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

Desenvolvimento de diferentes métodos LC-MS/MS para a determinação de fármacos e
endocanabinóides em amostras de plasma

VINICIUS RICADO ACQUARO JUNIOR

Tese 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 Doutor em
Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO - SP

2018

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

Desenvolvimento de diferentes métodos LC-MS/MS para a determinação de fármacos e endocanabinóides em amostras de plasma

VINICIUS RICARDO ACQUARO JUNIOR

Tese 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 Doutor em Ciências, Área: **Química**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Eugênia Queiroz Nassur

Versão corrigida

A versão original se encontra disponível na Biblioteca da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

RIBEIRÃO PRETO - SP

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Acquaro Jr, Vinicius Ricardo

Desenvolvimento de diferentes métodos LC-MS/MS para a determinação de fármacos e endocanabinóides em amostras de plasma. Ribeirão Preto, 2018.

167 p. : il. ; 30 cm

Tese de doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Química Analítica.

Orientador: Nassur, Maria Eugênia Queiroz.

1. Esquizofrenia. 2. *Column switching*. 3. Colunas superficialmente porosas. 4. Parâmetros cromatográficos. 5. Endocanabinóides. 6. SPME-UHPLC-MS/MS. 7. Bio-SPME-Nano-ESI.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Vinicius Ricardo Acquaro Junior

Título: Desenvolvimento de diferentes métodos LC-MS/MS para a determinação de fármacos e endocanabinóides em amostras de plasma

Tese 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 Doutor em Ciências, Área: **Química**

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a).: _____ Julgamento: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).: _____ Julgamento: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).: _____ Julgamento: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).: _____ Julgamento: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).: _____ Julgamento: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Vinicius e Janete,
pelo exemplo de vida,
dignidade e retidão de
caráter, dedico.*

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Profa. Dra. Maria Eugênia Queiroz Nassur pela valiosa orientação, paciência e ajuda incansável durante a realização deste trabalho.

Ao meu supervisor do estágio BEPE (nº do processo - 2016/16180-6), Prof. Dr. Janusz Pawliszyn pelo seu profissionalismo e valiosos ensinamentos durante minha estadia no Canadá.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e especialmente a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (nº dos processos - 2014/22140-1 e 2015/07619-1) pelo apoio financeiro, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.

Aos técnicos de laboratório Mércia, Tiago, Valdir, Luiza e Zanato pela ajuda e descontração na preparação das aulas práticas durante o Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE).

Aos professores Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes e Dr. Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira pelo incentivo e conhecimentos transmitidos.

Aos amigos de laboratório Diego Soares Domingues e Luis Felipe Cabral Miranda pela ajuda incansável e momentos de descontração no decorrer deste trabalho.

Aos amigos de laboratório Camila Marchioni, Tamirez Valim, Mônia Lemos, Israel Donizete e Caroline Grecco, ao auxílio prestado contribuindo diretamente ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Aos amigos de laboratório do Canadá, Germán Augusto, Marcos Tascon, Daniel Rickert, Alex Kasperkiewicz, Mohammad Huq, Varoon Singh, Miao Chen, Jonathan Grandy, Miao Yu, Nathaly Reyes, Ezel Boyaci, Emanuela Gionfriddo, Nikita Looby, Sofia Lendor, Abir Khaled, Li Zhang e Tijana Vasićević pela incansável ajuda, companheirismo e acima de tudo a amizade, tornando minha estadia confortável e prazerosa mesmo longe de casa.

Aos meus amigos de Ribeirão Preto, Fernando Francelino, Ronaldo José, William Garbelline, Amilton Lopes, Luiz Fernando e Fábio Guilherme, pela amizade e companheirismo de tantos anos.

Ao meu avô paterno Antônio Carlos Acquaro Neto que infelizmente faleceu no período em que estava realizando o estágio BEPE no Canadá.

As minhas avós Aparecida da Silva e Ruth Acquaro pelo amor e incentivo dado durante toda minha vida.

A minha namorada Júlia Pereira Rodrigues pelo amor, amizade e incentivo, sendo essencial durante esta trajetória.

A toda minha família, em especial meus pais, Vinicius e Janete, aos meus irmãos, Vanessa, Vivien e Victor e aos meus sobrinhos Pietro, Vincent e Enzo, por todo o amor e apoio incondicional que me fizeram chegar até aqui.

EPÍGRAFE

“O ato de doutorar-se em uma determinada ciência não provê o poder de toda a sabedoria. Tornar-se doutor é ser capaz de compreender a dimensão de sua ignorância frente à imensidão do saber. Entender que ainda se há muito a aprender e humildade para não deixar escapar nenhuma oportunidade de aprendizagem, em qualquer momento, com qualquer pessoa, fazem um verdadeiro doutor. Títulos são obtidos a partir de esforços pontuais e temporais, contudo, as atitudes como tal detentor do título o definem mais do que qualquer carimbo em um pedaço de papel. ”

Vinicius R Acquaro Junior

RESUMO

ACQUARO JUNIOR, V.R. **Desenvolvimento de diferentes métodos LC-MS/MS para a determinação de fármacos e endocanabinóides em amostras de plasma**. 2018. 167f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Esta tese foi dividida em três capítulos. O capítulo I descreve o desenvolvimento do método “*Column switching*” UHPLC-MS/MS para a determinação simultaneamente de fármacos psicotrópicos em amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos. A politerapia é uma prática comum no tratamento da esquizofrenia. Portanto, a monitorização terapêutica destes fármacos tem sido realizada para o ajuste das doses e individualização da terapia farmacológica. O método “*Column switching*” UHPLC-MS/MS apresentou linearidade na faixa de concentração de 0,025 a 1,25 ng mL⁻¹ com R² acima de 0,9950 e falta de ajuste ($p > 0,05$) não significativa; precisão com coeficientes de variação inferiores a 12% e exatidão com erro padrão relativo inferior a 14%. Este método foi aplicado com sucesso para determinação de fármacos em amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos para fins de monitorização terapêutica.

No capítulo II, o desempenho cromatográfico de colunas C₁₈ superficialmente e totalmente porosas com diferentes tamanhos de partícula foi avaliado para a análise de fármacos psicotrópicos por LC-MS/MS e LC-DAD. Com o sistema LC-MS/MS foram avaliados os seguintes parâmetros cromatográficos: altura do prato reduzido vs velocidade linear reduzida, impedância vs velocidade linear reduzida, tempo da corrida cromatográfica vs vazão, pressão vs vazão, resolução, capacidade de pico, assimetria e fator de retenção. Já com o sistema LC-DAD foram avaliados a hidrofobicidade, atividade silanol e impurezas metálicas também foram avaliadas. As colunas com superfície carregada apresentaram maior eficiência cromatográfica para os fármacos em sua forma ionizada. Já as colunas com partículas menores que 2 µm (Cortecs 1,6 µm, Acquity 1,7 µm, e Kinetex 1,7 µm) apresentaram maior eficiência cromatográfica para os fármacos na forma parcialmente ionizada. Os modelos matemáticos gerados foram capazes de prever a pressão e o tempo da corrida cromatográfica em diferentes vazões para todas as colunas. Considerando a eficiência, impedância, resolução, capacidade de pico, fator de retenção e hidrofobicidade, as colunas Cortecs 1,6 µm e Acquity 1,7 µm apresentaram melhor desempenho durante a análise dos fármacos em amostra de plasma.

O capítulo III descreve o desenvolvimento e validação dos métodos SPME-UHPLC-MS/MS e Bio-SPME-Nano-ESI-MS/MS para a determinação dos endocanabinóides (AEA e 2-AG) em amostras biológicas. Para a otimização do processo SPME foram avaliadas as fases SPME (C₁₈, C₃₀ e HLB) e os solventes para dessorção (metanol, acetonitrila e isopropanol). Os aditivos modificadores de matriz, como cloridrato de guanidina, ácido trifluoroacético e acetonitrila foram avaliados por planejamento experimental. Os métodos SPME-UHPLC-MS/MS e Bio-SPME-Nano-ESI-MS/MS, com a fase HLB biocompatível, apresentaram para ambos endocanabinóides valores de LOQs de 1 ng mL⁻¹ e 50 ng mL⁻¹, respectivamente. O método Bio-SPME-Nano-ESI-MS/MS permitiu o direto acoplamento da fibra SPME ao espectrômetro de massas via dessorção/ionização nanoeletrospray que resultou em rápida determinação quantitativa dos endocanabinóides em amostras biológicas.

Palavras Chave: Esquizofrenia, *column switching*, colunas superficialmente porosas, parâmetros cromatográficos, endocanabinóides, SPME-UHPLC-MS/MS, Bio-SPME-Nano-ESI-MS/MS.

ABSTRACT

ACQUARO JUNIOR, V.R. **Development of different LC-MS/MS methods for the determination of drugs and endocannabinoids in plasma samples.** 2018. 167f. Thesis (Ph.D. - Degree) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

This thesis is divided into three chapters. Chapter I describes the development of a column switching UHPLC–MS/MS method to determine psychotropic drugs in schizophrenic patient's plasma samples simultaneously. Polytherapy is a common practice in schizophrenia treatment. Therefore, therapeutic drug monitoring has been applied to adjust doses and to customize pharmacological therapy. The column switching UHPLC–MS/MS method developed here is linear at concentrations ranging from 0.025 to 1.25 ng mL⁻¹ with R² above 0.9950 and non-significant lack of fit ($p > 0.05$), precision with coefficients of variation lower than 12%, and accuracy with relative standard error lower than 14%. This method was successfully applied to determine drugs in schizophrenic patients' plasma samples for therapeutic drug monitoring.

In chapter II, the chromatographic performance of C₁₈ superficially porous columns and of C₁₈ fully porous columns with different particle sizes were evaluated for analysis of psychotropic drugs by LC-MS/MS and LC-DAD. Within the LC-MS/MS system, the following chromatographic parameters were assessed: reduced plate height *vs* reduced linear velocity, impedance *vs* reduced linear velocity, chromatographic run time *vs* flow rate, backpressure *vs* flow rate, resolution, peak capacity, asymmetry, and retention factor. Within the LC-DAD system, hydrophobicity, silanol activity, and metal impurities were also examined. Columns with charged surface displayed improved chromatographic efficiency for drugs in the ionized form. Columns with particles smaller than 2 µm (Cortecs 1.6 µm, Acquity 1.7 µm, and Kinetex 1.7 µm) presented higher chromatographic efficiency for the drugs, which were in their partially ionized form. The generated mathematical models were able to predict the backpressure and the chromatographic run time at different flow rates for all the columns. Considering efficiency, impedance, resolution, peak capacity, retention factor, and hydrophobicity, columns Cortecs 1.6 µm and Acquity 1.7 µm provided the best performance during analysis of drugs in plasma samples.

Chapter III describes the development and validation of the SPME-UHPLC-MS/MS and the Bio-SPME-Nano-ESI-MS/MS methods for determination of endocannabinoids (AEA and 2-AG) in biological samples. To optimize the SPME process, SPME coatings (C₁₈, C₃₀, and HLB) and solvents for desorption (methanol, acetonitrile, and isopropanol) were evaluated. Matrix modifier additives, such as guanidine hydrochloride, trifluoroacetic acid, and acetonitrile, were assessed by experimental design. The SPME-UHPLC-MS/MS and the Bio-SPME-Nano-ESI-MS/MS methods with HLB biocompatible coating provided LOQ values of 1 ng mL⁻¹ and 50 ng mL⁻¹, respectively, for both endocannabinoids. The Bio-SPME-Nano-ESI-MS/MS method allowed direct coupling of SPME fibers to the mass spectrometer by desorption/ionization nanoelectrospray, which resulted in rapid quantitative determinations of endocannabinoids in biological samples.

Key words: Schizophrenia, column switching, superficially porous columns, chromatographic parameters, endocannabinoids, SPME-UHPLC-MS/MS, Bio-SPME-Nano-ESI-MS/MS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Alguns fármacos utilizados no tratamento da esquizofrenia.	21
Figura 2. Representação esquemática do sistema “Column Switching” LC-MS/MS (Fonte (Chaves et al., 2011) – adaptado).	25
Figura 3. Sistema “Column Switching” em modo back-flush (reverso), destacando a configuração da válvula de seis pórticos.	32
Figura 4. Superfície de resposta para clozapina.	38
Figura 5. Diagrama de Pareto para clozapina.	40
Figura 6. Correlação dos valores observados com os valores previstos pelo modelo para clozapina.	41
Figura 7. Parâmetros de desabilidade estimado na condição ótima para todos os fármacos.	43
Figura 8. Superfície de resposta ótima (Derringer e Suich) para todos os fármacos.	44
Figura 9. Valores preditos pelo modelo vs valores experimentais.	44
Figura 10. Aumento da resposta pela adição de 0,1 % de ácido fórmico na condição obtida pelo planejamento experimental.	45
Figura 11. Cromatograma de íons totais (TIC) de amostra de plasma enriquecida com os fármacos de interesse (250 ng mL ⁻¹).	48
Figura 12. Avaliação da exclusão dos componentes endógenos.	49
Figura 13. Influência do pH da amostra (solução padrão de 50 ng mL ⁻¹) em água ultrapura e em solução acetato de amônio 4 mmol L ⁻¹ (diferentes pHs) para o método UHPLC-MS/MS no modo “Column Switching”.	50
Figura 14. Cromatogramas de íons totais (TIC-12 e 19 canais) da solução padrão de fármacos a 50 ng mL ⁻¹ no modo direto e inverso.	51
Figura 15. Cromatogramas UHPLC-MS/MS no modo “Column Switching” das amostras de plasma branco (sobrescrito na esquerda), e amostras de plasma enriquecidas com fármacos nas concentrações do LOQ.	58
Figura 16. Cromatogramas de monitorização de reações múltiplas, (a) injeção (5,0 µL) de amostra de plasma isenta de fármacos e (b) injeção de (5,0 µL) de água isenta de fármacos para infusão pós-coluna constante de solução padrão dos fármacos (1,0 µg mL ⁻¹) sobreposta com cromatogramas de íons totais (TIC) dos fármacos na concentração do CQM.	59
Figura 17. Ilustração de uma partícula superficialmente porosa (Fonte (Ali <i>et al.</i> , 2012) – adaptado).	77
Figura 18. Representação esquemática dos diferentes tipos de partículas superficialmente porosas (Fonte (Hayes <i>et al.</i> , 2014) – adaptado).	78
Figura 19. Ilustração do processo de síntese da camada porosa para as partículas superficialmente porosas (Fonte (Tanaka e McCalley, 2016) – adaptado).	79
Figura 20. Ilustração dos termos A, B e C da equação 2.	80
Figura 21. Diminuição do alargamento do pico devido ao menor volume da camada porosa... ..	82
Figura 22. Ilustração da eficiência e pressão de uma partícula superficialmente porosa relacionada as partículas totalmente porosas (Fonte (Rios, 2014) – adaptado).	83
Figura 23. Ilustração de silanol, isolado, germinal, vicinal e superfície siloxano (Fonte (Del Rosal <i>et al.</i> , 2015) – adaptado).	85
Figura 24. Variação da temperatura em função de <i>h</i> para (a) Olanzapina e (b) Diazepam.	93
Figura 25. Variação da pressão do sistema cromatográfico (a) e modelo de regressão de potência para o <i>t_R</i> vs vazão (b) para o Diazepam.	95
Figura 26. Cromatogramas UHPLC-MS/MS (TIC) para as colunas (a) Kinetex 1,3 µm e (b) Acquity 1,7 µm, FM: (A) 4 mmol L ⁻¹ solução de acetato de amônio (com 0,1 % de ácido fórmico) e (B) acetonitrila (63:37 v/v) e vazão 0,3 mL min ⁻¹	96
Figura 27. Gráficos <i>h</i> vs vazão para a olanzapina (a) e Diazepam (b). Na parte (c) a variação da impedância em função da velocidade linear da fase móvel.	101

Figura 28. Estrutura molecular dos endocanabinóides AEA, 2-AG e 1-AG (Fonte (Zoerner <i>et al.</i> , 2011) – adaptado).....	112
Figura 29. Processo de extração com SPME (Fonte (Pawliszyn, 2011) – adaptado).	117
Figura 30. Ilustração do processo de dessorção/ionização por Bio-SPME-Nano-ESI-MS/MS (Fonte (Gomez-Rios <i>et al.</i> , 2016) – adaptado).....	121
Figura 31. (a) Cromatograma de íons totais (TIC) da solução padrão de AEA e 2-AG (100 ng mL ⁻¹) (b) e amostra de plasma enriquecida com solução padrão de AEA e 2-AG (100 ng mL ⁻¹).	128
Figura 32. Comparação entre plasma fortificado com solução padrão de AEA e 2-AG (100 ng mL ⁻¹) deixado durante a noite e apenas 3 horas.	130
Figura 33. Estabilidade dos endocanabinóides (100 ng mL ⁻¹) em diferentes solventes.....	131
Figura 34. Estabilidade dos endocanabinóides (100 ng mL ⁻¹ em metanol) em diferentes temperaturas.	132
Figura 35. Comparação entre os revestimentos com partículas C ₁₈ , C ₃₀ e HLB.	133
Figura 36. Comparação entre diferentes soluções de dessorção para os revestimentos de HLB e C ₃₀ . As misturas de dois solventes foram preparadas nas proporções 50:50 (v/v).....	134
Figura 37. Avaliação de diferentes modificadores de matriz através da extração de AEA e 2-AG utilizando fibras SPME revestidas com C ₃₀ e HLB. Gu-HCl (6 mmol L ⁻¹) (2:1, v/v), TFA 0.1% e acetonitrila 100 µL.	135
Figura 38. Superfície ótima de contorno (Dering and Suich) para AEA e 2-AG(s).	138
Figura 39. Parâmetros de desejabilidade estimado na condição ótima para AEA e 2-AG(s). ..	138
Figura 40. Comparação entre a extração dos endocanabinóides de plasma sem adição de modificador de matriz e com a adição de modificador na condição otimizado pelo planejamento experimental.	139
Figura 41. Perfil do tempo de extração para os endocanabinóides em plasma.	140
Figura 42. Curva de calibração (adição de padrão) para AEA e 2-AG(s) em amostra de plasma (a) e curva de calibração em PBS com albumina (36 mg mL ⁻¹) (b) para o método SPME-UHPLC-MS/MS. O triângulo alaranjado é correlacionado com a concentração do padrão interno.	142
Figura 43. Curva de calibração (adição de padrão) para AEA e 2-AG(s) em amostra de plasma para o método Bio-SPME-Nano-ESI-MS/MS. O triângulo alaranjado é correlacionado com a concentração do padrão interno.....	143
Figura 44. Fluxo analítico para ambos os métodos desenvolvidos para análise de endocanabinóides.	144
Figura 45. Amostragem em cérebro de vaca <i>ex vivo</i>	146
Figura 46. Perfil do equilíbrio de sorção dos endocanabinóides em amostra de cérebro de vaca homogeneizado.	147
Figura 47. Cromatograma de íons totais (TIC) de cérebro de vaca (a), cérebro de vaca homogeneizado (b) e plasma (c). Para todas as análises não foi adicionado soluções padrão.	148
Figura 48. Espetrômetro de massas com mobilidade iônica (Sciex).....	150
Figura 49. “ <i>Tongrams</i> ” da otimização do SV e CoV para a separação dos isômeros 2-AG e 1-AG na concentração de 10 µg mL ⁻¹	151

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Métodos empregando a técnica LC-MS/MS para determinação de fármacos em fluidos biológicos	23
Tabela 2. Aplicações do sistema “column switching” RAM-LC online na determinação de fármacos em amostras biológicas.....	27
Tabela 3. Variáveis independentes e níveis de variação do planejamento central composto 2 ²	31
Tabela 4. Condições UHPLC-MS/MS no modo “Column Switching”.....	33
Tabela 5. Transição dos íons, configurações do instrumento e tempo de retenção para todos os fármacos	36
Tabela 6. Planejamento fatorial central composto 2 ² e resposta para clozapina	37
Tabela 7. Análise de variância (ANOVA) dos parâmetros de regressão para clozapina	39
Tabela 8. Função resposta dos fármacos e seus respectivos coeficientes de determinação	42
Tabela 9. Valores de fator de retenção, assimetria, altura do prato reduzido e capacidade de pico para as composições de FM obtidas pelo planejamento experimental e otimizada (adição de 0,1% de ácido fórmico)	47
Tabela 10. Equação linear, coeficiente de determinação, falta de ajuste e padrão interno para o método UHPLC-MS/MS no modo “Column Switching”	53
Tabela 11. Precisão e exatidão (inter e intraensaio) para amostras de plasmas enriquecidas em diferentes concentrações dos fármacos para o método UHPLC-MS/MS no modo “Column Switching”.....	54
Tabela 12. Avaliação do efeito de matriz para as amostras de controle de qualidade baixo (QCB) e alto (QCA) (n=5)	56
Tabela 13. O método proposto em comparação com outros métodos descritos na literatura. ...	61
Tabela 14. Níveis plasmáticos de psicotrópicos em amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos.....	62
Tabela 15. Representação para a avaliação dos parâmetros cromatográficos (Fonte (Visky <i>et al.</i> , 2002)).	84
Tabela 16. Principais características das colunas em fase reversa avaliadas	91
Tabela 17. Assimetria, resolução, capacidade de pico, fator de retenção e tempo de retenção para todas as colunas avaliadas com vazão de 0,3 mL min ⁻¹	98
Tabela 18. Hidrofobicidade, impureza metálica e atividade silanol para as colunas avaliadas	102
Tabela 19. Métodos recentes LC-MS para determinação de endocanabinóides em amostras biológicas	115
Tabela 20. Aplicações de SPME com fibras biocompatíveis para análises <i>in vivo</i>	120
Tabela 21. Parâmetros MS para todas as transições monitoradas	125
Tabela 22. Análise de variância para AEA	136
Tabela 23. Análise de variância para 2-AG(s)	137
Tabela 24. Coeficiente de correlação, equação linear, falta de ajuste, faixa de concentração e padrão interno para o método SPME-UHPLC-MS/MS em plasma e PBS	141
Tabela 25. Coeficiente de correlação, equação linear, falta de ajuste, faixa de concentração e padrão interno para o método Bio-SPME-Nano-ESI-MS/MS em amostra de plasma	143
Tabela 26. Parâmetros otimizados para monitoramento de cada endocanabinóide	152

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ	Velocidade linear
1-AG	1-Araquidonilglicerol
1D	Primeira coluna
2-AG	2-Araquidonilglicerol
2-AG(s)	2-AG + 1-AG
2D	Segunda coluna
3-AG	3-Araquidonilglicerol
AA	Ácido acético
ACN	Acetonitrila
AEA	Araquidonil etanolamida
AF	Ácido fórmico
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	Ionização química por pressão atmosférica
APG	Antipsicóticos de primeira geração
API	Ionização a pressão atmosférica
A_s	Assimetria do pico
ASG	Antipsicóticos de segunda geração
BSM	Bomba Binária
C_{18}	Octadecilsilano
C_{30}	Triacontilsilano
C_8	Octilsilano
CB_1	Receptor canabinóide tipo 1
CB_2	Receptor canabinóide tipo 2
CBD	Canabidiol
CID	Dissociação induzida por colisão
CoV	Voltagem de compensação
CQA	Controle de qualidade alto
CQB	Controle de qualidade baixo
CQM	Controle de qualidade médio
CS	<i>Column switching</i>
CSH	Superfície híbrida carregada

CV	Coeficiente de Variação
DC	Corrente continua
D_m	Coeficiente de difusão
DMS-MS/MS	Espectrômetro de massas com mobilidade iônica
d_p	Diâmetro da partícula
DPR	Desvio padrão relativo
E	Impedância
EC	Energia de colisão
eCB	Endocanabinóides
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EPEA	Eicosapentaenoil-etanolamida
EPR	Erro padrão relativo
ESI	Ionização eletrospray
ESI	Eletrospray
F	Valor de F calculado
FD	Detector de fluorescência
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FE	Fase estacionária
FMN	Fator de matriz normalizada por padrão
GABA	Ácido γ -aminobutírico
gl	Graus de liberdade
GPCR	Proteínas-G receptoras acopladas específicas
Gu-HCl	Cloridrato de guanidina
H	Altura do prato
h	Altura do prato reduzida
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HLB	Balanco hidrofílico-lipofílico
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IPA	Isopropanol
k	Fator de retenção
LC-DAD	Cromatografia líquida acoplada ao detector de arranjo de diodos
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em <i>tandem</i>
LEA	Linoleil-etalonamina

LLE	Extração Líquido-Líquido
LNEA	α -linoleil-etanolamina
LOQ	Limite de quantificação
LPME	Micro extração em fase líquida
LSQ	Limite superior de quantificação
m/z	Razão massa-carga
MeOH	Metanol
MRM ³	Monitoramento de reações múltiplas com três transições
MS	Espectrometria de massa
MS/MS	Espectrometria de massas sequencial
N	Número de pratos teóricos
η	Viscosidade cinemática da fase móvel
NADA	Araquidonil-dopamina
OEA	Oleil-etalonamida
Ox1	Oxilipinas
p	Nível de significância
PAN	Poliacrilonitrila
PBS	Solução tampão de fosfato
P_c	Capacidade de pico
PEA	Palmitoil-etalonamida
PI	Padrão Interno
PMME	Micro extração com polímero monolítico
PPT	Precipitação de proteínas
QM	Quadrado médio
QSM	Bomba Quaternária
R	Coeficiente de correlação
R^2	Coeficiente de determinação
RF	Rádio frequência
RP	Fase reversa
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
R_s	Resolução cromatográfica
SDME	Micro extração em gota única
SEA	Estearoil-etanolamida

SFME	Micro extração em fluxo lento
SPE	Extração em fase sólida
SPME	Micro extração em fase sólida
SQ	Soma dos quadrados
SRM	Monitoramento de reações selecionadas
SV	Voltagem de separação
TDM	Monitorização Terapêutica
TEOS	Trietoxisilano
TFA	Ácido trifluoroacético
THC	Δ^9 – tetra-hidrocanabinol
TIC	Cromatograma de íons totais
t_R	Tempo de retenção
UV	Detector de ultravioleta
V	Velocidade linear reduzida
VC	Voltagem do cone
V_s	Volume molar
w_b	Larguras de base
ΔP	Variação de Pressão

Sumário

1. INTRODUÇÃO GERAL	14
Capítulo I.....	17
1. INTRODUÇÃO	19
1.1 Esquizofrenia.....	19
<i>1.1.1 Conceitos e etiologia da esquizofrenia</i>	<i>19</i>
<i>1.1.2 Antipsicóticos e a esquizofrenia.....</i>	<i>19</i>
1.2 Metodologias LC-MS/MS para a determinação de fármacos em fluidos biológicos.....	22
1.3 Sistema LC-MS/MS no modo “Column Switching”	24
2. OBJETIVOS	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1 Padrões analíticos, reagentes e materiais.....	29
3.2 Pacientes esquizofrênicos – amostras de plasma	29
3.3 Armazenamento do material biológico	30
3.4 Amostras de plasma branco	30
3.5 Condições UHPLC-MS/MS	30
3.6 Pré-tratamento da amostra de plasma.....	31
3.7 Otimização das condições UHPLC-MS/MS no modo “Column Switching”..	31
3.8 Validação analítica do método UHPLC-MS/MS no modo “Column Switching”	33
3.9 Amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos.....	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1 Otimização das condições do método UHPLC-MS/MS por precipitação de proteínas	36
<i>4.1.1 Otimização MS/MS</i>	<i>36</i>
<i>4.1.2 Otimização da composição da fase móvel UHPLC-MS/MS.....</i>	<i>37</i>
4.2 Otimização das condições do método UHPLC-MS/MS no modo “Column Switching”	47
<i>4.2.1 Otimização da etapa de pré-concentração dos fármacos na coluna C₈-ADS – ID.....</i>	<i>47</i>
4.3 Validação analítica.....	52
<i>4.3.1 Linearidade, precisão e exatidão</i>	<i>52</i>
<i>4.3.2 Efeito residual.....</i>	<i>56</i>

4.3.3 Efeito de matriz	56
4.4 Determinação dos fármacos pelo método UHPLC-MS/MS em modo “ <i>Column Switching</i> ” em amostra de plasma de pacientes esquizofrênicos.....	60
5. CONCLUSÃO.....	63
6. REFERÊNCIAS	64
ANEXO.....	73

Capítulo II 74

1. INTRODUÇÃO	76
1.1 Colunas analíticas (HPLC) recheadas com partículas totalmente e superficialmente porosas.....	76
1.2 Síntese das partículas superficialmente porosas	77
1.3 Parâmetros cromatográficos das partículas totalmente e superficialmente porosas	79
1.4 Comparação dos aspectos cromatográficos entre partículas totalmente e superficialmente porosas.....	81
1.5 Parâmetros de avaliação das colunas.....	83
1.5.1 Eficiência cromatográfica.....	83
1.5.2 Hidrofobicidade	84
1.5.3 Atividade Silanol.....	84
1.5.4 Impurezas metálicas.....	85
1.6 A avaliação de colunas totalmente e superficialmente porosas na determinação de fármacos em amostras biológicas.....	85
2. OBJETIVOS	87
3. MATERIAIS E MÉTODOS	88
3.1 Reagentes e padrões cromatográficos	88
3.2 Amostras de plasma.....	88
3.3 Preparo das amostras de plasma para análises LC-MS/MS.....	89
3.4 Soluções padrão para análises LC-DAD.....	89
3.5 Análises LC-MS/MS	89
3.6 Análises LC-DAD.....	90
3.7 Parâmetros cromatográficos.....	90
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	93
4.1 Pressão e tempo total de análise	93
4.2 Altura do prato reduzido, impedância, assimetria, resolução, capacidade de pico, fator de retenção e tempo de retenção	97

4.3 Hidrofobicidade, impureza metálica e atividade silanol	101
5. CONCLUSÃO.....	104
6. REFERÊNCIAS	105

Capítulo III 110

1. INTRODUÇÃO	112
1.1 Principais endocanabinóides.....	112
1.2 Doenças neurológicas.....	113
1.3 Determinação de endocanabinóides por LC-MS/MS em amostras biológicas	114
1.4 Técnica de microextração em fase sólida (SPME)	117
1.4.1 Conceitos SPME.....	117
1.4.2 Fibras SPME biocompatíveis.....	118
1.4.3 Bio-SPME-Nano-ESI-MS/MS	120
2. OBJETIVOS	122
3. MATERIAIS E MÉTODOS	123
3.1 Padrões e reagentes.....	123
3.2 Amostras de plasma.....	124
3.3 Procedimento de SPME.....	124
3.4 Otimização do modificador de matriz para amostras de plasma.....	124
3.5 Análises em amostra de cérebro de vaca	124
3.6 Análises por SPME-UHPLC-MS/MS	125
3.7 Análises por acoplamento direto Bio-SPME-Nano-ESI-MS/MS	126
3.8 Análises por espectrometria de massas com mobilidade iônica	126
3.9 Validação analítica.....	127
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	128
4.1 Análises por SPME-UHPLC-MS/MS	128
4.2 Estabilidade dos endocanabinóides	130
4.3 Escolha do revestimento, solução de dessorção e modificador de matriz....	133
4.4 Validação analítica.....	140
4.4.1 SPME-UHPLC-MS/MS.....	140
4.4.2 Bio-SPME-Nano-ESI-MS/MS	142
4.5 Comparação das metodologias desenvolvidas.....	144
4.6 Perspectivas futuras.....	146
4.6.1 Análises em cérebro de vaca e cérebro de vaca homogeneizado	146

4.6.2 Testes preliminares utilizando mobilidade iônica	149
5. CONCLUSÃO.....	153
6. REFERÊNCIAS	154

1. INTRODUÇÃO GERAL

As amostras biológicas, em razão da complexidade, não têm sido inseridas diretamente em sistemas cromatográficos. Componentes endógenos indesejáveis podem interferir nas análises de forma significativa através da coeluição com os analitos ou sorção na coluna analítica (de forma irreversível). A adsorção, principalmente de macromoléculas à fase estacionária das colunas, diminui o tempo de vida útil das mesmas ou modifica a retenção dos analitos. Já no espectrômetro de massas, esses interferentes podem suprir ou aumentar o sinal iônico, ocasionando medidas errôneas.

Para minimizar esses efeitos, técnicas eficientes de preparo de amostra têm sido requeridas para eliminar grande parte destes componentes endógenos, pré-concentrar os analitos, aumentando a seletividade e detectabilidade do método desenvolvido.

Na área da química analítica, o preparo de amostra tem sido convergido para o desenvolvimento de métodos automatizados que minimizam erros aleatórios e miniaturização dos sistemas analíticos. Neste contexto, destacamos as técnicas “*Column switching*” e de microextração, como a microextração em fase sólida (“*solid phase microextraction*” – SPME) que permitem a minimização do volume da amostra biológica e dos solventes orgânicos, facilitando o acoplamento com sistemas analíticos.

Com o intuito de propiciar melhor entendimento das metodologias desenvolvidas, a tese foi dividida em três capítulos. Cada capítulo foi dividido em uma breve introdução contendo a relevância do tema, os objetivos que estimularam o desenvolvimento do trabalho, materiais e métodos descrevendo como foi realizado cada trabalho, resultados e discussão sobre os resultados obtidos e sua relevância para a ciência, e a conclusão finalizando o trabalho.

O capítulo I corresponde a primeira parte do projeto FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo). Dentre as atividades realizadas, as condições cromatográficas da técnica de cromatografia líquida de ultra eficiência (“*Ultra-High Performance Liquid Chromatography*” – UHPLC), foram otimizadas a partir de técnicas quimiométricas para a determinação de fármacos em amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos. Um planejamento composto central 2^2 foi utilizado para estudar os efeitos de variáveis independentes: porcentagem de acetonitrila e concentração de solução tampão acetato de amônio (mmol L^{-1}) na proporção da fase móvel (v/v) a fim de se obter a maior resposta analítica (área dos analitos).

Na primeira dimensão do sistema “column switching” foi utilizado uma coluna de material de acesso restrito (“*Restricted Access Material*” – RAM) para sorção seletiva

dos fármacos e exclusão dos componentes endógenos da amostra biológica e na segunda dimensão uma coluna com fase reversa para a separação cromatográfica e posterior detecção MS/MS. O método de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas em *tandem* (“*Ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry*” – UHPLC-MS/MS) no modo “*Column Switching*” foi validado com amostras de plasma enriquecidas com os analitos segundo normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (RDC n.º 27 de maio de 2012). Este método foi aplicado com sucesso na determinação de fármacos de diferentes classes em amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos para fins de monitorização terapêutica. Esse trabalho foi publicado na revista *Bioanalysis* com o título “*Column switching UHPLC-MS/MS with restricted access material for the determination of CNS drugs in plasma samples*” (Acquaro, V. R. *et al.*, 2017).

No capítulo II, através da análise de fármacos em amostra de plasma foi realizado um estudo comparativo do desempenho cromatográfico das colunas superficialmente porosas (core-shell) [Kinetex® C₁₈ 1,7 µm (100 mm x 2,1 mm); Kinetex® C₁₈ 1,3 µm (50 mm x 2,1 mm); Cortecs® C₁₈+ 2,7 µm (100 mm x 2,1 mm); Cortecs® C₁₈+ 1,6 µm (100 mm x 2,1 mm)] e as colunas totalmente porosas [XSelect® C₁₈ CSH 2,5 µm (100 mm x 2,1 mm) e Acquity® C₁₈ CSH 1,7 µm (100 mm x 2,1 mm)].

Com o sistema LC-MS/MS foram avaliados os seguintes parâmetros cromatográficos: altura do prato reduzido vs velocidade linear reduzida, impedância vs velocidade linear reduzida, tempo da corrida cromatográfica vs vazão, pressão vs vazão, resolução, capacidade de pico, assimetria e fator de retenção. Já com o sistema LC-DAD foram avaliados a hidrofobicidade, atividade silanol e impurezas metálicas também foram avaliadas. Esse trabalho foi publicado na revista *Journal of Chromatography B* com o título “*Evaluation of superficially porous and fully porous columns for analysis of drug in plasma samples by UHPLC-MS/MS*” (Acquaro, V. R. J. *et al.*, 2017).

O capítulo III corresponde ao trabalho intitulado “*Determinação de anandamida e 2-araquidonil glicerol em amostras de plasma por Bio-SPME-Nano-ESI-MS/MS*” desenvolvido na Universidade de Waterloo no Canadá, durante o estágio BEPE (Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior) sob a supervisão do Prof. Dr. Pawliszyn. Para a realização desse trabalho foi desenvolvido primeiramente um método SPME-UHPLC-MS/MS para fins de otimização das etapas de extração e detecção dos endocanabinóides.

A partir desse método foram otimizados a composição da fase móvel, permitindo assim, a separação de todos os endocanabinóides, inclusive isômeros. Além disso, foram

estudados diferentes revestimentos (C₁₈, C₃₀ e HLB) como fase extratora e a utilização de modificadores de matriz.

A estabilidade dos endocanabinóides em diferentes solventes e a prevalência dos isômeros em amostras de plasma e amostras de tecido (cérebro de vaca) também foi avaliada. O método com fibra SPME biocompatível diretamente acoplada no espectrômetro de massas e ionização via nanoeletrospray ("*Bio-compatible SPME direct coupled to mass spectrometry via nanoelectrospray ionization*" – Bio-SPME-Nano-ESI-MS/MS) foi desenvolvido e comparado com o método utilizando fibra SPME biocompatível para cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas em *tandem* ("*Bio-compatible SPME coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry*" – SPME-UHPLC-MS/MS).

Ambos métodos foram validados de acordo com diretrizes internacionais como FDA ("*Food and Drug Administration*") e EMA ("*European Medicines Agency*"). Por fim, testes preliminares em amostra de cérebro de vaca e a utilização de um espectrômetro de massas com mobilidade iônica, demonstram as perspectivas futuras para utilização dessa técnica em análises *in vivo* com alto poder de seletividade e detectabilidade.

CAPÍTULO I

CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA
ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM *TANDEM* (UPLC-
MS/MS) NO MODO “*COLUMN SWITCHING*” PARA
DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS EM AMOSTRAS DE PLASMA DE
PACIENTES ESQUIZOFRÊNICOS

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

1.1 Esquizofrenia

1.1.1 Conceitos e etiologia da esquizofrenia

A esquizofrenia é um transtorno mental de alta complexidade que afeta aproximadamente 1% da população mundial (Cunningham e Peters, 2014; Millan *et al.*, 2014). É uma doença crônica e debilitante, caracterizada por vários sintomas como, diminuição das capacidades mentais (embotamento emocional), alucinações (percepções irreais, sobretudo auditivas) e delírios. Esta patologia, na maioria dos casos, manifesta-se no adulto jovem (final da adolescência, em homens e mulheres), e raramente, antes da puberdade ou acima dos 50 anos (Tandon *et al.*, 2013; Cunningham e Peters, 2014).

As atuais evidências relativas às causas da esquizofrenia são um mosaico. Porém, há consenso em atribuir a desorganização da personalidade às interações de variáveis culturais, psicológicas e biológicas, entre as quais se destacam as de natureza genética (Rahmoune *et al.*, 2013; Sadock *et al.*, 2017). Teorias genéticas, neurobiológicas e psicanalíticas foram desenvolvidas para elucidar surgimento deste distúrbio neurológico. No entanto, nenhuma destas teorias, isoladamente, descreve satisfatoriamente, a origem da esquizofrenia, reforçando assim a ideia de uma etiologia multifatorial (Sun *et al.*, 2013; Sadock *et al.*, 2017).

Os sintomas apresentados pela esquizofrenia têm sido divididos em positivos e negativos. Os positivos são comportamentos psicóticos, geralmente não vistos em pessoas saudáveis (principalmente, pensamentos irreais, delírios e mania de perseguição). Já os sintomas negativos estão associados a perturbações das emoções e comportamentos normais, tais como desânimo, incapacidade de planejamento e execução de atividades. Estes sintomas são mais difíceis de reconhecer como parte do distúrbio e podem ser confundidos com depressão. Comumente esses sintomas aparecem de forma gradual, entretanto em alguns casos podem ser manifestados de forma repentina em surtos psicóticos (Tandon *et al.*, 2013).

1.1.2 Antipsicóticos e a esquizofrenia

Ao lado do importante papel da psicoterapia e do ambiente social, a farmacoterapia atenua, significativamente, os sintomas da doença. A farmacoterapia

exata, dificilmente, é encontrada. Geralmente, os sistemas terapêuticos são complexos, com associações de fármacos de diferentes classes.

A descoberta dos antipsicóticos de primeira geração (APG) ou típicos, na década de 1950, originou grande benefício para pacientes esquizofrênicos, com o controle dos sintomas psicóticos e, como consequência, a possibilidade de tratamento em regime ambulatorial e redução da permanência hospitalar e do número de internações (Hegarty *et al.*, 1994).

As teorias do mecanismo de ação dos antipsicóticos de primeira geração (APG) no sistema dopaminérgico surgiram na década de 1960. Em 1970 e nas décadas subsequente (1980 e 1990) o papel da dopamina na psicose ficou mais firmemente confirmado por estudos de neuroimagem (Kapur *et al.*, 2006). Entretanto, não existe dúvida que o mecanismo fisiopatológico da esquizofrenia é mais complexo que apenas o aumento nos níveis de dopamina (Krystal *et al.*, 2005). A maioria dos antipsicóticos age como antagonistas nos receptores D₂ da via mesolímbica (reduz sintomas positivos) ou na via mesocortical (reduz sintomas negativos), porém o bloqueio do receptor D₂ (causa sintomas extrapiramidais) e via tuberoinfundibulares (causa hiperprolactinemia) também podem ocorrer (Vallianatou, 2012).

Os antipsicóticos de primeira geração são classificados como convencionais ou típicos e apresentavam bastante eficácia no controle dos sintomas positivos presentes na esquizofrenia, porém a mesma eficácia não era obtida quanto aos efeitos negativos. Assim, em 1990 foram introduzidos os antipsicóticos de segunda geração (ASG) ou atípicos, que bloqueiam não somente os receptores dopaminérgicos D₂, mas também os receptores serotoninérgicos 5-HT₂, α 1-adrenérgicos, H1-Histamina e muscarínicos, diminuindo os sintomas extrapiramidais e promovendo melhora nos efeitos afetivos e cognitivos (Vallianatou, 2012).

Dentre os antipsicóticos atípicos podemos destacar a clozapina, olanzapina, quetiapina, risperidona e ziprasidona. Estes fármacos têm sido largamente utilizados no tratamento da esquizofrenia, pois comparados com os típicos, apresentam diferente mecanismo de ação e brandos efeitos adversos (Park e Kuntz, 2014).

O intervalo terapêutico é utilizado de forma efetiva para estabelecer a dosagem terapêutica de um medicamento. Desta forma, o intervalo terapêutico compreende a faixa entre a concentração mínima e máxima do fármaco na qual é observada a eficácia terapêutica. Concentrações acima deste intervalo implicam em efeitos tóxicos ao paciente e concentrações abaixo o fármaco não possui eficiência no tratamento. A extensão do

intervalo varia entre os fármacos (Mizuno *et al.*, 2012; Yilmaz *et al.*, 2012). Uma ideia lógica seria a diminuição da dosagem durante a etapa de manutenção, entretanto ainda há debates se a dose poderia ser reduzida sem perda dos efeitos clínicos (Wang *et al.*, 2010).

Além dos antipsicóticos, grande parte dos pacientes também faz uso concomitante de outras classes de fármacos, tais como antidepressivos, anticonvulsivantes e ansiolíticos, para diminuir os sintomas associados à doença.

Alguns dos fármacos utilizados no tratamento da esquizofrenia podem ser visualizados na Figura 1.

Figura 1. Alguns fármacos utilizados no tratamento da esquizofrenia.

No entanto, não há evidências quanto à eficácia dessa terapia empírica, em relação à monoterapia. Alguns consideram que associações, especialmente de risperidona, olanzapina, quetiapina e ziprasidona são bem toleradas e podem ser mais eficazes no tratamento da esquizofrenia refratária, ao passo que outros autores são mais cautelosos

devido à falta de estudos bem controlados ou da evidência de prejuízo como, por exemplo, mortalidade aumentada.

Assim, a monitorização terapêutica (“*Therapeutic drug monitoring*” – TDM) se tornou uma poderosa ferramenta clínica para auxiliar no ajuste das doses terapêuticas, minimizar os efeitos adversos, as respostas desfavorável ao tratamento, as interações farmacocinéticas e até mesmo a baixa adesão do paciente ao tratamento (Queiroz e Melo, 2014; Widmer *et al.*, 2014), (Juenke *et al.*, 2013). A farmacoterapia, apesar das vantagens, ainda é falha em aproximadamente um terço dos pacientes, devido principalmente aos efeitos adversos, inadequado controle das convulsões ou combinação de ambas (Martinc *et al.*, 2014).

Consequentemente, a análise dos fármacos utilizados no tratamento da esquizofrenia em amostras de plasma é importante para ajustar as doses, minimizar os efeitos adversos e verificar a anuência do paciente à terapia.

1.2 Metodologias LC-MS/MS para a determinação de fármacos em fluidos biológicos

Nos últimos anos, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, sistema tandem, (“*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*” – LC-MS/MS) com ionização por eletrospray (“*Electrospray Ionization*” – ESI) tem se tornado a técnica analítica de referência para fármacos (antipsicóticos, antidepressivos, anticonvulsivantes e ansiolíticos) em fluidos biológicos (Tabela 1).

Tabela 1. Métodos empregando a técnica LC-MS/MS para determinação de fármacos em fluidos biológicos

Analitos	Preparo da amostra	Análise LC-MS/MS	Limite quantificação	Referências
Carbamazepina, Lamotrigina e Ácido valpróico	Sangue seco -	Fase reversa FM – Acetato de amônio (10 mmol L ⁻¹), MeOH ESI+	0,25 ng mL ⁻¹ 0,25 ng mL ⁻¹ 5,0 ng mL ⁻¹	(Linder <i>et al.</i> , 2015)
		Fase reversa FM – Acetato de amônio (pH 3, 20 mmol L ⁻¹), ACN ESI+	0,2 e 0,5 ng mL ⁻¹	
		Fase reversa FM – Acetato de amônio (10 mmol L ⁻¹), ACN ESI+	0,8-60 ng mL ⁻¹	
Vortioxetina e metabolito (Lu AA34443)	Plasma SPE	Fase reversa FM – Acetato de amônio (pH 3, 20 mmol L ⁻¹), ACN ESI+	0,2 e 0,5 ng mL ⁻¹	(Kall <i>et al.</i> , 2015)
11 antipsicóticos e 5 metabolitos	Fluído oral LLE	Fase reversa FM – Acetato de amônio (10 mmol L ⁻¹), ACN ESI+	0,8-60 ng mL ⁻¹	(Patteet <i>et al.</i> , 2016)
Lamotrigina, Topiramato, Levetiracetam e Oxcarbazepina	Plasma PPT	Fase reversa FM – Água + 0,1% AF, MeOH ESI+	0,20 µg mL ⁻¹	(Dupouey <i>et al.</i> , 2016)
Carbamazepina, CBZ-E e 10-OH-CBZ	Soro PPT	Fase reversa FM – Água + 0,1% AF, ACN + 0,1% AF ESI+	0,1 µg mL ⁻¹	(Taibon <i>et al.</i> , 2017)
Triptófano, Quinurenina e Ácido quinurênico	Soro PPT	Fase reversa FM – Formiato de amônio (5 mmol L ⁻¹), Água e MeOH ESI+	1,0 µg mL ⁻¹ 100 ng mL ⁻¹ 1,0 ng mL ⁻¹	(Hu <i>et al.</i> , 2017)
Fluoxetina Risperidona e 9-OH-Risperidona	Plasma de rato PPT	Fase reversa FM – Acetato de amônio (0,25 mol L ⁻¹) + 0,1% AF, ACN + 0,1% AF ESI+	0,2-1,0 ng mL ⁻¹	

Continua...

Continuação da Tabela 1

Analitos	Preparo da amostra	Análise LC-MS/MS	Limite quantificação	Referências
Risperidona, Aripiprazol, Pipamperona, 9-OH-Risperidona e Dehidro-aripiprazol	Sangue seco -	Fase reversa FM – Acetato de amônio (2 mmol L ⁻¹) + 0,1% AF, ACN ESI+	2,0-10 ng mL ⁻¹	(Tron <i>et al.</i> , 2017)
Dexmedetomidina	Plasma SPE	Fase reversa FM – Água + 0,1% AF, ACN ESI+	0,5 ng mL ⁻¹	(Moosavi <i>et al.</i> , 2018)
Ácido valpróico e 5 metabolitos	Plasma LLE	Fase reversa FM – Acetato de amônio (10 mmol L ⁻¹), ACN ESI+	0,1-10 µg mL ⁻¹	(Wen <i>et al.</i> , 2018)

SPE = extração em fase sólida, LLE = extração líquido-líquido, PPT = precipitação de proteínas, FM = fase móvel, ACN = acetonitrila, MeOH = metanol, ESI = ionização por eletrospray, Lu AA34443 = 3-metil-4-(2-piperazina-1-il-fenil sulfanil)-ácido benzóico, AF = Ácido fórmico, CBZ-E = Carbamazepina-10, 11-epoxido, 10-OH-CBZ = 10,11-dihidro-10-hidroxi-carbamazepina.

1.3 Sistema LC-MS/MS no modo “Column Switching”

As amostras biológicas contêm vários interferentes, como as proteínas e fosfolipídeos, os quais podem suprimir a ionização dos analitos durante processo de ionização à pressão atmosférica (“*Atmospheric Pressure Ionization*” – API), coeluir com os analitos durante a separação cromatográfica ou até mesmo adsorver junto à coluna analítica de forma irreversível, diminuindo assim a vida útil da coluna e modificando a retenção dos analitos. Portanto, as amostras biológicas não podem ser injetadas diretamente em sistemas cromatográficos. A etapa de preparo da amostra se faz necessário para o desenvolvimento de métodos cromatográficos, eliminando as macromoléculas e pré-concentrando os analitos, quase sempre presentes em níveis de traços (Queiroz e Melo, 2014).

A técnica LC-MS/MS no modo “*Column Switching*” permite a injeção direta de amostras biológicas com simples pré-tratamento, geralmente, diluição com solução tampão. A instrumentação LC-MS/MS no modo “*Column Switching*” utiliza sistemas de cromatografia líquida convencionais (*Liquid Chromatography* – LC), com uma bomba

de alta pressão extra e uma válvula de seleção com várias vias para conectar as duas colunas (Kataoka e Saito, 2012; Peng *et al.*, 2016). Geralmente, a amostra é injetada (manualmente ou com o auxílio de um injetor automático) em uma coluna da 1D (primeira coluna) usando uma fase móvel fraca (diferente polaridade da fase estacionária). Os analitos são pré-concentrados na coluna 1D e os interferentes da matriz (macromoléculas) são eluídos para o descarte. Os analitos são eluídos para a coluna 2D (segunda coluna), por uma simples troca de posição da válvula, usando o mesmo eluente ou outro de maior força (polaridade similar da fase estacionária) (Figura 2) (Kataoka e Saito, 2012; Fernández-Ramos *et al.*, 2014).

Figura 2. Representação esquemática do sistema “*Column Switching*” LC-MS/MS (Fonte (Chaves *et al.*, 2011) – adaptado).

Métodos “*Column Switching*” reduzem o número de etapas no preparo de amostra, muitas vezes tediosas, eliminam interferentes presentes na amostra e promovem a pré-concentração dos analitos alvo. Adicionalmente, reduzem a possibilidade de contaminação da amostra bem como sua perda durante as várias etapas no preparo de amostra em métodos tradicionais, aumenta a frequência analítica e diminui a exposição do analista aos fluidos biológicos (Souverain *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2011); (Kataoka e Saito, 2012; Pan *et al.*, 2014; Queiroz e Melo, 2014; Peng *et al.*, 2016).

Dentre as fases seletivas utilizadas nos sistemas *column switching*, podemos destacar as colunas de fluxo turbulento (Crutchfield *et al.*, 2016; Herviou *et al.*, 2016; Shin *et al.*, 2016), as monolíticas (Caris *et al.*, 2012; Domingues *et al.*, 2015; Mizuno e Kataoka, 2015), polímeros molecularmente impressos (Xu *et al.*, 2010; Moraes *et al.*,

2013), e materiais de acesso restrito (Eckert e Göen, 2014; Fagundes *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2014).

Os materiais de acesso restrito (*“Restricted Access Material”* – RAM) combinam os princípios da cromatografia de exclusão e da cromatografia em fase reversa. A superfície hidrofílica evita a adsorção de macromoléculas da matriz biológica e as partículas hidrofóbicas (C₈ ou C₁₈) são responsáveis pela concentração (partição) das micromoléculas (Souverain *et al.*, 2004).

A exclusão das macromoléculas pode ocorrer por barreira de difusão física (diâmetro do poro), impedindo a adsorção de moléculas maiores de 20,000 Da (como albumina, 65,000 Da), (Souverain *et al.*, 2004). A exclusão também pode ocorrer por barreira de difusão química por cadeia polimérica semipermeável na superfície da partícula (ex. polímero de polioxietileno) (Desilets *et al.*, 1991), proteína revestida na superfície da partícula (ex. albumina) (Hermansson e Grahm, 1994) e por material funcional de modo misto (ex. polioxietileno e estireno) ligados na superfície da partícula (Kanda *et al.*, 1994). Ambos revestimentos de cadeia polimérica e proteína apresentam poros de 10 nm, enquanto que o revestimento de modo misto poros de 8 nm são obtidos. Todos revestimentos proporcionam a mesma finalidade impedindo a introdução de macromoléculas junto a fase interna (Souverain *et al.*, 2004).

A Tabela 2 ilustra algumas aplicações da metodologia RAM-LC *online* na análise de fármacos em amostras biológicas.

Tabela 2. Aplicações do sistema “*column switching*” RAM-LC *online* na determinação de fármacos em amostras biológicas

Analito	Fluído biológico	Material de acesso restrito	Coluna Analítica	Deteção	Referência
Peptídeos	Soro	SCX-RAM	C ₁₈	MS/MS	(Hu <i>et al.</i> , 2014)
Estatinas	Plasma	BSA e ADS	C ₁₈	UV	(Fagundes <i>et al.</i> , 2014)
Loratadina, Nifedipina, Diazepam e <i>p</i> -hidroxibenzaldeído	Leite bovino	ISRP-RAM e BSA	C ₁₈	UV	(Wang <i>et al.</i> , 2014)
Parabenos	Leite materno	RAMIP	C ₁₈	MS/MS	(Souza <i>et al.</i> , 2016)
Ivermectina	Carne de vaca	RAMIP-BSA	C ₁₈	UV	(De Lima <i>et al.</i> , 2016)
5 antipsicóticos, 7 antidepressivos, 2 ansiolíticos e 2 anticonvulsivantes	Plasma	C ₁₈ -BSA	C ₁₈	MS/MS	(Pinto <i>et al.</i> , 2017)
Anandamida e 2-AG	Plasma	C ₈ -ADS	C ₁₈	MS/MS	(Marchioni <i>et al.</i> , 2017)
Antidepressivos tricíclicos	Plasma	RAMIP-BSA	-	MS/MS	(Santos <i>et al.</i> , 2017)

UV = detector de ultravioleta, ADS = alquil diol sílica; BSA = albumina sérica bovina, ISRP = superfície interna da fase reversa, MIP = polímero molecularmente impresso, SCX = forte trocador de cátions

2. OBJETIVOS

Desenvolver e validar o método UHPLC-MS/MS no modo “*Column Switching*” com as colunas: RAM (sílica-alquildiol) na primeira coluna (1D) e fase reversa na segunda coluna (2D) para determinação simultânea de fármacos (antipsicóticos, antidepressivos, anticonvulsivantes e ansiolíticos) em amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos.

Aplicar o método desenvolvido em amostras reais de pacientes esquizofrênicos para fins de monitorização terapêutica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Padrões analíticos, reagentes e materiais

Os padrões analíticos de fármacos foram adquiridos da Cerilliant Corporation (Texas, USA). As soluções padrão estoque dos fármacos (Carbamazepina, Mirtazapina, Imipramina, Fluoxetina, Olanzapina, Clonazepan, Clorpromazina, Citalopram, Clozapina, Haloperidol, Lamotrigina, Diazepam, Sertralina, Clomipramina, Paroxetina, Quetiapina, Carbamazepina-d10, Imipramina-d3, Diazepam-d5, Sertralina-d3, Fluoxetina-d6, Clomipramina-d3, Clonazepan-d4, Citalopram-d6, Clozapina-d4, Paroxetina-d6, Haloperidol-d4 e Quetiapina-d8). Metanol (MeOH) e Acetonitrila (ACN), grau HPLC, acetato de amônio e ácido fórmico foram obtidos do fornecedor JT Baker (Phillipsburg, EUA). A fase móvel foi filtrada através de sistema de filtração à vácuo com membrana de celulose adquirida pela Millipore e degaseificada em banho de ultrassom por aproximadamente 15 minutos. A água utilizada para o preparo das soluções foi purificada pelo sistema Milli-Q, Millipore (São Paulo, Brasil) apresentando condutividade de 18,2 MΩ cm.

3.2 Pacientes esquizofrênicos – amostras de plasma

Os indivíduos esquizofrênicos participantes da pesquisa foram selecionados dentre os pacientes internados em tratamento na Enfermaria da Psiquiatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (EPQU-HCFMRP). Estes pacientes foram convidados a participar do estudo e incluídos após leitura e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido pelo paciente (TCLE) e seu responsável. Os pacientes participantes da pesquisa foram submetidos a uma única coleta de sangue para a determinação dos fármacos. O diagnóstico de esquizofrenia foi realizado pela equipe médica da EPQU-HCRP, sob supervisão do Prof. Dr. Jaime Eduardo Cecílio Hallak, seguindo os critérios do Manual Diagnóstico e Estatístico da Associação Psiquiátrica Americana – 4ª edição (Diagnostic and Statistical Manual – DSM IV).

As coletas das amostras foram realizadas no Ambulatório de Reabilitação Psicossocial (AREP) da Enfermaria de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (EPQU-HCFMRP), por enfermeiros qualificados e experientes, onde todos os procedimentos seguiram os protocolos de segurança com a utilização de material totalmente descartável. Este projeto

tem a participação de pacientes esquizofrênicos que ainda não realizaram estudos de monitorização terapêutica, pois na EPQU-HCFMRP tem um grande número de pacientes.

Os fármacos em análise, segundo testes de estabilidade no injetor automático (amostra pré-preparo) e nas condições de análise à temperatura ambiente mostraram-se estáveis. Segundo resultados descritos na literatura, os fármacos em análise presentes em amostras de plasma mostraram-se estáveis a durante seis meses-20 °C, assim como após três ciclos de congelamento/descongelamento (Hartman, 2003; Cooper e Negrusz, 2013; Breier *et al.*, 2014).

3.3 Armazenamento do material biológico

Após a coleta, as amostras foram centrifugadas a 3000 g durante 25 minutos em centrífuga refrigerada a 4 °C (Centrífuga 5810R, Eppendorf®). As amostras de plasma obtidas foram aliquotadas e congeladas à temperatura de 80 °C negativos até o momento da análise. Este projeto foi realizado segundo normas do Comitê e Ética em Pesquisa da FMRP – USP.

3.4 Amostras de plasma branco

As amostras de plasma branco, com sorologia negativa para hepatite B e C, HIV, chagas, HTLV I/II, TGP e sífilis, foram cedidas pelo HCFMRP – USP, as quais foram enriquecidas com concentrações conhecidas dos analitos para a otimização e validação do método UHPLC-MS/MS.

3.5 Condições UHPLC-MS/MS

As análises UHPLC-MS/MS foram realizadas em sistema UPLC Waters ACQUITY H-Class acoplado ao espectrômetro de massas Xevo® TQ-D com analisador de massas do tipo triplo quadrupolo e fonte Z-spray, operando em modo positivo (Waters Corporation, Milford, MA, USA). Utilizou-se N₂ a 600 °C como gás de dessolvatação e argônio como gás de colisão. A temperatura da fonte de ionização foi de 150 °C, voltagem do capilar 0,5 kV e fluxo de dessolvatação 600 L h⁻¹. Todos os dados foram adquiridos no modo de monitoramento de reação selecionadas (*“selected reaction monitoring”* – SRM) e para as transições MS/MS. Foi utilizado o software MassLynx V4.1. 3.

Para a otimização da composição da fase móvel, a concentração de acetonitrila na fase móvel e a concentração molar da solução de acetato de amônio foram avaliados segundo um planejamento fatorial central composto 2^2 em 5 níveis de variação, conforme a tabela 3. A variável dependente avaliada (resposta) foi a área dos fármacos. Foram realizados 10 experimentos: 4 nos pontos fatoriais (-1,+1); 4 nos pontos axiais (-1,41,+1,41) e 2 no ponto central (0,0), inteiramente aleatorizados.

Tabela 3. Variáveis independentes e níveis de variação do planejamento central composto 2^2

Variáveis Independentes	Níveis de Variação				
	-1,41	-1	0	1	1,41
Acetonitrila na fase móvel (%)	30,0	31,5	35,0	38,5	40,0
Solução de acetato de amônio (mmol L ⁻¹)	2,0	3,2	6,0	8,8	10,0

Os fármacos foram separados em coluna Kinetex® C₁₈ 1.7 µm (2.1×100 mm) superficialmente porosa e pré-coluna Kinetex® C₁₈ 1.7 µm (2.1×10 mm) a 40 °C. A fase móvel (FM) foi avaliada no modo isocrático com vazão de 0,3 mL min⁻¹.

3.6 Pré-tratamento da amostra de plasma

As proteínas das amostras de plasma (200 µL) foram precipitadas com acetonitrila (400 µL). Este procedimento foi realizado em tubo eppendorf sob agitação em vortex por 1 min, e posterior centrifugado por 30 min a 9000 g. O sobrenadante (500 µL) transferido para um tubo eppendorf foi seco em um concentrador a vácuo (Eppendorf, Brasil). O extrato seco foi reconstituído em 100 µL de água e solução tampão acetato de amônio 4 mmol L⁻¹ em diferentes valores de pH (5,0, 7,0, 10,0) para avaliação da sorção dos fármacos na coluna seletiva LiChrospher® C₈-ADS (primeira coluna).

3.7 Otimização das condições UHPLC-MS/MS no modo “Column Switching”

As colunas, Kinetex® C₁₈ 1.7 µm (2.1×100 mm) superficialmente porosa (2D) e LiChrospher® C₈-ADS (1D) foram conectadas na válvula de injeção de 6 canais do equipamento, conforme mostrado no esquema da Figura 3. A coluna 1D foi conectada nos canais 1 e 4 da válvula de injeção, a bomba quaternária (“*Quaternary Solvent*

Manager” – QSM) no canal 3, a bomba binária (“*Binary Solvent Manager*” – BSM) no canal 6 e a entrada da coluna 2D no canal 5. A bomba QSM transportou a FM para a coluna 1D e a bomba BSM para a coluna 2D.

Com a válvula na *Posição 1*, ambas as colunas foram condicionadas com a composição inicial das fases móveis. Em seguida, 5 µL de amostra foram injetados e a fase móvel composta por água (solvente fraco) foi percolada pela coluna 1D com vazão de 0,3 mL min⁻¹, para sorção dos analitos de interesse e remoção dos componentes endógenos da amostra de plasma da fase estacionária (Tabela 4).

Após 2 min, a válvula do injetor foi mudada para a *Posição 2*. Neste arranjo, a solução de (A) acetato de amônio 4 mmol L⁻¹ (0,1% de ácido fórmico) e (B) acetonitrila (63:37, v/v) foi percolada pela coluna 1D com vazão de 0,3 mL min⁻¹ para eluição dos fármacos para a coluna 2D (Tabela 4).

No tempo de 3,50 min, a válvula do injetor retornou à *Posição 1*. No tempo de 3,51 a 7,5 min foi realizada a separação cromatográfica dos fármacos. Já no período de 3,51 a 7,0 foi realizada a limpeza da coluna 1D (QSM). Após este período, a composição da fase móvel retornou à condição inicial para reequilíbrio da coluna 1D, para injeção da próxima amostra (Tabela 4). Diferentes tempos de acoplamento/desacoplamento e condições sorção/dessorção foram avaliadas.

Figura 3. Sistema “*Column Switching*” em modo *back-flush* (reverso), destacando a configuração da válvula de seis pórticos.

Tabela 4. Condições UHPLC-MS/MS no modo “*Column Switching*”

t (min)	Bomba	% B	Posição da Válvula	Comentários
0,00	QSM	0	1	Pré-concentração dos fármacos e remoção dos componentes endógenos da coluna C ₈ -ADS (1D)
0,00	BSM	37	1	Condicionamento da coluna 2D
2,00	BSM	37	2	Eluição dos fármacos da coluna C ₈ -ADS
3,50	BSM	37	1	Separação cromatográfica na coluna analítica (2D)
3,51	QSM	100	1	Limpeza da coluna C ₈ -ADS
7,01	QSM	0	1	Recondicionamento da coluna C ₈ -ADS para posterior injeção
10,0	QSM BSM	-	1	Final da análise cromatográfica

QSM: A = Água, B = Acetonitrila

BSM: A = Acetato de amônio 4 mmol L⁻¹ (0,1 % ácido fórmico), B = AcetonitrilaVazão = 0,3 mL min⁻¹

3.8 Validação analítica do método UHPLC-MS/MS no modo “*Column Switching*”

O método proposto foi validado com amostras de plasma branco enriquecidas com padrões internos deuterados e analitos em diferentes concentrações, segundo normas estabelecidas pela RESOLUÇÃO RDC N.º 27, DE 17 DE MAIO DE 2012 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (Brasil. Resolução Rdc N° 27, 2012). A linearidade, exatidão, precisão, limite de quantificação, efeito residual e efeito da matriz foram avaliados.

As curvas analíticas foram geradas para cada analito, a razão entre a área cromatográfica do analito e padrão interno (analito/padrão interno) versus concentração plasmática. Os pontos de calibração da curva analítica foram aprovados quando o coeficiente de variação (CV, n=5) foi inferior ou igual a 20% em relação à concentração plasmática no limite de quantificação (LOQ), e quando o CV foi inferior ou igual a 15% em relação às concentrações dos outros padrões de calibração, incluindo o limite superior de quantificação (LSQ). As faixas lineares do método iniciaram com o valor de LOQ.

A precisão foi determinada a partir de ensaios realizados no mesmo dia (precisão intraensaio) e entre ensaios realizados em cinco dias consecutivos (precisão inter-ensaio). Cada ensaio foi realizado com cinco réplicas para cinco concentrações diferentes: LOQ, controle de qualidade baixo (CQB), controle de qualidade médio (CQM), controle de qualidade alto (CQA), e limite superior de quantificação (LSQ). A precisão foi expressa como coeficiente de variação (CV%); onde valores superiores a 15% não foram aceitos, exceto para o LOQ, com valor menor ou igual a 20%.

A exatidão foi determinada a partir de ensaios realizados no mesmo dia (intraensaio) e em três dias consecutivos (exatidão inter-ensaio), com cinco repetições para cinco concentrações diferentes: LOQ, CQB, CQM, CQA e LSQ. A exatidão foi expressa pelo erro padrão relativo (EPR%); onde valores fora do intervalo de $\pm 15\%$ do valor nominal não foram aceitos, exceto para o LOQ, onde valores fora do intervalo de $\pm 20\%$ do valor nominal não são permitidos.

Para avaliar o efeito residual, três alíquotas do mesmo extrato de amostra de plasma branco foram injetadas no sistema: uma alíquota foi injetada antes e duas após a injeção de uma ou mais amostras de plasma enriquecida com os analitos em concentrações correspondentes ao LSQ. Os cromatogramas foram comparados com os de amostras contendo os analitos em concentrações correspondentes ao LOQ. As respostas dos picos interferentes nos mesmos tempos de retenção dos analitos de interesse foram inferiores a 20% da resposta (resposta analítica) das amostras enriquecidas de analitos em concentrações correspondentes ao LOQ; as respostas dos picos interferentes com os mesmos tempos de retenção do padrão interno devem ser inferiores a 5% da resposta (resposta analítica) do padrão interno.

O efeito de matriz foi avaliado comparando as razões entre as áreas cromatográficas dos analitos de diferentes amostras de plasma branco ($n = 5$) enriquecidas com analitos com as áreas dos padrões internos, em função das razões entre as áreas cromatográficas dos analitos e padrão interno em soluções padrões (aquosa) nas mesmas concentrações que as amostras de plasma branco enriquecidas. As concentrações CQB e o CQA foram avaliadas. Também foi avaliada o teste clássico de infusão pós-coluna (Jessome e Volmer, 2006; Silvestro *et al.*, 2013), através da injeção de amostra de plasma branco e solução aquosa com infusão combinada de uma solução padrão dos fármacos na concentração de $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Para cada amostra, o fator de matriz normalizado pelo padrão interno (FMN) foi obtido de acordo com a equação: $\text{FMN} = (\text{resposta do analito na matriz} / \text{resposta do$

padrão interno na matriz) / (resposta do analito na solução aquosa / resposta do padrão em solução aquosa). Os valores de CV dos FMNs relativos foram inferiores a 15%.

A seletividade foi avaliada pelo cromatogramas de 06 amostras de plasma brancos de referência, comparados com amostras de plasma branco enriquecidas com os analitos na concentração representada pelo LOQ. Picos interferentes no tempo de retenção dos analitos devem ser inferiores a 20% (vinte por cento) dos sinais analíticos dos fármacos no cromatograma referente ao LOQ. As respostas de picos interferentes no tempo de retenção dos padrões internos (PI) foram inferiores a 5% (cinco por cento) da resposta do PI.

3.9 Amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos

Para avaliar a aplicabilidade do método UHPLC-MS/MS no modo “*Column Switching*”, 10 amostras de pacientes esquizofrênicos em tratamento junto à Enfermaria de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (EPQU-HCFMRP) foram analisadas para fins de monitorização terapêutica.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Otimização das condições do método UHPLC-MS/MS por precipitação de proteínas

4.1.1 Otimização MS/MS

A otimização da detecção MS/MS foi realizada através de infusão direta de soluções-padrões dos analitos em metanol ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$). Os analitos inicialmente foram detectados por ESI-MS/MS no modo positivo “*full-scan*”. As moléculas protonadas $[M + H]^+$ dos analitos foram submetidas a dissociação induzida por colisão (“*Collision-Induced Dissociation*” – CID). Assim, foram selecionados o íon precursor e dois íons produto de cada analito, sendo que o íon produto de maior intensidade foi empregado na quantificação, e o de menor intensidade na confirmação do analito. Os dados analíticos foram adquiridos no modo de monitoramento de reação selecionada (SRM) para as transições MS/MS descritas na tabela 5.

Tabela 5. Transição dos íons, configurações do instrumento e tempo de retenção para todos os fármacos

Fármacos	Íon precursor (m/z)	Íon produto (m/z)	DP (V)	CE (eV)	IC (m/z)	tr (min)
Olanzapina	313,3	84,1	45	20	256,2	3,52
Lamotrigina	256,1	58,0	55	30	144,9	3,57
Mirtazapina	266,2	195,0	40	25	72,1	3,61
Clozapina	327,2	192,2	40	40	270,2	3,98
Quetiapina	384,3	253,2	45	20	221,0	4,03
Citalopram	325,3	262,0	45	25	109,1	4,10
Haloperidol	376,1	165,0	40	25	123,0	4,34
Paroxetina	330,2	70,0	50	25	192,2	4,39
Carbamazepina	237,1	194,1	35	20	-	4,45
Imipramina	281,2	86,0	30	15	57,9	4,69
Clonazepam	316,0	270,1	50	25	214,1	5,06
Fluoxetina	310,1	43,9	25	10	148,2	5,20
Sertralina	306,2	159,0	25	30	275,1	5,35
Clorpromazina	319,4	86,1	40	20	58,1	5,58
Clomipramina	315,2	86,0	35	15	57,9	5,77
Diazepam	285,1	154,2	50	30	193,1	7,45
Clozapina-d4	331,2	192,2	50	50	272,4	3,99

Continua...

Continuação da Tabela 5

Fármacos	Íon precursor (m/z)	Íon produto (m/z)	DP (V)	CE (eV)	IC (m/z)	tr (min)
Quetiapina-d8	392,3	258,1	50	30	286,1	4,02
Citalopram-d6	331,2	108,9	35	25	262,1	4,08
Haloperidol-d4	380,2	127,1	45	45	169,1	4,34
Paroxetina-d6	336,2	76,1	30	35	198,2	4,40
Carbamazepina-d10	247,2	204,1	35	20	-	4,43
Imipramina-d3	284,3	89,0	35	15	208,2	4,70
Clonazepam-d4	320,1	274,1	50	30	218,1	5,05
Fluoxetina-d6	316,2	44,1	25	15	154,1	5,20
Sertralina-d3	309,1	159,0	20	25	275,0	5,36
Clomipramina-d3	318,2	89,0	40	20	60,9	5,75
Diazepam-d5	290,1	198,1	55	30	153,9	7,46

DP: Energia do cone, CE: energia de colisão, IC: íon de confirmação, rt: tempo de retenção

4.1.2 Otimização da composição da fase móvel UHPLC-MS/MS

O planejamento fatorial central composto 2² totalizou 10 experimentos. A área de cada fármaco foi utilizada como resposta para as diferentes condições de fase móvel avaliadas. Para exemplificação, ilustramos os resultados (áreas) obtidos para a Clozapina (Tabela 6) nas diferentes condições experimentais.

Tabela 6. Planejamento fatorial central composto 2² e resposta para clozapina

Corrida [†]	Variáveis independentes		Resposta ^b (área do fármaco)	
	Acetonitrila (%)	Acetato de amônio (mmol L ⁻¹)	Clozapina (área)	Coefficiente de variação (%)
1	31,5	3,2	112331	8,8
2	31,5	8,8	82933	13,9
3	38,5	3,2	154989	11,3
4	38,5	8,8	125909	11,3
5	30,0	6,0	124101	11,0
6	40,0	6,0	157110	5,7
7	35,0	2,0	139550	11,5
8	35,0	10,0	110712	10,4
9	35,0	6,0	167710	13,9
10	35,0	6,0	168095	11,2

[†] randomizado. ^b valor médio (n=3).

A clozapina é um antipsicótico bastante utilizado no tratamento da esquizofrenia e devido a isso foi selecionado como exemplo. A partir dos resultados obtidos foi possível gerar superfície de resposta (Figura 3) e função resposta (equação 1), referente a área de Clozapina.

No gráfico de superfície de resposta a região vermelha indica a máxima área da clozapina. A superfície de resposta indicou que em regiões com maior porcentagem de acetonitrila e menor concentração molar da solução acetato de amônio observa-se aumento da área de clozapina (resposta analítica). No entanto, nos valores extremos (maior porcentagem de acetonitrila e menor concentração molar de solução de acetato de amônio) observa-se diminuição na resposta. Isso indica que temos pontos de máximos e mínimos em nosso modelo, e que podemos obter a composição de FM que resultará no maior sinal analítico.

$$Y = 167902 + 16540x_1 - 17106x_1^2 - 12408x_2 - 24843x_2^2 + 80x_1x_2 \quad \text{Equação 1.}$$

Figura 4. Superfície de resposta para clozapina.

Na equação 1, x_1 representa a influência da porcentagem de acetonitrila e x_2 a influência da concentração molar da solução de acetato de amônio na área de clozapina

(Y). Analisando a equação podemos verificar que a interação entre as duas variáveis independentes ($80x_1x_2$) não apresentou influência significativa na resposta analítica. No entanto, todos outros coeficientes da equação que podem ser visualizados na Tabela 7, apresentaram influência significativa ($p < 0,05$) na resposta analítica (de 7 a 15% valor da grande média, 167902). As influências desses valores podem ser confirmadas pela análise de variância (“*Analysis of Variance*” – ANOVA) (Tabela 7).

Tabela 7. Análise de variância (ANOVA) dos parâmetros de regressão para clozapina

Fatores	SQ	gl	QM	F	p
(1)Acetonitrila (%) (L)	6,56E+09	1	6,56E+09	30,0444	0,000019
Acetonitrila (%) (Q)	4,01E+09	1	4,01E+09	18,3636	0,000328
(2)Acetato de Amônio (mmol L ⁻¹) (L)	3,69E+09	1	3,69E+09	16,9084	0,000497
Acetato de Amônio (mmol L ⁻¹) (Q)	8,46E+09	1	8,46E+09	38,7339	0,000004
1L by 2L	7,60E+04	1	7,60E+04	0,00035	0,985297
Falta de ajuste	1,83E+09	3	6,11E+08	2,79696	0,065220
Erro Puro	4,58E+09	21	2,18E+08		
Total SS	2,58E+10	29			

SQ Soma dos quadrados. **gl** Graus de liberdade. **QM** Quadrado da média. **F** valor calculado. **p** Nível de significância. L linear. Q quadrático

Confirmando os resultados discutidos na superfície de resposta e na função resposta (equação 1), observamos que o único fator que não apresentou efeito significativo (nível de 5%) foi a interação linear da porcentagem de acetonitrila com concentração molar da solução de acetato amônio. A falta de ajuste não apresentou efeito significativo, indicando um bom ajuste do modelo aplicado.

O diagrama de Pareto (Figura 5) é um gráfico que ordena as variáveis independentes da maior para menor, ou seja, a que mais e menos influenciou na resposta analítica, permitindo assim, uma fácil visualização e identificação das variáveis independentes significativas, confirmando a análise de variância (ANOVA).

Figura 5. Diagrama de Pareto para clozapina.

Podemos observar que a influência quadrática da variável independente, solução de acetato de amônio, é a mais significativa na resposta analítica. Assim se houver um aumento da concentração molar da solução de acetato de amônio, a resposta (área) irá decair devido ao sinal negativo. O diagrama de Pareto confirma os resultados obtidos pela equação 1.

Os valores experimentais em função dos valores calculados pelo modelo preditivo (Equação 1) apresentaram um coeficiente de determinação (R^2) de 0,751. Isso indica que 75,1% das variações dos dados que ocorrem durante todo processo de análise puderam ser explicados pelo referido modelo para a clozapina (Figura 6).

Figura 6. Correlação dos valores observados com os valores previstos pelo modelo para clozapina.

A mesma análise apresentada foi realizada para todos os fármacos e a função resposta do modelo preditivo de cada fármaco está ilustrada na Tabela 8. O teste de falta de ajuste mostrou-se não significativo ao nível de 5% ($p < 0,05$), indicando que todos os fármacos obtiveram seus modelos bem ajustados.

Tabela 8. Função resposta dos fármacos e seus respectivos coeficientes de determinação

Fármacos	Função Resposta	R ²
Haloperidol	$Y = 463526 + 79492x_1 - 28704x_1^2 - 32533x_2 - 59288x_2^2 - 46894x_1x_2$	0,895
Clozapina	$Y = 167902 + 16540x_1 - 17106x_1^2 - 12408x_2 - 24843x_2^2 + 80x_1x_2$	0,751
Citalopram	$Y = 25589 + 3308x_1 - 2901x_1^2 - 1559x_2 - 3734x_2^2 - 210x_1x_2$	0,879
Clorpromazina	$Y = 110219 + 12645x_1 - 24306x_1^2 - 1354x_2 - 8889x_2^2 + 4109x_1x_2$	0,791
Clonazepam	$Y = 48658 + 2216x_1 - 400x_1^2 - 4679x_2 - 2698x_2^2 + 1315x_1x_2$	0,778
Fluoxetina	$Y = 20367 + 21473x_1 - 18932x_1^2 - 11806x_2 - 25521x_2^2 + 613x_1x_2$	0,784
Imipramina	$Y = 197126 + 33206x_1 - 25495x_1^2 + 1010x_2 + 5724x_2^2 - 7553x_1x_2$	0,814
Mirtazapina	$Y = 129937 + 13571x_1 - 17717x_1^2 - 6477x_2 + 1545x_2^2 - 3343x_1x_2$	0,725
Carbamazepina	$Y = 377667 + 29066x_1 - 22067x_1^2 - 36524x_2 - 29004x_2^2 + 6368x_1x_2$	0,799
Quetiapina	$Y = 200078 + 19771x_1 - 17630x_1^2 - 13852x_2 - 29214x_2^2 + 5906x_1x_2$	0,866
Paroxetina	$Y = 138538 + 15260x_1 - 4505x_1^2 - 9695x_2 - 9596x_2^2 - 14488x_1x_2$	0,710
Clomipramina	$Y = 142509 + 13537x_1 - 13827x_1^2 + 2560x_2 - 10256x_2^2 + 875x_1x_2$	0,646
Sertralina	$Y = 36796 + 4356x_1 - 5358x_1^2 - 2368x_2 - 3781x_2^2 - 474x_1x_2$	0,811
Diazepam	$Y = 39682 + 2361x_1 - 7994x_1^2 - 832x_2 - 1813x_2^2 - 102x_1x_2$	0,802
Lamotrigina	$Y = 53725 + 3744x_1 - 1497x_1^2 - 7327x_2 + 3007x_2^2 + 1806x_1x_2$	0,904
Olanzapina	$Y = 133954 + 14606x_1 - 13581x_1^2 + 2627x_2 - 18199x_2^2 - 2936x_1x_2$	0,686

Como os ensaios do planejamento experimental foram realizados para todos os fármacos, pela análise de desejabilidade, a composição da FM que resultou na maior resposta analítica (área) foi obtida (Figura 7).

Figura 7. Parâmetros de desabilidade estimado na condição ótima para todos os fármacos.

A partir do modelo gerado foi possível identificar o ponto ótimo, para todos os fármacos como sendo (0,71) 37% de acetonitrila e (-0,71) 4 mmol L⁻¹ de solução acetato de amônio (Figura 8).

Figura 8. Superfície de resposta ótima (Derringer e Suich) para todos os fármacos.

A condição ótima, obtida pelo modelo, foi realizada experimentalmente e os resultados estão expressos na Figura 9. Para todos os fármacos foi obtido erro absoluto baixo ($\leq 5\%$) entre o valor predito pelo modelo e o valor experimental.

Figura 9. Valores preditos pelo modelo vs valores experimentais.

O aumento da concentração molar da solução de acetato de amônio resultou no aumento da força iônica da fase móvel, favorecendo a supressão iônica dos analitos (Johnson *et al.*, 2013). Tal fato pode ser evidenciado pela superfície de resposta, onde o

aumento da concentração molar da solução de acetato de amônio resultou na diminuição na resposta.

No caso de misturas aquosas/orgânicas, o componente orgânico normalmente se evapora mais facilmente, influenciando na intensidade do sinal analítico, no modo ESI (Siuzdak, 1996; Konermann *et al.*, 2013; Sirhan *et al.*, 2013). Entretanto, o aumento da quantidade de solvente orgânico resulta em aumento na força da fase móvel, o que propicia menor tempo de análise, e consequentemente coeluição de alguns fármacos. Alguns trabalhos da literatura descrevem que o aumento do sinal analítico MS está relacionado à adequada resolução cromatográfica dos analitos (Van Eeckhaut *et al.*, 2009; Xia e Jemal, 2009; Rainville *et al.*, 2012).

Os aditivos ácidos promovem a protonação de moléculas básicas, favorecendo o aumento de sinal analítico no modo ESI positivo (Kasprzyk-Hordern *et al.*, 2007; Rainville *et al.*, 2012; Kakitani *et al.*, 2014). Assim, a adição de 0,1% de ácido fórmico na composição da fase móvel já otimizada pelo planejamento experimental, foi testada e um aumento no sinal analítico de 1,2 a 2,1 vezes foi obtido (Figura 10).

Figura 10. Aumento da resposta pela adição de 0,1 % de ácido fórmico na condição obtida pelo planejamento experimental.

Quando comparamos a faixa de fator de retenção (equação 2), k , da olanzapina (primeiro pico) ao diazepam (último pico), verificamos diminuição nos valores quando adicionamos o ácido fórmico na FM. Tal fato se deve a ionização dos fármacos (protonação), diminuindo a sorção destes na fase reversa (C_{18}). Para a assimetria

(equação 3) não houve diferença significativa (nível de 5%) pelo teste t-Student. No entanto, a adição de ácido fórmico à FM favoreceu, significativamente ($p < 0,05$), tanto a eficiência (equação 4) (diminuição da altura do prato reduzido), quanto a capacidade de pico (equação 5) (“*Peak Capacity*” – P_c) (maior probabilidade de resolução dos compostos na corrida cromatográfica) (Mogollón *et al.*, 2014) (Tabela 9) (Dolan, 2002; 2003; Meyer, 2013).

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad \text{Equação 2}$$

Onde t_R é o tempo de retenção do composto de interesse e o t_0 é o tempo de um composto não retido (tempo morto).

$$A_s = \frac{b}{a} \quad \text{Equação 3}$$

Onde a e b são medidas a 10% da altura do pico.

$$h = \frac{L}{N \times d_p} \quad \text{Equação 4}$$

Onde L é o comprimento da coluna, d_p é o diâmetro da partícula e N é o número de pratos teóricos.

$$P_c = 1 + \left[\frac{\sqrt{N}}{4} \times \ln \left(\frac{t_R}{t_i} \right) \right] \quad \text{Equação 5}$$

Onde t_R e t_i são os tempos de retenção para o primeiro e o último pico eluídos no cromatogramas e N é o número de pratos teóricos.

Desta forma, a fase móvel constituída por acetonitrila: solução acetato de amônio (4 mmol L⁻¹, 37:63 v/v) com adição de 0,1% de ácido fórmico foi selecionada para os ensaios posteriores.

Para separação cromatográfica dos fármacos utilizou-se a nova geração de colunas superficialmente porosas constituídas de um núcleo sólido revestidos com uma camada

fina de sílica porosa e diâmetro de partícula menor que sub 2 μm . A coluna Kinetex® C₁₈ 1,7 μm (2,1×100 mm) superficialmente porosa apresentava um núcleo rígido de $\cong 1,25$ μm e camada porosa $\cong 0,23$ μm segundo informações do fornecedor. Além disso, tamanho do poro de 100 Å e área superficial efetiva de 200 m² g⁻¹. Todas essas características promovem a utilização dessa coluna para separação de fármacos básicos com alto poder de resolução cromatográfica e picos estreitos, além de uma baixa pressão de trabalho.

Tabela 9. Valores de fator de retenção, assimetria, altura do prato reduzido e capacidade de pico para as composições de FM obtidas pelo planejamento experimental e otimizada (adição de 0,1% de ácido fórmico)

Parâmetros	Condição obtida pelo planejamento experimental	Condição otimizada (adição de 0,1 % Ácido fórmico)	p-valor
Faixa de k	0,8 a 11,3	0,21 a 7,9	
Assimetria (a/b)	1,11 ^a $\pm$ 0,16	1,02 ^a $\pm$ 0,06	<0,05
Altura do prato reduzido (h)	27,1 ^a $\pm$ 1,6	22,4 ^b $\pm$ 2,8	>0,05
Capacidade de pico (Pc)	23,7 ^a $\pm$ 0,7	26,4 ^b $\pm$ 1,5	>0,05

Valor médio (n=3). Média $\pm$ Desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste t-Student.

Essas colunas geram pressões menores quando comparadas às colunas totalmente porosas (Fekete e Guillarme, 2013; Gritti *et al.*, 2014; Walter e Andrews, 2014). Além disso, a dispersão turbulenta (termo A da equação de Van Deemter) é significativamente menor em colunas superficialmente porosas em comparação com totalmente porosas (~ 30-40%). A presença do núcleo sólido não permeável dentro da partícula limita a distância através da qual o analito alvo difunde nas partículas, melhorando assim o processo de transferência de massas (termo C) (Bobaly *et al.*, 2014; Dolzan *et al.*, 2014; Haidar Ahmad *et al.*, 2015).

4.2 Otimização das condições do método UHPLC-MS/MS no modo “Column Switching”

4.2.1 Otimização da etapa de pré-concentração dos fármacos na coluna C₈-ADS – 1D

Para avaliar a sorção dos fármacos, após o processo de precipitação de proteínas da amostra de plasma enriquecida com os fármacos (250 ng mL⁻¹), o extrato seco foi reconstituído com água ultrapura, e foi percolada pela coluna 1D utilizando água ultrapura

como FM (QSM), para obtenção do cromatograma de íons totais (“*Total Ion chromatogram*” – TIC). Para este experimento somente a coluna 1D foi conectada no espectrômetro de massas e um longo tempo de sorção (10 min) foi monitorado para verificar a eluição dos fármacos. Após 10 min, a válvula de injeção mudou para *Posição 2* para a eluição dos fármacos com a FM constituída por (A) solução acetato de amônio 4 mmol L⁻¹ (0,1% ácido fórmico) e (B) acetonitrila (63:37, v/v) (Figura 11).

Figura 11. Cromatograma de íons totais (TIC) de amostra de plasma enriquecida com os fármacos de interesse (250 ng mL⁻¹).

Após a confirmação da sorção dos fármacos junto a coluna 1D, prosseguiu-se para o teste de exclusão dos componentes endógenos pela coluna C₈-ADS. Para esse teste utilizou-se somente o detector de arranjo de diodos (“*Diode Array Detector*” – DAD).

Para esse teste foi utilizado uma amostra de plasma branco, somente para averiguar a capacidade de exclusão dos componentes endógenos. Assim, 5 µL da amostra de plasma branco foram injetados e percolou-se pela coluna 1D, 100% de água ultrapura (FM) durante 10 min. Após esse período mudou-se a válvula para *Posição 2*, e a FM (100 % de acetonitrila) foi percolada pela coluna 1D. A Figura 12 ilustra o pico dos componentes endógenos ($t_R = 0,22$ min), o pico de acetonitrila ($t_R = 10,83$ min) e os espectros de absorção, 278 nm (componentes endógenos, (Gonzalez-Ruiz *et al.*, 2014)) e 190 nm (acetonitrila).

Figura 12. Avaliação da exclusão dos componentes endógenos.

Em seguida, a etapa de sorção dos fármacos foi otimizada pela reconstituição da amostra (100 μL) em diferentes valores de pH da amostra (5,0, 7,0 e 10,0), em água e em solução de acetato de amônio 4 mmol L^{-1} . As colunas $\text{C}_8\text{-ADS}$ e C_{18} superficialmente porosa foram conectadas na válvula do injetor do sistema bidimensional. A FM para a eluição e separação dos fármacos consistiu em (A) solução acetato de amônio 4 mmol L^{-1} (0,1% ácido fórmico) e (B) acetonitrila (63:37, v/v). A Figura 13 ilustra a sorção dos fármacos em solução de acetato de amônio 4 mmol L^{-1} e em água em diferentes valores de pH (5,0, 7,0 e 10,0).

Figura 13. Influência do pH da amostra (solução padrão de 50 ng mL⁻¹) em água ultrapura e em solução acetato de amônio 4 mmol L⁻¹ (diferentes pHs) para o método UHPLC-MS/MS no modo “Column Switching”.

Por se tratar de uma fase estacionária C_8 (fase reversa) e a maioria dos fármacos apresentarem caráter básico, em pH 10, tanto em água quanto em solução de acetato de amônio 4 mmol L^{-1} , tem-se uma maior quantidade de espécies parcialmente ionizadas e não ionizadas, aumentando assim a sorção dos fármacos na fase estacionária. Assim, optou-se pela reconstituição dos extratos secos em água ultrapura em pH 10 pelo fato de minimizar a quantidade de sal introduzida no equipamento.

Em seguida foi avaliado o modo de eluição dos fármacos da coluna 1D, vazão da FM no mesmo sentido da sorção, direto (“*straight flush*”) ou no sentido inverso (“*back flush*”), figura 14. A eluição no modo inverso, resultou em maior sorção dos fármacos e consequentemente, maior sinal analítico.

Figura 14. Cromatogramas de íons totais (TIC-12 e 19 canais) da solução padrão de fármacos a 50 ng mL^{-1} no modo direto e inverso.

O mecanismo de sorção (físico e químico) da coluna C₈-ADS é baseado em uma barreira hidrofílica (poros 6 nm) que permite a permeação de moléculas pequenas (peso molecular < 20.000 Da) para a fase estacionária hidrofóbica e a exclusão de macromoléculas (Souverain *et al.*, 2004). Considerando a fase móvel utilizada durante a sorção dos fármacos (água, pH = 7,0), o ponto isoelétrico das proteínas plasmáticas (albumina sérica, pKa 4,7) e o pKa dos grupos diol (2,3 e 3,0) é possível dizer que também esteja ocorrendo uma barreira química pela repulsão eletrostática dos grupamentos diol e da albumina sérica, ambas em suas formas ionizadas carregadas negativamente.

4.3 Validação analítica

4.3.1 Linearidade, precisão e exatidão

O método UHPLC-MS/MS no modo “*Column Switching*” apresentou resposta linear dentro dos intervalos de calibração adotados. Para todos os fármacos estudados, a linearidade variou entre os limites inferiores de quantificação (25,0 pg mL⁻¹ – 1250,0 pg mL⁻¹) e os limites superiores de quantificação (40,5 ng mL⁻¹ – 10,5 µg mL⁻¹), com coeficientes de determinação superior a 0,9950 e coeficientes de variação dos calibradores menores que 8,5%. As faixas lineares de trabalho foram estabelecidas com base nos intervalos terapêuticos preconizados. A linearidade do método também foi verificada pelo teste de falta de ajuste (Tabela 10). Os valores de LOQ (Tabela 11) correspondem a menor concentração determinada com precisão e com coeficiente de variação (CV) inferior a 8,5% e exatidão com valores de erro padrão relativo (EPR) menores que 14,8%.

Tabela 10. Equação linear, coeficiente de determinação, falta de ajuste e padrão interno para o método UHPLC-MS/MS no modo “*Column Switching*”

Fármacos	Equação linear	R ²	Falta de ajuste	Padrão interno
Haloperidol	$Y = 0,0795x - 0,0032$	0,9996	0,394	Haloperidol-d ₄
Olanzapina	$Y = 0,0038x + 0,0162$	0,9999	0,920	Haloperidol-d ₄
Clozapina	$Y = 0,0011x + 0,031$	0,9950	0,228	Clozapina-d ₄
Citalopram	$Y = 0,0007x + 0,0009$	0,9998	0,823	Citalopram-d ₆
Imipramina	$Y = 0,004x + 0,0026$	0,9999	0,768	Imipramina-d ₃
Clorpromazina	$Y = 0,0029x - 0,0042$	0,9985	0,921	Imipramina-d ₃
Clonazepam	$Y = 0,0293x + 0,0191$	0,9993	0,519	Clonazepam-d ₄
Paroxetina	$Y = 0,0472x + 0,4881$	0,9999	0,103	Paroxetina-d ₆
Mirtazapina	$Y = 0,0116x + 0,0453$	0,9992	0,352	Paroxetina-d ₆
Fluoxetina	$Y = 0,021x - 0,0263$	0,9997	0,714	Fluoxetina-d ₆
Quetiapina	$Y = 0,0051x + 0,0004$	0,9999	0,631	Quetiapina-d ₈
Clomipramina	$Y = 0,0047x + 0,0042$	0,9999	0,128	Clomipramina-d ₃
Sertralina	$Y = 0,0068x - 0,003$	0,9999	0,245	Sertralina-d ₃
Diazepam	$Y = 0,0019x + 0,0365$	0,9979	0,924	Diazepam-d ₅
Carbamazepina	$Y = 0,0009x + 0,035$	0,9991	0,936	Carbamazepina-d ₁₀
Lamotrigina	$Y = 0,0005x + 0,0002$	0,9994	0,825	Carbamazepina-d ₁₀

Tabela 11. Precisão e exatidão (inter e intraensaio) para amostras de plasmas enriquecidas em diferentes concentrações dos fármacos para o método UHPLC-MS/MS no modo “*Column Switching*”

Fármacos	Concentração adicionada (ng mL ⁻¹)	Precisão		Exatidão	
		Intra (% CV)	Inter (% CV)	Intra (% EPR)	Inter (% EPR)
Olanzapina	0,075 ^a	5,3	5,0	9,8	7,6
	1,5 ^b	5,6	5,2	5,0	6,2
	16,5 ^c	3,3	3,0	-0,9	-6,6
	32,5 ^d	6,5	6,0	-0,2	-1,5
	40,5 ^e	3,0	2,8	0,1	-0,8
Lamotrigina	0,5 ^a	2,1	3,0	3,9	5,0
	1500 ^b	0,9	0,2	10,5	10,1
	5500 ^c	3,4	3,2	9,5	9,2
	8500 ^d	2,9	2,0	9,3	9,8
	10500 ^e	3,0	2,6	9,0	10,3
Mirtazapina	0,125 ^a	3,9	3,7	10,7	14,0
	15,0 ^b	6,7	6,2	-8,6	-8,9
	80,0 ^c	3,0	2,7	1,8	0,7
	125 ^d	6,6	6,1	2,1	0,8
	155 ^e	5,4	5,0	-1,9	-3,2
Clozapina	0,188 ^a	0,6	0,6	5,9	6,1
	430 ^b	3,6	3,4	11,8	11,7
	850 ^c	7,6	7,0	9,9	8,7
	1270 ^d	3,3	3,0	0,1	-1,7
	1550 ^e	4,2	3,9	0,7	2,2
Quetiapina	0,125 ^a	3,5	3,3	7,5	7,9
	30 ^b	4,2	3,8	3,1	2,8
	260 ^c	2,7	2,5	0,3	-1,2
	410 ^d	2,7	2,5	-0,5	-0,6
	510 ^e	1,5	1,4	0,6	-1,6
Citalopram	1,25 ^a	6,1	9,2	-4,2	-0,7
	15 ^b	4,4	11,0	11,8	10,4
	205 ^c	4,8	4,5	-0,8	0,2
	325 ^d	7,1	8,3	1,4	-0,1
	405 ^e	7,2	8,3	-0,4	-1,5
Haloperidol	0,075 ^a	8,5	7,9	2,0	-2,3
	1,5 ^b	4,3	4,0	-5,2	-2,1
	20,5 ^c	2,7	2,5	0,1	-5,7
	32,5 ^d	4,8	4,4	-1,1	-2,5
	40,5 ^e	1,1	1,0	0,5	-0,2
Paroxetina	0,25 ^a	5,3	4,9	9,6	11,0
	15 ^b	6,5	6,0	0,1	-0,8
	80 ^c	2,0	1,9	0,2	-0,9
	125 ^d	5,2	4,8	0,3	-1,1
	155 ^e	3,2	3,0	-0,3	-1,6

Continua...

Fármacos	Concentração adicionada (ng mL ⁻¹)	Precisão		Exatidão	
		Intra (%) CV)	Inter (%) CV)	Intra (%) CV)	Inter (%) CV)
Carbamazepina	0,05 ^a	3,5	3,0	-13,9	-13,5
	1500 ^b	2,4	2,7	-6,4	-6,2
	5500 ^c	0,9	0,7	1,4	1,4
	8500 ^d	1,6	1,3	1,9	1,4
	10500 ^e	2,0	1,4	2,3	2,1
Imipramina	0,063 ^a	6,0	5,5	-3,8	-4,2
	30 ^b	7,0	6,5	7,5	7,5
	185 ^c	5,5	5,1	1,0	0,5
	290 ^d	9,7	9,0	-0,7	2,2
	360 ^e	3,3	3,1	0,7	-0,7
Clonazepam	0,063 ^a	5,9	5,3	-2,0	-7,7
	15 ^b	5,7	5,3	11,3	13,3
	80 ^c	7,5	7,0	-1,0	-5,9
	125 ^d	3,7	3,4	1,8	-0,7
	155 ^e	1,2	1,1	0,5	0,3
Fluoxetina	0,025 ^a	0,3	0,3	13,6	13,9
	150 ^b	5,3	4,9	-2,3	-2,6
	550 ^c	3,4	3,1	-1,1	-1,3
	850 ^d	1,7	1,5	0,3	1,8
	1050 ^e	4,6	4,3	-0,7	-2,7
Sertralina	0,625 ^a	8,1	7,6	12,5	14,0
	15 ^b	8,0	7,4	-0,1	0,4
	205 ^c	7,5	6,9	-0,1	-1,7
	325 ^d	4,9	4,6	0,3	0,2
	405 ^e	4,1	3,8	-0,4	-0,4
Clorpromazina	0,063 ^a	2,8	2,5	4,9	4,7
	30 ^b	2,9	2,9	-1,0	-0,6
	185 ^c	3,1	2,9	-0,9	-0,1
	290 ^d	5,0	4,2	3,4	2,4
	360 ^e	2,0	2,6	-1,0	-2,1
Clomipramina	0,063 ^a	5,0	4,6	-11,6	-9,1
	30 ^b	12,0	11,5	-2,4	-2,7
	260 ^c	4,4	4,1	0,4	-1,1
	410 ^d	5,3	4,9	0,2	-0,7
	510 ^e	5,5	5,1	-0,2	-2,3
Diazepam	0,313 ^a	2,3	3,0	-10,5	-10,3
	150 ^b	3,0	3,2	0,5	1,5
	550 ^c	1,5	1,4	-2,1	-1,7
	850 ^d	2,2	2,0	2,0	2,1
	1050 ^e	4,0	4,5	-1,1	-1,6

a LOQ. b CQB. c CQM. d CQA. e LSQ. (n=5).

4.3.2 Efeito residual

As respostas de picos interferentes nos tempos de retenção dos analitos foram inferiores a 20% (vinte por cento) da resposta (sinal analítico) dos analitos das amostras enriquecidas com concentrações correspondentes ao LOQ, e as respostas de picos interferentes no tempo de retenção do padrão interno foram inferiores a 5% (cinco por cento) da resposta (sinal analítico) do padrão interno.

4.3.3 Efeito de matriz

O efeito da matriz biológica na supressão da ionização é ilustrado na Tabela 12 por meio dos valores FMN, onde os coeficientes de variação foram menores que 15%.

Tabela 12. Avaliação do efeito de matriz para as amostras de controle de qualidade baixo (QCB) e alto (QCA) (n=5)

Fármacos	FMN QCB (% CV)	FMN QCA (% CV)
Olanzapina	6,4	10,5
Lamotrigina	2,	3,7
Mirtazapina	5,9	7,2
Clozapina	3,2	5,4
Quetiapina	11,6	3,6
Citalopram	5,2	11,3
Haloperidol	8,8	4,7
Paroxetina	11,6	9,4
Carbamazepina	14,1	3,3
Imipramina	10,2	6,7
Clonazepam	9,8	9,7

Continuação...

Continuação da Tabela 12

Fármacos	FMN QCB (% CV)	FMN QCA (% CV)
Fluoxetina	4,9	3,3
Sertralina	7,1	3,0
Clorpromazina	2,1	7,8
Clomipramina	10,6	3,6
Diazepam	4,1	3,6

A seletividade do método UHPLC-MS/MS no modo “*Column Switching*” (modo SRM) foi confirmada pelos cromatogramas de uma amostra de plasma branco, e desta enriquecida com os fármacos em concentrações correspondentes ao LOQ (Figura 15) onde não foram observadas coeluições nos tempos de retenção dos analitos em estudo.

O teste clássico de infusão pós-coluna dos fármacos, apresentou semelhança entre a injeção de uma amostra de plasma branco (Figura 16a) e água (Figura 16b). A supressão iônica (de 2,55 a 3,40 min) ocorreu devido à diminuição de solvatação na fonte de eletrospray, associado com a mistura da FM utilizada para o processo de sorção com a FM utilizada para o processo de dessorção e posterior separação cromatográfica (Siuzdak, 1996; Konermann *et al.*, 2013; Sirhan *et al.*, 2013). Já para a instabilidade de sinal nos tempos de 2,0 min e 3,5 min se deve a mudança de posição da válvula de 6 pórticos. Além disso, a figura 16 demonstrou que durante a eluição dos fármacos em estudo, não houve efeito de matriz (de 3,52 a 7,45 min).

Figura 15. Cromatogramas UHPLC-MS/MS no modo “*Column Switching*” das amostras de plasma branco (sobrescrito na esquerda), e amostras de plasma enriquecidas com fármacos nas concentrações do LOQ.

Figura 16. Cromatogramas de monitorização de reações múltiplas, (a) injeção (5,0 μL) de amostra de plasma isenta de fármacos e (b) injeção de (5,0 μL) de água isenta de fármacos para infusão pós-coluna constante de solução padrão dos fármacos (1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) sobreposta com cromatogramas de íons totais (TIC) dos fármacos na concentração do CQM.

O método desenvolvido UHPLC-MS/MS no modo “*Column Switching*” apresenta uma série de vantagens em relação a outros métodos descritos na literatura (Tabela 13). A capacidade de analisar antipsicóticos na presença de antidepressivos, anticonvulsivantes e ansiolíticos, volume de plasma (200 µL) e volume de injeção (5,0 µL) preservando a coluna na primeira dimensão, o tempo de corrida cromatográfica (10 min) e o baixo limite de quantificação (0,025 ng mL⁻¹). Portanto, este método é potencialmente aplicável para monitorização terapêutica de pacientes esquizofrênicos em tratamento com um único fármaco ou combinação de fármacos.

4.4 Determinação dos fármacos pelo método UHPLC-MS/MS em modo “*Column Switching*” em amostra de plasma de pacientes esquizofrênicos

As análises de amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos em tratamento com fármacos psicotrópicos comprovam a aplicabilidade do método desenvolvido. A Tabela 14 ilustra as concentrações dos fármacos em amostras de plasma de dez pacientes esquizofrênicos. As concentrações plasmáticas determinadas são condizentes com os intervalos terapêuticos preconizados (Hiemke *et al.*, 2011), para a maioria dos pacientes. As concentrações plasmáticas determinadas apresentaram CV menor que 5%.

Tabela 13. O método proposto em comparação com outros métodos descritos na literatura.

Analitos Alvo	Matriz e Amostra (µL)	Corrida Cromatográfica (min)	Primeira coluna	Segunda Coluna	Sistema de Detecção e LOQ (ng mL ⁻¹)	Referências
Opióides, benzodiazepinas e metabólitos	Urina (200)	20	Cartuchos Oasis® HLB (25 µm, 2,1 mm × 20 mm)	C ₁₈ (3,5 µm, 150 × 2,1 mm)	LC-MS/MS 1,0-20	(Xiong <i>et al.</i> , 2015)
Antipsicóticos	Plasma (200)	20	Monólito de sílica híbrida funcionalizado com cianopropil (4,5 cm x 530 µm)	C ₁₈ (2,5 µm, 100 × 2,1 mm)	LC-MS/MS 0,075-1,250	(Domingues <i>et al.</i> , 2015)
Antidepressivos						
Ansiolíticos						
Anticonvulsivantes	Urina (500)	20	LiChrospher® C ₈ -ADS (25 µm, 25 x 4 mm)	C ₁₈ (3 µm, 75 × 3,0 mm)	LC-MS/MS 0,15-0,27	(Zhang <i>et al.</i> , 2015)
Biomarcadores do 1,3-butadieno						
Anti-hipertensivos	Soro (100)	12	RACNTs (1 cm x 4 mm)	C ₁₈ (5 µm, 150 × 4,6 mm)	LC-MS/MS 0,09-10,85	(De Faria <i>et al.</i> , 2017)
Ácido 3-hidroxipropil mercaptúrico	Urina (200)	30	SAX (5 µm, 150 x 6 mm) e C ₈ (3 µm, 150 x 4,6 mm)	C ₁₈ (5 µm, 150 × 4,6 mm)	HPLC-ECD 0,11	(Higashi <i>et al.</i> , 2017)
Anticonvulsivantes	Plasma (-)	12	RACNTs (1 cm x 4 mm)	C ₁₈ (5 µm, 250 × 4,6 mm)	LC-UV 10 – 100	(Dos Santos <i>et al.</i> , 2017)
Benzodiazepinas e tandospirona	Plasma (100)	8	Cartuchos Oasis® HLB (25 µm, 2,1 mm × 20 mm)	C ₁₈ (2 µm, 30 × 3,0 mm)	UHPLC-MS/MS 0,05 – 0,1	(Lee <i>et al.</i> , 2017)
Antipsicóticos	Plasma (200)	10	LiChrospher® C ₈ -ADS (25µm, 25 x 4 mm)	C ₁₈ (1,7 µm, 100 × 2,1 mm)	UHPLC-MS/MS 0,063-0,188	Presente Trabalho
Antidepressivos					0,025-1,250	
Ansiolíticos					0,063-0,313	
Anticonvulsivantes					0,05-0,5	

UV = detector de ultravioleta; MS = Detector de espectrômetro de massas, RACNTs = material de acesso restrito com nano tubos de carbono, ECD = detector eletroquímico, SAX = trocador de ânion

Tabela 14. Níveis plasmáticos de psicotrópicos em amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos

Fármacos	Intervalo terapêutico (ng mL ⁻¹) (Hiemke <i>et al.</i> , 2011)	Concentração Plasmática (ng mL ⁻¹)									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Olanzapina	20-80	-	-	-	-	-	32,78 ± 0,97	49,04 ± 2,4	7,81 ± 0,32	-	-
Sertralina	10-150	-	14,01 ± 0,21	-	-	54,75 ± 0,78	-	-	-	-	24,98 ± 2,9
Imipramina	175-300	-	-	-	-	-	-	171,6 ± 3,5	-	-	-
Fluoxetina	120-500	-	-	-	-	-	147,2 ± 3,2	-	-	-	-
Clozapina	350-600	668,2 ± 3,1	320,9 ± 5,2	1066 ± 9,3	549,1 ± 1,8	766,7 ± 3,7	-	-	262,4 ± 3,1	411,1 ± 1,1	828,9 ± 9,1

5. CONCLUSÃO

A otimização da composição da fase móvel através de técnicas quimiométricas, favoreceu a separação cromatográfica e a detectabilidade MS-MS para determinação dos fármacos por UHPLC-MS/MS em concentrações plasmáticas que contemplam o intervalo terapêutico.

A pré-concentração dos fármacos na coluna C₈-ADS permitiu a remoção dos componentes endógenos da amostra de plasma, favorecendo a seletividade e detectabilidade do método UHPLC-MS/MS no modo “*Column Switching*”.

O método UHPLC-MS/MS no modo “*Column Switching*” padronizado e validado apresentou faixa de linearidade adequada para fins de monitorização terapêutica de pacientes esquizofrênicos.

6. REFERÊNCIAS

ACQUARO, V. R.; DOMINGUES, D. S.; QUEIROZ, M. E. C. Column switching UHPLC-MS/MS with restricted access material for the determination of CNS drugs in plasma samples. **Bioanalysis**, v. 9, n. 6, p. 555-568, 2017. ISSN 1757-6180.

ACQUARO, V. R. J.; LANCAS, F. M.; QUEIROZ, M. E. Evaluation of superficially porous and fully porous columns for analysis of drugs in plasma samples by UHPLC-MS/MS. **Journal of Chromatography B**, v. 1048, p. 1-9, 2017. ISSN 1570-0232.

BOBALY, B.; GUILLARME, D.; FEKETE, S. Systematic comparison of a new generation of columns packed with sub-2 μ m superficially porous particles. **Journal of Separation Science**, v. 37, n. 3, p. 189-97, 2014. ISSN 1615-9314.

BRASIL. RESOLUÇÃO RDC Nº 27, D. M. D. Requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos. **Diário Oficial da União, Poder Executivo**, 2012.

BREIER, M. et al. Targeted metabolomics identifies reliable and stable metabolites in human serum and plasma samples. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. 11, 2014. ISSN 1932-6203.

CARIS, J. A. et al. Automated analysis of lidocaine and its metabolite in plasma by in-tube solid-phase microextraction coupled with LC-UV for pharmacokinetic study. **Journal of Separation Science**, v. 35, n. 5-6, p. 734-741, 2012. ISSN 1615-9314.

CHAVES, A. R. et al. Biocompatible in-tube solid phase microextraction coupled with liquid chromatography-fluorescence detection for determination of interferon α in plasma samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 21, p. 3376-3381, 2011. ISSN 0021-9673.

COOPER, G.; NEGRUSZ, A. **Clarke's analytical forensic toxicology**. Pharmaceutical Press, 2013. ISBN 0857110543.

CRUTCHFIELD, C. A.; MARZINKE, M. A.; CLARKE, W. A. Quantification of Docetaxel in Serum Using Turbulent Flow Liquid Chromatography Electrospray Tandem Mass Spectrometry (TFC-HPLC-ESI-MS/MS). **Methods in Molecular Biology**, v. 1383, p. 121-124, 2016. ISSN 1064-3745.

CUNNINGHAM, C.; PETERS, K. Aetiology of schizophrenia and implications for nursing practice: a literature review. **Issues in Mental Health Nursing**, v. 35, n. 10, p. 732-738, 2014. ISSN 0161-2840.

DE FARIA, H. D. et al. Online extraction of antihypertensive drugs and their metabolites from untreated human serum samples using restricted access carbon nanotubes in a column switching liquid chromatography system. **Journal of Chromatography A**, v. 1528, p. 41-52, 2017. ISSN 0021-9673.

DE LIMA, M. M. et al. On-line restricted access molecularly imprinted solid phase extraction of ivermectin in meat samples followed by HPLC-UV analysis. **Food Chemistry**, v. 197, p. 7-13, 2016. ISSN 0308-8146.

DESILETS, C. P.; ROUNDS, M. A.; REGNIER, F. E. Semipermeable-surface reversed-phase media for high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 544, n. 1-2, p. 25-39, 1991.

DOLAN, J. W. Peak Tailing and Resolution. **LC Troubleshooting**, v. 5, n. 3, p. 14-20, 2002.

_____. Why Do Peaks Tail? **LC Troubleshooting**, v. 21, n. 7, p. 612-616, 2003.

DOLZAN, M. D. et al. Comparison of superficially porous and fully porous silica supports used for a cyclofructan 6 hydrophilic interaction liquid chromatographic stationary phase. **Journal of Chromatography A**, v. 1365, p. 124-130, 2014. ISSN 0021-9673.

DOMINGUES, D. S.; DE SOUZA, I. D.; QUEIROZ, M. E. C. Analysis of drugs in plasma samples from schizophrenic patients by column-switching liquid chromatography-tandem mass spectrometry with organic-inorganic hybrid cyanopropyl monolithic column. **Journal of Chromatography B**, v. 993, p. 26-35, 2015. ISSN 1570-0232.

DOS SANTOS, R. C. et al. Characterization and application of restricted access carbon nanotubes in online extraction of anticonvulsant drugs from plasma samples followed by liquid chromatography analysis. **Journal of Chromatography B**, v. 1054, p. 50-56, 2017. ISSN 1570-0232.

DUPOUEY, J. et al. Simultaneous determination of four antiepileptic drugs in human plasma samples using an ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method and its application in therapeutic drug monitoring. **Biomedical Chromatography**, v. 30, n. 12, p. 2053-2060, 2016. ISSN 0269-3879.

ECKERT, E.; GÖEN, T. Rapid determination of four short-chain alkyl mercapturic acids in human urine by column-switching liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 965, p. 54-60, 2014. ISSN 1570-0232.

EZZELDIN, E.; ABO-TALIB, N. F. UPLC-Tandem Mass Spectrometry Method for Simultaneous Determination of Fluoxetine, Risperidone, and Its Active Metabolite 9-Hydroxyrisperidone in Plasma: Application to Pharmacokinetics Study in Rats. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2017, p. 5187084, 2017. ISSN 2090-8865.

FAGUNDES, V. F. et al. Rapid and direct analysis of statins in human plasma by column-switching liquid chromatography with restricted-access material. **Journal of Chromatography B**, v. 947, p. 8-16, 2014. ISSN 1570-0232.

FEKETE, S.; GUILLARME, D. Possibilities of new generation columns packed with 1.3 μ m core-shell particles in gradient elution mode. **Journal of Chromatography A**, v. 1320, p. 86-95, 2013. ISSN 0021-9673.

FERNÁNDEZ-RAMOS, C. et al. Analysis of trace organic compounds in environmental, food and biological matrices using large-volume sample injection in column-switching liquid chromatography. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 62, p. 69-85, 2014. ISSN 0165-9936.

GONZALEZ-RUIZ, V.; OLIVES, A. I.; MARTIN, M. A. Challenging core-shell stationary phases with the separation of closely related anti-cancer compounds: performance studies and application to drug quantitation in cell cultures with multi-well plate clean-up. **Journal of Chromatography A**, v. 1364, p. 83-95, 2014. ISSN 0021-9673.

GRITTI, F. et al. Characterization and kinetic performance of 2.1 x 100 mm production columns packed with new 1.6 μ m superficially porous particles. **Journal of Separation Science**, v. 37, n. 23, p. 3418-3425, 2014. ISSN 1615-9306.

HAIDAR AHMAD, I. A. et al. Comparison of core-shell particles and sub-2 μ m fully porous particles for use as ultrafast second dimension columns in two-dimensional liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1386, p. 31-8, 2015. ISSN 1873-3778.

HARTMAN, D. A. Determination of the stability of drugs in plasma. **Current Protocols in Pharmacology**, v. 7, n. 7.6, p. 1-8, 2003. ISSN 1934-8282.

HEGARTY, J. D. et al. One hundred years of schizophrenia: a meta-analysis of the outcome literature. **The American Journal of Psychiatry**, v. 151, n. 10, p. 1409-16, 1994. ISSN 0002-953X.

HERMANSSON, J.; GRAHN, A. Determination of drugs by direct injection of plasma into a biocompatible extraction column based on a protein-entrapped hydrophobic phase. **Journal of Chromatography A**, v. 660, n. 1, p. 119-129, 1994. ISSN 0021-9673.

HERVIOU, P. et al. Determination of irinotecan and SN38 in human plasma by TurboFlow™ liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 118, p. 284-291, 2016. ISSN 0731-7085.

HIEMKE, C. et al. AGNP Consensus Guidelines for Therapeutic Drug Monitoring in Psychiatry: Update 2011. **Pharmacopsychiatry**, v. 44, n. 6, p. 195-235, 2011. ISSN 0176-3679.

HIGASHI, K. et al. Determination of 3-hydroxypropylmercapturic acid in urine by three column-switching high-performance liquid chromatography with electrochemical detection using a diamond electrode. **Journal of Chromatography A**, v. 1517, p. 79-85, 2017. ISSN 0021-9673.

HU, L. et al. Analysis of the endogenous human serum peptides by on-line extraction with restricted-access material and HPLC-MS/MS identification. **Talanta**, v. 127, p. 191-195, 2014. ISSN 0039-9140.

HU, L. J. et al. A Simple HPLC-MS/MS Method for Determination of Tryptophan, Kynurenine and Kynurenic Acid in Human Serum and its Potential for Monitoring Antidepressant Therapy. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 41, n. 1, p. 37-44, 2017. ISSN 0146-4760.

JESSOME, L. L.; VOLMER, D. A. Ion suppression: a major concern in mass spectrometry. **Lc Gc North America**, v. 24, n. 5, p. 498, 2006. ISSN 1527-5949.

JOHNSON, D.; BOYES, B.; ORLANDO, R. The use of ammonium formate as a mobile-phase modifier for LC-MS/MS analysis of tryptic digests. **Journal of Biomolecular Techniques**, v. 24, n. 4, p. 187-97, 2013. ISSN 1943-4731.

JUENKE, J. M. et al. Simultaneous UPLC-MS/MS assay for the detection of the traditional antipsychotics haloperidol, fluphenazine, perphenazine, and thiothixene in serum and plasma. **Clinica Chimica Acta**, v. 423, p. 32-34, 2013. ISSN 0009-8981.

KAKITANI, A. et al. Simultaneous determination of water-soluble vitamins in beverages and dietary supplements by LC-MS/MS. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 31, n. 12, p. 1939-1948, 2014. ISSN 1944-0049.

KALL, M. A.; ROHDE, M.; JORGENSEN, M. Quantitative determination of the antidepressant vortioxetine and its major human metabolite in plasma. **Bioanalysis**, v. 7, n. 22, p. 2881-94, 2015. ISSN 1757-6180.

KANDA, T. et al. Synthesis of polymer-coated mixed-functional packing materials for direct analysis of drug-containing serum and plasma by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 672, n. 1-2, p. 51-7, 1994. ISSN 0021-9673.

KAPUR, S. et al. How antipsychotics work-from receptors to reality. **NeuroRX**, v. 3, n. 1, p. 10-21, 2006. ISSN 1545-5343.

KASPRZYK-HORDERN, B.; DINSDALE, R. M.; GUWY, A. J. Multi-residue method for the determination of basic/neutral pharmaceuticals and illicit drugs in surface water by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography-positive electrospray ionisation tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1161, n. 1-2, p. 132-145, 2007. ISSN 0021-9673.

KATAOKA, H.; SAITO, K. Recent advances in column switching sample preparation in bioanalysis. **Bioanalysis**, v. 4, n. 7, p. 809-32, 2012. ISSN 1757-6180.

KONERMANN, L. et al. Unraveling the Mechanism of Electrospray Ionization. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 1, p. 2-9, 2013. ISSN 0003-2700.

KRYSTAL, J. H. et al. Comparative and interactive human psychopharmacologic effects of ketamine and amphetamine: implications for glutamatergic and dopaminergic model psychoses and cognitive function. **Archives of General Psychiatry**, v. 62, n. 9, p. 985-94, 2005. ISSN 0003-990X.

LEE, X.-P. et al. Rapid and highly sensitive analysis of benzodiazepines and tandospirone in human plasma by automated on-line column-switching UFLC-MS/MS. **Legal Medicine**, v. 24, p. 36-55, 2017. ISSN 1344-6223.

LINDER, C. et al. A LC-MS/MS method for therapeutic drug monitoring of carbamazepine, lamotrigine and valproic acid in DBS. **Bioanalysis**, v. 7, n. 16, p. 2031-9, 2015. ISSN 1757-6180.

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. ISSN 1618-2642.

MARTINC, B. et al. Simultaneous determination of gabapentin, pregabalin, vigabatrin, and topiramate in plasma by HPLC with fluorescence detection. **Journal of Chromatography B**, v. 962, p. 82-8, 2014. ISSN 1570-0232.

MEYER, V. R. **Practical High-Performance Liquid Chromatography**. John Wiley & Sons, 2013. ISBN 1118681347.

MILLAN, M. J. et al. Negative symptoms of schizophrenia: clinical characteristics, pathophysiological substrates, experimental models and prospects for improved treatment. **European Neuropsychopharmacology**, v. 24, n. 5, p. 645-692, 2014. ISSN 0924-977X.

MIZUNO, K.; KATAOKA, H. Analysis of urinary 8-isoprostane as an oxidative stress biomarker by stable isotope dilution using automated online in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 112, p. 36-42, 2015. ISSN 0731-7085.

MIZUNO, Y. et al. Dopamine D2 receptor occupancy with risperidone or olanzapine during maintenance treatment of schizophrenia: a cross-sectional study. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 37, n. 1, p. 182-187, 2012. ISSN 0278-5846.

MOGOLLÓN, N. G. S. et al. O Estado da arte da cromatografia líquida bidimensional: conceitos fundamentais, instrumentação e aplicações. **Química Nova**, v. 37, p. 1680-1691, 2014. ISSN 0100-4042.

MOOSAVI, S. M. et al. An improved liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for quantification of dexmedetomidine concentrations in samples of human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 1073, p. 118-122, 2018. ISSN 1570-0232.

MORAES, G. D. O. I. et al. A new restricted access molecularly imprinted polymer capped with albumin for direct extraction of drugs from biological matrices: the case of chlorpromazine in human plasma. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 24, p. 7687-7696, 2013. ISSN 1618-2642.

PAN, J. et al. Review of online coupling of sample preparation techniques with liquid chromatography. **Analytica Chimica acta**, v. 815, p. 1-15, 2014. ISSN 0003-2670.

PARK, T.; KUNTZ, K. M. Cost-effectiveness of second-generation antipsychotics for the treatment of schizophrenia. **Value in Health**, v. 17, n. 4, p. 310-9, 2014. ISSN 1098-3015.

PATTEET, L. et al. Determination of Common Antipsychotics in Quantisal-Collected Oral Fluid by UHPLC-MS/MS: Method Validation and Applicability for Therapeutic Drug Monitoring. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 38, n. 1, p. 87-97, 2016. ISSN 0163-4356.

PENG, J. et al. New techniques of on-line biological sample processing and their application in the field of biopharmaceutical analysis. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 6, n. 6, p. 540-551, 2016. ISSN 2211-3835.

PINTO, M. A. L.; DE SOUZA, I. D.; QUEIROZ, M. E. C. Determination of drugs in plasma samples by disposable pipette extraction with C18-BSA phase and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 139, p. 116-124, 2017. ISSN 0731-7085.

QUEIROZ, M.; MELO, L. Selective capillary coating materials for in-tube solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography to determine drugs and biomarkers in biological samples: a review. **Analytica Chimica acta**, v. 826, p. 1-11, 2014. ISSN 0003-2670.

RAHMOUNE, H. et al. Explorando o componente inflamatório da esquizofrenia. **Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)**, v. 40, n. 1, p. 28-34, 2013. ISSN 0101-6083.

RAINVILLE, P. D. et al. Comprehensive investigation of the influence of acidic, basic, and organic mobile phase compositions on bioanalytical assay sensitivity in positive ESI mode LC/MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 59, p. 138-150, 2012. ISSN 0731-7085.

SADOCK, B. J.; SADOCK, V. A.; RUIZ, P. **Compêndio de psiquiatria: Ciência do Comportamento e Psiquiatria Clínica**. Porto Alegre: 2017. 1490 ISBN 9788582713785.

SANTOS, M. G. et al. Analysis of tricyclic antidepressants in human plasma using online-restricted access molecularly imprinted solid phase extraction followed by direct mass spectrometry identification/quantification. **Talanta**, v. 163, p. 8-16, 2017. ISSN 0039-9140.

SHIN, J. S. et al. Direct analysis of prostaglandin-E2 and -D2 produced in an inflammatory cell reaction and its application for activity screening and potency evaluation using turbulent flow chromatography liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1463, p. 128-35, 2016. ISSN 0021-9673.

SILVESTRO, L.; TARCOMNICU, I.; SAVU, S. R. Matrix effects in mass spectrometry combined with separation methods—comparison HPLC, GC and discussion on methods to control these effects. In: (Ed.). **Tandem Mass Spectrometry - Molecular Characterization**, 2013. cap. 1, p.3-37. ISBN 978-953-51-1136-8.

SIRHAN, A. Y.; TAN, G. H.; WONG, R. C. S. Determination of aflatoxins in food using liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time of flight mass spectrometry (LC-ESI-QTOF-MS/MS). **Food Control**, v. 31, n. 1, p. 35-44, 2013. ISSN 0956-7135.

SIUZDAK, G. Ion Sources and Sample Introduction. In: (Ed.). **Mass Spectrometry for Biotechnology**. San Diego: Academic Press, 1996. cap. 1, p.4-31. ISBN 9780080535845.

SOUVERAIN, S.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J. L. Restricted access materials and large particle supports for on-line sample preparation: an attractive approach for biological fluids analysis. **Journal of Chromatography B**, v. 801, n. 2, p. 141-156, 2004. ISSN 1570-0232.

SOUZA, I. D. et al. Selective molecularly imprinted polymer combined with restricted access material for in-tube SPME/UHPLC-MS/MS of parabens in breast milk samples. **Analytica Chimica acta**, v. 932, p. 49-59, 2016. ISSN 0003-2670.

SUN, J. et al. Characterization of schizophrenia adverse drug interactions through a network approach and drug classification. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013. ISSN 2314-6133.

TAIBON, J. et al. An LC-MS/MS based candidate reference method for the quantification of carbamazepine in human serum. **Clinica Chimica Acta**, v. 472, p. 35-40, 2017. ISSN 0009-8981.

TANDON, R. et al. Definition and description of schizophrenia in the DSM-5. **Schizophrenia Research**, v. 150, n. 1, p. 3-10, 2013. ISSN 0920-9964.

TRON, C. et al. Dried Blood Spots Combined With Ultra-High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry for the Quantification of the Antipsychotics Risperidone, Aripiprazole, Pipamperone, and Their Major Metabolites. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 39, n. 4, p. 429-440, 2017. ISSN 0163-4356.

VALLIANATOU, K. Antipsychotics. **Medicine**, v. 40, n. 12, p. 676-678, 2012. ISSN 1357-3039.

VAN EECKHAUT, A. et al. Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: Evaluation of matrix effects. **Journal of Chromatography B**, v. 877, n. 23, p. 2198-2207, 2009. ISSN 1570-0232.

WALTER, T. H.; ANDREWS, R. W. Recent innovations in UHPLC columns and instrumentation. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, v. 63, p. 14-20, 2014. ISSN 0165-9936.

WANG, C. et al. Preparation of an internal surface reversed-phase restricted-access material for the analysis of hydrophobic molecules in biological matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 1343, p. 195-199, 2014. ISSN 0021-9673.

WANG, C. Y. et al. Risperidone maintenance treatment in schizophrenia: a randomized, controlled trial. **The American Journal of Psychiatry**, v. 167, n. 6, p. 676-85, 2010. ISSN 0002-953x.

WEN, D. et al. A rapid and simple HPLC-MS/MS method for the simultaneous quantification of valproic acid and its five metabolites in human plasma and application to study pharmacokinetic interaction in Chinese epilepsy patients. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 149, p. 448-456, 2018. ISSN 0731-7085.

WIDMER, N. et al. Review of therapeutic drug monitoring of anticancer drugs part two-targeted therapies. **European Journal of Cancer**, v. 50, n. 12, p. 2020-36, 2014. ISSN 0959-8049.

XIA, Y. Q.; JEMAL, M. Phospholipids in liquid chromatography/mass spectrometry bioanalysis: comparison of three tandem mass spectrometric techniques for monitoring plasma phospholipids, the effect of mobile phase composition on phospholipids elution and the association of phospholipids with matrix effects. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 23, n. 14, p. 2125-2138, 2009. ISSN 0951-4198.

XIONG, L. et al. Determination of co-administrated opioids and benzodiazepines in urine using column-switching solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1395, p. 99-108, 2015. ISSN 0021-9673.

XU, W. et al. Determination of sulfonamides in bovine milk with column-switching high performance liquid chromatography using surface imprinted silica with hydrophilic external layer as restricted access and selective extraction material. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 46, p. 7198-7207, 2010. ISSN 0021-9673.

YILMAZ, Z. et al. Antipsychotics, dopamine D(2) receptor occupancy and clinical improvement in schizophrenia: a meta-analysis. **Schizophrenia Research**, v. 140, n. 1-3, p. 214-20, 2012. ISSN 0920-9964.

ZHANG, L. et al. Aminopropyltriethoxysilane-silica hybrid monolithic capillary microextraction combined with inductively coupled plasma mass spectrometry for the determination of trace elements in biological samples. **Journal of Separation Science**, v. 34, n. 16-17, p. 2247-2254, 2011. ISSN 1615-9314.

ZHANG, X. et al. A column-switching LC–MS/MS method for simultaneous quantification of biomarkers for 1,3-butadiene exposure and oxidative damage in human urine. **Journal of Chromatography B**, v. 1002, p. 123-129, 2015. ISSN 1570-0232.

ZHOU, X. et al. Automated on-line column-switching high performance liquid chromatography isotope dilution tandem mass spectrometry method for the quantification of bisphenol A, bisphenol F, bisphenol S, and 11 other phenols in urine. **Journal of Chromatography B**, v. 944, p. 152-156, 2014. ISSN 1570-0232.

Aprovação do Comitê de Ética

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

"Campus" de Ribeirão Preto

Of.CEtP/FFCLRP-USP/147/-jsl

Ribeirão Preto, 08 de novembro de 2011.

Prezada Pesquisadora,

Comunicamos a V. Sa. que o trabalho intitulado
"CROMATOGRAFIA LÍQUIDA BIDIMENSIONAL COM DETECÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE
MASSAS EM TANDEM (2D-LC-MS/MS) PARA DETERMINAÇÃO DE NEUROTRANSMISSORES,
AMINOÁCIDOS E FÁRMACOS EM AMOSTRAS DE PLASMA PARA ELUCIDAÇÃO DA
NEUROBIOLOGIA DA ESQUIZOFRENIA E MONITORIZAÇÃO TERAPÊUTICA" foi reanalisado
pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FFCLRP-USP, e enquadrado na categoria:
APROVADO, de acordo com o Processo CEP-FFCLRP nº 591/2011 -
2011.1.1664.59.2.

Atenciosamente,

Prof.ª Dr.ª ANA RAQUEL LUCATO CIANFLONE
Coordenadora

À Senhora

Prof. Dr. Maria Eugênia Costa Queiroz
Docente do Departamento de Química da FFCLRP - USP

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa da FFCLRP

Fone: (16) 3602-4811

Fax: (16) 3633-2660 (direto) ou 3633-5015

Avenida Bandeirantes, 3900 - bloco 3 - sala 16 - 14040-901 - Ribeirão Preto - SP - Brasil

Homepage: <http://www.fclrp.usp.br> - e-mail: coetp@fclrp.usp.br

CAPÍTULO II

DESEMPENHO CROMATOGRÁFICO DE COLUNAS
SUPERFICIALMENTE POROSA E TOTALMENTE POROSA PARA A
DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS EM AMOSTRAS DE PLASMA
POR LC-MS/MS

CAPÍTULO II

1. INTRODUÇÃO

1.1 Colunas analíticas (HPLC) recheadas com partículas totalmente e superficialmente porosas

O desenvolvimento tecnológico da técnica HPLC tem sido direcionado para a obtenção de separações cromatográficas rápidas para diferentes substâncias, com alta eficiência, alta resolução e baixa pressão do sistema analítico.

Neste contexto, vários estudos têm sido realizados para a redução da escala do tamanho das partículas das fases estacionárias totalmente porosas ou superficialmente porosas (Lanças, 2010; González-Ruiz *et al.*, 2015).

O conceito da fase estacionária com partículas superficialmente porosa foi introduzido por Horváth e colaboradores em 1967 (Horvath *et al.*, 1967). Posteriormente em 1969, Kirkland publicou um trabalho pioneiro no desenvolvimento de partículas superficialmente porosas com diâmetro de 30 – 55 μm , as quais resultaram em rápidas separações cromatográficas, devido ao menor volume de poro permitindo a difusão rápida dos compostos alvo para dentro e para fora da fase estacionária (Kirkland, 1969; Lanças, 2010).

No entanto, na década de 70, em razão do desenvolvimento de partículas totalmente porosas com diâmetros inferiores a 10 μm e a dificuldade de sintetizar partículas superficialmente porosas de menor diâmetro, o uso das partículas superficialmente porosas foi direcionado para cartuchos SPE de preparo de amostra (Lanças, 2010).

O início do século XXI foi marcado pelo o desenvolvimento da cromatografia líquida de ultra eficiência (“*Ultra-High Performance Liquid Chromatography*” – UHPLC). Tal fato permitiu a utilização de colunas recheadas com partículas cada vez menores, havendo assim, um ganho considerável em desempenho cromatográfico com separações rápidas, muito eficientes e com menor volume de fase móvel (Lanças, 2010; González-Ruiz *et al.*, 2015).

No entanto, em razão da pressão elevada dos sistemas cromatográficos, resultantes das partículas totalmente porosas com pequeno diâmetro, as colunas recheadas com partículas superficialmente porosas renasceram. A produção e comercialização destas colunas com partículas superficialmente porosas ocorreram no ano de 2006, com as colunas HALO®. Estas colunas revelaram o grande potencial dessa nova tecnologia (Lanças, 2010; González-Ruiz *et al.*, 2015).

As colunas superficialmente porosas quando utilizadas com sistemas de cromatografia líquida de alta eficiência (“*High Performance Liquid Chromatography*” – HPLC) convencionais apresentam algumas vantagens sobre a UHPLC, como eficiente separação em baixa pressão e instrumentação menos dispendiosa. Portanto, as partículas superficialmente porosas se estabeleceram como uma alternativa às partículas totalmente porosas. A Figura 17 ilustra uma partícula superficialmente porosa (González-Ruiz *et al.*, 2015).

1.2 Síntese das partículas superficialmente porosas

Considerando a nomenclatura das partículas superficialmente porosas (também denominadas de *core-shell*, *fused-core* ou *shell*) fica evidente que tal partícula é constituída por um núcleo sólido e uma camada porosa (Figura 17).

Figura 17. Ilustração de uma partícula superficialmente porosa (Fonte (Ali *et al.*, 2012) – adaptado).

O núcleo e a camada porosa podem ser constituídos por estruturas ou materiais diferentes (Figura 18). O núcleo pode ser uma simples esfera (Figura 18A) ou uma agregação de diversas esferas pequenas (Figura 18B). É possível obter uma casca vazia com uma pequena esfera dentro (Figura 18C). A camada porosa pode ser formada por uma camada contínua (Figura 18A-C), pela agregação de pequenas esferas sobre um grande núcleo esférico (Figura 18D e E) ou pequenos núcleos esféricos agregados (Figura 18F). Geralmente, as colunas cromatográficas recheadas com partículas superficialmente porosas são de sílica (Figura 18I) (Hayes *et al.*, 2014).

O mais comum processo para obtenção dessas partículas envolve a síntese inicial do núcleo de sílica, tipicamente sintetizado pelo processo de Stöber (Tanaka e McCalley, 2016). O processo foi desenvolvido por Stöber e Fink em 1968, usado para preparar partículas de sílica (SiO_2) de tamanho e uniformidade controlável (Stöber *et al.*, 1968). Foi elaborado um processo de sol-gel em que um precursor molecular (tipicamente etileno de tetraetilo) reage com água em uma solução alcoólica e as moléculas resultantes se ligam formando estruturas maiores (Levy e Zayat, 2015).

De um modo mais detalhado, o precursor tetraetil ortossilicato ($\text{Si}(\text{OEt})_4$ – TEOS) é hidrolisado em álcool (tipicamente metanol ou etanol) e na presença de amônia como catalisador. A reação produz etanol e uma mistura de etóxi-silânóis (tais como $\text{Si}(\text{OEt})_3\text{OH}$, $\text{Si}(\text{OEt})_2(\text{OH})_2$), e até mesmo hidróxido de silício ($\text{Si}(\text{OH})_4$) que pode condensar com TEOS ou outro silanol ocorrendo a perda de álcool ou água. Após a hidrólise dos grupos etóxi e subsequente condensação a reação finaliza com o processo de reticulação (“*crosslinking*”) (Stöber *et al.*, 1968; Levy e Zayat, 2015).

Figura 18. Representação esquemática dos diferentes tipos de partículas superficialmente porosas (Fonte (Hayes *et al.*, 2014) – adaptado).

A camada porosa é ligada pelo procedimento de camada por camada (“*layer-by-layer*”). O núcleo de sílica carregado negativamente (pH básico) reage (eletrostática) com um polímero orgânico carregado positivamente (ex. dextran, polietilenoglicol). Em seguida o excesso é removido por lavagem e filtração ou centrifugação. Em seguida ocorre o recobrimento com uma suspensão de nanopartículas de sílica (10-16 nm, diâmetro) de carga oposta (negativa). O processo é repetido até que se obtenha a espessura desejada. Segundo a literatura, 5-6 repetições resultam em uma camada porosa de 0,25 μm de espessura, enquanto que 40-50 repetições em 0,5 μm de espessura. A Figura 19 ilustra o processo crescimento da camada porosa para obtenção da partícula final (Chen *et al.*, 2015; Tanaka e Mccalley, 2016).

Figura 19. Ilustração do processo de síntese da camada porosa para as partículas superficialmente porosas (Fonte (Tanaka e Mccalley, 2016) – adaptado).

1.3 Parâmetros cromatográficos das partículas totalmente e superficialmente porosas

A eficiência das separações cromatográficas, expressa pela altura de prato (H , μm), tem sido descrita pela clássica equação de Van Deemter (Equação 6). Neste

modelo, os três diferentes termos (A , B e C) somam contribuições que eleva a altura do prato (H) e consequentemente diminui a eficiência (Hayes *et al.*, 2014; González-Ruiz *et al.*, 2015).

$$H = A + \frac{B}{\mu} + C\mu$$

Equação 6

O termo A da equação de Van Deemter, também descrito como difusão turbulenta, refere-se ao alargamento dos picos devido aos múltiplos caminhos seguidos pelas moléculas do analito. Esses caminhos são dependentes do tamanho das partículas bem como sua morfologia. O termo B está relacionado à difusão longitudinal ou difusão do soluto na fase móvel e este termo pode ser minimizado com o uso de altas velocidades lineares da fase móvel. A difusão ocorre das regiões centrais (maior concentração) para as regiões axiais (menor concentração) (Hayes *et al.*, 2014; González-Ruiz *et al.*, 2015; Tanaka e Mccalley, 2016).

O termo C é descrito pela transferência de massa do analito entre a fase móvel e fase estacionária. Portanto, o uso de colunas com partículas pequenas (sub-2 μm) resulta em rápida difusão dos analitos entre as fases, em razão da menor profundidade de poros (Hayes *et al.*, 2014; González-Ruiz *et al.*, 2015; Tanaka e Mccalley, 2016). A figura 20 demonstra a ilustração dos termos A , B e C da equação de Van Deemter.

Figura 20. Ilustração dos termos A , B e C da equação 2.

1.4 Comparação dos aspectos cromatográficos entre partículas totalmente e superficialmente porosas

Entretanto, para fins de comparação entre colunas com diferentes comprimentos e tamanhos de partículas, utiliza-se a equação de Van Deemter em sua forma reduzida (Equação 7). O valor de H é substituído por h enquanto que o valor da velocidade linear (μ) é substituído pela velocidade linear reduzida (ν). Os termos A , B e C são substituídos por a , b e c , porém não há alterações em suas definições (González-Ruiz *et al.*, 2015).

$$h = a + \frac{b}{\nu} + c\nu$$

Equação 7

Os termos A e C dependem diretamente do diâmetro da partícula, de modo que uma redução do tamanho da partícula aumenta a eficiência de separação. Em contrapartida, colunas empacotadas com partículas menores apresentam menor permeabilidade, ocasionando em pressões de trabalho mais elevadas de acordo com a equação 8 (González-Ruiz *et al.*, 2015).

$$\Delta P = \phi \frac{\mu \eta L}{d_p^2}$$

Equação 8

Onde ΔP é a variação de pressão, ϕ é a resistência à vazão, L é o comprimento da coluna, η é a viscosidade da fase móvel, μ é a velocidade linear e d_p é o diâmetro da partícula.

Quando comparadas com as partículas totalmente porosas, as partículas superficialmente porosas apresentam uma maior densidade, e consequentemente uma maior homogeneidade da estrutura do leito cromatográfico, resultando em uma diminuição do termo A (dispersão turbulenta) (Bruns *et al.*, 2012). O desvio padrão relativo (DPR) obtido oscila de 3-6% para as partículas superficialmente porosas, enquanto que para as partículas totalmente porosas apresentam valores de 10-20%. O real motivo da obtenção de uma maior homogeneidade pelo empacotamento das partículas superficialmente porosas ainda não é totalmente elucidado, entretanto, se defende que a maior homogeneidade se deve ao fato dessas partículas apresentarem um núcleo rígido (Bruns *et al.*, 2012; Tanaka e McCalley, 2016).

Além de um melhor empacotamento, uma das principais vantagens do emprego das partículas superficialmente porosa é redução no número total de poros, diminuindo o comprimento do caminho de difusão, devido ao núcleo sólido limita o volume de poro disponível para a interação analito/fase estacionária e que reduz a contribuição do termo C , devido a transferência de massas mais rápida (Van Deemter *et al.*, 1956; Hayes *et al.*, 2014).

Características da partícula como, tamanho da partícula e espessura da camada porosa pode influenciar significativamente nos parâmetros de separação cromatográfica. Diminuindo a espessura da camada porosa, a transferência de massas ocorre mais rapidamente e aumenta a eficiência cromatográfica (Figura 21) (Destefano *et al.*, 2012; Hayes *et al.*, 2014).

Figura 21. Diminuição do alargamento do pico devido ao menor volume da camada porosa.

Portanto, as partículas superficialmente porosas, quando comparadas às partículas totalmente porosa de menor diâmetro, apresentam a mesma eficiência cromatográfica e menor pressão de trabalho, ou seja, pressão de trabalho igual à obtida com partículas totalmente porosas com maior diâmetro de partícula (Figura 22).

Figura 22. Ilustração da eficiência e pressão de uma partícula superficialmente porosa relacionada as partículas totalmente porosas (Fonte (Rios, 2014) – adaptado).

1.5 Parâmetros de avaliação das colunas

1.5.1 Eficiência cromatográfica

A eficiência cromatográfica é definida em termos do número de pratos teóricos (N). Geralmente, N é avaliado pela separação de hidrocarbonetos aromáticos, porém não há nenhuma objeção para o cálculo da eficiência com os analitos de interesse (Visky *et al.*, 2002; Sultan *et al.*, 2014). A eficiência fornece informações sobre a qualidade do processo de empacotamento e propriedades físicas das partículas. Assim, a eficiência depende do tamanho da partícula e da densidade da cadeia alquílica na superfície da sílica (Lesellier e West, 2007; Kulikov e Galat, 2009). O número de pratos teóricos pode ser medido pela equação 9.

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w_b} \right)^2 \quad \text{Equação 9}$$

Onde t_R e w_b são o tempo de retenção e a largura da base do pico dos picos de interesse.

A Tabela 15 ilustra as representações para a avaliação dos parâmetros cromatográficos.

Tabela 15. Representação para a avaliação dos parâmetros cromatográficos (Fonte (Visky *et al.*, 2002)).

Parâmetros cromatográficos	Representação
Eficiência	n_{MPPH}
	$n_{tolueno}$
	$n_{fenilpentano}$
Hidrofobicidade	$rk_{tolueno/MPPH}$
	$k_{tolueno}$
	$k_{etilbenzeno}$
	$rk_{etilbenzeno/tolueno}$
	$k_{fenilpentano}$
Atividade Silanol	$rk_{difenidramina/MPPH}$
	$rk_{cafeína/fenol}$
	$rk_{piridina/cafeína}$
Impureza metálica	$rk_{piridina/fenol}$
	$n_{acetilacetona}$
	$k_{2,2'-dipiridil}$
	$k_{diidroxinaftaleno}$
	$rk_{diidroxinaftaleno/2,2'-dipiridil}$

n = número de pratos teóricos, k = fator de retenção, rk = razão entre os fatores de retenção, MPPH = 5-*p*-metilfenil-5-fenil-hidantoína.

1.5.2 Hidrofobicidade

O parâmetro de hidrofobicidade infere diretamente nos tempos de retenção dos analitos analisados, ou seja, na interação destes com as cadeias alquílicas (C₈, C₁₈) ligadas a sílica. O caráter hidrofóbico depende do tamanho cadeia alquílica ligada, densidade de ligação e do diâmetro do poro (Kulikov e Galat, 2009).

1.5.3 Atividade Silanol

A atividade silanol ilustra as interações (i) dos grupos silânóis neutros (SiOH) com analitos ácidos e básicos, através da ligação de hidrogênio (doador/aceptor) e (ii) dos grupos silânóis ionizados (SiO⁻) com analitos básicos ionizados (B⁺), através de

interações iônicas (troca de cátion). Portanto, esta atividade depende da quantidade de grupos silanóis disponíveis e do seu caráter ácido, assim, a faixa de pH da fase móvel influencia na ionização. Além disso, a atividade silanol também está relacionada ao tipo de silanóis residuais, podendo ser isolado, germinal ou vicinal (Figura 23) (Lesellier e West, 2007; Del Rosal *et al.*, 2015).

Figura 23. Ilustração de silanol, isolado, germinal, vicinal e superfície siloxano (Fonte (Del Rosal *et al.*, 2015) – adaptado).

1.5.4 Impurezas metálicas

As impurezas metálicas presentes na fase estacionária podem aumentar a capacidade de sorção do suporte de sílica através da formação de complexos com os analitos de interesse. Os metais podem ser provenientes de impurezas do processo de síntese, da fase móvel ou de cartuchos de extração (Kulikov e Galat, 2009). Deste modo, as impurezas metálicas na sílica, devido ao aumento da acidez de grupos silanóis, podem comprometer a simetria do pico. (Lesellier e West, 2007). As impurezas metálicas podem ser determinadas pelo uso de agentes quelantes (Tabela 15).

1.6 A avaliação de colunas totalmente e superficialmente porosas na determinação de fármacos em amostras biológicas

A técnica de UHPLC, quando comparado à HPLC, resulta em separações rápidas, mais eficientes, melhor resolução dos analitos e menor consumo de solventes (Kucerova *et al.*, 2013). No entanto, a UHPLC requer altas pressões do sistema cromatográfico para a percolação da fase móvel ao longo de colunas recheadas com partículas menores que 2 µm. O desenvolvimento da nova geração de colunas superficialmente porosas

favoreceu a técnica UHPLC, pois proporcionou separações altamente eficientes com elevadas vazões, mas com pressões de trabalho relativamente baixas (Hayes *et al.*, 2014). Atualmente, analistas tanto da área industrial quanto acadêmica têm empregado as colunas superficialmente porosas recheadas com partículas sub-3 μm , com o intuito de melhorar o desempenho cromatográfico de métodos cromatográficos desenvolvidos com colunas totalmente porosas (Lanças, 2010; Fekete e Guillarme, 2013; Tanaka e Mccalley, 2016).

O desempenho cromatográfico de colunas totalmente e superficialmente porosas têm sido avaliadas para a separação de diferentes substâncias tais como, vitaminas (Kucerova *et al.*, 2013), aflotoxinas (Sultan *et al.*, 2014), fármacos psicoativos, drogas ilícitas e seus metabolitos (Borova *et al.*, 2014), anticorpos monoclonal e fármacos neutros e básicos (Bobaly *et al.*, 2014), oligonucleotídeo RNA (Biba *et al.*, 2013), e peptídeos (Fekete e Guillarme, 2013). Atualmente, um grande número de diferentes colunas em fase reversa C₁₈ estão disponíveis no comércio (Dehouck *et al.*, 2004; Haghedooren *et al.*, 2007).

Recentemente, na área clínica há uma crescente demanda de métodos bioanalíticos para análises de rotina com alta sensibilidade analítica, rapidez e baixo custo.

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, sistema tandem, (“*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*” – LC-MS/MS) tem sido destacada como uma técnica de referência para bioanálises (Fu *et al.*, 2016).

Alguns fatores podem influenciar as análises LC-MS/MS, tais como: (i) a coeluição de substâncias que poderá resultar na supressão ou aumento do sinal iônico durante o processo de ionização (Van Eeckhaut *et al.*, 2009; Xia e Jemal, 2009) e (ii) aumento significativo da largura do pico obtido durante as análises MS/MS (Ardrey, 2003). Estes fatores podem influenciar as análises quantitativas, alterando os limites de quantificação e simetria dos picos. Neste contexto, a avaliação do desempenho cromatográfico de colunas totalmente e superficialmente porosas é de grande relevância para o desenvolvimento de um método bioanalítico de alta sensibilidade analítica (Ardrey, 2003; Krueve *et al.*, 2015; Schure *et al.*, 2017; Wagner *et al.*, 2017).

2. OBJETIVOS

Avaliar o desempenho cromatográfico de diferentes colunas totalmente e superficialmente porosas para a análise fármacos em amostras de plasma por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) e cromatografia líquida acoplada ao detector de arranjo de diodos (“*Liquid Chromatography-Diode Array Detector*” – LC-DAD).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes e padrões cromatográficos

Os padrões cromatográficos dos fármacos (Carbamazepina, Mirtazapina, Imipramina, Fluoxetina, Olanzapina, Clonazepam, Clorpromazina, Citalopram, Clozapina, Haloperidol, Lamotrigina, Diazepam, Sertralina, Clomipramina, Paroxetina e Quetiapina) e dos padrões internos (carbamazepina-d10, imipramina-d3, diazepam-d5, sertralina-d3, fluoxetina-d6, clomipramina-d3, clonazepam-d4, citalopram-d6, clozapina-d4, paroxetina-d6, haloperidol-d4 e quetiapina-d8) foram adquiridos da Cerilliant Corporation (Texas, USA). Metanol (MeOH) e Acetonitrila (ACN), grau HPLC, acetato de amônio e ácido fórmico foram obtidos do fornecedor JT Baker (Phillipsburg, EUA). Uracila, tolueno, fenol, cafeína e 2,2'-dipiridil foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). A água utilizada no preparo da fase móvel foi purificada pelo sistema Milli-Q, Millipore (São Paulo, Brasil), apresentando condutividade de 18,2 MΩ cm. A fase móvel foi filtrada através de sistema de filtração à vácuo com membrana de celulose adquirida pela Millipore e desgaseificada em banho de ultrassom por aproximadamente 15 min.

3.2 Amostras de plasma

As amostras de plasma branco foram obtidas de voluntários não expostos a quaisquer fármacos a 72 horas que antecederam a coleta. Estas amostras de plasma branco e as amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos foram fornecidas pela equipe de Enfermagem Psiquiátrica do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Brasil.

Os fármacos em análise em soluções padrão e em amostras de plasma, segundo testes de estabilidade no injetor automático (amostra de plasma após preparo prévio) e nas condições de análise à temperatura ambiente mostraram-se estáveis. Segundo trabalhos da literatura, os fármacos em amostras de plasma mostraram-se estáveis durante seis meses a -20 °C, assim como após três ciclos de congelamento/descongelamento (Hartman, 2003; Cooper e Negrusz, 2013; Breier *et al.*, 2014).

3.3 Preparo das amostras de plasma para análises LC-MS/MS

Em um tubo de ensaio foram adicionados 200 μL de amostra de plasma, 25 μL da solução padrão dos fármacos (250 ng mL^{-1}) e 400 μL de acetonitrila para precipitação das proteínas. Este procedimento foi realizado em tubo eppendorf sob agitação em vortex por 1 min, e posterior centrifugado por 30 min a 9000 g (Centrífuga 5810R, Eppendorf®). O sobrenadante (500 μL) foi transferido para um tubo eppendorf, submetido à secagem em concentrador a vácuo (Eppendorf, Brasil), e o resíduo seco foi reconstituído com 125 μL com (A) 4 mmol L^{-1} de solução de acetato de amônio (com 0,1% de ácido fórmico) e (B) acetonitrila (63:37 v/v). Em seguida, 10 μL dessa solução foi injetado no sistema LC-MS/MS.

3.4 Soluções padrão para análises LC-DAD

Para os testes de atividade silanol e impurezas metálicas, os padrões cromatográficos de uracila (0,1 mg), cafeína (0,3 mg), fenol (3,5 mg) e 2,2'-dipiridil (3 mg) foram diluídos em 10,0 mL da fase móvel (metanol/água 34:100, m/m). Para o teste de hidrofobicidade, padrões cromatográficos de uracila (0,1 mg) e tolueno (10 mg) foram diluídos em 10,0 mL de fase móvel (metanol/água 50:50, m/m) (Visky *et al.*, 2002). Em seguida, 10 μL dessas soluções foram injetados no sistema LC-DAD. O tempo de retenção da uracila foi utilizada para determinação do tempo morto (t_0).

3.5 Análises LC-MS/MS

As análises por LC-MS/MS foram realizadas utilizando um sistema UPLC Waters ACQUITY H-Class acoplado ao espectrômetro de massas Xevo® TQ-D com analisador de massas do tipo triplo quadrupolo e fonte Z-spray, operando em modo positivo (Waters Corporation, Milford, MA, USA). 10 μL das amostras foram injetadas no sistema cromatográfico com injetor automático a 10 °C. Para separação cromatográfica foi utilizada a fase móvel constituída por (A) 4 mmol L^{-1} de solução de acetato de amônio (com 0,1% de ácido fórmico) e (B) acetonitrila (63:37 v/v), no modo isocrático. Utilizou-se N_2 (pureza 99,9%) a 600 °C como gás de dessolvatação e argônio (pureza 99,9999%) como gás de colisão. A temperatura da fonte de ionização foi de 150 °C, voltagem do capilar 0,5 kV e fluxo de dessolvatação 500 L h^{-1} . Todos os dados foram adquiridos no modo SRM. O dwell time foi estabelecido para cada transição separadamente e o tempo

entre cada varredura foi configurado no modo automático. Os dados foram adquiridos usando o software MassLynx V4.1.

Considerando a altura do prato reduzido, h , diferentes temperaturas (15 a 40 °C) foram avaliadas para as colunas Xselect 2,5 μm e Cortecs 2,7 μm , sendo uma representante das colunas totalmente porosas e a outra das colunas superficialmente porosa, respectivamente. Diferentes vazões (de 0,1 até 0,5 mL min^{-1}) foram avaliadas para a otimização das separações cromatográficas das diferentes colunas. Para esses ensaios, 10 μL da solução padrão dos fármacos (50 ng mL^{-1}) foram injetados no sistema LC-MS/MS.

3.6 Análises LC-DAD

As análises LC-DAD foram realizadas em um sistema Waters ACQUITY UPLC H-class acoplado a um detector de arranjo de diodos (Waters Corporation, Milford, MA, EUA). A fase móvel utilizada nos testes de Hidrofobicidade consistiu em metanol/água (50:50 m/m, modo isocrático), enquanto que para os testes de atividade silanol e impureza metálica, a fase móvel consistiu em metanol/água (34:100 m/m, modo isocrático). O comprimento de onda utilizado foi de 235 nm e a temperatura de 40 °C para ambos os métodos (Visky *et al.*, 2002).

3.7 Parâmetros cromatográficos

Distintas colunas de fase reversa C_{18} com diferentes morfologias de partículas (superficialmente porosas e totalmente porosas) foram avaliadas (Tabela 16).

As recentes colunas com partículas superficialmente porosas Cortecs 1,6 μm e Kinetex 1,3 μm foram gentilmente emprestadas pela empresa Waters (Milford, USA) e Phenomenex (Torrance, USA), respectivamente. A coluna Kinetex 1,7 μm foi adquirida da empresa Phenomenex (Torrance, USA). As colunas Xselect 2,5 μm , Acquity 1,7 μm e Cortecs 2,7 μm foram adquiridas de empresa Waters (Milford, USA).

O detector de arranjo de diodos foi utilizado para os ensaios de hidrofobicidade (k_{toluenp}), atividade silanol ($r_{k_{\text{cafeina/phenol}}}$) e impurezas metálicas ($k_{2,2'}$ – dipiridil) (Visky *et al.*, 2002). Os outros parâmetros cromatográficos: altura do prato reduzido (h) vs velocidade linear reduzida (v), resolução, capacidade de pico, assimetria e fator de retenção foram analisados por espectrometria de massas para aumento da detectabilidade e seletividade do método.

Tabela 16. Principais características das colunas em fase reversa avaliadas

Colunas	Comprimento (mm)	Diâmetro Interno (mm)	Partícula (µm)	Fase estacionária
X Select CSH (Waters)	100	2,1	2,5	C ₁₈ (<i>charged surface hybrid</i>) Totalmente porosa
Acquity UHPLC CSH (Waters)	100	2,1	1,7	C ₁₈ (<i>charged surface hybrid</i>) Totalmente porosa
Cortecs (Waters)	100	2,1	2,7	C ₁₈ + Core-shell
Cortecs UHPLC (Waters)	100	2,1	1,6	C ₁₈ + Core-shell
Kinetex UHPLC (Phenomex)	100	2,1	1,7	C ₁₈ TMS <i>endcapping</i> Core-shell
Kinetex UHPLC (Phenomex)	50	2,1	1,3	C ₁₈ TMS <i>endcapping</i> Core-shell

CSH = “*Charged Surface Hybrid*” – superfície híbrida carregada

Os parâmetros cromatográficos: número de pratos teóricos (N), altura do prato reduzido (h), capacidade de pico (P_c), resolução (R_s), assimetria (A_s) e impedância (E) foram avaliados de acordo com as equações de 2 a 12 (Dolan, 2002; 2003; Horie *et al.*, 2012; Moldoveanu e David, 2012; Pereira, 2012; Meyer, 2013; Chester, 2014; Sultan *et al.*, 2014). As equações de 2 a 5 foram rerepresentadas do capítulo 1 da presente tese.

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad \text{Equação 2}$$

Onde t_R é o tempo de retenção do composto de interesse e o t_0 é o tempo de um composto não retido (tempo morto).

$$A_s = \frac{b}{a} \quad \text{Equação 3}$$

Onde a e b são medidas a 10% da altura do pico.

$$h = \frac{L}{N \times d_p} \quad \text{Equação 4}$$

Onde L é o comprimento da coluna, d_p é o diâmetro da partícula e N é o número de pratos teóricos.

$$P_c = 1 + \left[\frac{\sqrt{N}}{4} \times \ln \left(\frac{t_R}{t_i} \right) \right] \quad \text{Equação 5}$$

Onde t_R e t_i são os tempos de retenção para o primeiro e o ultimo pico eluídos no cromatogramas e N é o número de pratos teóricos.

$$R_s = 2 \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{(w_{b1} + w_{b2})} \quad \text{Equação 10}$$

Onde t_{R1} e t_{R2} são os tempos de retenção de dois picos de interesse, w_{b1} e w_{b2} são as larguras de base medidos na linha de base.

$$E = \frac{\Delta P \times t_0}{\eta \times N^2} \quad \text{Equação 11}$$

Onde ΔP é a variação de pressão, η é a viscosidade cinemática da fase móvel, N é o número de pratos teóricos e t_0 é o tempo morto da corrida cromatográfica.

$$v = \frac{\mu \times d_p}{D_m} \quad \text{Equação 12}$$

A velocidade linear reduzida (v) é determinada como a relação da velocidade linear (μ), a o coeficiente de difusão (D_m) do analito na fase móvel e o diâmetro da partícula (d_p). Para calcular o coeficiente de difusão foi utilizado a equação de (Wilke e Chang, 1955):

$$D_m = 7.4 \times 10^{-12} \frac{T \times \sqrt{M \times \Psi}}{\eta \times V_s}, \quad \text{Equação 13}$$

Onde Ψ é a constante do solvente, M é a massa molar do solvente, T é a temperatura absoluta, η é a viscosidade e V_s é o volume molar do composto testado.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Pressão e tempo total de análise

A fase móvel no modo isocrático constituída por (A) 4 mmol L⁻¹ solução de acetato de amônio (com 0,1% de ácido fórmico) e (B) acetonitrila (63:37 v/v) foi utilizada para avaliar a variação de pressão do sistema cromatográfico (de 0,1 a 0,5 mL min⁻¹). Embora as colunas com partículas menores tenham apresentaram separações mais rápidas, a diminuição do tamanho da partícula resultou em uma menor permeabilidade e consequentemente uma maior pressão. Além disso, a temperatura afeta diretamente a retenção, a seletividade e a eficiência da coluna (Lundanes e Greibrokk, 2006). A Figura 24 ilustra a altura do prato reduzido (h) em função da temperatura. Dentre as temperaturas avaliadas, 15 a 40 °C para as colunas Xselect 2,5 µm e Cortecs 2,7 µm, o melhor desempenho cromatográfico foi obtido à 40 °C e consequentemente, esta temperatura foi selecionada para as análises subsequentes.

Figura 24. Variação da temperatura em função de h para (a) Olanzapina e (b) Diazepam.

É importante ressaltar que as colunas totalmente porosas apresentam valor de temperatura limite mais elevado (80 °C) que as colunas superficialmente porosas (45 °C). Portanto, temperaturas superiores à selecionada (40 °C) poderão aumentar a eficiência das separações cromatográficas em colunas totalmente porosas.

As fases estacionárias com partículas de menor diâmetro interno resultam em rápidas separações cromatográficas, no entanto, a diminuição do tamanho de partícula leva a uma baixa permeabilidade e aumento de pressão do sistema cromatográfico. Utilizando a vazão de 0,3 mL min⁻¹, as colunas superficialmente porosas apresentaram a menor pressão do sistema cromatográfico, dentre as colunas avaliadas. Destacando-se a

coluna Cortecs 2,7 μm , com 3.135 psi. A coluna totalmente porosa Acquity 1,7 μm e a coluna superficialmente porosa Kinetex 1,3 μm apresentaram as maiores pressões do sistema cromatográfico, 7.010 e 7.368 psi, respectivamente. Contudo, todas as colunas avaliadas apresentaram pressões abaixo de 15.000 psi (Figura 25a).

O sistema de UHPLC suporta pressões até 15.000 psi, e consequentemente pressões inferiores tendem a preservar os componentes do sistema cromatográfico, principalmente o selo da agulha, bomba e a coluna analítica (fase estacionária). Outro importante parâmetro é o tempo total de análise, que está diretamente relacionado com a frequência analítica e ao consumo da fase móvel.

A Figura 25 descreve a correlação entre (a) pressão vs vazão e (b) tempo de análise cromatográfica vs vazão, bem como suas respectivas equações e coeficientes de determinações (R^2) para todas as colunas avaliadas. Consequentemente, as equações que foram geradas podem ser utilizadas para prever a pressão (Figura 25a) e o tempo de análise cromatográfica (Figura 25b) para todas as colunas em diferentes vazões. Os modelos matemáticos gerados, apresentaram coeficientes de determinação adequados e que estavam bem ajustados conforme o teste de falta de ajuste ao nível de 5% ($p > 0,05$).

Como era esperado a coluna Kinetex (1,3 μm), devido ao seu menor comprimento (50 mm), apresentou o menor tempo de análise cromatográfica. Tal fato reduz os custos de análise, pois diminui a quantidade de solvente orgânico utilizado e o aumento da frequência analítica. Fekete e Guillarme, 2013 avaliaram o uso da coluna Kinetex (1,3 μm) para rápidas separações de peptídeos em soluções padrão. Devido a sua baixa permeabilidade ($K_v = 1,7 \times 10^{-11} \text{ cm}^2$), os autores relataram que colunas recheadas com partículas 1,3 μm não são apropriadas para as separações de alta resolução. Resultado foi observado em nosso estudo (Figura 25a). Entretanto, em análises por espectrometria de massas sequencial MS/MS no modo de monitoramento de reações selecionadas (SRM), os tempos de retenção próximos não afetaram a confiabilidade da identificação e quantificação dos fármacos.

Figura 25. Variação da pressão do sistema cromatográfico (a) e modelo de regressão de potência para o t_R vs vazão (b) para o Diazepam.

A Figura 26 ilustra os cromatogramas que resultaram no menor (Kinetex 1,3 μm , $t_R = 2.3$ min, Fig. 26a) e no maior tempo de análise (Acquity 1,7 μm , $t_R = 6.6$ min, Fig. 26b), considerando o último fármaco eluído (Diazepam). As colunas Cortecs 2,7 μm e 1,6 μm , Xselect 2,5 μm e Kinetex 1,7 μm apresentam tempo de análise similar ao obtido para a coluna Acquity 1,7 μm .

Figura 26. Cromatogramas UHPLC-MS/MS (TIC) para as colunas (a) Kinetex 1,3 μm e (b) Acquity 1,7 μm , FM: (A) 4 mmol L⁻¹ solução de acetato de amônio (com 0,1 % de ácido fórmico) e (B) acetonitrila (63:37 v/v) e vazão 0,3 mL min⁻¹.

4.2 Altura do prato reduzido, impedância, assimetria, resolução, capacidade de pico, fator de retenção e tempo de retenção

De acordo com a Figura 27a e 27b, no menor valor de velocidade linear reduzida (v) é obtido o menor valor de altura do prato reduzido (h). Entretanto, tempos de análise cromatográfica relativamente longos foram obtidos utilizando o menor valor de velocidade linear reduzida de acordo com o modelo matemático (Figura 25b). Considerando análises de alta performance, extensivos tempos de análise cromatográfica podem ser considerados inaceitáveis do ponto de vista de praticidade. Devido a isso, a vazão de $0,3 \text{ mL min}^{-1}$ foi selecionada para as subseqüentes análises.

Considerando a composição da fase móvel, os fármacos estudados encontram-se na forma ionizada ou parcialmente ionizada. A fase móvel no modo isocrática constituída de (A) 4 mmol L^{-1} da solução de acetato de amônio (com 0,1% de ácido fórmico) e (B) acetonitrila (63:37 v/v) foi utilizada para avaliar todas as colunas em razão da similaridade das fases estacionárias (C_{18}) e das dimensões das colunas, com exceção da coluna Kinetex (50 mm de comprimento). A composição da fase móvel (FM) para as separações nas diferentes colunas não foi alterada com o intuito de manter constante o fator de retenção (k), dos analitos, pois mudanças na FM podem alterar a viscosidade da mesma bem como a difusão dos analitos (Fekete e Guilleme, 2013; Kucerova *et al.*, 2013; Gritti *et al.*, 2014; Sultan *et al.*, 2014).

Os fármacos com tempo de retenção no início, meio e no final da corrida cromatográfica foram selecionados para avaliar os parâmetros (assimetria, resolução, capacidade de pico, fator de retenção e tempo de retenção) nas diferentes colunas. O conceito de assimetria de pico com pouco ou nenhum alargamento, pode ser associado com os valores de assimetria (A_s de 0,9 a 1,5) como determinado pela equação 3 (Dolan, 2003). Considerando esse parâmetro (Tabela 17), o teste de Tukey realizado para todas as colunas, mostrou que não existe diferença significativa ao nível de 5 % ($p > 0,05$).

A Resolução cromatográfica é a medida da capacidade da coluna analítica em separar dois compostos consecutivos (Dolan, 2002). Para Olanzapina-Lamotrigina, as colunas Acquity $1,7 \mu\text{m}$, Xselect $2,5 \mu\text{m}$ e Cortecs $2,7 \mu\text{m}$ e $1,6 \mu\text{m}$ apresentaram os maiores valores de resolução. Para Quetiapina-Citalopram, as colunas Cortecs $2,7 \mu\text{m}$ e $1,6 \mu\text{m}$ proporcionaram os maiores valores de resolução. Para Clomipramina-Diazepam, as colunas Acquity $1,7 \mu\text{m}$ e Cortecs $2,7 \mu\text{m}$ e $1,6 \mu\text{m}$ apresentaram os maiores valores de resolução, como mostrados na Tabela 17.

O fator de retenção é a medida da força de sorção entre o soluto e a fase estacionária, também foi determinado para o primeiro e o último pico (Olanzapina e Diazepam). Os fatores de retenção obtidos para a Olanzapina (forma ionizada) foram similares para todas as colunas, não apresentando diferença significativa ($p > 0,05$), pois esse fármaco foi eluído próximo ao t_0 em todas as colunas. Entretanto, para o Diazepam foi obtido diferença significativa ($p < 0,05$) entre as colunas totalmente porosas (maiores valores de k) e as colunas superficialmente porosas, Tabela 17.

As colunas totalmente porosas apresentam mais caminhos de difusividade que as colunas superficialmente porosas, o que resultou em maiores fatores de retenção para o Diazepam em sua forma parcialmente ionizada. A capacidade de pico fornece a medida da quantidade máxima de substâncias que podem ser separadas ($R_s = 1,0$) em uma análise cromatográfica. Utilizando o último pico (Diazepam), as colunas Cortecs 1,6 μm , Kinetex 1,7 μm e Acquity 1,7 μm apresentaram a maior capacidade de pico, sem diferença significativa ($p > 0,05$) entre as mesmas, como mostrado na Tabela 17.

Tabela 17. Assimetria, resolução, capacidade de pico, fator de retenção e tempo de retenção para todas as colunas avaliadas com vazão de 0,3 mL min⁻¹

Parâmetros	Fármacos	Kinetex 1,3 μm	Cortecs 1,6 μm	Kinetex 1,7 μm	Acquity 1,7 μm	Xselect 2,5 μm	Cortecs 2,7 μm
Assimetria (A_s)	Olanzapina	1,37 ^a $\pm$ 0,29	0,88 ^a $\pm$ 0,10	1,27 ^a $\pm$ 0,22	1,33 ^a $\pm$ 0,22	1,43 ^a $\pm$ 0,06	1,43 ^a $\pm$ 0,41
		1,48 ^a $\pm$ 0,10	1,45 ^a $\pm$ 0,02	1,04 ^a $\pm$ 0,04	1,29 ^a $\pm$ 0,23	1,22 ^a $\pm$ 0,27	1,50 ^a $\pm$ 0,10
	Lamotrigina	1,38 ^a $\pm$ 0,42	1,40 ^a $\pm$ 0,39	1,42 ^a $\pm$ 0,25	1,50 ^a $\pm$ 0,07	1,34 ^a $\pm$ 0,11	1,46 ^a $\pm$ 0,04
		1,47 ^a $\pm$ 0,23	1,31 ^a $\pm$ 0,19	1,35 ^a $\pm$ 0,41	1,52 ^a $\pm$ 0,11	1,35 ^a $\pm$ 0,12	1,35 ^a $\pm$ 0,20
	Citalopram	1,48 ^a $\pm$ 0,03	1,44 ^a $\pm$ 0,23	1,26 ^a $\pm$ 0,15	1,52 ^a $\pm$ 0,16	1,12 ^a $\pm$ 0,16	1,22 ^a $\pm$ 0,26
		1,32 ^a $\pm$ 0,23	1,44 ^a $\pm$ 0,22	1,11 ^a $\pm$ 0,31	0,99 ^a $\pm$ 0,20	1,18 ^a $\pm$ 0,38	1,05 ^a $\pm$ 0,12
	Clomipramina	1,37 ^a $\pm$ 0,29	0,88 ^a $\pm$ 0,10	1,27 ^a $\pm$ 0,22	1,33 ^a $\pm$ 0,22	1,43 ^a $\pm$ 0,06	1,43 ^a $\pm$ 0,41
		1,48 ^a $\pm$ 0,10	1,45 ^a $\pm$ 0,02	1,04 ^a $\pm$ 0,04	1,29 ^a $\pm$ 0,23	1,22 ^a $\pm$ 0,27	1,50 ^a $\pm$ 0,10
	Quetiapina	1,38 ^a $\pm$ 0,42	1,40 ^a $\pm$ 0,39	1,42 ^a $\pm$ 0,25	1,50 ^a $\pm$ 0,07	1,34 ^a $\pm$ 0,11	1,46 ^a $\pm$ 0,04
		1,47 ^a $\pm$ 0,23	1,31 ^a $\pm$ 0,19	1,35 ^a $\pm$ 0,41	1,52 ^a $\pm$ 0,11	1,35 ^a $\pm$ 0,12	1,35 ^a $\pm$ 0,20
	Diazepam	1,48 ^a $\pm$ 0,03	1,44 ^a $\pm$ 0,23	1,26 ^a $\pm$ 0,15	1,52 ^a $\pm$ 0,16	1,12 ^a $\pm$ 0,16	1,22 ^a $\pm$ 0,26
		1,32 ^a $\pm$ 0,23	1,44 ^a $\pm$ 0,22	1,11 ^a $\pm$ 0,31	0,99 ^a $\pm$ 0,20	1,18 ^a $\pm$ 0,38	1,05 ^a $\pm$ 0,12
Altura do prato reduzido (h)	Olanzapina	1860 ^a $\pm$ 282	148,3 ^d $\pm$ 12,3	600,7 ^b $\pm$ 88,9	202,3 ^c $\pm$ 15,6	388,7 ^{bc} $\pm$ 32,2	379,8 ^{bc} $\pm$ 26,3
		1006 ^a $\pm$ 139	197,1 ^d $\pm$ 13,9	207,5 ^{cd} $\pm$ 6,21	204,8 ^d $\pm$ 2,85	257,2 ^b $\pm$ 21,2	239,3 ^{bc} $\pm$ 8,24
	Lamotrigina	339,2 ^a $\pm$ 22,6	86,4 ^e $\pm$ 1,76	211,2 ^b $\pm$ 3,87	101,7 ^{de} $\pm$ 4,21	131,5 ^c $\pm$ 2,52	128,9 ^c $\pm$ 2,84
	Quetiapina						

Continua...

Continuação da Tabela 17

Parâmetros	Fármacos	Kinetex 1,3 μm	Cortecs 1,6 μm	Kinetex 1,7 μm	Acquity 1,7 μm	Xselect 2,5 μm	Cortecs 2,7 μm
Altura do prato reduzido (h)	Citalopram	484,9 ^a $\pm$	97,2 ^e $\pm$	148,6 ^b $\pm$	100,8 ^{ed} $\pm$	110,4 ^{cd}	114,1 ^c $\pm$
		50,6	1,86	8,29	5,49	$\pm$ 3,10	1,28
	Clomipramina	104,0 ^a $\pm$	30,8 ^d $\pm$	61,2 ^b $\pm$	31,1 ^d $\pm$	38,1 ^c $\pm$	37,2 ^c $\pm$
		8,73	2,0	9,21	1,84	1,67	1,94
	Diazepam	59,3 ^a $\pm$	7,97 ^b $\pm$	10,1 ^b $\pm$	8,43 ^b $\pm$	14,3 ^b $\pm$	13,59 ^b $\pm$
		7,91	1,10	1,54	1,10	0,86	0,86
Resolução (R_s)	Olanzapina	0,16 ^c $\pm$	0,77 ^a $\pm$	0,48 ^b $\pm$	0,76 ^a $\pm$	0,75 ^a $\pm$	0,75 ^a $\pm$
	Lamotrigina	0,02	0,04	0,02	0,13	0,04	0,08
	Quetiapina	0,12 ^c $\pm$	0,44 ^a $\pm$	0,36 ^b $\pm$	0,35 ^b $\pm$	0,38 ^b $\pm$	0,43 ^a $\pm$
	Citalopram	0,01	0,02	0,04	0,02	0,05	0,04
	Clomipramina	2,57 ^d $\pm$	10,1 ^a $\pm$	5,58 ^c $\pm$	9,52 ^a $\pm$	7,13 ^b $\pm$	10,5 ^a $\pm$
	Diazepam	0,08	0,54	0,32	0,59	0,43	0,36
Capacidade de pico (P_c)	Diazepam	12,2 ^c $\pm$	48,2 ^a $\pm$	48,8 ^a $\pm$	48,4 ^a $\pm$	31,0 ^b $\pm$	29,0 ^b $\pm$
		0,78	3,35	3,40	3,01	0,90	0,90
Tempo de retenção (t_R)	Diazepam	2,29 ^a $\pm$	5,68 ^d $\pm$	5,17 ^b $\pm$	6,63 ^e $\pm$	6,62 ^e $\pm$	5,62 ^c $\pm$
		0,01	0,03	0,01	0,02	0,01	0,03
Fator de retenção (k)	Olanzapina	0,14 ^a $\pm$	0,18 ^a $\pm$	0,21 ^a $\pm$	0,19 ^a $\pm$	0,21 ^a $\pm$	0,15 ^a $\pm$
		0,03	0,03	0,02	0,03	0,02	0,04
	Diazepam	6,91 ^e $\pm$	8,79 ^b $\pm$	7,92 ^d $\pm$	10,4 ^a $\pm$	10,5 ^a $\pm$	8,68 ^c $\pm$
		0,02	0,06	0,01	0,04	0,02	0,05

Média $\pm$ Desvio padrão ($n = 3$). Diferentes letras na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey

Para avaliar a altura do prato reduzida, a Olanzapina (primeiro pico) e o Diazepam (último pico) foram selecionados para ilustrar a variabilidade dentre os parâmetros cromatográficos obtidos. Para a Olanzapina (pK_a 7,2 e 14,2, Fig 27a), as colunas com fase estacionária contendo carga superficial positiva (Cortecs 2,7 μm e 1,6 μm , Xselect 2,5 μm e Acquity 1,7 μm) apresentaram menores valores de h (eficiência cromatográfica) (Figura 27). Essa característica específica da coluna favorece a seletividade e a simetria do pico para fármacos básicos, quando ácidos, como ácido fórmico (baixa força iônica), são adicionados à fase móvel. Destacamos que para as colunas superficialmente porosas (Cortecs 2,7 μm e 1,6 μm), o aumento da vazão (de 0,4 a 0,5 mL min^{-1}) não alterou significativamente o valor de h (Fig. 27a). Para o Diazepam (pK_a 3,4), as colunas com partículas menores que sub-2 μm (Cortecs 1,6 μm , Acquity 1,7 μm e Kinetex 1,7 μm) apresentaram menores valores de h (maior eficiência de separação) (Figura 27b). Com exceção da coluna Kinetex (tamanho da partícula = 1,3 μm) que apresenta tanto o menor tamanho de partícula, quanto o menor comprimento (50 mm), dentre as colunas avaliadas (Tabela 17).

Para confirmar os resultados obtidos para h , o parâmetro de impedância também foi calculado. A impedância (E) fornece verídica medida do desempenho das colunas, pois associa parâmetros críticos para a separação cromatográfica, tais como a eficiência, tempo morto do sistema e variação de pressão (Pereira, 2012; Meyer, 2013). A Figura 27 (c) ilustra os gráficos de impedância *vs* velocidade linear da fase móvel, obtidos para as colunas que apresentaram as separações mais eficientes para os fármacos, Olanzapina e o Diazepam. Estes resultados são equivalentes aos obtidos para h . Os gráficos (h *vs* v , e impedância *vs* velocidade linear da fase móvel) para a Olanzapina e o Diazepam ilustram os resultados representativos do estudo realizado para os fármacos, em sua forma ionizada e não ionizadas, respectivamente (Figura 27).

Assim, as colunas com partículas menores que 2 μm (Cortecs 1,6 μm , Acquity 1,7 μm , e Kinetex 1,7 μm) apresentaram a maior eficiência de separação para os fármacos em sua forma parcialmente ionizados (Tabela 17). De fato, as colunas Cortecs com a inovação de carga superficial positiva C_{18}^+ e as colunas Acquity e Xselect com a superfície híbrida carregada (CSH) forneceram a maior eficiência de separação para os fármacos em sua forma ionizada. A presença de carga superficial fornece um aumento na seletividade e assimetria de pico de compostos básicos quando utilizado um ácido como ácido fórmico (Lauber *et al.*, 2013). A carga superficial das partículas parece minimizar interações secundárias indesejadas que causam picos assimétricos, contudo esse efeito ainda não está inteiramente compreendido (Lauber *et al.*, 2013).

Figura 27. Gráficos h vs vazão para a olanzapina (a) e Diazepam (b). Na parte (c) a variação da impedância em função da velocidade linear da fase móvel.

4.3 Hidrofobicidade, impureza metálica e atividade silanol

A hidrofobicidade se baseia nas interações entre os fármacos e os grupos octadecil quimicamente ligados na superfície da sílica. Essa propriedade é correlacionada ao comprimento da cadeia alquila, com a porosidade e área superficial da fase estacionária (Kulikov e Galat, 2009). Os valores de k (fator de retenção) aumentam em função da maior densidade da cadeia alquila, em grupos por m^2 de superfície (Visky *et al.*, 2002; Kulikov e Galat, 2009; Ahuja e Rasmussen, 2011). As colunas que apresentaram a maior hidrofobicidade, foram aquelas que também apresentaram a maior capacidade de pico (Cortecs 1,6 μm , Kinetex 1,7 μm e Acquity 1,7 μm) como mostrado na Tabela 18. Esses resultados fornecem uma correlação entre a detecção MS/MS com a detecção por arranjo de diodos podendo ser levado em consideração para futuras avaliações de colunas.

O número de grupos silânóis livres sobre a superfície da fase estacionária pode ser correlacionado com as propriedades hidrofílicas. Os silânóis residuais podem interagir com compostos polares através de ligações de hidrogênio e interações dipolo-dipolo. Uma superfície heterogênea pode resultar em mecanismos mistos de retenção, perda de resolução e alargamento de pico para compostos básicos. O número de grupos silânóis livres tem sido avaliado pela razão do fator de retenção (k) de dois compostos que apresentam características (ácido/base) diferentes, por exemplo, cafeína/fenol, piridina/fenol, cafeína/teofilina ou difenidramina/5-p-metilfenil-5-fenilhidantoína (Visky *et al.*, 2002; Nollet, 2004; Kulikov e Galat, 2009; Ahuja e Rasmussen, 2011).

As colunas com partículas de sílica híbrida podem ser utilizadas em uma ampla faixa de pH (1-11) e em temperaturas acima de 60 °C apresentando uma baixa concentração de silânóis residuais. Em nosso estudo foi confirmado baixos valores de atividade silanol. As partículas totalmente porosas contendo partículas de sílica híbrida (Acquity 1,7 µm e Xselect 2,5 µm) apresentaram os menores valores de atividade silanol (Tabela 18). As fases de sílica híbrida são conhecidas por propiciarem uma forma de pico simétrica para compostos básicos. A coluna Acquity 1,7 também demonstrou alta capacidade de pico e valores de h para análises realizadas por detecção MS/MS.

Tabela 18. Hidrofobicidade, impureza metálica e atividade silanol para as colunas avaliadas

	Hidrofobicidade k_{tolueno}	Impureza metálica $k_{2,2'} - \text{dipyridil}$	Atividade silanol $r k_{\text{cafeína/fenol}}$
Kinetex 1,3 µm	$3,77^c \pm 0,04$	$1,38^f \pm 0,03$	$0,46^a \pm 0,03$
Cortecs 1,6 µm	$6,19^a \pm 0,09$	$2,89^b \pm 0,04$	$0,42^b \pm 0,01$
Kinetex 1,7 µm	$6,16^a \pm 0,18$	$2,62^c \pm 0,01$	$0,44^{ab} \pm 0,01$
Acquity 1,7 µm	$6,18^a \pm 0,30$	$2,19^e \pm 0,02$	$0,30^c \pm 0,02$
Xselect 2,5 µm	$5,68^b \pm 0,06$	$2,28^d \pm 0,02$	$0,32^c \pm 0,01$
Cortecs 2,7 µm	$3,27^d \pm 0,02$	$3,25^a \pm 0,02$	$0,46^{ab} \pm 0,01$

Média $\pm$ Desvio padrão (n = 3). Diferentes letras na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

A presença de impurezas metálicas na superfície da fase estacionária pode afetar significativamente o desempenho cromatográfico. Impurezas metálicas sobre a superfície da sílica pode ser determinada pelo uso de agentes quelantes. A forte retenção desses compostos indica a presença de impurezas metálicas sobre a superfície da sílica (Visky *et al.*, 2002; Kulikov e Galat, 2009; Ahuja e Rasmussen, 2011). Um dos parâmetros de impureza metálica mais reprodutivo é a determinação do k de dipiridil. Alta contaminação

de metal pode considerada quanto o parâmetro k for superior a 12 (Ahuja e Rasmussen, 2011). Todas as colunas avaliadas apresentaram valores de k para dipiridil (impurezas metálicas) muito inferiores a 12, Tabela 18. Em razão das dimensões da coluna Kinetex 1,3 μm , esta apresentou a menor quantidade de impureza metálica na fase estacionária. Entretanto, para esse parâmetro não foi possível obter uma correlação com os testes realizados em MS/MS.

5. CONCLUSÃO

As colunas com fase estacionária contendo carga positiva na superfície (Cortecs 2,7 μm e 1,6 μm , Xselect 2,5 μm e Acquity 1,7 μm) apresentam as separações cromatográficas mais eficientes para os fármacos na forma ionizada. Já as colunas com diâmetros internos menores que 2 μm (Cortecs 1,6 μm , Acquity 1,7 μm e Kinetex 1,7 μm ,) apresentaram separações cromatográficas mais eficientes para os fármacos na forma parcialmente ionizada.

Dentre as colunas avaliadas, as colunas superficialmente porosas apresentaram as menores pressões do sistema cromatográfico, com destaque à coluna Cortecs 2,7 μm (3.135 psi). A coluna totalmente porosa, Acquity 1,7 μm , e a coluna superficialmente porosa, Kinetex 1,3 μm , apresentaram as maiores pressões do sistema cromatográfico, 7.010 e 7.368 psi, respectivamente. No entanto, todas as colunas avaliadas apresentaram pressões do sistema cromatográfico inferiores a 15.000 psi. Além disso, os modelos matemáticos gerados foram capazes de prever a pressão e o tempo de análise cromatográfica para todas as colunas em diferentes vazões.

Os diferentes parâmetros cromatográficos permitiram avaliar o desempenho das diferentes colunas utilizando detecção por espectrometria de massas. Em relação aos testes realizados utilizando detecção por arranjo de diodos, os resultados de hidrofobicidade e atividade silanol correlacionaram-se bem com os resultados obtidos por espectrometria de massas. Em conclusão, considerando-se a eficiência, resolução, impedância, capacidade de pico, fator de retenção e hidrofobicidade as colunas com partículas menores que 2 μm e fases estacionárias carregadas superficialmente (Cortecs 1,6 μm e Acquity 1,7 μm), apresentaram os melhores desempenhos cromatográficos comparado com as demais colunas.

6. REFERÊNCIAS

AHUJA, S.; RASMUSSEN, H. **HPLC Method Development for Pharmaceuticals**. Academic Press, 2011. ISBN 0080554199.

ALI, I. et al. Recent trends in ultra-fast HPLC: new generation superficially porous silica columns. **Journal of Separation Science**, v. 35, n. 23, p. 3235-49, 2012. ISSN 1615-9306.

ARDREY, R. E. **Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction**. John Wiley & Sons, 2003. ISBN 0470862173.

BIBA, M. et al. Evaluation of core-shell particle columns for ion-pair reversed-phase liquid chromatography analysis of oligonucleotides. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 72, p. 25-32, 2013. ISSN 0731-7085.

BOBALY, B.; GUILLARME, D.; FEKETE, S. Systematic comparison of a new generation of columns packed with sub-2 μ m superficially porous particles. **Journal of Separation Science**, v. 37, n. 3, p. 189-197, 2014. ISSN 1615-9306.

BOROVA, V. L. et al. Highly sensitive determination of 68 psychoactive pharmaceuticals, illicit drugs, and related human metabolites in wastewater by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, n. 17, p. 4273-85, 2014. ISSN 1618-2650.

BREIER, M. et al. Targeted metabolomics identifies reliable and stable metabolites in human serum and plasma samples. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. 11, 2014. ISSN 1932-6203.

BRUNS, S. et al. Influence of particle properties on the wall region in packed capillaries. **Journal of Chromatography A**, v. 1268, p. 53-63, 2012. ISSN 0021-9673.

CHEN, W. et al. Synthesis and optimization of wide pore superficially porous particles by a one-step coating process for separation of proteins and monoclonal antibodies. **Journal of Chromatography A**, v. 1414, p. 147-57, 2015. ISSN 0021-9673.

CHESTER, T. L. Further Considerations of Exact Equations for Peak Capacity in Isocratic Liquid Chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 15, p. 7239-7241, 2014. ISSN 0003-2700.

COOPER, G.; NEGRUSZ, A. **Clarke's analytical forensic toxicology**. Pharmaceutical Press, 2013. ISBN 0857110543.

DEHOUCK, P. et al. Characterisation of reversed-phase liquid-chromatographic columns by chromatographic tests comparing column classification based on

chromatographic parameters and column performance for the separation of acetylsalicylic acid and related compounds. **Journal of Chromatography A**, v. 1025, n. 2, p. 189-200, 2004. ISSN 0021-9673.

DEL ROSAL, I. et al. Grafting of lanthanide complexes on silica surfaces dehydroxylated at 200 [degree]C: a theoretical investigation. **New Journal of Chemistry**, v. 39, n. 10, p. 7703-7715, 2015. ISSN 1144-0546.

DESTEFANO, J. J. et al. Performance characteristics of new superficially porous particles. **Journal of Chromatography A**, v. 1258, p. 76-83, 2012. ISSN 0021-9673.

DOLAN, J. W. Peak Tailing and Resolution. **LC Troubleshooting**, v. 5, n. 3, p. 14-20, 2002.

_____. Why Do Peaks Tail? **LC Troubleshooting**, v. 21, n. 7, p. 612-616, 2003.

FEKETE, S.; GUILLARME, D. Possibilities of new generation columns packed with 1.3µm core-shell particles in gradient elution mode. **Journal of Chromatography A**, v. 1320, p. 86-95, 2013. ISSN 0021-9673.

FU, Y. et al. Differential mobility spectrometry coupled with multiple ion monitoring in regulated LC-MS/MS bioanalysis of a therapeutic cyclic peptide in human plasma. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 7, p. 3655-3661, 2016. ISSN 0003-2700.

GONZÁLEZ-RUIZ, V.; OLIVES, A. I.; MARTÍN, M. A. Core-shell particles lead the way to renewing high-performance liquid chromatography. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 64, n. Supplement C, p. 17-28, 2015. ISSN 0165-9936.

GRITTI, F. et al. Characterization and kinetic performance of 2.1 x 100 mm production columns packed with new 1.6 µm superficially porous particles. **Journal of Separation Science**, v. 37, n. 23, p. 3418-3425, 2014. ISSN 1615-9306.

HAGHEDOOREN, E. et al. Classification of reversed-phase columns based on their selectivity towards vancomycin compounds. **Talanta**, v. 71, n. 1, p. 31-7, 2007. ISSN 0039-9140.

HARTMAN, D. A. Determination of the stability of drugs in plasma. **Current Protocols in Pharmacology**, v. 7, n. 7,6, p. 1-8, 2003. ISSN 1934-8282.

HAYES, R. et al. Core-shell particles: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1357, p. 36-52, 2014. ISSN 0021-9673.

HORIE, K. et al. Estimation and optimization of the peak capacity of one-dimensional gradient high performance liquid chromatography using a long monolithic silica capillary column. **Journal of Chromatography A**, v. 1228, p. 283-291, 2012. ISSN 0021-9673.

HORVATH, C. G.; PREISS, B. A.; LIPSKY, S. R. Fast liquid chromatography. Investigation of operating parameters and the separation of nucleotides on pellicular ion exchangers. **Analytical Chemistry**, v. 39, n. 12, p. 1422-1428, 1967. ISSN 0003-2700.

KIRKLAND, J. J. Controlled surface porosity supports for high-speed gas and liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 41, n. 1, p. 218-220, 1969. ISSN 0003-2700.

KRUBE, A. et al. Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part I. **Analytica Chimica acta**, v. 870, p. 29-44, 2015. ISSN 0003-2670.

KUCEROVA, B. et al. Comparison of a new high-resolution monolithic column with core-shell and fully porous columns for the analysis of retinol and alpha-tocopherol in human serum and breast milk by ultra-high-performance liquid chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 36, n. 14, p. 2223-30, 2013. ISSN 1615-9314.

KULIKOV, A. U.; GALAT, M. N. Comparison of C18 silica bonded phases selectivity in micellar liquid chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 32, n. 9, p. 1340-1350, 2009. ISSN 1615-9314.

LANÇAS, F. M. O Renascimento das partículas superficialmente porosas (“core shell particles”) em HPLC. **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 2, p. 47, 2010.

LAUBER, M. A. et al. High-resolution peptide mapping separations with MS-friendly mobile phases and charge-surface-modified C18. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 14, p. 6936-6944, 2013. ISSN 0003-2700.

LESELLIER, E.; WEST, C. Description and comparison of chromatographic tests and chemometric methods for packed column classification. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, n. 1, p. 329-360, 2007. ISSN 0021-9673.

LEVY, D.; ZAYAT, M. **The Sol-Gel Handbook: Synthesis, Characterization and Applications, 3-Volume Set**. John Wiley & Sons, 2015. ISBN 352767084X.

LUNDANES, E.; GREIBROKK, T. Temperature effects in liquid chromatography. **Advances in Chromatography**, v. 44, p. 45-77, 2006. ISSN 0065-2415.

MEYER, V. R. **Practical High-Performance Liquid Chromatography**. John Wiley & Sons, 2013. ISBN 1118681347.

MOLDOVEANU, S. C.; DAVID, V. **Essentials in Modern HPLC Separations**. Newnes, 2012. ISBN 0123850142.

NOLLET, L. M. L. **Handbook of Food Analysis: Methods and Instruments in Applied Food Analysis**. New York: Marcel Dekker, 2004. 2165 ISBN 9780824750381.

PEREIRA, L. An Overview of Core Enhanced Technology for Fast, High Efficiency HPLC. **Chromatography Today**, p. 14-22, 2012.

RIOS, J. D. **Novas colunas CORTECS com Partículas de Núcleo Fundido**. Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas Afins. Campos do Jordão: SIMCRO. 1: 1-54 p. 2014.

SCHURE, M. R. et al. Intraparticle and interstitial flow in wide-pore superficially porous and fully porous particles. **Chemical Engineering Science**, v. 174, n. Supplement C, p. 445-458, 2017. ISSN 0009-2509.

STÖBER, W.; FINK, A.; BOHN, E. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 26, n. 1, p. 62-69, 1968. ISSN 0021-9797.

SULTAN, Y.; MAGAN, N.; MEDINA, A. Comparison of five different C18 HPLC analytical columns for the analysis of ochratoxin A in different matrices. **Journal of chromatography B**, v. 971, p. 89-93, 2014. ISSN 1873-376X.

TANAKA, N.; MCCALLEY, D. V. Core-Shell, Ultrasmall Particles, Monoliths, and Other Support Materials in High-Performance Liquid Chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 1, p. 279-298, 2016. ISSN 0003-2700.

VAN DEEMTER, J. J.; ZUIDERWEG, F. J.; KLINKENBERG, A. Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography. **Chemical Engineering Science**, v. 5, n. 6, p. 271-289, 1956. ISSN 0009-2509.

VAN EECKHAUT, A. et al. Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: evaluation of matrix effects. **Journal of chromatography B**, v. 877, n. 23, p. 2198-2207, 2009. ISSN 1570-0232.

VISKY, D. et al. Characterisation of reversed-phase liquid chromatographic columns by chromatographic tests. Evaluation of 36 test parameters: repeatability, reproducibility and correlation. **Journal of Chromatography A**, v. 977, n. 1, p. 39-58, 2002. ISSN 0021-9673.

WAGNER, B. M. et al. Superficially porous particles with 1000Å pores for large biomolecule high performance liquid chromatography and polymer size exclusion chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1489, n. Supplement C, p. 75-85, 2017. ISSN 0021-9673.

WILKE, C.; CHANG, P. Correlation of diffusion coefficients in dilute solutions. **AIChE Journal**, v. 1, n. 2, p. 264-270, 1955. ISSN 1547-5905.

XIA, Y. Q.; JEMAL, M. Phospholipids in liquid chromatography/mass spectrometry bioanalysis: comparison of three tandem mass spectrometric techniques for monitoring plasma phospholipids, the effect of mobile phase composition on phospholipids elution and the association of phospholipids with matrix effects. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 23, n. 14, p. 2125-2138, 2009. ISSN 1097-0231.

CAPÍTULO III

DETERMINAÇÃO DE ANANDAMINA E 2-ARAQUIDONIL
GLICEROL EM AMOSTRAS DE PLASMA POR BIO-SPME-NANO-
ESI-MS/MS

CAPÍTULO III

1. INTRODUÇÃO

1.1 Principais endocanabinóides

Em 1992 foi descoberto o primeiro endocanabinóide denominado anandamida, (araquidonil etanolamina – AEA) seu nome deriva da palavra sânscrita “*ananda*” que significa felicidade, devido aos seus efeitos únicos na mente e corpo, e três anos mais tarde o segundo endocanabinóide 2-araquidonilglicerol (2-AG) foi descoberto (Blüher *et al.*, 2006; Grotenhermen e Müller-Vahl, 2012; Battista *et al.*, 2014).

Os endocanabinóides agem como mediadores locais em muitos tecidos, sendo produzidos por demanda após alterações agudas ou crônicas da homeostase celular. Anandamida e 2-AG são derivados de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, sendo como o ácido araquidônico seu precursor principal (Ward e Tuma, 2014).

Dentre os endocanabinóides, AEA e 2-AG são considerados os mais importantes (Zoerner *et al.*, 2011) e consequentemente os mais estudados (Grotenhermen e Müller-Vahl, 2012). A Anandamida é descrita como agonista parcial dos os receptores CB₁ e CB₂, enquanto que 2-AG se comporta como agonista total para ambos receptores. Entretanto, 2-AG pode ter sua atividade diminuída devido a sua transformação, não enzimática, em seu isômero 1-AG (Grotenhermen e Müller-Vahl, 2012). As estruturas moleculares dos endocanabinóides AEA, 2-AG e 1-AG são ilustradas na Figura 28.

Figura 28. Estrutura molecular dos endocanabinóides AEA, 2-AG e 1-AG (Fonte (Zoerner *et al.*, 2011) – adaptado).

1.2 Doenças neurológicas

Os endocanabinóides são neurotransmissores sintetizados segundo a demanda do organismo (“ordem curta”). Estes neurotransmissores são liberados logo após a síntese, ou seja, não são estocados em vesículas secretoras e rapidamente inativados por degradação enzimática (Ward e Tuma, 2014).

Os endocanabinóides, AEA e 2-AG, são considerados mensageiros retrógrados e atuam no receptor canabinóide no neurônio pré-sináptico inibindo a liberação de muitos neurotransmissores clássicos, excitatórios e inibitórios, tais como dopamina, glutamato e ácido γ -aminobutírico (GABA) (Manseau e Goff, 2015).

Os receptores CB₁ são amplamente distribuídos no sistema nervoso dos mamíferos, estando mais proeminentes no córtex cerebral, hipocampo, gânglios basais, hipotálamo, e nas vias de dor da medula espinhal (Grotenhermen e Müller-Vahl, 2012; Kalant, 2014). Já os receptores CB₂ são encontrados em neurônios sensoriais periféricos e em neurônios do tronco encefálico, bem como na microglia (derivados de macrófagos), mas podem influenciar a atividade de neurônios adjacentes (Kalant, 2014).

Neste contexto, os endocanabinóides têm sido correlacionados com doenças neurológicas, pois interagem com os receptores canabinóides (CB₁ e CB₂), através dos receptores acoplados à proteína-G, a qual tem sido considerada alvo terapêutico para uma série de distúrbios neurológicos, incluindo a esclerose múltipla (Jean-Gilles *et al.*, 2009; Haugh *et al.*, 2016), Alzheimer (Jung *et al.*, 2012; Bedse *et al.*, 2015; Haugh *et al.*, 2016), Parkinson (Criscuolo *et al.*, 2005; Pisani *et al.*, 2005; Kluger *et al.*, 2015) e Esquizofrenia (Leweke *et al.*, 2012; Battista *et al.*, 2014; Manseau e Goff, 2015).

Como foi descrito no capítulo 1 a politerapia tem sido adotada com o intuito de minimizar os sintomas tanto positivo quanto negativos associados à doença. Entretanto, a busca por novos medicamentos seguros e efetivos no tratamento da esquizofrenia é ainda dificultada pela natureza complexa desse distúrbio, que é conhecido por envolver múltiplos neurotransmissores cerebrais (Leweke *et al.*, 2012). Mais recentemente o uso de canabidiol tem se apresentado com uma alternativa para o tratamento da esquizofrenia, por inibir a degradação de anandamida. Experimentos em animais mostraram que o bloqueio da degradação farmacológica da anandamida atenua comportamento psicóticos induzidos em roedores (Leweke *et al.*, 2012).

De tal modo, uma maior compreensão do sistema endocanabinóide e suas ligações com a doença neurológica, tem o potencial de gerar novas hipóteses sobre as causas

neurobiológicas da esquizofrenia e abrir novas e mais eficazes opções de tratamento para essa doença debilitante (Leweke *et al.*, 2012; Battista *et al.*, 2014).

1.3 Determinação de endocanabinóides por LC-MS/MS em amostras biológicas

A LC-MS/MS, em razão da alta detectabilidade e seletividade, tem sido considerada a técnica analítica de referência para a determinação de endocanabinóides em amostras biológicas (Tabela 19). A determinação de AEA e 2-AG em matrizes biológicas tem sido um desafio, pois (i) estas substâncias estão presentes em níveis de traços em complexas amostras biológicas; (ii) alguns endocanabinóides (eCB) apresentam baixa estabilidade química; e (iii) pequenos volumes de amostra biológica (Trufelli *et al.*, 2011; Zoerner *et al.*, 2011; Fumes *et al.*, 2015). Desta forma, a etapa do preparo da amostra é suma importância no desenvolvimento de métodos LC-MS/MS.

As técnicas convencionais de preparo de amostra convencionais, tais como extração líquido-líquido (LLE), precipitação de proteína (PPT) e extração em fase sólida (SPE) têm sido utilizadas para a determinação de AEA e 2-AG em matrizes biológicas (Tabela 19).

Tabela 19. Métodos recentes LC-MS para determinação de endocanabinóides em amostras biológicas

Analitos	Amostras	Descrição dos métodos			LOQ	Referências
		Extração	Condições Cromatográficas	Sistema de análise		
AEA, OEA, LEA, LNEA, EPEA, PEA e SEA	Plasma Urina Cultura celular	SPE	FE = HSST3 FM = ACN + 0,1% AF; água + 0,1% AF. (Gradiente)	UHPLC-MS	0,106 – 0,273 ng mL ⁻¹	(Ottaria <i>et al.</i> , 2014)
AEA, OEA e PEA	Cérebro de rato	PPT	FE = C ₁₈ FMP = Acetato de amônio (1 mmol L ⁻¹) + 0,1% AA; Acetato de amônio (1 mmol L ⁻¹) + 0,1% AA e 5% MeOH. (Gradiente)	LC-MS	0,5 – 1,4 ng mL ⁻¹	(Liput <i>et al.</i> , 2014)
AEA, 2-AG, OEA, PEA e LEA	Cérebro de rato	LLE	FE = C ₁₈ FM = AF (0,02 mol L ⁻¹) em ACN; AF (0,02 mol L ⁻¹), (Gradiente)	LC-MS/MS	0,2 ng g ⁻¹ – 0,8 mg g ⁻¹	(Bystrowska <i>et al.</i> , 2014)
AEA e 2-AG	Cérebro de rato	LLE	FE = - FM = Acetato de amônio (10 mmol L ⁻¹); ACN. (Isocrático)	LC-MS/MS	50 amol – 25 fmol Na coluna	(Qi <i>et al.</i> , 2015)
AEA e 2-AG	Plasma Aorta	LLE	FE = C ₁₈ FM = 0,2 % AA; 0,1 % AF em ACN. (Gradiente)	LC-MS/MS	0,5 – 1,0 µg mL ⁻¹	(Garst <i>et al.</i> , 2015)
AEA, OEA, PEA e 2-AG	Cultura celular	LLE	FE = C ₁₈ FM = Água + 0,2 % AF; ACN/2-propanol (60:40, v/v) + 0,2% AF (Gradiente)	LC-MS/MS	0,05 – 0,80 pmol Na coluna	(Ivanov <i>et al.</i> , 2015)
AEA, 2-AG, próstanoides e esteróides	Plasma	SPE	FE = C ₁₈ FM = Acetato de amônio (2 mmol L ⁻¹) + MeOH; Acetato de amônio (10 mmol L ⁻¹) + 0,1% AF (Gradiente)	LC-MS/MS	0,1–190 ng mL ⁻¹	(Gachet <i>et al.</i> , 2015)

Continua...

Continuação da Tabela 19

Analitos	Amostras	Descrição dos métodos			LOQ	Referências
		Extração	Condições Cromatográficas	Sistema de análise		
OxL e eCB	Tecidos Extrato celular Plasma Leite bovino	SPE	FE = C ₁₈ FM = 0,1% AA; ACN/isopropanol (90:10, v/v). (Gradiente)	UHPLC-MS/MS	0,5 – 1000 fg Na coluna	(Gouveia-Figueira e Nording, 2015)
AEA e 2-AG	Plasma e cérebro de rato	LLE	FE = C ₁₈ FM = Água/ACN (40:60, v/v) + 0,1% AF (Isocrático)	LC-MS/MS	0,325 – 11 ng mL ⁻¹	(Gong <i>et al.</i> , 2015)
AEA e 2-AG	Plasma	CS	FE = C ₁₈ FM = Água/ACN (60:40, v/v) para CS e 0,5 % AF; ACN (Isocrático)	UHPLC-MS/MS	0,04 – 0,1 ng mL ⁻¹	(Marchioni <i>et al.</i> , 2017)

LOQ = Limite de quantificação, FE = fase estacionária, FM = fase móvel, SPE = extração em fase sólida, LLE = extração líquido-líquido, CS = “*column switching*”, OEA = N-oleiletalonamina, PEA = N-palmitoil-etanolamina, LEA = N-linoleil-etanolamina, LNEA = N- α -linoleil-etanolamina, SEA = N-estearoil-etanolamida, EPEA = N-eicosapentaenoil-etanolamida, OxL = Oxilipinas, eCB = endocanabinóides, MeOH = metanol, ACN = acetonitrila, AA = ácido acético, AF = ácido fórmico

1.4 Técnica de microextração em fase sólida (SPME)

1.4.1 Conceitos SPME

A microextração pode ser definida como uma técnica de extração em que a fase extratora (líquida ou sólida) apresenta volume de menor grandeza ($< 100 \mu\text{L}$ ou $< 100 \text{ mg}$) quando comparado ao volume da amostra ($> 1 \text{ mL}$). Nesse contexto podemos destacar a microextração em fase sólida (“*Solid Phase Microextraction*” – SPME), que desde sua introdução, em 1990, tem avançado a passos largos com ampla aplicação em diferentes áreas. (Reyes-Garces *et al.*, 2018).

A SPME é baseada no equilíbrio de partição (transferência de massas) dos analitos presentes na amostra com a fase extratora (Figura 29), técnica de extração não exaustiva (Pawliszyn, 2011; Reyes-Garces *et al.*, 2018). Após atingir o equilíbrio de partição, o aumento de tempo de extração não favorece a eficiência da extração.

Figura 29. Processo de extração com SPME (Fonte (Pawliszyn, 2011) – adaptado).

Segundo a Lei de Conservação de Massas (Lei de Lavoisier), e considerando-se apenas duas fases (ex. amostra e fase extratora), o equilíbrio de partição pode ser ilustrado pela equação 14 (Pawliszyn, 2011).

$$C_0 V_a = C_a^{eq} V_a + C_f^{eq} V_f$$

Equação 14

Onde C_0 é a concentração inicial do analito de interesse, V_a é o volume da amostra, V_f é o volume da fase extratora e K_{fa} é o coeficiente de partição no equilíbrio, razão entre a concentração do analito na fase extratora (C_f^{eq}) e na amostra (C_a^{eq}) (Equação 15) (Pawliszyn, 2011).

$$K_{fa} = \frac{C_f^{eq}}{C_a^{eq}} \quad \text{Equação 2}$$

Dessa forma, as equações 13 e 14 podem ser combinadas e rearranjadas na equação 16 (Pawliszyn, 2011).

$$C_f^{eq} = C_0 \left(\frac{K_{fa} V_a}{K_{fa} V_f + V_a} \right) \quad \text{Equação 3}$$

Por fim o número de mols (n) de analito extraído pela fase extratora pode ser calculado pela equação 17 (Pawliszyn, 2011).

$$n = C_f^{eq} V_f = C_0 \left(\frac{K_{fa} V_a V_f}{K_{fa} V_f + V_a} \right) \quad \text{Equação 4}$$

A equação 17 demonstra que a quantidade de analito (n) extraído é linearmente proporcional a concentração inicial na amostra (C_0), permitindo determinações quantitativas. Contudo, quando o volume de amostra, V_a , for maior que $K_{fa} V_f$, a equação 16 pode ser simplificada para a equação 18 (Pawliszyn, 2011).

$$n = K_{fa} V_f C_0 \quad \text{Equação 5}$$

Essa simplificação apresenta a grande vantagem de se utilizar a técnica SPME, mesmo para amostras que se desconhece o volume amostral. Em prática, isso significa que a fibra SPME pode ser aplicada para análises *in vivo* (Pawliszyn, 2011).

1.4.2 Fibras SPME biocompatíveis

As técnicas de microextração (não exaustivas) extraem apenas uma fração dos analitos presentes na amostra, ou seja, mínima perturbação no sistema amostral. Portanto, a microextração permite melhor caracterização e obtenção mais exata de informações a

respeito do sistema amostral, quando comparado com às técnicas de extração exaustiva. Considerando a extração “SPME in vivo” de fármacos, a concentração determinada é proporcional à concentração livre do fármaco, ou seja, a fração biodisponível para a absorção no organismo (Pawliszyn, 2011).

De acordo com a IUPAC a biocompatibilidade pode ser definida como a habilidade do material de estar em contato com um sistema vivo sem produção de efeitos adversos (Vert *et al.*, 2012). No contexto da extração por SPME, a biocompatibilidade, também significa que o desempenho do dispositivo SPME não é afetado pela matriz analisada (Bojko e Pawliszyn, 2014).

As fases biocompatíveis têm sido utilizadas nas análises “SPME in vivo”. Estas fases são compatíveis biologicamente ao ser vivo, pois são desenvolvidas com material não tóxico (Reyes-Garces *et al.*, 2018). Para a produção dessas fibras biocompatíveis, têm se utilizado polímeros biocompatíveis tais como, poliacrilonitrilo (“*polyacrylonitrile*” – PAN), polietilenoglicol (“*polyethylene glycol*” – PEG), poliacrilato (“*polyacrylate*” – PA), polipirrol (“*polypyrrole*” – PPY) e polidimetilsiloxano (“*polydimethylsiloxane*” – PDMS) (Bojko e Pawliszyn, 2014).

Avanços recentes da técnica de SPME para análises de amostras biológicas têm sido atribuídos ao desenvolvimento destas fibras SPME biocompatíveis, principalmente as de hastes metálicas (mais resistentes). Estas fibras permitem a inserção direta das fibras SPME em amostras complexas como os fluidos biológicos, pois as macromoléculas (ex. proteínas e fosfolipídios) não são adsorvidas na superfície da fase biocompatível (Cudjoe *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2013; Bessonneau, Boyaci, *et al.*, 2015; Bessonneau, Zhan, *et al.*, 2015; Souza-Silva *et al.*, 2015; Reyes-Garces *et al.*, 2018).

Algumas aplicações das fibras de SPME biocompatíveis na área clínica, de alimentos, produtos naturais bioativos e doping são ilustradas na Tabela 2, (Bojko e Pawliszyn, 2014; Souza-Silva *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016; Reyes-Garces *et al.*, 2018).

Tabela 20. Aplicações de SPME com fibras biocompatíveis para análises *in vivo*

<i>In vivo</i>	Compostos	Amostragem	Fibra SPME	Referência
Humanos	Metabólitos	Pele do braço	PDMS	(Thomas <i>et al.</i> , 2010)
Peixe	Resíduos farmacêuticos	Bile	C ₁₈ e PDMS	(Togunde <i>et al.</i> , 2012)
Coelho	Antidepressivo	Veia	PS	(Wu <i>et al.</i> , 2013)
Rato	Neurotransmissores	Cérebro	Fase de modo misto	(Cudjoe <i>et al.</i> , 2013)
Porco	Metabólitos	Fígado e Pulmão	Fase de modo misto	(Bojko <i>et al.</i> , 2014)
Peixe	Resíduos farmacêuticos	Músculo	HLB	(Poole <i>et al.</i> , 2017)

HLB = “hydrophilic-lipophilic balanced”

1.4.3 Bio-SPME-Nano-ESI-MS/MS

Os métodos recentes desenvolvidos no campo da espectrometria de massas por ionização a pressão atmosférica (API) incluem dispositivos de preparo de amostra que têm sido acoplados diretamente ao espectrômetro de massas (MS), tais como extração em fase sólida (SPE) (Zhang e Manicke, 2015), microextração em fluxo lento (“*slug-flow microextraction*” – SFME) (Ren *et al.*, 2014), microextração em gota única (“*single-drop microextraction*” – SDME) (Sun *et al.*, 2011), microextração em fase líquida (“*liquid phase microextraction*” – LPME) (Raterink *et al.*, 2014) e microextração com polímero monolítico (“*polymer monolith microextraction*” – PMME) (Wang *et al.*, 2015).

Já o acoplamento direto da técnica SPME (fibras biocompatíveis) com o espectrômetro de massas foi proposto inicialmente por Walles *et al.* (2005), e em razão da potencialidade desta técnica, recentemente, diferentes inovações têm sido avaliadas (Deng *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2015; Gomez-Rios *et al.*, 2016; Mirabelli *et al.*, 2016; Piri-Moghadam *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2017).

A inserção direta da fibra de SPME em um dispositivo emissor (“*emitter*”) na câmara de ionização por nanoeletrospray (Nano-ESI) para a dessorção e ionização dos analitos, consiste em inovador avanço na área bioanalítica. A técnica de Bio-SPME-Nano-ESI-MS/MS pode ser dividida em quatro etapas: extração dos analitos da amostra, remoção dos componentes endógenos adsorvidos na superfície da fase extratora, dessorção em solvente apropriado e ionização (Reyes-Garcés *et al.*, 2018).

Em razão da pré-concentração dos analitos na fase biocompatível e a dessorção em um pequeno volume de solvente no *emitter* ($V_{\text{des}} < 10 \mu\text{L}$), o método Bio-SPME-

Nano-ESI-MS/MS apresenta baixos limites de quantificação (ng mL^{-1}) (Reyes-Garces et al., 2018). A Figura 30 ilustra o processo de dessorção/ionização por Bio-SPME-Nano-ESI-MS/MS.

Figura 30. Ilustração do processo de dessorção/ionização por Bio-SPME-Nano-ESI-MS/MS (Fonte (Gomez-Rios *et al.*, 2016) – adaptado).

Além disso, o uso de Nano-ESI não somente leva a maior eficiência de ionização quando comparado ao ESI, mas também provê o spray eletrolítico por mais tempo, permitindo análises com diferentes sistemas MS/MS. Em outras palavras, um único dispositivo emissor poderia ser utilizado sequencialmente em diferentes espectrômetros de massas, objetivando a análise de compostos alvos (MS^n), análise de alta resolução (“*High Resolution Mass Spectrometry*” – HRMS), ou o acoplamento com o espectrômetro de massas com mobilidade iônica (“*Ion Mobility Spectrometry - Mass Spectrometry*” – IMS-MS) (Zheng *et al.*, 2016; Deng *et al.*, 2017).

2. OBJETIVOS

Desenvolver, validar e comparar os métodos SPME-UHPLC-MS/MS e Bio-SPME-Nano-ESI-MS/MS para a determinação de endocanabinóides em amostras de plasma.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Padrões e reagentes

O ácido acético, ácido trifluoroacético, cloridrato de guanidina, albumina, cloreto de sódio, cloreto de potássio, fosfato de sódio e fosfato de potássio foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint-Louis, USA). Os solventes orgânicos (grau LC-MS) como acetonitrila (ACN), etanol, isopropanol (IPA) foram obtidos do fornecedor Fisher Scientific (Hampton, USA). Os padrões dos endocanabinóides N-araquidonil etanolamida (anandamida – AEA), 2-araquidonilglicerol (2-AG) e 1-araquidonilglicerol (1-AG), bem como os padrões internos dos endocanabinóides araquidoniletanolamida-d4 (AEA-d4), 2-araquidonilglicerol-d5 (2-AG-d5) e 1-araquidonilglicerol-d5 (1-AG-d5) foram adquiridos da Cayman Chemical (Michigan, USA).

As soluções estoque foram preparadas individualmente para cada endocanabinóide. Para anandamida e anandamida-d4 foi preparado a solução de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em etanol. Para 2-AG e 2-AG-d5 a solução estoque foi de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em ACN, respectivamente. Os compostos 1-AG e 1-AG-d5 foram preparados nas mesmas concentrações que 2-AG e 2-AG-d5. Todas as soluções foram estocadas em freezer (-80 °C). A solução tampão de fosfato (“*Phosphate Buffer Solution*” – PBS) com albumina foi preparada na concentração de 36 mg mL^{-1} .

Os fios de aço inoxidável para a produção das fibras SPME foram adquiridos da Shimadzu Inc. (Concord, Ontario, Canada). Os fios foram cortados em 10 cm de comprimento e utilizados no processo de revestimento com diferentes fases estacionárias; C₁₈, C₃₀ e HLB. Essas partículas (C₁₈, C₃₀ e HLB) foram gentilmente doadas pela Millipore-Sigma (Bellefonte, PA, USA) e Waters (Waters Corporation, MA, USA), respectivamente. O comprimento e espessura do revestimento foram de 10 mm e 20 μm .

O processo de recobrimento do fio de aço inox segundo o protocolo desenvolvido no laboratório do Prof. Dr. Janusz Pawliszyn. Inicialmente, uma solução contendo 5 g de poliacrilonitrila (“*Polyacrylonitrile*” – PAN) e 72,5 mL de dimetilformamida (“*Dimethyl formamide*” – DMF) foi aquecida a 90 °C durante 1 h. Após o resfriamento, 6,3 g dessa solução (PAN + DMF) foram misturados com 0,65 g das fases utilizadas (C₁₈, C₃₀ e HLB – 5 μm), durante toda a noite. Para a deposição da fase no fio de aço inox, este foi imerso na solução de revestimento durante 10 segundos e subsequentemente levado à estufa (125 °C) durante 1 minuto (Gómez-Ríos *et al.*, 2018).

3.2 Amostras de plasma

As amostras de plasma branco humano (K2 EDTA) foram adquiridas da Bioreclamation IVT (WestBurry, New York, USA). Estas amostras de plasma foram enriquecidas com a solução padrão dos endocanabinóides nas concentrações de 100 ng mL^{-1} e agitadas durante 3 horas (1200 rpm). Posteriormente, estas amostras de plasma foram preservadas em freezer -4°C durante noite a fim de se garantir o equilíbrio de ligação endocanabinóide-proteínas.

3.3 Procedimento de SPME

O procedimento de SPME foi realizado em três etapas: extração (60 min, 1500 rpm) dos endocanabinóides em amostras de plasma (300 μL) com adição da solução de modificador de matriz (200 μL) realizada em frasco de vidro (600 μL); remoção das macromoléculas (5s cada, 1500 rpm) em frasco de plástico (300 μL), e dessorção (60 min, 1500 rpm) em *inserts* de vidro de 50 μL com solução metanol/isopropanol (17 μL – 50:50, v/v).

3.4 Otimização do modificador de matriz para amostras de plasma

A fim de se aumentar a concentração livre dos endocanabinóides em amostras de plasma, o planejamento experimental central composto 2^3 foi empregado. As variáveis independentes estudadas foram: ácido trifluoroacético (%), cloridrato de guanidina (mmol L^{-1}) e acetonitrila (μL) em 5 níveis.

A variável dependente (resposta) foi a recuperação dos endocanabinóides. Foram realizados 17 experimentos aleatórios: 8 pontos fatoriais (-1,+1); 6 pontos axiais (-1,68, +1,68) e 3 pontos centrais (0,0).

3.5 Análises em amostra de cérebro de vaca

O processo de extração realizado em ambas amostras, cérebro de vaca e cérebro de vaca homogeneizado, foi realizada durante 30 minutos. Entretanto, enquanto que para a amostra de cérebro de vaca homogeneizado foram utilizados 300 μL (amostra) em um frasco de vidro (300 μL), para a amostra de cérebro houve o cuidado de se amostrar em regiões cerebrais similares. Após a extração foi efetuado dois enxágues (5 s) com

água/acetona (90:10, v/v) antes da etapa de dessorção. A dessorção foi realizada conforme descrito anteriormente no item 3.3.

3.6 Análises por SPME-UHPLC-MS/MS

As análises SPME-UHPLC-MS/MS foram realizadas no espectrômetro de massas TSQ Quantiva (Thermo Fisher Scientific, San Jose, California, USA), e os dados obtidos foram processados no software Trace Finder 3.3 (Thermo Fisher (Thermo Fisher Scientific, San Jose, California, USA). Após a etapa de dessorção as amostras foram injetadas no TSQ Quantiva (10 µL) e os endocanabinóides foram separados na coluna cromatográfica superficialmente porosa Cortecs (100 mm x 2,1 mm – 1,6 µm) C₁₈, e pré-coluna Cortecs (5 mm x 2,1 mm – 1,6 µm) C₁₈ a 40 °C. A separação cromatográfica foi realizada no modo gradiente com a fase móvel constituída por água com 0,1% de ácido acético (A) e acetonitrila/isopropanol (90:10, v/v) (B). O gradiente utilizado foi 0,0-0,5 (40% B), 0,5-5,0 (79% B), 5,0-6,5 (75% B), 6,5-8,1 (40% B) e 8,1-10,0 (40% B).

Os endocanabinóides foram analisados no modo positivo, a voltagem do spray foi de 3,5 kV, a temperatura do tubo de transferência de íons foi de 333 °C, temperatura de vaporização 317 °C, gás de dissociação induzido por colisão 1,5 mTorr e o dwell time de 100 ms. Os outros parâmetros otimizados para a análise dos endocanabinóides foram listados na Tabela 21.

Tabela 21. Parâmetros MS para todas as transições monitoradas

Analito	Precursor (<i>m/z</i>)	Produto (<i>m/z</i>)	Energia de colisão (V)	RF lentes (V)
AEA	348,2	287,2	13,1	66
		62,1	17,5	
		269,2	14,9	
AEA-d4	358,2	287,2	13,1	65
		287,2	13,3	
2-AG	379,2	269,2	17,2	78
		203,2	21,1	
2-AG-d5	384,2	287,2	14,9	85
		287,2	13,3	
1-AG	379,2	269,2	17,2	78
		203,2	21,1	
1-AG-d5	384,2	287,2	14,9	85

RF = rádio frequência

3.7 Análises por acoplamento direto Bio-SPME-Nano-ESI-MS/MS

As análises por acoplamento direto foram realizadas em quatro principais etapas: extração/pré-concentração, limpeza da fase, dessorção e ionização. Para a extração/pré-concentração a fibra de Bio-SPME foi inserida em um frasco de vidro (600 μL) contendo a amostra de plasma (300 μL) e a solução modificadora de matriz (200 μL). A extração foi realizada com agitação (1500 rpm) durante 60 min. Em seguida, as fibras foram enxaguadas em um frasco de plástico (300 μL) contendo água (grau LC-MS) para remoção de possíveis interferentes ligados superficialmente sobre o revestimento da fibra (5 segundos x 2, 1500 rpm). Logo após, as fibras foram inseridas no dispositivo emissor (“*emitter*”, ESI) de 1,0 nm de diâmetro externo (d.e) e 0,58 de diâmetro interno (d.i), preenchido com 4 μL (pré-concentração) de solução de dessorção (metanol/isopropanol – 50:50, v/v e 0,1% ácido acético) onde ocorreu a dessorção dos analitos em condição estática. Por fim, um alto potencial elétrico foi aplicado entre o dispositivo de emissão e a entrada do espectrômetro de massas para iniciar a ionização dos analitos via o mecanismo de ionização por eletrospray.

3.8 Análises por espectrometria de massas com mobilidade iônica

Foi utilizado o espectrômetro de massas 5500 QTRAP[®] (Sciex, Concord, ON) com cela Selexion-DMS, com uma voltagem de 5 kV na sonda ESI e o constante fluxo de gás a 20 psi (N_2). A temperatura do gás de transporte dentro da cela DMS foi mantida em 150 °C e a taxa de fluxo bombeada para dentro do ESI foi de 7,0 $\mu\text{L min}^{-1}$. Foi infundida soluções padrão dos endocanabinóides na concentração de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em acetonitrila.

Para fins de otimização, a voltagem de separação (SV) foi variada de 0 a 4000 V com incrementos de 250 V, enquanto que a voltagem de compensação (CoV) oscilou de -10 a 23 V e os “*ionograms*” foram registrados no software *Analyst*. Para a etapa de MRM³ foi monitorado três transições para AEA e 2-AG, respectivamente. As transições foram selecionadas de acordo com suas intensidades.

3.9 Validação analítica

A validação analítica de ambos os métodos foi baseada nas atuais diretrizes internacionais emitidas pela FDA (*“Food and Drug Administration”*) e EMA (*“European Medicines Agency”*).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Análises por SPME-UHPLC-MS/MS

O método cromatográfico desenvolvido foi baseado no método desenvolvido por (Gouveia-Figueira e Nording, 2015) com modificações. O tempo total da corrida cromatográfica para a separação cromatográfica dos isômeros 2-AG e 1-AG foi de 10 min. A AEA foi eluído em $t_R = 6,68$ min, 2-AG em $t_R = 7,55$ min e 1-AG em $t_R = 7,75$ min. A separação foi baseada no coeficiente de sorção dos analitos em fase reversa, de acordo com a polaridade (afinidade). Os isômeros (2-AG e 1-AG) apresentam a mesma massa molecular, no entanto, devido a migração acila no processo de isomerização do endocanabinóide 2-AG para 1-AG, as polaridades são diferentes. Devido a esse fato, foi possível obter separação cromatográfica dos isômeros com resolução cromatográfica de 1,3 (R_s).

Além disso, a separação cromatográfica dos isômeros alcançada, muito se deve a utilização da coluna com partículas superficialmente porosas, Cortecs 1,6 μm provendo picos estreitos (largura do pico $\cong 11$ s). Outro fator importante obtido através da separação cromatográfica dos isômeros foi a predominância de 1-AG em amostras de plasma (Figura 31).

Figura 31. (a) Cromatograma de íons totais (TIC) da solução padrão de AEA e 2-AG (100 ng mL^{-1}) (b) e amostra de plasma enriquecida com solução padrão de AEA e 2-AG (100 ng mL^{-1}).

O processo de isomerização tem sido amplamente discutido na literatura e resultados demonstram que solventes polares próticos favorecem a conversão de 2-AG para 1-AG (Rouzer *et al.*, 2002; Zoerner *et al.*, 2012; Balvers *et al.*, 2013; Docs *et al.*, 2017). Em nosso estudo foi observado a conversão de 2-AG para 1-AG em amostras de plasma, o que pode ser explicado devido à grande quantidade de água presente em plasma ($\cong 90\%$) (Krebs, 1950; Adkins *et al.*, 2002) bem como a presença de albumina sérica (Zoerner *et al.*, 2011; Garst *et al.*, 2015; Kantae *et al.*, 2017).

De acordo com publicações utilizando os meios “*Roswell Park Memorial Institute*” (RPMI) (Rouzer *et al.*, 2002) e “*Hank’s Balanced Salt Solution*” (HBSS) (Docs *et al.*, 2017), 2-AG se converteu rapidamente em 1-AG. Utilizando o meio RPMI sem adição de albumina sérica, o tempo de meia vida de conversão foi de 10 min, enquanto que com a adição de albumina sérica, o tempo obtido foi de 2,3 min. Já em HBSS sem adição de albumina sérica o tempo de conversão foi de 16,2 min, e com a adição de albumina sérica foi de 8,8 min. Esses resultados não somente confirmam a influência da albumina sérica no processo de isomerização (Zoerner *et al.*, 2011; Garst *et al.*, 2015; Kantae *et al.*, 2017), mas também ressaltam a rapidez da conversão de 2-AG para 1-AG.

Como o isômero 1-AG é termodinamicamente mais estável que 2-AG, a isomerização ocorre até que atinja o equilíbrio na razão de 1:9 (2-AG:1-AG) (Docs *et al.*, 2017). Em razão deste fato, em vários trabalhos da literatura os resultados têm sido expressos como a soma de 2-AG e 1-AG (Zoerner *et al.*, 2011; Garst *et al.*, 2015; Gong *et al.*, 2015; Gouveia-Figueira e Nording, 2015; Marchioni *et al.*, 2017). Nesta tese, os resultados foram expressos como 2-AG(s), ou seja, a soma de 2-AG e 1-AG.

Uma vez que a etapa de extração é governada pelo equilíbrio, o tempo de incubação é requerido com o intuito de garantir que o equilíbrio entre compostos (ex. proteínas) presentes na matriz (plasma) e os analitos estudados, seja atingido antes da análise. Portanto, ignorar essa etapa pode resultar em um processo de extração não reprodutível (Pawliszyn, 2011).

Para investigar esse efeito, amostras de plasma enriquecidas com os padrões foram analisadas após diferentes tempos de equilíbrio, “overnight” e 3 horas. A Figura 32 apresenta os resultados obtidos. Não observamos diferença significativa ($p > 0,05$, teste t de Student) entre as amostras de plasma avaliadas. Os resultados apresentados reforçam a predominância de 1-AG, devido o processo de isomerização. Adicionalmente, os endocanabinóides apresentam estabilidade em amostras de cérebro e plasma durante 24 horas a temperatura ambiente (Gong *et al.*, 2015).

Evidentemente, como já discutido na literatura, fatores que influenciem no processo de isomerização como, temperatura, pH, solventes polares próticos e albumina sérica (Zoerner *et al.*, 2011; Garst *et al.*, 2015; Kantae *et al.*, 2017) não foram controlados neste presente trabalho. Isso implica que as condições realizadas no presente trabalho, favorecem a conversão de 2-AG para 1-AG em amostras de plasma.

Trabalhos que também realizaram a separação cromatográfica dos isômeros em questão, trabalharam em condições experimentais capazes de controlar essa conversão como o uso de tolueno para LLE (Zoerner *et al.*, 2012) ou para SPE o uso de acetonitrila para precipitação de proteínas e reconstituição do extrato seco (Balvers *et al.*, 2013; Gouveia-Figueira e Nording, 2015).

Figura 32. Comparação entre plasma fortificado com solução padrão de AEA e 2-AG (100 ng mL⁻¹) deixado durante a noite e apenas 3 horas.

4.2 Estabilidade dos endocanabinóides

A estabilidade dos endocanabinóides foi avaliada em diferentes solventes. Para essa avaliação foi preparado uma solução padrão de 100 ng mL⁻¹ em diferentes solventes contendo AEA, 2-AG, AEA-d4 e 2-AG-d5. Os solventes avaliados foram: acetonitrila, metanol, isopropanol, acetonitrila/metanol (50:50, v/v), acetonitrila/isopropanol (50:50, v/v), metanol/isopropanol (50:50, v/v) e água/acetonitrila (90:10, v/v). Cada solução foi preparada em triplicata e injetada no sistema UHPLC-MS/MS (10 µL) durante 18 horas. O endocanabinóide 2-AG apresentou uma diminuição devido ao aumento do processo

de isomerização decorrente dos solventes polares próticos, enquanto que para 1-AG houve um aumento nesses solventes durante o tempo de análise (Figura 33).

Figura 33. Estabilidade dos endocanabinóides (100 ng mL⁻¹) em diferentes solventes.

Para AEA não foi observado decréscimo de sua concentração, com exceção da solução preparada com água/acetonitrila (90:10, v/v). Nessa composição de solução, tanto 2-AG quanto AEA apresentaram um decréscimo em suas concentrações e tal fato pode ser explicado pela hidrofobicidade dos endocanabinóides. Logo, devido à alta hidrofobicidade dos endocanabinóides, provavelmente ocorreu a adsorção dos endocanabinóides junto as paredes do frasco (Pezeshki *et al.*, 2009; Pawliszyn, 2011;

Warwood *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2015). Entretanto, estudos mais aprofundados são necessários para completa elucidação desse efeito observado neste presente trabalho.

A estabilidade dos endocanabinóides também foi avaliada em diferentes temperaturas durante a separação cromatográfica (de 25 °C até 40 °C) e os resultados foram apresentados como razão entre 2-AG e 1-AG (Figura 34).

Figura 34. Estabilidade dos endocanabinóides (100 ng mL⁻¹ em metanol) em diferentes temperaturas.

De acordo com Zoerner *et al.*, 2012 o processo de isomerização pode ser influenciado pela temperatura, em outras palavras, o aumento da temperatura pode aumentar a conversão de 2-AG em 1-AG. Dentre as diferentes temperaturas avaliadas não houve diferença significativa ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey, o que indica que o processo de isomerização é constante durante a separação cromatográfica e pode ser ignorado nesta etapa. Portanto, com o intuito de manter a eficiência cromatográfica, com picos estreitos, a temperatura de 40 °C foi selecionada para as análises subsequentes. Desse modo, picos com largura de 11 segundos foram obtidos nessa temperatura. Temperaturas acima das estudadas nesse trabalho não foram avaliadas devido a estabilidade da coluna analítica.

4.3 Escolha do revestimento, solução de dessorção e modificador de matriz

Foram selecionados três revestimentos com partículas C_{18} , C_{30} e HLB, para efetuar as extrações dos endocanabinóides em amostras de plasma. Todos os revestimentos eram biocompatíveis o que permitiu a imersão direta das fibras na matriz biológica. O procedimento para avaliar os revestimentos consistiu em amostras de plasma (300 μ L), extração (60 min), duplo enxágue (5 s) e dessorção em 100 μ L de metanol (60 min). Baseado no Log P dos endocanabinóides estudados, AEA ($\cong 5.7$) e 2-AG ($\cong 6.2$) era esperado uma maior interação com os revestimentos apolares como C_{18} e C_{30} . Entretanto, levando em consideração que esses endocanabinóides também apresentam grupos químicos polares como amida (AEA) e éster (2-AG), o revestimento com partículas de HLB também apresentou boa interação com os endocanabinóides. Dentre os revestimentos avaliados, C_{30} e HLB apresentaram as maiores taxas de recuperação (Figura 35). Uma vez que 1-AG exibe estrutura similar ao 2-AG a discussão acima pode também ser considerada para 1-AG.

Figura 35. Comparação entre os revestimentos com partículas C_{18} , C_{30} e HLB.

Devido a propriedade lipofílica dos endocanabinóides, a fase mais hidrofóbica (C_{30}) demonstrou boa interação com os analitos e consequentemente boa recuperação, enquanto que para a fase HLB o destaque é a capacidade de interagir com ambas partes da molécula, hidrofílica e lipofílica. Portanto, a fim de se escolher o melhor solvente para dessorção dos endocanabinóides diferentes solventes foram testados e comparados utilizando esses dois revestimentos. Os solventes utilizados foram: acetonitrila, metanol,

isopropanol, acetonitrila/metanol (50:50, v/v), acetonitrila/isopropanol (50:50, v/v) e metanol/isopropanol (50:50, v/v). Para realizar o teste de diferentes solventes de dessorção, foi adotado o mesmo procedimento utilizado para avaliar os diferentes revestimentos, porém com a diferença do solvente de dessorção. Para selecionar o melhor solvente de dessorção foi levado em consideração aquele que apresentou melhores taxas de recuperação. Como demonstrado na Figura 36, metanol/isopropanol (50:50, v/v) foi escolhido como melhor solvente de dessorção com maiores taxas de recuperação para ambos revestimentos (HLB e C₃₀).

Figura 36. Comparação entre diferentes soluções de dessorção para os revestimentos de HLB e C₃₀. As misturas de dois solventes foram preparadas nas proporções 50:50 (v/v).

Em seguida, diferentes modificadores de matriz foram testados em experimentos de triagem com o intuito de verificar a capacidade de cada modificador individualmente, bem como as suas faixas a serem trabalhadas. Os modificadores testados foram: acetonitrila (ACN), cloridrato de guanidina (Gu-HCl) e ácido trifluoroacético (TFA). Os dois revestimentos HLB e C₃₀ foram considerados para verificar os desempenhos dos modificadores (Figura 37).

Figura 37. Avaliação de diferente modificadores de matriz através da extração de AEA e 2-AG utilizando fibras SPME revestidas com C₃₀ e HLB. Gu-HCl (6 mmol L⁻¹) (2:1, v/v), TFA 0.1% e acetonitrila 100 µL.

De acordo com os resultados obtidos, o revestimento de HLB apresentou as maiores taxas de recuperação para ambos endocanabinóides (AEA e 2-AG(s)) e a adição de acetonitrila se mostrou como o modificador de matriz mais eficiente no que diz respeito a recuperação. Assim, devido ao melhor desempenho do revestimento de HLB o mesmo foi selecionado para as análises subsequentes.

Em relação aos modificadores de matriz, foi realizado uma otimização utilizando planejamento experimental central composto 2³. O planejamento experimental foi aplicado devido a sua capacidade de investigar profundamente os efeitos de cada modificador bem com a interação entre os mesmos. Foi realizado a adição de água ultrapura (grau LC-MS) a fim de se corrigir o volume entre as extrações realizadas, completando o volume final de 200 µL (fixado). Os modificadores de matriz bem como suas faixas foram selecionados devido a suas propriedades de precipitar proteínas. Como já é bem conhecido os solventes orgânicos diminuem a constante dielétrica das proteínas do plasma, facilitando a interação eletrostática da proteína que ocasiona o processo de precipitação (Milovanovic *et al.*, 2015). Para os ácidos, sais insolúveis podem ser formados em pH abaixo do ponto isoelétrico das proteínas devido a carga positiva no grupamento amino (Kirkwood *et al.*, 2015). Já o cloridrato de guanidina pode quebrar as ligações de hidrogênio bem como a interação hidrofóbica entre proteína e molécula (Huerta-Viga e Woutersen, 2013).

A tabela de análise de variância (ANOVA) demonstrou os efeitos significativos que influenciam nas taxas de recuperação dos endocanabinóides AEA e 2-AG(s) em amostras de plasma (Tabela 22 e 23). De acordo com o planejamento experimental tanto para AEA quanto 2-AG(s) o valor da falta de ajuste não foi significativo, o que indica que o modelo foi bem ajustado e pode ser utilizado para predição. As equações 19 e 20 (AEA e 2-AG(s)) foram utilizadas para predizer a resposta, em outras palavras, para obter o maior valor de recuperação para os endocanabinóides estudados.

Tabela 22. Análise de variância para AEA

Fatores	SQ	gl	QM	F	p
(1)TFA (%) (L)	2942.246	1	2942.246	188.8473	0.000000
TFA (%) (Q)	344.098	1	344.098	22.0858	0.000122
(2)Gu-HCl (mM) (L)	26.257	1	26.257	1.6853	0.208301
Gu-HCl (mM) (Q)	8.802	1	8.802	0.5649	0.460617
(3)ACN (µL) (L)	3173.508	1	3173.508	203.6908	0.000000
ACN (µL) (Q)	76.043	1	76.043	4.8808	0.038401
1L by 2L	405.880	1	405.880	26.0513	0.000047
1L by 3L	90.738	1	90.738	5.8240	0.025029
2L by 3L	253.741	1	253.741	16.2863	0.000597
Falta de ajuste	193.244	5	38.649	2.4807	0.064710
Erro puro	327.181	21	15.580		
Total SS	8450.555	35			

SQ Soma dos quadrados. **gl** Graus de liberdade. **QM** Quadrado da média. **F** valor calculado. **p** Nível de significância. L linear. Q quadrático

Tabela 23. Análise de variância para 2-AG(s)

Fatores	SQ	gl	QM	F	p
(1)TFA (%) (L)	2593.461	1	2593.461	74.65926	0.000000
TFA (%) (Q)	111.966	1	111.966	3.22321	0.087007
(2)Gu-HCl (mM) (L)	7.708	1	7.708	0.22188	0.642464
Gu-HCl (mM) (Q)	8.401	1	8.401	0.24184	0.627979
(3)ACN (μL) (L)	2101.355	1	2101.355	60.49276	0.000000
ACN (μL) (Q)	75.278	1	75.278	2.16707	0.155823
1L by 2L	962.359	1	962.359	27.70391	0.000032
1L by 3L	269.712	1	269.712	7.76434	0.011060
2L by 3L	640.039	1	640.039	18.42512	0.000323
Falta de ajuste	234.007	5	46.801	1.34730	0.283598
Erro puro	729.483	21	34.737		
Total SS	7817.605	35			

SQ Soma dos quadrados. **gl** Graus de liberdade. **QM** Quadrado da média. **F** valor calculado. **p** Nível de significância. L linear. Q quadrático

$$y = 38,6 - 10,3 x_1 + 0,93 x_2 - 10,7 x_3 + 3,94 x_1^2 - 0,62 x_2^2 - 1,88 x_3^2 - 4,91 x_1 x_2 + 2,32 x_1 x_3 + 3,89 x_2 x_3 \quad \text{Equação 6}$$

$$y = 49,9 - 9,64 x_1 - 0,51 x_2 - 8,68 x_3 + 2,26 x_1^2 - 0,57 x_2^2 - 1,82 x_3^2 - 7,57 x_1 x_2 - 4,01 x_1 x_3 + 6,18 x_2 x_3 \quad \text{Equação 20}$$

As Figuras 38 e 39 ilustram a condição ótima de composição dos modificadores de matriz adicionados em amostras de plasma para liberar os endocanabinóides ligados as proteínas do plasma. Para AEA e 2-AG(s), as variáveis independentes TFA (%) e ACN (μL) foram significativas. De acordo com o planejamento experimental, maiores quantidades de solvente orgânico e maiores concentrações de ácido diminuem a recuperação dos endocanabinóides em amostras de plasma. De fato, ambos em alta concentração podem prejudicar a extração de AEA e 2-AG(s) devido ao rápido processo de precipitação arrastando os compostos para o fundo do frasco (co-precipitação) juntamente com as proteínas. Por outro lado, quantidades consideráveis podem promover a recuperação como mostrado pelo planejamento experimental.

A partir desses experimentos o modificador de matriz, cloridrato de guanidina parece não ter efeito sobre a recuperação, entretanto, a interação com outros modificadores foi significativa. Tal fato pode ser obtido somente pela aplicação do planejamento experimental na otimização do processo.

Figura 38. Superfície ótima de contorno (Dering and Suich) para AEA e 2-AG(s).

Figura 39. Parâmetros de desejabilidade estimado na condição ótima para AEA e 2-AG(s).

Portanto, de acordo com o planejamento experimental desenvolvido, a melhor condição para extração dos endocanabinóides em amostras de plasma foi a não adição de TFA (0,0%), 50 μL de Gu-HCl (1 mol L^{-1}), 75 μL de ACN e 75 μL de água ultrapura. A combinação de Gu-HCl com ACN sugere um aumento na capacidade de quebrar as ligações dos endocanabinóides com as proteínas presentes na amostra de plasma, gerando um incremento na concentração livre disponível para extração por SPME. A Figura 40 apresenta a comparação de extração de amostra de plasma sem qualquer adição de modificador de matriz, e amostra de plasma com adição de modificador de matriz na condição ótima obtida pelo planejamento experimental. Portanto, essa condição ótima de extração foi selecionada para as análises subsequentes.

Figura 40. Comparação entre a extração dos endocanabinóides de plasma sem adição de modificador de matriz e com a adição de modificador na condição otimizado pelo planejamento experimental.

Adicionalmente, o teste de perfil do tempo de extração foi realizado para os endocanabinóides fornecendo o tempo necessário para atingir o equilíbrio entre endocanabinóides e a fibra revestida com partículas HLB ($\cong 60 \text{ min}$). Portanto esse tempo foi selecionado como ótimo para a realização da extração (Figura 41).

Figura 41. Perfil do tempo de extração para os endocanabinóides em plasma.

4.4 Validação analítica

4.4.1 SPME-UHPLC-MS/MS

As curvas de calibração obtidas foram lineares para todos os endocanabinóides e com coeficiente linear maior que 0,999. Além do mais, a falta de ajuste foi não significativa ao nível de 5% ($p > 0,05$), indicando que os modelos foram bem ajustados para todos os endocanabinóides (Tabela 24). Uma vez que os compostos de interesse eram endógenos, a curva de calibração seguiu o procedimento de adição de padrão.

Os resultados intraensaio e interensaio foram expressos como coeficiente de variação (CV) e erro padrão relativo (EPR), para precisão e exatidão em cinco concentrações diferentes. Para AEA os valores de CV variaram entre 1,4 a 6,8%

(Intraensaio) e de 0,7 a 12,1% (Interensaio). Ao passo que para exatidão os valores de EPR oscilaram de -17,5 a 6,1% (Intraensaio) e de -15,7 a 9,1% (Interensaio). Adicionalmente, para o 2-AG(s) a precisão variou de 1,2 a 6,1% (Intraensaio) e de 0,9 a 11,3% (Interensaio), enquanto que para a exatidão os valores flutuaram de -14,9 a 12,6% (Intraensaio) e de -13,5 a 14,4% (Interensaio). Os valores para ambos, precisão e exatidão, bem como intraensaio e interensaio podem ser considerados satisfatórios, pois atendem as especificações dos órgãos reguladores seguidos (FDA e EMA). Os valores de EPR maiores que 15% foram obtidos no limite de quantificação (LOQ) o que é aceitável de acordo com as diretrizes internacionais FDA e EMA ($\leq 20\%$).

Tabela 24. Coeficiente de correlação, equação linear, falta de ajuste, faixa de concentração e padrão interno para o método SPME-UHPLC-MS/MS em plasma e PBS

Analito	R	Equação	Falta de ajuste	Faixa de concentração (ng mL ⁻¹)	Padrão Interno
Plasma					
AEA	0,9999	$Y = 0,0445x + 0,0249$	0,9907	1-200	AEA-d4
2-AG	0,999	$Y = 0,0453x + 2,0932$	0,8202	1-200	2-AG-d5
PBS					
AEA	0,9995	$Y = 0,0453x - 0,0007$	0,8477	1-200	AEA-d4
2-AG	0,9995	$Y = 0,0463x - 0,0941$	0,6739	1-200	2-AG-d5

Adicionalmente, com o intuito de equiparar a matriz biológica amostral (plasma), foi preparada uma curva de calibração em solução salina tamponada com fosfato (PBS) (pH 7,4) com albumina humana. O PBS com albumina humana foi preparado de acordo com o procedimento descrito abaixo: Solução de PBS (pH 7,4) foi preparada pela adição de 8,0 g de cloreto de sódio, 1,44 g de fosfato de sódio, 0,2 g fosfato de potássio e 0,2 g de cloreto de potássio para 1 litro de água ultrapura. Em 100 mL dessa solução, 3,6 g de albumina humana foi diluída a fim de se obter a concentração final de 36 mg mL⁻¹ (Krebs, 1950; Adkins *et al.*, 2002).

Além disso, foi realizado a comparação entre os coeficientes angulares pela análise de variância. De acordo com o teste de Tukey os coeficientes angulares não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$) o que indica que a sensibilidade de ambas curvas de calibração (plasma e PBS com albumina humana) não podem ser consideradas diferentes. As curvas de calibração em amostra de plasma e em PBS com albumina humana foram apresentadas na Figura 42. Para ambos endocanabinóides (AEA e 2-AG(s)) foram adicionados o padrão interno na concentração de 50 ng mL⁻¹, com o

objetivo de obter a correção do erro aleatório através da razão. Foi obtido LOQ de 1 ng mL^{-1} para ambos endocanabinóides.

Figura 42. Curva de calibração (adição de padrão) para AEA e 2-AG(s) em amostra de plasma (a) e curva de calibração em PBS com albumina (36 mg mL^{-1}) (b) para o método SPME-UHPLC-MS/MS. O triângulo alaranjado é correlacionado com a concentração do padrão interno.

4.4.2 Bio-SPME-Nano-ESI-MS/MS

A validação do método Bio-SPME-Nano-ESI-MS/MS seguiu as mesmas diretrizes aplicadas ao método SPME-UHPLC-MS/MS. As curvas de calibração foram lineares para ambos endocanabinóides com coeficientes de correlação maiores que 0,996. A falta de ajuste obtida não foi significativa ao nível de 5% ($p > 0,05$), indicando que os modelos lineares foram bem ajustados para todos os endocanabinóides (Tabela 25).

Os valores obtidos para a precisão e exatidão se mostraram em acórdância com os limites preconizados pelas diretrizes internacionais seguidas. Para AEA, os valores de CV variaram de 0,55 a 7,2% (Intraensaio) e de 1,2 a 10,3% (Interensaio), enquanto que os valores de EPR alternaram de -16,5 a 11,2% (Intraensaio) e de -15,4 a 12,9% (Interensaio). Já para 2-AG(s) foi obtido valores de CV variando de 2,5 a 8,1% (Intraensaio) e de 1,9 a 9,4% (Interensaio). Para a exatidão os valores oscilaram de -17,7 a 11,8% (Intraensaio) e de 14,9 a 9,8% (Interensaio). Os valores para ambos, precisão e

exatidão, bem como intraensaio e interensaio podem ser considerados satisfatórios, pois atendem as especificações dos órgãos reguladores seguidos (FDA e EMA)

Tabela 25. Coeficiente de correlação, equação linear, falta de ajuste, faixa de concentração e padrão interno para o método Bio-SPME-Nano-ESI-MS/MS em amostra de plasma

Analito	R	Equação	Falta de ajuste	Faixa de concentração (ng mL ⁻¹)	Padrão Interno
Plasma					
AEA	0,9969	Y = 0,0046x + 0,0868	0,1169	50-800	AEA-d4
2-AG	0,9985	Y = 0,0201x + 1,8788	0,0675	50-800	2-AG-d5

As curvas de calibração para ambos endocanabinóides foram apresentadas na Figura 43. O limite de quantificação obtido para AEA e 2-AG(s) foi de 50 ng mL⁻¹.

Figura 43. Curva de calibração (adição de padrão) para AEA e 2-AG(s) em amostra de plasma para o método Bio-SPME-Nano-ESI-MS/MS. O triângulo alaranjado é correlacionado com a concentração do padrão interno.

4.5 Comparação das metodologias desenvolvidas

Ambos os métodos desenvolvidos estão em conformidade com as diretrizes internacionais e podem ser aplicados para a quantificação de endocanabinóides em amostras de plasma. Com a finalidade de comparar esses dois métodos, destacar as etapas (Figura 44) envolvidas para a extração e posterior detecção dos endocanabinóides é de suma importância.

Figura 44. Fluxo analítico para ambos os métodos desenvolvidos para análise de endocanabinóides.

Primeiramente, a etapa de extração foi considerada 60 min até atingir o equilíbrio e para ambos os métodos (SPME-UHPLC-MS/MS e Bio-SPME-Nano-ESI-MS/MS) assim, o tempo de extração foi o mesmo. Contudo, é importante destacar que as extrações foram realizadas em 96-poços e devido a isso diminuindo o tempo por amostra. A etapa de enxágue seguiu o mesmo procedimento para ambos os métodos, mergulhando a fibra e agitando (5 s – 1500 rpm) por duas vezes com a finalidade de remover qualquer macromolécula na superfície do revestimento de extração. Em seguida, a etapa de dessorção apresentou a principal diferença entre os métodos.

Para SPME-UHPLC-MS/MS a dessorção foi realizada durante 60 min em *insert* (50 μ L) contendo 17 μ L (metanol/isopropanol 50:50, v/v), e após, injetado 10 μ L no sistema UHPLC-MS/MS. Por outro lado, para Bio-SPME-Nano-ESI-MS/MS o processo de dessorção ocorreu dentro do dispositivo de emissão (“*emitter*”) 1,0 nm de diâmetro externo (d.e) e 0,58 de diâmetro interno (d.i) durante 5 min contendo aproximadamente 4 μ L (metanol/isopropanol 50:50, v/v com 0,1% de ácido acético). Após essa etapa foi aplicado um alto potencial elétrico (2,2 kV) sobre o dispositivo de emissão promovendo a ionização dos analitos pelo mecanismo de eletrospray. Por fim, a aquisição de dados que enquanto para o método cromatográfico demandou 10 min (corrida cromatográfica), o método por acoplamento direto necessitou apenas de 30 s (Figura 44).

O método SPME-UHPLC-MS/MS, quando comparado ao SPME-Nano-ESI-MS/MS, apresentou menores valores de LOQs, em razão da separação/resolução cromatográfica em fase reserva dos endocanabinóides e interferentes co-extraídos pela fibra SPME biocompatível. Este fato favoreceu a detectabilidade dos endocanabinóides.

No sistema SPME-Nano-ESI-MS/MS, a ionização por nanoeletrospray é mais eficiente e teoricamente, todos os analitos dessorvidos no dispositivo emissor são encaminhados ao espectrômetro de massas, enquanto que no método SPME-UHPLC-MS/MS, apenas uma fração do extrato (10 μ L) é injetada para separação e posterior ionização. Sendo assim, esperávamos que o método SPME-Nano-ESI-MS/MS apresentasse maior sensibilidade analítica. No entanto, em razão da baixa seletividade da fibra SPME biocompatível utilizada e do grande ruído gerado pelos interferentes co-extraídos, a sensibilidade analítica deste método foi prejudicada.

O recente método *column switching* LC-MS/MS desenvolvido em nosso grupo de pesquisa para a determinação de endocanabinóides em amostras de plasma, em razão da pré-concentração na primeira dimensão do sistema bidimensional, também apresentou menores valores de LOQs, para AEA (0,1 ng mL⁻¹) e 2-AG (0,04 ng mL⁻¹) (Marchioni *et al.*, 2017).

O método SPME-Nano-ESI-MS/MS apresenta com vantagem o acoplamento direto SPME-Nano-ESI-MS/MS que diminuiu o tempo da análise. O tempo total por amostra analisada foi de 11,15 min para o método SPME-UPLC-MS/MS e 5,40 min para o método Bio-SPME-Nano-ESI-MS/MS. Para o cálculo do tempo total foi considerado o período da etapa de extração ao processamento de dados. Os métodos SPME padronizados podem ser realizados em sistemas de 96 poços que permite o alto desempenho no processo de preparação amostral.

Outra vantagem dos métodos SPME padronizados, quando comparados às técnicas de preparo de amostras descritas na literatura (SPE, LLE, PPT e *column switching*), está relacionada à utilização de fibras SPME biocompatíveis, as quais podem ser utilizadas em análises *in vivo*.

4.6 Perspectivas futuras

4.6.1 Análises em cérebro de vaca e cérebro de vaca homogeneizado

Como discutido anteriormente, o dispositivo SPME permite análises *in vivo*. Adicionalmente, podemos comparar uma amostragem *ex vivo* e *in vivo* com a técnica SPME. A SPME permite a utilização de pequenos volumes de amostra em análises *ex vivo*, e não necessidade da coleta de frações da amostra para as análises *in vivo* (Bojko e Pawliszyn, 2014).

Assim, com o intuito futuro de aplicar a técnica SPME para quantificar endocanabinóides *in vivo*, testes de extração *ex vivo* de cérebro de vaca e de cérebro de vaca homogeneizado foram realizados.

Figura 45. Amostragem em cérebro de vaca *ex vivo*.

A figura 45 ilustra a amostragem em cérebro de vaca *ex vivo*. As extrações *in vivo* podem ser realizadas apenas em condições estáticas, devido a isso, a fim de se equiparar essa condição, a extração para a amostra de cérebro de vaca homogeneizado também foi realizada em modo estático. A Figura 46 ilustra o tempo estabelecido para atingir o equilíbrio de sorção entre os analitos e fase extratora em amostra de cérebro de vaca homogeneizado.

Entretanto, quando se realiza extrações *in vivo* menores tempos de extração são desejáveis, mesmo com perda de sensibilidade analítica (Bojko e Pawliszyn, 2014). Com o objetivo de se aplicar essa técnica para análises *in vivo*, o tempo de extração foi estabelecido em 30 min,

Figura 46. Perfil do equilíbrio de sorção dos endocanabinóides em amostra de cérebro de vaca homogeneizado.

Os cromatogramas de íons totais (TIC) das análises realizadas com inserção direta da fibra no cérebro de vaca e nas amostras de cérebro de vaca homogeneizado e plasma são apresentados na Figura 47. É importante destacar que a amostragem por SPME pode fornecer informações em relação à distribuição espacial (Bojko e Pawliszyn, 2014) dos endocanabinóides em amostras de cérebro. Além disso, poderiam ser realizadas múltiplas amostragens, já que a SPME não é uma técnica destrutiva, como as técnicas de extração convencionais (Bojko e Pawliszyn, 2014; Reyes-Garces *et al.*, 2018).

Figura 47. Cromatograma de íons totais (TIC) de cérebro de vaca (a), cérebro de vaca homogeneizado (b) e plasma (c). Para todas as análises não foi adicionado soluções padrão.

Uma característica surpreendente foi observada na Figura 47. De acordo com os resultados obtidos, em amostras de tecido (cérebro) ocorre a prevalência de 2-AG ao invés de seu isômero 1-AG. Esse relevante fato pode ser explicado pela alta lipofilicidade

presente em amostras de tecido que fornece uma alta estabilidade para a molécula de 2-AG evitando sua isomerização para 1-AG. Como já discutido previamente em amostras de plasma a prevalência é obtida para 1-AG ao invés de 2-AG devido à alta quantidade de água e albumina sérica presente na composição do plasma.

O isômero 1-AG tem sido associado a uma das formas de degradação de seu isômero 2-AG (Vogeser e Schelling, 2007; Zoerner *et al.*, 2011; Zoerner *et al.*, 2012; Docs *et al.*, 2017). No entanto, estudos recentes demonstraram que 1-AG é um composto biologicamente ativo que age sobre o CB₁ ocasionando aumento da concentração de cálcio extracelular. Em altas concentrações de 2-AG, o 1-AG tende a competir com o receptor CB₁. Entretanto quando 2-AG está em baixas concentrações, 1-AG desempenha um papel importante na manutenção da ativação de receptor canabinóides CB₁ e estabiliza a força da sinalização canabinóide, prolongando a sinalização resultante do 2-AG (Docs *et al.*, 2017).

Este relato apresenta alta relevância, pois sinaliza a importância do desenvolvimento de métodos para quantificação 1-AG e 2-AG, separadamente, *in vivo*, utilizando técnicas de preparo de amostra que não influenciem na isomerização destes endocanabinóides.

Indiscutivelmente, a técnica de SPME pode ser considerada uma alternativa muito promissora no desenvolvimento de métodos para análises *in vivo*. Bem como se sabe, a realização de análises *in vivo* requer o processo de esterilização do dispositivo de extração, sendo considerado uma etapa importante antes da amostragem. Estudos revelam que o dispositivo SPME pode ser autoclavado com solução de formaldeído (8%) e etanol (80%) em água, sem perda de desempenho de extração (Bojko e Pawliszyn, 2014).

Entretanto, o aumento da sensibilidade analítica dos instrumentos de detecção, poderia ser de grande valia para a obtenção de menores limites de quantificações para métodos com baixas taxas de recuperação (Bojko e Pawliszyn, 2014; Reyes-Garcés *et al.*, 2018).

4.6.2 Testes preliminares utilizando mobilidade iônica

Com o objetivo de superar os desafios encontrados no método Bio-SPME-Nano-ESI-MS/MS, foi realizado testes um espectrômetro de massas com mobilidade iônica (“*Differential Mobility Spectrometry - Mass Spectrometry*” – DMS-MS/MS).

Essencialmente, o DMS é uma tecnologia que é capaz de separar íons na fase gasosa antes da análise por MS. Portanto, esses testes objetivaram a separação dos isômeros 2-AG e 1-AG através da cela de mobilidade iônica e adicionalmente, separar os endocanabinóides dos interferentes já discutidos previamente.

Na cela de mobilidade iônica foi aplicada uma onda de voltagem de separação (“*Separation Voltage*” – SV) assimétrica que variou de comandos de baixo campo a alto campo. Diferentes mobilidades foram exibidas devido à variação de baixo e alto campo elétrico resultando em uma trajetória de “ziga-zag” durante o caminho percorrido pelos íons (Liu *et al.*, 2017). Contudo, para direcionar os íons de volta para o eixo em alinhamento com o MS, foi aplicado uma corrente contínua denominada voltagem de compensação (“*Compensation Voltage*” – CoV) (Schneider *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2017). Para esses experimentos foi utilizado o equipamento 5500 QTRAP® (Sciex, Concord, ON) com cela Selextion-DMS (Figura 48).

Figura 48. Espectrômetro de massas com mobilidade iônica (Sciex).

A Figura 49, ilustra a otimização do SV e CoV para a separação dos isômeros 2-AG e 1-AG. O método consistiu na infusão de uma solução padrão de ambos os isômeros na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ em acetonitrila. Foi utilizado acetonitrila como solvente

pelo fato de que solventes polares práticos poderiam converter 2-AG para 1-AG dificultando assim a análise.

Além disso, foram testados diferentes modificadores com o objetivo de obter uma separação dos isômeros. Para os solventes orgânicos avaliados, acetonitrila, acetona e isopropanol, o íon precursor analisado ($m/z = 379,2$) não foi encontrado, o que pode ser explicado pela formação de clusters entre os endocanabinóides e os solventes orgânicos. Já para a proporção de metanol e água (50:50, v/v) foi possível visualizar o íon precursor estudado ($m/z = 379,2$) e a adição de somente água como modificador apresentou o maior sinal do íon precursor, sendo então escolhida para a otimização de SV e CoV ilustrado na Figura 49. Entretanto, não foi possível obter uma boa separação dos isômeros 2-AG e 1-AG.

Figura 49. “*Iongrams*” da otimização do SV e CoV para a separação dos isômeros 2-AG e 1-AG na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Assim, os esforços foram voltados para a separação das interferências co-extraídas com os endocanabinóides que apresentam as mesmas transições, como discutido previamente. Para tal, foi otimizado o MRM³ no espectrômetro de massa e com a cela DMS desligada, pois o software (*Analyst*) não apresentava essa possibilidade. Com essa abordagem foi possível superar a ação dos interferentes, pois somente os compostos que

apresentavam uma determinada sequência de transição de íons foram monitorados. Essa abordagem somente foi possível pelo fato de que o espectrômetro de massas utilizado 5500 QTRAP® (Sciex, Concord, ON) era um triplo quadrupolo sendo que o último quadrupolo era um aprisionador de íons (*trap*).

As transições monitoradas para AEA foram 348,1 *m/z*, 331,1 *m/z* e 269,1 *m/z*, enquanto que para 2-AG(s) as transições foram 379,2 *m/z*, 361,2 *m/z* e 287,2 *m/z*. Os parâmetros para obtenção dessas transições foram apresentados na Tabela 26.

Tabela 26. Parâmetros otimizados para monitoramento de cada endocanabinóide

Analito	Transição	EP (V)	CE (V)	DP (V)	CXP (V)
AEA	348,1 – 331,1 – 269,1	10	12	25	15
2-AG(s)	379,2 – 361,2 – 287,2	10	20	25	15

EP = Potencial de entrada, CE = energia de colisão, DP = potencial de dessolvatação e CXP = potencial de saída da cela de colisão.

Assim, esses testes simbolizam as perspectivas futuras no que diz respeito a análise de endocanabinóides. Possivelmente o uso de uma cela DMS com maior comprimento poderia influenciar de forma significativa na separação dos isômeros. O comprimento da cela DMS do equipamento utilizado apresenta as dimensões de 1,5 x 20 x 63 mm, para a altura, largura e comprimento da cela (Liu *et al.*, 2017). Dessa forma, o aumento do comprimento da cela, poderia fornecer um maior caminho a ser percorrido pelos isômeros e ocasionando em uma possível separação.

5. CONCLUSÃO

O método SPME-UHPLC-MS/MS, quando comparado ao SPME-Nano-ESI-MS/MS, apresentou menores valores de LOQs, em razão da separação/resolução cromatográfica em fase reversa dos endocanabinóides e interferentes co-extraídos pela fibra SPME biocompatível. Este fato favoreceu a detectabilidade dos endocanabinóides.

No sistema SPME-Nano-ESI-MS/MS, a ionização por nanoeletrospray é mais eficiente e teoricamente, todos os analitos desorvidos no dispositivo emissor são encaminhados ao espectrômetro de massas, enquanto que no método SPME-UHPLC-MS/MS, apenas uma fração do extrato (10 µL) é injetada para separação e posterior ionização. Sendo assim, esperávamos que o método SPME-Nano-ESI-MS/MS apresentasse maior sensibilidade analítica. No entanto, em razão da baixa seletividade da fibra SPME biocompatível utilizada e do grande ruído gerado pelos interferentes co-extraídos, a sensibilidade analítica deste método foi prejudicada.

O método SPME-Nano-ESI-MS/MS apresentou como vantagem o acoplamento direto SPME-Nano-ESI-MS/MS que diminuiu o tempo da análise.

A técnica de SPME aliada a detectores de alta sensibilidade analítica pode ser considerada uma alternativa muito promissora para o desenvolvimento de métodos para análises *in vivo*.

6. REFERÊNCIAS

ADKINS, J. N. et al. Toward a human blood serum proteome: analysis by multidimensional separation coupled with mass spectrometry. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 1, n. 12, p. 947-55, 2002. ISSN 1535-9476.

BALVERS, M. G. 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. 275-83, 2013. ISSN 1096-0309.

BATTISTA, N. et al. Analytical approaches for the determination of phytocannabinoids and endocannabinoids in human matrices. **Drug Testing and Analysis**, v. 6, n. 1-2, p. 7-16, 2014. ISSN 1942-7611.

BEDSE, G. et al. The role of endocannabinoid signaling in the molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 43, n. 4, p. 1115-36, 2015. ISSN 1387-2877.

BESSONNEAU, V. et al. In vivo solid phase microextraction sampling of human saliva for non-invasive and on-site monitoring. **Analytica Chimica Acta**, v. 856, p. 35-45, 2015. ISSN 0003-2670.

BESSONNEAU, V. et al. In vivo solid-phase microextraction liquid chromatography-tandem mass spectrometry for monitoring blood eicosanoids time profile after lipopolysaccharide-induced inflammation in Sprague-Dawley rats. **Journal of Chromatography A**, v. 1424, p. 134-138, 2015. ISSN 0021-9673.

BLÜHER, M. et al. Dysregulation of the peripheral and adipose tissue endocannabinoid system in human abdominal obesity. **Diabetes**, v. 55, n. 11, p. 3053-3060, 2006. ISSN 0012-1797.

BOJKO, B. et al. Low invasive in vivo tissue sampling for monitoring biomarkers and drugs during surgery. **Laboratory Investigation**, v. 94, n. 5, p. 586-94, 2014. ISSN 0023-6837.

BOJKO, B.; PAWLISZYN, J. In vivo and ex vivo SPME: a low invasive sampling and sample preparation tool in clinical bioanalysis. **Bioanalysis**, v. 6, n. 9, p. 1227-1239, 2014.

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. 315-22, 2014. ISSN 1537-6524.

CRISCUOLO, C. et al. Very late onset in ataxia oculomotor apraxia type I. **Annals of Neurology**, v. 57, n. 5, p. 777-777, 2005. ISSN 1531-8249.

CUDJOE, E. et al. Solid-Phase Microextraction: A Complementary In Vivo Sampling Method to Microdialysis. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 52, n. 46, p. 12124-12126, 2013. ISSN 1433-7851.

DENG, J. et al. Surface-coated probe nanoelectrospray ionization mass spectrometry for analysis of target compounds in individual small organisms. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 19, p. 9923-30, 2015. ISSN 0003-2700.

DENG, L. et al. Compression Ratio Ion Mobility Programming (CRIMP) Accumulation and Compression of Billions of Ions for Ion Mobility-Mass Spectrometry Using Traveling Waves in Structures for Lossless Ion Manipulations (SLIM). **Analytical Chemistry**, v. 89, n. 12, p. 6432-6439, 2017. ISSN 0003-2700.

DOCS, K. et al. The Ratio of 2-AG to Its Isomer 1-AG as an Intrinsic Fine Tuning Mechanism of CB1 Receptor Activation. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 11, p. 39, 2017. ISSN 1662-5102.

FUMES, B. H. et al. Recent advances and future trends in new materials for sample preparation. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 9-25, 2015. ISSN 0165-9936.

GACHET, M. S. et al. A quantitative LC-MS/MS method for the measurement of arachidonic acid, prostanoids, endocannabinoids, N-acylethanolamines and steroids in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 976, p. 6-18, 2015. ISSN 1570-0232.

GARST, C. et al. Optimized extraction of 2-arachidonyl glycerol and anandamide from aortic tissue and plasma for quantification by LC-MS/MS. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 118, n. 5, p. 814-820, 2015. ISSN 1438-9312.

GOMEZ-RIOS, G. A. et al. Biocompatible Solid-Phase Microextraction Nanoelectrospray Ionization: An Unexploited Tool in Bioanalysis. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 2, p. 1259-65, 2016. ISSN 0003-2700.

GÓMEZ-RÍOS, G. A. et al. Rapid determination of immunosuppressive drug concentrations in whole blood by coated blade spray-tandem mass spectrometry (CBS-MS/MS). **Analytica Chimica Acta**, v. 999, p. 69-75, 2018. ISSN 0003-2670.

GONG, Y. et al. Simultaneous determination of endocannabinoids in murine plasma and brain substructures by surrogate-based LC-MS/MS: Application in tumor-bearing mice. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 111, p. 57-63, 2015. ISSN 0731-7085.

GOUVEIA-FIGUEIRA, S.; NORDING, M. L. Validation of a tandem mass spectrometry method using combined extraction of 37 oxylipins and 14 endocannabinoid-related compounds including prostamides from biological matrices. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 121, p. 110-121, 2015. ISSN 1098-8823.

GROTENHERMEN, F.; MÜLLER-VAHL, K. The therapeutic potential of cannabis and cannabinoids. **Deutsches Ärzteblatt International**, v. 109, n. 29-30, p. 495-501, 2012. ISSN 1866-0452.

HAUGH, O. et al. The emerging role of the cannabinoid receptor family in peripheral and neuro-immune interactions. **Current Drug Targets**, 2016. ISSN 1389-4501.

HUERTA-VIGA, A.; WOUTERSEN, S. Protein Denaturation with Guanidinium: A 2D-IR Study. **Journal of Physical Chemistry Letters**, v. 4, n. 20, p. 3397-401, 2013. ISSN 1948-7185.

IVANOV, I.; BORCHERT, P.; HINZ, B. A simple method for simultaneous determination of N-arachidonylethanolamine, N-oleylethanolamine, N-palmitoylethanolamine and 2-arachidonoylglycerol in human cells. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 6, p. 1781-7, 2015. ISSN 1618-2650.

JEAN-GILLES, L. et al. Plasma endocannabinoid levels in multiple sclerosis. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 287, n. 1, p. 212-215, 2009. ISSN 0022-510X.

JUNG, K.-M. et al. An amyloid β 42-dependent deficit in anandamide mobilization is associated with cognitive dysfunction in Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 33, n. 8, p. 1522-1532, 2012. ISSN 0197-4580.

KALANT, H. Effects of cannabis and cannabinoids in the human nervous system. In: (Ed.). **The Effects of Drug Abuse on the Human Nervous System**. Boston: Academic Press, 2014. p.387-422. ISBN 978-0-12-418679-8.

KANTAE, V. et al. Quantitative profiling of endocannabinoids and related N-acylethanolamines in human CSF using nano LC-MS/MS. **Journal of Lipid Research**, v. 58, n. 3, p. 615-624, 2017. ISSN 0022-2275.

KIRKWOOD, J. et al. Using isoelectric point to determine the pH for initial protein crystallization trials. **Bioinformatics**, v. 31, n. 9, p. 1444-51, 2015. ISSN 1367-4803.

KLUGER, B. et al. The therapeutic potential of cannabinoids for movement disorders. **Movement Disorders**, v. 30, n. 3, p. 313-327, 2015. ISSN 1531-8257.

KREBS, H. Chemical composition of blood plasma and serum. **Annual Review of Biochemistry**, v. 19, n. 1, p. 409-430, 1950. ISSN 0066-4154.

LEWEKE, F. et al. Cannabidiol enhances anandamide signaling and alleviates psychotic symptoms of schizophrenia. **Translational Psychiatry**, v. 2, n. 3, p. e94, 2012. ISSN 2158-3188.

LI, W. et al. The role of methanol addition to water samples in reducing analyte adsorption and matrix effects in liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1389, p. 76-84, 2015. ISSN 0021-9673.

LIPUT, D. J. et al. Quantification of anandamide, oleylethanolamide and palmitoylethanolamide in rodent brain tissue using high performance liquid chromatography-electrospray mass spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 4, n. 4, p. 234-241, 2014. ISSN 2095-1779.

LIU, C. et al. Fast quantitation of opioid isomers in human plasma by differential mobility spectrometry/mass spectrometry via SPME/open-port probe sampling interface. **Analytica Chimica Acta**, v. 991, p. 89-94, 2017. ISSN 0003-2670.

MANSEAU, M. W.; GOFF, D. C. Cannabinoids and Schizophrenia: Risks and Therapeutic Potential. **Neurotherapeutics**, v. 12, n. 4, p. 816-24, 2015. ISSN 1878-7479.

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. ISSN 1618-2642.

MILOVANOVIC, D. et al. Hydrophobic mismatch sorts SNARE proteins into distinct membrane domains. **Nature Communications**, v. 6, p. 5984-94, 2015.

MIRABELLI, M. F.; WOLF, J.-C.; ZENOBI, R. Direct Coupling of Solid-Phase Microextraction with Mass Spectrometry: Sub-pg/g Sensitivity Achieved Using a Dielectric Barrier Discharge Ionization Source. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 14, p. 7252-7258, 2016. ISSN 0003-2700.

OTTRIA, R. et al. Simultaneous ultra-high performance liquid chromatography-electrospray ionization-quadrupole-time of flight mass spectrometry quantification of endogenous anandamide and related N-acyl ethanolamides in bio-matrices. **Journal of Chromatography B**, v. 958, p. 83-89, 2014. ISSN 1570-0232.

PAWLISZYN, J. **Handbook of solid phase microextraction**. Elsevier, 2011. ISBN 0123914493.

PEZESHKI, A. et al. Adsorption of peptides at the sample drying step: Influence of solvent evaporation technique, vial material and solution additive. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, n. 3, p. 607-612, 2009. ISSN 0731-7085.

PIRI-MOGHADAM, H. et al. Fast Quantitation of Target Analytes in Small Volumes of Complex Samples by Matrix-Compatible Solid-Phase Microextraction Devices. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 128, n. 26, p. 7636-7640, 2016. ISSN 1521-3757.

PISANI, A. et al. High endogenous cannabinoid levels in the cerebrospinal fluid of untreated Parkinson's disease patients. **Annals of Neurology**, v. 57, n. 5, p. 777-779, 2005. ISSN 1531-8249.

POOLE, J. J. et al. Rapid and Concomitant Analysis of Pharmaceuticals in Treated Wastewater by Coated Blade Spray Mass Spectrometry. **Environmental Science & Technology**, v. 51, n. 21, p. 12566-12572, 2017. ISSN 0013-936X.

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. ISSN 0951-4198.

RATERINK, R.-J. et al. Gas Pressure Assisted Microliquid-Liquid Extraction Coupled Online to Direct Infusion Mass Spectrometry: A New Automated Screening Platform for Bioanalysis. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 20, p. 10323-10330, 2014. ISSN 0003-2700.

REN, Y. et al. Direct mass spectrometry analysis of biofluid samples using slug-flow microextraction nano-electrospray ionization. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 53, n. 51, p. 14124-7, 2014. ISSN 1433-7851.

REYES-GARCES, N. et al. Advances in Solid Phase Microextraction and Perspective on Future Directions. **Analytical Chemistry**, v. 90, n. 1, p. 302-360, 2018. ISSN 0003-2700.

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. ISSN 0009-3084.

SCHNEIDER, B. B. et al. Differential mobility spectrometry/mass spectrometry history, theory, design optimization, simulations, and applications. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 35, n. 6, p. 687-737, 2016. ISSN 1098-2787.

SILVA, E. A. S.; RISTICEVIC, S.; PAWLISZYN, J. Recent trends in SPME concerning sorbent materials, configurations and in vivo applications. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 43, p. 24-36, 2013. ISSN 0165-9936.

SOUZA-SILVA, É. A. et al. A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices III. Bioanalytical and clinical applications. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 249-264, 2015. ISSN 0165-9936.

SUN, X. B. et al. Coupling of single droplet micro-extraction with desorption electrospray ionization-mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 301, n. 1-3, p. 102-108, 2011. ISSN 1387-3806.

THOMAS, A. N. et al. Novel noninvasive identification of biomarkers by analytical profiling of chronic wounds using volatile organic compounds. **Wound Repair and Regeneration**, v. 18, n. 4, p. 391-400, 2010. ISSN 1067-1927.

TOGUNDE, O. P. et al. Determination of Pharmaceutical Residues in Fish Bile by Solid-Phase Microextraction Couple with Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC/MS/MS). **Environmental Science & Technology**, v. 46, n. 10, p. 5302-5309, 2012. ISSN 0013-936X.

TRUFELLI, H. et al. An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 30, n. 3, p. 491-509, 2011. ISSN 1098-2787.

VERT, M. et al. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). **Pure and Applied Chemistry**, v. 84, n. 2, p. 377-410, 2012. ISSN 1365-3075.

VOGESER, M.; SCHELLING, G. Pitfalls in measuring the endocannabinoid 2-arachidonoyl glycerol in biological samples. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 45, n. 8, p. 1023-5, 2007. ISSN 1434-6621.

WALLES, M. et al. Approaches for coupling solid-phase microextraction to nanospray. **Journal of Chromatography A**, v. 1067, n. 1, p. 197-205, 2005. ISSN 0021-9673.

WANG, X. et al. Just dip it: online coupling of "Dip-it" polymer monolith microextraction with plasma assisted laser desorption ionization mass spectrometry. **Chemical Communications**, v. 51, n. 22, p. 4615-4618, 2015. ISSN 1359-7345.

WARD, S. J.; TUMA, R. F. Endocannabinoids. In: (Ed.). **Encyclopedia of the Neurological Sciences (Second Edition)**. Oxford: Academic Press, 2014. p.42-47. ISBN 978-0-12-385158-1.

WARWOOD, S. et al. The effect of peptide adsorption on signal linearity and a simple approach to improve reliability of quantification. **Journal of Proteomics**, v. 85, p. 160-164, 2013. ISSN 1874-3919.

WU, Q.; WU, D.; GUAN, Y. In Vivo Fast Equilibrium Microextraction by Stable and Biocompatible Nanofiber Membrane Sandwiched in Microfluidic Device. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 23, p. 11524-11531, 2013. ISSN 0003-2700.

YANG, B.-C. et al. Quantification of monohydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons in human urine samples using solid-phase microextraction coupled with glass-capillary nanoelectrospray ionization mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 973, p. 68-74, 2017. ISSN 0003-2670.

ZHANG, C. S.; MANICKE, N. E. Development of a Paper Spray Mass Spectrometry Cartridge with Integrated Solid Phase Extraction for Bioanalysis. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 12, p. 6212-6219, 2015. ISSN 0003-2700.

ZHANG, Q. et al. Solid-phase microextraction technology for in vitro and in vivo metabolite analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 80, p. 57-65, 2016. ISSN 0165-9936.

ZHAO, Y. et al. Coupling a solid phase microextraction (SPME) probe with ambient MS for rapid enrichment and detection of phosphopeptides in biological samples. **Analyst**, v. 140, n. 8, p. 2599-2602, 2015. ISSN 0003-2654.

ZHENG, Y. et al. Development and Application of Zirconia Coated Paper Substrate for High Sensitivity Analysis of Therapeutic Drugs in Dried Blood Spots. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 14, p. 7005-7013, 2016. ISSN 0003-2700.

ZOERNER, A. A. et al. Simultaneous UPLC-MS/MS quantification of the endocannabinoids 2-arachidonoyl glycerol (2AG), 1-arachidonoyl glycerol (1AG), and anandamide in human plasma: minimization of matrix-effects, 2AG/1AG isomerization and degradation by toluene solvent extraction. **Journal of Chromatography B**, v. 883-884, p. 161-71, 2012. ISSN 1570-0232.

ZOERNER, A. A. et al. Quantification of endocannabinoids in biological systems by chromatography and mass spectrometry: a comprehensive review from an analytical and biological perspective. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1811, n. 11, p. 706-723, 2011. ISSN 1388-1981.