Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

“Desenvolvimento do método SALLE-UHPLC-MS/MS para a determinação de
anandamida e 2-araquidonoilglicerol em amostras de encéfalos de ratos submetidos
a modelo animal da Doença de Parkinson”

Igor Gustavo de Carvalho Oliveira

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

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

Igor Gustavo de Carvalho Oliveira

Desenvolvimento do método SALLE-UHPLC-MS/MS para determinação de anandamida e 2-araquidonoilglicerol em amostras de encéfalos de ratos submetidos a modelo animal da Doença de Parkinson

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

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

Oliveira, Igor Gustavo de Carvalho

Desenvolvimento do método SALLE-UHPLC-MS/MS para a determinação de anandamida e 2-araquidonoilglicerol em amostras de encéfalos de ratos submetidos a modelo animal da Doença de Parkinson. Ribeirão Preto, 2020

85 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. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem. 2. Extração líquido-líquido assistida por *salting-out*. 3. Endocanabinóides. 4. Encéfalos de ratos. 5. Doença de Parkinson.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: Igor Gustavo de Carvalho Oliveira

Título: **Desenvolvimento do método SALLE-UHPLC-MS/MS para a determinação de anandamida e 2-araquidonoilglicerol em amostras de encéfalos de ratos submetidos a modelo animal da Doença de Parkinson.**

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: _____

Dedico este trabalho à minha família, pelo apoio durante todo meu percurso acadêmico, e a todos que de alguma forma contribuíram com sua realização.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à **Universidade de São Paulo** e às **Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP)** e **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP)** pela formação, apoio institucional e instalações necessárias para realização desse trabalho.

À minha orientadora **Profa. Dra. Maria Eugênia Queiroz Nassur** pela excelente orientação, discussões enriquecedoras, exemplo profissional e pela confiança em mim depositada ao longo destes anos de trabalho.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** (processos 2018/06068-0 e 2017/02147-0) e à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** pela concessão de bolsa e apoio financeiro para o desenvolvimento dessa pesquisa.

À **Profa. Dra. Elaine Aparecida Del Bel Belluz Guimarães**, da FORP, pelo fornecimento das amostras biológicas, pela parceria desenvolvida na realização desse trabalho, por sempre me atender de forma solícita e participação em meu exame de qualificação.

À **Profa. Dra. Cristiane Masetto de Gaitani** pelas sugestões e críticas ao participar de minha banca de qualificação.

Às alunas de pós-doutorado da professora Elaine, **Dra. Glauce Crivelaro do Nascimento** e **Dra. Mariza Bortolanza** pelo auxílio no fornecimento das amostras biológicas.

Aos amigos de laboratório **Caroline Grecco, Camila Marchioni, Israel Souza, Lúcia Miranda, Luís Felipe** e **Luiz Gabriel** pela convivência amigável, discussões enriquecedoras e auxílio nas atividades do laboratório.

À todos os técnicos e funcionários do Departamento de Química pela ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho bem como nas aulas práticas do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE).

Aos meus pais, **Sonia Aparecida de Carvalho** e **José Carlos de Oliveira**, e ao meu irmão, **Vitor Hugo Carvalho de Oliveira**, por todo apoio e incentivo durante a realização deste trabalho.

RESUMO

OLIVEIRA, I.G.C. **Desenvolvimento do método SALLE-UHPLC-MS/MS para a determinação de anandamida e 2-araquidonoilglicerol em amostras de encéfalos de ratos submetidos a modelo animal da Doença de Parkinson.** 2020, 85f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Os endocanabinóides (ECs), anandamida (AEA) e 2-araquidonoilglicerol (2-AG), juntamente dos receptores celulares canabinóides (CB1 e CB2) e enzimas metabólicas, fazem parte do chamado sistema endocanabinóide (eCB). Estudos realizados indicam que os níveis endógenos desses ECs sofrem alterações à estímulos fisiológicos, farmacológicos e patológicos, fazendo com que a determinação de suas concentrações em amostras biológicas sejam alvo de estudos de diversas patologias, com destaque às doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson (DP). Modelos experimentais em animais têm sido desenvolvidos para mimetizar as características da DP observada na clínica em humanos, comumente, a injeção aguda seletiva de neurotoxinas, como o análogo hidroxilado da Dopamina 6-hidroxidopamina (6-OHDA) em ratos, é usada para criar lesões neurodegenerativas agudas das vias nigro-estriatais. A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em *tandem* (LC-MS/MS) tem sido considerada a técnica analítica de referência para a determinação de endocanabinóides em amostras biológicas. A extração líquido-líquido assistida por “salting-out” (SALLE) é uma técnica de extração baseada no efeito de “salting-out”, que consiste na redução da miscibilidade mútua entre a água e um solvente orgânico miscível em água pela adição de um eletrólito. Como consequência da adição do sal, os analitos orgânicos não carregados presentes na amostra sofrem redução de solubilidade na fase aquosa, favorecendo a migração para a fase orgânica. O objetivo deste projeto foi o desenvolvimento de método SALLE/UHPLC-MS/MS para a determinação de AEA e 2-AG em amostras de encéfalos de ratos induzidos ao parkinsonismo.

O procedimento SALLE desenvolvido apresentou como vantagens menor consumo de solvente orgânico e menor tempo de análise, quando comparado às técnicas de extração líquido-líquido e extração em fase sólida, e extratos mais limpos, em razão da separação de fases orgânica/aquosa, quando comparado à precipitação de proteínas. O método SALLE-UHPLC-MS/MS foi validado, apresentando linearidade de 2,00 a 20,00 ng/mL para AEA e 0,300 a 10,00 µg/mL para 2-AG, valores de exatidão (EPR) e precisão (CV) intra e inter-ensaio abaixo de 15% e efeito matriz não significativo. O método proposto foi aplicado com sucesso na determinação das concentrações endógenas de AEA e 2-AG em amostras de encéfalo total, de hemisférios e estriados de ratos parkinsonianos e ratos saudáveis do grupo controle. Para AEA, verificou-se diferença significativa ($p < 0,05$), entre os estriados ipsilateral e contralateral à lesão. Já ao comparar esses dois grupos de estriados com os estriados dos animais saudáveis, observou grande diferença estatística ($p < 0,001$). Para 2-AG, observou-se grande diferença estatística ($p < 0,001$) ao se comparar as concentrações entre os estriados ipsilateral e contralateral à lesão. Da mesma forma, observou-se grande diferença estatística ($p < 0,001$) entre os estriados ipsilateral e contralateral dos animais lesionados com os animais saudáveis.

Palavras chave: Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem, Extração líquido-líquido assistida por *salting-out*, endocanabinóides, encéfalos de ratos, Doença de Parkinson.

ABSTRACT

OLIVEIRA, I. G. C. Development of the SALLE-UHPLC-MS/MS method to determine anandamide and 2-arachidonoylglycerol in rat brain samples submitted to a Parkinson's Disease animal model. 2019, 80f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

The endogenous compounds anandamide (AEA) and 2-arachidonoylglycerol (2-AG), derived from the arachidonic acid, are part of a neurotransmitters class known as endocannabinoids (ECs) that, together with the cellular cannabinoid receptors (CB1 and CB2) and metabolic enzymes, compose the endocannabinoid system (eCB). Studies indicate that the endogenous concentrations of these ECs suffers variations to physiological, pharmacological and pathological stimuli, making the determination of their concentrations in biological samples to be the target of studies of several pathologies, with emphasis on neurodegenerative diseases, such as Parkinson's Disease (PD). Experimental animal models have been developed to mimic the characteristics of PD observed in the clinic in humans, commonly, the selective acute injection of neurotoxins, such as the hydroxylated analogue of dopamine, 6-hydroxidopamine (6-OHDA) in rats, is used to create acute neurodegenerative lesions on the nigrostriatal pathways. Liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry has been considered the reference technique in the determination of endocannabinoids in biological samples. The sample preparation step has been required in the development of chromatographic methods, to eliminate interfering agents and to pre-concentrate the analytes, usually present at trace levels in biological samples. The salting-out assisted liquid-liquid extraction (SALLE) is an extraction technique based on the "salting-out" effect, which consists in reducing the mutual solubility between water and a water-miscible organic solvent by the addition of an electrolyte. In function of the salt addition, the uncharged organic analytes present in the sample undergo a reduction of solubility in the aqueous phase and are extracted in the organic phase.

The developed SALLE method presented the advantage of consuming lower organic solvent volume and shorter analysis time when compared to conventional liquid-liquid extraction and solid phase extractions. In addition, the SALLE technique presented cleaner extracts due to the separation of organic/aqueous phases, when compared to protein precipitation. The SALLE-UHPLC-MS/MS method was validated, presenting linear range from 2.00 to 20.00 ng/mL for AEA and from 0.30 to 10.00 µg/mL for 2-AG, values of intra- and inter-assay accuracy (CV) and precision (RSD) bellow 15%, and no significant matrix effect. The proposed method was successfully applied to determine the endogenous concentrations of AEA and 2-AG in samples of total brain, hemispheres and striatum from parkinsonian rats and healthy rats from the control group. For AEA, there was a significant difference ($p < 0.05$) between the ipsilateral and contralateral striatums. When comparing these two groups of striatums with striatums of healthy animals, there was a large statistical difference ($p < 0.001$). For 2-AG, a large statistical difference ($p < 0.001$) was observed when comparing the concentrations between the ipsilateral and contralateral striatums. Likewise, a large statistical difference ($p < 0.001$) was observed between the ipsilateral and contralateral striatum of the injured animals with the healthy animals.

Key words: Liquid chromatography tandem mass spectrometry; Salting-out assisted liquid-liquid extraction; endocannabinoids; rat brain samples; Parkinson's Disease.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição dos receptores CB1 e CB2 nos tecidos e órgãos humanos.....	18
Figura 2. Estrutura química dos endocanabinóides AEA (a) e 2-AG (b).....	19
Figura 3. Representação esquemática do processo de sinapse mediado por AEA e 2-AG.....	21
Figura 4. Esquema de um sistema de espectrometria de massas do tipo triploquadropolo com ionização por electrospray	30
Figura 5. Avaliação dos solventes acetonitrila e solução de ácido fórmico (0,100 mol L ⁻¹) na homogeneização de amostras de encéfalos para análise de AEA (a) e 2-AG (b)	51
Figura 6. Cromatograma de íons totais para os analitos AEA e 2-AG após análise no dia de preparo do homogenato	53
Figura 7. Cromatograma de íons totais para os analitos AEA e 2-AG após análise de homogenato armazenado por sete dias	54
Figura 8. Valores médios (n = 5) de área para os analitos AEA e 2-AG variando-se o volume de amostra no processo SALLE	57
Figura 9. Valores médios (n = 5) de área para os analitos AEA e 2-AG variando-se o volume de acetonitrila no processo SALLE	58
Figura 10. Valores médios (n = 5) de área para os analitos AEA e 2-AG variando-se o volume de solução salina no processo SALLE	60
Figura 11. Valores médios (n = 5) de área para os analitos AEA e 2-AG variando-se a temperatura de centrifugação no processo SALLE	62
Figura 12. Curva analítica média para quantificação de AEA AG pelo método SALLE-UHPLC-MS/MS	63
Figura 13. Curva analítica média para quantificação de 2-AG pelo método SALLE-UHPLC-MS/MS	64
Figura 14. Comparação entre as concentrações de AEA e 2-AG em amostras de estriados de animais sadios e estriados ipsilateral e contralateral de animais lesionados por 6-OHDA.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Métodos cromatográficos para a determinação de endocanabinóides em amostras biológicas.....	33
Tabela 2. Métodos analíticos disponíveis na literatura aplicando SALLE como método de preparo de amostra.....	36
Tabela 3. Transições iônicas e configurações instrumentais para os endocanabinóides e endocanabinóides deuterados (PI) analisados	44
Tabela 4. Valores de área dos analitos AEA e 2AG para avaliação de estabilidade no homogenato	52
Tabela 5. Experimentos qualitativos para definição do solvente orgânico e do agente de salting-out para o processo de SALLE	55
Tabela 6. Valores de CV e EPR para avaliação da precisão e exatidão, respectivamente, do método SALLE-UHPLC-MS/MS na determinação de AEA e 2-AG	65
Tabela 7. Valores de área dos analitos AEA e 2-AG e dos padrões deuterados AEAd e 2-AGd para avaliação do efeito residual entre injeções para o método SALLE-UHPLC-MS/MS	66
Tabela 8. Concentrações endógenas de AEA e 2-AG em amostras de encéfalo total de animais sadios e animais lesionados por 6-OHDA	67
Tabela 9. Concentrações endógenas de AEA e 2-AG em amostras de encéfalos seccionados em hemisférios lesionados e não lesionados por 6-OHDA	69
Tabela 10. Concentrações endógenas de AEA e 2-AG em amostras de estriados de animais sadios (sem lesão por 6-OHDA).....	70
Tabela 11. Concentrações endógenas de AEA e 2-AG em amostras de estriados (lesionados e não lesionados) de animais submetidos ao modelo animal de Parkinson por 6-OHDA	71

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

1-AG	1-araquidonoilglicerol
2-AG	2-araquidonoilglicerol
2-AGd ₅	2-araquidonoilglicerol deuterado
6-OHDA	6-hidroxidopamina
ACN	Acetonitrila
AEA	Anandamida (n-araquidonoiletanolamina)
AEAd ₄	Anandamida deuterada
CB1	Receptor canabinóide do tipo 1
CB2	Receptor canabinóide do tipo 2
CV	Coefficiente de variação
DA	Dopamina
DP	Doença de Parkinson
EC	Endocanabinóide
eCB	Sistema endocanabinóide
EPR	Erro relativo percentual
ESI	<i>Electrospray ionization</i> (ionização por electrospray)
FAAH	<i>Fatty acid amide hydrolase</i> (amida hidroxilase de ácidos graxos)
FE	Fase estacionária
FM	Fase móvel
FMN	Fator de matriz normalizada
HILIC	<i>Hydrophilic interaction liquid chromatography</i> (cromatografia líquida por interações hidrofílicas)
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> (cromatografia líquida de alta eficiência)
IPA	Isopropanol
LC-MS	<i>Liquid chromatography coupled to mass spectrometry</i> (cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas)
LLE	<i>Liquid-liquid extraction</i> (extração líquido-líquido)
MAGL	Lipase de monoacilglicerol

MRM	Monitoramento de reações múltiplas
PI	Padrão interno
PP	Precipitação de proteínas
SALLE	<i>Salting-out assisted liquid-liquid extraction</i> (extração líquido-líquido assistida por <i>salting-out</i>)
SPE	<i>Solid phase extraction</i> (extração em fase sólida)
SPME	<i>Solid phase micro extraction</i> (microextração em fase sólida)
THF	Tetrahidrofurano
TIC	<i>Total ion chromatogram</i> (cromatograma de íons totais)
UHPLC	<i>Ultra high performance liquid chromatography</i> (cromatografia líquida de ultra eficiência)
UHPLC-MS/MS	<i>Ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry</i> (cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas em tandem)

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	grau Celsius
μm	micrômetro
μg μL ⁻¹	micrograma/microlitro
μg mL ⁻¹	microgramas/mililitro
μg min ⁻¹	microgramas/minuto
μL	microlitro
amol	attomol
cm	centímetro
eV	elétron-volt
fmol	femtomol
g	grama
h	hora
L	litro
L h ⁻¹	litro/hora
mg	miligrama
mL	mililitro
mL kg ⁻¹	mililitro/kilograma
mL min ⁻¹	mililitro/minuto
mol L ⁻¹	mol/litro
m/z	massa/carga
ng g ⁻¹	nanograma/grama
ng mL ⁻¹	nanograma/mililitro
nmol L ⁻¹	nanomol/litro
rpm	rotações por minuto
s	segundo
V	volt
v/v	volume/volume

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	17
1.1.	Sistema endocanabinóide	17
1.2.	Anandamida e 2-araquidonoilglicerol.....	18
1.2.1.	Propriedades físico-químicas dos endocanabinóides AEA e 2-AG.....	19
1.2.2.	Metabolismo e função sináptica dos endocanabinóides AEA e 2-AG	20
1.3.	Doença de Parkinson	22
1.3.1.	Doença de Parkinson e o sistema endocanabinóide.....	24
1.3.2.	Modelos animais da Doença de Parkinson	26
1.4.	Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas..	27
1.5.	Métodos analíticos para determinação de endocanabinóides em amostras biológicas.....	31
1.6.	Extração líquido-líquido assistida por salting-out	35
1.6.1.	Solventes orgânicos utilizados na SALLE.....	37
1.6.2.	Sais utilizados na SALLE	37
2.	OBJETIVOS	40
2.1.	Objetivo Geral.....	40
2.2.	Objetivos específicos	40
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.1.	Reagentes e padrões analíticos	42
3.2.	Animais	42
3.2.1.	Lesão unilateral do estriado	42
3.2.2.	Coleta e transporte das amostras de encéfalo	43
3.2.3.	Delineamento clínico	43
3.3.	Condições cromatográficas	43
3.4.	Homogeneização das amostras de encéfalos	44
3.5.	Otimização das variáveis SALLE.....	44
3.6.	Validação Analítica.....	45
3.6.1.	Linearidade	45
3.6.2.	Precisão e exatidão.....	46
3.6.3.	Efeito Residual.....	47

3.6.4.	Efeito da matriz biológica.....	47
3.7.	Análise das amostras.....	47
3.8.	Tratamento estatístico	48
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
4.1.	Homogeneização das amostras de encéfalo	50
4.1.1.	Estabilidade dos analitos no homogenato	52
4.2.	Otimização das variáveis SALLE.....	54
4.2.1.	Seleção do solvente orgânico e agente de salting-out (sal).....	55
4.2.2.	Volume de homogenato	56
4.2.3.	Volume de solvente orgânico	58
4.2.4.	Volume de solução salina	59
4.2.5.	Concentração da solução salina	60
4.2.6.	Temperatura de centrifugação.....	61
4.3.	Validação Analítica.....	62
4.3.1.	Linearidade	63
4.3.2.	Precisão e exatidão.....	64
4.3.3.	Efeito matriz	65
4.3.4.	Efeito residual	66
4.4.	Determinação dos níveis endógenos de AEA e 2-AG em amostras de encéfalo..	66
4.4.1.	Níveis de AEA e 2-AG em amostras de encéfalo total de animais parkinsonianos e sadios.....	67
4.4.2.	Níveis de AEA e 2-AG em amostras de encéfalos seccionados em hemisfério lesionado e hemisfério não lesionado de animais parkinsonianos.....	68
4.4.3.	Níveis de AEA e 2-AG em amostras de estriados de animais parkinsonianos e sadios.....	70
5.	CONCLUSÃO	75
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Sistema endocanabinóide

A planta *Cannabis* (*Cannabis Sativa*) foi umas das primeiras plantas a ser utilizada como medicamento, em cerimônias religiosas e de forma recreativa, sendo as primeiras evidências de seu uso datadas de mais de 5000 anos atrás. No início da década de 60 o principal componente psicoativo presente na cannabis e principal representante do grupo de substâncias hoje conhecidas como fitocanabinóides, o (-)-trans- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 – THC), foi identificado, isolado e sintetizado em laboratório, expandindo, pelos próximos anos, o interesse na pesquisa acerca das interações entre esse composto e o organismo humano, sobretudo para potencial uso medicinal (MECHOULAM, 2019). Dada a natureza lipofílica dos canabinóides acreditava-se, em princípio, que estes apresentariam efeito biológico pelo rompimento da membrana celular, de forma não específica, entretanto, estudos de mapeamento e caracterização farmacológica levaram à identificação de receptores celulares específicos sob os quais os canabinóides se ligariam de forma seletiva, conhecidos hoje como receptores canabinóides (CB) (ZOU; KUMAR, 2018).

Até o presente momento dois receptores celulares canabinóides foram identificados, os receptores canabinóides do tipo 1 (CB1) e os receptores canabinóides do tipo 2 (CB2). Ambos os receptores CB1 e CB2 pertencem a uma superfamília de receptores de membrana celular acoplada às proteínas Gi/o (GPCR). A princípio acreditava-se que esses receptores eram encontrados apenas no sistema nervoso central, entretanto, hoje se sabe que podem ser encontrados em diversos tecidos e órgãos de mamíferos (Figura 1) (MACKIE, 2006).

O CB1 foi o primeiro receptor a ser identificado, através da clonagem de uma biblioteca de cDNA (DNA complementar) de rato. Pela combinação de técnicas anatômicas, farmacológicas e moleculares, sua distribuição em tecidos biológicos foi determinada, sendo encontrado principalmente em células do sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP) (ZOU; KUMAR, 2018). Os receptores CB1 estão distribuídos de forma densa no córtex cerebral, no hipocampo, no putâmen, na substância nigra, entre outras áreas do encéfalo e espinha dorsal. Esta distribuição pode estar relacionada à habilidade de agonistas dos receptores CB1 em prejudicar a cognição e memória e alterar a função do controle motor (KATCHAN; DAVID; SHOENFELD, 2016).

Os receptores CB2, por sua vez, foram identificados alguns anos mais tarde, em uma biblioteca de cDNA promielocítico humano. Embora também sejam expressos em células neuronais, encontram-se majoritariamente em células do sistema imune, apresentando ação nos processos de imunomodulação e inflamação (KATCHAN; DAVID; SHOENFELD, 2016;

PERTWEE et al., 2010).

A presença de receptores celulares específicos, sob os quais os canabinóides se ligariam, em tecidos animais sugeriam a existência de substâncias endógenas capazes de atuar como agonistas desses receptores. No início da década de 90 os primeiros agonistas endógenos dos receptores CB1 e CB2 foram identificados, sendo hoje classificados num grupo conhecido como endocanabinóides (ECs) (ZOU; KUMAR, 2018). Juntamente de enzimas metabólicas, os receptores CB1 e CB2 e os endocanabinóides formam o que hoje se conhece por sistema endocanabinóide (eCB).

Figura 1. Distribuição dos receptores CB1 e CB2 nos tecidos e órgãos humanos.

Fonte: adaptado de “California Institute for Cannabis Research”. Disponível em: <https://normlwomensalliance.org/2013/07/what-are-cannabinoid-receptors/>

1.2. Anandamida e 2-araquidonoilglicerol

A identificação e clonagem bem sucedida do receptor CB1 propiciou, alguns anos mais tarde, em 1992, a descoberta do primeiro endocanabinóide, a N-araquidonoil etanolamina, que foi batizada popularmente de anandamida (AEA) (Figura 2a) pelos cientistas responsáveis por sua descoberta, sendo o nome derivado da palavra de língua sânscrita “ananda”, que significa felicidade ou alegria, em função da sua atuação no cérebro

no processo de recompensa (DEVANE et al., 1992). Três anos após a identificação da AEA, num experimento de “*screening*” a procura de novos ECs, um segundo composto foi identificado em tecidos de rato e cachorro, o 2-araquidonoil glicerol (2-AG) (Figura 2b) (SUGIURA et al., 2006). Embora hoje tenha-se conhecimento de outros representantes do grupo dos endocanabinóides, como peptídeos de interação com os receptores CB1 e CB2, além de derivados do ácido araquidônico, AEA e 2-AG continuam a ser os ECs mais amplamente estudados e foco desse trabalho.

Figura 2. Estrutura química dos endocanabinóides AEA (a) e 2-AG (b)

Fonte: próprio autor. Moléculas desenhadas no software ChemSketch®

1.2.1. Propriedades físico-químicas dos endocanabinóides AEA e 2-AG

O conhecimento das propriedades físico-químicas dos endocanabinóides AEA e 2-AG é essencial para o desenvolvimento de métodos analíticos para estudos clínicos. A Figura 2 apresenta as estruturas químicas dessas substâncias. Ambas derivam especificamente do ácido araquidônico, sendo a AEA um produto de reação entre o ácido araquidônico e etanolamina, composto orgânico de bifunção álcool e amina. O 2-AG, por sua vez, é um éster de glicerol derivado do ácido araquidônico (ZOERNER et al., 2011).

Como são derivados de ácidos graxos, são compostos lipofílicos, embora apresentem solubilidade moderada em água, em função da existência dos grupamentos amida e glicerol, na estrutura da AEA e 2-AG, respectivamente. A adição do composto hidrofílico 2-hidroxi- β -ciclodextrina aumenta a solubilidade da AEA em água por meio da formação de complexos 1:1 e 1:2 (JARHO et al., 1996). Apresentam valores calculados de log de p (coeficiente de partição octanol-água, indicativo de lipofilicidade/hidrofobicidade) iguais a 5.645 e 5.447, para AEA e 2-AG, respectivamente, indicando maior caráter hidrofóbico, sendo, portanto, solúveis em solventes orgânicos próticos e apróticos (ZOERNER et al., 2011).

Embora estudos aprofundados não tenham sido desenvolvidos, acredita-se que a AEA

apresente boa estabilidade em água e solventes orgânicos (DI SCALA et al., 2018). Em contrates, o 2-AG apresenta a característica única de sofrer rápida isomerização em água, dando origem a seu isômero estrutural conhecido por 1-AG. Esse processo de isomerização é dependente do pH do meio aquoso, sendo catalisado em meio básico, onde verifica-se que o equilíbrio de isomerização é deslocado no sentido de formação do isômero 1-AG em valores de pH superiores a 7,0, de forma contrária, em valores de pH inferiores a 5, o equilíbrio é favorecido no sentido de formação do isômero 2-AG (ROUZER; GHEBRESELASIE; MARNETT, 2002).

1.2.2. Metabolismo e função sináptica dos endocanabinóides AEA e 2-AG

Os endocanabinóides AEA e 2-AG apresentam algumas características distintas no que tange seus metabolismos e processos bioquímicos. AEA apresenta alta afinidade, sendo agonista parcial, dos receptores CB1, ao passo que é quase inativa nos receptores CB2, enquanto que o 2-AG atua como agonista de ambos os receptores, apresentando afinidade moderada (ZOU; KUMAR, 2018). Além das interações com os receptores CB, ambos apresentam interações com outros tipos de receptores celulares, sendo a interação entre a AEA e o receptor de potencial vanilóide do tipo 1 (TRPV1) a mais documentada, dado seu papel na transmissão sináptica da regulação da dor (DI MARZO; DE PETROCELLIS, 2012).

A Figura 3 é uma representação esquemática dos terminais sinápticos de um axônio, onde em azul tem-se o terminal pré-sináptico, em rosa o terminal pós-sináptico e em verde um astrócito adjacente. Os neurotransmissores, representados pelos círculos de coloração laranja no esquema, são moléculas biosintetizadas nos neurônios e que exercem função em processos de biossinalização. Comumente são sintetizados no terminal pré-sináptico e armazenados em vesículas. Em resposta a um potencial de ação, as vesículas são direcionadas até a membrana celular, onde são desfeitas, liberando os neurotransmissores na fenda sináptica num processo de exocitose. Os neurotransmissores ficam então livres na fenda sináptica para interagir com receptores celulares específicos e completar a sinapse (SILVA et al., 2010).

De forma contrária a outros neurotransmissores, os endocanabinóides são sintetizados em demanda em função de ativações neuronais, não sendo armazenados em vesículas (BASAVARAJAPPA, 2007). O 2-AG é biosintetizado a partir de diacilglicerol (DAG) por mediação da enzima diacilglicerol lipase alfa (DAG α). Já a AEA é sintetizada a partir de n-acil-fosfatidiletanolamina (NAPE) pela enzima fosfolipase D específica NAPE (NAPE-PLD).

Figura 3. Representação esquemática do processo de sinapse mediado por AEA e 2-AG

Fonte: adaptado de Zou (2018). *2-AG: 2-araquidonoilglicerol; AA: ácido araquidônico; AEA: anandamida; CB1R: receptor canabinoide tipo 1; DAG: diacilglicerol; DAGLα: diacilglicerol lipase alfa; EtNH₂: etanolamina; FAAH: amida hidrolase de ácidos graxos; MAGL: monoglicerol lipase; NAPE: n-acil-fosfatidiletanalamina; NAPE-PLD: fosfolipase D específica NAPE; NT: neurotransmissores

Dado a sua natureza lipídica, os endocanabinóides, principalmente 2-AG, facilmente cruzam a membrana celular e viajam pela fenda sináptica de forma retrógrada, no sentido terminal pós-sináptico à terminal pré-sináptico, ao contrário de neurotransmissores mais comuns, para ativar os receptores CB1 contidos no terminal pré-sináptico. Os receptores CB1 ativados então inibem a liberação de neurotransmissores através da supressão do influxo de cálcio (OHNO-SHOSAKU; KANO, 2014). O 2-AG excedente na fenda sináptica é então carregado até o terminal pré-sináptico, por um mecanismo ainda desconhecido, e degradado à ácido araquidônico (AA) e glicerol pela enzima monoglicerol lipase (MAGL). Já a AEA é sintetizada no terminal pós-sináptico e ativa receptores intracelulares CB1 e TRPV1. Embora a ativação retrógrada seja mediada principalmente por 2-AG, AEA também é capaz de ativar receptores CB1 no terminal pré-sináptico. A enzima de degradação da AEA, amida hidrolase de ácidos graxos (FAAH), é encontrada principalmente no terminal pós-sináptico, degradando-a à AA e etanolamina (EtNH₂) (ZOU; KUMAR, 2018).

Sua função como neurotransmissores e a distribuição dos ECs primariamente no sistema nervoso central justificam o papel destes em regulações de processos neurológicos envolvidos em condições fisiológicas e patológicas. Segundo relatos da literatura, as concentrações de endocanabinóides em fluidos e tecidos biológicos variam segundo à estímulos fisiológicos, farmacológicos e patológicos (SERGI et al., 2013). Essas evidencias levaram ao interesse na pesquisa para elucidação da função do sistema endocanabinóide em uma série de desordens neurodegenerativas, como a esquizofrenia, a doença de Alzheimer, doença de Huntington e doença de Parkinson (BASAVARAJAPPA et al., 2017).

1.3. Doença de Parkinson

A Doença de Parkinson (DP) foi descrita pela primeira vez no início do século XIX pelo médico britânico James Parkinson, ao observar alguns sintomas motores clássicos da doença em alguns pacientes. Anos mais tarde a doença recebeu esse nome em sua homenagem (PALACIOS-SÁNCHEZ; TORRES NUPAN; BOTERO-MENESES, 2017). A DP é a segunda doença neurodegenerativa mais comum, ficando atrás apenas da Doença de Alzheimer, tendo prevalência de aproximadamente 1% em indivíduos acima dos 60 anos podendo chegar a até 4% em indivíduos com idade superior a 85 anos de acordo com organização mundial da saúde (MORITZ et al., 2006).

A DP tem origem idiopática, ou seja, se manifesta de forma espontânea, sendo as causas e fatores de riscos obscuros ou desconhecidos. O envelhecimento ainda é considerado o maior fator de risco, visto que a prevalência da patologia é crescente em função da idade.

Alguns genes têm sido associados na mediação de formas autossômicas dominantes da DP em pacientes com histórico familiar da doença, entre eles os genes SNCA e LRRK2, os quais codificam um grupo de proteínas com multidomínios envolvidas em múltiplos processos celulares (KALIA; LANG, 2015). Esses fatores genéticos são observados apenas em cerca de 10 a 15 % dos casos da DP, indicando que fatores ambientais, como exposição a pesticidas, alimentação, uso de drogas de abuso, metais pesados, entre outros, desempenhem um papel no surgimento da doença (KOULI; TORSNEY; KUAN, 2018).

Fisiopatologicamente a DP é caracterizada principalmente pela perda seletiva de neurônios dopaminérgicos na porção compacta da substância nigra, principalmente na porção ventrolateral dessa estrutura. Resultados clínicos e patológicos demonstram que a perda severa desses neurônios nessa região leva a redução dos níveis de dopamina (DA), resultando no desenvolvimento dos sintomas motores da DP (KALIA; LANG, 2015). Embora nos estágios iniciais da doença a perda dopaminérgica esteja concentrada na região da substância nigra, com o avanço da patologia, em estados avançados, a perda dopaminérgica se difunde a outras regiões cerebrais (POEWE et al., 2017).

Outra característica neuropatológica da DP é o acúmulo de corpos de Lewy em diferentes regiões cerebrais. Os corpos de Lewy são gerados pela formação de agregados de proteínas enoveladas de forma anormal. Na DP esses agregados são formados pelo acúmulo da proteína α -sinucleína no citoplasma de células neuronais (KALIA; LANG, 2015). Os corpos de Lewy são observados inicialmente em neurônios colinérgicos e monoaminérgicos do tronco cerebral e em neurônios do sistema olfatório, entretanto, com a progressão da doença, são encontrados nas regiões límbica e neocorticais do encéfalo (POEWE et al., 2017).

Os principais sintomas associados a DP são os clássicos e bem conhecidos sintomas motores, como a bradicinesia (lentidão nos movimentos voluntários), rigidez muscular, tremor de repouso e comprometimento postural e da marcha. Além destes, outros sintomas não-motores são também observados, como redução olfatória, alterações de cognição, disfunções psiquiátricas, distúrbios de sono, entre outros (ARMSTRONG; OKUN, 2020). Dada a falta de especificidade dos sintomas não motores e o desenvolvimento tardio dos sintomas motores, observados apenas após perda considerável dos neurônios dopaminérgicos, o diagnóstico precoce da DP é ainda um desafio.

A DP não tem cura sendo, portanto, o tratamento sintomático, realizado principalmente por meio da administração de fármacos, sendo o fármaco de referência a L-DOPA ou levodopa, um precursor do neurotransmissor dopamina. Esse medicamento é normalmente administrado em conjunto com os fármacos benserazida e carbidopa, inibidores

da enzima L-amino ácido aromático descarboxilase (AADC), responsável pela conversão da L-DOPA em dopamina, evitando dessa forma a metabolização da L-DOPA na corrente sanguínea antes de que essa possa atravessar a barreira hematoencefálica. A levodopa que não é convertida periféricamente atravessa a barreira hematoencefálica e atinge o sistema nervoso central. Ali, os neurônios dopaminérgicos sobreviventes do Parkinson captam a levodopa, que é descarboxilada pela enzima AADC em dopamina, a qual é armazenada nas vesículas sinápticas e liberada pelos neurônios na fenda sináptica (NISHIJIMA; TOMIYAMA, 2016).

O tratamento prolongado da DP com o fármaco levodopa leva ao desenvolvimento da condição clínica conhecida como discinesias induzida por levodopa (*Levodopa-induced dyskinesia*, LID). A LID é caracterizada pelo surgimento de movimentos musculares involuntários excessivos sendo diretamente relacionada com os níveis de levodopa no organismo, diminuindo a eficácia desse medicamento no tratamento da doença (PANDEY; SRIVANITCHAPOOM, 2017).

Os problemas resultantes do tratamento crônico da DP com o fármaco levodopa, bem como a dificuldade no seu diagnóstico precoce, justificam a necessidade do desenvolvimento de novos tratamentos, terapias, fármacos e a identificação de potenciais biomarcadores. Portanto, o desenvolvimento de métodos cromatográficos, para a quantificação de endocanabinóides, como AEA e 2-AG em amostras biológicas, é uma ferramenta importante na elucidação do sistema endocanabinóide de pacientes com a DP. Além disso, AEA e 2-AG têm se demonstrado como promissores biomarcadores da DP e de outras desordens neurodegenerativas (BASAVARAJAPPA et al., 2017).

1.3.1. Doença de Parkinson e o sistema endocanabinóide

A participação do sistema endocanabinóide na sinalização retrógrada das sinapses glutamatérgicas faz com que o eCB seja um alvo farmacológico para doenças caracterizadas pela homeostase de glutamato, como as doenças neurodegenerativas. Dessa forma, compostos que atuem na normalização da homeostase de glutamato pela ativação dos receptores CB1 se apresentam como agentes anti-excitotóxicos. Outro efeito neuroprotetor dos CB1 é a melhora no suprimento de sangue em regiões lesionadas do encéfalo (FERNÁNDEZ-RUIZ; ROMERO; RAMOS, 2015).

Dada sua localização em células da glia, os receptores CB2 podem ser ativados atuando no controle da homeostase neuronal. Os efeitos advindos dessa ativação estão associados ao papel trófico exercido pelas células da glia, incluindo melhoras no suprimento de substratos metabólicos para os neurônios, melhora na geração de neurotrofinas ou

mediadores anti-inflamatórios, que poderiam potencialmente resgatar neurônios danificados, e a redução da produção de uma variedade de fatores neurotóxicos pelas células da glia (FERNÁNDEZ-RUIZ; ROMERO; RAMOS, 2015).

Evidências sugerem que alguns endocanabinóides, como AEA e 2-AG possam aumentar o dano cerebral por meio da geração de novos lipídios mediadores no metabolismo da enzima ciclo-oxigenase-2 (COX-2), que podem ser tóxicos aos neurônios. Dessa forma, a inibição da biossíntese de AEA e 2-AG apresenta efeito neuroprotetor, visto que reduz a quantidade desses compostos disponíveis para participação no metabolismo da COX-2. De forma contraditória, a degradação de AEA e 2-AG tem apresentado efeito neurotóxico através do acúmulo de ácido araquidônico, um dos produtos de degradação desses ECs. Dessa forma, inibidores das enzimas de degradação desses ECs, MAGL e FAAH, podem apresentar efeitos neuroprotetores (FERNÁNDEZ-RUIZ; ROMERO; RAMOS, 2015).

Concentrações elevadas dos endocanabinóides AEA e 2-AG em regiões do encéfalo têm sido associado à sintomatologia parkinsoniana. Embora os receptores CB1 não sejam abundantes em neurônios dopaminérgicos, o envolvimento dos ECs na degradação desses neurônios tem sido observado em uma série de trabalhos (BASAVARAJAPPA et al., 2017).

Pisani et al descreveram que as concentrações de AEA em amostras de liquor de pacientes com DP, sem tratamento, chegam a ser maior que o dobro quando comparados às concentrações de indivíduos sadios (grupo controle) de mesma idade. Já em pacientes em tratamento com precursor da dopamina (Levodopa), as concentrações plasmáticas são similares às do grupo controle. Este estudo indica que o aumento anormal da concentração de AEA em amostras de liquor reflete a ocorrência de um mecanismo compensatório que ocorre na DP para normalizar a depleção de dopamina (PISANI et al., 2010).

Em um estudo realizado com ratos tratados com reserpina, para induzir a DP, foi constatado que a supressão da locomoção ocasionada pelo fármaco foi acompanhada de aumento de sete vezes nos níveis de 2-AG na região do globo pálido, enquanto esse aumento não foi observado nas outras cinco regiões cerebrais analisadas. O estímulo da locomoção nos ratos tratados com reserpina pelos agonistas seletivos dos receptores dopaminérgicos D1 e D2 resultou em uma redução dos níveis de AEA e 2-AG no globo pálido. A recuperação da locomoção total dos ratos foi obtida pela coadministração de quinpirole (antagonista do D1) e do antagonista seletivo do CB1, SR141716A. Essas descobertas sugerem que a modulação do sistema de sinalização endocanabinóide pode ser útil no tratamento das disfunções motoras ocasionadas pela DP ou outras patologias (DI MARZO et al., 2000).

Em outro estudo em que a neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropirididina

(MPTP) foi utilizada para reproduzir o padrão de morte celular da DP no tecido cerebral de ratos, verificou-se que a administração do endocanabinóide 2-AG de forma exógena promoveu proteção contra a degradação celular por MPTP, indicando que os ECs agem como uma defesa natural do organismo contra a inflamação (MOUNSEY et al., 2015). Celorrio et al e Viveros-Paredes et al, em estudos distintos, também utilizando a toxina MPTP em ratos, evidenciaram que o URB597, um inibidor da enzima amido hidrolase de ácido graxo (FAAH), responsável pela degradação de AEA, exibe efeitos de proteção ao diminuir a imunoreatividade microglial e melhorar a função motora (CELORRIO et al., 2016; VIVEROS-PAREDES et al., 2016).

1.3.2. Modelos animais da Doença de Parkinson

Um modelo animal é definido como um animal que apresenta uma doença ou lesões similares aos humanos. Idealmente deve apresentar etiologia e função semelhante à contraparte humana, sendo necessário que vários aspectos da patologia sejam replicados no animal (LANE; DUNNETT, 2008).

Na DP duas abordagens são utilizadas para modelar a patologia em animais: neurotoxinas ou através da genética. A administração de neurotoxinas modela a DP pela rápida degeneração dos neurônios dopaminérgicos. Esses modelos geralmente induzem uma rápida perda de células neuronais na região compacta da substância nigra (*substantia nigra pars compacta*, *SNpc*), provocam sintomas motores e mudanças comportamentais, porém, não mimetizam a formação dos corpos de Lewy observada na DP. Em contraste, os modelos genéticos são capazes de promover a deposição de α -sinucleína, gerando os corpos de Lewy, porém, não apresentam neurodegeneração e perda celular no mesmo nível que os modelos neurotóxicos (KONNOVA; SWANBERG, 2018).

Modelos animais baseados em roedores têm sido preferidos no estudo da DP e outras patologias, dada a conveniência e facilidade nos cuidados desses animais em condições laboratoriais. A vantagem do uso desses animais em modelos da DP é que a degeneração das vias nigro-estriatais se correlaciona ao surgimento de deficiências motoras em camundongos e ratos. Esses déficits podem ser observados e acompanhados através de uma série de testes comportamentais associados ao movimento, postura e força desses roedores (KONNOVA; SWANBERG, 2018).

Embora outras neurotoxinas estejam disponíveis para mimetizar a degeneração neuronal da DP, destaca-se aqui o uso do análogo hidroxilado da dopamina, a 6-hidroxdopamina (6-OHDA), sendo o modelo animal utilizado no desenvolvimento desse

trabalho.

A toxina 6-OHDA não cruza a barreira hematoencefálica, sendo necessária administração direta no encéfalo para indução da neurodegeneração. Esse composto entra em neurônios dopaminérgicos e noradrenérgicos através de transportadores monoamina, sendo necessária a coadministração de inibidores de recaptção noradrenérgica para que a lesão ocorra de forma seletiva nos neurônios dopaminérgicos (KONNOVA; SWANBERG, 2018). Três mecanismos são propostos para explicar os efeitos citotóxicos da 6-OHDA: (i) auto oxidação intra- ou extra-celular da 6-OHDA, que favorece a produção de radicais livres; (ii) formação de peróxido de hidrogênio por ação da enzima monoamina oxidase e (iii) inibição direta do complexo da cadeia respiratória mitocondrial I. Esses mecanismos podem agir em conjunto ou de forma independente, gerando espécies reativas de oxigênio, levando ao estresse oxidativo e morte celular (HERNANDEZ-BALTAZAR; ZAVALA-FLORES; VILLANUEVA-OLIVO, 2017).

A injeção intracerebral de 6-OHDA em roedores permite o direcionamento da toxina na substância nigra, estriado ou no feixe prosencefálico medial, comumente de forma unilateral, gerando um modelo de hemi-parkinsonismo. Grande degeneração dopaminérgica unilateralmente e desenvolvimento de déficits motores são observados em alguns dias após a injeção.

Dada a capacidade de mimetização de características da DP, o modelo da 6-OHDA se demonstra como uma importante ferramenta no desenvolvimento de novas terapias e fármacos. Dessa forma, o desenvolvimento de métodos analíticos para quantificação de AEA e 2-AG em tecidos e biofluidos de roedores, submetidos ou não, a esse modelo animal se faz necessária, a fim de se acompanhar alterações das concentrações desses ECs em testes clínicos.

1.4. Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) tem sido a técnica analítica de referência para a quantificação de endocanabinóides em amostras biológicas.

Embora existam evidências de experimentos relacionados à cromatografia anteriores ao século XX, atribui-se o mérito da introdução da cromatografia líquida ao botânico russo Mikhail Tswett em seu artigo publicado em 1903. Tswett desenvolveu experimentos para separação de pigmentos em extratos de plantas, onde fez uso de um tubo de vidro preenchido com material adsorvente (fase estacionária), o qual era capaz de adsorver parte ou a totalidade

dos pigmentos. Para remover os compostos adsorvidos na fase estacionária um líquido, denominada fase móvel, foi percolado pelo material adsorvente, arrastando os compostos separados para fora do tubo em uma ordem específica de acordo com a interação destes com a fase estacionária (PACHECO et al., 2015).

Com o avanço tecnológico, anos mais tarde teve-se o surgimento da cromatografia líquida de alta eficiência (*high performance liquid chromatography*, HPLC). É uma técnica analítica de separação que faz uso de uma coluna cromatográfica contendo partículas de pequeno diâmetro (da ordem de micrometros, μm), sob a qual um solvente ou mistura de solventes, é percolado sob aplicação de pressão. Após preparo prévio, a amostra é introduzida na coluna e seus componentes percolados por toda sua extensão por ação da fase móvel, promovendo a separação destes de acordo com a sua interação com as fases estacionária e móvel (HARRIS, 2007).

A cromatografia líquida de alta eficiência pode ser classificada de acordo com as propriedades das fases estacionária e móvel e o mecanismo atuante no processo de separação, podendo ser (1) por partição ou cromatografia líquido-líquido; (2) por adsorção ou cromatografia líquido-sólido; (3) por troca iônica; (4) cromatografia por exclusão; (5) cromatografia por afinidade e (6) cromatografia quiral (SKOOG et al., 2015).

Atualmente a cromatografia líquida por partição tem sido a modalidade HPLC mais utilizada para a determinação dos mais diversos compostos em diferentes matrizes. Nesse tipo de cromatografia a fase estacionária é constituída de um fino filme líquido, imiscível com a fase móvel, imobilizado na superfície de partículas de suporte, geralmente a base de sílica. A fase estacionária pode ser imobilizada por meio da adsorção sobre a superfície das partículas do recheio ou através de ligações químicas, na subdivisão conhecida como cromatografia líquida por partição com fase ligada (SKOOG et al., 2015).

A cromatografia líquida por partição pode ainda ser classificada em dois modos de acordo com as polaridades relativas das fases estacionária e móvel. Os primeiros trabalhos de cromatografia líquida faziam uso de fases estacionárias altamente polares, baseadas principalmente em sílica, e fases móveis constituídas por um solvente ou mistura de solventes de característica apolar (hexano, éter propílico, entre outros), ficando conhecida como cromatografia em fase normal. Com o advento das fases estacionárias quimicamente ligadas, o uso de fases estacionárias mais hidrofóbicas, isto é, contendo grupamentos apolares (C18, C8, C4, entre outros) ancorados nas partículas de sílica e fases móveis mais polares (misturas de água e solventes como metanol e acetonitrila) propiciaram o desenvolvimento da cromatografia em fase reversa, que leva esse nome em função da ordem de eluição dos

componentes da mistura ser contrária à ordem de eluição observada na cromatografia em fase normal (SKOOG et al., 2015).

A busca pelo aumento da eficiência da separação cromatográfica, menores tempos de análise e aumento da frequência analítica levaram ao desenvolvimento de fases estacionárias com tamanhos de partículas inferiores, menores que 2 μm . Partículas menores levam a um ganho de eficiência na separação cromatográfica pois permitem que os equilíbrios de partição dos solutos entre as fases móvel e estacionária sejam mais rápidos em função da diminuição do tamanho dos poros, de modo que os solutos são eluídos mais rapidamente e geram picos cromatográficos mais estreitos (ganho de eficiência). Além disso, a vantagem do uso de partículas menores que 2 μm é possibilidade do uso de colunas de menores comprimentos e maiores vazões, levando a análises mais rápidas sem perda de eficiência (MALDANER; JARDIM, 2009).

Embora a diminuição do tamanho das partículas proporcione um ganho de eficiência na separação, um grande aumento na pressão do sistema é observado em função da maior resistência ao fluxo da fase móvel através dessas partículas, limitando sua aplicação em função da pressão, uma vez que os equipamentos HPLC convencionais não podem atuar sob altas pressões. Nesse contexto, com o avanço da instrumentação analítica, surge a cromatografia líquida de ultra eficiência (*ultra high performance liquid chromatography*, UHPLC), capaz de operar sob altos valores de pressão utilizando as colunas recheadas com partículas de diâmetro inferior a 2 μm (SWARTZ, 2005).

Num sistema típico de cromatografia líquida os analitos são separados e eluídos, em uma ordem específica dependente das interações com as fases móvel e estacionária, sendo então direcionados a um detector para que possam ser identificados e quantificados. Embora diversos detectores (espectrofotométricos, eletroquímicos, massas, etc) sejam empregados em conjunto com sistemas HPLC e UHPLC para quantificação dos analitos, destaca-se o acoplamento com a técnica de espectrometria de massas (*mass spectrometry*, MS) para a determinação de fármacos, metabolitos e biomarcadores.

A espectrometria de massas é o estudo da matéria através da formação de íons em fase gasosa e posterior detecção e caracterização destes em função da razão entre sua massa e carga (razão m/z) (MURRAY et al., 2013). Um espectrômetro de massas típico é constituído de um sistema de introdução da amostra, uma fonte de ionização, um ou mais analisadores de massas, um detector e um sistema de aquisição de dados.

A fonte de ionização mais comumente empregada no acoplamento LC-MS é a fonte de ionização por *electrospray* (*electrospray ionization*, ESI). A Figura 4 apresenta uma

representação esquemática de um equipamento de espectrometria de massas com sistema de ionização ESI. Na ESI o efluente da fase móvel do sistema cromatográfico é direcionado até a fonte de ionização, através de um capilar de aço inox à pressão atmosférica, ao qual se aplica um campo elétrico, induzindo a acumulação de cargas na superfície do líquido na saída do capilar. Esse procedimento de carga gera um cone de Taylor, que é então quebrado, gerando pequenas gotículas carregadas dispersas no espaço na forma de um aerossol. Essas gotículas são então dessolvatadas, através da passagem em um gás inerte aquecido, fazendo com que sejam reduzidas e ocorra o aumentando da densidade de cargas, até que, em função de colisões e um fenômeno conhecido por “explosão Coulombica”, são produzidos íons a partir dos solutos contidos nas gotículas. Os íons são então focalizados e direcionados ao analisador de massas (BHARDWAJ; HANLEY, 2014).

Figura 4. Esquema de um sistema de espectrometria de massas do tipo triploquadropolo com ionização por electrospray

Fonte: (MARTINS JÚNIOR et al., 2006)

Após a formação dos íons, estes são direcionados até o analisador, sendo separados em função da relação m/z . Diferentes analisadores são utilizados em sistemas de espectrometria de massas, como os quadropolos (Q), aprisionamento de íons (*ion-trap*), “orbitraps” e tempo de voo (TOF). Os analisadores do tipo quadropolo são usualmente os mais utilizados em determinações quantitativas em acoplamento com a cromatografia líquida. Um quadropolo consiste, basicamente, de quatro hastes cilíndricas ou hiperbólicas paralelas entre si, onde as hastes opostas são eletricamente conectadas e um potencial de radiofrequência (RF) é aplicado. Um potencial de corrente direta (DC) é então sobreposto ao potencial RF. A combinação dos potenciais RF e DC faz com que os íons oscilem e passem através do

quadropolo na direção z do plano cartesiano. Dependendo dos potenciais aplicados, somente íons de razão m/z particular apresentarão trajetórias estáveis, de modo que, os demais íons terão trajetórias instáveis e colidirão com as hastes, sendo então removidos. Modificações nos potenciais RF e DC aplicados possibilitam a seleção de íons com razões m/z específicas para serem analisados, garantindo seletividade a este método de detecção (HAAG, 2016).

Um espectrômetro de massas que faz uso de dois ou mais analisadores, como o triploquadropolo representado na Figura 4, são conhecidos como espectrômetros de massas em *tandem* (MS/MS). O triploquadropolo consiste basicamente de três quadropolos dispostos em série, onde o primeiro e o terceiro atuam como seletores de íons em função da m/z e o segundo quadropolo atua como célula de colisão. Os íons gerados pós processo de ionização são selecionados como íons precursores no primeiro quadropolo (Q1), de modo que somente os íons de m/z de interesse são direcionados ao segundo quadropolo (q2). No q2, que atua somente como célula de colisão e não como seletor de massa (por isso simbolizado por q minúsculo), os íons selecionados sofrem fragmentação sendo, então, selecionados e quantificados no terceiro quadropolo (Q3). Esse modo de análise é conhecido por monitoramento de reações múltiplas (*multiple reaction monitoring*, MRM), sendo altamente sensível e seletivo em função da seleção de transições de m/z entre íon precursor e íons fragmentos específicas para cada analito (HOFFMAN; STROOBANT, 2007).

1.5. Métodos analíticos para determinação de endocanabinóides em amostras biológicas

A Tabela 1 sumariza os principais métodos analíticos recentes encontrados na literatura para a quantificação de AEA, 2-AG e outros endocanabinóides, em uma série de amostras biológicas, como tecidos cerebrais de roedores e biofluidos humanos, tais como plasma, soro e líquido cefalorraquidiano.

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

Como observado na Tabela 1, os métodos desenvolvidos em sua grande maioria fazem

uso de técnicas convencionais de extração como a precipitação de proteínas (PP), extração em fase sólida (SPE) e extração líquido-líquido (LLE). Esses métodos, além da baixa seletividade e baixa remoção de interferentes, apresentam como desvantagens o uso de maiores volumes de solventes orgânicos, requerem maiores volumes de amostras biológicas, além de seus procedimentos serem mais laboriosos e consumirem mais tempo quando comparado às técnicas modernas de microextração.

No que diz respeito a quantificação de endocanabinóides em tecido cerebral de roedores, Buczinsky e Parsons publicaram um levantamento dos métodos utilizados (BUCZYNSKI; PARSONS, 2010), onde se evidencia o uso do método clássico de extração de lipídios desenvolvido por Folch na década de 50 (FOLCH; LEES; SLOANE STANLEY, 1957) e os métodos convencionais de extração já citados. Em sua grande maioria, tratam-se de estudos clínicos sem grande preocupação com a etapa analítica.

A química analítica moderna, em especial a cromatografia, tem direcionado seus esforços na miniaturização das técnicas de preparo de amostra. As técnicas miniaturizadas fazem uso de menores volumes de amostra e solventes orgânicos, procuram aplicar solventes e reagentes ambientalmente amigáveis, e comumente apresentam maior remoção de interferentes quando comparado às técnicas convencionais. Nesse contexto, podemos destacar a extração líquido-líquido assistida por *salting-out* (*salting-out assisted liquid-liquid extraction*, SALLE).

Tabela 1. Métodos cromatográficos para a determinação de endocanabinóides em amostras biológicas

Analitos	Amostra	Descrição do Método			LOQ	Referência
		Extração	Condições Cromatográficas	Sistema de Detecção		
AEA, DHEA, LEA, PEA, OEA e 2-AG	Cérebro humano (1-3 mg)	LLE	FE: C18 FM: água: acetonitrila: ácido fórmico (33:67:0,1) (Eluição Isocrática)	LC-MS/MS	(1,0 nM, AEA); (0,5 nM, DHEA); (0,5 nM, LEA); (2,3 nM, PEA); (1,1 nM OEA) e (189 nM, 2-AG)	(LEHTONEN et al., 2011)
AEA, 2-AG, DHEA, DLE, OEA, PEA e SEA	Plasma humano (100 µL)	PP	FE: C8 FM: água/metanol/acetonitrila (40/40/20) com 0,1% ácido fórmico: metanol/acetonitrila (70/30) com 0,1% ácido fórmico. (Eluição por gradiente)	LC-MS/MS	(0,056 ng mL ⁻¹ , AEA); (0,771 ng mL ⁻¹ , 2-AG); (0,064 ng mL ⁻¹ DHEA); (0,019 ng mL ⁻¹ DLE); (0,064ng mL ⁻¹ OEA); (0,064ng mL ⁻¹ PEA) e (0,095 ng mL ⁻¹ SEA)	(BALVERS et al., 2013)
2-AG e AEA	Plasma humano (100 µL)	SPME	FE: C18 FM: Água (80%); ácido fórmico 2,5mM em metanol (20%). (Eluição por gradiente)	LC – MS/MS	(2,9 ng mL ⁻¹ 2-AG) e (0,29 ng mL ⁻¹ para AEA)	(SERGI et al., 2013)
AEA, OEA e PEA	Cérebro de roedores (50 mg)	Precipitação de proteínas	FE: C18 FM: 1 mM de acetato de amônio + 0,1% de ácido acético em metanol:1 mM de acetato de amônio, 0,1% de ácido acético e 5% de metanol em água. (Eluição por gradiente)	LC-MS	(1,4 ng mL ⁻¹ , AEA); (0,6 ng mL ⁻¹ , OEA) e (0,5 ng mL ⁻¹ , PEA)	(LIPUT et al., 2014)
AEA, 2-AG, OEA e PEA	Células tronco (1 mL)	LLE	FE: C18 FM: 0,2% de ácido fórmico: acetonitrila/2-propanol (60:40) com 0,2% de ácido fórmico. (Eluição por gradiente)	LC-MS	(0,3 ng mL ⁻¹ AEA); (0,5 ng mL ⁻¹ OEA); (0,5 ng mL ⁻¹ PEA) e (5 ng mL ⁻¹ 2-AG)	(IVANOV; BORCHERT; HINZ, 2015)
AEA, 2-AG, OEA, PEA e LEA	Cérebro de rato (10 mg)	LLE	FE: C18 FM: ácido fórmico (0.02 M) em acetonitrila; ácido fórmico (0.02 M) em água Eluição por gradiente	LC-MS/MS	(0.2 ng/g AEA, OEA, PEA); (0.8 mg/g 2-AG)	(BYSTROWSKA et al., 2014)

Tabela 1 continua ...

Continuação da Tabela 1

Analitos	Amostra	Descrição do Método			LOQ	Referência
		Extração	Condições Cromatográficas	Sistema de Detecção		
AEA e 2-AG	Cérebro de rato	LLE	FE: C18 FM: 15% acetato de amônio 10 mM em água + 85% acetonitrila (Eluição isocrática)	LC-MS/MS	(50 amol AEA); (25 fmol 2-AG)	(QI et al., 2015)
AEA	Plasma	SALLE	FE: C18 FM: 65 % Acetonitrila + 35 % de água com 0,1 % ácido fórmico (Eluição isocrática)	LC-MS/MS	(0,1 ng mL ⁻¹ AEA)	(XIONG et al., 2015)
AEA, PEA, OEA e 2AG	Soro e fluído folicular	MLME-CD	FE: C18 FM: 0.1 % ácido fórmico em água e 0.1% ácido fórmico em acetonitrila	UHPLC-MS/MS	(8.4 fmol AEA); (3.0 fmol PEA); (7.6 fmol OEA); (54.3 fmol 2-AG)	(DING et al., 2017)
AEA e 2AG	Plasma	-	<u>Coluna 1 D</u> FE: RP-8 ADS FM: água (Eluição isocrática) <u>Coluna 2D</u> FE: Kinetex C18 column FM: solução aquosa contendo 0.5% ácido fórmico e acetonitrila (30:70, v/v) (Eluição isocrática)	Column-switching UHPLC-MS/MS	(0.10 ng mL ⁻¹ AEA) e (0.04 ng mL ⁻¹ 2-AG)	(MARCHIONI et al., 2017)
AEA	Líquido cefalorraquidiano	DPX	FE: Kinetex C18 column FM: solução aquosa contendo 0.5% ácido fórmico e acetonitrila (30:70, v/v) (Eluição isocrática)	LC-MS/MS	(0.10 ng mL ⁻¹ AEA)	(OLIVEIRA; MARCHIONI; QUEIROZ, 2019)

*2-AG: 2-araquidonoil glicerol; 2-AG ETHER: éter glicerol-2 araquidonoil; AEA: anandamida/araquidonoil etanolamida; DEA: docosatetraenoil etanolamida; DHEA: docosahexaenoil etanolamida; DLE: dihomolinenol etanolamida; DPX: microextração em ponteiros descartáveis; EPEA: N-eicosapentaenoil etanolamida; FE: fase estacionária; FM: fase móvel; LC-MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas; LC-MS/MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem; LEA: N-linoleoil etanolamida; LLE: extração líquido-líquido; LNEA: N- α -linoleoil etanolamida; MILME-CD: microextração líquida dispersiva-derivação química; NADA: N-araquidonoil dopamina; NAGly: N-araquidonoil glicina; ODS: octadecilsilano; OEA: oleoil etanolamida; OLDA: N-oleoil dopamina; PEA: palmitoil etanolamida; PP: precipitação de proteínas; SALLE: extração líquido-líquido assistida por salting-out; SEA: etanolamida stearoil; SPE: extração em fase sólida; SPME: micro extração em fase sólida; UHPLC: cromatografia líquida de ultra eficiência.

1.6. Extração líquido-líquido assistida por *salting-out*

A extração líquido-líquido assistida por *salting-out* (*Salting-out Assisted Liquid-Liquid Extraction*, SALLE), embora tenha sido demonstrada pela primeira vez em 1973 (MATKOVICH; CHRISTIAN, 1973), recentemente tem recebido destaque para a extração de diversos analitos em diferentes matrizes para análises por cromatografia líquida de alta eficiência. Esse método de extração é baseado no efeito de “*salting-out*”, que consiste na redução da miscibilidade mútua entre a água e um solvente orgânico miscível em água, como a acetonitrila, pela adição de um eletrólito, provocando a quebra das ligações fracas entre as moléculas de água e as moléculas do solvente orgânico, separando as fases, aquosa e orgânica, as quais em condições normais são miscíveis e se apresentam como um sistema monofásico. Como consequência da adição do sal, os analitos orgânicos não carregados presentes na amostra sofrem redução de solubilidade na fase aquosa e são extraídos na fase orgânica (equilíbrio de partição) (JAIN et al., 2014).

A SALLE tem se mostrado mais vantajosa que as técnicas convencionais de preparo de amostras dada a sua facilidade de aplicação, visto que é capaz de extrair de forma eficiente uma grande gama de analitos de diferentes polaridades utilizando apenas solventes orgânicos e sais de fácil acesso. O processo de extração apresenta a mesma simplicidade que a precipitação de proteínas, mas gera extratos mais limpos, pois a alta concentração salina e a adição do solvente orgânico ao sistema podem precipitar efetivamente as proteínas, presentes na matriz, e promover a separação das fases. Além disso, o material precipitado, os sais e outros resíduos permanecem na fase aquosa. A SALLE quando comparada à LLE convencional, (i) utiliza menores volumes de solvente orgânico, (ii) não requer agitação vigorosa, (iii) utiliza solventes menos agressivos ao ambiente, como a acetonitrila, o que a torna mais favorável no contexto da química verde, (iv) evita, em alguns casos, a necessidade de evaporação do extrato, que pode ser injetado diretamente ou diluído no sistema cromatográfico e (v) extrai analitos mais polares. Quando comparada à SPE, a SALLE requer menor tempo para o desenvolvimento do procedimento analítico e em razão da simplicidade, menor custo (TANG; WENG, 2013; VALENTE; GONÇALVES; RODRIGUES, 2013).

O solvente orgânico miscível em água e o sal são as principais variáveis que influenciam na eficiência do método SALLE e devem ser cuidadosamente avaliados e selecionados de acordo com os analitos de interesse e a técnica analítica aplicada. A Tabela 2 apresenta os métodos SALLE mais recentes descritos na literatura para análise de diferentes analitos em diferentes matrizes.

Tabela 2. Métodos analíticos disponíveis na literatura aplicando SALLE como método de preparo de amostra

Analitos	Matriz	Solvente orgânico	Sal	Técnica analítica	Referência
Aminas biogênicas	Suco de frutas e bebidas alcoólicas	Acetonitrila	Sulfato de amônio	LC-UV	(JAIN; GUPTA; VERMA, 2015)
Anandamida	Plasma humano	Acetonitrila	Formiato de amônio	LC-MS/MS	(XIONG et al., 2015)
Inseticidas piretroides	Urina humana, água do mar e água de esgoto	Acetonitrila	Cloreto de sódio	GC-MS	(NIU et al., 2017)
Benzimidazóis	Leite bovino	Acetonitrila	Sulfato de amônio	cLC-DAD	(TEJADA-CASADO et al., 2018)
Biguanidas	Plasma e urina humanos e água de rio	Acetonitrila	Hidróxido de sódio	HILIC-DAD	(ALSHISHANI; SALHIMI; SAAD, 2018)
Nitroimidazóis	Ovas de peixe	Acetonitrila	Cloreto de sódio e sulfato de magnésio	LC-MS/MS	(HERNÁNDEZ-MESA; CRUCES-BLANCO; GARCÍA-CAMPAÑA, 2018)
Anfetaminas	Mecônio humano	Acetonitrila	Formiato e bicarbonato de amônio	LC-MS/MS	(NEMEŠKALOVÁ et al., 2019)
Inibidores da tirosina quinase	Plasma humano	Acetonitrila	Cloreto de sódio	CE-UV	(AHMED et al., 2020a)
Inibidores da tirosina quinase	Sangue total	Acetonitrila	Cloreto de sódio	LC-UV	(AHMED et al., 2020b)

*CE-UV: eletroforese capilar acoplada a detector espectrofotométrico; cLC-DAD: cromatografia líquida capilar com detector espectrofotométrico por arranjo de diodos; GC-MS: cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas HILIC-DAD: cromatografia líquida com interação hidrofílica com detector espectrofotométrico por arranjo de diodos; LC-MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas; LC-MS/MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem; LC-UV: cromatografia líquida com detector espectrofotométrico

Como se observa pela tabela, a SALLE tem sido aplicada como técnica de preparo de amostra principalmente para a quantificação de fármacos, metabólitos e biomarcadores em amostras biológicas e ambientais aliada às técnicas de separação, como as cromatografias líquida e gasosa e a eletroforese capilar.

1.6.1. Solventes orgânicos utilizados na SALLE

Tem-se reportado que os solventes mais vantajosos e passíveis de serem utilizados são a acetonitrila (ACN), isopropanol (IPA) e tetrahidrofurano (THF). O uso de IPA gera eficiência de extração de fármacos e metabólitos, mas em contrapartida, alguns componentes da matriz são coextraídos, provavelmente devido ao fato da fase orgânica de IPA pós SALLE apresentar maior conteúdo em água. O mesmo é observado ao se utilizar outros álcoois, como acetona e metanol, como solvente (TANG; WENG, 2013).

A ACN é o solvente mais comumente utilizado, como verificado pela Tabela 2, visto que apresenta grande eficiência de extração e gera extratos mais limpos em comparação a outros solventes, dado o seu menor conteúdo de água, além disso, é o solvente mais utilizado em fases móveis de LC em fase reversa, o que possibilita, em alguns casos, injeção direta no sistema. Na SALLE de biofluidos, como plasma, a ACN tem função dupla: precipita as proteínas da matriz e depois atua como solvente extrator (TANG; WENG, 2013).

O THF, embora ainda pouco utilizado, pode se apresentar como uma escolha promissora, visto que gera a maior separação de fases, com o menor conteúdo de água na fase orgânica. Sua natureza menos polar, em comparação com ACN e IPA, pode ajudar na obtenção de extratos mais limpos. Além disso, THF é utilizado na cromatografia HILIC (cromatografia líquida com interações hidrofílicas) e LC-MS/MS em fase reversa como modificador de fase móvel, podendo ser explorado como solvente SALLE em conjunto com essas técnicas. (TANG; WENG, 2013).

1.6.2. Sais utilizados na SALLE

O sal utilizado é, provavelmente, o componente de maior importância no processo, visto que desempenha vários papéis: auxilia na precipitação de proteínas e outros componentes endógenos da matriz; promove a separação entre água e solvente orgânico; reduz a solubilidade dos analitos na fase aquosa e aumenta a solubilidade dos analitos na fase orgânica. Dessa forma, três importantes fatores deverão ser considerados para o sal: (i) a solubilidade no solvente orgânico miscível em água deve ser desprezível; (ii) a solubilidade em água deve ser alta e (iii) a série liotrópica (ou série de Hofmeister), que classifica íons e

cátions quanto a sua capacidade de provocar “salting-out” ou “salting-in” em proteínas, deverá ser considerada. Ao levar em conta esses três fatores, o sal de maior eficiência seria o sulfato de magnésio (MgSO_4), entretanto, a escolha e eficiência do sal pode variar de acordo com o analito de interesse, a matriz de análise, o solvente utilizado e a instrumentação da análise (TANG; WENG, 2013; ZHANG; XIONG, 2019).

No que diz respeito ao uso de sais para o processo SALLE na análise de amostras biológicas por técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas, sais compatíveis com análises de espectrometria de massas, conhecidos por “*MS-Friendly salts*”, como sais orgânicos de amônio, são preferíveis pois apresentam baixa volatilidade, sendo facilmente volatilizados e decompostos no processo de ionização, dessa forma não sendo introduzidos no analisador do sistema de espectrometria de massas (NEMEŠKALOVÁ et al., 2019). Sais de sódio, como o cloreto de sódio, devem ser evitados pois formam adutos de sódio indesejados no processo de ionização. Em contrapartida, o cloreto de sódio é uma ótima escolha como agente de salting-out nas análises por eletroforese capilar (CE), visto que já é utilizado em estratégias de pré-concentração por “*stacking*” (AHMED et al., 2020a).

A concentração do sal de escolha é, na maioria das vezes, utilizada próxima da saturação ou a uma concentração alta o suficiente para que, após adição de um volume específico de solução salina na amostra, a concentração final de sal no meio seja suficiente para promover clara separação das fases. Embora a adição de volume de solução salina à alta concentração promova melhor separação das fases, se uma pré-concentração dos analitos na porção orgânica é desejada, a concentração e proporção da solução salina e de amostra deve ser avaliada (ZHANG; XIONG, 2019). Além disso, a utilização de altas concentrações salinas pode introduzir resíduos salinos indesejados nos sistemas LC-MS/MS, dessa forma, a extração ideal deve utilizar a menor concentração em que haja separação adequada das fases, evitando a introdução de sal no sistema.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Desenvolver e validar o método SALLE/UHPLC-MS/MS para a determinação de AEA e 2-AG em amostras de encéfalos de encéfalo total, de hemisférios e estriados de ratos induzidos ao parkinsonismo.

2.2. Objetivos específicos

- Otimizar as variáveis da SALLE
- Validar o método SALLE/UHPLC-MS/MS segundo normas da ANVISA (RDC 166/2017).
- Determinar as concentrações de AEA e 2-AG em amostras de encéfalo total, de hemisférios e estriados de ratos parkinsonianos e ratos sadios do grupo controle.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes e padrões analíticos

Os padrões analíticos de AEA, 2-AG e seus respectivos deuterados, AEA d₄ e 2-AG d₅, foram adquiridos da Cayman Chemical (Michigan, USA). A partir desses, foram preparadas diferentes soluções padrão estoque (individuais) de AEA e 2-AG em acetonitrila com concentrações variadas. A solução do padrão interno, contendo AEA d₄ e 2-AG d₅, também foi preparada em acetonitrila numa concentração final de AEA d₄ igual a 15,0 ng mL⁻¹ e 2-AG d₅ 3,0 µg mL⁻¹. Todas estas soluções são armazenadas em frascos adequados e refrigeração a - 80 °C.

As fases móveis foram preparadas utilizando água purificada em sistema Milli-Q (Millipore, São Paulo, Brasil), acetonitrila (JT Baker, Phillipsburg, EUA), grau HPLC, e ácido fórmico (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). A fase móvel foi desgaseificada em banho de ultrassom por aproximadamente 20 min, antes do uso.

Os solventes orgânicos miscíveis em água avaliados no processo de extração SALLE foram definidos e adquiridos em grau de pureza HPLC. Da mesma forma, os sais utilizados foram definidos e adquiridos no maior grau de pureza disponível.

3.2. Animais

Esse projeto foi desenvolvido em parceria com a Prof. Dra. Elaine Aparecida Del Bel da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP-USP) e todos os cuidados e procedimentos com os animais foram realizados sob sua supervisão. Destaca-se ainda que todos os protocolos experimentais foram realizados de acordo com os regulamentos e cuidados na utilização de animais de laboratório, conforme a Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento, sendo aprovado pelo comitê de ética em uso de animais da FORP- USP (Anexo 1).

Ratos (n = 56) Wistar machos (250 gramas no início dos experimentos) cedidos pelo Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto foram utilizados nesse estudo. Os animais foram mantidos em grupos de 4 animais em caixa moradia com dimensões de 40x33x17cm, em ambiente com temperatura controlada (24 °C ± 1 °C) e ciclo claro-escuro de 12 horas, com água e comida ad libitum.

3.2.1. Lesão unilateral do estriado

Para a lesão da via nigro-estriatal os animais foram anestesiados com associação de ketamina e xilasina e posicionados no aparelho estereotático (David-Kopf, modelo USA, 957). Foi administrada uma única injeção de 6-OHDA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA);

na concentração de $8 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ em solução salina 0,9% (contendo 0,05% de ácido ascórbico) no feixe prosencefálico medial (FPM) direito (grupo 6-OHDA FPM) nas seguintes coordenadas: anteroposterior (AP): - 4,3 partindo do bregma; latero-lateral (LL): -1,6 da linha média e dorso-ventral (DV): - 8,3 a partir do crânio seguindo o atlas de Paxinos e Watson, 2006. A 6-OHDA foi injetada a uma velocidade de $1 \mu\text{L}/\text{min}$ e a cânula mantida imóvel por um tempo adicional de 3 min para evitar refluxo da droga. Ao final da cirurgia os animais receberam injeção intramuscular de pentabiótico veterinário (0,2 mL) para animais de pequeno porte (Forte Dodge Saúde Animal LTDA), sendo observados até recuperação da anestesia.

3.2.2. Coleta e transporte das amostras de encéfalo

Para coleta dos materiais biológicos os animais foram anestesiados com 2,2,2-Tribromoetanol (1 mL kg^{-1} , i.p) e sacrificados. Seguidamente, foram removidos o encéfalo e tronco cerebral dos mesmos, sendo imediatamente armazenados a uma temperatura de -80°C até processamento. As amostras foram transportadas entre os laboratórios da FORP-USP e do DQ/FFCLRP-USP em nitrogênio líquido para evitar descongelamento.

3.2.3. Delineamento clínico

Após validação do método SALLE-UHPLC-MS/MS, as seguintes amostras foram submetidas à análise para comparação dos níveis endógenos de AEA e 2-AG: (i) encéfalos totais de animais lesionados e animais saudáveis do grupo controle (ii) encéfalos de animais lesionados, dissecados em dois hemisférios, um lesionado e outro não lesionado e (iii) região do estriado dissecada de encéfalos de animais saudáveis e lesionados.

3.3. Condições cromatográficas

As condições cromatográficas utilizadas foram previamente otimizadas em outros trabalhos realizados pelo grupo. O sistema cromatográfico utilizado foi o Waters® UHPLC-MS/MS (Waters Corporation, Milford, MA, USA). A separação cromatográfica dos analitos foi realizada em fase reversa, com eluição no modo isocrático com a seguinte fase móvel: A) Solução aquosa de ácido fórmico (0,5%) e B) Acetonitrila (30:70 v/v), na vazão de $0,4 \text{ mL min}^{-1}$. A coluna analítica utilizada foi uma Kinetex C18 ($100 \text{ mm} \times 2,1 \text{ mm} \times 1,7 \mu\text{m}$) (Phenomenex®, EUA), a 40°C . Para as determinações quantitativas UHPLC-MS/MS adotou-se o uso de padrões internos, empregando padrões isotópicos (AEA d_4 e 2-AG d_5). No amostrador automático as amostras foram mantidas a 10°C antes da injeção, sendo em seguida, injetados $10 \mu\text{L}$.

As análises MS/MS foram realizadas em sistema de espectrometria de massas em tandem do tipo triplo quadrupolo Xevo® TQ-D (Waters, Milford, MA, USA). A ionização por

eletronebulização (ESI) foi usada no modo positivo e de monitoramento de reações múltiplas (MRM). Os seguintes parâmetros de operação foram utilizados: voltagem do capilar de 3,20 kV; temperatura da fonte a 150 °C; temperatura de dessolvatação de 350 °C e vazão do gás de dessolvatação igual a 700 L h⁻¹ (N₂ com 99,99% de grau de pureza). Argônio (pureza de 99,99%) foi utilizado como gás de colisão. A Tabela 3 apresenta os fragmentos, a energia do cone e energia de colisão para cada analito definida pelo software do equipamento (Intellistart Program). Todas as aquisições de dados foram feitas pelo software MassLynx V4.1.

Tabela 3. Transições iônicas e configurações instrumentais para os endocanabinóides e endocanabinóides deuterados (PI) analisados

Analito	Íon precursor (m/z)	Íon de quantificação (m/z)	Íon de confirmação (m/z)	Energia de colisão (eV)	Voltagem do cone (V)
AEA	348.35	61.82	90.82	18/50	14
AEA d ₄	352.41	65.92	47.84	18/34	26
2-AG	379.29	286.99	90.82	14/44	24
2-AG d ₅	384.35	90.82	286.98	16/52	28

3.4. Homogeneização das amostras de encéfalos

Anteriormente à extração SALLE, as amostras de encéfalos foram submetidas a um processo de homogeneização a fim de se obter um homogenato líquido livre de partículas sólidas. Para esse procedimento, foram avaliados como solventes homogeneizadores acetonitrila e uma solução de ácido fórmico 0,100 mol L⁻¹, ambos a uma proporção de 4,5 µL por 1 mg de tecido. Os homogenatos foram obtidos com auxílio de um homogeneizador POLYTRON® system PT 2100 homogenizer (Kinematica AG, Lucerne, Switzerland). A seleção do melhor solvente homogeneizador se deu por meio da avaliação qualitativa dos homogenatos resultantes e pela área absoluta dos analitos AEA e 2-AG, após análise.

3.5. Otimização das variáveis SALLE

O processo de otimização do método de extração SALLE para os analitos AEA e 2-AG foi realizado por meio da análise de amostras “branco” de encéfalo, ou seja, sem que houvesse a necessidade de enriquecimento das mesmas com padrões dos analitos, dadas suas elevadas concentrações endógenas. Essas amostras biológicas foram submetidas ao processo de SALLE utilizando-se diferentes condições a fim de se avaliar as condições onde se há

máxima extração dos analitos.

Os parâmetros avaliados do processo de extração foram o tipo de solvente orgânico miscível com água (ACN, IPA e THF); o volume necessário desse solvente (100, 150, 200, 300 e 400 μL); o volume de homogenato de encéfalo (50, 100, 150, 200, ou 250 μL); o tipo de sal como agente de *salting-out* (formiato e acetato de amônio), a concentração final desse sal (1,00, 2,00, 3,00, 4,00 e 5,00 mol L^{-1}), o volume de solução salina adicionada (50, 75, 100, ou 125 μL) e a temperatura de centrifugação (-5,0, 0,0, 5,0, ou 10,0 $^{\circ}\text{C}$). O processo de otimização foi realizado por meio de análise univariada, alternando um parâmetro de extração por vez, fixando os valores dos demais parâmetros. A escolha das melhores condições se deu por meio de testes qualitativos e da análise das áreas absolutas dos picos cromatográficos.

3.6. Validação Analítica

A validação do método analítico foi realizada com amostras de encéfalos previamente homogeneizadas e enriquecidas com a solução do PI e com as soluções dos endocanabinóides em diferentes concentrações, segundo critérios estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, RESOLUÇÃO RDC Nº 166, DE 24 de julho de 2017) (“Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, in RDC No 166 , 24 Julho 2017”, 2017). Os parâmetros de validação analítica analisados foram os seguintes: limite de quantificação, linearidade, precisão, exatidão, efeito de matriz.

3.6.1. Linearidade

Para a avaliação da linearidade do método, alíquotas de homogenato (150 μL) foram enriquecidas com as soluções do padrão interno (5,00 ng mL^{-1} para AEA d₄ e 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para 2-AG d₅) e concentrações crescentes dos padrões dos endocanabinóides, numa faixa de concentração de 2,00 a 20,00 ng mL^{-1} para AEA e 0,300 a 10,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para 2-AG. Essas fixas de concentração foram definidas com base nos valores endógenos normalmente encontrados nas amostras de encéfalos de roedores (BUCZYNSKI; PARSONS, 2010).

Analisou-se, primeiramente, amostras branco de encéfalo (sem enriquecimento com padrões AEA e 2-AG, somente PI), obtendo-se uma razão entre as áreas dos analitos e dos padrões internos. Para a construção da curva, essa razão da amostra branco, foi subtraída da razão entre as áreas dos analitos e padrões internos das amostras enriquecidas. Três curvas analíticas foram traçadas por meio da regressão linear da razão da área do pico dos analitos pela área do pico dos padrões internos (Y) (já subtraída a razão da amostra branco) em função das concentrações nominais dos endocanabinóides (X).

Para o uso dessas curvas em determinações quantitativas foi calculado o coeficiente de

variação (CV) para cada ponto, devendo ser menor que 20 % para o ponto referente à concentração nominal do limite inferior de quantificação (LIQ) e menor que 15 % para os demais pontos. Além disso, por meio do software Origin (OriginLab, Northampton, Massachusetts, USA), determinou-se a falta de ajuste (Lack-of-Fit), que visa avaliar a presença de valores anormais nos resíduos e verificar o ajuste do método, onde este valor deve ser maior que 0,05 para que se possa afirmar, com 95 % de confiança, que não há falta de ajuste no modelo, possibilitando seu uso (RAMSEY, F.L., SCHAFER, 1997).

3.6.2. Precisão e exatidão

A exatidão e a precisão intra-ensaio (análises realizadas em um mesmo dia) e inter-ensaios (análises realizadas em dias diferentes) foram avaliadas em quintuplicata ($n = 5$), com amostras de encéfalos homogeneizadas e enriquecidas com PI e padrões dos analitos em cinco concentrações diferentes:

- Limite Inferior de Quantificação (LIQ) = 2,00 ng mL⁻¹ para AEA e 0,300 µg mL⁻¹ para 2-AG;
- Controle de Qualidade Baixo (CQB) = 6,00 ng mL⁻¹ para AEA e 0,900 µg mL⁻¹ para 2-AG;
- Controle de Qualidade Médio (CQM) = 10,00 ng mL⁻¹ para AEA e 4,00 µg mL⁻¹ para 2-AG;
- Controle de Qualidade Alto (CQA) = 14,00 ng mL⁻¹ para AEA e 7,00 µg mL⁻¹ para 2-AG;
- Limite Superior de Quantificação (LSQ) = 20,00 ng mL⁻¹ para AEA e 10,00 µg mL⁻¹ para 2-AG.

Para determinar a precisão calculou-se o coeficiente de variação (CV, Equação 1) e para a exatidão calculou-se o erro padrão relativo (EPR, Equação 2). Ambos valores devem ser menores ou iguais a ± 20 % para LIQ e ± 15 % para os demais pontos.

$$CV = \left(\frac{\text{Desvio padrão}}{\text{Concentração média experimental}} \right) * 100 \% \quad \text{Equação 1}$$

$$EPR = \left(\frac{\text{Conc.média experimental} - \text{valor nominal}}{\text{valor nominal}} \right) * 100 \% \quad \text{Equação 2}$$

3.6.3. Efeito Residual

O efeito residual foi avaliado por meio da comparação das áreas dos picos cromatográficos das amostras de encéfalos analisadas sem adição de padrão dos endocanabinóides (concentrações endógenas) antes e depois da injeção de uma amostra enriquecida na concentração do LSQ. As áreas dos analitos antes e depois da injeção da amostra enriquecida não devem variar mais que 20% para os analitos e mais que 5% para o padrão interno.

3.6.4. Efeito da matriz biológica

Para avaliação do efeito da matriz biológica no método SALLE-UHPLC-MS/MS foram analisadas diferentes amostras de encéfalos homogeneizadas e enriquecidas com os analitos nas concentrações correspondentes ao CQB e CQA e soluções aquosas nessas mesmas concentrações. Com os resultados calculou-se o fator de matriz normalizado (FMN, Equação 3). Os valores dos coeficientes de variação (CV) dos FMNs devem ser inferiores a 15% para que se possa afirmar que não há efeito significativo da matriz.

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

3.7. Análise das amostras

Após otimização e validação do método SALLE, as amostras do delineamento clínico foram analisadas. Para isso, amostras de encéfalo foram submetidas à homogeneização com auxílio de um homogeneizador POLYTRON® system PT 2100 homogenizer (Kinematica AG, Lucerne, Switzerland) utilizando-se solução de ácido fórmico 0,100 mol L⁻¹ como solução homogeneizadora em uma proporção de 4,5 µL para cada 1 mg de encéfalo. As massas de encéfalo total foram previamente pesadas, seccionadas em porções menores e transferidas para o homogeneizador, adicionando solução de ácido fórmico em proporção adequada. Estas foram processadas até obtenção de solução homogênea livre de partículas sólidas visíveis.

Para o processo de SALLE otimizado, em um tubo Eppendorf de 2,0 mL, adiciona-se 150 µL do homogenato resultante juntamente de 150 µL de acetonitrila, agitando-se por 30s a 3000 rpm com auxílio de um vortex (Fisher Scientific®). Em seguida adiciona-se ao mesmo tubo 100 µL de solução salina de formiato de amônio 5,0 mol L⁻¹, agitando-se novamente por 30s a 3000 rpm. A mistura resultante foi centrifugada por 15 minutos a 9000 rpm numa temperatura de 5,0 °C para precipitação das proteínas e separação das fases. A fase orgânica

superior foi então coletada (50 µL), seca em Concentrator plus (Eppendorf®, Hamburg, Germany) por 40 minutos e reconstituída em 50 µL de fase móvel (água:acetonitrila, 30:70 v/v) para injeção no sistema UHPLC-MS/MS.

3.8. Tratamento estatístico

As análises estatísticas dos conjuntos de dados de concentrações de AEA e 2-AG, obtidos após análise das amostras do delineamento clínico, foram realizadas com auxílio do software Prism 8 (GraphPad Software).

Para averiguar se houve diferença estatística entre as concentrações na análise das amostras de (i) encéfalo total de animais saudáveis e animais lesionados por 6-OHDA e (ii) encéfalos de animais lesionados por 6-OHDA, dissecados em dois hemisférios, um lesionado e outro não lesionado, fez-se uso do teste t de Student não pareado com nível de confiança de 95 %.

Para comparação das concentrações entre as amostras de estriados de animais saudáveis e os estriados dos hemisférios lesionados e não lesionados dos animais tratados com 6-OHDA, realizou-se análise de variância para um fator (One way ANOVA) seguida de teste de Tuckey, sendo consideradas significativas as diferenças em que $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Homogeneização das amostras de encéfalo

Por se tratarem de amostras sólidas, as análises de tecidos biológicos requerem um preparo de amostra, de modo a possibilitar sua compatibilidade com sistemas de cromatografia líquida. Previamente à extração SALLE as amostras de encéfalos foram submetidas a um processo de homogeneização com auxílio de um homogeneizador, fazendo uso de um solvente, de modo a se obter uma solução homogênea livre de material sólido.

Baseando-se em trabalhos publicados, que fazem uso de solventes orgânicos para homogeneização de encéfalos e posterior análise de ECs (BYSTROWSKA et al., 2014; JI; JANG; LEE, 2014; QI et al., 2015), e no protocolo desenvolvido por Bindila e Lutz, que faz uso de uma solução aquosa acidificada (BINDILA; LUTZ, 2016), acetonitrila e uma solução 0,100 mol L⁻¹ de ácido fórmico foram testados como solventes no processo de homogeneização.

Dois encéfalos inteiros foram pesados, em balança analítica, apresentando massas de 475,6 mg e 413,8 mg. Ambos foram seccionados em porções menores e transferidos individualmente para o homogeneizador. Adicionou-se a um deles solução de ácido fórmico 0,100 mol L⁻¹, numa proporção de 4,5 µL de solução para cada mg de tecido, e ao outro acetonitrila em igual proporção. No encéfalo ao qual se adicionou acetonitrila observou-se precipitação de grande quantidade de proteínas e um sobrenadante translúcido, já ao encéfalo onde foi adicionado ácido fórmico observou-se a formação de um homogenato de coloração bege, sem a presença de partículas sólidas ou precipitado.

Após o processo de homogeneização, tomou-se alíquotas (quintuplicatas) de ambos os homogenatos formados, submetendo-as ao processo de SALLE, adaptado de Xiong et al (XIONG et al., 2015), e posterior análise no sistema UHPLC-MS/MS. Avaliou-se a eficiência do processo de homogeneização através das áreas absolutas médias dos picos cromatográficos para os analitos AEA, Figura 5a e 2-AG, Figura 5b.

Figura 5. Avaliação dos solventes acetonitrila e solução de ácido fórmico ($0,100 \text{ mol L}^{-1}$) na homogeneização de amostras de encéfalos para análise de AEA (a) e 2-AG (b)

Fonte: próprio autor. Gráficos obtidos pelo software Origin® (OriginLab, USA)

Como se observa, no caso da AEA, há um pequeno aumento na área média do pico cromatográfico, embora não tão significativo, já para o 2-AG esse aumento na área é muito mais pronunciado e aparente. O aumento das áreas dos picos de ambos os analitos utilizando-se ácido fórmico demonstra uma melhor eficiência desse solvente no processo de homogeneização, o que também é comprovado qualitativamente já que este resulta numa solução homogênea e livre de partículas sólidas, diferente do que acontece ao se utilizar acetonitrila como solvente, onde ocorre formação de grande volume de precipitado, o qual pode carregar os analitos.

Dessa forma, estabeleceu-se a solução de ácido fórmico $0,100 \text{ mol L}^{-1}$ como solvente homogeneizador. Os trabalhos publicados na literatura não especificam uma relação clara entre o volume de solvente utilizado no processo de homogeneização e a massa de encéfalo, dessa forma, utilizou-se a princípio a proporção arbitrária de $4,5 \mu\text{L}$ de solvente para cada 1 mg de tecido. Como essa proporção se demonstrou suficiente para gerar uma solução homogênea e os valores de área obtidos são suficientes para posterior quantificação dos analitos, não foram realizados novos testes de proporção entre volume de solvente e massa de encéfalo para evitar o consumo de amostra e o sacrifício desnecessário de animais.

4.1.1. Estabilidade dos analitos no homogenato

Para se avaliar a estabilidade dos analitos AEA e 2-AG no homogenato de encéfalo gerado, após armazenamento a -80°C e ciclos de congelamento e descongelamento, alíquotas de homogenato ($n = 4$) foram analisadas logo após o processo de homogeneização da amostra de encéfalo, sendo a solução homogênea resultante armazenada logo em seguida a -80°C por um período de 24h. Após esse período, o homogenato foi descongelado e novas alíquotas foram analisadas, repetindo-se o processo após um novo período de 24h de armazenamento. A Tabela 4 apresenta os valores de área para ambos os analitos e o coeficiente de variação (CV) dessas áreas ao longo dos três dias de ensaio.

Tabela 4. Valores de área dos analitos AEA e 2AG para avaliação de estabilidade no homogenato

	Medida	AEA	2AG
Dia 1	1	2145	87534
	2	2036	84297
	3	1869	84301
	4	2042	82487
Dia 2	1	2267	77940
	2	2271	86397
	3	2111	81608
	4	2369	84569
Dia 3	1	2143	64162
	2	2039	74346
	3	2053	73363
	4	1976	73191
Média		2082	82047,5
Desvio		139,60	6999,74
CV		6,70 %	8,53 %

Quanto à AEA, não se verifica grande variação nos valores de área, apresentando um coeficiente de variação de 6,70 % que diz respeito somente a variações entre as medidas durante o preparo da amostra, não havendo diminuição significativa dos valores de área entre os três dias de análise, indicando estabilidade do analito nesse período. Já para o 2-AG, o qual apresentou coeficiente de variação de 8,53% no período de três dias, nota-se uma ligeira diminuição da área confrontando os valores obtidos nos dois primeiros dias de análise com os valores obtidos no terceiro. Uma possível explicação para essas observações seria o fato de a AEA ser quimicamente estável em solventes orgânicos e em meio aquoso, ao passo que o 2-AG está propenso a sofrer isomerização em meio aquoso pela migração do grupamento acila

da posição 2 para a posição 1, dando origem ao isômero 1-araquidonoil-sn-glicerol (1-AG) (DÓCS et al., 2017). Esse processo de isomerização é favorecido por altas temperaturas, a presença de albumina sérica e altos valores de pH (ZOERNER et al., 2012). Como a homogeneização é feita em solução aquosa ácida, o processo de isomerização é desfavorecido, mas ainda ocorre em certa proporção, um dos possíveis fatores que poderiam explicar a diminuição dos valores de área.

Após uma semana de armazenamento do homogenato à temperatura de -80°C , novas alíquotas ($n = 4$) foram analisadas, onde foi verificado a degradação de ambos os analitos. A Figura 6 apresenta o cromatograma de íons totais (TIC) para AEA e 2-AG de uma alíquota analisada no dia do preparo de amostra, podendo se observar o sinal analítico para ambos os analitos. A Figura 7 apresenta o TIC para AEA e 2-AG de uma das alíquotas analisadas após sete dias de armazenamento do homogenato, onde se verifica a ausência dos sinais analíticos desses compostos, indicando a degradação dos mesmos.

Figura 6. Cromatograma de íons totais para os analitos AEA e 2-AG, após análise no dia de preparo do homogenato

Figura 7. Cromatograma de íons totais para os analitos AEA e 2-AG, após análise de homogenato armazenado por sete dias

Verificou-se pelos resultados obtidos que os analitos não apresentam estabilidade no homogenato gerado em longo período de tempo (uma semana ou mais) e submetido a ciclos de congelamento e descongelamento, dessa forma, as análises dos ECs devem ser preferencialmente realizadas logo após a homogeneização das amostras de encéfalos.

4.2. Otimização das variáveis SALLE

Para garantir máxima eficiência de extração dos analitos AEA e 2-AG na etapa de preparo da amostra, realizou-se um processo de otimização a fim de se investigar as melhores condições de operação do processo de SALLE, conforme descrito na seção de materiais e métodos.

4.2.1. Seleção do solvente orgânico e agente de *salting-out* (sal)

Os solventes mais eficientes e comumente utilizados para extrações líquido-líquido por *salting-out* são acetonitrila (ACN), isopropanol (ou outros álcoois) e tetrahidrofurano (THF). Dessa forma, os solventes orgânicos miscíveis com água avaliados foram ACN, THF e metanol (MeOH). Para a análise de analitos presentes em amostras biológicas por LC-MS/MS tem-se a preferência do uso de sais orgânicos, especialmente aqueles a base de amônio, dada a maior compatibilidade destes com a espectrometria de massas (WU et al., 2008; YANES; LOVETT, 2012; ZHANG; MYASEIN; RODILA, 2009). Sendo assim, foram testados os sais formiato de amônio e acetato de amônio, ambos em soluções próxima à condição de saturação (5 mol L⁻¹).

A avaliação dos solventes e sais baseou-se em testes qualitativos, no qual se examinou a precipitação de proteínas, a separação das fases e a presença ou não de sal na fase orgânica. Para tal, o processo de SALLE foi realizado utilizando-se uma proporção de 2:4:1 (v/v/v) dos volumes de homogenato de encéfalo/solvente orgânico/solução salina, baseando-se no trabalho publicado por Xiong et al (XIONG et al., 2015), combinando-se os diferentes sais e solventes utilizados. Após centrifugação, tomou-se respostas qualitativas através do aspecto visual do sistema. A Tabela 5 apresenta os diferentes experimentos realizados e as respectivas observações qualitativas.

Tabela 5. Experimentos qualitativos para definição do solvente orgânico e do agente de *salting-out* para o processo de SALLE

Solvente orgânico	Solução salina	Precipitação de proteínas	Separação das fases	Resíduo de sal na fase orgânica
ACN	Formiato de amônio	Sim	Boa separação	Pouco ou ausente
	Acetato de amônio	Sim	Boa separação	Pouco
THF	Formiato de amônio	Sim	Pouca separação	Grande quantidade
	Acetato de amônio	Sim	Pouca separação	Grande quantidade
MeOH	Formiato de amônio	Sim	Sem separação	-
	Acetato de amônio	Sim	Sem separação	-

Como se verifica pela tabela, houve precipitação de proteínas em quantidades relativamente iguais para todas as combinações de solventes orgânicos e sais testados. Verificou-se a formação de um sistema bifásico ao se utilizar os solventes ACN e THF em combinação com ambos os sais testados, o que não ocorreu em ambas as combinações de sais com MeOH, provavelmente devido ao fato das fortes interações intermoleculares entre as moléculas do solvente com as moléculas de água por ligações de hidrogênio (TABATA; KUMAMOTO; NISHIMOTO, 1994). Constatou-se, ainda, uma melhor separação, ou seja, maior volume de fase orgânica ao se utilizar ACN como solvente orgânico.

Embora a adição do agente de salting-out promova a separação das fases, uma porção de água ainda se faz presente na fase orgânica, isso, aliado à baixa, mas existente solubilidade dos sais nos solventes orgânicos, acaba por acarretar na presença de uma pequena concentração destes nas fases orgânicas. Ao se coletar a fase orgânica superior após centrifugação e secá-la em sistema concentrator plus (Eppendorf®) pode-se verificar a precipitação desses sais, o que ocorreu de forma significativa ao se empregar THF e ambos os sais de amônio. Já ao se utilizar ACN, verificou-se pouca, mas significativa presença de cristais de sal de acetato de amônio após secagem, o que ocorreu numa porção muito menor e menos recorrente ao se empregar o sal de formiato de amônio.

Levando em consideração todos os aspectos qualitativos julgados, optou-se por utilizar o solvente acetonitrila juntamente do sal formiato de amônio, visto que esta combinação apresentou boa separação de fases, com volume expressivo de fase orgânica, o que facilita a coleta da fase superior. Além disso, visando evitar a inserção de sal no sistema cromatográfico, o qual poderia gerar a supressão da ionização dos analitos no espectrômetro de massas ou ainda provocar entupimento ou danos ao sistema, optou-se pelo uso do formiato de amônio, por apresentar menor resíduo de sal na fase orgânica.

4.2.2. Volume de homogenato

Após a definição do solvente orgânico e do sal a ser utilizado, foram realizados testes variando-se o volume de homogenato a fim de se verificar o volume onde se obtém os maiores valores de área dos picos cromatográficos. Os volumes estudados variaram de 50 a 250 μL . Para realização do teste, efetuou-se o processo SALLE com os diferentes volumes de amostra, fixando as demais variáveis (400 μL de solvente acetonitrila, 100 μL de solução salina 5,0 mol L^{-1} , temperatura de centrifugação de 5 $^{\circ}\text{C}$), tomando, após centrifugação e separação das fases, o maior volume possível de fase orgânica, o qual foi seco, reconstituído em fase móvel e injetado no sistema cromatográfico. As análises para cada valor de volume

foram realizadas em quintuplicata ($n = 5$).

A Figura 8 apresenta um gráfico de barras com os valores médios de área absoluta para cada um dos analitos estudados e as respectivas barras de erro nos diferentes volumes avaliados. Verifica-se que os volumes de 50 μL e 100 μL apresentaram valores de área significativamente mais baixos em comparação aos outros três volumes explorados, sobretudo para o analito 2-AG. Comparando os três maiores volumes estudados, 150 μL , 200 μL e 250 μL , não se observa uma variação tão significativa, entretanto, o volume de 150 μL apresentou valor de área ligeiramente maior para 2-AG, além de um menor desvio para ambos os analitos.

Ao contrário do que se espera, os maiores volumes considerados não apresentaram os maiores valores de área, o que se deve ao fato das interações com as demais variáveis no processo de *salting-out*, sobretudo o volume de acetonitrila utilizado (400 μL), que acaba por gerar uma separação de fases mais pobre. Nos dois menores volumes avaliados verificou-se uma separação de fases baixa, dada a inadequada proporção volume de amostra/volume de acetonitrila, já nos três volumes de amostra maiores, verificou-se boa separação das fases, sobretudo para o volume de amostra de 150 μL , o que se reflete nos valores de área obtidos. Sendo assim, definiu-se o volume de homogenato de 150 μL para os próximos experimentos.

Figura 8. Valores médios ($n = 5$) de área para os analitos AEA e 2-AG variando-se o volume de amostra no processo SALLE

Fonte: próprio autor. Obtido pelo software Origin® (OriginLab)

4.2.3. Volume de solvente orgânico

Na extração líquido-líquido assistida por salting-out o solvente orgânico miscível com água utilizado apresenta função dupla: precipitar proteínas da matriz biológica e extrair os analitos de interesse após a separação das fases, podendo, ainda, concentrar os analitos na fase orgânica dependendo do volume da mesma. Assim, após definição do volume de amostra, avaliou-se diferentes volumes de acetonitrila, verificando a precipitação das proteínas, a separação das fases e o volume de fase orgânica.

Foram testados os volumes entre 100 e 400 μL . As demais variáveis foram fixadas (150 μL de amostra, 100 μL de solução de formiato de amônio $5,0 \text{ mol L}^{-1}$ e temperatura de centrifugação de $5,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$). Após centrifugação e separação das fases, coletou-se o maior volume possível de fase orgânica para a análise dos ECs no sistema cromatográfico. A Figura 9 ilustra os valores de área obtidos para ambos analitos variando-se o volume de acetonitrila.

Figura 9. Valores médios ($n = 5$) de área para os analitos AEA e 2-AG variando-se o volume de acetonitrila no processo SALLE

Fonte: próprio autor. Obtido pelo software Origin® (OriginLab)

Pôde-se verificar precipitação de proteínas em todos os volumes testados de acetonitrila, entretanto ao se utilizar o volume de 100 μL não houve separação adequada das

fases, impossibilitando a coleta e posterior análise. Para os demais volumes de acetonitrila houve formação do sistema bifásico, gerando-se volumes crescentes de porção orgânica alinhado ao aumento de acetonitrila utilizado.

Embora o uso de volumes maiores de ACN acarretem num aumento do volume da fase orgânica na separação, não há, necessariamente, maior extração dos analitos da porção aquosa para a porção orgânica, o que fica evidenciado pela Figura 6, onde pode-se notar maior valor médio de área para o analito 2-AG ao se empregar 150 μL de solvente orgânico. Quanto ao analito AEA, não houve diferenças significativas entre os volumes empregados.

Dessa forma, definiu-se o uso de 150 μL de acetonitrila no processo de extração, ficando estabelecida uma relação de 1:1 (v/v) entre os volumes de homogenato/solvente orgânico.

4.2.4. Volume de solução salina

Uma pequena porção de solução salina de formiato de amônio é adicionada à mistura de homogenato/acetonitrila para que haja a separação de fases entre os solventes que, em condições normais, são miscíveis em todas as proporções. Dessa forma, após a definição do volume de amostra e volume de solvente acetonitrila, investigou-se a influência do volume de solução salina na separação das fases e extração dos analitos para a porção orgânica.

Foram considerados os volumes de 50 μL , 75 μL , 100 μL , 125 μL . Diferente das variações observadas anteriormente, verificou-se uma relação muito mais direta na porção de solução salina adicionada ao sistema e a separação das fases, sendo observada separação apenas ao se utilizar os volumes de 100 μL e 125 μL . A separação de fases ocorre devido ao aumento da força iônica do meio, provocada pela adição do sal. Esse aumento faz com que as moléculas de água passem a solvatar os íons provenientes do sal, o que acaba por reduzir o número de moléculas de água disponíveis para interagir, por meio de forças intermoleculares, com as moléculas de solvente, resultando em um sistema bifásico. Assim, pode-se inferir que os volumes de 50 μL e 75 μL não foram suficientes para fornecer a força iônica necessária para a separação das fases.

A Figura 10 apresenta os valores de área para AEA e 2-AG ao se empregar os volumes de 100 e 125 μL de solução salina no processo SALLE. Fica bem evidenciado que o volume de 100 μL propiciou os maiores valores de área para ambos os analitos, sendo definido como volume ótimo de solução salina.

Figura 10. Valores médios ($n = 5$) de área para os analitos AEA e 2-AG variando-se o volume de solução salina no processo SALLE

Fonte: próprio autor. Obtido pelo software Origin® (OriginLab)

4.2.5. Concentração da solução salina

A concentração da solução salina utilizada no processo de salting-out é, provavelmente, o fator mais importante, já que ao se adicionar um volume dessa solução ao sistema (100 µL, conforme otimizado previamente) as concentrações dos íons provenientes do sal devem ser suficientes para gerar uma força iônica adequada para que ocorra a separação das fases pela redução das interações intermoleculares entre a água e o solvente orgânico. Comumente o que se encontra na literatura são trabalhos que fazem uso de concentrações salinas elevadas (MYASEIN et al., 2009; TANG; WENG, 2013; VALENTE; GONÇALVES; RODRIGUES, 2013; XIONG et al., 2015), próximas da saturação, visto que se faz necessário uma força iônica elevada para garantir que a maior parte das moléculas de água estejam ocupadas na formação das esferas de solvatação dos íons advindos do sal.

Uma concentração próxima da saturação, igual a $5,0 \text{ mol L}^{-1}$, de formiato de amônio

foi utilizada nos testes anteriores. Após a definição do volume dessa solução na SALLE, buscou-se investigar se concentrações menores ainda promoveriam a separação das fases, visto que concentrações reduzidas teriam como vantagem a presença de uma menor concentração residual de sal na fase orgânica, introduzindo menor quantidade de sal no sistema cromatográfico. Avaliou-se então as concentrações entre 1,0 e 5,0 mol L⁻¹ de solução de formiato de amônio.

Concentrações inferiores a 4,0 mol L⁻¹ sequer apresentaram separação das fases, o que pode ser entendido como a ausência de íons em quantidade suficiente para promover uma força iônica adequada para que ocorresse a formação do sistema bifásico, conforme já discutido. A concentração de 4,0 mol L⁻¹ é onde se tem o início da separação de fases, entretanto, o volume de fase orgânica separado foi pequeno, impossibilitando a coleta adequada. Dessa forma, constatou-se que dentre as concentrações avaliadas, somente a de 5,0 mol L⁻¹ foi capaz de gerar uma força iônica adequada no sistema para propiciar a separação das fases, sendo definida como concentração ótima.

4.2.6. Temperatura de centrifugação

Nos processos de extração líquido-líquido, seja o processo convencional, ou suas variáveis, como a SALLE, sabe-se que a solubilidade e separação dos componentes entre as duas fases dependem primariamente do equilíbrio de partição termodinâmico desses componentes entre as duas fases líquidas (ROBBINS; PH; COMPANY, 1999). Assim como todo equilíbrio químico o equilíbrio de partição apresenta dependência da temperatura (ATKINS; DE PAULA, 2006), dessa forma, é lógico esperar que a temperatura de centrifugação deva influenciar na separação das fases e na partição dos analitos AEA e 2-AG entre as fases aquosa e orgânica.

As temperaturas avaliadas variaram entre -5 °C e 10 °C. O processo de SALLE foi realizado utilizando-se as variáveis previamente otimizadas. Após a adição de acetonitrila e solução de formiato de amônio à amostra, os tubos Eppendorf foram levados para centrifugação em centrífuga com controle de temperatura por 15 minutos a 9000 RPM, coletando em seguida 50 µL de fase orgânica, secando e ressuspensando o extrato em fase móvel para injeção no sistema cromatográfico. A Figura 11 apresenta os valores médios de área dos picos cromatográficos de AEA e 2-AG nas diferentes temperaturas de centrifugação avaliadas.

Pelo gráfico de barras fica evidente que a temperatura de centrifugação em que houve maiores valores de área, definida como temperatura ótima, foi a temperatura de 5 °C,

sobretudo para o analito 2-AG. Não houve diferença tão significativa ao se comparar as áreas medias para AEA. Não se pode afirmar muito entre a relação da temperatura e o equilíbrio de partição dos analitos nas duas fases líquidas, entretanto, observa-se uma provável tendência ao favorecimento da partição destes analitos em temperaturas mais baixas até certo ponto.

Figura 11. Valores médios (n = 5) de área para os analitos AEA e 2-AG variando-se a temperatura de centrifugação no processo SALLE

Fonte: próprio autor. Obtido pelo software Origin® (OriginLab)

4.3. Validação Analítica

Quantificações dos endocanabinóides AEA e 2-AG em amostras de encéfalos de roedores têm demonstrado a presença desses ECs em concentrações significativas e elevadas em comparação as concentrações destes em fluídos biológicos, como plasma ou líquido cefalorraquidiano, sendo da ordem de ng mL^{-1} para AEA e $\mu\text{g mL}^{-1}$ para 2-AG (BUCZYNSKI; PARSONS, 2010). Sendo assim, a obtenção de uma matriz totalmente isenta dos analitos é impossível, além disso, dada a complexidade dessa matriz, o uso de uma matriz substituta também seria inviável.

A princípio, pensou-se na realização do processo de validação analítica pelo método de adição de padrão, entretanto, esse método faz uso de grandes volumes de amostra, dado que, há a necessidade da construção de uma curva para cada amostra analisada, o que seria também, inviável, visto que testes clínicos seriam posteriormente realizados e a quantidade de

amostra seria limitada. Por fim, optou-se por realizar a construção das curvas analíticas pelo enriquecimento das amostras de homogenato, descontando-se posteriormente os valores de razão analito/PI referentes à análise de amostra branco (sem enriquecimento).

4.3.1. Linearidade

Foram construídas três curvas analíticas adicionando-se as concentrações dos padrões AEA e 2-AG, além de PI, nas concentrações especificadas na metodologia. As Figuras 12 e 13 apresentam as curvas analíticas médias obtidas, respectivamente, para os analitos AEA e 2-AG. As faixas de linearidade das curvas foram definidas com base nas concentrações endógenas dos analitos em amostras de encéfalo, entretanto, o método apresenta sensibilidade adequada para que valores menores de LIQ fossem obtidos.

Figura 12. Curva analítica média para quantificação de AEA pelo método SALLE-UHPLC-MS/MS

Fonte: próprio autor. Obtido pelo software Origin® (OriginLab). *Intercept: coeficiente linear; Slope: coeficiente angular; Person's r: coeficiente de correlação de Pearson (r)

Figura 13. Curva analítica média para quantificação de 2-AG pelo método SALLE-UHPLC-MS/MS

Fonte: próprio autor. Obtido pelo software Origin® (OriginLab). *Intercept: coeficiente linear; Slope: coeficiente angular; Person's r: coeficiente de correlação de Pearson (r)

O método desenvolvido apresentou LIQ igual a $2,00 \text{ ng mL}^{-1}$ e linearidade em uma faixa de concentração entre $2,00$ a $20,00 \text{ ng mL}^{-1}$ para AEA e um LIQ igual a $0,30 \text{ µg mL}^{-1}$ e linearidade entre $0,30 \text{ µg mL}^{-1}$ até 10 µg mL^{-1} para 2-AG. Os coeficientes de determinação, R^2 , foram iguais a 0,9962 e 0,9960 para AEA e 2-AG respectivamente, indicando boa linearidade das curvas.

O CV de cada ponto em relação à concentração nominal não foi superior que 20 % no LIQ e nem maior que 15 % nos demais pontos. Também foi realizado o teste de Lack-of-fit para verificar o ajuste do modelo, obtendo um valor de p igual a 0,7060 para a curva de AEA e igual a 0,1236 para a curva de 2-AG. Como esses valores de p foram superiores a 0,05, pode-se afirmar, com 95 % de confiança, que não há falta de ajuste nos modelos.

4.3.2. Precisão e exatidão

A Tabela 6 apresenta os valores obtidos de precisão e exatidão inter-ensaio e intra-ensaio para os analitos AEA e 2-AG.

Para AEA verifica-se uma variação de 3,5 % a 11,4 % nos valores de CV para a precisão inter-ensaio e de 1,2 % a 11,1 % nos valores de precisão intra-ensaio. Para exatidão, foi observado variação nas faixas de - 2,6 % a 10,0 % e - 0,5% a 9,8% nos valores de EPR para os testes inter-ensaio e intra-ensaio respectivamente.

Quanto ao 2-AG, os valores de CV na precisão inter-ensaio variaram entre 2,0 % a 10,6% e os de precisão intra-ensaio entre 1,1 % e 8,1 %. Para precisão, foi observada faixa de variação de EPR inter-ensaio de - 1,7 % a 3,8% e intra-ensaio de - 4,0 a 3,0%.

Todos esses valores encontram-se dentro do que se estabelece o guia de validação da ANVISA, o que permite afirmar que o método é preciso e exato.

Tabela 6. Valores de CV e EPR para avaliação da precisão e exatidão, respectivamente, do método SALLE-UHPLC-MS/MS na determinação de AEA e 2-AG

Analito	Concentração do calibrador (ng mL ⁻¹ para AEA e µg mL ⁻¹ para 2-AG)	Precisão (CV, %)		Exatidão (EPR, %)	
		Interensaio	Intraensaio	Interensaio	Intraensaio
AEA	LIQ – 2,00	11,4	11,1	10,0	9,8
	CQB – 6,00	9,5	2,7	7,8	9,7
	CQM – 10,00	7,8	4,2	9,7	4,7
	CQA – 14,00	4,3	1,2	0,3	3,2
	LSQ – 20,00	3,5	1,5	- 2,6	- 0,5
2-AG	LIQ – 0,300	10,6	5,5	3,8	- 1,4
	CQB – 0,900	5,3	8,1	- 1,7	- 4,0
	CQM – 4,00	1,9	1,2	3,5	3,0
	CQA – 7,00	2,8	1,9	4,2	1,8
	LSQ – 10,00	2,0	1,1	- 1,3	- 0,5

4.3.3. Efeito matriz

O teste de efeito matriz é realizado para avaliar se há interferência dos componentes endógenos contidos na matriz biológica de determinação dos ECs. Este foi realizado pela análise de diferentes amostras de encéfalo de animais distintos, calculando o fator de matriz normalizada (FMN) para os calibradores CQB e CQA.

Observou-se coeficiente e variação dos FMNs igual a 3,3 % para o CQB e 1,21 % para o CQA para AEA. Para 2-AG, os valores dos CVs calculados dos FMNs foram iguais a 5,53 % para o CQB e 2,25 % para o CQA. Como todos os valores de CV obtidos foram inferiores a 15 % podemos considerar que não há efeito pronunciado da matriz nas respostas dos analitos

para o método SALLE-UPLC-MS/MS.

4.3.4. Efeito residual

Para a avaliação do efeito residual entre as injeções cromatográficas injetou-se o extrato de uma amostra de encéfalo sem enriquecimento com os padrões analíticos de AEA e 2-AG, ou seja, com as concentrações endógenas dos analitos, injetando em seguida uma amostra enriquecida na concentração do LSQ. Após essa injeção, duas novas amostras sem enriquecimento foram analisadas. Em todas as injeções fez-se adição do PI.

A Tabela 7 apresenta os valores de áreas para ambos os analitos e padrões internos utilizados para cada uma dessas injeções.

Tabela 7. Valores de área dos analitos AEA e 2-AG e dos padrões deuterados AEAd e 2-AGd para avaliação do efeito residual entre injeções para o método SALLE-UHPLC-MS/MS

Injeção	Área AEA	Área AEAd	Área 2-AG	Área 2-AGd
Amostra	14510	5807	221996	46458
LSQ	32630	5770	727895	31757
Amostra	15696	6032	199797	47248
Amostra	15446	6025	218955	49390

Como se verifica pelos valores apresentados, as variações dos valores de área foram inferiores a 10 % para os analitos e inferior a 5 % para os padrões internos, indicando que não houve efeito residual significativo entre as injeções.

4.4. Determinação dos níveis endógenos de AEA e 2-AG em amostras de encéfalo

Após a otimização e validação analítica do método SALLE-UHPLC-MS/MS, amostras de encéfalos de ratos submetidos à modelo animal da DP pela toxina 6-OHDA e de animais saudáveis foram analisadas para definição dos níveis endógenos de AEA e 2-AG.

A princípio buscou-se a comparação dos níveis dos endocanabinóides em amostras de encéfalo total (sem dissecação de áreas específicas) entre animais saudáveis do grupo controle e animais submetidos ao parkinsonismo pela injeção de 6-OHDA.

Dada a natureza unilateral das lesões nas vias nigroestritais pela 6-OHDA, buscou-se, também, avaliar as concentrações de AEA e 2-AG em amostras de encéfalos de animais parkinsonianos dissecadas em dois hemisférios: um hemisfério ao qual a lesão foi direcionada e o outro hemisfério não-lesionado.

4.4.1. Níveis de AEA e 2-AG em amostras de encéfalo total de animais parkinsonianos e sadios

Para a quantificação dos níveis endógenos de AEA e 2-AG, 8 amostras de encéfalos de animais sadios e 8 amostras de encéfalos animais submetidos a modelo animal da DP pela 6-OHDA foram submetidas à homogeneização e análise pelo método SALLE-UHPLC-MS/MS conforme descrito na sessão de métodos. Para cada um dos homogenatos gerados foram tomadas cinco alíquotas distintas. A Tabela 8 apresenta as concentrações médias de AEA e 2-AG obtidas para cada uma das amostras analisadas.

Tabela 8. Concentrações endógenas de AEA e 2-AG em amostras de encéfalo total de animais sadios e animais lesionados por 6-OHDA

Grupo	Amostra	Concentração de AEA	Concentração de 2-AG
		(ng mL ⁻¹)	(µg mL ⁻¹)
Animais sadios	1	7,28 ± 0,12	0,83 ± 0,06
	2	6,97 ± 0,16	0,73 ± 0,09
	3	7,12 ± 0,24	0,77 ± 0,11
	4	7,22 ± 0,34	0,81 ± 0,07
	5	6,87 ± 0,22	0,91 ± 0,06
	6	7,03 ± 0,08	0,89 ± 0,12
	7	7,36 ± 0,31	0,95 ± 0,09
	8	6,93 ± 0,19	0,69 ± 0,21
Animais lesionados (6-OHDA)	9	6,77 ± 0,33	0,84 ± 0,02
	10	7,14 ± 0,21	0,93 ± 0,07
	11	7,09 ± 0,12	0,95 ± 0,07
	12	6,83 ± 0,19	0,83 ± 0,3
	13	7,21 ± 0,31	0,74 ± 0,11
	14	7,16 ± 0,24	0,91 ± 0,06
	15	6,95 ± 0,42	0,79 ± 0,21
	16	6,83 ± 0,16	0,77 ± 0,15

A concentração média de AEA entre as amostras dos animais do grupo controle (sadios) foi igual a 7,09 ± 0,17 e entre os animais lesionados igual a 6,99 ± 0,12. Já para o 2-AG a média de concentração entre as amostras de animais do grupo controle foi igual a 0,82 ± 0,09 e igual a 0,84 ± 0,07 entre os animais parkinsonianos.

Verifica-se que para ambos os analitos as concentrações não variaram de forma significativa entre os grupos de animais saudáveis e de animais lesionados. Ao se realizar um teste *t de Student*, um teste estatístico comumente utilizado para averiguar se há diferença entre as médias de grupos diferentes, verificou-se que, para um grau de confiança de 95%, não há diferença estatística ($p > 0,05$) entre as médias das concentrações dos animais do grupo controle e as concentrações dos animais lesionados.

Embasado no teste estatístico, que indicou que não há diferença entre as médias, podemos afirmar que as concentrações de AEA e 2-AG nas amostras de encéfalo total não variaram entre os grupos de animais parkinsonianos e controle. Uma possível hipótese para a não variação das concentrações é o fato da lesão pela toxina 6-OHDA ser feita de forma unilateral, ou seja, esta é seletivamente aplicada na via nigroestriatal em apenas um lado do encéfalo. Em função disso, o lado lesionado sofre a perda dos neurônios dopaminérgicos comum à DP e o animal apresenta disfunções motoras de forma contralateral, ou seja, nos membros do lado contrário ao da injeção. Nesse contexto, acredita-se que as variações nas concentrações de AEA e 2-AG não possam ser verificadas de forma global no encéfalo total e seja específica à região lesionada.

4.4.2. Níveis de AEA e 2-AG em amostras de encéfalos seccionados em hemisfério lesionado e hemisfério não lesionado de animais parkinsonianos

Em função da não variação das concentrações de AEA e 2-AG nos encéfalos totais (não seccionados), buscou-se investigar os níveis desses ECs em amostras de encéfalos de animais submetidos a modelo da DP pela 6-OHDA seccionando-os longitudinalmente em hemisfério direito e hemisfério esquerdo. Dada a natureza unilateral da lesão, tem-se que um dos hemisférios sofre a perda seletiva dos neurônios dopaminérgicos ao que passo que o outro não.

Doze animais foram submetidos à injeção de 6-OHDA na via nigroestriatal no hemisfério direito segundo procedimento descrito na metodologia. Esses animais foram então sacrificados e os encéfalos seccionados em hemisférios, sendo posteriormente homogeneizados e analisados pelo método SALLE-UHPLC-MS/MS. A Tabela 10 apresenta as respectivas concentrações de AEA e 2-AG encontradas para cada hemisfério em cada um dos doze animais.

Tabela 9. Concentrações endógenas de AEA e 2-AG em amostras de encéfalos seccionados em hemisférios lesionados e não lesionados por 6-OHDA

Amostra	Hemisfério lesionado		Hemisfério não lesionado	
	AEA (ng mL ⁻¹)	2-AG (µg mL ⁻¹)	AEA (ng mL ⁻¹)	2-AG (µg mL ⁻¹)
1	7,13 ± 0.14	0,73 ± 0.02	8,06 ± 0.13	0,71 ± 0.02
2	6,55 ± 0.20	0,60 ± 0.02	6,85 ± 0.47	0,70 ± 0.07
3	6,36 ± 0.32	0,59 ± 0.01	6,83 ± 0.17	0,66 ± 0.06
4	6,42 ± 0.26	0,57 ± 0.02	6,65 ± 0.24	0,60 ± 0.04
5	6,37 ± 0.26	0,59 ± 0.03	6,45 ± 0.20	0,66 ± 0.04
6	6,80 ± 0.35	0,51 ± 0.05	6,52 ± 0.31	0,49 ± 0.02
7	6,81 ± 0.15	0,47 ± 0.02	6,76 ± 0.37	0,86 ± 0.05
8	6,53 ± 0.33	0,63 ± 0.05	7,03 ± 0.24	0,61 ± 0.04
9	6,56 ± 0.21	0,66 ± 0.06	6,60 ± 0.48	0,66 ± 0.02
10	6,67 ± 0.37	0,52 ± 0.04	6,51 ± 0.48	0,52 ± 0.03
11	6,68 ± 0.24	0,49 ± 0.02	6,73 ± 0.29	0,48 ± 0.03
12	7,27 ± 0.16	0,48 ± 0.15	6,58 ± 0.16	0,54 ± 0.03

A média da concentração de AEA nos hemisférios lesionados foi igual a $6,68 \pm 0,28$ ng mL⁻¹ ao passo que nos hemisférios não lesionados a média foi de $6,79 \pm 0,43$ ng mL⁻¹. Para o 2-AG verificou-se uma média de $0,57 \pm 0,08$ µg mL⁻¹ no grupo dos hemisférios lesionados e uma média de $0,62 \pm 0,10$ µg mL⁻¹ no grupo dos hemisférios não lesionados.

Novamente não foram observadas diferenças significativas nos valores de concentração. De forma análoga às análises anteriores, realizou-se um teste *t de Student*, onde verificou-se que, para um nível de confiança de 95 %, não existe diferença estatística ($p > 0,05$) entre as médias das concentrações de AEA e 2-AG entre os dois grupos de hemisférios, o que permite afirmar que as concentrações desses ECs não variam entre os hemisférios lesionados e não lesionados.

Trabalhos disponíveis na literatura, onde se comparam as concentrações de AEA e 2-AG entre animais saudáveis e animais lesionados por 6-OHDA, foram publicados por Gubellini et al em 2002 e Maccarrone et al em 2003 (GUBELLINI et al., 2002; MACCARRONE et al., 2003). Em ambos se observou um aumento de cerca de três vezes nas concentrações endógenas de AEA na região do estriado em animais lesionados por 6-OHDA em comparação com animais não-lesionados. Para 2-AG alterações não foram observadas.

Esses trabalhos publicados juntamente dos dados experimentais aqui obtidos sugerem que as variações dos ECs devem ser específicas na região do estriado, parte do encéfalo mais afetada pela lesão, onde se observa grande perda dos neurônios dopaminérgicos.

4.4.3. Níveis de AEA e 2-AG em amostras de estriados de animais parkinsonianos e sadios

Considerando os resultados obtidos nas análises anteriores de encéfalo total e dos hemisférios seccionados, verificou-se que não houve alterações significativas nos níveis dos endocanabinóides AEA e 2-AG. Portanto, avaliou-se as concentrações dos endocanabinóides de forma específica, na região do encéfalo mais afetada pela lesão por 6-OHDA, nesse modelo animal de parkinsonismo.

Primariamente, buscou-se avaliar as concentrações de AEA e 2-AG em amostras de estriado seccionados a partir de encéfalos de animais sadios, sem qualquer tipo de lesão ou tratamento. A Tabela 10 apresenta as concentrações determinadas para os animais.

Tabela 10. Concentrações endógenas de AEA e 2-AG em amostras de estriados de animais sadios (sem lesão por 6-OHDA)

Amostra	AEA (ng mL ⁻¹)	2-AG (µg mL ⁻¹)
1	17,23 ± 0,10	1,36 ± 0,07
2	16,69 ± 0,08	1,21 ± 0,04
3	17,25 ± 0,13	1,33 ± 0,11
4	16,52 ± 0,20	1,45 ± 0,14
5	17,15 ± 0,05	1,47 ± 0,11
6	17,31 ± 0,09	1,44 ± 0,06
7	16,78 ± 0,11	1,34 ± 0,13
8	15,96 ± 0,13	1,17 ± 0,16
9	16,68 ± 0,17	1,23 ± 0,08
10	17,71 ± 0,16	1,35 ± 0,08

A partir desses dados verificamos que as concentrações dos endocanabinóides determinadas, de média 16,97 ng mL⁻¹ para AEA e 1,34 µg mL⁻¹ para 2-AG, foram maiores na região do estriado do que no encéfalo total ou nos hemisférios seccionados, indicando que esses endógenos devem se concentrar nessa região da estrutura cerebral.

Após a análise dos animais sadios, partiu-se para a análise dos animais lesionados por 6-OHDA. De forma análoga ao que foi feito na análise dos hemisférios cerebrais, em função da natureza unilateral da lesão, a partir de cada amostra de encéfalo obteve-se o estriado do hemisfério lesionado (ipsilateral) e o estriado do hemisfério não lesionado (contralateral). A Tabela 11 apresenta as respectivas concentrações obtidas de AEA e 2-AG para cada amostra.

Tabela 11. Concentrações endógenas de AEA e 2-AG em amostras de estriados (lesionados e não lesionados) de animais submetidos ao modelo animal de Parkinson por 6-OHDA

Amostra	Estriado ipsilateral		Estriado contralateral	
	AEA (ng mL ⁻¹)	2-AG (µg mL ⁻¹)	AEA (ng mL ⁻¹)	2-AG (µg mL ⁻¹)
1	12,04 ± 0,17	2,45 ± 0,10	10,89 ± 0,10	3,74 ± 0,05
2	13,20 ± 0,08	2,48 ± 0,05	11,40 ± 0,15	3,82 ± 0,02
3	12,31 ± 0,06	2,37 ± 0,03	11,49 ± 0,12	3,92 ± 0,13
4	11,92 ± 0,06	2,28 ± 0,05	12,75 ± 0,08	4,37 ± 0,12
5	12,26 ± 0,15	2,50 ± 0,13	11,77 ± 0,07	4,57 ± 0,07
6	12,04 ± 0,13	2,44 ± 0,11	9,34 ± 0,14	4,33 ± 0,15
7	12,17 ± 0,11	2,56 ± 0,15	11,36 ± 0,12	3,61 ± 0,10
8	11,88 ± 0,14	2,33 ± 0,08	12,02 ± 0,19	4,71 ± 0,08
9	12,24 ± 0,11	2,15 ± 0,16	12,33 ± 0,13	5,14 ± 0,07
10	13,13 ± 0,05	2,53 ± 0,12	11,22 ± 0,11	4,89 ± 0,13

As concentrações médias de AEA determinadas foram iguais a 12,32 ng mL⁻¹ para os estriados lesionados e 11,46 ng mL⁻¹ para os estriados não lesionados. Já para 2-AG, observa-se uma média igual a 2,41 µg mL⁻¹ no grupo dos estriados lesionados e igual a 4,31 µg mL⁻¹ para os estriados contralaterais.

A partir dos conjuntos de concentrações de AEA e 2-AG nos três grupos de estriados analisados, realizou-se análise de variância (one way ANOVA), onde pôde-se verificar que houve diferença significativa entre as médias dos grupos. Em seguida, para comparações múltiplas entre os grupos, dois a dois, um teste de Tuckey foi realizado. A Figura 14 apresenta um histograma que ilustra as diferenças observadas.

Para AEA, verificou-se diferença significativa ($p < 0,05$), ainda que pequena, entre os estriados ipsilateral e contralateral à lesão. Já ao comparar esses dois grupos de estriados com os estriados dos animais sadios, observou-se grande diferença estatística ($p < 0,001$). Para 2-AG, observa-se grande diferença estatística ($p < 0,001$) ao se comparar as concentrações entre os estriados ipsilateral e contralateral à lesão, sendo a concentração mais elevada no segundo. Da mesma forma, há uma grande diferença estatística ($p < 0,001$) entre os estriados ipsilateral e contralateral dos animais lesionados por 6-OHDA ao se comparar com os estriados dos animais sadios.

Figura 14. Comparação entre as concentrações de AEA e 2-AG em amostras de estriados de animais sadios e estriados ipsilateral e contralateral de animais lesionados por 6-OHDA

Fonte: próprio autor. Obtido pelo software Prism 8® (GraphPad Software).

Em suma, todos os conjuntos de amostras analisadas, desde encéfalo total até os estriados, sugerem que as concentrações dos endocanabinóides AEA e 2-AG sofreram alterações em função da lesão provocada pela injeção de 6-OHDA e desenvolvimento do parkinsonismo, mas que essas alterações ocorreram de forma específica nas regiões mais afetadas pela lesão, como o estriado. Observa-se que ocorreu diminuição da concentração de AEA nos estriados dos animais lesionados por 6-OHDA em comparação aos animais sadios, e que há resposta em ambos os estriados, não somente no estriado ipsilateral. Para 2-AG o mesmo se verifica, mas de forma contrária: há um aumento na concentração média, sendo mais pronunciada no estriado contralateral.

Os dados experimentais obtidos contrastam com os obtidos por Gubellini et al em 2002 e Maccarrone et al em 2003 (GUBELLINI et al., 2002; MACCARRONE et al., 2003), onde se observou um aumento da concentração de AEA nos animais lesionados por 6-OHDA e nenhuma mudança nas concentrações de 2-AG. Entretanto, estão de acordo com o observado por Ferrer et al (FERRER et al., 2003), onde também se verificou uma queda na concentração de AEA nos animais tratados com 6-OHDA, porém, não se observou variação na concentração de 2-AG. Uma hipótese que explique essas diferenças nas concentrações de AEA e 2-AG entre os trabalhos mencionados e o que se foi obtido aqui é a natureza da lesão: nesses trabalhos a toxina 6-OHDA é administrada diretamente na região da substância nigra ao passo que nos animais utilizados nos experimentos desse trabalho a injeção é feita no feixe prosencefálico medial.

Destaca-se que a observação do aumento das concentrações de 2-AG é um resultado até então inédito na literatura no que diz respeito ao modelo animal 6-OHDA da DP. Como essa elevação não foi observada nos trabalhos que fizeram administração da toxina na região da substância nigra, acredita-se que seja uma variação específica do procedimento experimental aqui adotado, a injeção no feixe prosencefálico medial. Entretanto, essa observação está em consonância com observações feitas em outros modelos animais de roedores da doença de Parkinson, como os modelos da reserpina e MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina), onde se observa aumento na concentração de 2-AG em animais parkinsonianos (BASAVARAJAPPA et al., 2017).

CONCLUSÃO

5. CONCLUSÃO

A processo de homogeneização do tecido encefálico com solução aquosa de ácido fórmico propiciou a obtenção de um homogenato líquido sem presença de grandes partículas sólidas, possibilitando a compatibilidade da amostra com a extração SALLE e o sistema cromatográfico.

A otimização das variáveis inerentes à SALLE favoreceu a extração dos endocanabinóides AEA e 2-AG da amostra biológica. O método SALLE desenvolvido apresentou como vantagens o menor consumo de solvente orgânico e menor tempo de análise, quando comparado à extração líquido-líquido convencional e as extrações em fase sólida, e extratos mais limpos, em razão da separação de fases orgânica/aquosa, quando comparado à precipitação de proteínas.

Todos os parâmetros de validação analítica avaliados encontraram-se em congruência com os critérios preconizados no guia de validação da ANVISA. Portanto, o método SALLE-UHPLC-MS/MS desenvolvido é adequado para a determinação de AEA e 2-AG em amostras de encéfalo de ratos.

O método proposto foi aplicado com sucesso na determinação das concentrações endógenas de AEA e 2-AG em amostras de encéfalo total, de hemisférios e estriados de ratos parkinsonianos e ratos saudáveis do grupo controle. Todos os conjuntos de amostras analisadas, desde encéfalo total até os estriados, sugerem que as concentrações dos endocanabinóides AEA e 2-AG sofreram alterações em função da lesão provocada pela injeção de 6-OHDA e desenvolvimento do parkinsonismo, mas que essas alterações ocorreram de forma específica nas regiões mais afetadas pela lesão, como o estriado.

Para AEA, verificou-se diferença significativa ($p < 0,05$), entre os estriados ipsilateral e contralateral à lesão. Já ao comparar esses dois grupos de estriados com os estriados dos animais saudáveis, observou grande diferença estatística ($p < 0,001$). Para 2-AG, observou-se grande diferença estatística ($p < 0,001$) ao se comparar as concentrações entre os estriados ipsilateral e contralateral à lesão. Da mesma forma, observou-se grande diferença estatística ($p < 0,001$) entre os estriados ipsilateral e contralateral dos animais lesionados com os animais saudáveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, in RDC No 166 , 24 Julho 2017. p. 22, 2017.
- AHMED, O. S. et al. A fully automated on-line salting-out assisted liquid-liquid extraction capillary electrophoresis methodology: Application to tyrosine kinase inhibitors in human plasma. **Talanta**, v. 208, p. 120391, 2020a.
- AHMED, O. S. et al. Direct salting-out assisted liquid–liquid extraction (SALLE) from human blood: Application for the analysis of tyrosine kinase inhibitors. **Microchemical Journal**, v. 155, 2020b.
- ALSHISHANI, A.; SALHIMI, S. M.; SAAD, B. Salting-out assisted liquid-liquid extraction coupled with hydrophilic interaction chromatography for the determination of biguanides in biological and environmental samples. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1073, n. December 2017, p. 51–59, 2018.
- ARMSTRONG, M. J.; OKUN, M. S. Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease: A Review. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 323, n. 6, p. 548–560, 2020.
- ATKINS, P.; DE PAULA, J. **Physical Chemistry**. 8. ed. Oxford: Oxford Press, 2006.
- BALVERS, M. G. J. et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of free and esterified fatty acid N-acyl ethanolamines in plasma and blood cells. **Analytical Biochemistry**, v. 434, n. 2, p. 275–283, 2013.
- BASAVARAJAPPA, B. Neuropharmacology of the Endocannabinoid Signaling System- Molecular Mechanisms, Biological Actions and Synaptic Plasticity. **Current Neuropharmacology**, v. 5, n. 2, p. 81–97, 2007.
- BASAVARAJAPPA, B. S. et al. Endocannabinoid system in neurodegenerative disorders. **Journal of Neurochemistry**, v. 142, n. 5, p. 624–648, set. 2017.
- BHARDWAJ, C.; HANLEY, L. Ion sources for mass spectrometric identification and imaging of molecular species. **Natural Product Reports**, v. 31, n. 6, p. 756–767, 2014.
- BINDILA, L.; LUTZ, B. Extraction and Simultaneous Quantification of Endocannabinoids and Endocannabinoid-Like Lipids in Biological Tissues. In: MACCARRONE, M. (Ed.). . **Methods in Molecular Biology**. New York, NY: Springer New York, 2016. v. 1412p. 9–18.
- BUCZYNSKI, M. W.; PARSONS, L. H. THEMED ISSUE : CANNABINOIDS REVIEW Quantification of brain endocannabinoid levels : methods , interpretations and pitfalls Abbreviations : p. 423–442, 2010.

- BYSTROWSKA, B. et al. Troubleshooting in LC-MS/MS method for determining endocannabinoid and endocannabinoid-like molecules in rat brain structures applied to assessing the brain endocannabinoid/endovanilloid system significance. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 24, n. 4, p. 315–322, 2014.
- CELORRIO, M. et al. Fatty acid amide hydrolase inhibition for the symptomatic relief of Parkinson's disease. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 57, p. 94–105, 2016.
- DEVANE, W. A. et al. Isolation and Structure of a Brain Constituent That Binds to the Cannabinoid Receptor. **Science**, v. 1558, n. 10, p. 19–22, 1992.
- DI MARZO, V. et al. Enhanced levels of endogenous cannabinoids in the globus pallidus are associated with a reduction in movement in an animal model of Parkinson's disease. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 14, n. 10, p. 1432–1438, jul. 2000.
- DI MARZO, V.; DE PETROCELLIS, L. **Why do cannabinoid receptors have more than one endogenous ligand?** *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2012.
- DI SCALA, C. et al. Anandamide revisited: How cholesterol and ceramides control receptor-dependent and receptor-independent signal transmission pathways of a lipid neurotransmitter. **Biomolecules**, v. 8, n. 2, 2018.
- DING, J. et al. Investigation of changes in endocannabinoids and N-acyl ethanolamides in biofluids, and their correlations with female infertility. **Journal of Chromatography A**, v. 1509, p. 16–25, 2017.
- DÓCS, K. et al. The Ratio of 2-AG to Its Isomer 1-AG as an Intrinsic Fine Tuning Mechanism of CB1 Receptor Activation. v. 11, n. February, p. 1–13, 2017.
- FERNÁNDEZ-RUIZ, J.; ROMERO, J.; RAMOS, J. A. Endocannabinoids and Neurodegenerative Disorders: Parkinson's Disease, Huntington's Chorea, Alzheimer's Disease, and Others. In: [s.l: s.n.]. p. 233–259.
- FERRER, B. et al. Effects of levodopa on endocannabinoid levels in rat basal ganglia: implications for the treatment of levodopa-induced dyskinesias. **European Journal of Neuroscience**, v. 18, n. 6, p. 1607–1614, set. 2003.
- FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **The Journal of biological chemistry**, v. 226, n. 1, p. 497–509, 1957.
- GUBELLINI, P. et al. Experimental parkinsonism alters endocannabinoid degradation: Implications for striatal glutamatergic transmission. **Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 16, p.

6900–6907, 2002.

HAAG, A. M. Mass Analyzers and Mass Spectrometers. In: MIRZAEI, H.; CARRASCO, M. (Eds.). . **Modern Proteomics - Sample Preparation, Analysis and Practical Applications**. Advances in Experimental Medicine and Biology. Cham: Springer International Publishing, 2016. v. 919p. 157–169.

HARRIS, D. C. **Quantitative Chemichal Analysis**. 7. ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2007.

HERNANDEZ-BALTAZAR, D.; ZAVALA-FLORES, L. M.; VILLANUEVA-OLIVO, A. The 6-hydroxydopamine model and parkinsonian pathophysiology: Novel findings in an older model. **Neurología (English Edition)**, v. 32, n. 8, p. 533–539, out. 2017.

HERNÁNDEZ-MESA, M.; CRUCES-BLANCO, C.; GARCÍA-CAMPAÑA, A. M. Simple and rapid determination of 5-nitroimidazoles and metabolites in fish roe samples by salting-out assisted liquid-liquid extraction and UHPLC-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 252, n. December 2016, p. 294–302, 2018.

HOFFMAN, E. DE; STROOBANT, V. **Mass Spectrometry Principles and Aplications**. Third edit ed. England: [s.n.].

IVANOV, I.; BORCHERT, P.; HINZ, B. A simple method for simultaneous determination of N-arachidonoyl ethanolamine, N-oleoyl ethanolamine, N-palmitoyl ethanolamine and 2-arachidonoylglycerol in human cells. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 407, n. 6, p. 1781–1787, 2015.

JAIN, A.; GUPTA, M.; VERMA, K. K. Salting-out assisted liquid-liquid extraction for the determination of biogenic amines in fruit juices and alcoholic beverages after derivatization with 1-naphthylisothiocyanate and high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1422, p. 60–72, 2015.

JAIN, D. et al. Double-salting out assisted liquid-liquid extraction (SALLE) HPLC method for estimation of temozolomide from biological samples. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 970, p. 86–94, 2014.

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

Jl, D.; JANG, C. G.; LEE, S. A sensitive and accurate quantitative method to determine N-arachidonoyldopamine and N-oleoyldopamine in the mouse striatum using column-switching LC-MS-MS: Use of a surrogate matrix to quantify endogenous compounds. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, n. 18, p. 4491–4499, 2014.

KALIA, L. V.; LANG, A. E. Parkinson's disease. **The Lancet**, v. 386, n. 9996, p. 896–912,

2015.

KATCHAN, V.; DAVID, P.; SHOENFELD, Y. Autoimmunity Reviews Cannabinoids and autoimmune diseases : A systematic review. **Autoimmunity Reviews**, 2016.

KONNOVA, E. A.; SWANBERG, M. Animal Models of Parkinson's Disease. In: **Parkinson's Disease: Pathogenesis and Clinical Aspects**. [s.l.] Codon Publications, 2018. p. 83–106.

KOULI, A.; TORSNEY, K. M.; KUAN, W. **Parkinson's Disease: Etiology, Neuropathology, and Pathogenesis**. 1. ed. Brisbane: Codon Publications, 2018.

LANE, E.; DUNNETT, S. Animal models of Parkinson's disease and L-dopa induced dyskinesia: How close are we to the clinic? **Psychopharmacology**, v. 199, n. 3, p. 303–312, 2008.

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

LIPUT, D. J. et al. Quantification of anandamide, oleoylethanolamide and palmitoylethanolamide in rodent brain tissue using high performance liquid chromatography – electrospray mass spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, n. 2014, p. 1–8, 2014.

MACCARRONE, M. et al. Levodopa treatment reverses endocannabinoid system abnormalities in experimental parkinsonism. **Journal of Neurochemistry**, v. 85, n. 4, p. 1018–1025, 2003.

MACKIE, K. Cannabinoid Receptors As Therapeutic Targets. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 46, n. 1, p. 101–122, 2006.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 214–222, 2009.

MARCHIONI, C. et al. A column switching ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method to determine anandamide and 2-arachidonoylglycerol in plasma samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 409, n. 14, p. 3587–3596, 2017.

MARTINS JÚNIOR, H. A. et al. **Determinação de resíduos de cloranfenicol em amostras de leite e mel industrializados utilizando a técnica de espectrometria de massas em “tandem” (CLAE-EM/EM)** *Química Nova* scielo , , 2006.

MATKOVICH, C. E.; CHRISTIAN, G. D. Salting-Out of Acetone from Water-Basis of a New Solvent Extraction System. **Analytical Chemistry**, v. 45, n. 11, p. 1915–1921, 1973.

MECHOULAM, R. **Cannabinoids As Therapeutic Agents**. [s.l.] CRC Press, 2019.

- MORITZ, D. J. et al. Neurological and psychiatric predictors of mortality in patients with Alzheimer disease in California. **Archives of Neurology**, v. 54, n. 7, p. 878–885, 2006.
- MOUNSEY, R. B. et al. Increasing levels of the endocannabinoid 2-AG is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. **Experimental Neurology**, v. 273, p. 36–44, nov. 2015.
- MURRAY, K. K. et al. Definitions of terms relating to mass spectrometry (IUPAC Recommendations 2013). **Pure and Applied Chemistry**, v. 85, n. 7, p. 1515–1609, 6 jun. 2013.
- MYASEIN, F. et al. Analytica Chimica Acta Rapid , simultaneous determination of lopinavir and ritonavir in human plasma by stacking protein precipitations and salting-out assisted liquid / liquid extraction , and ultrafast LC – MS / MS. v. 651, p. 112–116, 2009.
- NEMEŠKALOVÁ, A. et al. Salting out assisted liquid-liquid extraction for liquid chromatography tandem-mass spectrometry determination of amphetamine-like stimulants in meconium. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 172, p. 42–49, 2019.
- NISHIJIMA, H.; TOMIYAMA, M. What mechanisms are responsible for the reuptake of levodopa-derived dopamine in parkinsonian striatum? **Frontiers in Neuroscience**, v. 10, n. DEC, p. 1–9, 2016.
- NIU, Z. et al. Salting-out assisted liquid–liquid extraction combined with gas chromatography-mass spectrometry for the determination of pyrethroid insecticides in high salinity and biological samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 143, p. 222–227, 2017.
- OHNO-SHOSAKU, T.; KANO, M. Endocannabinoid-mediated retrograde modulation of synaptic transmission. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 29, p. 1–8, 2014.
- OLIVEIRA, I. G. C.; MARCHIONI, C.; QUEIROZ, M. E. C. Determination of anandamide in cerebrospinal fluid samples by disposable pipette extraction and ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1130–1131, 2019.
- PACHECO, S. et al. History of Liquid Chromatography. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 4, p. 1225–1271, 2015.
- PALACIOS-SÁNCHEZ, L.; TORRES NUPAN, M.; BOTERO-MENESES, J. S. James Parkinson and his essay on “shaking palsy”, two hundred years later. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 75, n. 9, p. 671–672, set. 2017.
- PANDEY, S.; SRIVANITCHAPOOM, P. Levodopa-induced Dyskinesia: Clinical Features, Pathophysiology, and Medical Management. **Annals of Indian Academy of Neurology**, v.

20, n. 3, p. 190–198, 2017.

PERTWEE, R. G. et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology . LXXIX . Cannabinoid Receptors and Their Ligands : Beyond CB 1 and CB 2. v. 62, n. 4, p. 588–631, 2010.

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

POEWE, W. et al. Parkinson disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, p. 1–21, 2017.

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

RAMSEY, F.L., SCHAFER, D. W. **The statistical sleuth - a course in methods of data analysis**. Belmont: Duxbury Press, 1997.

ROBBINS, L. A.; PH, D.; COMPANY, D. C. Liquid-Liquid Extraction Operations and Equipment. 1999.

ROUZER, C. A.; GHEBRESELASIE, K.; MARNETT, L. J. Chemical stability of 2-arachidonylglycerol under biological conditions. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 119, n. 1–2, p. 69–82, 2002.

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

SILVA, R. A. D. V. DA et al. The role of eletrical synapses in epileptic seizures. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, v. 16, n. 4, p. 149–154, 2010.

SKOOG et al. **Fundamentos de química analítica**. 8. ed. [s.l.] Cengage Learning, 2015.

SUGIURA, T. et al. Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand. **Progress in Lipid Research**, v. 45, n. 5, p. 405–446, 2006.

SWARTZ, M. E. UPLC ^{TM} : An Introduction and Review. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 28, n. 7–8, p. 1253–1263, 6 abr. 2005.

TABATA, M.; KUMAMOTO, M.; NISHIMOTO, J. Chemical Properties of Water-Miscible Solvents Separated by Salting-out and Their Application to Solvent Extraction. **Analytical Sciences**, v. 10, n. 3, p. 383–388, 1994.

TANG, Y. Q.; WENG, N. Salting-out assisted liquid-liquid extraction for bioanalysis. **Bioanalysis**, v. 5, n. 12, p. 1583–98, 2013.

TEJADA-CASADO, C. et al. Green and simple analytical method to determine

benzimidazoles in milk samples by using salting-out assisted liquid-liquid extraction and capillary liquid chromatography. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1091, p. 46–52, 2018.

VALENTE, I. M.; GONÇALVES, L. M.; RODRIGUES, J. A. Another glimpse over the salting-out assisted liquid-liquid extraction in acetonitrile/water mixtures. **Journal of Chromatography A**, v. 1308, p. 58–62, 2013.

VIVEROS-PAREDES, J. M. et al. Effect of inhibition of fatty acid amide hydrolase on MPTP-induced dopaminergic neuronal damage. **Neurologia**, p. 1–10, 2016.

WU, H. et al. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Simultaneous determination of a hydrophobic drug candidate and its metabolite in human plasma with salting-out assisted liquid / liquid extraction using a mass spectrometry friendly salt. v. 48, p. 1243–1248, 2008.

XIONG, X. et al. High-throughput salting-out assisted liquid-liquid extraction with acetonitrile for the determination of anandamide in plasma of hemodialysis patients with liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Biomedical Chromatography**, v. 29, n. 9, p. 1317–1324, 2015.

YANES, E. G.; LOVETT, D. P. High-throughput bioanalytical method for analysis of synthetic cannabinoid metabolites in urine using salting-out sample preparation and LC – MS / MS. **Journal of Chromatography B**, v. 909, p. 42–50, 2012.

ZHANG, J.; MYASEIN, F.; RODILA, R. High-throughput salting-out assisted liquid / liquid extraction and ultrafast LC for same-day delivery of first-in-human bioanalytical data. p. 715–719, 2009.

ZHANG, J.; XIONG, X. Salting - out Assisted Liquid – Liquid Extraction (SALLE) in LC - MS Bioanalysis a SALLE Method. n. 3, 2019.

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

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

ZOU, S.; KUMAR, U. **Cannabinoid receptors and the endocannabinoid system:**

Signaling and function in the central nervous system *International Journal of Molecular Sciences*, 2018.

ANEXO 1. Carta de aprovação do comitê de ético no uso de animais

Maíza Bartolanza
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
Comissão de Ética no Uso de Animais

Of. CEUA 118/2016

Ribeirão Preto, 21 de setembro de 2016.

Ref. processo nº 2016.1.667.58.4

Senhora Pesquisadora,

Informamos que a Comissão de Ética no Uso de Animais da FORP, em sua 41ª Sessão Ordinária, realizada em 21 de setembro de 2016, **aprovou** os procedimentos éticos apresentados no Protocolo sobre a Pesquisa intitulada: "**Estudo da contribuição do processo inflamatório na discinesia induzida por L-DOPA na doença de Parkinson em ratos**", emitindo o certificado anexo.

Informamos, também, que deverá ser entregue na Secretaria da CEUA, **até 01/08/2018**, o **Relatório Final** contendo os resultados e/ou resumo do trabalho publicado.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Andíara De Rossi Daldegan

Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais

Ilma. Sra

Profa. Dra. Elaine Aparecida Del Bel Belluz Guimarães Departamento de Morfologia, Fisiologia e Patologia Básica
desta Faculdade

./aafn