanto esta modalidade será descrita com maiores detalhes.

1.8. Fases monolíticas poliméricas

Os monolitos de polímeros orgânicos são baseados principalmente em poliacrilamida, poliestireno-divinilbenzeno e polimetacrilato e têm sido preparados para fases cromatográficas ou extratoras.⁶⁹ Com a variedade de monômeros que podem ser escolhidos para a síntese torna-se possível obter monolitos com superfícies químicas diferentes.

A maneira mais simples de obter a superfície química desejada é através da copolimerização destes monômeros, que podem estar sozinhos no meio reacional otimizado ou em conjunto com outros monômeros. A combinação dos monômeros pode gerar monolitos com características polares e apolares.

Os monolitos poliméricos são preparados de uma mistura de polimerização homogênea envolvendo os monômeros, os solventes porogênicos e um iniciador radicalar, com a iniciação da reação ocorrendo através da temperatura ou da luz UV.⁷⁰ A polimerização pode ser realizada *in situ*, dessa maneira, diferentes formatos de monolitos são obtidos de acordo com o molde usado: Watanabe et al. (2009) desenvolveram um monolito em uma coluna de HPLC⁷¹, Kalashnikova et al. (2008) desenvolveram em formato de discos⁷², Branovic et al. (2002) desenvolveram em formato de cilindro⁷³ e Deverell et al. (2011) desenvolveram em formato de canais microfluidos⁷⁴, além de diversas sínteses em capilares.

Por se tratar de uma reação radicalar, os monolitos poliméricos são obtidos pela copolimerização dos monômeros contendo duplas ligações. Quando realizada a síntese em um capilar de sílica fundida, é necessário um preparo do mesmo para que os grupos silanóis residuais possam ser silanizados e sirvam de âncora para a fixação do monolito ao capilar. Ho et al. (2014) preencheram o capilar com viniltrimetoxisilano por 2 horas a 85°C para que este processo ocorresse.⁷⁵

Após o tratamento da superfície, o capilar é preenchido com a solução contendo os monômeros, solventes porogênicos e iniciador para uma polimerização em etapa única. A porosidade de um capilar monolítico é controlada alterando cada um destes compostos na mistura de polimerização, bem como a temperatura utilizada para a reação, portanto, será dado destaque a cada uma dessas variáveis a seguir.

1.8.1. Monômeros

Todas as propriedades físico-químicas estão intimamente ligadas ao monômeros escolhido para a síntese do monolito, proporcionando, desta maneira, diferentes tipos de interação entre o monolito e os analitos a serem analisados.

As propriedades dos monômeros ditam também qual serão os solventes utilizados para a síntese e, conseqüentemente, influenciam na estrutura porosa final do monolito.⁷⁶

Merhar et al. (2003) analisaram a estrutura do monômero e seu resultado na conformação final do monolito, avaliando o tamanho do poro e sua porosidade total. Nove monômeros foram utilizados, sendo eles: metacrilato de glicidila, metacrilato de etila, metacrilato de butila, metacrilato de 2-etilexil, metacrilato de dodecila, metacrilato de estearila, metacrilato de hidroxipropila, metacrilato de 2-dietilaminoetila e

metacrilato de 2-dimetilaminoetila. Todos os monômeros foram co-polimerizados sob as mesmas condições e os resultados mostraram que o tamanho do poro diminui significativamente com a hidrofobicidade do monômero.⁷⁷

1.8.2. Agente reticulante

O agente reticulante participa da estrutura final do monolito juntamente com o monômero escolhido. A mudança na proporção do agente reticulante na mistura do monolito acarreta na mudança das propriedades porosas do monolito e em sua composição química.

Tennikova et al. (1990) estudaram a quantidade de agente reticulante na mistura do monolito e verificou que um aumento na proporção do agente reticulante acarreta em uma diminuição na permeabilidade do monolito. Utilizando-se 75% de etilenoglicol dimetacrilato obteve-se uma permeabilidade de $8,0 \text{ m s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$, enquanto proporções de 60% e 50% resultaram em permeabilidades de $22,4 \text{ m s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ e $40,0 \text{ m s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$, respectivamente.⁷⁸ Em contrapartida, a diminuição da permeabilidade está relacionada com o aumento da área de sorção do monolito.

Além disso, a porcentagem de agente reticulante utilizado pode influenciar na rigidez e na homogeneidade do monolito final.

1.8.3. Solventes porogênicos

A escolha do solvente adequado também está relacionada com a porosidade da estrutura final do monolito, no entanto, ele não altera a composição química final do monolito.

O processo de polimerização ocorre através da separação de fases dos monômeros e agentes reticulantes que precipitam no meio reacional, dando início ao processo de nucleação.

Uma precipitação que ocorre rapidamente no meio reacional gera monolitos com poros maiores.⁷⁹ Dessa maneira, solventes específicos e em proporções adequadas deverão ser escolhidos frente aos monômeros de interesse para obter uma estrutura com as características desejáveis.

Atualmente, misturas envolvendo álcoois como ciclo-hexanol, 1-propanol, dodecanol, 1,4-butanodiol são utilizados para monômeros a base de acrilatos,

enquanto misturas de tolueno com álcoois de cadeias maiores são utilizados para monômeros de estireno-co-divinilbenzeno.⁸⁰ Cooper et al. (1999) utilizaram-se de dióxido de carbono super crítico como solvente da mistura reacional, pelo mesmo apresentar-se menos tóxico, menos inflamável e mais barato.⁸¹

1.8.4. Iniciador radicalar

Durante o processo de síntese, podem- ser empregadas diferentes técnicas para a formação do monolito. Dentre as mais usuais, destacam-se a iniciação através da temperatura e pela utilização de fótons. Ambas as técnicas são capazes de decompor o iniciador radicalar o qual originará uma molécula com um grupo radical para reagir com as duplas ligações dos monômeros e agentes reticulantes presentes na mistura reacional. Estas moléculas irão se ligar entre elas e formar núcleos na mistura reacional que, por sua solubilidade no meio reacional, irão precipitar e dar início a formação das cadeias poliméricas.

O iniciador mais utilizado para a síntese de monolitos orgânicos é a molécula de 2,2-azobisisobutílnitrila (AIBN), no entanto, a escolha do iniciador não está restrita ao mesmo. Bedair et al. (2006) utilizaram-se da molécula éter metílico e benzoílico como iniciador radicalar para a síntese de um monolito a base de metacrilato de glicidila.⁸² Enquanto Li et al. (2009) escolheram a molécula de 2,2-dimetóxi-2-fenil-acetofenona como iniciador radicalar.⁸³

1.8.5. Temperatura

A temperatura na qual o monolito é formado determina a velocidade da reação e afeta na porosidade do monolito. Svec e Frechét realizaram um trabalho estudando o efeito da variação da temperatura em um monolito de metacrilato de glicidila-co-dimetacrilato de etilenoglicol.⁸⁴ Observaram que com o aumento da temperatura há uma decomposição mais rápida do iniciador radicalar, formando mais núcleos de polimerização no meio reacional. Com a maior formação de núcleos no meio reacional, menor serão o tamanho destes núcleos e conseqüentemente menor serão os poros entre eles. Dessa forma, originam-se monolitos de menor porosidade conforme maior a temperatura.

Para que haja uma característica desejada no monolito de interesse, como a porosidade e área de superfície, a temperatura é um fator a ser otimizado.

1.9. Aplicações das fases monolíticas orgânicas

As fases monolíticas orgânicas foram primeiramente preparadas com o intuito de se destinarem a separação cromatográfica e, até hoje, são utilizadas com esta finalidade.

No entanto, as interações do monolito orgânico podem possibilitar à fase monolítica atuar no processo de extração dos analitos no preparo da amostra. As interações entre o monolito e os analitos são comumente do tipo dipolo-dipolo, dipolo-dipolo induzido, ligações de hidrogênio e interações π - π , garantindo uma retenção eficaz no sorvente sintetizado através dos equilíbrios de sorção que ocorrem na fase extratora. Assim, os capilares de monolitos orgânicos podem ser empregados em conjunto com diferentes técnicas de microextração, na pré-concentração de uma ampla variedade de analitos (Tabela 4).

Tabela 4. Diferentes técnicas de microextração utilizando monolitos orgânicos como fase extratora

Analitos	Matriz	Técnica de Extração	Monolito orgânico (monômeros)	Referências
Naftaleno, acenaftileno, fluoreno, fenantreno, antraceno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(k)fluoranteno e dibenzo (a,h)antraceno	Água	PMME*	Metacrilato de benzila e etileno dimetacrilato	Al-Rifai et al. 2018 ⁸⁵
Selenitos e Selenatos	Água	PMME	Metacrilato de glicidila e etileno dimeacrilato	Wang et al. 2018 ⁸⁶
Antidepressivos	Urina	PMME	Metacrilato de butila e Dimetacrilato de etilenoglicol	Cai et al. 2017 ⁸⁷
Corantes	Pimenta	EFS	2-etilhexilacrilato, divinilbenzeno e metacrilato de metila	Du et al. 2016 ⁸⁸

(a tabela 4 continua...)

(continuação da tabela 4)

Analitos	Matriz	Técnica de Extração	Monolito orgânico (monômeros)	Referências
Bisfenol	Soro humano	PMME	Metacrilato de butila e dimetacrilato de etileno	Wang et al. 2016 ⁸⁹
Estrogênio	Cosméticos	PMME	Metacrilato de butila e dimetacrilato de etileno	Zhou et al. 2015 ⁹⁰
Penicilina G, Penicilina V, Oxacilina, Cloxacilina Dicloxacilina e Nafcilina	Água de rio e leite	SPME	Al- Metacrilato de butilo-dimetacrilato de co-etileno	Lirio et al. 2015 ⁹¹

PMME: *Microextração em monolito polimérico

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo principal

Sintetizar a fase monolítica polimérica a base de metacrilato de butila-co-dimetacrilato de etilenoglicol em capilar de sílica fundida para ser utilizada como fase extratora para a determinação dos antipsicóticos clozapina, clorpromazina, olanzapina e quetiapina e seus metabólitos N-desmetilclozapina, desmetilclorpromazina, 7-hidroxi-clorpromazina, N-desmetilolanzapina e norquetiapina em amostras plasma de pacientes esquizofrênicos por *in-tube* SPME-UHPLC-MS/MS.

2.2. Objetivos específicos

- Otimização do procedimento de síntese da fase monolítica polimérica orgânica;
- Caracterização física e química da fase monolítica polimérica;
- Otimização das condições LC-MS/MS para a determinação dos antipsicóticos e seus metabólitos;
- Otimizar as variáveis do procedimento *in-tube* SPME;
- Validar o método *in-tube* SPME/UHPLC-MS/MS para a determinação dos antipsicóticos e seus metabólitos em amostras de plasma;
- Analisar amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos.

Materiais e Métodos

3. Materiais e Métodos

3.1. Materiais

Clorpromazina, clozapina, olanzapina e quetiapina foram compradas da Cerilliant (Round Rock, TX, USA). Desmetilclorpromazina e 7-hidroxi-clorpromazina foram adquiridas da TRC Canada (Toronto, ON, Canada). N-desmetilclozapina foi obtida da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). N-desmetilolanzapina foi comprada da Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA). Norquetiapina foi adquirida da Biovision (Milpitas, CA, USA). Os padrões internos clorpromazina-d3 e quetiapina-d8 foram obtidos da Cerilliant (Round Rock, TX, USA). Metacrilato de butila (BMA) (99%), dimetacrilato de etilenoglicol (EGDMA, 98%), 1-propanol (grau HPLX), viniltrimetoxissilano (VTMS), 1,4-butenodiol (99%) e 2,2-azobisisobutílnitrila (AIBN) foram comprados da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). O capilar de sílica fundida (530 µm d.i. × 10 cm) foi adquirido da NST (São Paulo, Brasil). Acetonitrila (ACN), metanol (MeOH) (grau HPLC), acetato de amônio (NH₄Ac) e ácido fórmico foram fornecidos pela JTBaker (Phillisburg, NJ, USA). Ácido clorídrico (HCl) e hidróxido de sódio (NaOH) foram comprados da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Soluções aquosas foram preparadas com água ultrapura Mili-Q, sistema Millipore (18,2 MΩ cm) (São Paulo, SP, Brasil).

3.2. Métodos Analíticos

3.2.1. Síntese do capilar monolito orgânico poli(butyl metacrilato-co-etilenoglicol dimetacrilato)

O monolito orgânico de BMA-co-EGDMA foi sintetizado baseado nos trabalhos publicados de Skoglund et al. (2013)⁹² e Liu et al. (2011)⁹³, após algumas modificações. Foram avaliados diferentes procedimentos de síntese a fim de obter a capacidade de sorção adequada e fase com permeabilidade adequada para a percolação da amostra de plasma (após pré-tratamento), como demonstrado na Tabela 5.

Tabela 5. Procedimentos para síntese do capilar monolítico orgânico de poli(Metacrilato de Butila-co-Dimetacrilato de Etilenoglicol)

Monolito	Monômero/Porogênico (%m/m)	EGDMA:BMA (%m/m)	Porogênicos BUT:PRO (%m/m)	AIBN
M1	40:60	70:30	25:65	1%
M2	40:60	55:45	30:60	1%
M3	35:65	40:60	57:43	1%
M4	35:65	50:50	57:43	1%
M5	35:65	30:70	57:43	1%

BUT = 1,4-butenodiol; PRO = 1-propanol; AIBN = 2,2- azobisisobutílnitrila, BMA = Metacrilato de Butila, EGDMA = Dimetacrilato de Etilenoglicol

Antes da síntese do monolito orgânico foi necessário realizar o procedimento para o preparo do capilar de sílica fundida para que ocorresse a ativação dos grupos silanóis na superfície interna do capilar. Este procedimento consistiu, inicialmente, na lavagem do capilar com uma solução $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ de HCl por 30 minutos, seguida por uma lavagem com água até que a mesma, após percorrer o capilar, apresenta-se pH 7,0. Em seguida, o capilar foi lavado com uma solução $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH por 2 horas, seguida por uma lavagem com água por 30 minutos e finalizado com uma lavagem com metanol por mais 30 minutos. Após a etapa de lavagem, o capilar foi purgado com nitrogênio a 160°C por 3 horas para o seu uso.

Devido ao monolito utilizado para preencher o capilar ser um monolito polimérico orgânico, foi necessária a modificação dos grupos silanóis com a intenção de obter ligações covalentes entre o monolito e a parede interna do capilar. Desta maneira, a superfície do capilar foi modificada através do procedimento de silanização utilizando-se uma solução de viniltrimetoxissilano. O procedimento de silanização consistiu no preenchimento do capilar com a solução de viniltrimetoxissilano e, em seguida, o capilar foi vedado em suas extremidades com borrachas de silicone e colocado na estufa para reagir a 85°C por 2 horas, como previamente descrito por Ho, T.D. et al. (2014)⁷⁵. O capilar silanizado foi lavado com metanol e purgado com nitrogênio a 60°C por 3 horas.

Para realizar a síntese do monolito, foram misturadas diferentes proporções de BMA (monômero funcional), EGDMA (agente reticulante), AIBN (iniciador radicalar), 1-propanol e 1,4-butenodiol (solventes porogênicos) como descrito na

Tabela 6. Esta mistura foi agitada no vortex por 1 minuto, sonicada por 10 minutos e purgada com nitrogênio por 10 minutos.

O capilar anteriormente preparado foi preenchido com a mistura e novamente vedado com borrachas de silicone. A reação de polimerização foi mantida a 60°C durante 20 horas. Finalmente, o capilar foi lavado com metanol por 2 horas para remover monômeros, solventes e quaisquer outros compostos solúveis que não reagiram dos poros do monolito.

Após avaliar todos os procedimentos de síntese do monolito, foi verificado que o monolito denominado como M3 apresentou as melhores características físico-químicas e melhores interações com os analitos de interesse. Para a sua síntese, foram utilizados 235 µL de BMA, 133 µL de EGDMA, 458 µL de 1-propanol, 277 µL de 1,4-butenodiol e 2,33 µL de AIBN gerando a mistura reacional submetida ao processo de polimerização acima descrito.

3.2.2. Caracterização do capilar monolítico orgânico de poli(BMA-co-EGDMA)

O capilar monolítico denominado como M3 foi selecionado para a caracterização química e física.

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi a técnica empregada para avaliar a superfície do monolito orgânico. O capilar monolítico M3 foi submetido a evaporação por carbono e revestido com ouro por 180s no equipamento Bal-Tec SCD050 Sputter (Fürstentum, Liechtenstein). Em seguida, o capilar foi analisado no microscópio eletrônico de varredura Carl Zeiss EVO50 (Cambridge, UK).

Os grupamentos químicos presentes no monolito foram identificados através da técnica de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) no espectrômetro Shimadzu-IRPrestige-21 (ABB Bomem series MB100). Para a obtenção do espectro, uma porção da fase monolítica foi macerada juntamente com pastilhas de KBr.

As análises de MEV e FTIR foram realizadas em equipamentos presentes no Departamento de Química da Faculdade de Filosofias Ciências e Letras de Ribeirão Preto – FFCLRP da Universidade de São Paulo (USP).

3.2.3. Amostras de plasma

O método *in-tube* SPME-UHPLC-MS/MS foi otimizado e validado com amostras de plasma livre dos fármacos em análise (amostras branco) de voluntários que não foram expostos a nenhum fármaco por pelo menos 72 horas. As amostras branco e amostras de plasmas de pacientes que estão em terapia com os antipsicóticos foram cedidas pela Enfermaria da Psiquiatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (EPQU-HCFMRP) e estão em acordo com os critérios estabelecidos pelo Comitê de Ética em da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brasil. As amostras de plasma dos pacientes esquizofrênicos foram coletadas e armazenadas a -80°C por até seis meses.

3.2.4. Preparo das amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos

Inicialmente, 300 µL de amostra de plasma foram enriquecidos com soluções de padrões internos (clopromazina-d3 e quetiapina-d8) para obter concentrações finais de 50 ng mL⁻¹ cada. As proteínas do plasma foram precipitadas com 600 µL de ACN e, após este procedimento, o plasma foi centrifugado por 30 minutos a 15.000 rpm. 800 µL do sobrenadante foi coletado e seco em um concentrador a vácuo (Eppendorf, Brasil). O extrato seco foi reconstituído em 100 µL de solução tampão de NH₄Ac e hidróxido de amônia de concentração 5 mmol L⁻¹.

Com o objetivo de avaliar a capacidade de sorção do monolito, foram preparadas soluções tampão com diferentes valores de pH (4,0; 7,0 e 10,0). 10 µL desta solução foram injetados no sistema *in-tube* SPME-UHPLC-MS/MS para análise.

3.2.5. Condições cromatográficas e espectrométricas

As análises cromatográficas foram realizadas no equipamento Waters ACQUITY UPLC H-Class acoplado ao espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo Xevo® TQ-D (Waters Corporation, Milford, MA, USA). A ionização (fonte de ionização eletrospray) foi realizada no modo positivo.

Para a separação cromatográfica dos fármacos e metabólitos foi empregada a coluna ACQUITY UPLC CSH C18 (1,7 µm, 2,1 × 100 mm) mantida a 40°C. Diferentes fases móveis foram avaliadas para obter adequada resolução

cromatográfica, detectabilidade e menor tempo de análise. Foi variado a concentração molar da solução de acetato de amônio (NH_4Ac) da fase aquosa contendo 0,1% de ácido fórmico e do gradiente de eluição com o intuito de obter as melhores condições cromatográficas, como mostrado na Tabela 6.

Tabela 6. Diferentes composições de fases móveis avaliadas para separação simultânea dos fármacos e metabólitos

Procedimento	Solvente A	Solvente B	Gradiente de eluição	Vazão ($\mu\text{L min}^{-1}$)
A	NH_4Ac 5 mM (0,1% Ácido fórmico)	ACN	1	300
B	NH_4Ac 10 mM (0,1% Ácido fórmico)	ACN	2	300
C	NH_4Ac 10 mM (0,1% Ácido fórmico)	ACN	3	300
D	NH_4Ac 10 mM (0,1% Ácido fórmico)	ACN	4	300

Gradiente 1: 10-25% B (0–2, 0 min), 25–40% B (2,0–8,0 min), 40%–80% B (8,0–10,0 min), 80%–10% B (10,0–15,0min).

Gradiente 2: 10-65% B (0–2,50 min), 65–85% B (2,50–3,0 min), 85% B (3,0–4,50 min), 85%–65% B (4,50–6,0min), 65%–10% B (6,0–15,0).

Gradiente 3: 20-65% B (0–2,50 minutos), 65–85% B (2,50–3,0 min), 85% B (3,0–4,50 minutos), 85% – 65% B (4,50–5,0min), 65%–20% B (5,0–6,0 min), 20% B (6,0–15,0min).

Gradiente 4: 30-65% B (0–2,50 minutos), 65–85% B (2,50–3,0 min), 85% B (3,0–4,50 minutos), 85%–65% B (4,50–5,0min), 65%–20% B (5,0–6,0 min), 20% B (6,0–15,0min).

A melhor resolução cromatográfica foi obtida utilizando-se fase móvel constituída pelo solvente A (solução de NH_4Ac 10 mM + 0,1% ácido fórmico) e B (ACN) a uma vazão de $300 \mu\text{L min}^{-1}$. O gradiente de eluição consistiu em 20% B (0 min) 20-65% B (2,50 minutos), 65–85% B (3,0 minutos), 85% B (4,50 minutos), 85%–65% B (5,0min), 65%–20% B (6,0 min), 20% B (15,0min).

As condições nas quais o sistema analítico foi operado foram: voltagem do capilar, 3,20 kV; temperatura da fonte, 150°C , temperatura de dessolvatação, 400°C ; fluxo do gás de dessolvatação, 700 L h^{-1} (N_2 99,9% de pureza) e fluxo do gás de cone, 150 L h^{-1} (N_2 99,9% de pureza). Argônio foi utilizado como gás de colisão (99,9999%

de pureza) e o *dwell time* foi de 0,049 segundos. Os analitos e os padrões internos foram analisados no modo SRM (monitoramento de reações selecionadas) e as transições específicas utilizadas para cada analito estão apresentadas na Tabela 7. Foram selecionadas duas transições, após a clivagem do íon precursor, para serem monitoradas. A transição de maior sinal foi utilizada para fins quantitativos e a segunda transição foi utilizada para a confirmação dos respectivos analitos. Os dados foram adquiridos utilizando o programa MassLynx V4.1.

Tabela 7. Transições iônicas, configurações do instrumento e tempos de retenção do método *in-tube* SPME-UHPLC-MS/MS para cada antipsicótico e seus metabólitos

Analitos	Íon Precursor (m/z)	Íon Quantitativo (m/z)	Ce (eV)	DP (v)	Íon Qualitativo (m/z)	Tempo de retenção
Chlorpromazina	319,0	85,9	38	18	57,9	9,27
Clorpromazina-d3	324,0	60,9	34	42	89,0	9,25
Clozapina	327,0	270,0	44	30	191,9	8,62
Olanzapina	313,0	256,0	22	20	84,0	5,95
Quetiapina	384,0	253,0	36	18	221,0	8,66
Quetiapina-d8	392,2	225,9	38	48	257,8	8,64
Desmetil clorpromazina	304,9	72,0	30	14	43,9	9,19
7-hidroxi-clorpromazina	335,0	85,9	30	34	57,8	8,71
N-desmetil clozapina	313,0	191,9	28	52	69,9	8,52
N-desmetil olanzapina	299,0	197,9	26	28	212,9	5,46
Norquetiapina	296,0	209,9	54	26	138,9	8,61

3.2.6. Condições de sorção dos analitos junto à fase monolítica

Nesta etapa foram avaliados (a) a solução de reconstituição do extrato seco, (b) fase móvel para a etapa de sorção dos analitos e (c) a fase móvel para eluição dos analitos. Esta etapa foi realizada apenas com a coluna monolítica (1D), sem uso da coluna analítica (coluna 2D). Para tanto, 10 µL de solução padrão 1 µmol mL⁻¹ foram secos e o extrato seco foi reconstituído em 200 µL de solução aquosa em

diferentes valores de pH. Em seguida, 10 µL desta solução foram injetados no sistema UHPLC-MS/MS. Em 6 min a força da fase móvel foi aumentada para eluição dos analitos.

As soluções de reconstituição avaliadas foram as seguintes: solução de acetato de amônio em diferentes valores de pH (4,0; 7,0 e 10,0).

As fases móveis utilizadas para a sorção dos analitos foram: água e soluções de NH₄Ac em pH (4,0; 7,0 e 10,0), e ACN e metanol foram utilizados para a eluição dos analitos para a segunda dimensão.

As melhores condições foram obtidas utilizando-se solução de NH₄Ac 5 mM com pH 10 como solução de reconstituição dos analitos, água como fase móvel para a sorção dos analitos junto ao monolito e ACN para a eluição dos analitos, ambos a uma vazão de 0,1 mL min⁻¹.

3.2.7. Procedimento *in-tube* SPME-UHPLC-MS/MS

No procedimento *in-tube* SPME-UHPLC-MS/MS as colunas monolítica (1D) e analítica (2D) foram conectadas à válvula de 6 pórticos. A coluna 1D foi conectada nos pórticos 1 e 4 e a coluna 2D no pórtico 5 e no espectrômetro de massas. A bomba quaternária (QSM) foi conectada no pórtico 1 e a binária (BSM) no pórtico 6. Na primeira etapa do procedimento *in-tube* SPME-UHPLC-MS/MS, com a válvula na posição 1, a fase móvel da QSM foi percolada pela coluna monolítica sendo direcionada para o descarte, enquanto a fase móvel da BSM foi percolada pela coluna analítica e encaminhada para o espectrômetro de massas. Nesta etapa ocorreu o condicionamento de ambas as colunas. Após a injeção da amostra, os analitos foram sorvidos na coluna 1D (etapa de pré concentração) com a fase móvel da bomba QSM, enquanto os interferentes (componentes endógenos) foram direcionados para o descarte. Na segunda etapa, a válvula foi colocada na posição 2, a fase móvel da bomba QSM foi direcionada diretamente para o descarte, enquanto que a fase BSM eluiu/dessorveu os analitos da coluna monolítica (1D) para a coluna analítica (2D). A válvula retornou para a posição 1, com o aumento gradativo da força da fase móvel (eluição por gradiente, fase BSM), os analitos foram separados e direcionados para o espectrômetro de massas (detecção MS/MS) enquanto a coluna 1D foi regenerada com a fase móvel QSM.

Após a determinação das condições de sorção, o desenvolvimento do procedimento *in-tube* SPME-UHPLC-MS/MS foi avaliado com a utilização da coluna analítica como coluna 2D. Para tanto, foi avaliado (a) a fase móvel de eluição, (b) o comprimento do capilar monolítico, (c) o tempo de eluição dos analitos e (d) o modo de eluição (“direct flush” ou “backflush”). A composição das fases móveis utilizadas na BSM e QSM foram selecionadas com base nos melhores resultados obtidos nas etapas de otimização da separação cromatográfica e sorção dos analitos junto à fase extratora, respectivamente.

Assim como nas etapas anteriores, 10 µL de solução padrão de 1 µg mL⁻¹ em metanol foram evaporados e o extrato seco foi reconstituído em solução adequada para a pré-concentração dos analitos. 10 µL de uma solução de 50 ng mL⁻¹ foram injetados no sistema UHPLC-MS/MS.

As melhores configurações para o método *in-tube* SPME-UHPLC-MS/MS foram obtidas no modo “direct flush” com eluição dos analitos de 2 minutos a 6,5 minutos utilizando a condição C (item 3.2.5.) empregando-se um capilar monolítico com 10 centímetros de comprimento.

3.2.8. Validação analítica do método *in-tube* SPME-UHPLC-MS/MS

A validação analítica do método *in-tube* SPME-UHPLC-MS/MS foi realizada segundo as normas preconizadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) – RESOLUÇÃO RDC N° 27, de 17 de maio de 2012. Foram avaliados os parâmetros seletividade, limite de quantificação, precisão intra e interensaio, exatidão intra e interensaio, efeito residual, efeito matriz e linearidade. Para a realização destes ensaios, foram utilizadas amostras de plasma enriquecidas com os fármacos e seus metabólitos e com os padrões internos deuterados.

Foi preparada uma curva para cada analito em diferentes intervalos de concentração abrangendo seus intervalos terapêuticos. Estas curvas foram geradas em quintuplicadas plotando-se a concentração plasmática do analito em função das áreas obtidas (área do analito/área do padrão interno). Os intervalos de concentração utilizados foram: Clozapina (10 – 700 ng mL⁻¹); Clorpromazina (10 – 400 ng mL⁻¹); Olanzapina (10 – 200 ng mL⁻¹); Quetiapina (10 – 600 ng mL⁻¹); Desmetilclozapina (10 – 500 ng mL⁻¹); Desmetilclorpromazina (10 – 200 ng mL⁻¹); 7-hidroxiclорpromazina (10 – 200 ng mL⁻¹); N-desmetilolanzapina (10 - 200 ng mL⁻¹) e Norquetiapina (10 – 200 ng

mL⁻¹), distribuídos na curva através de 6 padrões de calibração de concentração diferentes, incluindo o limite inferior de quantificação (LIQ) e limite superior de quantificação (LSQ).

As curvas analíticas puderam ser utilizadas para análises quantitativas quando o coeficiente de variação (CV) dos padrões de calibração apresenta valor menor que 20 % para a concentração correspondente ao LIQ e menor que 15% para os demais padrões de calibração.

$$CV = \frac{\text{Desvio Padrão}}{\text{Concentração média experimental}} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

A linearidade do método foi comprovada através do coeficiente de determinação e do teste de *lack-of-fit* para as curvas analíticas dos analitos.

A seletividade do método foi avaliada através da comparação do cromatograma obtido com a injeção da amostra de plasma branco com a amostra de plasma enriquecida com os analitos na concentração correspondente ao LIQ.

O LIQ foi determinado como sendo a menor concentração do analito na curva analítica preparada na matriz que pode ser quantitativamente determinada com precisão e exatidão apropriada.

A precisão foi avaliada em ensaios realizados em um mesmo dia (precisão intraensaio) e em três dias consecutivos (precisão interensaio). Cada experimento foi realizado em quintuplicata em cinco concentrações diferentes. A precisão foi expressa através dos valores de CV de amostra de plasmas enriquecidas em cinco diferentes concentrações denominadas como LIQ, controle de qualidade baixo (CQB), controle de qualidade médio (CQM), controle de qualidade alta (CQA) e no LSQ. Os valores de CV não devem exceder em 20% para a concentração do LIQ e em 15% para as demais concentrações.

A exatidão foi avaliada em ensaios realizados em um mesmo dia (exatidão intraensaio) e em três dias consecutivos (exatidão interensaio). A exatidão foi expressa através dos valores de erro padrão relativo (EPR) de amostras de plasma enriquecidas na concentração dos padrões de calibração LIQ, CQB, CQM, CQA e LSQ. Os valores de EPR obtidos devem estar contidos no intervalo de $\pm 15\%$ do valor nominal para o LIQ e $\pm 20\%$ do valor nominal para as demais concentrações.

$$EPR = \frac{(Concentração\ média\ experimental - Valor\ nominal)}{Valor\ nominal} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

O efeito residual foi avaliado através da injeção da amostra de plasma branco antes da injeção da amostra de plasma enriquecida na concentração de valor nominal do LSQ e da injeção de 2 amostras de plasma branco após a injeção da amostra de plasma enriquecida na concentração de valor nominal do LSQ. A resposta obtida das amostras de plasma branco após a injeção do LSQ não deve apresentar valores maiores que 20% da resposta obtida para os valores de LIQ para os analitos e não deve apresentar valores maiores que 5% da resposta dos valores do padrão interno.

O efeito matriz foi investigado usando-se oito amostras de plasma branco enriquecidas com os analitos nas concentrações de padrão de calibração referentes ao CQB e CQA. O fator de matriz normalizado (FMN) foi avaliado através da comparação da resposta dos analitos na presença da matriz (plasma) e na ausência da matriz. O FMN foi calculado de acordo com a equação a seguir:

$$FMN = \frac{\frac{Resposta\ do\ analito\ em\ matriz}{Resposta\ do\ PI\ em\ matriz}}{\frac{Resposta\ do\ analito\ em\ solução}{Resposta\ do\ PI\ em\ solução}} \quad (\text{Equação 3})$$

Resultados

4. Resultados

4.1. Síntese do capilar monolítico orgânico poli(metacrilato de butila-co-dimetacrilato de etilenoglicol)

Os monolitos orgânicos metacrílicos são produzidos, geralmente, via copolimerização radicalar no *bulk* entre os monômeros funcionais e o agente reticulante na presença de solventes porogênicos e um iniciador radicalar.

A reação dá-se início com a decomposição do iniciador radicalar, iniciando assim a polimerização. Conforme há o crescimento das cadeias poliméricas, a solubilidade destas diminui, precipitando no meio reacional para a formação de um núcleo. A cinética desta reação é favorecida em razão do ambiente repleto de monômeros em maior concentração.

Polimerizações sucessivas aumentam o tamanho dos núcleos à microglóbulos que se conectam entre si para formar a estrutura final. A estrutura final apresenta-se como um sólido monolítico contínuo e os solventes porogênicos que ocupam uma região dentro do monolito, denominada de macroporos. A mudança nas concentrações de cada reagente e a temperatura influenciam na morfologia final do monolito.

As proporções entre as concentrações dos monômeros e solventes porogênicos foram avaliadas, pois quanto maior a concentração dos solventes porogênicos, maior o tamanho dos poros gerados, ocasionado no aumento da permeabilidade dos analitos pela fase monolítica e diminuindo a pressão no sistema.

Ao passar metanol (utilizado como solução de limpeza após a síntese) pelo capilar, foi observado pressão excessiva nos capilares monolíticos M1 e M2, visto que o metanol não conseguia permear por todo o capilar devido à baixa permeabilidade obtida por esta síntese. A elevada pressão realizada sobre o capilar com a passagem do metanol ocasionou na expulsão da fase monolítica do interior dos capilares M1 e M2, sendo necessário, desta forma, aumentar a concentração dos solventes porogênicos em relação aos monômeros na mistura polimérica. Os capilares M3, M4 e M5 (Tabela 8) apresentaram permeabilidade adequada com baixa pressão para a percolação de metanol e de solução com analitos.

A variação de diferentes concentrações de monômero funcional e do agente reticulante alterou o tamanho dos poros e a formação química e estrutural do monolito. Maiores concentrações do agente reticulante resultam na diminuição do

poro e, em contrapartida, um aumento da área superficial. Desta maneira, a relação entre estas propriedades alterou a capacidade de sorção da fase monolítica. A sorção de cada analito no capilar monolítico foi avaliada (Figura 4) e o capilar do procedimento M3 foi selecionado para as análises posteriores, por proporcionar extração mais eficiente para a maioria dos analitos estudados.

Tabela 8. Otimização do procedimento de síntese do capilar monolítico orgânico de poli (Metacrilato de Butila-co-Dimetacrilato de Etilenoglicol)

Monolito	Monômero/Porogênico (%m/m)	EGDMA:BMA (%m/m)	Porogênicos BUT:PRO (%m/m)	AIBN	Permeabilidade
M1	40:60	70:30	25:65	1%	Ruim
M2	40:60	55:45	30:60	1%	Ruim
M3	35:65	40:60	57:43	1%	Boa
M4	35:65	50:50	57:43	1%	Boa
M5	35:65	30:70	57:43	1%	Boa

BUT = 1,4-butanodiol; PRO = 1-propanol; AIBN = 2,2-azobisisobutílnitrilo, BMA = Metacrilato de Butila, EGDMA = Dimetacrilato de Etilenoglicol.

Figura 4. Capacidade de sorção das diferentes fases monolíticas no procedimento *in-tube* SPME. Os ensaios foram realizados com soluções padrões dos analitos na concentração de 50 ng mL⁻¹

4.2. Caracterização do capilar monolítico orgânico de poli(BMA-co-EGDMA)

A microscopia eletrônica de varredura auxiliou na caracterização morfológica através de imagens topológicas do material. As Figuras 5 e 6 ilustram as imagens de MEV do corte seccional do capilar monolítico de poli(BMA-co-EGDMA) com magnitude de 200x e 10000x. O monolito exibiu continuidade e homogeneidade por toda sua estrutura interconectada com os macroporos, que permitiram a passagem da amostra pelo capilar a uma baixa pressão. A presença de macroporos ocorreu devido à presença dos solventes porogênicos que permaneceram ao final da precipitação e crescimento dos núcleos dos monômeros funcionais e agentes reticulantes. O monolito permaneceu ligado à superfície interna do capilar. A ligação entre o monolito e a parede interna do capilar era constituída por ligações covalentes, não sendo requerido, portanto, o uso de “frits” para a fixação da fase monolítica.⁹⁴ Como resultado desta ligação química e de sua estrutura, o monolito exibiu estabilidade química e mecânica, bem como biocompatibilidade com amostras biológicas.^{94,95} Segundo as imagens de microscopia, foi possível avaliar o tamanho das partículas do monolito entre 154,1nm a 325,9 nm. O capilar monolítico proposto foi reutilizado mais de cem vezes sem observar mudanças significativas (CV<15%) em sua capacidade de sorção.

Figura 5. Microscopia eletrônica de varredura do capilar monolítico de Metacrilato de Butila-co-Dimetacrilato de Etilenoglicol ampliada em 1000 vezes

Figura 6. Microscopia eletrônica de varredura do capilar monolítico de Metacrilato de Butila-co-Dimetacrilato de Etilenoglicol ampliada em 10000 vezes

A Figura 7 ilustra o espectro de infravermelho da fase monolítica de poli-(BMA-co-EGDMA). Com o espectro de infravermelho foi possível identificar e inferir a incorporação dos grupos funcionais ao monólito. A banda referente ao sinal em $3443,8\text{ cm}^{-1}$ indica a presença de grupos hidroxilas (O-H). Apesar de a estrutura final do monólito não possuir grupos hidroxilas, o mesmo apresenta alta porosidade e moléculas de água encontram-se facilmente adsorvidas ao material, explicando a presença desta banda. As bandas em $2960,7\text{ cm}^{-1}$ e $1454,4\text{ cm}^{-1}$ indicam a presença de carbonos sp^3 ligados a hidrogênio. A banda em $1728,6\text{ cm}^{-1}$ indica a presença de ligações carbonila (C=O) e as bandas $1388,9\text{ cm}^{-1}$, 1254 cm^{-1} e $1157,1\text{ cm}^{-1}$ indicam as vibrações de dobramento, simétricas e assimétricas da ligação C-O de ésteres. O espectro ainda apresenta bandas em $1637,6\text{ cm}^{-1}$ referentes aos estiramento de grupos C=C de vinilas residuais, vibrações em $814,36\text{ cm}^{-1}$ e $751,24\text{ cm}^{-1}$ referentes aos grupos vinilas cis-dissubstituídos e vibrações fora do plano em $959,12\text{ cm}^{-1}$ de ligações C-H. O espectro de FTIR confirmou a incorporação de ambos os monômeros, metacrilato de butila e dimetacrilato de etilenoglicol na estrutura do capilar monolítico.^{96,97}

Figura 7. Espectro de infravermelho do capilar monolítico de Metacrilato de Butila-co-Dimetacrilato de Etilenoglicol

4.3. Condições cromatográficas e espectrométricas

A separação dos analitos foi realizada na coluna ACQUITY UPLC CSH C18 (1.7 μm , 2.1 x 100mm) de caráter apolar e utilizando-se uma fase móvel de maior caráter polar. Os analitos apresentam um caráter apolar, mas fracamente básico, sendo que o aumento da força da fase móvel com ACN diminui o tempo de retenção dos analitos.

A vazão da fase móvel foi mantida em 300 $\mu\text{L min}^{-1}$ por proporcionar corrida de menor tempo de análise e pressões adequadas à coluna. Os aditivos ácidos foram mantidos em todas as fases móveis pois eles promovem a protonação dos analitos básicos, favorecendo o aumento do sinal analítico no modo ESI positivo. As fases móveis com maior porcentagem inicial de solução de NH_4Ac resultaram em separações mais eficientes com melhores resoluções dos picos. Soluções de NH_4Ac com maior concentração molar permitiram um aumento da força iônica da solução, favorecendo a sorção dos analitos junto à fase estacionária e simetria dos picos. Desta forma, a solução de NH_4Ac na concentração molar de 10mM foi escolhida para a separação. Dentre as fases móveis avaliadas, a fase B resultou em cromatogramas com picos mais simétricos, devido a ocorrência de mais processos de partição durante a separação, mas não favoreceu a eluição dos analitos da coluna monolítica; a fase móvel C apresentou menor tempo de análise pelo aumento da força da fase móvel e sua composição inicial favoreceu a eluição dos analitos da coluna monolítica (Figura 8), já a fase móvel D, favoreceu a eluição dos analitos da coluna monolítica porém

sua separação proporcionou picos mais largos e com analitos possuindo tempo de retenção no tempo de volume morto. Devido aos resultados obtidos, a fase C foi escolhida por apresentar características desejáveis tanto para a eluição como para a separação dos analitos.

Figura 8. Cromatogramas de íons totais (TIC) obtidos por injeção de solução padrão dos analitos a 50 ng mL⁻¹ separados por ACQUITY UPLC CSH C18 (1.7 µm, 2.1 x 100mm) com vazão máxima de 300 µL min⁻¹. Condição B: Solvente A = NH₄Ac 10 mM (0,1% Acido fórmico), solvente B = ACN com gradiente: 10–65% B (0–2,50 min), 65–85% B (2,50–3,0 min), 85% B (3,0–4,50 min), 85%–65% B (4,50–6,0min), 65%–10% B (6,0–15,0); Condição C: Solvente A = NH₄Ac 10 mM (0,1% Acido fórmico), solvente B = ACN com gradiente: 20–65% B (0–2,50 minutos), 65–85% B (2,50–3,0 min), 85% B (3,0–4,50 minutos), 85%–65% B (4,50–5,0min), 65%–20% B (5,0–6,0 min), 20% B (6,0–15,0min).

4.4. Condições de sorção dos analitos junto à fase monolítica

Os fármacos e metabólitos da esquizofrenia são compostos levemente hidrofóbicos e não polares, apresentando alta afinidade por fases orgânicas. Isto possibilitou a sorção dessas substâncias junto à fase estacionária monolítica quando se utilizou um solvente polar para a pré concentração dos analitos.

Os extratos secos dos analitos foram reconstituídos em soluções aquosas de NH_4Ac com concentração de 5 mM em diferentes valores de pH (4,0; 7,0 e 10,0) e 10 μL dessa solução foram injetados no sistema cromatográfico.

Considerando os valores de pK_a dos analitos (Tabela 9), o aumento do pH da solução de NH_4Ac diminuiu a ionização dos analitos, favorecendo a retenção junto à fase poli(metacrilato de butila-co-dimetacrilato de etilenoglicol) que possui um caráter apolar (Figura 9). A forma não ionizada é favorecida quando o pH da solução é maior que o pK_a do analito. Desta forma interações do tipo dipolo-dipolo ou dipolo induzido foram responsáveis pelos equilíbrios de sorção dos analitos com a fase estacionária monolítica. A Figura 9 mostra que mesmo com o pH sendo 10,0 houve a sorção parcial por parte da olanzapina e seu metabólito N-desmetilolanzapina, por possuírem caráter mais polar e não possuírem maior afinidade com o capilar.

Tabela 9. Valores de pK_a dos fármacos e metabólitos analisados neste projeto

Composto	pK_{a1}	pK_{a2}	pK_{a3}
Clozapina	8,0	-	-
Clorpromazina	9,3	-	-
Olanzapina	5,00	7,4	14,17
Quetiapina	2,78	7,46	-
N-desmetilclozapina	8,83	15,9	-
7-hidroxi-clorpromazina	9,15	10,16	-
Desmetilclorpromazina	10,02	-	-
N-desmetilolanzapina	5,42	-	-

Como fase móvel para a sorção destes analitos no capilar, foram avaliados água e soluções de NH_4Ac em diferentes pH (4,0; 7,0 e 10,0). Melhores resultados foram obtidos utilizando somente água como fase móvel para a sorção dos analitos, devido ao sal presente na solução causar maior supressão do sinal, visto que o capilar está conectado diretamente ao espectrômetro de massas. Devido a um maior sinal e

com o intuito de diminuir a quantidade de sal no sistema cromatográfico, água foi selecionada como fase móvel durante a etapa de sorção dos analitos.

Figura 9. Cromatogramas de íons totais (TIC) obtidos por injeção de 10 µL solução padrão dos analitos a 50 ng mL⁻¹, onde utilizou-se água como solução de pré concentração em pH: (A) 4,00, (B) 7,00 e (C) 10,00.

Devido ao caráter apolar dos analitos, a eluição dos mesmos do capilar monolítico foi favorecida com o uso da ACN (solvente mais apolar) frente ao uso do metanol (solvente mais polar). Dessa forma, ACN foi selecionada para a eluição dos analitos.

4.5. Procedimento *in-tube* SPME-UHPLC-MS/MS

Com o intuito de unir a etapa de sorção à separação analítica, a eluição dos analitos antes realizada somente com ACN, foi feita com as fases móveis nas condições iniciais utilizadas na separação analítica (item 3.2.5. Tabela 4). Para esta etapa, foi utilizado somente o capilar monolítico na primeira dimensão.

A Figura 10 ilustra os cromatogramas obtidos com a eluição dos analitos nas condições iniciais de fase móvel da separação analítica.

Segundo os cromatogramas da Figura 10, foi possível observar que as fases móveis testadas foram capazes de eluir os analitos da coluna capilar mesmo com a diminuição da quantidade de ACN.

As fases B (80% NH_4Ac 10 mmol L^{-1} (0,1% ácido fórmico):20% ACN) e C (70% NH_4Ac 10 mmol L^{-1} (0,1% ácido fórmico):30% ACN) mostraram-se mais eficientes por eluir os analitos em menor tempo, portanto, as duas fases foram selecionadas para serem avaliadas no procedimento utilizando as duas colunas comutativamente.

Figura 10. Cromatogramas da soma de íons totais (TIC) obtidos pelo procedimento *in-tube* SPME com acoplamento em 2,0 min e desacoplamento em 4,0 min, utilizando solução aquosa com NH_4Ac 10mmol L^{-1} (0,1% ácido fórmico):ACN nas proporções (A) 90:10; B) 80:20 e C) 70:30.

O sinal analítico obtido com a eluição B apresentou maior detectabilidade e ofereceu sinais mais intensos para a maioria dos analitos (Figura 11), portanto esta foi considerada a fase móvel de eluição.

Figura 11. Sinais analíticos obtidos utilizando a eluição com a fase móvel B (NH₄Ac e ACN 80:20 v/v) e fase móvel C (NH₄Ac e ACN 70:30 v/v)

Após a escolha da fase móvel para a eluição dos analitos, foi testado o tempo de eluição dos analitos da coluna monolítica, caracterizado pelo tempo acoplamento e desacoplamento da válvula do sistema. Tempos de eluição 2 a 4 minutos e 2 a 5 minutos foram avaliados na tentativa de se utilizar a menor quantidade de ACN possível para eluição dos analitos e evitar a difusão dos analitos durante a corrida cromatográfica.

Devido a difusão dos analitos, picos com intensidades menores foram observados para as análises com tempo de eluição de 2 a 5 minutos, como mostrado na Figura 12 e, portanto, o tempo de eluição de 2 a 4 minutos foi selecionado para o procedimento *in-tube* SPME-UHPLC-MS/MS.

Figura 12. Cromatogramas da soma de íons totais (TIC) obtidos pelo procedimento *in-tube* SPME com acoplamento em (A) 2,0 minutos e desacoplamento em 4,0 minutos e (B) 2,0 minutos e desacoplamento em 5,0 minutos

No entanto, o estudo do tempo de eluição foi realizado com um capilar monolítico possuindo 4,5 centímetros de comprimento. Após a avaliação do comprimento da coluna capilar, discutida a seguir, o tempo de eluição passou a ser de 2 a 6,5 minutos, pois o capilar monolítico utilizado possuía comprimento de 10 centímetros e maiores quantidades de solventes seriam necessários para eluir uma quantidade maior de analitos presentes na coluna.

O comprimento do capilar monolítico foi avaliado após as fases móveis estarem definidas. Foram sintetizados capilares nos comprimentos de 4,5; 6,0; 8,0 e 10,0 centímetros (Figura 13). O aumento do tamanho do capilar resultou em um aumento na sorção e aumento nos sinais analíticos dos analitos que possuíam menor detectabilidade. Isso permitiu o alcance de menores LIQs para estes analitos e a detecção dos mesmos dentro dos intervalos terapêuticos. A maior parte dos analitos também apresentou maior resposta ao ser analisado pelo capilar de 10 centímetros, portanto, este capilar foi selecionado para a realização do trabalho.

Figura 13. Sinais analíticos obtidos variando-se o comprimento dos capilares monolíticos

Os modos de eluição, (A) inverso (back flush) e (B) direto (straight flush) foram avaliados como ilustrados na Figura 14.

Figura 14. Cromatogramas da soma de íons totais (TIC) obtidos pelo procedimento *in-tube* SPME no modo (A) inverso e (B) direto.

Os maiores sinais analíticos foram obtidos pelo procedimento *in-tube* SPME-UHPLC-MS/MS no modo direto. Os dois cromatogramas apresentaram tempos de retenção dos analitos semelhantes, indicando que a sorção dos analitos não ocorreu nas extremidades do capilar. Desta forma, o método *in-tube*-SPME-UHPLC-MS/MS no modo de eluição direto foi escolhido para as análises posteriores.

A Tabela 10 ilustra a melhor condição encontrada para o procedimento *in-tube* SPME-UHPLC-MS/MS.

Tabela 10. Condições cromatográficas para a análise por *in-tube* SPME-UHPLC-MS/MS

QSM A= Água, B= ACN		BSM A = 10 mmol L ⁻¹ NH ₄ Ac (0,1% ácido fórmico) B = ACN			Comentários
T (min)	bomba	Fluxo ($\mu\text{L min}^{-1}$)	%A	Posição da válvula	
0,0	QSM	100	100	1	Limpeza da amostra e pré-concentração dos analitos no capilar monolítico
0,0	BSM	100	80	1	Condicionamento da coluna analítica
2,0	BSM	100	80	2	Eluição dos analitos da coluna monolítica para a coluna cromatográfica
5,50	BSM	100	80	2	Início da separação cromatográfica na coluna analítica
6,50	BSM	300	80	1	Final da eluição dos analitos da coluna monolítica para a coluna analítica.
7,01	QSM	100	0	1	Limpeza do capilar monolítico
12,50	BSM	300	15	1	Final da separação cromatográfica e começo do condicionamento da coluna analítica para próxima injeção
17,50	QSM	100	100	1	Começo do condicionamento da coluna monolítica para próxima injeção

QSM: Bomba Quaternária e BSM: Bomba Binária.

4.6. Validação analítica do método *in-tube* SPME-UHPLC-MS/MS

4.6.1. Linearidade e LOQ

O método desenvolvido *in-tube* SPME-UHPLC-MS/MS apresentou intervalos lineares do LIQ (10 ng mL⁻¹) ao LSQ (200 a 700 ng mL⁻¹). O LIQ foi considerado como sendo a menor concentração com precisão e exatidão adequados (CV $\leq$ 20% e EPR dentro do intervalo de $\pm$ 20%). O coeficiente de determinação apresentou valores maiores que 0,9975. O teste de *lack-of-fit* confirmou a linearidade do método. O intervalo linear incluiu o intervalo terapêutico dos analitos avaliados. A Tabela 11 ilustra a linearidade do método avaliado.

Tabela 11. Linearidade do método *in-tube* SPME-UHPLC-MS/MS

Analitos	Linearidade		Teste <i>Lack of Fit</i> *
	R ²	Padrão interno	
Clorpromazina	0,9986	clorpomazina-d3	0,848
Clozapina	0,9997	quetiapina-d8	0,226
Olanzapina	0,9989	quetiapina-d8	0,146
Quetiapina	0,9981	quetiapina-d8	0,888
Desmetilclorpromazina	0,9975	clorpomazina-d3	0,420
7-hidroxi-clorpromazina	0,9992	clorpomazina-d3	0,166
N-desmetilclozapina	0,9989	quetiapina-d8	0,196
N-desmetilolanzapina	0,9997	quetiapina-d8	0,955
Norquetiapina	0,9985	quetiapina-d8	0,115

* valor de *p* a um nível de significância de 0,05

4.6.2. Seletividade

Os cromatogramas obtidos através da injeção de amostras de plasma branco de diferentes procedências em comparação ao cromatograma obtido pela injeção da amostra de plasma enriquecida com os analitos na concentração respectiva ao LIQ garantem a seletividade do método ao mostrar que nenhum pico interferente foi observado no tempo de retenção dos analitos estudados (Figura 15).

Figura 15. Cromatogramas de amostra de plasma branco (sobrescrito à esquerda) e amostra de plasma branco enriquecido com os fármacos nas concentrações do LIQ.⁹⁸

4.6.3. Precisão, exatidão e efeito matriz

A Tabela 12 apresenta os valores de precisão e exatidão intra e interensaios do método *in-tube* SPME-UHPLC-MS/MS avaliados nas concentrações de LIQ, CQB, CQM, CQA e LSQ e os valores de coeficiente de variação do FMN nas concentrações do CQB e CQA.

O método desenvolvido apresentou precisão com coeficiente de variação variando entre 0,7% a 14,2% (intra e interensaios) e exatidão com valores de EPR variando entre -19,4% a 19,9% (intraensaio) e -18,9% a 19,3% (interensaio). O efeito matriz do método avaliado apresentou valores de coeficiente de variação para o FMN menos que 15%.

Todos os valores obtidos estão em acordo com os limites preconizados pelo guia de validação da ANVISA.

Tabela 12. Exatidão, precisão e efeito matriz do método *in-tube* SPME SPME-UHPLC-MS/MS

Analitos	Concentração (ng mL ⁻¹)	Exatidão (%EPR) <i>n</i> = 5		Precisão (%CV) <i>n</i> = 5		Efeito matriz (%CV)
		Intra ensaio	Inter ensaio	Intra ensaio	Inter ensaio	
Clorpromazina	10	-19,4	-18,9	1,7	0,9	
	30	3,5	1,9	2,5	0,7	0,6
	200	-3,1	-10,9	4,8	7,8	
	300	-0,1	0,4	7,7	0,7	12,1
	400	-2,5	0,2	10,0	7,0	
Clozapina	10	14,7	14,7	14,2	3,3	
	30	14,6	6,7	9,1	12,1	3,6
	350	-1,0	-5,9	3,5	1,1	
	500	-2,5	-3,2	2,4	1,0	1,9
	700	1,0	-0,7	0,7	3,8	
Olanzapina	10	18,4	19,3	9,0	12,1	
	30	13,3	9,7	3,2	3,7	6,7
	100	-1,9	-4,2	1,2	8,3	
	150	5,7	6,2	4,8	3,3	7,9
	200	2,5	1,8	3,5	1,0	
Quetiapina	10	-18,8	-14,5	2,6	3,2	
	30	13,6	-10,5	7,7	1,6	1,5
	250	-9,5	-8,4	2,5	5,2	
	500	4,7	0,7	4,1	10,2	9,1
	600	-1,4	0,3	2,0	8,1	
Desmetilclorpromazina	10	-6,3	-9,5	1,7	4,5	
	30	-13,4	-13,5	1,6	2,7	9,9
	100	-2,2	-2,1	3,1	3,6	
	150	4,6	-1,8	2,4	6,8	10,6
	200	-7,9	-12,8	9,1	2,3	
7-hidroxi-clorpromazina	10	-5,0	8,8	11,9	3,6	
	30	0,9	-4,4	1,5	4,3	13,5
	100	2,0	0,4	8,3	2,7	
	150	-3,9	5,5	3,0	6,6	14,3
	200	2,9	5,0	3,6	3,2	
N-desmetil clozapina	10	7,5	10,4	0,8	2,3	
	30	-8,8	-0,1	9,1	7,3	2,1
	200	-4,3	-10,3	2,2	13,1	
	300	1,0	12,6	6,3	14,2	2,2
	500	-1,7	-2,5	1,3	10,0	
N-desmetil olanzapina	10	11,0	15,6	0,7	6,0	
	25	-1,3	4,3	13,5	5,1	5,3
	100	-2,4	-3,6	9,1	3,0	
	150	0,8	12,8	10,1	3,6	6,1
	200	1,0	4,3	3,5	8,6	
Norquetiapina	10	19,9	18,4	4,1	3,4	
	30	7,5	7,5	9,5	9,2	3,1
	100	-4,6	-5,4	4,4	1,5	
	150	0,04	-6,1	6,7	11,7	5,3
	200	1,5	-1,4	1,0	7,2	

4.6.4. Efeito residual

O efeito residual foi avaliado através da injeção da amostra de plasma branco antes da injeção da amostra de plasma enriquecida na concentração de valor nominal do LSQ e da injeção de duas amostras de plasma branco após a injeção da amostra de plasma enriquecida na concentração de valor nominal do LSQ. As amostras de plasma analisadas após a injeção do LSQ apresentaram valores menores que 3% do sinal dos analitos na concentração de valor nominal correspondente ao LIQ e valores menores que 0,05% do sinal do padrão interno na concentração de valor nominal correspondente ao LIQ.

4.6.7. Comparação do método *in-tube* SPME-UHPLC-MS/MS desenvolvido com trabalhos da literatura

Realizando-se uma revisão bibliográfica para comparar o método *in-tube* SPME-UHPLC-MS/MS com demais métodos que empregaram diversos preparos de amostras para a análise de antipsicóticos e seus metabólitos em amostras de pessoas esquizofrênicas foi possível verificar que o método se destaca em relação a diversas técnicas, tanto as clássicas, como as miniaturizadas.

A Tabela 13 ilustra a comparação do método descrito neste trabalho com os trabalhos de Park et al. (2018); Khelfi et al. (2018); Domingues et al. (2015) e Gonçalves et al. (2015).

O trabalho desenvolvido por Gonçalves et al. (2015) foi desenvolvido analisando apenas clozapina e risperidona além de seus derivados utilizando um grande volume de amostra de urina e com a obtenção de LIQ de 100 ng mL⁻¹ enquanto o método *in-tube* SPME-UHPLC-MS/MS foi capaz de apresentar menores valores de LIQ com menores volumes de amostra.

Apesar do tempo total de análise do método desenvolvido possuir 20 minutos, seus analitos são separados na faixa de 4,5 minutos, sendo os demais tempos pertencentes ao preparo da amostra e de condicionamento das colunas. Comparando-se o tempo de separação cromatográfica com o trabalho de Domingues et al. (2015) que utiliza técnica semelhante para a análise dos antipsicóticos em plasma, é possível verificar que este método apresenta pequeno tempo de corrida cromatográfica.

Em comparação ao trabalho apresentado por Khelfi et al. (2018) foi possível avaliar que o método miniaturizado neste trabalho foi capaz de utilizar reduzido volume de amostra frente as técnicas clássicas de separação.

Com o método desenvolvido foi possível analisar diferentes fármacos juntamente de seus metabólitos auxiliando nos estudos de farmacocinética, farmacodinâmica e monitorização terapêutica.

O uso da fase monolítica orgânica constitui-se como uma inovação para a determinação de antipsicóticos através do método *in-tube* SPME pois a fase apresentou-se como seletiva para a sorção dos analitos, possuiu boa permeabilidade, alta estabilidade química e mecânica, dispensou o uso de *frits* na interface entre as dimensões, proporcionou baixas pressões ao sistemas e apresentou-se biocompatível, características essas adequadas para a automatização do preparo de amostra e hifenação a separação cromatográfica.

Tabela 13. Comparação do método *in-tube* SPME-UHPLC-MS/MS com demais métodos para a determinação de antipsicóticos e seus metabólitos em amostras biológicas

Analitos	Matriz	Quantidade de amostra (µL)	Separação cromatográfica (min)	Técnica analítica	LIQ (ng mL ⁻¹)	Referências
Aripiprazol Olanzapina Paliperidona Ziprasidona	Plasma	200	8	PP	10,0 (olanzapina)	Park et al. 2018 ⁴⁰
Clorpromazina haloperidol, levomepromazina, olanzapina, risperidona e sulpirida	Plasma	500	7	EFS (Oasis HLB)	13,2 (clorpromazina) 2,9 (olanzapina)	Khelfi et al. 2018 ⁴²
Haloperidol, olanzapina, clorpromazina, quetiapina, clozapina	Plasma	200	10	Column switching LC-MS/MS (monolito híbrido com grupos ciano)	0,075–0,188	Domingues et al. 2015 ⁹⁹
Clozapina, Risperidone e metabólitos	Urina	500	10	MEPS (C18) UHPLC-PDA	100,0	Gonçalves et al. 2015 ¹⁰⁰

(a tabela 13 continua...)

(continuação da tabela 13)

Analitos	Matriz	Quantidade de amostra (µL)	Separação cromatográfica (min)	Técnica analítica	LIQ (ng mL ⁻¹)	Referências
Clorpromazina clozapina, quetiapina, olanzapina e metabólitos	Plasma	300	4,5	in-tube SPME- UHPLC- MS/MS	10,0	Beloti et al. 2019 ⁹⁸

4.7. Análise de amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos

Com o intuito de avaliar a aplicabilidade do método, amostras de plasma de pacientes em tratamento com os fármacos estudados neste projeto foram analisados para fins de monitorização terapêutica. As concentrações obtidas estão ilustradas na Tabela 14 abaixo.

Tabela 14. Concentrações dos antipsicóticos e metabólitos analisados em plasma de pacientes esquizofrênicos

Fármacos	Intervalo de monitorização terapêutica (ng mL ⁻¹)	Concentrações plasmáticas (ng mL ⁻¹)			
		Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3	Paciente 4
Clorpromazina	30–300	-	-	-	329
Clozapina	350–600	-	-	528	-
Olanzapina	20–80	85	-	-	-
Quetiapina	100–500	-	400	-	-
Desmetilclorpromazina	-	-	-	-	12
7-hidroxi-clorpromazina	-	-	-	-	40
N-desmetilclozapina	-	-	-	328	-
N-desmetilolanzapina	-	19	-	-	-
Norquetiapina	-	-	61	-	-

Quatro amostras de plasma de pacientes em terapia com os antipsicóticos foram analisadas. As concentrações plasmáticas determinadas para os fármacos estavam dentro de seus respectivos intervalos terapêuticos. As análises foram realizadas em triplicata e seus CV estavam dentro dos valores preconizados pela Anvisa.

A Figura 16 ilustra o cromatograma obtido através da análise do plasma do paciente 1.

Figura 16. Cromatogramas obtidos através da análise do plasma do paciente 1 pelo método *in-tube* SPME-UHPLC-MS/MS determinando o fármaco olanzapina (acima) na concentração de 85,86 ng mL⁻¹ e seu metabólito N-desmetil-olanzapina (abaixo) na concentração de 20,13 ng mL⁻¹.

Juntamente com o fármaco analisado é possível verificar a presença de seus respectivos metabólitos junto a amostra, indicativo da biotransformação ocorrida no organismo.

Por fim conclui-se que o método *in-tube* SPME-MS/MS foi aplicado com êxito na determinação dos fármacos e os metabólitos presentes em amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos para fins de monitorização terapêutica.

Conclusão

5. Conclusão

O capilar monolítico sintetizado apresentou seletividade e capacidade de sorção adequados para os antipsicóticos e seus metabólitos em amostra de plasma pelo sistema *in-tube* SPME-UHPLC-MS/MS. Em razão da adequada estabilidade química e física do capilar monolítico orgânico orgânico de poli(BMA-co-EGDMA), este foi reutilizado em mais de uma centena de análises.

As análises (MEV e Infravermelho) de caracterização do capilar comprovaram a incorporação dos grupos funcionais e morfologia de caráter monolítico.

O método *in-tube* SPME-UHPLC-MS/MS desenvolvido permitiu a hifenação da etapa de preparo de amostra e análise cromatográfica, diminuindo o tempo da análise e as fontes de erro.

Quando comparado aos outros métodos da literatura para a determinação de antipsicóticos em amostras de plasma, o método inovador apresentou menores valores de LIQ e minimizou o consumo de solvente orgânico, o volume de amostra e o tempo de análise.

Segundo os parâmetros de validação analítica avaliados, o método *in-tube* SPME-UHPLC-MS/MS desenvolvido é adequado para a determinação de antipsicóticos e metabólitos em amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos para fins de TDM. As faixas de linearidades deste método contemplaram os intervalos terapêuticos preconizados para os fármacos estudados.

Referências

6. Referências

1. Srinivasan, S. *et al.* Genetic Markers of Human Evolution Are Enriched in Schizophrenia. *Biol. Psychiatry* **80**, 284–292 (2016).
2. Hor, K. & Taylor, M. Suicide and schizophrenia: a systematic review of rates and risk factors. *J. Psychopharmacol.* **24**, 81–90 (2010).
3. Global Health Metrics. Global , regional , and national incidence , prevalence , and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries , 1990 – 2016 : a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet* **390**, 1211–59 (2017).
4. Mennigen, E., Rashid, B. & Calhoun, V. D. Connectivity and dysconnectivity: A brief history of functional connectivity research in schizophrenia and future directions. in *Connectomics* 123–154 (Elsevier, 2019). doi:10.1016/B978-0-12-813838-0.00007-8
5. Ashok, A. H., Baugh, J. & Yeragani, V. K. Paul Eugen Bleuler and the origin of the term schizophrenia (SCHIZOPRENIEGRUPPE). *Indian J. Psychiatry* **54**, 95 (2012).
6. Tandon, R., Nasrallah, H. A. & Keshavan, M. S. Schizophrenia, ‘just the facts’ 4. Clinical features and conceptualization. *Schizophr. Res.* **110**, 1–23 (2009).
7. Andreasen, N. C. Positive vs. Negative Schizophrenia : A Critical Evaluation. *Schizophr. Bull.* **11**, 380–389 (1985).
8. Da Silva, R. C. B. Esquizofrenia: Uma Revisão. *Psicol. USP* **17**, 263–285 (2006).
9. Silva, A. M. *et al.* Esquizofrenia: Uma revisão bibliográfica. *UNILUS Ensino e Pesqui.* **13**, 18–25 (2016).
10. Seeman, P. Dopamine Receptor Sequences: Therapeutic Levels of Neuroleptics Occupy D2 Receptors , Clozapine occupies D4. *Neuropsychopharmacology* **7**, 261–283 (1992).
11. Ferretjans, R., Moreira, F. A., Teixeira, A. L. & Salgado, J. V. The Endocannabinoid System and its Role in Schizophrenia: A Systematic Review of the Literature. *Rev. Bras. Psiquiatr.* **34**, 163–193 (2012).
12. Lally, J. & MacCabe, J. H. Antipsychotic medication in schizophrenia: a review. *Br. Med. Bull.* **114**, 1–11 (2015).
13. Shen, W. W. A History of Antipsychotic Drug Development. *Compr. Psychiatry* **40**, 407–414 (1999).

14. Lehmann, H. E. & Ban, T. A. The History of the Psychopharmacology of Schizophrenia. *Canadian J.* **42**, 152–162 (1997).
15. Hippius, H. The history of clozapine. *Psychopharmacology (Berl)*. **99**, 3–5 (1989).
16. Leucht, S. *et al.* Second-generation versus first-generation antipsychotic drugs for schizophrenia : a meta-analysis. *Lancet* **373**, 31–41 (2009).
17. Lin, J. H. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Variability: A Daunting Challenge in Drug Therapy. *Curr. Drug Metab.* **8**, 109–136 (2007).
18. Zanger, U. M., Turpeinen, M., Klein, K. & Schwab, M. Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. *Anal. Bioanal. Chem.* **392**, 1093–1108 (2008).
19. Zanger, U. M. & Schwab, M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol. Ther.* **138**, 103–141 (2013).
20. Raggi, M. A., Mandrioli, R., Sabbioni, C. & Pucci, V. Atypical Antipsychotics: Pharmacokinetics , Therapeutic Drug Monitoring and Pharmacological Interactions. *Curr. Med. Chem.* **11**, 279–296 (2004).
21. Alfredson, G., Wode-Helgodt, B. & Sedvall, G. A Mass Fragmentographic Method for the Determination of Chlorpromazine and Two of Its Active Metabolites in Human Plasma and CSF. *Psychopharmacology (Berl)*. **48**, 123–131 (1976).
22. Park, C. *et al.* Preparation and in vitro/in vivo evaluation of PLGA microspheres containing norquetiapine for long-acting injection. *Drug Des. Devel. Ther.* **12**, 711–719 (2018).
23. Söderberg, M. M. & Dahl, M.-L. Pharmacogenetics of olanzapine metabolism. *Pharmacogenomics* **14**, 1319–1336 (2013).
24. Hendset, M., Haslemo, T., Rudberg, I., Refsum, H. & Molden, E. The Complexity of Active Metabolites in Therapeutic Drug Monitoring of Psychotropic Drugs. *Pharmacopsychiatry* **39**, 121–127 (2006).
25. Baumann, P. *et al.* The AGNP-TDM Expert Group Consensus Guidelines: Therapeutic Drug Monitoring in Psychiatry. *Pharmacopsychiatry* **37**, 243–265 (2004).
26. Regenthal, R., Krueger, M., Koeppel, C. & Preiss, R. Drug Levels: Therapeutic and Toxic Serum/Plasma Concentrations of Common Drugs. *J. Clin. Monit.*

- Comput.* **15**, 529–544 (1999).
27. Shipkova, M. & Svinarov, D. LC–MS/MS as a tool for TDM services: Where are we? *Clin. Biochem.* **49**, 1009–1023 (2016).
 28. Grundmann, M., Kacirova, I. & Urinovska, R. Therapeutic drug monitoring of atypical antipsychotic drugs. *Acta Pharm.* **64**, 387–401 (2014).
 29. Hiemke, C. *et al.* AGNP Consensus Guidelines for Therapeutic Drug Monitoring in Psychiatry: Update 2011. *Pharmacopsychiatry* **44**, 195–235 (2011).
 30. Queiroz, S. C. N., Collins, C. H. & Jardim, I. C. S. F. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E/OU CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS ENCONTRADOS EM FLUIDOS BIOLÓGICOS PARA POSTERIOR DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA. *Quim. Nova* **24**, 68–76 (2001).
 31. Vuckovic, D., Zhang, X., Cudjoe, E. & Pawliszyn, J. Solid-phase microextraction in bioanalysis: New devices and directions. *J. Chromatogr. A* **1217**, 4041–4060 (2010).
 32. Kole, P. L., Venkatesh, G., Kotecha, J. & Sheshala, R. Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods. *Biomed. Chromatogr.* **25**, 199–217 (2011).
 33. Berrueta, L. A., Gallo, B. & Vicente, F. A Review of Solid Phase Extraction: Basic Principles and New Developments. *Chromatographia* **40**, 474–483 (1995).
 34. Rodriguez-Mozaz, S., de Alda, M. J. L. & Barceló, D. Advantages and limitations of on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography–mass spectrometry technologies versus biosensors for monitoring of emerging contaminants in water. *J. Chromatogr. A* **1152**, 97–115 (2007).
 35. Chhatre, S. & Titchener-Hooker, N. J. Review: Microscale methods for high-throughput chromatography development in the pharmaceutical industry. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **84**, 927–940 (2009).
 36. Taylor, P. J. Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry. *Clin. Biochem.* **38**, 328–334 (2005).
 37. Maldaner, L. & Jardim, I. C. S. F. UHPLC – Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes. *Sci. Chromatogr.* **4**, 197–207 (2012).
 38. Mennickent, S., de Diego, M., Liser, B. & Trujillo, L. SIMPLIFIED LIQUID-LIQUID EXTRACTION METHOD COUPLED WITH LC/DAD BY QUANTITATIVE DETERMINATION OF RISPERIDONE IN HUMAN SERUM. *Chil. Chem. Soc.*

64, 4265–4267 (2019).

39. Miroshnichenko, I. I. & Baymeeva, N. V. Simultaneous Determination of Antipsychotic Drugs and Their Active Metabolites by LC–MS-MS and its Application to Therapeutic Drug Monitoring. *J. Chromatogr. Sci.* **56**, 510–517 (2018).
40. Park, D. *et al.* Simultaneous determination of 18 psychoactive agents and 6 metabolites in plasma using LC–MS/MS and application to actual plasma samples from conscription candidates. *Forensic Sci. Int.* **288**, 283–290 (2018).
41. Dziurkowska, E. & Wesolowski, M. Solid Phase Extraction Purification of Saliva Samples for Antipsychotic Drug Quantitation. *Molecules* **23**, 1–11 (2018).
42. Khelfi, A., Azzouz, M., Abtroun, R., Reggabi, M. & Alamir, B. Determination of Chlorpromazine, Haloperidol, Levomepromazine, Olanzapine, Risperidone, and Sulpiride in Human Plasma by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS). *Int. J. Anal. Chem.* **2018**, 1–13 (2018).
43. Acquaro, V. R., Domingues, D. S. & Queiroz, M. E. C. Column switching UHPLC–MS/MS with restricted access material for the determination of CNS drugs in plasma samples. *Bioanalysis* **9**, 555–568 (2017).
44. Couchman, L. *et al.* Ultra-fast LC-MS/MS in therapeutic drug monitoring: Quantification of clozapine and norclozapine in human plasma. *Drug Test. Anal.* 1–7 (2017). doi:10.1002/dta.2223
45. Sim, J., Kim, E., Yang, W., Woo, S. & In, S. An LC–MS/MS method for the simultaneous determination of 15 antipsychotics and two metabolites in hair and its application to rat hair. *Forensic Sci. Int.* **274**, 91–98 (2017).
46. De Meulder, M. *et al.* Development and validation of HILIC–ESI/MS/MS methods for simultaneous quantitation of several antipsychotics in human plasma and blood. *Bioanalysis* **8**, 765–794 (2016).
47. Dhiman, R., Kumar, B., Kumar, D. & Kumar, A. Liquid-liquid extraction method for Ziprasidone (ZRS) bioanalysis by using ZRS-D8 (stable isotope) as internal standard. *J. Chem. Pharm. Res.* **8**, 722–727 (2016).
48. Zhong, Q. *et al.* Automatic on-line solid-phase extraction with ultra-high performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry for the determination of ten antipsychotics in human plasma. *J. Sep. Sci.* **39**, 2129–2137 (2016).
49. Kumar, M. S. S. & Ramanathan, M. Concurrent determination of olanzapine,

- risperidone and 9-hydroxyrisperidone in human plasma by ultra performance liquid chromatography with diode array detection method: application to pharmacokinetic study. *Biomed. Chromatogr.* **30**, 263–268 (2016).
50. Wijma, R. A. *et al.* Identification and quantification of the antipsychotics risperidone, aripiprazole, pipamperone and their major metabolites in plasma using ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr.* **30**, 794–801 (2016).
 51. Wang, J. *et al.* Simple and Accurate Quantitative Analysis of 16 Antipsychotics and Antidepressants in Human Plasma by Ultrafast High-Performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Ther. Drug Monit.* **37**, 649–660 (2015).
 52. Gradinaru, J., Vullioud, A., Eap, C. B. & Ansermot, N. Quantification of typical antipsychotics in human plasma by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for therapeutic drug monitoring. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **88**, 36–44 (2014).
 53. Patteet, L. *et al.* High throughput identification and quantification of 16 antipsychotics and 8 major metabolites in serum using ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Clin. Chim. Acta* **429**, 51–58 (2014).
 54. Queiroz, M. E. C. Microextração em fase sólida no capilar (in-tube SPME) para automação das análises de fármacos em fluidos biológicos. *Sci. Chromatogr.* **1**, 13–21 (2009).
 55. Kataoka, H. Current Developments and Future Trends in Solid-phase Microextraction Techniques for Pharmaceutical and Biomedical Analyses. *Anal. Sci.* **27**, 893–905 (2011).
 56. Queiroz, M. E. C. & Melo, L. P. Selective capillary coating materials for in-tube solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography to determine drugs and biomarkers in biological samples: A review. *Anal. Chim. Acta* (2014). doi:10.1016/j.aca.2014.03.024
 57. Queiroz, M. E. C. & Melo, L. P. Recentes avanços da in-tube SPME-LC para bioanálises. *Sci. Chromatogr.* **5**, 167–179 (2013).
 58. Miranda, L. F. C., Gonçalves, R. R. & Queiroz, M. E. C. A Dual Ligand Sol–Gel Organic-Silica Hybrid Monolithic Capillary for In-Tube SPME-MS/MS to Determine Amino Acids in Plasma Samples. *Molecules* **24**, 1–17 (2019).

59. 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. *Anal. Chim. Acta* **1045**, 108–116 (2019).
60. Argente-garcía, A. I., Moliner-martínez, Y., López-garcía, E., Campíns-falcó, P. & Herráez-hernández, R. Application of Carbon Nanotubes Modified Coatings for the Determination of Amphetamines by In-Tube Solid-Phase Microextraction and Capillary Liquid Chromatography. *Separations* **3**, 7 (2016).
61. Manbohi, A. & Ahmadi, S. H. In-tube magnetic solid phase microextraction of some fluoroquinolones based on the use of sodium dodecyl sulfate coated Fe₃O₄ nanoparticles packed tube. *Anal. Chim. Acta* **885**, 114–121 (2015).
62. Moliner-Martinez, Y., Herráez-Hernández, R., Verdú-Andrés, J., Molins-Legua, C. & Campíns-Falcó, P. Recent advances of in-tube solid-phase microextraction. *Trends Anal. Chem.* **71**, 205–213 (2015).
63. Alemán, J. V. *et al.* Definitions of terms relating to the structure and processing of sols, gels, networks, and inorganic-organic hybrid materials. *Pure Appl. Chem.* **79**, 1801–1829 (2007).
64. Gokmen, M. T., Dereli, B., De Geest, B. G. & Du Prez, F. E. Complexity from Simplicity: Unique Polymer Capsules, Rods, Monoliths, and Liquid Marbles Prepared via HIPE in Microfluidics. *Part. Part. Syst. Charact.* **30**, 438–444 (2013).
65. Kubín, M., Spacek, P. & Chomecek, R. GEL PERMEATION CHROMATOGRAPHY ON POROUS POLY(ETHYLENE GLYCOL METHACRYLATE). *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* **32**, 3881–3887 (1967).
66. Svec, F. Monolithic columns: A historical overview. *Electrophoresis* **38**, 2810–2820 (2017).
67. Zhu, T. & Row, K. H. Preparation and applications of hybrid organic-inorganic monoliths: A review. *J. Sep. Sci.* **35**, 1294–1302 (2012).
68. Jandera, P. Advances in the development of organic polymer monolithic columns and their applications in food analysis—A review. *J. Chromatogr. A* **1313**, 37–53 (2013).
69. Liu, K., Aggarwal, P., Lawson, J. S., Tolley, H. D. & Lee, M. L. Organic monoliths for high-performance reversed-phase liquid chromatography. *J. Sep. Sci.* **36**,

2767–2781 (2013).

70. Arrua, R. D., Talebi, M., Causon, T. J. & Hilder, E. F. Review of recent advances in the preparation of organic polymer monoliths for liquid chromatography of large molecules. *Anal. Chim. Acta* **738**, 1–12 (2012).
71. Watanabe, F., Kubo, T., Kaya, K. & Hosoya, K. Novel separation medium spongy monolith for high throughput analyses. *J. Chromatogr. A* **1216**, 7402–7408 (2009).
72. Kalashnikova, I., Ivanova, N. & Tennikova, T. Development of a Strategy of Influenza Virus Separation Based on Pseudoaffinity Chromatography on Short Monolithic Columns. *Anal. Chem.* **80**, 2188–2198 (2008).
73. Branovic, K. *et al.* Very fast analysis of impurities in immunoglobulin concentrates using conjoint liquid chromatography on short monolithic disks. *J. Immunol. Methods* **271**, 47–58 (2002).
74. Deverell, J. A., Rodemann, T., Smith, J. A., Canty, A. J. & Guijt, R. M. UV initiated formation of polymer monoliths in glass and polymer microreactors. *Sensors Actuators B Chem.* **155**, 388–396 (2011).
75. Ho, T. D., Toledo, B. R., Hantao, L. W. & Anderson, J. L. Chemical immobilization of crosslinked polymeric ionic liquids on nitinol wires produces highly robust sorbent coatings for solid-phase microextraction. *Anal. Chim. Acta* **843**, 18–26 (2014).
76. Vlakh, E. G. & Tennikova, T. B. Preparation of methacrylate monoliths. *J. Sep. Sci.* **30**, 2801–2813 (2007).
77. Merhar, M. Methacrylate monoliths prepared from various hydrophobic and hydrophilic monomers – Structural and chromatographic characteristics. *J. Sep. Sci.* **26**, 322–330 (2003).
78. Tennikova, T. B., Belenkii, B. G. & Svec, F. High-Performance Membrane Chromatography. A Novel Method of Protein Separation. *J. Liq. Chromatogr.* **13**, 63–70 (1990).
79. Viklund, C., Svec, F. & Fréchet, J. M. J. Monolithic, ‘Molded’, Porous Materials with High Flow Characteristics for Separations, Catalysis, or Solid-Phase Chemistry: Control of Porous Properties during Polymerization. *Chem. Mater.* **8**, 744–750 (1996).
80. Svec, F. Porous polymer monoliths: Amazingly wide variety of techniques enabling their preparation. *J. Chromatogr. A* **1217**, 902–924 (2010).

81. Cooper, A. I., Hems, W. P. & Holmes, A. B. Synthesis of Highly Cross-Linked Polymers in Supercritical Carbon Dioxide by Heterogeneous Polymerization. *Macromolecules* **32**, 2156–2166 (1999).
82. Bedair, M. & Oleschuk, R. D. Lectin affinity chromatography using porous polymer monolith assisted nanoelectrospray MS/MS. *Analyst* **131**, 1316–1321 (2006).
83. Li, Y., Gu, B., Tolley, H. D. & Lee, M. L. Preparation of polymeric monoliths by copolymerization of acrylate monomers with amine functionalities for anion-exchange capillary liquid chromatography of proteins. *J. Chromatogr. A* **1216**, 5525–5532 (2009).
84. Svec, F. & Fréchet, J. M. J. Temperature, a Simple and Efficient Tool for the Control of Pore Size Distribution in Macroporous Polymers. *Macromolecules* **28**, 7580–7582 (1995).
85. Al-Rifai, A., Aqel, A., Wahibi, L. Al, AlOthman, Z. A. & Badjah-Hadj-Ahmed, A.-Y. Carbon nanotube-based benzyl polymethacrylate composite monolith as a solid phase extraction adsorbent and a stationary phase material for simultaneous extraction and analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon in water. *J. Chromatogr. A* **1535**, 17–26 (2018).
86. Wang, C., He, M., Chen, B. & Hu, B. Polymer monolithic capillary microextraction on-line coupled with ICP-MS for determination of inorganic selenium species in natural waters. *Talanta* **188**, 736–743 (2018).
87. Cai, J. *et al.* Polyoxometalate incorporated polymer monolith microextraction for highly selective extraction of antidepressants in undiluted urine. *Talanta* **170**, 252–259 (2017).
88. Du, F. *et al.* High Internal Phase Emulsion Polymeric Monolith Extraction Coupling with High-Performance Liquid Chromatography for the Determination of Para Red and Sudan Dyes in Chilli Samples. *Food Anal. Methods* 2018–2026 (2016). doi:10.1007/s12161-016-0751-8
89. Wang, H., Wei, S., Zhang, H. & Jia, Q. Preconcentration of bisphenols by using calix[4]arene derivatives modified porous polymer monolith coupled with HPLC. *RSC Adv.* **6**, 36256–36263 (2016).
90. Zhou, Y. *et al.* Preparation of an allyloxy-cucurbit[6]uril-modified polymer monolithic column for microextraction of estrogens in cosmetics. *New J. Chem.* **39**, 9714–9721 (2015).

91. Lirio, S. & Lin, C. Aluminum based metal-organic framework-polymer monolith in solid-phase microextraction of penicillins in river water and milk samples. *J. Chromatogr. A* **1428**, 236–245 (2015).
92. Skoglund, C., Bassyouni, F. & Abdel-Rehim, M. Monolithic packed 96-tips set for high-throughput sample preparation: determination of cyclophosphamide and busulfan in whole blood samples by monolithic packed 96-tips and LC-MS. *Biomed. Chromatogr.* **27**, 714–719 (2013).
93. Liu, W., Qi, J., Yan, L., Jia, Q. & Yu, C. Application of poly(butyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) monolith microextraction coupled with high performance liquid chromatography to the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked meat products. *J. Chromatogr. B* **879**, 3012–3016 (2011).
94. Coufal, P. *et al.* Methacrylate monolithic columns of 320 μm I.D. for capillary liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **946**, 99–106 (2002).
95. Zhang, M., Wei, F., Zhang, Y.-F., Nie, J. & Feng, Y.-Q. Novel polymer monolith microextraction using a poly(methacrylic acid-ethylene glycol dimethacrylate) monolith and its application to simultaneous analysis of several angiotensin II receptor antagonists in human urine by capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **1102**, 294–301 (2006).
96. Smith, B. *Infrared Spectral Interpretation: A systematic approach*. (CRC Press, 2018). doi:10.1201/9780203750841
97. Coates, J. Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach. *Encycl. Anal. Chem.* 1–23 (2006). doi:10.1002/9780470027318.a5606
98. Beloti, L., Miranda, L. & Queiroz, M. Butyl Methacrylate-Co-Ethylene Glycol Dimethacrylate Monolith for Online in-Tube SPME-UHPLC-MS/MS to Determine Chlopromazine, Clozapine, Quetiapine, Olanzapine, and Their Metabolites in Plasma Samples. *Molecules* **24**, 1–13 (2019).
99. Domingues, D. S., Souza, I. D. de & Queiroz, M. E. C. Analysis of drugs in plasma samples from schizophrenic patients by column-switching liquid chromatography-tandem mass spectrometry with organic–inorganic hybrid cyanopropyl monolithic column. *J. Chromatogr. B* **993–994**, 26–35 (2015).
100. Gonçalves, J. L., Alves, V. L., Conceição, C. J. F., Teixeira, H. M. & Câmara, J. S. Development of MEPS–UHPLC/PDA methodology for the quantification of clozapine, risperidone and their major active metabolites in human urine.

Microchem. J. **123**, 90–98 (2015).