UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento de fases extratoras seletivas para técnicas de
microextração para a determinação de fármacos e endocanabinóide em
amostras de plasma por LC-MS/MS.**

Mônia Aparecida Lemos Pinto de Melo

Ribeirão Preto

2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento de fases extratoras seletivas para técnicas de
microextração para a determinação de fármacos e endocanabinóide em
amostras de plasma por LC-MS/MS.**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Toxicologia para
obtenção do Título de Doutora em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientada: Mônia Ap. Lemos Pinto de Melo

Orientadora: Maria Eugênia Queiroz Nassur

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia em 11/08/2017. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2017

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.

Melo, Mônia Aparecida Lemos Pinto de

Desenvolvimento de fases extratoras seletivas para técnicas de microextração para a determinação de fármacos e endocanabinóide em amostras de plasma por LC-MS/MS. Ribeirão Preto, 2017.

Colocar numero de paginas 127 p. : il. ; 30 cm.

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

Orientadora: Nassur, Maria Eugênia Queiroz.

1. Fármacos. 2. DPX. 3. Material de acesso restrito. 4. Endocanabinóides. 5. Polímero molecularmente impresso. 6. In-tube SPME. 7. LC-MS/MS.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Mônia Aparecida Lemos Pinto de Melo

Desenvolvimento de fases extratoras seletivas para técnicas de microextração para a determinação de fármacos e endocanabinóide em amostras de plasma por LC-MS/MS.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Toxicologia para
obtenção do Título de Doutora em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientadora: Maria Eugênia Queiroz Nassur

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Dedico este trabalho, aos meus pais,
Homero e Aparecida, e ao meu esposo
Diogo, pelo apoio e amor
incondicional, dispensados a mim.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus pelo Dom da Vida... Obrigada Senhor, por sempre guiar e proteger os meus passos. Por estar a frente de tudo em minha vida, me encorajando e me dando forças nos momentos mais difíceis.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas e a Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, pelo apoio institucional e instalações necessárias para a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Maria Eugênia Queiroz Nassur pela confiança depositada em mim durante estes quatro anos de convivência. Obrigada pela orientação, apoio, compreensão, amizade e dedicação.

Ao Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis, por nos disponibilizar as ponteiros DPX utilizadas no trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo incentivo financeiro que possibilitou a realização deste trabalho (processo nº 2013/03808-9).

Aos Amigos de laboratório: Camila, Caroline, Diego, Israel, Igor, Juciene, Jonas, Luiz Gabriel, Luís Felipe, Mércia, Tamires, Valéria e Vinícius, pelo companheirismo e amizade.

Ao meu colega de trabalho e amigo Israel Donizeti de Souza pelo imensurável apoio e contribuição neste trabalho.

À colega de laboratório e, hoje, amiga Camila Marchioni por toda a amizade e apoio em um dos momentos mais difíceis da minha vida.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto FCFRP-USP, em especial ao departamento de Toxicologia, por todos os serviços prestados.

*Aos meus pais, **Homero e Aparecida**, e ao meu irmão, **Cícero**, pelos valores que me tornaram a pessoa que sou e por acreditarem sempre em meu melhor.*

*Ao meu esposo **Diogo**, por todo o amor, dedicação, apoio e companheirismo em todos os momentos da minha vida.*

Por fim, a todos que de alguma forma colaboraram para que este trabalho fosse realizado, os meus mais sinceros agradecimentos.

RESUMO

DE MELO, M.A.L.P. **Desenvolvimento de fases extratoras seletivas para técnicas de microextração para a determinação de fármacos e endocanabinóide em amostras de plasma por LC-MS/MS.** 2017. 127f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Este trabalho descreve o desenvolvimento de seletivas fases extratoras para técnicas de microextração empregadas para a determinação de fármacos e endocanabinóide em amostras de plasma por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em *Tandem* (LC-MS/MS). O capítulo I descreve o desenvolvimento e aplicação da fase extratora de material de acesso restrito (RAM) para a extração em ponteiras descartáveis (DPX) de dezesseis fármacos psicotrópicos em amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos. Em virtude da complexidade de sintomas associados à esquizofrenia, a politerapia tem sido uma prática clínica cada vez mais comum. A maioria destes fármacos possui estreito índice terapêutico, o que requer acompanhamento adequado por meio de estudos de monitorização terapêutica. Tais estudos visam otimizar as doses terapêuticas, minimizar os efeitos adversos e avaliar a anuência do paciente ao regime de dosagens. O emprego da fase seletiva, RAM, permitiu a exclusão das macromoléculas, simultaneamente, a pré-concentração dos analitos de forma rápida e eficiente. A otimização das variáveis DPX favoreceu a sensibilidade e seletividade do método, empregando pequenos volumes de amostra biológica e de solvente orgânico. O método DPX/LC-MS/MS, desenvolvido e validado, apresentou linearidade adequada com limite inferior de quantificação na faixa de concentração de 0,5-20,0 ng mL⁻¹, precisão inter e intra-ensaio com coeficientes de variação inferiores a 15% e exatidão com valores de EPRs variando de -12% a 11%. O método proposto foi aplicado com êxito na determinação destes fármacos em amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos. As variações encontradas nas concentrações plasmáticas de alguns pacientes podem ser atribuídas a interações farmacocinéticas ou a variações inerentes ao paciente. No capítulo II, um polímero molecularmente impresso foi sintetizado *in situ*, no interior de um capilar de sílica fundida, para microextração em fase sólida no capilar (*in-tube* SPME) do endocanabinóide, anandamida (AEA), em amostras de plasma de pacientes com Doença de Parkinson (DP). A DP é caracterizada pela neurodegeneração dos neurônios dopaminérgicos. Estudos demonstram correlação entre os sistemas endocanabinóide e dopaminérgico, ligados ao controle motor. O processo de impressão molecular (não-covalente) do MIP, bem como os reagentes de síntese empregados, originaram sítios seletivos, complementares, em forma e tamanho à AEA. Micrografias eletrônicas de varredura (MEV) e espectros de infravermelho (FTIR) ilustraram as modificações físicas e químicas da superfície do capilar impresso e não impresso (NIP), após a polimerização. A otimização das variáveis *in-tube* SPME, favoreceu a eficiência das extrações. O método *in-tube* SPME/LC-MS/MS apresentou intervalo linear de 5 ng mL⁻¹ (LOQ) a 20 ng mL⁻¹; os ensaios de precisão apresentaram CV variando de 1,2 a 13% e exatidão com valores de EPRs variando de -3,6 a 7,5 %. Amostras de plasma de pacientes com DP foram analisadas pelo método de adição de padrão, e a concentração plasmática média de AEA de 0,2 ng mL⁻¹, está em concordância com os valores da literatura, demonstrando a aplicabilidade do método *in-tube* SPME/LC-MS/MS na área clínica.

Palavras-chave: Esquizofrenia; fármacos; microextração em ponteiras descartáveis; material de acesso restrito; monitorização terapêutica; doença de Parkinson; endocanabinóides; anandamida; polímero molecularmente impresso; microextração em fase sólida no capilar; cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em *Tandem*.

ABSTRACT

DE MELO, M.A.L.P. 2017. **Selective extractive phases for microextraction techniques for determination of drugs and an endocannabinoid in plasma samples by LC-MS/MS.** 127f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

This work describes the development of highly selective sorbents for use in microextraction techniques for determination of drugs and endocannabinoid in plasma samples by liquid chromatography coupled to *Tandem* mass spectrometry (LC-MS/MS). Chapter I describes the development and application of a restricted access material (RAM-BSA) for use as extractive phase in DPX technique ("Disposable pipette extraction") for determination of 16 psychotropic drugs in plasma samples obtained from schizophrenic patients. Polytherapy has been increasingly common in clinical practice associated with schizophrenia due the complexity of its symptoms. Most of these drugs have narrow therapeutic index, wherefore requires adequate follow-up through therapeutic monitoring studies. This monitoring aims to optimizing therapy, to minimize adverse effects and verify patient adherence to treatment. By using a selective phase, RAM, we were able to exclude the macromolecules and to pre-concentrate the analytes quickly and efficiently. Optimization of the DPX variables improved the sensitivity and selectivity of the method, which demanded only small volumes of sample and organic solvent. The DPX/LC-MS/MS method developed and validated presented adequate linearity; the lower limit of quantification ranged from 0.5 to 20.0 ng mL⁻¹. The inter- and intra-assay precision tests provided coefficients of variation (CV) lower than 15%; and the relative standard error (RSD) values, of the accuracy tests, varied from -12% to 11%. We successfully applied the proposed method to determine drugs in plasma samples from schizophrenic patients. Variations in the plasma concentrations of drugs in some patients may result from pharmacokinetic interactions or variations inherent in the patient. Chapter II details the "in situ" synthesis of a molecularly imprinted polymer within a fused silica capillary for capillary solid phase (*in-tube* SPME) of the endocannabinoid, anandamide (AEA), in plasma samples obtained from patients with Parkinson's Disease (PD), which is characterized by neurodegeneration of dopaminergic neurons. Studies have demonstrated a relationship between this endocannabinoid and dopaminergic systems, which are linked to motor control. The molecular imprinting process (non-covalent) and the synthesis reagents used to obtain the MIP gave rise to complementary, selective sites with the same shape and size as AEA. Scanning electron micrographs (SEM) and infrared spectra (FTIR) helped to illustrate the physical and chemical modification of the printed and non-printed capillary surface (NIP) after polymerization. Optimization of *in-tube* SPME variables favored the extraction process efficiency. The "in tube" SPME/LC-MS/MS method showed a linear range from 5 ng mL⁻¹ (LOQ) to 20 ng mL⁻¹. The precision tests presented CV that varied from 1.2 to 13%; and the RSD accuracy ranged from -3.6 to 7.5%. We analyzed plasma samples from patients with PD by the standard addition method. The mean plasmatic concentration was 0.2 ng mL⁻¹, in agreement with the literature. This result suggested that the "in tube" SPME/LC-MS/MS employing the MIP extractive phase is suitable to determine AEA in plasma samples.

Keywords: Schizophrenia; drugs; disposable pipette extraction; restricted access material; therapeutic monitoring; Parkinson's disease; endocannabinoids; anandamide; molecularly imprinted polymer; solid phase microextraction in the capillary; liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura I.1 - Estrutura química dos fármacos, comumente, utilizados no tratamento da esquizofrenia, empregados no trabalho.	12
Figura I.2 - Ilustração de uma Ponteira DPX.....	16
Figura I.3 - Etapas do processo por DPX.....	17
Figura I.4 - Material de acesso restrito, partículas hidrofóbicas revestidas com albumina sérica bovina.	20
Figura I.5 - Espectro de absorção do corante azul brilhante de Comassie e do complexo corante-proteína após eluição do plasma humano.	33
Figura I.6 - Porcentagem de proteínas excluídas pelos cartuchos RAM-C18-BSA em 5 min de eluição (Fase móvel: água).	34
Figura I.7 - Influência do pH da amostra na pré-concentração dos fármacos na fase RAM-BSA em 500 µL tampão fosfato 0,05 M enriquecidos com os fármacos na concentração de 100 ng.mL ⁻¹ . Tempo de equilíbrio de 1 min e eluição em metanol. Análise por DPX-LC-MS/MS.	36
Figura I.8 - Influência do tempo de equilíbrio (1, 2 e 4 min) entre soluto e fase extratora RAM-BSA na pré-concentração dos fármacos, em plasma (200 µL) enriquecido com fármacos na concentração de 125 ng.mL ⁻¹ e diluídos em 200 µL de tampão fosfato 0,05 M (pH=8,0). Eluição em metanol. Análise por DPX-LC-MS/MS.	37
Figura I.9 - Otimização do processo de dessorção dos fármacos a partir da fase RAM-BSA, para amostras de plasma enriquecidas com os fármacos (125 ng.mL ⁻¹) diluídas em tampão fosfato 0,05 M (pH=8,0), 4 min de equilíbrio e metanol como solvente de eluição. Análise por DPX-LC-MS/MS.....	38
Figura I.10 - Otimização do volume de amostras de plasma enriquecidas com os fármacos (125 ng.mL ⁻¹) e diluídas em tampão fosfato 0,05 M (pH=8,0), 4 min de equilíbrio, lavagem com água pura e metanol como solvente de eluição. Fase extratora RAM-BSA. Análise por DPX-LC-MS/MS.....	39

Figura I.11 - Otimização da solução de lavagem para amostra de 200 μL de plasma enriquecida com os fármacos (125 ng.mL^{-1}), diluídas em tampão fosfato 0,05 M (pH=8,0), 4 min de equilíbrio e metanol como solvente de eluição. Fase extratora RAM-BSA. Análise por DPX-LC-MS/MS.....	40
Figura I.12 - Cromatogramas SRM obtidos pelo método DPX/LC–MS/MS referentes às amostras de plasma branco de referência enriquecidas com os fármacos nas concentrações correspondentes ao LOQ. Os cromatogramas sobrepostos correspondem às amostras de plasma branco de referência.	46
Figura I.13 – Estrutura química da anandamida	58
Figura II.14 - Sistema de extração SPME-LC “no capilar”.....	62
Figura II.15 - Esquema de um sistema in-tube SPME “off-line”.	63
Figura II.16 - Esquema geral de síntese dos MIPs.....	64
Figura II.17 - Estrutura dos principais monômeros funcionais.....	68
Figura II.18 – Estrutura química do etilenoglicol dimetacrilato.	69
Figura II.19 - Estrutura química do iniciador radicalar AIBN.....	70
Figura II.20 - Fragmentação da molécula de AEA.	75
Figura II.21 - Esquema de síntese do capilar MIP: (21a) Funcionalização no interior do capilar e (21b) Polimerização.	76
Figura II.22 - Otimização da razão molar template: monômero funcional: 200 μL de solução tampão acetato de amônio 5mM (pH=9), enriquecido com padrão de AEA (100 ng mL^{-1}); dessorção com 4 x 50 μL de ACN.....	77
Figura II.23 - Estruturas químicas de AEA (a) e N - araquidoil etanolamina (b).....	78
Figura II.24 - Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura dos capilares de sílica fundida (a) MIP, (b) NIP e (c) capilar branco (EHT = 20.00 K V e Mag = 10.00 K X)	79
Figura II.25 - Espectros FTIR para MIP e NIP.....	80
Figura II.26 - Influência do pH da amostra na pré-concentração de AEA pela fase MIP, em 200 μL de tampão acetato 5 mM, enriquecidos com padrão na concentração de 100 ng.mL^{-1}	82

Figura II.27 - Influência na sorção de AEA, empregando tampão acetato de amônio adicionado de acetonitrila na reconstituição do extrato seco. Amostra de plasma (200 μL), enriquecida com padrão de AEA na concentração de 100 ng.mL^{-1} . Dessorção: 4 x 50 μL de ACN.....	83
Figura II.28 - Otimização da etapa de remoção dos compostos endógenos a partir da fase MIP: (a) solução de lavagem e em (b) volume de solução. Amostra de plasma (200 μL), enriquecida com padrão de AEA na concentração de 100 ng.mL^{-1} . Dessorção: 4 x 50 μL de ACN.....	84
Figura II.29 - Otimização da etapa de dessorção, de AEA, em acetonitrila. Amostra de plasma (200 μL), enriquecida com padrão de AEA na concentração de 100 ng.mL^{-1}	85
Figura II.30 - Avaliação da capacidade de sorção, para AEA, dos capilares MIP e NIP após otimização das variáveis envolvidas no processo de extração por “in-tube” SPME.....	86
Figura II.31 - Cromatogramas das análises in-tube SPME/LC-MS/MS obtidos após extração de anandamida em amostras de plasma branco enriquecidas na concentração de 100 ng mL^{-1} , nas condições otimizadas de extração. (Azul) – MIP e (Preto) – NIP.	87
Figura II.32 - Cromatogramas das amostras de plasma enriquecido com padrão de AEA e AEA-d4 no LOQ e de plasma branco de referência (sobrescrito) empregando o método “in-tube” SPME/LC-MS/MS otimizado.....	89
Figura II.33 - Avaliação da seletividade do capilar MIP, para anandamida, em amostras de plasma enriquecidas com AEA e fármacos antidepressivos, anticonvulsivantes e antipsicóticos (100 ng mL^{-1}).....	90
Figura II.34 – Cromatogramas das amostras de plasma analisadas.....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela I.1 - Métodos de LC-MS/MS para determinação de fármacos em fluidos biológicos.	10
Tabela I.2 - Aplicações da técnica DPX para a análise de fármacos em fluidos biológicos ..	14
Tabela I.3 - Transições MS/MS (SRM), energia do cone (DP) e energia de colisão (CE) para cada um dos fármacos estudados.....	26
Tabela I.4 - Valores de <i>pka</i> dos Fármacos analisados.....	35
Tabela I.5 - Equações de regressão linear, coeficientes de correlação e padrões internos selecionados.....	41
Tabela I.6 - Exatidão e precisão inter e intraensaio para amostras de plasma enriquecidas com diferentes concentrações de analitos, LOQ, CQB, CQM, CQA e LSQ (n = 5).	42
Tabela I.7 - Avaliação do efeito de matriz para as amostras de controle de qualidade baixo (QCB) e alto (QCA) ; n = 5.	45
Tabela I.8 - Comparação do método DPX/LC–MS/MS com outros métodos que empregam fases RAM para determinação de psicotrópicos em amostras biológicas.	49
Tabela I.9 - Concentrações plasmáticas dos fármacos determinados (DPX-LC-MS/MS) em pacientes esquizofrênicos para fins de monitorização terapêutica (n = 3).	50
Tabela I.10 - Concentrações plasmáticas de fármacos determinados (PPT-LC-MS/MS) em pacientes esquizofrênicos.	51
Tabela II.11 - Determinação de endocanabinóides em amostras de plasma.	60
Tabela II.12 - Transições MS/MS, energia do cone (DP) e energia de colisão (CE) para o endocanabinóide anandamida.....	75
Tabela II.13 - Validação analítica para amostras de plasma enriquecidas com diferentes concentrações de analito - LOQ, CQB, CQM, CQA e LSQ (n = 5).	88
Tabela II.14 - Curva de calibração pelo método de adição de padrão e concentração de AEA encontrada nas amostras de plasma analisadas (n=5).....	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-AG	2-araquidonoil glicerol
ADS	Sílica alquil-diol
AEA	Etanolamina araquidonoil/Anandamida
AGP	Alpha-glicoproteína ácida
AIBN	2,2-azobisisobutironitrilo
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APG	Antipsicóticos de primeira geração ou típicos
ASG	Antipsicóticos de segunda geração ou atípicos
BSA	Albumina sérica bovina
C18	Sílica funcionalizada com grupos octadesilsilano
C8	Sílica funcionalizada com grupos octasilano
CB1/CB2	Receptores canabinóides
CE	Energia do cone
CQA	Controle de qualidade alto
CQB	Controle de qualidade baixo
CQM	Controle de qualidade médio
CV	Coefficiente de variação
D1/D2	Receptores dopaminérgicos (dopamina)
DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva
DP	Voltagem do capilar
DP	Doença de Parkinson
DPX	Microextração em ponteira descartável
EGDMA	Dimetacrilato de etilenoglicol
EPR	Erro padrão relativo
ESI	Ionização eletrospray
FMN	Fator de matriz normalizado
FTIR	Infravermelho com transformada de Fourier
GABA	Ácido gama-aminobutírico
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HSA	Albumina sérica humana
IF	Fator de impressão molecular
<i>in-tube</i> SPME	Microextração em fase sólida no capilar

ISRS	Inibidor seletivo da recaptação de serotonina
LC	Cromatografia Líquida
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em <i>tandem</i>
LIQ	Limite Inferior de Quantificação
LLE	Extração Líquido-líquido
LSQ	Limite superior de quantificação
MAA	Ácido metacrílico
MEPS	Microextração em sorvente empacotado
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MIP	Polímero molecularmente impresso
NIP	Polímero não impresso
PI	Padrão Interno
PPT	Precipitação de proteínas
R	Coefficiente de correlação
RAM	Material de acesso restrito
RPM	Rotação por minuto
SPE	Extração em fase sólida
SEM	Modo de monitoramento de reações selecionadas
TDM	Monitorização terapêutica de fármacos
UPLC	Cromatografia líquida de ultra eficiência
CG	Cromatografia gasosa
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vii
SUMÁRIO.....	ix
1 INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO I	4
I.1 INTRODUÇÃO	4
I.1.1 Esquizofrenia.....	4
I.1.2 Tratamento farmacológico da esquizofrenia e monitorização terapêutica	6
<i>I.1.2.1 Antipsicóticos</i>	<i>6</i>
<i>I.1.2.2 Antidepressivos</i>	<i>8</i>
<i>I.1.2.3 Ansiolíticos.....</i>	<i>8</i>
<i>I.1.2.4 Anticonvulsivantes.....</i>	<i>8</i>
I.1.3 Extração em ponteira descartável - “Disposable pipette extraction” (DPX)	13
<i>I.1.3.1 Ponteiras DPX</i>	<i>15</i>
<i>I.1.3.2 Etapas do processo de DPX.....</i>	<i>17</i>
I.1.4 Material de Acesso Restrito – “Restricted access material” (RAM).....	18
<i>I.1.4.1 Fases RAM com proteína imobilizada</i>	<i>19</i>
I.2 OBJETIVOS.....	21
I.2.1 Objetivos específicos	21
I.3 MATERIAIS E MÉTODOS	22
I.3.1 Padrões Analíticos, Reagentes e Materiais.	22

I.3.2 Amostras de Plasma.....	22
I.3.3 Soluções Estoque e Padrões de Calibração.....	22
I.3.4 Preparo das ponteiros DPX com a fase C₁₈-BSA	23
I.3.5 Avaliação da exclusão das proteínas do plasma pelos cartuchos SPE (C₁₈-BSA).....	23
<i>I.3.5.1 Preparo do reagente de Bradford</i>	<i>23</i>
<i>I.3.5.2 Avaliação da exclusão das proteínas do plasma</i>	<i>24</i>
<i>I.3.5.3 Medidas espectrofotométricas.....</i>	<i>24</i>
I.3.6 Condições cromatográficas e espectrométricas.....	25
I.3.7 Otimização dos parâmetros DPX	27
<i>I.3.7.1 Otimização do pH da amostra</i>	<i>27</i>
<i>I.3.7.2 Otimização do tempo de equilíbrio de sorção</i>	<i>28</i>
<i>I.3.7.3 Otimização do processo de dessorção</i>	<i>28</i>
<i>I.3.7.4 Otimização da solução de lavagem.....</i>	<i>28</i>
<i>I.3.7.5 Otimização do volume de amostra</i>	<i>29</i>
I.3.8 Validação Analítica	29
I.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
I.4.1 Avaliação da exclusão das proteínas do plasma humano.....	32
I.4.2 Otimização dos parâmetros da técnica de extração por DPX	34
<i>I.4.2.1 Otimização do pH da amostra</i>	<i>34</i>
<i>I.4.2.2 Otimização do tempo de equilíbrio sorção</i>	<i>36</i>
<i>I.4.2.3 Otimização do processo de dessorção</i>	<i>37</i>
<i>I.4.2.4 Otimização do volume de amostra</i>	<i>39</i>
<i>I.4.2.5 Otimização da solução de lavagem.....</i>	<i>39</i>
I.4.3 Validação Analítica	41
<i>I.4.3.1 Linearidade</i>	<i>41</i>
<i>I.4.3.2 Exatidão e Precisão</i>	<i>42</i>

<i>I.4.3.3 Efeito Residual</i>	44
<i>I.4.3.4 Efeito de Matriz</i>	45
<i>I.4.3.5 Seletividade</i>	46
I.4.4 Comparação do método DPX/LC-MS/MS com outros métodos da literatura	48
I.4.5 Determinação dos fármacos em amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos por DPX-LC-MS/MS	50
CAPÍTULO II	56
II.1 INTRODUÇÃO	56
II.1.1 A Doença de Parkinson	56
II.1.2 Sistema endocanabinoide e a Doença de Parkinson	57
II.1.3 Microextração em fase sólida no capilar (<i>in-tube</i> SPME)	61
II.1.4 Polímeros Molecularmente Impressos	63
<i>II.1.4.1 Template – molécula molde</i>	67
<i>II.1.4.2 Monômero funcional</i>	67
<i>II.1.4.3 Agente reticulante</i>	68
<i>II.1.4.4 Solvente porogênico</i>	69
<i>II.1.4.5 Iniciador</i>	69
II.2 OBJETIVOS	71
II.2.1 Objetivos específicos	71
II.3 MATERIAIS E MÉTODOS	72
II.3.1 Padrões Analíticos, Reagentes e Materiais	72
II.3.2 Soluções estoque e Padrões de Calibração	72
II.3.3 Síntese do Polímero Molecularmente Impresso	72
II.3.4 Caracterização morfológica dos polímeros sintetizados	73
II.3.5 Pré-tratamento das amostras de plasma – Precipitação de proteínas	74
II.3.6 Condições LC-MS/MS	74

II.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
II.4.1 Síntese do polímero molecularmente impresso.....	76
II.4.2 Remoção da molécula molde do MIP	79
II.4.3 Caracterização morfológica dos polímeros	79
II.4.4 Otimização dos parâmetros in-tube SPME.....	81
<i>II.4.4.1 pH da amostra</i>	<i>81</i>
<i>II.4.4.2 Solução de sorção.....</i>	<i>82</i>
<i>II.4.4.3 Solução de lavagem</i>	<i>83</i>
<i>II.4.4.4 Volume e ciclos de dessorção</i>	<i>84</i>
II.4.5 Desempenho analítico do MIP.....	86
II.4.6 Validação Analítica do método in-tube SPME/LC-MS/MS	87
II.4.7 Seletividade do MIP	89
II.4.8 Avaliação da reprodutibilidade do procedimento de síntese do capilar MIP.....	90
II.4.9 Análise das amostras de plasma de pacientes com Doença de Parkinson.....	91
5 CONCLUSÃO.....	93
REFERÊNCIAS ¹	95
ANEXO.....	108

1 INTRODUÇÃO GERAL

A química analítica, nos últimos anos, tem testemunhado grandes avanços tecnológicos tanto em metodologia quanto em instrumentação. Além da seletividade e sensibilidade melhoradas, a instrumentação analítica moderna fornece grandes vantagens, de forma rápida e econômica, ao desenvolvimento e a validação de métodos bioanalíticos. Dentre as técnicas modernas de análise, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em *Tandem* (*LC-MS/MS*), com ionização *electrospray* (*ESI*), tem sido considerada referência para a análise de fármacos e neurotransmissores em amostras biológicas, conferindo especificidade, sensibilidade e agilidade ao método (KOLE et al., 2011). A alta detectabilidade dos equipamentos *LC-MS/MS*, sobretudo quando operados no modo de monitoramento de reações selecionadas (SRM), nos equipamentos do tipo triplo quadrupolo, permite a detecção de compostos presentes em concentrações extremamente baixas. Dessa forma, considerando seu custo-benefício, este tipo de equipamento constitui-se em uma das primeiras escolhas na análise quantitativa de fármacos, em amostras biológicas, para fins de monitorização terapêutica (TDM), estudo farmacocinético, análises forenses e toxicológicas.

No entanto, ainda que mais seletiva e sensível, a técnica de *LC-MS/MS* também sofre limitações quanto ao efeito da matriz. Uma vez que os fluidos biológicos, em sua maioria, são constituídos de proteínas, sais, ácidos, bases e compostos orgânicos com propriedades semelhantes aos analitos, estes não podem ser introduzidos em seu estado “in natura” em sistemas de *LC-MS/MS*. A presença destes interferentes, principalmente as proteínas, pode suprimir a ionização dos analitos durante o processo de ionização à pressão atmosférica (API) (análises *LC-MS*), coeluir com os analitos durante a separação cromatográfica ou adsorver de forma irreversível junto à coluna analítica, diminuindo o tempo de vida útil da mesma e modificando a retenção dos analitos (NOVÁKOVÁ; VLCKOVÁ, 2009a). Portanto, a etapa de preparo de amostras é parte integrante do método bioanalítico, sendo requerida para o desenvolvimento de métodos cromatográficos. Esta etapa tem como finalidade, eliminar os interferentes presentes na matriz, além de isolar e pré-concentrar os analitos de interesse, quase sempre presentes em nível de traços (KATAOKA, 2003). Por se tratar de um processo laborioso e mais propenso a erros de metodologia, a escolha de um método adequado no preparo da amostra é extremamente importante para garantir maior confiabilidade e precisão à análise (KATAOKA, 2003).

Convencionalmente, as técnicas de preparo de amostra utilizando precipitação de proteínas (“protein precipitation”- PPT), extração líquido-líquido (“liquid-liquid extraction” - LLE) e extração em fase sólida (“solid-phase” extraction SPE) são as mais utilizadas em bioanálise (CHAVES et al., 2015; KOLE et al., 2011; NOVÁKOVÁ; VLCKOVÁ, 2009a). Todavia, quando se trata de matrizes complexas, tais como amostras biológicas e ambientais, os métodos de preparo de amostras convencionais não podem satisfazer todos os requisitos analíticos, impulsionando o desenvolvimento de novas técnicas (FAN et al., 2005). A química analítica moderna tem sido direcionada para a simplificação através da hifenação de técnicas, automação, miniaturização dos sistemas analíticos, minimização do consumo de solvente orgânico e do volume da amostra, e utilização de tecnologias ambientalmente corretas em direção ao cuidado preventivo do meio ambiente. Neste contexto, podemos destacar, dentre outras, as técnicas de microextração em ponteira descartável (“Disposable pipette extraction” - DPX) e a microextração em fase sólida no capilar (“in-tube” SPME), as quais empregam menores volumes de amostra biológica e de solventes orgânicos, além de integrarem a extração e pré-concentração do soluto em uma única etapa, reduzindo a perda do soluto e o tempo da análise. Aliada as vantagens destas técnicas, novas fases extratoras vêm sendo desenvolvidas, como as fases de material de acesso restrito (RAM) e os polímeros molecularmente impressos (MIPs), conferindo maior seletividade ao processo de extração.

Portanto, esta tese, descreve o desenvolvimento de novos métodos cromatográficos empregando fases extratoras seletivas em conjunto com técnicas de microextração para a análise de 16 fármacos (antipsicóticos, antidepressivos, ansiolíticos e anticonvulsivantes) e de anandamida em amostras de plasma.

A fim de facilitar a compreensão da metodologia adotada, este documento foi dividido em dois capítulos, tendo sido estes organizados em introdução, objetivo geral e objetivos específicos, materiais e métodos, resultados e discussões e conclusão.

Capítulo I: Desenvolvimento de fase extratora de material de acesso restrito para extração de fármacos, em amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos, por DPX e análise por LC-MS/MS para fins de monitorização terapêutica.

Capítulo II: Desenvolvimento da fase extratora molecularmente impressa para extração de anandamida, em amostra de plasma de pacientes com doença de Parkinson, por in-tube SPME e análise por LC-MS/MS.

Capítulo I

Desenvolvimento de fase extratora de material de acesso restrito para extração de fármacos, em amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos, por DPX e análise por LC-MS/MS para fins de monitorização terapêutica.

CAPÍTULO I

I.1 INTRODUÇÃO

I.1.1 Esquizofrenia

A esquizofrenia é caracterizada por uma condição médica crônica, potencialmente incapacitante, que acomete em torno de 1% de toda a população mundial (SCHUITZ; ANDREASEN, 1999). Considerando-se a heterogeneidade e gravidade de suas manifestações clínicas, a complexidade do tratamento e, sobretudo, o impacto causado às famílias, à sociedade e ao próprio paciente, a esquizofrenia pode ser vista como um dos principais transtornos psiquiátricos da atualidade.

O conceito histórico do que, hoje, conhecemos como esquizofrenia data do início do século XIX, a partir das observações clínicas de EMIL KRAEPELIN, sob o nome de "demência precoce". No entanto, foi através dos trabalhos do suíço BLEULER, em 1911, que o termo "esquizofrenia" se estabeleceu e passou a ser, efetivamente, considerado (MOSKOWITZ; HEIM, 2011). Etimologicamente, o termo esquizofrenia significa "mente dividida" ou "dissociada", visto que nesta doença os pensamentos e os sentimentos dos indivíduos doentes não se relacionam entre si de uma maneira lógica e harmoniosa.

Apesar de a esquizofrenia poder surgir de forma abrupta, o quadro mais frequente se inicia de maneira insidiosa, mais comumente, no final da adolescência e início da vida adulta (ANDREASEN, 1995; GOFF; HECKERS; FREUDENREICH, 2001). Os homens são, ligeiramente, mais afetados e manifestam a doença mais precocemente. As mulheres, além de manifestarem a doença mais tardiamente, apresentam uma evolução mais benigna, incluindo menos admissões hospitalares e melhor adaptação social (MUESER; MCGURK, 2004a).

Perda de energia e iniciativa, humor depressivo, isolamento, comportamento inadequado, negligência com a aparência pessoal e higiene, podem surgir e permanecer por algumas semanas ou até meses antes do aparecimento de sintomas mais característicos da doença. Portanto, o que se costuma chamar de esquizofrenia é, na realidade, uma síndrome; ou seja, um conjunto de sinais e sintomas heterogêneos observáveis que são agrupados, conforme suas manifestações clínicas, a fim de caracterizar a doença e melhorar a confiabilidade do diagnóstico.

Na abordagem proposta por CROW (1980), os sintomas foram subdivididos em "positivos" e "negativos" (ADDINGTON; ADDINGTON, 1991). Os sintomas positivos caracterizam-se por alucinações, delírios, alterações na fala e comportamentos bizarros. Estes sintomas parecem estar associados à hiperatividade dopaminérgica, portanto, são percebidos mais facilmente e respondem melhor ao tratamento (MORRISSETTE; STAHL, 2012; TANDON; NASRALLAH; KESHAVAN, 2010). Os sintomas negativos incluem embotamento afetivo, deficiência intelectual e de memória, anedonia (perda da capacidade de sentir prazer), isolamento social e falta de motivação. Trata-se de sintomas mais difíceis de serem diagnosticados, podendo, muitas vezes, serem confundidos com outras doenças funcionais do cérebro (MORRISSETTE; STAHL, 2012). Estes sintomas podem estar presentes durante todo o curso da doença, contudo, tornam-se mais evidentes em doentes crônicos, cujo tratamento instituído aliviou, principalmente, os sintomas positivos.

Segundo Crow, embora estes dois conjuntos de sintomas reflitam diferentes processos patológicos, eles não constituem doenças separadas. Estes sintomas, geralmente, ocorrem juntos, seja de forma simultânea ou não (ADDINGTON; ADDINGTON, 1991). Suas vítimas, muitas vezes, sentem como se tivessem perdido sua identidade e capacidade mental, sendo o suicídio uma das principais causas de morte entre esses indivíduos (ANDREASEN, 1995; SALOKANGAS et al., 2002).

Embora a esquizofrenia, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), seja a terceira causa de perda da qualidade de vida entre 15 e 44 anos de idade, a identificação da sua etiologia ainda tem sido uma das principais preocupações da psiquiatria (HARRISON, 2005). Há um consenso em atribuir à desorganização da personalidade, verificada na esquizofrenia, a uma complexa interação de variáveis sociais, psicológicas e biológicas. No entanto, a chamada “hipótese dopaminérgica”, caracterizada por alterações bioquímicas dos neurotransmissores da dopamina, tem sido a teoria mais estudada para explicar os sintomas associados a essa doença (HOWES; KAPUR, 2009; STONE; MORRISON; PILOWSKY, 2007; TSOI; HUNTER; WOODRUFF, 2008).

Apesar de a esquizofrenia ser vista como uma doença “sem cura”, o controle efetivo dos sintomas é essencial para melhorar a qualidade de vida do paciente. As estratégias e formas de tratamento variam de acordo com o curso e grau da doença. O tratamento que melhor oferece resultados baseia-se no uso de fármacos psicotrópicos associados a intervenções psicossociais,

levando em consideração, sobretudo, os aspectos individuais do paciente, tais como perfil psicológico, social, familiar e econômico (KANE; MCGLASHAN, 1995; RÖSSLER et al., 2005).

I.1.2 Tratamento farmacológico da esquizofrenia e monitorização terapêutica

Identificar a melhor terapêutica para indivíduos diagnosticados com esquizofrenia continua sendo um desafio para a psiquiatria. Até o início dos anos cinquenta, os recursos de que se dispunha para tratar os doentes com distúrbios psiquiátricos graves eram muito limitados. Contudo, a partir de 1952, com o advento da clorpromazina, os antipsicóticos passaram a ser o alicerce do tratamento da esquizofrenia, reduzindo consideravelmente a morbidade e diminuindo a frequência e gravidade dos episódios psicóticos (SILVA, 2006). A terapêutica medicamentosa é fundamental no tratamento, porém os prejuízos acarretados por ela podem ser tão intensos quanto os sintomas da própria doença (VEDANA et al., 2013). Os pacientes com esquizofrenia grave, em sua maioria, não conseguem acompanhar o tratamento ambulatorial o que resulta na não adesão à medicação e, conseqüentemente, em recidivas frequentes (MUESER; MCGURK, 2004b). Dessa forma, tendo em vista as limitações dos agentes antipsicóticos em tratar alguns sintomas da doença e os efeitos adversos provenientes da própria terapêutica, a politerapia tem se tornado uma prática clínica cada vez mais comum. Dentre as classes de fármacos prescritos no tratamento da esquizofrenia, em associação aos antipsicóticos, estão os anticonvulsivantes, antidepressivos e ansiolíticos (TANDON; NASRALLAH; KESHAVAN, 2010).

I.1.2.1 Antipsicóticos

A introdução da clorpromazina na prática clínica, na década de 50, marcou o início do tratamento moderno da esquizofrenia (KANE; MCGLASHAN, 1995). Sua descoberta trouxe grandes benefícios aos pacientes, possibilitando o tratamento em regime ambulatorial e a redução da permanência hospitalar (GOLDSTEIN; HENDERSON, 2000). Tendo em vista que este foi o primeiro fármaco capaz de reduzir drasticamente os sintomas psicóticos ocasionados pela doença, a clorpromazina permaneceu como sendo o agente antipsicótico mais prescrito ao longo dos anos 60 e início dos anos 70. Seu incrível sucesso clínico estimulou uma ampla busca por outros compostos com propriedades farmacológicas

semelhantes, ainda que com estruturas químicas diferentes. A esta primeira geração de antipsicóticos (clorpromazina, haloperidol e perfenazina) deu-se o nome de antipsicóticos de primeira geração (APG) ou típicos.

Os APG são caracterizados pelo forte bloqueio dos receptores D2 da dopamina sendo, fundamentalmente, efetivos no tratamento dos sintomas positivos (alucinações e delírios) em 60-70% dos pacientes, porém, minimamente, eficazes sobre os sintomas negativos da doença (TANDON; NASRALLAH; KESHAVAN, 2010). Por meio do bloqueio dos receptores dopaminérgicos, os APG, podem levar ao aparecimento de efeitos adversos, especialmente os denominados sintomas extrapiramidais, que incluem efeitos colaterais motores como a síndrome de Parkinson (GOLDSTEIN; HENDERSON, 2000). Além, o bloqueio D2 leva ao aumento dos níveis de prolactina e da disfunção sexual associada.

Com a introdução da clozapina no mercado, um novo passo foi dado para o avanço no tratamento da esquizofrenia. Surge o primeiro fármaco com eficácia antipsicótica e risco, qualitativamente, menor de parkinsonismo induzido, distonia e discinesia tardia. Com o surgimento da clozapina, a comunidade científica se convence de que era possível separar os efeitos terapêuticos dos APG dos seus efeitos extrapiramidais (KANE; CORRELL, 2010), dando origem a uma segunda geração de antipsicóticos (risperidona, olanzapina, quetiapina, ziprasidona e mais recentemente o aripiprazol), denominados de “segunda geração ou atípicos” - ASG (GOLDSTEIN; HENDERSON, 2000).

A clozapina representa até hoje o maior avanço no tratamento das psicoses desde a clorpromazina (GOLDSTEIN; HENDERSON, 2000). No entanto, apesar de continuar sendo o principal tratamento para a esquizofrenia seu uso é restrito, principalmente, aos pacientes refratários. Sua utilização requer estrita vigilância hematológica, uma vez que seu uso implica no surgimento de agranulocitose (diminuição ou ausência de leucócitos) em 1% dos pacientes tratados (FRANGO; KINGTON, 2004).

Infelizmente, apesar do grande arsenal de fármacos antipsicóticos disponíveis, estes não fazem mais que atenuar a intensidade das manifestações psicóticas, sendo incapazes de curar o paciente. A maioria dos pacientes melhora com a medicação, no entanto, continuam lutando com déficits de atenção, concentração, memória de curto prazo, motivação, planejamento e tomada de decisão, sensação de prazer, capacidade empática e comportamento.

I.1.2.2 Antidepressivos

Sabe-se que em torno de 80% dos pacientes com esquizofrenia apresentam sintomas depressivos. A depressão na esquizofrenia é conhecida como “depressão pós-esquizofrênica”, por ocorrer com maior frequência após a fase aguda de psicose, podendo ser, muitas vezes, confundida com os sintomas negativos da doença. Além das relações temporais aparentes entre episódios psicóticos e depressivos, a depressão também pode ocorrer como efeito adverso ao tratamento antipsicótico (particularmente os antipsicóticos de primeira geração). E, apesar de não existirem recomendações consistentes quanto ao melhor tipo de tratamento, os antidepressivos são, frequentemente, empregados, em conjunto com os antipsicóticos, em 43% dos pacientes com esquizofrenia (MORRISSETTE; STAHL, 2012).

Dentre os antidepressivos mais utilizados estão os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS), tais como a fluoxetina, paroxetina, sertralina e citalopram. Estes fármacos atuam inibindo a recaptação pré-sináptica da serotonina, aumentando a disponibilidade deste neurotransmissor e, por consequência, seu nível no organismo.

I.1.2.3 Ansiolíticos

Os estados de ansiedade e os distúrbios do sono estão presentes na maioria dos transtornos psiquiátricos. Estima-se que em torno de 14% a 79% dos pacientes, com esquizofrenia, fazem uso de algum tipo de ansiolítico em associação ao tratamento antipsicótico. Dentre as classes mais utilizadas, os benzodiazepínicos (diazepam e clonazepam) estão entre os mais efetivos no tratamento da ansiedade, distúrbios do sono e efeitos secundários provenientes da terapia antipsicótica (FONTANELLA; CAMPO, 2014). Em longo prazo, o uso de ansiolíticos por pacientes esquizofrênicos, isoladamente ou em combinação com antipsicóticos, envolve um balanço adequado entre os riscos e benefícios, haja vista os seus efeitos colaterais e seu alto potencial de abuso e dependência (TEREZA et al., 2010). Portanto, dada a eficácia e segurança não comprovadas, a cautela na prescrição destes fármacos é requerida pelos profissionais da saúde.

I.1.2.4 Anticonvulsivantes

Os fármacos anticonvulsivantes, também conhecidos como “estabilizadores de humor”, são utilizados para tratar uma variedade de distúrbios não epiléticos, incluindo condições

neurológicas e psiquiátricas, tais como a esquizofrenia. Uma vez que, em torno de 30% dos pacientes esquizofrênicos não respondem ao tratamento antipsicótico, a combinação destes fármacos com anticonvulsivantes representa uma possível opção de tratamento, especialmente, no controle do comportamento hostil e violento apresentado por parte destes indivíduos. A melhoria destes sintomas está associada ao neurotransmissor inibitório GABA e ao glutamato (aminoácido excitatório) (HOSÁK; LIBIGER, 2002). Como exemplo, podemos citar o ácido valpróico, a carbamazepina e a lamotrigina, que são os principais anticonvulsivantes empregados no tratamento da esquizofrenia, visando potencializar o efeito dos antipsicóticos (BALLON; STROUP, 2013).

Como visto, a farmacoterapia representa a principal forma de tratamento para a esquizofrenia. No entanto, encontrar a terapia correta é uma tarefa difícil que requer, na maioria, o emprego de sistemas terapêuticos que dificultam à adesão do paciente ao tratamento. Portanto, a intervenção clínica é extremamente importante para monitorar os fatores de risco, principalmente, metabólicos e neurológicos, provenientes dos efeitos adversos da própria terapia ou do uso de outras substâncias. A essa prática clínica dá-se o nome de monitorização terapêutica de fármacos (TDM, da sigla em inglês). A TDM é geralmente definida como a medida laboratorial clínica de um parâmetro químico que, com interpretação médica adequada, influenciará diretamente na prescrição de um fármaco (KANG; LEE, 2009). Ela é usada para monitorar, especialmente, fármacos com intervalos terapêuticos estreitos, fármacos com variabilidade farmacocinética acentuada, medicamentos para os quais as concentrações alvo são difíceis de serem monitoradas e fármacos conhecidos por causarem efeitos terapêuticos e adversos. A TDM começa quando o fármaco é prescrito pela primeira vez e envolve a determinação de um regime de dosagem inicial apropriado para o estado clínico e as características do doente tais como a idade, o peso, a função do órgão e a terapêutica farmacológica concomitante. Ao combinar conhecimentos de farmacocinética e farmacodinâmica, a TDM permite a avaliação da eficácia e segurança de uma determinada medicação em diferentes contextos clínicos. O objetivo deste processo é a individualização do regime de dosagem terapêutica, visando melhorar não apenas à adesão ao tratamento, mas também assegurar a saúde do paciente e evitar possíveis recaídas (PATTEET et al., 2014).

Tradicionalmente, a TDM envolve a medição da concentração de fármacos em vários fluidos biológicos baseando-se na suposição de que há uma relação definível entre a concentração de droga no plasma/sangue e os efeitos terapêuticos da mesma (KANG; LEE,

2009). Os estudos de monitorização terapêutica, portanto, requerem uma abordagem multidisciplinar com colaboração de diferentes áreas. Neste contexto, a química analítica, mais precisamente a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) destaca-se como técnica primária para a quantificação rápida e precisa de fármacos em amostras biológicas (Tabela I.1).

Tabela I.1 - Métodos de LC-MS/MS para determinação de fármacos em fluidos biológicos.

Analitos	(Matriz) Preparo da mostra	Condições LC-MS/MS	Limite quantificação	Referências
16 Fármacos (Antipsicóticos, antidepressivos, ansiolíticos e anticonvulsivantes)	(Plasma, 200 µL) MEPS: 100 µL de MeOH/ACN (50:50 v/v) FE: Monolito de sílica híbrida (cianopropil)	FM: acetato de amônio 5 mM + 0,1% HCOOH e ACN Eluição por gradiente Modo +	0,05–1,0 ng/mL ⁻¹	(DE SOUZA; DOMINGUES; QUEIROZ, 2015)
27 benzodiazepínicos 18 antipsicóticos e antidepressivos 21 drogas de abuso	(Sangue, 500 µL) DLLME: clorofórmio como extrator e metanol como dispersor	FM: H ₂ O + 0,1% HCOOH e MeOH + 0,1% HCOOH Eluição por gradiente	0,2 – 10,0 ng/mL ⁻¹	(FISICHELLA; ODOARDI; STRANO- ROSSI, 2015)
16 antipsicóticos e 8 metabólitos	(Soro, 200 µL) LLE: éter metil terc- butílico	FM: Acetato de amônio 10 mM (pH = 3,7) e ACN Eluição por gradiente Modo +	0,5 – 64,2 ng/mL ⁻¹	(GRADINARU et al., 2014a)

continua...

conclusão.

Analitos	(Matriz) Preparo da mostra	Condições LC-MS/MS	Limite quantificação	Referências
6 antipsicóticos	(Plasma, 250 µL) PPT: plasma/ACN 1:3 (v/v)	FM: Formiato de amônio 20 mM (pH = 4) e ACN Eluição por gradiente Modo +	0,2 – 2,0 ng/mL ⁻¹	(GRADINARU et al., 2014b)
Benzodiazepínicos	(Sangue, Soro e Plasma- 500 µL) LLE: éter/acetato de etila 1:1 (v/v)	FM: Formiato de amônio 10 mM (pH = 3,4) + 0,1% HCOOH e ACN + 0,1% HCOOH Eluição por gradiente Modo +	5 – 450 ng/mL ⁻¹	(MONTENARH et al., 2014)

FM: Fase móvel; FE: Fase extratora; MEPS: Microextração em sorbente empacotado; DLLME: Microextração líquido-líquido dispersiva; MeOH: Metanol; ACN: Acetonitrila; HCOOH: Ácido fórmico; H₂O: Água; LLE: Extração líquido-líquido; PPT: Precipitação de proteínas.

A Figura I.1 ilustra a estrutura química de alguns fármacos, utilizados no tratamento da esquizofrenia, que foram empregados neste trabalho, para fins de monitorização terapêutica.

Figura I.1 - Estrutura química dos fármacos, comumente, utilizados no tratamento da esquizofrenia, empregados no trabalho.

Antipsicóticos
Clozapina	Olanzapina	Haloperidol	Quetiapina	Clorpromazina
Antidepressivos
Mirtazapina	Imipramina	Sertralina	Paroxetina	Fluoxetina
Clomipramina		Citalopram		
Ansiolíticos		Anticonvulsivantes
Diazepam	Clonazepam	Lamotrigina	Carbamazepina	

Fonte: Próprio autor.

I.1.3 Extração em ponteira descartável - “Disposable pipette extraction” (DPX)

A técnica de DPX, baseada no equilíbrio de sorção do soluto com a fase extratora, surgiu como uma alternativa a SPE convencional, utilizando ponteiras descartáveis, ao invés de cartuchos ou tubos de ensaio. A DPX, quando comparada à SPE, permite a rápida extração de solutos, em matrizes complexas, sem a utilização de vácuo e com emprego de menor quantidade de material sorvente (LI et al., 2012). Trata-se de um método único no qual o sorvente contido, livremente, no interior de uma ponteira, é completamente misturado a solução de amostra por meio da aspiração de ar. Esta mistura dinâmica do sorvente com a amostra favorece o rápido equilíbrio de partição, enquanto a menor massa de sorvente resulta em menores volumes de amostra e de solvente orgânico (GUAN; BREWER; MORGAN, 2009). Além disso, a extração por DPX pode ser facilmente automatizada, favorecendo a frequência analítica.

As principais áreas de aplicação, nas quais a extração por DPX tem sido reportada são as análises forenses (drogas de abuso) e de contaminantes de alimentos (principalmente os pesticidas). No entanto, mais recentemente, a DPX vem sendo descrita como uma ferramenta essencial para a purificação e concentração de proteínas e peptídeos em genômica, proteômica e metabolômica. E embora, a literatura científica sobre a utilização da DPX na determinação de fármacos, em fluidos biológicos, seja ainda limitada, sua simplicidade na operação, variedade de sorventes disponíveis e capacidade de automatização geram várias vantagens também a este seguimento (KOLE et al., 2011). A Tabela I.2 reúne alguns trabalhos, empregando a técnica de DPX, na determinação de fármacos em amostras biológicas.

Tabela I.2 - Aplicações da técnica DPX para a análise de fármacos em fluidos biológicos .

Analitos (Matriz)	Técnica Analítica	DPX (Procedimento)	LOQ/LOD	Referências
Antidepressivos (Plasma)	LC/FD	<i>Eluição:</i> ACN – 1 x 200 µL <i>Lavagem:</i> MeOH/água (50:50, v/v) – 3 x 500 µL	80 ng mL ⁻¹ (Fluoxetina) 10 ng mL ⁻¹ (Norfluoxetina)	(CHAVES et al., 2015)
Antibióticos aminoglicosídeos (Tecidos bovino)	UHPLC/ MS/MS	<i>Condicionamento:</i> 3mL MeOH (1x) e 3mL água (2x); <i>Sorção:</i> amostra por 30s; <i>Lavagem:</i> 3mL água (1x); <i>Eluição:</i> 0,9 mL de ác. fórmico 0,1% (5x)	LOD = 0,005 µg/g	(LEHOTAY et al., 2013)
Clorpromazina, Olanzapina, Clozapina e Biperideno (Urina)	GC/NPD	<i>Condicionamento:</i> 3mL MeOH (1x -10s) e 3mL de água (1x-10s); <i>Sorção:</i> amostra por 5 min; <i>Lavagem:</i> 3 mL água; <i>Eluição:</i> 1,5 mL ACN (1x).	LOD = 0,28– 0,42ng/µL	(SAMANIDOU et al., 2013)
Codeína, morfina e 6- monoacetilmorfina (Humor vítreo)	GC/NPD	<i>Condicionamento:</i> 2 mL água (1x-20s) e 2 mL MeOH (1x-20s) <i>Sorção:</i> amostra por 30s; <i>Lavagem:</i> 2,5 mL de água (30s) e 2,5 mL de ACN (30s); <i>Eluição:</i> 2,5 mL de CH ₂ Cl ₂ /isopropanol/ hidróxido de amônio (78:20:2 v/v/v).	LOD = 0,2 -50 ng mL ⁻¹	(KOVATSI et al., 2011)

continua...

conclusão.

Analitos (Matriz)	Técnica Analítica	DPX (Procedimento)	LOQ/LOD	Referências
Anfetaminas, opiáceos, cocaína tetrahydrocannabinol, antidepressivos, metadona, eperidina e fenciclidina (Urina)	GC/MS	<i>Sorção:</i> Amostra por 20s; <i>Lavagem:</i> 500 µL de água; <i>Eluição:</i> 500 µL de ACN (drogas ácidas/neutras), 500 µL de CH ₂ Cl ₂ / isopropanol/ hidróxido de amônio 78:20:2 (v/v/v) (básicas).	LOD < 5 ng/mL; Exceto para	(ELLISON; BREWER; MORGAN, 2009)
Metanfetamina e anfetamina (Sangue total)	GC/MS	<i>Condicionamento:</i> 200 µL MeOH e 200 µL de água; <i>Sorção:</i> Amostra -200 µL (25x) <i>Lavagem:</i> 200 µL de água; <i>Eluição:</i> 100 µL MeOH (5x)	1,5 – 1,1 ng mL ⁻¹	(KUMAZAWA et al., 2007)

CG/MS: Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas; MeOH: Metanol; ACN: Acetonitrila; UHPLC: Cromatografia líquida de ultra eficiência, NPD: Detector de nitrogênio e fósforo; LC/FD: Cromatografia líquida com detector de fluorescência.

1.1.3.1 Ponteiras DPX

As ponteiras DPX foram desenvolvidas e patenteadas, no ano de 2003, por Dr. William Brewer - Universidade da Carolina do Sul, EUA (BORDIN et al., 2016). De maneira original e simples, trata-se de uma ponteira padrão (1 ou 5 mL), modificada, na qual uma pequena quantidade de sorvente está contido, livremente, em seu interior, delimitada por dois filtros - um na extremidade inferior e outro na extremidade superior da ponteira. O primeiro filtro (de vidro sinterizado, lã de vidro, polímero poroso ou de metal), tem como finalidade proporcionar uma barreira permeável que permita a passagem livre dos fluidos em qualquer direção (aspirar/dispensar), na medida em que retém a fase extratora. Já o segundo, colocado na extremidade superior, impede a passagem de qualquer material sólido ou fluído para o interior da pipeta (“ou seringa”), assegurando a não contaminação da mesma e a retenção do sorvente, Figura I.2. Este segundo filtro é de preferência constituído de vidro sinterizado, de um polímero poroso, ou de uma membrana semipermeável (BORDIN et al., 2016).

Além do leito reduzido da ponteira, que requer menor volume de amostra e solvente orgânico, o fato do sorvente estar contido, livremente, na ponteira permite o fluxo bidirecional (aspirar ou dispensar) dos fluidos, acelerando o processo de extração. As ponteiras DPX podem ser facilmente acopladas a uma pipeta ou seringa (polipropileno) podendo, a extração, ser realizada manualmente para pequenos lotes de amostras. Para laboratórios com grandes volumes de amostras, sistemas automatizados já se encontram disponíveis no mercado. Estes possuem a vantagem de proporcionar um fluxo positivo uniforme e controlado e, por conseguinte, análises mais exatas e precisas (LAMBERT, 2009).

Figura I.2 - Ilustração de uma Ponteira DPX

Fonte: Próprio autor

A primeira ponteira DPX, comercialmente disponível, fundamentou-se na cromatografia clássica, com partículas C18. Desde então, semelhante aos cartuchos SPE tradicionais, diferentes fases com diferentes mecanismos de extração foram introduzidas no mercado: DPX-RP (estireno divinil benzeno); DPX-CX (grupos sulfônicos); DPX-WAX (grupos poliamino); DPX-WCX (grupos policarboxilato); DPX-Si (sílica gel). Em 2004, uma nova ponteira DPX com sílica monolítica, a *Mono Tip C18* (GL Sciences, Tóquio, Japão) foi desenvolvida e tem sido aplicada com sucesso em análises proteômicas e metabolômicas (HASEGAWA et al., 2007; KUMAZAWA et al., 2007). Portanto, o desenvolvimento de uma fase extratora de material de acesso restrito, como descreve este trabalho, propõe uma nova abordagem para as ponteiras DPX.

1.1.3.2 Etapas do processo de DPX

Em um experimento típico de extração por DPX, inicialmente, a fase extratora é condicionada com um solvente apropriado para ativação dos sítios de ligações. Esta etapa, em alguns casos, não se faz necessária. Após o condicionamento, a amostra líquida (ou extrato) é aspirada para o interior da ponteira e misturada à fase extratora por meio da entrada de ar através da ponta da ponteira. A subsequente aspiração de ar resulta em uma completa mistura da amostra com a fase extratora, formando uma suspensão, e permitindo assim uma rápida e eficiente extração (BORDIN et al., 2016). Essa etapa necessita ser otimizada, visto que a eficiência da extração está baseada no equilíbrio de sorção, ou seja, no tempo de contato do analito de interesse com a fase extratora, Figura I.3.

Figura I.3 - Etapas do processo por DPX

Fonte: Próprio autor

Uma vez que ocorreu a sorção dos analitos, normalmente após 30s, a amostra já pode ser dispensada e a fase extratora submetida a uma etapa de lavagem. A escolha do solvente de lavagem é feita com base no tipo / natureza química do sorvente, na natureza do analito de interesse e dos interferentes, possivelmente, presentes na matriz. A lavagem com solvente é também realizada por meio da entrada de ar na ponteira. Feito isso, finalmente o solvente de dessorção é aspirado para o interior da ponteira seguido da aspiração de ar, várias vezes, de

forma a assegurar à completa eluição dos analitos adsorvidos (GUAN; BREWER; MORGAN, 2009; KUMAZAWA et al., 2006; LAMBERT, 2009; MOZANER BORDIN et al., 2013). O eluato pode ser diretamente injetado em um sistema cromatográfico ou evaporado e reconstituído, visando maior sensibilidade analítica. Todas as etapas envolvidas na extração por DPX são válidas para ambos os sistemas, manual e/ou automatizado.

I.1.4 Material de Acesso Restrito – “Restricted access material” (RAM)

O termo material de acesso restrito ou, simplesmente RAM, como são conhecidos esses materiais, foi introduzido por DESILETS et al. em 1991. Esta denominação refere-se a uma classe de materiais biocompatíveis, usados no preparo da amostra, que permitem a injeção direta de fluidos biológicos em sistemas cromatográficos (NOVÁKOVÁ; VLCKOVÁ, 2009b).

De modo geral, as fases RAM combinam os princípios da Cromatografia de Exclusão e da Cromatografia de Fase Reversa ou troca iônica, uma vez que impedem a adsorção de macromoléculas, da matriz biológica, na superfície externa da partícula (hidrofílica) ao passo em que limitam o acesso, ao seu interior, às micromoléculas.

As macromoléculas podem ser excluídas por uma barreira física, relacionada ao diâmetro do poro (geralmente de 60 Å) ou por uma barreira de difusão química. Esta última pode ser gerada por uma rede de proteínas (albumina sérica bovina, BSA ou albumina sérica humana, HSA) ou polímeros, na superfície externa da partícula, conferindo a mesma característica hidrofílica. Já as moléculas pequenas (analitos) penetram nos poros (hidrofóbicos) e são retidas através do processo de partição (MULLETT, 2007).

Inicialmente, estes materiais foram classificados de acordo com o mecanismo de exclusão das macromoléculas (barreira física ou química). Esta classificação, porém, foi estendida. Atualmente, estas fases podem ser também subdivididas segundo o tipo de grupo ligado às superfícies (interna e externa da partícula) em fases unimodais e bimodais (YU; WESTERLUND; BOOS, 1997). As fases de superfície unimodal apresentam ambas as superfícies, interna e externa, com característica hidrofílica e hidrofóbica, simultaneamente. Já as fases bimodais caracterizam-se por apresentar uma região externa hidrofílica e uma região interna hidrofóbica. Como exemplo de fases bimodais tem-se os materiais de sílica com proteína imobilizada.

I.1.4.1 Fases RAM com proteína imobilizada

Os materiais de sílica, revestida com proteínas, se baseiam na exclusão de macromoléculas por meio de uma barreira de difusão química estabelecida por uma rede de proteínas ligadas à superfície externa da partícula. Esse tipo de suporte foi introduzido por HERMANSSON E GRAHN (HERMANSSON; GRAHN, 1994), em 1994, e comercializado sob o nome de *BioTrap* (SOUVERAIN; RUDAZ; VEUTHEY, 2004). Trata-se de um material constituído por partículas de sílica porosa revestidas, externamente, por uma rede de proteína presente no plasma humano, a alpha-1-glicoproteína (AGP) ácida. Este processo torna a superfície externa da partícula, hidrofílica, compatível com uma amostra proteica. Dessa forma, as macromoléculas (proteínas), presentes na matriz biológica, não conseguem penetrar nos pequenos poros (10 nm) da partícula e são excluídas por repulsão eletrostática. Os pequenos analitos, porém, conseguem adentrar por estes poros ficando retidos aos grupos hidrofóbicos (sílica, C8 ou C18) presentes na superfície interna da partícula (SOUVERAIN; RUDAZ; VEUTHEY, 2004).

Dentre estas fases, estão as fases RAM imobilizadas com proteína sérica bovina (RAM-BSA), como proposto por MENEZES E FÉLIX (MENEZES; FÉLIX, 1998). Estas fases são constituídas de BSA imobilizada sobre um suporte C18 por meio do entrecruzamento com glutaraldeído (Figura I.4).

Figura I.4 - Material de acesso restrito, partículas hidrofóbicas revestidas com albumina sérica bovina.

Fonte: Adaptado de (SOUVERAIN; RUDAZ; VEUTHEY, 2004).

Com o desenvolvimento e comercialização de diferentes tipos de suportes, a aplicação de fases RAM para a análise direta de fármacos, em fluidos biológicos, tornou-se cada vez mais comum, tanto no modo simples como no modo multidimensional de análise (DE OLIVEIRA ISAC MORAES et al., 2013; DENADAI; CASS, 2015; MOURA et al., 2012). No entanto, pouco, ou quase nada, se fala no emprego destas fases em conjunto com técnicas de microextração no modo “off-line”.

O uso destas fases, como sorbentes, para técnicas miniaturizadas de extração, viabiliza a etapa de preparo da amostra, uma vez que permite a “limpeza” e pré-concentração dos analitos em uma única etapa, de forma seletiva e versátil, empregando pequenos volumes de amostra e solvente orgânico.

I.2 OBJETIVOS

Desenvolvimento da fase de material de acesso restrito (C₁₈-BSA) para a extração de fármacos (antipsicóticos, antidepressivos, ansiolíticos e anticonvulsivantes), por DPX e análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial.

I.2.1 Objetivos específicos

- Desenvolvimento da fase extratora de material de acesso restrito C₁₈-BSA;
- Avaliação da fase RAM em conjunto com a técnica de extração em ponteira descartável – DPX;
- Otimização dos parâmetros da técnica DPX, tais como pH e volume da amostra, tempo de equilíbrio de sorção entre a amostra e o sorvente, condições de dessorção e soluções de lavagem;
- Padronização e validação analítica do método DPX/LC-MS/MS;
- Análise de amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos em terapia com fármacos antipsicóticos, antidepressivos, ansiolíticos e anticonvulsivantes, para fins de monitorização terapêutica.

I.3 MATERIAIS E MÉTODOS

I.3.1 Padrões Analíticos, Reagentes e Materiais.

Os padrões analíticos dos fármacos (Carbamazepina, Mirtazapina, Imipramina, Fluoxetina, Olanzapina, Clonazepam, Clorpromazina, Citalopram, Clozapina, Haloperidol, Lamotrigina, Diazepam, Sertralina, Clomipramina, Paroxetina, Quetiapina, 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 e Acetonitrila, grau HPLC, acetato de amônio e ácido fórmico foram obtidos do fornecedor JT Baker (Phillipsburg, EUA). Os reagentes, grau analítico, glutaraldeído (25%), dihidrogenofosfato de potássio e borohidreto de sódio foram adquiridos da Merck, Darmstadt, Germany. A albumina sérica bovina – BSA (98%) foi fornecida pela Sigma Aldrich (St. Louis, USA). A fase móvel foi filtrada através de sistema de filtragem a vácuo, com membrana de celulose, adquirida pela Millipore e desgaseificada 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.

I.3.2 Amostras de Plasma

Para otimizar e validar o método LC-MS/MS desenvolvido, amostras de plasma de voluntários não expostos a qualquer fármaco, por pelo menos 72 h, foram utilizadas (plasma em branco). Estas amostras foram, gentilmente, fornecidas pela equipe de Enfermagem Psiquiátrica do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Brasil. As amostras de plasma foram coletadas de acordo com os critérios estabelecidos pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Brasil.

I.3.3 Soluções Estoque e Padrões de Calibração

As soluções padrão estoque dos analitos foram preparadas, em metanol, em concentração inicial de 200 µg mL⁻¹. Essas soluções são estáveis por dois meses a 20 °C (ZHANG; JR; BARTLETT, 2009). As soluções dos padrões internos (PI) foram preparadas,

em metanol, nas seguintes concentrações: haloperidol-d4 (20,5 ng mL⁻¹), clonazepam-d4 e paroxetina-d6 (80,0 ng mL⁻¹), imipramina-d3 (185,0 ng mL⁻¹), citalopram-d6 e sertralina-d3 (205,0 ng mL⁻¹), clomipramina-d3 e quetiapina-d8 (260,0 ng mL⁻¹), diazepam-d5 e fluoxetina-d6 (550,0 ng mL⁻¹), clozapina-d4 (850,0 ng mL⁻¹) e carbamazepina-d10 (5,5 µg mL⁻¹).

I.3.4 Preparo das ponteiras DPX com a fase C₁₈-BSA

Para o preparo da fase extratora RAM foram utilizados cartuchos SPE SAMPLIQ C18 (1000 mg - 6mL), da AGILENT HP, fornecidos pela Hexis Científica. Com o auxílio de uma câmara de vácuo, com capacidade para 12 cartuchos (Altech, EUA), acoplada a uma bomba de vácuo Fanem (Brasil), os cartuchos SPE - C18 foram condicionados com 30 mL de metanol, 15 mL de uma mistura H₂O/Metanol (50:50 v/v) e 15 mL de água.

A imobilização com albumina sérica bovina (BSA) foi realizada pelo mesmo sistema SPE, segundo procedimento descrito por Menezes e Félix (MENEZES; FÉLIX, 1998), com alguns ajustes nos volumes dos solventes. Inicialmente, 15 mL de solução de dihidrogenofosfato de potássio (KH₂PO₄), 0,05 mol L⁻¹ (pH = 6), foram percolados pelo cartucho SPE, seguidos de 15 mL de solução BSA 1 mg mL⁻¹ (preparada em solução de KH₂PO₄ 0,05 mol/L, pH=6), 15 mL de água deionizada e duas porções de 5 mL de glutaraldeído a 25%. Após repouso de 5 horas, 10 mL de solução borohidreto de sódio (NaBH₄) 1 mg mL⁻¹ foram percolados pelo cartucho, seguido de 60 mL de água deionizada (CASS et al., 2003).

Uma massa de 60 mg da fase C₁₈-BSA foi adicionada a uma ponteira de polipropileno, de 1mL, contendo filtro de aço inoxidável na extremidade inferior. Estas ponteiras foram mantidas até o uso, em geladeira, a 4°C.

I.3.5 Avaliação da exclusão das proteínas do plasma pelos cartuchos SPE (C₁₈-BSA)

I.3.5.1 Preparo do reagente de Bradford

A solução do corante azul brilhante de Coomassie (reagente de Bradford), para a quantificação de proteínas, foi preparada na concentração de 100 mg L⁻¹, segundo procedimento descrito por BRADFORD (BRADFORD, 1976). Em um béquer, dissolveu-se

50 mg do corante em 25 mL de etanol, acrescentando-se, em seguida, 50 mL de ácido fosfórico 85%. Transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 500 mL e completou-se o volume com água deionizada. A solução foi armazenada em frasco âmbar, em geladeira, a 4°C.

1.3.5.2 Avaliação da exclusão das proteínas do plasma

A avaliação da exclusão das proteínas presentes no plasma humano, empregando os cartuchos SPE (C₁₈-BSA), foi feita segundo proposto por LIMA et al (LIMA; CASSIANO; CASS, 2006).

O plasma humano, a temperatura ambiente, foi, inicialmente, agitado em agitador de tubos por 30s. Após 1000 mg da fase C₁₈-BSA ter sido condicionada (em cartucho SPE) com 30 mL de água deionizada, 50 µL de plasma humano foram percolados pela mesma. A fase foi eluída com 5 mL de água e o eluato coletado em balão volumétrico para, posterior, leitura espectrofotométrica. Em seguida, a fase foi lavada com 10 mL de água e 30 mL de acetonitrila, para total eluição dos compostos endógenos do plasma. Novamente, a fase RAM foi condicionada com 30 mL de água deionizada e o procedimento descrito repetido, em triplicata, para os volumes de 100 e 200 µL de plasma. Todos os eluatos coletados foram submetidos à leitura espectrofotométrica.

As soluções referência, de plasma (sem exclusão das proteínas), foram preparadas adicionando-se volumes de 50, 100 e 200 µL de plasma humano, em balões volumétricos de 5 mL, e completando-se o volume com água deionizada.

Todas as soluções foram mantidas em frascos de vidro âmbar, em geladeira, a 4°C, e analisadas no máximo até 12 horas após terem sido coletadas.

1.3.5.3 Medidas espectrofotométricas

Pipetou-se 500 µL das frações eluídas (eluato) a partir do cartucho RAM (C₁₈-BSA); a essa fração adicionou-se 5,0 mL do reagente de “Bradford”, deixando agir por 3 minutos. Em seguida, transferiu-se uma alíquota para uma cubeta de quartzo e registrou-se o espectro na região de 190 a 800 nm. As absorbâncias foram medidas utilizando um espectrofotômetro *model nova 1800 UV*, da Nova Instruments, no comprimento de onda de 595 nm, relativo à

máxima absorção do complexo proteína-corante (CASSIANO et al., 2002). O mesmo procedimento foi repetido para as soluções de referência (sem exclusão das proteínas).

A eficiência de exclusão das proteínas do plasma pela fase RAM (C18-BSA) foi calculada comparando-se as absorbâncias das frações coletadas a partir do cartucho SPE e as absorbâncias das soluções de referência, que fornecem a máxima quantidade de proteínas no plasma (100%).

I.3.6 Condições cromatográficas e espectrométricas

As análises por LC-MS/MS foram realizadas utilizando um sistema HPLC 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).

Para as separações cromatográficas empregou-se a coluna X Select CSH C₁₈ XP (2.1x 100 mm, 2.5 µm) da Waters. A fase móvel consistiu em um solvente A (Acetato de amônio 5 mM + 0,1% de ácido fórmico) e B (Acetonitrila), em modo de eluição por gradiente (0-10 min, 90 % de A e 10 % de B; 10-15 min, 20 % de A e 80 % de B; 15-20 min, 90 % de A e 10 % de B), sob vazão de 0,3 mL min⁻¹. Utilizou-se N₂ (99,9% pureza); a 600 °C como gás de dessolvatação (fluxo 600 L/Hr). A temperatura da fonte de ionização foi de 150 °C e a voltagem do capilar de 0,5 kV. Argônio (99,9999% pureza) foi utilizado como gás de colisão. Tanto os analitos quanto os PIs (padrões internos) foram analisados no modo de monitoramento de reações selecionadas (SRM) para as transições MS/MS descritas na Tabela I.3. Todos os dados foram adquiridos utilizando o software MassLynx V4.1.

Tabela I.3 - Transições MS/MS (SRM), energia do cone (DP) e energia de colisão (CE) para cada um dos fármacos estudados.

Analito	Íon Precursor (<i>m/z</i>)	Íon Produto (<i>m/z</i>)	DP (V)	CE (eV)	Íon confirmação (<i>m/z</i>)	RT (min)
Haloperidol	376.1	123.0	40	45	165.0	5.54
Olanzapina	313.3	84.1	45	20	256.2	1.80
Clonazepam	316.0	270.1	50	25	214.1	6.77
Mirtazapina	266.2	72.1	40	20	195.0	3.61
Paroxetina	330.2	70.0	50	25	192.2	5.77
Citalopram	325.3	109.1	45	25	262.0	5.31
Sertralina	306.2	159.0	25	30	275.1	6.54
Clorpromazina	319.2	86.1	40	20	58.1	6.53
Imipramina	281.2	86.0	30	15	57.9	5.99
Clomipramina	315.2	86.0	35	15	57.9	6.75
Quetiapina	384.3	253.2	45	20	221.0	5.19
Diazepam	285.1	193.1	50	35	154.2	8.05
Fluoxetina	310.1	43.9	25	10	148.2	6.45
Clozapina	327.2	192.2	40	40	270.2	5.01
Carbamazepina	237.1	194.1	35	20	-	6.05
Lamotrigina	256.1	58.0	55	40	144.9	3.25
Padrões Internos						
Haloperidol-d4	380.2	127.1	45	45	169.1	5.52
Clonazepam-d4	320.1	274.1	50	30	218.1	6.76
Paroxetina-d6	336.2	76.1	30	35	198.2	5.76
Citalopram-d6	331.2	108.9	35	25	262.1	5.30
Sertralina-d3	309.1	159.0	20	25	275.0	6.53
Imipramina-d3	284.3	89.0	35	15	208.2	5.97
Clomipramina-d3	318.2	89.0	40	20	60.9	6.73
Quetiapina-d8	392.3	258.1	50	30	286.1	5.17
Diazepam-d5	290.1	198.1	55	30	153.9	8.03
Fluoxetina-d6	316.2	44.1	25	15	154.1	6.41
Clozapina-d4	331.2	192.2	50	50	272.4	5.00
Carbamazepina-d10	247.2	204.1	35	20	-	6.02

*Na tabela estão representados apenas os valores de voltagem do cone (DP) e energia de colisão (CE) referentes à transição utilizada para quantificação (íon precursor – íon produto).

I.3.7 Otimização dos parâmetros DPX

Os parâmetros envolvidos no processo de extração por DPX, tais como: pH e volume da amostra, tempo de equilíbrio de sorção entre os fármacos e o sorvente, soluções de lavagem e condições de dessorção foram otimizados. Ponteiros DPX (1 mL), contendo 60 mg da fase extratora RAM (C₁₈-BSA), foram conectadas a uma seringa de polipropileno de 5 mL da BD Plastipak[®], utilizadas como dispositivo para a extração. Com o objetivo de avaliar a influência dos diferentes parâmetros na eficiência da extração, utilizou-se amostras de plasma (200 µL) enriquecidas com solução padrão da mistura dos fármacos a uma concentração de 125 ng mL⁻¹. Para a injeção no sistema LC-MS/MS, um volume de 5 µL foi empregado e todas as análises realizadas em triplicata.

I.3.7.1 Otimização do pH da amostra

Inicialmente, avaliou-se a influência do pH da amostra na pré-concentração dos fármacos na fase RAM (C₁₈-BSA). Em virtude do ponto isoelétrico da albumina sérica bovina (4,7) e da restrição do uso de valores de pH superiores a 8, em fases à base de sílica, soluções de tampão fosfato (0,05 mol L⁻¹) em pH 6 e 8,0 foram avaliadas. Para o preparo das amostras, 500 µL do tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹, nos diferentes valores de pH, foram enriquecidos com os fármacos na concentração de 50 ng.mL⁻¹. As amostras foram agitadas, em vórtex, por 30s e, em seguida, submetidas à extração.

Para o processo de extração, inicialmente, a fase extratora RAM foi condicionada com 500 µL de metanol, seguida de 500 µL de água. Cada um dos solventes foi mantido em contato com a fase por 30 segundos. Posteriormente, a amostra foi vagarosamente aspirada para o interior da ponteira DPX. Por meio da entrada de ar constante através da ponta da ponteira (aspiração de ar), amostra e fase extratora foram misturadas, de forma dinâmica, por 1 minuto, a fim de se estabelecer o equilíbrio de sorção. Na sequência, a amostra foi dispensada e os analitos, adsorvidos na fase extratora RAM, eluidos com 500 µL de metanol. O eluato foi seco, em concentrador a vácuo, para completa evaporação do solvente e o resíduo seco reconstituído com 100 µL da fase móvel inicial 90:10 v/v (acetato de amônio 5 mM + 0,1% de ácido fórmico : acetonitrila).

1.3.7.2 Otimização do tempo de equilíbrio de sorção

Visando obter valores de recuperação satisfatórios, os tempos de 1, 2 e 4 minutos foram avaliados na otimização do tempo de equilíbrio de sorção entre soluto e fase extratora. Para o preparo das amostras, 200 μL de plasma, enriquecidos com os fármacos na concentração de 125 ng mL^{-1} , foram diluídos em 200 μL de solução tampão fosfato ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 8,0) e a mistura agitada, por 30 segundos, antes do processo de extração. 400 μL da amostra diluída foram, lentamente, aspirados para o interior da ponteira, mantendo a fase extratora em contato com a amostra por 1, 2 e 4 minutos, separadamente. Após a etapa de sorção, a fase extratora foi lavada, com 500 μL de água deionizada, previamente à eluição dos analitos.

1.3.7.3 Otimização do processo de dessorção

A otimização do processo de dessorção (solvente de eluição e número de ciclos) é importante para garantir a eficiente eluição dos solutos com taxas de recuperação satisfatórias. Para isso, diferentes números de ciclos de eluição foram avaliados. Um volume de 200 μL de amostra de plasma, enriquecidos com os fármacos na concentração de 125 ng mL^{-1} , foram diluídos em 200 μL de tampão fosfato ($0,05 \text{ M}$, pH 8,0) e a mistura agitada, em vórtex, por 30 segundos. 400 μL da amostra foram aspirados pela ponteira e misturados à fase extratora, por 4 min, a fim de se estabelecer o equilíbrio de sorção. Após lavagem com 500 μL de água, ciclos (aspirar/dispensar) de eluição de: 3 x 100 μL ; 4 x 100 μL , 5 x 100 μL e 1 x 500 μL , de metanol, foram avaliados.

1.3.7.4 Otimização da solução de lavagem

Com o objetivo de minimizar a interferência dos compostos endógenos, presentes no plasma, diferentes soluções de limpeza também foram avaliadas. 200 μL de amostra de plasma, enriquecidos com os fármacos na concentração de 125 ng mL^{-1} , foram diluídos em 200 μL de tampão fosfato ($0,05 \text{ M}$, pH 8,0). 400 μL da amostra, após terem sido mantidos por 4 min em contato com a fase extratora (sorção), foram dispensados e a fase extratora lavada, por 30 segundos, para retirada dos compostos endógenos. Diferentes soluções foram avaliadas nesta etapa de lavagem: 1 x 500 μL de água, 1 x 250 de ácido acético 1% + 1 x 250 μL de água e 1 x 250 de ácido acético + 1 x 250 μL de metanol 5%.

I.3.7.5 Otimização do volume de amostra

A fim de diminuir o volume da amostra de plasma, um volume de 100 μL de amostra também foi avaliado para a pré-concentração dos fármacos, na fase RAM (C_{18} -BSA), empregando a técnica de extração por DPX. Para o preparo das amostras, 100 μL de plasma, foi enriquecido com 50 μL de solução padrão da mistura dos fármacos (250 ng.mL^{-1}), resultando em uma concentração de 125 ng.mL^{-1} . A mistura foi diluída em tampão fosfato (200 μL ; 0,05 M, pH 8,0), agitada por 30s, em vórtex, e, posteriormente, submetida ao processo de extração. Os resultados foram comparados aos obtidos empregando um volume de 200 μL de amostra.

Na avaliação de todos os parâmetros envolvidos no processo de extração por DPX, as etapas de extração (do condicionamento a dessorção), bem como o procedimento de análise seguiram como descrito no *item I.3.7.1*.

I.3.8 Validação Analítica

O método proposto (DPX/HPLC-MS/MS), depois de otimizado, 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. Os parâmetros de validação analítica (seletividade, linearidade, exatidão, precisão, limite de quantificação, efeito residual e efeito da matriz) foram avaliados.

A seletividade avaliou a coeluição de picos interferentes e analitos. O sinal analítico dos picos interferentes devem ser inferiores a 20% (vinte por cento) dos sinais analíticos dos analitos, próximo aos tempos de retenção dos mesmos, nas amostras correspondentes ao limite inferior de quantificação (LOQ).

A faixa linear do método iniciou com os valores do limite inferior de quantificação (LOQ), abrangendo o intervalo terapêutico de cada fármaco: haloperidol ($0,5$ a $40,5 \text{ ng mL}^{-1}$); Olanzapina ($0,5$ a $32,5 \text{ ng mL}^{-1}$); Clonazepam, Mirtazapina e Paroxetina (5 a 155 ng mL^{-1}); Citalopram (5 a 405 ng mL^{-1}); Sertralina (5 a 325 ng mL^{-1}); Clorpromazina e Imipramina (10 a 360 ng mL^{-1}); Quetiapina (10 a 510 ng mL^{-1}); Clomipramina (10 a 410 ng mL^{-1}); Diazepam (50 ng mL^{-1} a $1,05 \mu\text{g mL}^{-1}$); Fluoxetina (50 ng mL^{-1} a $0,85 \mu\text{g mL}^{-1}$); Clozapina (150 ng mL^{-1} a $1,55 \mu\text{g mL}^{-1}$); Lamotrigina (500 ng mL^{-1} a $10,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) e Carbamazepina

(500 ng mL⁻¹ a 8,5 µg mL⁻¹). As curvas analíticas foram geradas, para cada analito, plotando a razão entre as áreas dos analitos e padrão interno (analito/padrão interno) *versus* concentração plasmática.

As curvas foram aprovadas para quantificação quando o coeficiente de variação (CV), *Equação 1*, apresentou valor menor ou igual a 20% em relação à concentração nominal para o LOQ, e menor que 15% em relação à concentração nominal para os outros padrões de calibração, incluindo o limite superior de quantificação (LSQ).

A precisão foi determinada em ensaios conduzidos no mesmo dia (precisão intraensaio) e em ensaios conduzidos em três dias consecutivos (precisão interensaio). Cada experimento foi realizado em quintuplicata, em concentrações diferentes, denominadas limite inferior de quantificação (LOQ), controle de qualidade baixo (CQB), controle de qualidade médio (CQM), controle de qualidade alto (CQA) e limite superior de quantificação (LSQ). A Anvisa preconiza que os valores de CV não devem exceder em 15% para os controles de qualidade, exceto para o LOQ, para o qual valores até 20% são aceitável.

$$CV = \frac{\text{Desvio Padrão} \times 100}{\text{Concentração média experimental}} \quad \text{Eq. 1}$$

A exatidão foi determinada em ensaios conduzidos no mesmo dia (exatidão intraensaio) e em ensaios conduzidos em três dias consecutivos (exatidão interensaio). A exatidão, expressa pelo Erro Padrão Relativo (EPR) - *Equação 2*, foi avaliada em quintuplicata para o LIQ, CQB, CQM, CQA e LSQ; sendo que não foram admitidos valores fora da faixa de $\pm 15\%$ do valor nominal, exceto para o LIQ, para o qual não se admitiu valores fora da faixa de $\pm 20\%$ (vinte por cento).

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

A avaliação do efeito residual foi realizada a partir de 3 (três) injeções da mesma amostra branco, sendo uma antes e duas logo após a injeção de uma ou mais amostras processadas no LSQ. Os picos interferentes, nos tempos de retenção dos analitos, devem

possuir valores de área inferiores a 20% (vinte por cento) das áreas correspondentes ao LIQ e inferior a 5% das áreas apresentadas pelos PIs.

O efeito de matriz foi avaliado comparando as respostas analíticas dos analitos em solução padrão aquosa com as respostas dos analitos em amostras de plasma enriquecidas na concentração do CQB e CQA. Para cada concentração do CQB e CQA calculou-se o efeito de matriz normalizado (FMN) por padrão interno, *Equação 3*, o qual deve apresentar valores de CV inferiores a 15% para todos os analitos.

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

I.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

I.4.1 Avaliação da exclusão das proteínas do plasma humano

Fases RAM proteína-imobilizada, preparadas com BSA, têm sido empregadas com sucesso na análise de fármacos em fluidos biológicos. Visto que a albumina sérica bovina se encontra disponível, comercialmente, a um custo relativamente baixo, esta foi a proteína de escolha para o preparo da fase RAM utilizada.

A fim de avaliar a eficiência de exclusão das proteínas pelas fases RAM imobilizadas com BSA a partir de cartuchos SPE C18, alíquotas de 50, 100 e 200 μ L de plasma humano foram eluídas com 5,0 mL de água (5 min).

O Método de “Bradford” é uma técnica para a determinação de proteínas totais, baseado na interação entre o corante “Coomassie brilliant blue” BG-250 e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. Essa ligação consiste em um processo muito rápido (aproximadamente 2 minutos) e o complexo corante-proteína permanece disperso na solução por um tempo relativamente longo (aproximadamente 1 hora) (BRADFORD, 1976).

As proteínas foram complexadas com o reagente de “Bradford” e os espectros de absorção foram registrados na região de 190-800 nm. A Figura I.5 apresenta o espectro de absorção do corante e do complexo proteína-corante após eluição de 50, 100 e 200 μ L de plasma humano pelo cartucho SPE (RAM-C18-BSA).

Figura I.5 - Espectro de absorção do corante azul brilhante de Comassie e do complexo corante-proteína após eluição do plasma humano.

Como observado, o espectro de absorção do corante apresenta dois picos, bem definidos, com máximo de absorção em 450 e 650 nm correspondentes, respectivamente, às formas catiônica e neutra do corante. Após a formação do complexo corante-proteína, as bandas em 450 e 650 nm desaparecem, enquanto há um aumento substancial da absorbância na região de 595 nm. Isto ocorre porque, devido à interação entre o corante e as proteínas do plasma, há um deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente no comprimento de onda de 595 nm (COMPTON; JONES, 1985).

A eficiência de exclusão das proteínas do plasma em cada cartucho SPE (RAM-C18-BSA) foi calculada comparando-se as absorbâncias das amostras coletadas e a as absorbâncias das soluções de referência, que fornecem a quantidade total de proteínas presentes no plasma (100%) (LIMA; CASSIANO; CASS, 2006), segundo *Equação 4*.

$$\text{Eficiência de exclusão (\%)} = \frac{\text{Absorbância da amostra} \times 100}{\text{Absorbância da referência}} \quad \text{Eq. 4}$$

Como apresentado na Figura I.6, a exclusão das proteínas pela fase RAM-C18-BSA foi superior a 90% de eficiência, independente do volume de plasma injetado (50, 100 ou 200 μ L).

Figura I.6 - Porcentagem de proteínas excluídas pelos cartuchos RAM-C18-BSA em 5 min de eluição (Fase móvel: água).

I.4.2 Otimização dos parâmetros da técnica de extração por DPX

I.4.2.1 Otimização do pH da amostra

O pH é importante para a extração de solutos que possuem grupos dissociáveis, dependentes do pH do meio. As fases RAM-C₁₈-BSA combinam os princípios da Cromatografia de Exclusão e da Cromatografia de Fase Reversa. Assim, à medida que a superfície externa hidrofílica da partícula (BSA) impede a adsorção de macromoléculas, presentes na matriz biológica (proteínas), pequenas moléculas (solutos) penetram nos poros hidrofóbicos (C18) e ficam retidas, através do processo de partição. Portanto, quanto menos ionizados estiverem os solutos, mais eficiente será a extração. O pH da amostra tem sido

controlado por uma solução tampão, onde a maioria dos solutos ionizados passará à forma não-ionizada, favorecendo o processo de extração. No entanto, quando se trabalha com fases RAM a escolha do pH é limitada pelo caráter da proteína, visto que a albumina sérica bovina (BSA) apresenta ponto isoelétrico de 4,7. Neste valor de pH, a proteína apresenta carga elétrica líquida igual a zero, portanto para evitar a precipitação dessas proteínas o pH da amostra deve ser distante desse valor, não sendo recomendável valores de pH em torno de 3-5 (YU; WESTERLUND, 1997). Por essa razão a influência do pH da amostra no processo de extração dos fármacos foi avaliada empregando soluções tampão fosfato nos valores de pH 6,0 e 8,0.

Como pode ser visto na Figura I.7, em solução tampão a pH 8,0 observamos satisfatória sorção para a maioria dos fármacos, os quais apresentam valores de pK_a acima de 8 (Tabela I.4). Nesse valor de pH têm-se uma menor quantidade de espécies ionizadas, favorecendo assim a interação desses fármacos com a fase extratora apolar. Portanto, esta condição (diluição da amostra com solução tampão pH 8,0) foi selecionada para as etapas posteriores de otimização dos parâmetros DPX.

Tabela I.4 - Valores de pka dos Fármacos analisados.

Fármacos	Pka
Olanzapina	7,2; 14,2
Lamotrigina	5,87; 14,98
Mirtazapina	6,67
Clozapina	7,5
Quetiapina	7,06; 15,12
Citalopram	9,78
Haloperidol	8,66
Paroxetina	9,77
Carbamazepina	-3,8; 15,96
Imipramina	9,4
Clonazepam	1,86; 11,89
Fluoxetina	9,8
Clorpromazina	9,3
Sertralina	9,85
Clomipramina	9,2
Diazepam	3,4

Figura I.7 - Influência do pH da amostra na pré-concentração dos fármacos na fase RAM-BSA em 500 μL tampão fosfato 0,05 M enriquecidos com os fármacos na concentração de 100 ng.mL^{-1} . Tempo de equilíbrio de 1 min e eluição em metanol.

Análise por DPX-LC-MS/MS.

I.4.2.2 Otimização do tempo de equilíbrio sorção

Na técnica de extração por DPX, soluto e fase extratora são misturados, dinamicamente, por meio da aspiração constante de ar através da ponteira, permitindo assim a máxima interação entre eles. Diferente de outros dispositivos de microextração, a eficiência de extração por DPX está diretamente relacionada ao tempo de equilíbrio de sorção, após a mistura da amostra com a fase extratora (ELLISON; BREWER; MORGAN, 2009). A fim de se obter eficiência satisfatória, diferentes tempos (1, 2 e 4 min) foram avaliados, para a otimização do tempo de equilíbrio, na pré-concentração dos fármacos na fase extratora RAM-BSA. Como observado na Figura I.8, quanto maior o tempo de contato entre soluto e fase extratora, maior a eficiência de extração. No tempo de 4 min observamos maior sorção

dos solutos na fase extratora, de forma que esse tempo foi selecionado para os ensaios seguintes.

Figura I.8 - Influência do tempo de equilíbrio (1, 2 e 4 min) entre soluto e fase extratora RAM-BSA na pré-concentração dos fármacos, em plasma (200 μL) enriquecido com fármacos na concentração de 125 ng.mL^{-1} e diluídos em 200 μL de tampão fosfato 0,05 M (pH=8,0). Eluição em metanol. Análise por DPX-LC-MS/MS.

1.4.2.3 Otimização do processo de dessorção

Após serem extraídos, para que os solutos sejam quantificados é necessário que os mesmos sejam eluídos/dessorvidos da fase extratora. Para isso, solventes ou misturas de solventes são utilizadas. A força de eluição ou capacidade desses solventes em interagir com os solutos presentes na amostra é determinada pela sua polaridade, que é atribuída em função da polaridade da fase extratora. Na extração por DPX os solutos são, rapidamente, eluídos a partir da fase extratora. No entanto, muitas vezes é necessário aspirar/dispensar (ciclos de

dessorção) o solvente, várias vezes, para garantir a total eluição dos solutos. A otimização do solvente de dessorção foi realizada avaliando-se dois solventes diferentes: Metanol e Acetonitrila. Empregando-se metanol como solvente, uma maior eficiência de eluição dos fármacos foi observada, ou seja, os solutos analisados apresentaram maior interação com metanol, em virtude da sua polaridade, do que com a acetonitrila. Sendo assim, o metanol foi mantido como solvente de eluição para as demais extrações.

Uma vez, determinado o solvente de eluição, avaliou-se a influência dos ciclos de dessorção na recuperação dos solutos. Ciclos aspirar/dispensar de 1 x 500; 5 x 100; 4 x 100 e 3 x 100 μL foram comparados. Como observado na Figura I.9, o aumento do número de ciclos aspirar/dispensar não favoreceu o processo de eluição dos fármacos. Conforme o volume de eluição foi diminuindo, notou-se também uma diminuição na recuperação da maioria dos fármacos adsorvidos na fase RAM. Portanto, um único ciclo de 500 μL de metanol foi mantido para os demais ensaios.

Figura I.9 - Otimização do processo de dessorção dos fármacos a partir da fase RAM-BSA, para amostras de plasma enriquecidas com os fármacos (125 ng.mL^{-1}) diluídas em tampão fosfato 0,05 M (pH=8,0), 4 min de equilíbrio e metanol como solvente de eluição. Análise por DPX-LC-MS/MS.

I.4.2.4 Otimização do volume de amostra

A quantidade extraída de soluto está relacionada com o volume de amostra aspirada. Com o objetivo de diminuir o volume da amostra de plasma, a pré-concentração dos fármacos na fase extratora RAM-C₁₈-BSA foi avaliada para volumes de plasma de 100 e 200 µL na concentração de 125 ng.mL⁻¹. Como observado na Figura I.10, para um volume de 200 µL de plasma uma maior resposta analítica foi obtida para a maioria dos fármacos analisados.

Figura I.10 - Otimização do volume de amostras de plasma enriquecidas com os fármacos (125 ng.mL⁻¹) e diluídas em tampão fosfato 0,05 M (pH=8,0), 4 min de equilíbrio, lavagem com água pura e metanol como solvente de eluição. Fase extratora RAM-BSA. Análise por DPX-LC-MS/MS.

I.4.2.5 Otimização da solução de lavagem

Com o objetivo de reduzir a presença de compostos interferentes indesejavelmente retidos, é importante incluir uma etapa de limpeza anterior à etapa de dessorção dos analitos.

Recomenda-se que seja utilizada uma solução que permita a remoção dos compostos endógenos sem que haja perdas significativas dos analitos de interesse. Dentre as soluções testadas, resultados satisfatórios foram obtidos empregando 1 x 250 de ácido acético 1% + 1 x 250 μ L de água, como mostra a Figura I.11.

Figura I.11 - Otimização da solução de lavagem para amostra de 200 μ L de plasma enriquecida com os fármacos (125 ng.mL⁻¹), diluídas em tampão fosfato 0,05 M (pH=8,0), 4 min de equilíbrio e metanol como solvente de eluição. Fase extratora RAM-BSA. Análise por DPX-LC-MS/MS.

Baseando-se, portanto, nos resultados experimentais obtidos, as melhores condições entre as investigadas, para o processo de extração por DPX com fase extratora RAM (C18-BSA) proteína imobilizada, foram as seguintes: 200 μ L de amostra de plasma diluídos em 200 μ L de solução tampão fosfato 0,05 M (pH=8,0); tempo de 4 min para o equilíbrio de sorção; 1 x 250 de ácido acético 1% + 1 x 250 μ L de água como solução de lavagem e apenas um ciclo aspirar/dispensar de 500 μ L de metanol para o processo de dessorção.

1.4.3 Validação Analítica

1.4.3.1 Linearidade

Os critérios estabelecidos para a linearidade foram cumpridos, sendo apresentados na Tabela I.5 as equações de regressão linear, os coeficientes de determinação (R^2), assim como os padrões internos selecionados.

Tabela I.5 - Equações de regressão linear, coeficientes de determinação e padrões internos selecionados.

Analitos	Linearidade				
	Equação da reta	R^2	Lack of Fit Test p^*	LIQ (ng mL ⁻¹)	PI
Haloperidol	$y = 0,0573x + 0,0213$	0,9973	0,270	0,5	Haloperidol-d4
Olanzapina	$y = 0,011x + 0,0185$	0,9942	0,156	0,5	Haloperidol-d4
Clonazepam	$y = 0,0183x - 0,0176$	0,9908	0,269	1,0	Clonazepam-d4
Mirtazapina	$y = 0,7903x - 2,6202$	0,9959	0,389	0,5	Clonazepam-d4
Paroxetina	$y = 0,021x - 0,0329$	0,9905	0,341	1,0	Paroxetina-d6
Citalopram	$y = 0,0004x + 0,0012$	0,9914	0,271	0,5	Citalopram-d6
Sertralina	$y = 0,0039x - 0,0194$	0,9986	0,447	5,0	Sertralina-d3
Clorpromazina	$y = 0,0017x + 0,0094$	0,9960	0,375	1,0	Imipramina-d3
Imipramina	$y = 0,0053x + 0,0109$	0,9991	0,787	1,0	Imipramina-d3
Clomipramina	$y = 0,0037x + 0,0268$	0,9943	0,213	10,0	Quetiapina-d8
Quetiapine	$y = 0,0079x + 0,0489$	0,9961	0,154	0,5	Diazepam-d5
Diazepam	$y = 0,0015x + 0,0515$	0,9920	0,253	1,0	Fluoxetina-d6
Fluoxetina	$y = 0,003x + 0,0695$	0,9966	0,256	10,0	Clozapina-d4
Clozapina	$y = 0,001x + 0,1295$	0,9957	0,489	0,5	Carbamazepina-d10
Carbamazepina	$y = 0,0002x + 0,1963$	0,9938	0,242	0,5	Carbamazepina-d10
Lamotrigina	$y = 8E-06x + 0,0107$	0,9962	0,294	20,0	Quetiapina-d8

*Teste de Lack of Fit com nível de significância de 0,05

I.4.3.2 Exatidão e Precisão

Tanto os ensaios de exatidão quanto os ensaios de precisão apresentaram, consecutivamente, erros padrão relativos e coeficientes de variação em congruência com os valores preconizados pela ANVISA, Tabela I.6.

Tabela I.6 - Exatidão e precisão inter e intraensaio para amostras de plasma enriquecidas com diferentes concentrações de analitos, LOQ, CQB, CQM, CQA e LSQ (n = 5).

Analito	Concentração adicionada (ng.mL ⁻¹)	Exatidão interensaio (%EPR)	Exatidão intraensaio (%EPR)	Precisão interensaio (%CV)	Precisão intraensaio (%CV)
Haloperidol	0,5	5,1	18,0	3,8	13,6
	1,5	6,7	3,3	9,7	11,9
	16,5	3,0	-0,9	5,0	6,7
	24,5	-5,2	-3,5	2,7	3,0
	32,5	1,5	4,7	5,2	7,3
Olanzapina	0,5	-8,0	-4,8	1,8	5,1
	1,5	-5,9	-9,9	3,7	6,2
	16,5	4,0	7,7	7,4	6,9
	24,5	5,5	3,7	4,2	5,6
	32,5	-8,6	-3,6	8,9	10,6
Clonazepam	5	5,0	8,3	6,7	10,6
	15	-4,6	-5,4	6,6	5,3
	80	-7,8	-7,4	1,7	7,3
	125	-1,3	-1,4	6,5	5,1
	155	-5,0	-7,0	3,8	9,2
Mirtazapina	5	-0,7	2,0	2,5	6,2
	15	1,3	2,1	6,5	8,2
	80	-5,9	-6,7	3,1	5,6
	125	-2,6	0,8	6,8	7,7
	155	-9,3	-5,6	3,5	6,6

continua...

continuação

Analito	Concentração adicionada (ng.mL ⁻¹)	Exatidão interensaio (%EPR)	Exatidão intraensaio (%EPR)	Precisão interensaio (%CV)	Precisão intraensaio (%CV)
Paroxetina	5	4,7	9,4	1,0	7,5
	15	5,8	11,4	6,0	7,9
	80	-2,2	-4,4	4,6	5,1
	125	5,5	8,6	1,4	6,5
	155	-3,2	-2,9	8,0	6,6
Citalopram	5	9,3	0,3	3,0	11,6
	15	4,8	6,7	7,1	9,2
	165	-1,4	-0,6	4,3	4,0
	245	-4,8	-3,1	1,0	2,6
	325	0,8	5,0	1,4	6,6
Clorpromazina	10	-5,5	-7,8	3,0	3,9
	30	2,8	-0,1	3,3	4,8
	185	4,1	2,6	3,5	7,4
	290	-3,1	-5,4	1,2	9,6
	360	-1,7	3,0	9,0	8,7
Imipramina	10	7,1	4,4	8,7	7,7
	30	5,1	-1,7	3,7	10,6
	185	3,6	3,0	2,6	7,0
	290	0,8	6,7	3,7	7,9
	360	-0,2	-3,2	2,4	6,0
Clomipramina	10	-2,8	-7,9	5,2	8,3
	30	-5,0	-9,0	6,2	7,4
	210	6,4	7,8	3,7	3,2
	310	-8,2	-6,5	1,3	2,8
	410	-1,0	1,6	4,6	6,6
Quetiapina	10	-9,8	-12,7	4,7	5,6
	30	-9,6	-8,0	6,0	9,8
	210	4,7	6,7	4,3	4,2
	310	-3,8	-3,6	5,0	4,0
	410	-8,2	-3,7	4,6	7,0

conclusão.

Analito	Concentração adicionada (ng.mL ⁻¹)	Exatidão interensaio (%EPR)	Exatidão intraensaio (%EPR)	Precisão interensaio (%CV)	Precisão intraensaio (%CV)
Diazepam	50	-3,3	-8,0	4,3	9,4
	150	-5,8	-4,7	1,3	1,8
	450	2,0	0,6	2,3	4,3
	650	-2,0	-0,2	1,8	2,6
	850	4,7	7,2	5,9	6,1
Fluoxetina	50	-2,6	-8,4	8,5	10,7
	150	-1,4	-0,8	0,9	1,7
	550	5,5	2,9	0,4	4,5
	650	-6,7	-4,2	1,7	3,5
	850	-0,6	2,4	5,5	6,8
Clozapina	150	-5,3	-7,2	5,0	15,3
	430	-6,4	-6,5	0,9	2,2
	850	1,2	-0,4	3,0	8,0
	1270	-1,6	4,4	3,1	7,4
	1550	-4,9	-3,2	7,8	7,6
Carbamazepina	500	-4,5	10,4	5,7	9,4
	1500	-7,2	-9,9	4,4	5,5
	5500	8,4	9,7	5,7	4,6
	8500	-9,5	-4,4	7,1	8,5
	10500	-6,3	-0,1	6,1	9,0
Lamotrigina	500	-9,2	-9,2	3,1	9,9
	1500	-5,8	-0,2	5,9	9,5
	5500	-3,5	-7,4	2,3	9,1
	8500	-4,6	-4,9	1,1	5,6
	10500	2,3	2,5	1,4	7,2

1.4.3.3 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 presentes nas amostras

enriquecidas, com os mesmos, em concentrações correspondentes ao LIQ. E as respostas de picos interferentes no tempo de retenção dos padrões internos foram inferiores a 5% (cinco por cento) da resposta (sinal analítico) do padrão interno.

I.4.3.4 Efeito de Matriz

O efeito da matriz biológica na supressão da ionização é ilustrado na Tabela I.7, por meio dos valores FMN, onde os coeficientes de variação foram menores que 15%.

Tabela I.7 - Avaliação do efeito de matriz para as amostras de controle de qualidade baixo (CQB) e alto (CQA) ; n = 5.

Analito	FMN CQB (%CV)	FMN CQA (%CV)
Haloperidol	10,0	9,1
Olanzapina	9,8	9,5
Clonazepam	10,1	9,6
Mirtazapina	9,8	9,6
Paroxetina	8,0	6,3
Citalopram	5,4	9,1
Sertralina	6,8	9,7
Clorpromazina	8,6	10,3
Imipramina	9,3	12,4
Clomipramina	8,0	8,2
Quetiapina	8,3	10,6
Diazepam	6,8	11,4
Fluoxetina	9,4	9,0
Clozapina	9,4	9,6
Carbamazepina	9,1	5,3
Lamotrigina	6,8	8,2

I.4.3.5 Seletividade

Após otimização das condições cromatográficas, o tempo de 10 min foi suficiente para a análise dos 16 fármacos avaliados.

Os cromatogramas do método DPX/LC-MS/MS (modo SRM), obtidos a partir de um pool de amostras de plasma branco de referência de cinco diferentes procedências e destas amostras enriquecidas com os analitos na concentração correspondente ao LIQ ilustram a seletividade do método. Como observado na Figura I.12, nenhum pico interferente (componentes endógenos) foi observado nos tempos de retenção dos fármacos analisados. Os cromatogramas de plasma branco atestam que os compostos endógenos, presentes nas amostras de plasma, foram efetivamente removidos durante a etapa de preparo da amostra.

Figura I.12 - Cromatogramas SRM obtidos pelo método DPX/LC–MS/MS referentes às amostras de plasma branco de referência enriquecidas com os fármacos nas concentrações correspondentes ao LOQ. Os cromatogramas sobrepostos correspondem às amostras de plasma branco de referência.

Capítulo I – Resultados e Discussão

continua

continuação.

I.4.4 Comparação do método DPX/LC-MS/MS com outros métodos da literatura

Comparado aos métodos descritos na literatura que utilizam fases RAM (Tabela I.8) na determinação de fármacos anticonvulsivantes (LOPES et al., 2012), ansiolíticos (MULLETT;

PAWLISZYN, 2001; WALLES; MULLETT; PAWLISZYN, 2004a), antidepressivos (NETO et al., 2006a; SANTOS-NETO et al., 2008) e antipsicóticos (DE OLIVEIRA ISAC MORAES et al., 2013), o método DPX/LC-MS/MS desenvolvido, proporcionou intervalo de linearidade mais amplo e valores de LIQ inferiores.

O uso de LC-MS/MS proporcionou maior resolução e sensibilidade, ao método, com tempo de análise reduzido. Além disso, o uso de padrões internos isotópicos estáveis permitiu a quantificação inequívoca de todos os fármacos analisados.

Tabela I.8 - Comparação do método DPX/LC–MS/MS com outros métodos que empregam fases RAM para determinação de psicotrópicos em amostras biológicas.

Analitos	Matriz	Fase RAM	Técnica Analítica	LOQ (ng mL⁻¹)	Referências
16 fármacos psicotrópicos	Plasma Humano	RAM-BSA-C ₁₈	DPX-LC-MS/MS	0.5 – 10.5	Presente trabalho
Anticonvulsivantes: Carbamazepina e metabólitos	Leite Humano	RAM-BSA C ₁₈ (coluna analítica)	LC-IT-MS/MS	25 – 600	(LOPES et al., 2012)
Antidepressivos: Clonazepam, diazepam e outros.	Soro e Urina	RAM-ADS (Sistema multimensional)	LC-UV (Extração “on line”)	50-10000 (Ambas matrizes)	(MULLETT; PAWLISZYN, 2001)
Antidepressivos: Diazepam e outros	Sangue Humano	RAM-ADS	SPME-LC-MS	25-1000	(WALLES; MULLETT; PAWLISZYN, 2004b)
Ansiolítico: Fuoxetina	Plasma Humano	RAM-BSA-C ₁₈	Column-switching (LC-UV)	20-500	(NETO et al., 2006b)
Ansiolíticos: Fluoxetina e Norfluoxetina	Human plasma	RAM-BSA-C ₁₈	Column-switching (LC-UV)	15-500	(SANTOS-NETO et al., 2008)
Antipsicótico: Clorpromazina	Human plasma	RAMIP-BSA	Column-switching (LC-UV)	30-350	(DE OLIVEIRA ISAC MORAES et al., 2013)

LC-IT-MS/MS: Cromatografia Líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial, com analisador do tipo Ion-trap; ADS: sílica alquil-diol

I.4.5 Determinação dos fármacos em amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos por DPX-LC-MS/MS

Para avaliar a aplicabilidade do método DPX-LC-MS/MS, 4 amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos, em terapia com um ou mais fármacos psicotrópicos, foram analisadas (Tabela I.9).

Tabela I.9 - Concentrações plasmáticas dos fármacos determinados (DPX-LC-MS/MS) em pacientes esquizofrênicos para fins de monitorização terapêutica (n = 3).

Fármaco	Intervalo terapêutico* (ng mL ⁻¹)	Concentração Plasmática (ng mL ⁻¹)			
		Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3	Paciente 4
Citalopram	50-110	-	-	24	-
Sertralina	30-150	24	75	-	135
Clozapina	350-600	190	541	512	356
Lamotrigina	3000-14000	-	2420	1307	-

* Segundo (HIEMKE et al., 2012)

Como observado, algumas alterações nas concentrações plasmáticas de alguns fármacos, em alguns pacientes, foram encontradas empregando o método DPX/LC-MS/MS desenvolvido. Estes resultados vão de encontro com os obtidos, em outro trabalho, no qual o método de precipitação de proteínas foi utilizado (DOMINGUES et al., 2015). Neste, o método PPT/LC-MS/MS foi empregado na análise de 51 amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos, em terapia com um ou mais fármacos psicotrópicos, dentre os quais estão os pacientes avaliados pelo método DPX/LC-MS/MS. Os indivíduos, previamente diagnosticados com esquizofrenia, foram selecionados dentre os pacientes internados em tratamento na Enfermaria de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (EPQU-HCFMRP), e submetidos a uma única coleta de sangue para a determinação dos fármacos. Os fatores de inclusão considerados na seleção dos pacientes foram: a) Pacientes com diagnóstico de esquizofrenia de acordo com os critérios do DSM-IV; b) Idade entre 18 a 60 anos, de ambos os sexos, e que não tenham outras patologias clínicas

ou condições médicas gerais associadas; c) Pacientes que estejam em tratamento com antipsicóticos e medicamentos associados. d) Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado pelos pacientes ou responsáveis. Os fatores de exclusão considerados foram: a) Quadro de comprometimento da função renal; b) Gravidez ou potencial para engravidar; c) Situação atual de amamentação; d) Diagnóstico de *diabetes mellitus*; e) Quadro de deficiência cardíaca congestiva grave; f) Dependência de álcool e drogas; g) Portadores de imunodeficiência adquirida; h) Pacientes com infecções virais hepatotrópicas.

Como demonstra a Tabela I.10, considerando os antipsicóticos, seis, dos treze pacientes em tratamento com olanzapina, apresentaram níveis plasmáticos acima do intervalo terapêutico. Nos pacientes em terapia com clozapina (35 pacientes), níveis acima do intervalo terapêutico foram observados em dezessete deles, e níveis sub-terapêuticos em quatro destes pacientes. O paciente em tratamento com haloperidol apresentou nível plasmático em concordância com o intervalo terapêutico preconizado.

Tabela I.10 - Concentrações plasmáticas de fármacos determinados (PPT-LC-MS/MS) em pacientes esquizofrênicos.

Fármacos	Intervalo Terapêutico (ng mL ⁻¹)*	Nível de concentração plasmática (ng mL ⁻¹)	Número de Pacientes
Haloperidol	1 - 10	1	1
Olanzapina	20 – 80	3 -40	11
Citalopram	50 – 110	18 – 149	3
Sertralina	10 – 150	11 – 53	7
Imipramina	175 – 300	240	1
Clomipramina	230 – 450	14 – 402	2
Fluoxetina	120 – 500	99 – 742	3
Clozapina	350 – 600	204 – 1507	35
Lamotrigina	3000 – 14000	1136 - 5666	6

* Segundo (HIEMKE et al., 2012)

Dentre os pacientes em uso de antidepressivos, um apresentou nível plasmático abaixo e o outro, nível acima, do intervalo terapêutico, quando em tratamento com clomipramina. Pacientes em terapia com fluoxetina, dois apresentaram níveis acima e um nível sub-terapêutico. Para os sete pacientes em tratamento com sertralina, três apresentaram níveis plasmáticos abaixo do intervalo terapêutico. Para aqueles em terapia com imipramina (um paciente) e citalopram (três pacientes), apresentaram níveis plasmáticos em concordância com o intervalo terapêutico.

Para o anticonvulsivante lamotrigina, três dentre os seis pacientes em tratamento apresentaram níveis plasmáticos abaixo do intervalo terapêutico estabelecido.

A co-administração de dois ou mais fármacos podem levar à interações farmacocinéticas ou farmacodinâmicas. As alterações observadas nos níveis plasmáticos de clozapina, sertralina, lamotrigina, clomipramina e fluoxetina, nos pacientes em tratamento como esses fármacos, podem estar associadas à presença de interações farmacocinéticas. Estas interações podem ocorrer: 1º) no trato gastrointestinal quando a droga é administrada oralmente; 2º) por meio da competição por uma proteína de ligação (visto que > 90% destas drogas se ligam as proteínas plasmáticas); 3º) através de interações que envolvam os transportadores de fármacos, em particular a glicoproteína P (P-gp), que desempenha um papel importante na absorção, distribuição e excreção de uma grande variedade de agentes terapêuticos; 4º) e pelas interações envolvendo as enzimas metabolizadoras de drogas. Além disso, a relação dose/ efeito de um fármaco também pode variar de paciente para paciente, dependendo das diferenças farmacocinéticas influenciadas pela idade e alterações no metabolismo de primeira passagem.

A maioria das interações envolvendo os antipsicóticos está relacionada com a biotransformação enzimática destes fármacos associadas ao sistema enzimático citocromo P450 (CYP) (KENNEDY; JANN; KUTSCHER, 2013).

O nível plasmático tóxico observado no paciente em tratamento com clozapina combinada à fluoxetina (clozapina-fluoxetina) pode ser atribuído ao potente efeito inibidor da fluoxetina sobre a atividade da CYP2D6, uma isoforma do sistema citocromo P450, que contribui para a biotransformação da clozapina. Além disso, a fluoxetina pode inibir CYP2C19 e CYP3A4, que também desempenham um papel importante no metabolismo da clozapina (KENNEDY, 2014; JANN; KUTSCHER, 2013; SPINA; DE LEON, 2007). Para os pacientes tratados com olanzapina e fluoxetina, embora níveis plasmáticos de fluoxetina

abaixo do intervalo terapêutico tenham sido encontrados, estudos não apontam alteração significativa na concentração e depuração plasmática da olanzapina quando combinada a este fármaco (SPINA; DE LEON, 2007).

Antidepressivos, como fluoxetina e sertralina, e antipsicóticos, como a olanzapina, são substratos da glicoproteína-P, um transportador multidroga que atua limitando a absorção a partir do intestino e a permeabilidade através do cérebro, de várias drogas, além de promover a sua eliminação via urina e bile. Portanto, as alterações observadas nas concentrações plasmáticas destes fármacos podem estar associadas à inibição da glicoproteína-P. A inibição dessa proteína altera a absorção, distribuição e eliminação da droga e, consequentemente, o seu nível de concentração plasmática (SPINA; DE LEON, 2014). Pacientes fumantes também podem ter a farmacocinética da olanzapina alterada através dos efeitos do cigarro sobre CYP1A2 (URICHUK et al., 2008)

Interações entre os antidepressivos tricíclicos (imipramina e clomipramina) e os antipsicóticos não têm sido investigadas (SPINA; DE LEON, 2007). No entanto, níveis plasmáticos de clozapina acima do intervalo terapêutico também foram observados em pacientes tratados concomitantemente com sertralina (clozapina-sertralina). Uma vez que a sertralina é também metabolizada pelo sistema de isoenzimas do citocromo P450 (CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 e CYP3A4), doses mais elevadas deste fármaco podem aumentar a ação inibitória da atividade de CYP2D6 sobre o metabolismo dos antipsicóticos (KENNEDY; JANN; KUTSCHER, 2013).

Interações envolvendo as proteínas de ligação podem ocorrer entre antipsicóticos, como clozapina e olanzapina. Estes fármacos competem pelos mesmos sítios de ligação das proteínas, deslocando um dos fármacos e promovendo um aumento da sua fração livre no plasma ou tecido.

Interações entre a lamotrigina e clozapina também veem sendo observadas, porém não são clinicamente significativas (SPINA; DE LEON, 2007). Algumas alterações na farmacocinética destes fármacos podem estar associadas à co-administração de outras drogas não declaradas, a não aderência ao tratamento e a fatores intrínsecos do indivíduo.

Os resultados obtidos, portanto, demonstram a aplicação do método para à análise de fármacos em amostras de plasma, de pacientes esquizofrênicos, para fins de monitorização terapêutica. Estes estudos viabilizam a otimização do tratamento farmacológico, minimizando

os efeitos indesejados da terapia, que por consequência, melhoram a anuência do paciente reduzindo à recidivas.

Capítulo II

Desenvolvimento da fase extratora molecularmente impressa para extração de anandamida, em amostra de plasma de pacientes com doença de Parkinson, por in-tube SPME e análise por LC-MS/MS.

CAPÍTULO II

II.1 INTRODUÇÃO

II.1.1 A Doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP), originalmente descrita pelo médico inglês James Parkinson, em 1817, (JANKOVIC, 2008), é considerada a segunda doença neurodegenerativa mais comum depois da Doença de Alzheimer. No Brasil, sua prevalência chega a cerca de 3%, nos indivíduos com idade acima de 65 anos (BARBOSA et al., 2006), sendo grande maioria do sexo masculino.

A primeira descrição da DP foi feita quase dois séculos atrás, no entanto, somente no início da década de 60 que pesquisadores conseguiram identificar as primeiras alterações patológicas e bioquímicas no cérebro de indivíduos doentes, que caracterizariam essa doença. A DP consiste em um transtorno neurodegenerativo crônico e lentamente progressivo, caracterizado pela degeneração dos neurônios dopaminérgicos em uma porção do encéfalo conhecida como substância negra ou nigra. A morte proeminente destes neurônios leva a uma intensa redução dos níveis de dopamina nos gânglios basais (estruturas presentes no cérebro relacionadas ao movimento), culminando em uma desordem do movimento caracterizada por sintomas parkinsonianos clássicos (KALIA; LANG, 2015).

As principais manifestações clínicas da DP incluem tremores, rigidez, comprometimento da postura, lentidão (bradicinesia) e pobreza de movimento (hipocinesia). Essas características são, inicialmente, unilaterais, tornando-se bilaterais à medida que a doença vai progredindo. Embora os fenômenos motores constituam o grupo de manifestações clínicas predominantes nestes indivíduos, vários sintomas não motores também podem acompanhar a doença, tais como: distúrbios do sono, perda do olfato, distúrbios da fala e alterações neuropsiquiátricas. As anormalidades neuropsiquiátricas mais comumente observadas são transtornos de humor e de ansiedade, alterações de personalidade, perda cognitiva, delírios e alucinações (CLARKE, 2007; SCHRAG, 2004). Os sintomas autonômicos, como a incontinência urinária, constipação com a necessidade de laxantes diários e hipotensão postural sintomática, são também características não-motoras comuns nos estágios mais tardios da doença (KALIA; LANG, 2015).

Sem causa definida, a DP pode estar associada a uma complexa combinação de fatores genéticos e ambientais. Tal complexidade é acompanhada por desafios clínicos que incluem a incapacidade de fazer um diagnóstico definitivo nas fases iniciais da doença e dificuldades no controle dos sintomas em estágios posteriores (KALIA; LANG, 2015).

Há várias formas de tratamento para a doença, mas a medida mais eficaz consiste em restabelecer, ao menos parcialmente, a transmissão dopaminérgica. Os fármacos que aumentam as concentrações de dopamina intracerebral ou estimulam os receptores de dopamina continuam a ser o principal suporte do tratamento para os sintomas motores. O uso de fármacos dopaminérgicos, especialmente, a levodopa é uma das formas mais efetiva e viável de tratamento. A levodopa penetra no sistema nervoso central e, por ação da enzima dopa descarboxilase cerebral, é convertida em dopamina, restabelecendo a neurotransmissão dopaminérgica, e, por consequência, promovendo uma melhora acentuada dos sintomas relacionados ao movimento. Porém, o tratamento prolongado não interrompe a progressão da doença, e à medida que a mesma evolui, os níveis de medicação exigidos para o controle da função motora aumentam, gerando efeitos colaterais indesejáveis como as discinesias (distúrbio do movimento) e as falhas no efeito sintomático motor (FERRAZ, 1999).

II.1.2 Sistema endocanabinoide e a Doença de Parkinson

O sistema endocanabinóide compreende uma família de moléculas lipídicas neuromoduladoras conhecidas como “endocanabinóides”, seus receptores conhecidos como “receptores canabinóides” (CB) e um conjunto de enzimas que catalisam a síntese e a degradação destas moléculas (QI et al., 2015). De acordo com sua ordem de descoberta, tais receptores foram denominados CB1 e CB2, estando ambos acoplados à proteína G (classe de proteínas envolvidas na transdução de sinais celulares). O CB1 está primariamente localizado nos terminais nervosos pré-sinápticos e sua ativação tem sido associada à maioria das ações psicotrópicas e comportamentais de drogas canabinóides. Em contrapartida, os receptores CB2 estão, em sua maioria, localizados em células envolvidas em respostas imunes e inflamatórias, além de poderem expressar-se nos neurônios (SAITO; WOTJAK; MOREIRA, 2010).

Dada à ampla distribuição dos receptores CB no cérebro, os endocanabinóides estão associados a numerosas funções do sistema nervoso central, incluindo função motora,

controle da cognição, do aprendizado e da memória, e na modulação da dor (FERNANDEZ-RUIZ et al., 2000).

Os principais ligantes endógenos dos receptores CB1 e CB2 - os endocanabinóides – foram isolados em 1992 e são lipídios derivados do ácido araquidônico. Estes lipídios funcionam como mensageiros em junções neuronais sinápticas e são sintetizados, sob demanda, para uso imediato como moléculas de sinalização (QI et al., 2015).

A etanolamina araquidonoil (Figura I.13) foi o primeiro endocanabinóide derivado do ácido araquidônico a ser caracterizado. Apelidada de anandamida (AEA), do sânscrito *ananda*, que significa “felicidade”, esta molécula atua como agonista parcial dos receptores CB1 e CB2, mimetizando a maioria dos efeitos farmacológicos produzidos por fármacos canabinóides (DEVANE et al., 1992). Embora a anandamida esteja presente no cérebro em concentrações basais muito baixas, acredita-se que esta seja sintetizada, sob demanda, em membranas neuronais e liberada extracelularmente para ativar, especialmente, receptores CB1 (SOLINAS et al., 2006).

Figura I.13 – Estrutura química da anandamida

Os endocanabinóides, bem como os seus receptores, especialmente CB1, estão, abundantemente, presentes nas estruturas dos gânglios basais o que explica a importante função moduladora exercida por este sistema no controle do movimento. Portanto, os efeitos motores resultantes da ativação ou bloqueio da sinalização canabinóide estão relacionados à capacidade deste sistema em modular (regular) a atividade dos neurotransmissores que participam do controle da função dos gânglios basais, nomeadamente o glutamato, o GABA e a dopamina (FERNÁNDEZ-RUIZ, 2009).

Desde a descoberta do sistema endocanabinóide vários estudos veem sendo realizados no campo na neurociência, e estudos recentes apontam o sistema endocanabinóide como um

importante modulador da atividade dopaminérgica em áreas do cérebro que controlam o sistema motor, como os gânglios basais (FERRER et al., 2003). A primeira indicação de possíveis interações entre estes sistemas é dada pela coexistência de receptores CB1 e de dopamina (D1 e D2) em neurônios estriatais (HERMANN; MARSICANO; LUTZ, 2002). Outro indício está na ativação dos neurônios dopaminérgicos, bem como na liberação de dopamina, por endocanabinóides, como a AEA (FERNÁNDEZ-RUIZ, 2009; GIUFFRIDA; MCMAHON, 2010). Evidências farmacológicas e neuroquímicas indicam que a estimulação dos receptores de dopamina (D2) é acompanhada de um aumento dos níveis de AEA nos gânglios basais. O significado funcional do aumento de AEA induzido por dopamina não é completamente compreendido, contudo, acredita-se que esse aumento possa servir como um sinal de *feedback* negativo contrário a ativação da dopamina na função motora, ou seja, a relação AEA-dopamina poderia inibir o sistema que controla a atividade motora (GIUFFRIDA; MCMAHON, 2010).

A progressão da DP e o surgimento dos principais sintomas parkinsonianos estão associados à hiperatividade do sistema de sinalização canabinóide na maioria das estruturas dos gânglios basais em pacientes, bem como em modelos animais (como por exemplo, níveis elevados de endocanabinóides e aumento da densidade e função do receptor CB1). Este fato está de acordo com a presença de hipocinesia, que caracteriza esta doença, e com a possibilidade de antagonistas dos receptores CB1 serem úteis no alívio da bradicinesia (FERNÁNDEZ-RUIZ, 2009).

Portanto, as evidências experimentais descritas acima, apoiam a ideia de que o sistema endocanabinóide desempenha um papel importante na atividade motora. Assim, o gerenciamento farmacológico deste sistema de sinalização pode servir como uma nova terapia para o tratamento da disfunção de movimento nos distúrbios que afetam as estruturas dos gânglios basais (FERNÁNDEZ-RUIZ, 2009).

A determinação de endocanabinóides, em diferentes matrizes biológicas, tem sido alvo de muitos trabalhos (Tabela II.11). As concentrações encontradas variam, segundo a matriz analisada. Para amostras de plasma (pacientes saudáveis) uma concentração de AEA de 0,14 ng mL⁻¹ é esperada (BALVERS et al., 2013).

Tabela II.11 - Determinação de endocanabinóides em amostras de plasma.

Analito	Método de Extração	Condições cromatográficas	Sistema de detecção	LOQ	Referências
AEA e 2-AG	μ -SPE	FE = C18 FM = Água (80%); ácido fórmico 2,5mM em metanol (20%). (Eluição por gradiente)	LC – MS/MS	AEA = 0,29 ng mL ⁻¹ .	(BATTISTA et al., 2014)
AEA e outros	SPE	FE = HSST3; FM = A (água +0,1% de ácido); B (acetonitrila + 5% água + 0,1% ácido fórmico). (Eluição por gradiente)	UHPLC-MS	AEA = 0,12 ng mL ⁻¹ . (plasma)	(OTTRIA et al., 2014)
AEA, 2-AG e outros	Precipitação de proteínas (PPT)	FE = C8; FM = A (água/metanol/acetonitrila, 40:40:20, v/v) + 0,1% ácido fórmico B (metanol/acetonitrila 70:30, v/v) + 0,1% ácido fórmico. (Eluição por gradiente)	LC-MS/MS	AEA = 0,056 ng mL ⁻¹ .	(BALVERS et al., 2013)
AEA e 2-AG	LLE	FE = C18; FM: acetato de amônio 2mmol:metanol com 2mmol de acetato de amônio. (Eluição por gradiente)	LC-MS/MS	AEA = 0,5 nM	(ZOERNER et al., 2012)

continua

Analito	Método de Extração	Condições cromatográficas	Sistema de detecção	LOQ	Referências
AEA e outros	SPE e LLE	FE = C8; FM = (40:40:20, v/v) A (acetato de amônio + 0,1% de ácido fórmico em água:metanol (95: 5, v/v); B (acetato de amônio + 0,1% ácido fórmico em metanol); C (acetato de amônio + 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila:água (95: 5, v/v) (Eluição por gradiente)	LC-MS/MS	AEA = 0,064 ng.mL ⁻¹	(BALVERS; VERHOECKX; WITKAMP, 2009)

2-AG = 2-araquidonoil glicerol; AEA = anandamida/ araquidonoil etanolamida; μ -SPE = microextração em fase sólida; LC-MS/MS = cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em Tandem; SPE = extração em fase sólida ; LLE = extração líquido-líquido; UHPLC = cromatografia líquida de ultra eficiência; HSST3 = High Strength Silica T3.

II.1.3 Microextração em fase sólida no capilar (*in-tube* SPME)

A microextração em fase sólida no capilar (*SPME no tubo*) consiste no acoplamento da tradicional técnica de microextração em fase sólida (SPME), desenvolvida por Pawliszyn e colaboradores (EISERT; PAWLISZYN, 1997), com a cromatografia líquida (LC), sem o uso de uma interface especial para a dessorção dos analitos (QUEIROZ et al., 2002). Trata-se de uma técnica de preparo de amostras, na qual uma coluna capilar aberta de sílica fundida, revestida internamente com a fase extratora, é utilizada como dispositivo para a microextração e pré-concentração de analitos podendo, facilmente, ser acoplada a sistemas HPLC.

A automação do processo de extração, reduz o tempo de análise e fornece melhor precisão e sensibilidade ao método, quando comparado às técnicas *off-line* convencionais (KATAOKA et al., 2009).

O sistema in-tube SPME-LC no capilar pode ser, facilmente, montado fixando a coluna capilar entre a alça de amostragem e a agulha do injetor automático do LC ou, simplesmente, substituindo a alça de amostragem. O injetor automático aspira a amostra e transporta-a para a coluna capilar a uma vazão constante. Os analitos da amostra são diretamente extraídos e pré-concentrados, pelo revestimento interno da coluna capilar, por meio de repetidos ciclos aspirar/dispensar, programados pelo injetor automático. Na coluna capilar ocorre o processo de partição ou sorção do analito com a fase estacionária até que o equilíbrio seja atingido. Durante o processo de extração, a válvula do injetor HPLC deverá estar na posição carregar (Figura II.14a) (QUEIROZ; LANÇAS, 2005).

Os analitos extraídos são dessorvidos rapidamente da fase estacionária, do capilar, pela fase móvel ou pela adição de um solvente orgânico, após posicionar a válvula do injetor LC na posição injetar (Figura II.14b). Os analitos dessorvidos são transferidos para a coluna analítica do LC, para separação e detecção em ultravioleta (UV) ou espectrometria de massas (MS). Desta forma, a técnica in-tube SPME não necessita de uma interface específica SPME-LC para dessorção dos analitos (QUEIROZ; LANÇAS, 2005). Para evitar a presença de partículas no transporte das amostras biológicas ao longo do capilar, as proteínas têm sido removidas através de filtragem em micro filtro ou por precipitação com solventes orgânicos (MULLETT et al., 2002; MULLETT; MARTIN; PAWLISZYN, 2001).

Figura II.14 - Sistema de extração SPME-LC “no capilar”.

Fonte: (QUEIROZ; LANÇAS, 2005)

A técnica *in-tube* SPME tem sido também utilizada no modo *off-line*. A micro coluna capilar é acoplada a uma microseringa HPLC convencional (Figura II.15). Recentemente, QUEIROZ e colaboradores desenvolveram um capilar com fase molecularmente impressa com revestimento hidrofílico (MIP-RAM) para sorção seletiva de parabenos e exclusão das macromoléculas de amostras de leite materno. Após a extração *in-tube* SPME, uma alíquota do extrato foi injetada no sistema LC-MS/MS (SOUZA et al., 2016).

Figura II.15 - Esquema de um sistema *in-tube* SPME “off-line”.

Fonte: Adaptado de (SOUZA et al., 2016).

A técnica *in-tube* SPME com diferentes fases seletivas, tais como os materiais de acesso restrito, polímeros molecularmente impressos, imunossorventes, monolíticas, dentre outras, tem sido acoplada a diferentes sistemas de detectores, principalmente à espectrometria de massas em *Tandem*, para a determinação de ampla gama de analitos para aplicações em diferentes áreas (QUEIROZ; MELO, 2014).

II.1.4 Polímeros Molecularmente Impressos

Os polímeros molecularmente impressos (*Molecular Imprinted Polymers - MIPs*) são materiais sintéticos com capacidade de reconhecimento molecular, dotados de sítios altamente seletivos para uma determinada molécula alvo. Uma vez que os MIPs apresentam sítios de

ligação com afinidades e seletividades aproximadas aos dos sistemas antígeno - anticorpo, estes materiais são também chamados de polímeros biomiméticos. Seu comportamento mimetiza as interações estabelecidas por receptores naturais para reter seletivamente uma molécula alvo, porém sem as limitações de estabilidade associadas aos imunossorventes (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005). Comparados aos imunossorventes, os MIPs, apresentam maior reprodutibilidade de síntese, maior resistência física, robustez, estabilidade química e menor custo. Além destas vantagens, os MIPs após serem secos, podem ser armazenados por longos períodos de tempo sem que haja perda da eficiência inicial (CHEONG; YANG; ALI, 2013).

Os MIPs têm sido amplamente utilizados em diferentes áreas da química como na separação de enantiômeros (LIU et al., 2007), sensores eletroquímicos (LIU et al., 2007), receptores de anticorpos (LAVIGNAC; ALLENDER; BRAIN, 2004) e como sorventes seletivos para a pré-concentração ou para clean-up de diferentes classes de compostos em diferentes matrizes complexas (HU et al., 2013).

O processo mais comum de preparo dos MIPs envolve, tipicamente, a polimerização de um monômero funcional (ou dois) na presença de uma molécula molde (que pode ser o próprio analito ou uma molécula análoga a ele), Figura II.16.

Figura II.16 - Esquema geral de síntese dos MIPs.

Fonte: Adaptado de (MAHONY et al., 2005)

Os monômeros são escolhidos considerando a sua capacidade de interagir com os grupos funcionais da molécula molde. Assim, na presença de um agente reticulante e um iniciador radicalar, há uma polimerização em torno do complexo molde-monômero, gerando uma rede polimérica tridimensional altamente entrecruzada. Uma vez ocorrida a polimerização, a molécula molde é removida das cavidades do polímero, dando origem a cavidades com sítios de ligação com forma, tamanho e funcionalidades complementares à molécula alvo. Estas cavidades constituem os sítios específicos de ligação do polímero que atuam no reconhecimento do molde e/ou compostos com estrutura química semelhante ao analito de interesse (MAYES; WHITCOMBE, 2005; TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005). Portanto, os reagentes químicos envolvidos no processo de síntese do MIP devem ser escolhidos, criteriosamente, para assegurar a formação de cavidades altamente seletivas. Os polímeros impressos resultantes são estáveis, robustos e resistentes a uma ampla variedade de pH, solventes e temperaturas (TAMAYO; TURIEL; MARTÍN-ESTEBAN, 2007).

De acordo com o tipo de interação estabelecida entre a molécula molde e o monômero funcional (mistura de pré-polimerização) e, subsequentemente, na religação do analito ao MIP, o processo de impressão molecular pode ser classificado em covalente e não covalente (TAMAYO; TURIEL; MARTÍN-ESTEBAN, 2007; TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005).

Nos processos de impressão molecular obtidos no modo covalente, a interação entre os grupos funcionais da molécula molde e do monômero, no processo de pré-polimerização e na etapa de religação (sorção dos analitos) são, essencialmente, covalentes. Por se tratar de um processo no qual a estequiometria é conhecida, não há grandes excessos de monômero funcional e, por consequência, há a formação de sítios mais homogêneos e com menor quantidade de interações inespecíficas no MIP. No entanto, este tipo de abordagem é restrito à molécula contendo grupos aldeídos, cetonas, aminas, álcoois ou ácidos carboxílicos, além de poder ser um processo mais laborioso e dispendioso. MIP (MAYES; WHITCOMBE, 2005). Portanto, embora os processos envolvendo interações covalentes deem origem a complexos mais estáveis (molde:monômero), a abordagem não-covalente é, de longe, a mais utilizada, para o preparo desses materiais (HU et al., 2013).

Nos processos não-covalente, há a formação de interações não covalentes relativamente fracas (tais como ligação de hidrogênio, interação dipolo- dipolo, interação iônica e interações hidrofóbicas) entre a molécula molde e o monômero. Nesta, a molécula molde é misturada

diretamente a um ou mais monómeros funcionais, na etapa de polimerização, podendo ser facilmente extraída do polímero e religada. Esta abordagem é particularmente interessante pela sua simplicidade experimental e disponibilidade comercial de diferentes monômeros capazes de interagir com praticamente qualquer tipo de molécula molde. Contudo, não está livre de algumas desvantagens derivadas do fato de as interações molde-monômero serem governadas por um processo de equilíbrio. Assim, para deslocar o equilíbrio para a formação do complexo molde-monômero, utiliza-se uma quantidade elevada de monômero. Consequentemente, o excesso de monômeros livres é incorporado aleatoriamente à matriz polimérica levando à formação de sítios de ligação inespecíficos (TAMAYO; TURIEL; MARTÍN-ESTEBAN, 2007).

A polimerização radicalar é o método sintético mais comumente empregado na conversão de monômero a polímero, sendo os polímeros de impressão molecular a base de acrílicos ou acrilatos orgânicos, os mais comumente encontrados (CORMACK; ELORZA, 2004; HU et al., 2013).

O mecanismo de polimerização radicalar caracteriza-se por três etapas distintas: (1) iniciação, (2) propagação e (3) término. A taxa de propagação (crescimento da cadeia) é geralmente muito mais rápida do que a taxa de iniciação. Ou seja, assim que uma nova cadeia de polímero começa a crescer ela se propaga em um período de tempo relativamente curto. Isso significa que o produto, de alto peso molecular, formado está presente no sistema mesmo quando a quantidade de monômero consumido é baixa. Outra evidência é que a fonte de radicais livres (o iniciador radicalar) está normalmente ativa durante todo o processo de polimerização. Portanto, é possível afirmar que no meio reacional, encontra-se os monômeros e iniciador que não reagiram, as cadeias poliméricas em propagação (em crescimento) e as cadeias, de alto peso molecular, já polimerizadas (CORMACK; ELORZA, 2004).

A polimerização radicalar pode ser realizada, sob condições brandas de temperatura, em massa (“*bulk*”) ou em solução. Dentre os métodos utilizados para a obtenção dos MIPs, a polimerização em massa (“*bulk*”) é, de longe, o mais utilizado. Neste, o polímero obtido deve é triturado, moído e peneirado a fim de se obter partículas úteis, que geralmente são irregulares em tamanho e forma, mesmo após a peneiração. Apesar da simplicidade experimental do processo de polimerização em massa, as partículas obtidas, invariavelmente, possuem uma distribuição heterogênea em forma e tamanho, o que limita a acessibilidade do

analito às cavidades seletivas do polímero (PICHON; CHAPUIS-HUGON, 2008). Além, com o processo de moagem, uma baixa porcentagem de partículas é reaproveitada (30-40%).

A fim de solucionar tais limitações, outros métodos vêm sendo aplicados na síntese destes polímeros, como a polimerização por suspensão, a polimerização em multi-etapas e a polimerização por precipitação (PICHON; CHAPUIS-HUGON, 2008).

A polimerização radicalar por precipitação é realizada de forma semelhante à polimerização em massa, porém, com a adição de maiores volumes de solvente porogênico (2-10 vezes mais). Assim, à medida que a polimerização vai ocorrendo, as cadeias poliméricas em propagação, vão tornando-se insolúveis na fase líquida e precipitam. Este método é considerado simples e pode gerar micro partículas, desde que haja um controle preciso dos parâmetros que regem o processo de polimerização (temperatura, *template*, iniciador, agente reticulante e solvente).

II.1.4.1 Template – molécula molde

Em todos os processos de impressão molecular, deve-se avaliar a molécula molde quanto à presença de grupos funcionais capazes de se ligarem ao monômero funcional. Infelizmente, e por uma variedade de razões, nem todas as moléculas são passíveis de serem usadas como *template*. Nos processos de polimerização radicalar, a molécula molde deve, idealmente, ser quimicamente inerte nas condições de síntese do polímero. Dessa forma a molécula molde deve ser avaliada quanto (1) à presença de grupos polimerizáveis (podem polimerizar junto à rede polimérica); (2) à presença de grupos funcionais que possam inibir ou retardar a reação de polimerização via radicais livres e (3) quanto a sua estabilidade em temperaturas moderadamente elevadas ou após exposição a irradiação UV (CORMACK; ELORZA, 2004).

II.1.4.2 Monômero funcional

Os monômeros funcionais são responsáveis pelo tipo de interação no processo de impressão molecular. A formação do complexo molde-monômero funcional obedece ao princípio de Le Chatelier (YAN; HO ROW, 2006), ou seja, um aumento na concentração de monômero funcional provoca o deslocamento químico estabelecido no sentido de formação do complexo. Em processos não-covalente, razões molares de 1:4 de monômeros ou mais,

têm sido utilizadas. A escolha do monômero funcional deve basear-se na complementariedade deste com a molécula molde. Dessa forma, é muito comum o emprego de um monômero doador de prótons (caráter ácido) e uma molécula molde receptora de prótons (caráter básico), ou vice-versa, para maximizar a formação do complexo, e por consequência, o efeito de impressão. Dentre estes, estão o ácido metacrílico e a 4-vinilpiridina (Figura II.17), que são os mais usados na síntese de MIPs para moléculas básicas e ácidas, respectivamente (CORMACK; ELORZA, 2004; FIGUEIREDO et al., 2008)

Figura II.17 - Estrutura dos principais monômeros funcionais.

4 - Vinilpiridina

Ácido metacrílico

Fonte: Próprio autor

II.1.4.3 Agente reticulante

O agente reticulante é adicionado ao meio reacional com a finalidade de gerar uma estrutura polimérica, entrecruzada, em torno do complexo molde:monômero funcional. Este é responsável por controlar a morfologia do MIP e estabilizar os sítios de impressão molecular, conferindo uma maior estabilidade mecânica ao polímero. Além, altas proporções de agente reticulante (em relação ao monômero funcional) são requeridas para assegurar a porosidade do MIP. Diferentes compostos, disponíveis comercialmente, têm sido utilizados como agente de reticulação. O composto etilenoglicol dimetacrilato (Figura II.18) tem se destacado por conferir maior estabilidade térmica e mecânica ao polímero (CORMACK; ELORZA, 2004).

Figura II.18 – Estrutura química do etilenoglicol dimetacrilato.

Etilenoglicol dimetacrilato

Fonte: Próprio autor

II.1.4.4 Solvente porogênico

Os solventes porogênicos desempenham um papel importante na formação da estrutura porosa do MIP. Sabe-se que a natureza e o nível de solventes porogênicos determinam a força das interações não covalentes e influenciam a morfologia do polímero que, obviamente, afeta diretamente o desempenho do polímero. Inicialmente, o solvente serve para integrar todos os reagentes de síntese em uma única fase. Portanto, molécula molde, iniciador, monômero funcional e agente reticulante devem ser solúveis neste solvente. Contudo, ele não pode interferir na formação do complexo molde:monômero, o que pode resultar na formação de sítios de ligação pouco seletivos e em pequeno número. Sabe-se que a natureza e o nível de solventes porogênicos determinam a força das interações não covalentes e influenciam a morfologia do polímero que, obviamente, afeta diretamente o desempenho da MIP. Dessa forma, o solvente adequado deve ser apolar, aprótico e de baixa constante dielétrica (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005). Em contrapartida, é importante destacar que a capacidade térmica, bem como o volume do solvente (em relação aos demais reagentes), estão diretamente relacionados à estabilidade mecânica e a quantidade dos poros formados no MIP (CORMACK; ELORZA, 2004).

II.1.4.5 Iniciador

Muitos compostos, com diferentes propriedades químicas, podem ser utilizados como iniciador radicalar. Normalmente, eles são usados em baixas concentrações em comparação ao monômero funcional (normalmente, 1% em massa ou em mol, em relação ao número total

de mols de duplas ligações polimerizáveis). A taxa e o modo de decomposição de um iniciador á radicais livres podem ser desencadeados e controlados de várias maneiras, incluindo calor, luz e por meios químicos / eletroquímicos, dependendo da sua natureza química. Por exemplo, o iniciador 2,2'-azobisisobutironitrila (AIBN), Figura II.19, pode convenientemente ser decomposto por fotólise (UV) ou termólise originado radicais estabilizados, capazes de iniciar o crescimento de uma série de monómeros vinílicos (CORMACK; ELORZA, 2004; YAN; HO ROW, 2006).

A presença de gás oxigênio, no meio reacional, retarda o processo de polimerização radicalar. Portanto, para garantir uma boa reproduibilidade na síntese do MIP, é importante que todo o oxigênio seja removido. A remoção de oxigênio dissolvido pode ser feita em banho de ultrassom ou por pulverização da solução com um gás inerte, como por exemplo, nitrogênio ou argônio (YAN; HO ROW, 2006).

Figura II.19 - Estrutura química do iniciador radicalar AIBN.

2, 2' - azobisisobutironitrila

Fonte: Próprio autor

O processo de polimerização radicalar pode também ocorrer “in-situ”. Como será visto neste trabalho, o processo de polimerização radicalar pode ocorrer no interior de um capilar de sílica fundida (*in-situ*), originando uma fina camada de material polimérico na superfície interna do mesmo. Esta técnica é bastante atraente devido à facilidade experimental, visto que o material polimérico sintetizado não requer tratamento especial, podendo ser utilizado, imediatamente, após a remoção da molécula molde. Devido à boa reprodutibilidade do polímero formado, os capilares MIPs têm sido aplicados, em conjunto com técnicas de extração, no processo de pré-concentração do analito, a partir de diferentes matrizes (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005).

II.2 OBJETIVOS

Desenvolvimento de uma fase estacionária de polímero molecularmente impresso para *in-tube* SPME de anandamida, em amostras de plasma de pacientes com Doença de Parkinson, e análise por LC-MS/MS.

II.2.1 Objetivos específicos

- Síntese e caracterização das fases de polímero molecularmente impresso (MIP) e não impresso (NIP);
- Otimização dos parâmetros envolvidos no processo de extração por “in-tube” SPME off-line;
- Padronização e validação do método in-tube SPME/LC-MS/MS, para a determinação de anandamida em amostras de plasma de pacientes com doença de Parkinson;
- Análise de amostras de plasma de pacientes com Doença de Parkinson.

II.3 MATERIAIS E MÉTODOS

II.3.1 Padrões Analíticos, Reagentes e Materiais

Os padrões analíticos de AEA, AEA d₄ foram adquiridos da Cayman Chemical (Michigan, USA). O solvente tolueno foi adquirido da JT Baker, Phillipsburg, EUA. A molécula N-araquidoil etanolamina (molde) foi adquirida da Cayman Chemical (Michigan, USA). O viniltrimetoxissilano (usado para silanizar o capilar), o dimetacrilato de etilenoglicol (EGDMA) e o ácido metacrílico (MAA), foram ambos obtidos da Sigma-Aldrich, St. Louis, USA. O 2,2-azobisisobutironitrilo (AIBN) foi fornecido pela Merck (São Paulo-BR). As fases móveis, acetonitrila, grau HPLC, e ácido fórmico (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), foram filtradas através de um sistema de filtragem a vácuo, com membrana de celulose, adquirida pela Millipore e desgaseificada 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. Os fármacos empregados no estudo de seletividade do MIP, foram adquiridos da Cerilliant Corporation (Texas, USA).

II.3.2 Soluções estoque e Padrões de Calibração

As soluções estoque de padrão e padrão interno de anandamida foram preparadas em acetonitrila, nas concentrações de 1000 ng mL⁻¹ e 18,75 ng mL⁻¹ para AEA e AEA d₄, respectivamente. Os padrões de calibração foram preparados a partir da diluição, em acetonitrila, da solução padrão estoque de anandamida no intervalo de concentração de 5 ng.mL⁻¹ a 20 ng.mL⁻¹. O padrão interno foi também preparado em acetonitrila a uma concentração de 10 ng mL⁻¹. Todas as soluções foram armazenadas em frasco âmbar, rotuladas e estocadas a - 80°C.

II.3.3 Síntese do Polímero Molecularmente Impresso

O MIP foi sintetizado, “in-situ”, no interior de um capilar de sílica fundida aberto (0,53 mm d.i, 7,5 cm), de maneira que apenas a superfície interna deste capilar pudesse ser totalmente revestida pelo polímero. Inicialmente, o capilar foi ativado com uma solução de

NaOH (1 mol L⁻¹), seguido de ativação com solução de HCl (0,1 mol L⁻¹). O mesmo foi lavado com água ultrapura e seco em estufa, a 60 °C, por 12 h. Para a silanização da superfície interna do capilar, o mesmo foi preenchido com viniltrimetoxisilano, vedado, e colocado em banho, a 85°C, durante 2 h (HO et al., 2014). Em seguida, o capilar foi lavado com metanol.

Para o preparo do MIP, inicialmente misturou-se 5 mg de N-araquidol etanolamina (template) a 5 mL de tolueno (solvente porogênico) em frasco de vidro com tampa de rosca. A esta mistura adicionou-se 50 µL do monômero funcional (ácido metacrílico) e a mesma foi colocada sob agitação, a 60 °C, por 4h. Em seguida, adicionou-se à solução, 100 µL do agente reticulante (EGDMA) e 100 µL do iniciador radicalar (AIBN). O frasco foi sonificado e a solução degaseificada, sob fluxo de nitrogênio, durante 10 min. Esta solução foi introduzida no capilar funcionalizado, tendo suas extremidades sido seladas com septos de silicone. O mesmo foi colocado em banho, a 60°C, durante 20 h, para que ocorresse a polimerização. Após, o capilar foi lavado com etanol para garantir a remoção dos resíduos de síntese. O polímero não impresso (NIP) foi preparado seguindo o mesmo procedimento, porém na ausência da molécula molde. Para o MIP, diferentes razões molares (1:3; 1:4 e 1:5) entre template e monômero funcional foram avaliadas.

II.3.4 Caracterização morfológica dos polímeros sintetizados

A caracterização física do material polimérico foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As análises foram realizadas em Microscópio Eletrônico de Varredura (Zeiss EVO50, Cambrigde – UK) do Departamento de Química, FFCLRP, da Universidade de São Paulo. As medidas foram feitas sob tensão de 20.00 kV, magnitude 10.00 KX e resolução nominal de 1µm.

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

II.3.5 Pré-tratamento das amostras de plasma – Precipitação de proteínas

Visando diminuir a viscosidade da amostra e a adsorção irreversível das proteínas aos poros do MIP, previamente à otimização do processo de extração e validação do método proposto, as amostras de plasma (200 μL) foram submetidas à precipitação de proteínas. Acetonitrila foi empregada como solvente de precipitação a uma proporção de 2:1 (v/v). A mistura foi agitada, em vórtex, durante 10 segundos e, posteriormente, centrifugada a uma rotação de 9000 RPM e a 15 °C, por 15 min. O sobrenadante (350 μL) foi coletado, seco em um concentrador a vácuo (Eppendorf), e em seguida, reconstituído com 200 μL de solução tampão de acetato de amônio (pH=9) adicionada de 10% de ACN (condições previamente otimizada).

II.3.6 Condições LC-MS/MS

Para as separações cromatográficas empregou-se uma coluna Kinetex C18 (100 mm x 2,1mm x 1,7 μm) da Phenomenex® - EUA, a uma temperatura de 40 °C. A Fase móvel empregada constituiu-se de um solvente A (água + 0,5% de ácido fórmico) e um solvente B (acetonitrila), a uma proporção de 30:70 (v/v), com vazão de 0,4 mL min⁻¹, em modo isocrático. As condições MS/MS foram otimizadas no modo SRM, com ionização por eletrospray e no modo positivo de análise, através de infusão direta de soluções aquosas enriquecidas com o analito. As condições de ionização estabelecidas foram as seguintes: voltagem do capilar de 3, 20 kV, temperatura da fonte de íons: 150 °C, gás de dessolvatação: nitrogênio (fluxo de 700 L h⁻¹, 350 °C) e argônio como gás de colisão. A voltagem do cone e a energia de colisão foi também determinada (Tabela II.12). Selecionou-se dois íons-produto no modo SRM *Daughter Scan*, um para análise quantitativa e outro para análise qualitativa. As duas transições específicas foram determinadas de maneira automática, aumentando-se a confiabilidade do método. Os dados foram coletados utilizando-se o sistema MassLynx 4.1 e para processamento do dado e quantificação o software QuanLynx.

Tabela II.12 - Transições MS/MS, energia do cone (DP) e energia de colisão (CE) para o endocanabinóide anandamida.

Analito	Íon precursor (<i>m/z</i>)	Íon produto (<i>m/z</i>)	DP (V)	CE (eV)	Íon de confirmação (<i>m/z</i>)	RT (min)
AEA	348,35	61,82	14	18/50	90,82	1,86
AEA-d ₄	352,41	65,92	26	18/34	47,84	1,84

O íon utilizado para quantificar a AEA foi o íon de maior intensidade, de razão massa carga (*m/z*) 61,82, que corresponde à protonação da etanolamina após a clivagem da molécula da amida (QI et al., 2015), como mostra a Figura II.20.

Figura II.20 - Fragmentação da molécula de AEA.

Fonte: Próprio autor

II.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

II.4.1 Síntese do polímero molecularmente impresso

Para a síntese dos polímeros, inicialmente, a superfície interna do capilar de sílica fundida foi funcionalizada com viniltrimetoxissilano, através de ligações covalentes deste reagente, com os grupamentos silanóis presentes na parede do capilar (HO et al., 2014). A etapa de funcionalização (Figura II.21a), que ocorreu no interior do capilar, gerou grupos vinil que permitiram a polimerização do MIP, via radicalar, na superfície interna do mesmo (Figura II.21b).

Figura II.21 - Esquema de síntese do capilar MIP: (21a) Funcionalização no interior do capilar e (21b) Polimerização.

Fonte: Próprio autor, adaptado de (HO et al., 2014)

O ácido metacrílico foi escolhido como monômero funcional, pois possui grupos funcionais que interagem em tamanho e em forma complementar, por meio de ligações de hidrogênio, com os grupos funcionais presentes na molécula N - araquidoil etanolamina (template). Baixas concentrações de monômero funcional, em relação à molécula molde, podem causar problemas por insuficiência de monômeros para formação do complexo monômero-molde, diminuindo, assim, a quantidade de sítios específicos no polímero final. Por outro lado, o excesso de monômeros funcionais é incorporado de forma randômica na cadeia polimérica, interagindo de forma não específica com os compostos endógenos da amostra biológica, durante o procedimento de extração, podendo adsorvê-los (RACHKOV; MINOURA, 2000). Diferentes proporções molde : monômero funcional foram avaliadas quanto a capacidade de sorção de AEA (Figura II.22).

Figura II.22 - Otimização da razão molar template: monômero funcional: 200 μL de solução tampão acetato de amônio 5mM (pH=9), enriquecido com padrão de AEA (100 ng mL^{-1}); dessorção com 4 x 50 μL de ACN.

Como observado, o capilar sintetizado empregando razão molar de 1:5 (molde: monômero) apresentou maior capacidade de sorção. No entanto, o excesso de monômero funcional pode gerar sítios não específicos no polímero, com consequente, perda de seletividade. Dessa forma, o polímero sintetizado na razão 1:3 foi o polímero de escolha para o método in-tube SPME, já que apresentou maior reprodutibilidade entre as replicatas.

A razão 1:12 de EGDMA : monômero funcional favoreceu as interações entre o monômero e a molécula molde, além de fornecer estabilidade química a matriz polimérica. Em virtude da solubilidade da molécula molde em tolueno, este foi o solvente empregado na síntese do polímero. O tolueno, por ser um solvente aprótico, favoreceu as ligações de hidrogênio durante a formação do complexo molde-monômero (pré polimerização).

AIBN foi utilizado como iniciador radicalar por apresentar alta eficiência nas polymerizações radiculares, ter baixo custo e também por permitir o uso de condições brandas de síntese.

A molécula molde deve ser inerte ao meio reacional e estável sob as condições de síntese. A presença de grupos polimerizáveis em sua estrutura pode ocasionar sua copolimerização com os demais monômeros e consequente não formação de sítios específicos no polímero. Portanto, na síntese do MIP proposto, o analito AEA não foi utilizado como molécula molde, visto que o mesmo apresenta duplas polimerizáveis em sua estrutura (Figura II.23a). Dessa forma, o N - araquidoil etanolamina foi a molécula de escolha na síntese do MIP por apresentar estrutura análoga a AEA e não conter grupos polimerizáveis (Figura II.23b).

Figura II.23 - Estruturas químicas de AEA (a) e N - araquidoil etanolamina (b)

Fonte: Próprio autor

O NIP foi sintetizado, seguindo o mesmo procedimento, porém sem a adição da molécula molde ao meio reacional.

II.4.2 Remoção da molécula molde do MIP

Para a remoção da molécula molde das cavidades específicas do MIP, o polímero foi lavado com etanol, durante 1 hora, com o auxílio de uma bomba HPLC. Alíquotas dessa solução foram coletadas e injetadas, em sistema LC-MS/MS, para a avaliação da eficiência do processo de remoção da molécula molde.

II.4.3 Caracterização morfológica dos polímeros

Com a finalidade de caracterizar o polímero impresso (MIP) e não – impresso (NIP) quanto a sua morfologia, análises de microscopia eletrônica de varredura foram feitas, utilizando pequenos pedaços dos capilares MIP, NIP e branco (capilar de sílica fundida não submetido ao processo de síntese), como demonstrado na Figura II.24.

Figura II.24 - Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura dos capilares de sílica fundida (a) MIP, (b) NIP e (c) capilar branco (EHT = 20.00 K V e Mag = 10.00 K X)

Os capilares foram comparados, e embora, uma comparação visual não seja suficiente para assegurar que há diferenças entre os polímeros, as imagens mostraram total recobrimento das paredes internas dos capilares MIP (Figura II.24a) e NIP (Figura II.24b), quando comparados ao capilar branco (Figura II.24c), demonstrando a eficiência do processo de síntese. Partículas maiores, medindo em torno de $1\mu\text{m}$, e aparentemente, mais porosas que as observadas no capilar NIP puderam ser observadas para o capilar MIP. Esta maior porosidade pode ser atribuída à presença da molécula molde, ausente no polímero não-impresso.

Os espectros FTIR (Figura II.25) dos polímeros impresso (MIP) e não impresso (NIP) não apresentaram diferenças químicas significativas em termos de presença ou ausência de grupos químicos específicos.

Figura II.25 - Espectros FTIR para MIP e NIP.

Bandas relacionadas aos grupos funcionais dos reagentes de síntese incorporados às cadeias poliméricas podem ser observadas. As bandas em 1728 e 3507 cm^{-1} correspondem,

respectivamente, a carbonila (C=O) e hidroxila (OH), provenientes da ligação de hidrogênio com o grupo carboxílico (-COOH) do ácido metacrílico. A banda em 1456 cm^{-1} corresponde às vibrações de ligação, simétrica (1259 cm^{-1}) e assimétrica (1262 cm^{-1}) da ligação C-O de ésteres (proveniente do agente reticulante EGDMA). Banda, característica da ligação C-H em polímeros, em 2688 cm^{-1} , pôde também ser observada. A presença de grupos vinílicos (resultantes da associação entre monômero funcional e reticulante) pode ser confirmada por um pico em 1637 cm^{-1} , harmônicos de OH, e por um pico em 960 cm^{-1} relativo à flexão fora do plano da ligação C-H vinílica (COATES, 2006; MIRANDA; DOMINGUES; QUEIROZ, 2016).

II.4.4 Otimização dos parâmetros in-tube SPME

A otimização dos parâmetros envolvidos no processo “in-tube” SPME, no modo off-line, visa aumentar a eficiência de extração e diminuir o tempo de análise. Para tal, amostras (200 μL .) enriquecidas com padrão de anandamida, a uma concentração de 100 ng μL , foram utilizadas. Todas as análises foram realizadas em triplicata e as variáveis, pH da amostra, solvente de sorção, volume e solução de lavagem, ciclos e volume de dessorção, foram avaliadas.

II.4.4.1 pH da amostra

A primeira variável avaliada na otimização do processo *in-tube SPME* foi o pH da amostra. Soluções tampão de acetato de amônio (5mM), em três diferentes valores de pH (4,0; 7,0 e 9,0), foram avaliadas. Conforme mostram os resultados (Figura II.26), a eficiência do processo de extração aumentou com o aumento do pH da amostra. Isto é, em pH 9,0 uma maior sensibilidade do método foi alcançada. Em condições ácidas, a seletividade do MIP diminui, porque o EGDMA pode estabelecer ligações de hidrogênio com os sítios não seletivos do polímero (SOUZA et al., 2016).

Figura II.26 - Influência do pH da amostra na pré-concentração de AEA pela fase MIP, em 200 μL de tampão acetato 5 mM, enriquecidos com padrão na concentração de 100 ng.mL^{-1} .

Por se tratar de uma molécula derivada de um ácido graxo (ácido araquidônico), a AEA é um composto lipofílico. No entanto, os grupos amida e glicerol, presentes em sua estrutura, conferem a ela certa solubilidade em água, podendo assim ser solúvel tanto em solventes próticos como apróticos. Em meios aquosos de pH neutro, a AEA, provavelmente, se encontra como molécula não-ionizada (ZOERNER et al., 2011). Portanto, em pH 9 as interações iônicas são favorecidas.

II.4.4.2 Solução de sorção

Após precipitação das proteínas presentes nas amostras de plasmas (200 μL), o sobrenadante foi coletado, seco e reconstituído em tampão acetato de amônio (5 mM, pH = 9). Visando melhorar a sorção de AEA pelo polímero, 10% de acetonitrila foram adicionados a esta solução. Como mostra a Figura II.27, a adição de acetonitrila em solução aquosa, para a reconstituição do extrato seco, favoreceu a solubilidade da AEA (CENTONZE et al., 2007), aumentando a sorção da mesma pela fase extratora MIP.

Figura II.27 - Influência na sorção de AEA, empregando tampão acetato de amônio adicionado de acetonitrila na reconstituição do extrato seco. Amostra de plasma (200 μL), enriquecida com padrão de AEA na concentração de 100 ng.mL^{-1} . Dessorção: 4 x 50 μL de ACN.

II.4.4.3 Solução de lavagem

Após a etapa de sorção do analito, uma etapa de lavagem foi avaliada com a finalidade de excluir os compostos endógenos residuais provenientes da matriz biológica.

Como observado na Figura II.28, um único ciclo aspirar/dispensar de 100 μL de uma solução metanólica 5% (v/v), foi suficiente para garantir a remoção dos compostos endógenos, sem que houvesse perda do analito. A remoção dos compostos interferentes da matriz, a partir da fase extratora, assegurou a não supressão da ionização do analito, garantindo a confiabilidade do método.

Figura II.28 - Otimização da etapa de remoção dos compostos endógenos a partir da fase MIP: (a) solução de lavagem e em (b) volume de solução. Amostra de plasma (200 μL), enriquecida com padrão de AEA na concentração de 100 ng.mL^{-1} . Dessorção: 4 x 50 μL de ACN.

II.4.4.4 Volume e ciclos de dessorção

Devido à alta solubilidade da AEA em acetonitrila, e com base em estudos prévios realizados em nosso laboratório, acetonitrila foi o solvente de escolha para o processo de dessorção.

Diferentes ciclos aspirar/dispensar (volumes) foram avaliados, quanto a sua influência na recuperação do analito. Ciclos aspirar/dispensar de 1 x 100; 2 x 100; 3 x 100 e 4 x 100 μL foram comparados (Figura II.29).

Figura II.29 - Otimização da etapa de dessorção, de AEA, em acetonitrila. Amostra de plasma (200 μL), enriquecida com padrão de AEA na concentração de 100 ng.mL^{-1} .

Maior eficiência de eluição (dessorção) foi obtida com 03 alíquotas de 100 μL de ACN.

Após o processo de dessorção do analito, o extrato foi seco e reconstituído em 50 μL de fase móvel (ACN + solução aquosa de ácido fórmico - 0,5% v/v) na proporção de 70:30 (v/v), e injetado em sistema LC-MS/MS.

Dentre as variáveis avaliadas para o procedimento “in-tube” SPME, maior eficiência de extração foi obtida empregando as seguintes condições: reconstituição do extrato seco (após precipitação das proteínas) com 200 μL de solução tampão acetato (5mM, pH 9); remoção dos componentes endógenos com 100 μL de solução metanólica 5% e eluição dos analitos com 3 x 100 μL de ACN.

Uma vez otimizada as variáveis para o método “in-tube” SPME, os capilares MIP e NIP foram avaliados quanto a sua capacidade de sorção para AEA (Figura II.30).

Figura II.30 - Avaliação da capacidade de sorção, para AEA, dos capilares MIP e NIP após otimização das variáveis envolvidas no processo de extração por “in-tube” SPME.

Como observado, o material polimérico não impresso extraiu a AEA por interações não específicas, em concentrações inferiores às obtidas com o MIP.

Para que os capilares MIP e NIP pudessem ser reutilizados, os mesmos foram lavados com ACN (4 x 200 μ L). Na avaliação desta etapa de limpeza, diferentes volumes de ACN foram empregados. O efeito de memória foi avaliado com análise de uma amostra de branco de referência. Nos tempos de retenção dos fármacos não foram observados sinais analíticos. A fase MIP foi reutilizada aproximadamente 50 vezes, sem perda significativa da eficiência da extração.

II.4.5 Desempenho analítico do MIP

O polímero não impresso (NIP) extraiu o analito de interesse através de interações não específicas. No entanto, o polímero impresso (MIP) contém cavidades altamente seletivas para a extração de compostos estruturalmente similar à N - araquidil etanolamina (molde), resultando em interações específicas com a molécula, alvo, de AEA. De acordo com os

cromatogramas (Figura II.31), observou-se que o cromatograma do MIP, em razão das interações específicas, apresentou maior seletividade para o analito anandamida, e portanto, maior eficiência de extração.

Figura II.31 - Cromatogramas das análises in-tube SPME/LC-MS/MS obtidos após extração de anandamida em amostras de plasma branco enriquecidas na concentração de 100 ng mL^{-1} , nas condições otimizadas de extração. (Azul) – MIP e (Preto) – NIP.

Para avaliar o desempenho do MIP, calculou-se o fator de impressão (IF), o qual é expresso pela razão entre a área dos pico cromatográficos do analito extraído pelo MIP em relação ao NIP (na mesma concentração). Quanto maior a quantidade de analito extraída utilizando o MIP, melhor será o desempenho seletivo do material impresso. O IF obtido pelo analito deve ser superior a 1. Neste trabalho, o IF obtido para a AEA foi de 4.

II.4.6 Validação Analítica do método in-tube SPME/LC-MS/MS

Todos os parâmetros avaliados durante a validação analítica foram realizados empregando-se padrão interno deuterado de anandamida (AEA d_4 , $40 \mu\text{L}$, 10 ng mL^{-1}).

A linearidade do método “in-tube” SPME/LC-MS/MS desenvolvido, foi determinada utilizando-se amostras de plasma (branco de referência) enriquecidas com soluções padrão de anandamida em concentrações que vão desde o limite inferior de quantificação a 20 ng mL^{-1} . O intervalo avaliado apresentou-se linear com coeficiente de correlação de 0,994 e coeficientes de variação menores que 15 % para todos os pontos da curva, conforme preconizado pela ANVISA. A equação de regressão linear foi: $y = 0,2028x - 0,5078$.

Tanto os ensaios de precisão quanto os ensaios de exatidão apresentaram, respectivamente, coeficientes de variação e erros padrão relativos em concordância com os valores preconizados. Para os ensaios de precisão os valores de CV variaram de 1,2 a 13% (precisão intercorridas) e de 3,1 a 11,7 (precisão intracorridas). Nos ensaios de exatidão valores variando de -3,6 a 7,5 % (exatidão intercorridas) e de -4,4 a 5,4% foram obtidos.

As respostas de picos interferentes nos tempos de retenção do analito foram inferiores a 20% (vinte por cento) da resposta (sinal analítico) do analito nas amostras enriquecidas com o mesmo em concentrações correspondentes ao LOQ. 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.

O efeito da matriz biológica (plasma) na supressão da ionização do analito foi avaliado por meio dos valores de FMN. Valores menores que 15 % foram obtidos para o coeficiente de variação dos FMNs, tanto para as amostras processadas no CQB quanto no CQA.

Todos os dados de validação estão descritos na Tabela II.13.

Tabela II.13 - Validação analítica para amostras de plasma enriquecidas com diferentes concentrações de analito - LOQ, CQB, CQM, CQA e LSQ (n = 5).

Analito	Linearidade	Conc. adicionada (ng mL ⁻¹)	Precisão (%CV)		Exatidão (% EPR)		Efeito Matriz (% CV)
			Inter	Intra	Inter	Intra	
AEA	Equação da reta $y = 0,2028x - 0,5078$	R^2 0,994	LOQ = 5	8,3	6,4	7,5	5,4
			CQB = 12	1,2	3,7	- 1,0	0,7
			CQM = 10	13,2	11,7	2,5	-1,5
			CQA = 15	4,2	3,1	-3,6	-4,4
			LSQ = 20	5,5	4,6	3,0	2,5

A seletividade do método “in-tube” SPME/LC-MS/MS foi demonstrada comparando-se o cromatograma de uma amostra de plasma (branco de referência) enriquecida com AEA no LOQ, com uma amostra de plasma branco de referência, processada nas condições de extração já otimizadas (Figura II.32).

Figura II.32 - Cromatogramas das amostras de plasma enriquecido com padrão de AEA e AEA-d4 no LOQ e de plasma branco de referência (sobrescrito) empregando o método “in-tube” SPME/LC-MS/MS otimizado.

Como observado na Figura II.32, não foram observados interferentes no tempo de retenção do analito ou do PI. A presença de um pico de menor intensidade no cromatograma do branco, próximo ao tempo de retenção do analito, refere-se à AEA endógena presente no plasma.

II.4.7 Seletividade do MIP

A alta seletividade do MIP é atribuída à sua estrutura tridimensional e à adequada distribuição dos monômeros funcionais, estrategicamente, ao redor da molécula molde (CORMACK; ELORZA, 2004). Dessa forma, a avaliação da retenção de outras moléculas (no MIP) objetiva assegurar a efetiva seletividade do sítio específico de reconhecimento.

A avaliação da seletividade do polímero, sintetizado, foi realizada a partir de amostras de plasma branco de referência enriquecidas com AEA e diferentes fármacos (antidepressivos, antipsicóticos e anticonvulsivantes) com estruturas químicas diferentes a do analito, nas mesmas concentrações (100 ng mL^{-1}). As extrações ($n=3$) realizadas com o polímero impresso apresentaram taxas de recuperação de 51% para AEA e de 4 - 21% para os demais analitos. Como esperado, maior porcentagem de recuperação para AEA foi observada, em virtude das interações do analito com os sítios seletivos do MIP (Figura II.33).

Figura II.33 - Avaliação da seletividade do capilar MIP, para anandamida, em amostras de plasma enriquecidas com AEA e fármacos antidepressivos, anticonvulsivantes e antipsicóticos (100 ng mL^{-1}).

II.4.8 Avaliação da reprodutibilidade do procedimento de síntese do capilar MIP

A fim de avaliar a reprodutibilidade do procedimento de síntese empregado, três capilares MIP foram sintetizados e avaliados com amostras de plasma branco enriquecidas

com AEA na concentração de 100 ng mL^{-1} ($n=3$). Os valores de CV variaram de 7% a 10% (intra-síntese) e 5% a 14% (inter-síntese).

II.4.9 Análise das amostras de plasma de pacientes com Doença de Parkinson

A quantificação de AEA, nas amostras de plasma de pacientes com DP, não foi possível empregando o método “in-tube” SPME/LC-MS/MS, uma vez que a menor concentração atingida (LOQ) foi bem superior às concentrações encontradas nas amostras. Para que a concentração de AEA pudesse então ser determinada, empregou-se o método de adição de padrão. Dessa forma, as amostras de plasma foram enriquecidas com o analito nas concentrações de 5, 10, 12 e 15 ng.mL^{-1} . O valor absoluto no eixo x, obtido a partir da curva de calibração quando o valor no eixo y é igual a zero, refere-se à quantidade de AEA encontrada na amostra de plasma analisada. Como mostra a Tabela II.14, o método apresentou linearidade adequada com valores de coeficiente de correlação maiores que 0,99 para as 3 amostras analisadas. Os valores de concentração de AEA encontrados nas amostras estão em concordância com os valores encontrados na literatura (BALVERS et al., 2013), demonstrando a confiabilidade do método (Figura II.34).

Tabela II.14 - Curva de calibração pelo método de adição de padrão e concentração de AEA encontrada nas amostras de plasma analisadas ($n=5$).

Curva - Adição de Padrão			
	Linearidade	R^2	Concentração (ng.mL^{-1})
Amostra 1	$y = 0,5159x + 0,193$	0,9906	0,4
Amostra 2	$y = 0,5704x - 0,0909$	0,9942	0,1
Amostra 3	$y = 0,525x + 0,0673$	0,9983	0,1

Figura II.34 – Cromatogramas das amostras de plasma analisadas.

5 CONCLUSÃO

No Capítulo I, as fases RAM, com partículas de octadesilsilano revestidas com albumina sérica bovina, foram desenvolvidas e aplicadas com êxito na eliminação dos componentes endógenos da amostra biológica e na pré-concentração dos fármacos (anticonvulsivantes, antipsicóticos, ansiolíticos e antidepressivos). A simples e rápida técnica de preparo de amostras biológicas DPX (C₁₈-BSA) apresentou adequada capacidade de sorção e empregou pequenos volumes de amostra de plasma e de solventes orgânicos.

A otimização dos parâmetros envolvidos na técnica DPX (pH da amostra, tempo de equilíbrio entre soluto e fase extratora, processo de dessorção, volume da amostra e solução de lavagem), favoreceu a seletividade e detectabilidade analítica do método DPX/LC-MS/MS.

O método desenvolvido apresentou valores de LOQ muito inferiores aos intervalos terapêuticos preconizados. Segundo parâmetros de validação analítica, o método DPX/LC-MS/MS apresentou seletividade, linearidade, precisão e exatidão analítica adequada, podendo ser empregado com confiabilidade na determinação de fármacos (antipsicóticos, anticonvulsivantes, ansiolíticos e antidepressivos) em amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos para fins de monitorização terapêutica.

Segundo às análises das amostras de plasma de 51 pacientes esquizofrênicos pelo método PPT/LC-MS/MS, as variações observadas nas concentrações plasmáticas de alguns fármacos podem ser atribuídas a interações farmacocinéticas, provenientes da co-administração de outras drogas não declaradas, a fatores intrínsecos do indivíduo ou mesmo a não adesão do paciente ao tratamento.

No Capítulo II, a caracterização das fases MIP e NIP, pelas técnicas MEV e FTIR, evidenciaram aspectos importantes das características morfológicas e químicas da estrutura dos sorventes sintetizados.

O capilar MIP, usado como sorvente para o processo de extração in-tube SPME, estabeleceu interações específicas com a anandamida presente em amostras de plasma, em contrapartida à baixa capacidade de sorção, para AEA, demonstrada pelo polímero não impresso (NIP). O N - araquidoil etanolamina, utilizado como molde, originou sítios molecularmente impressos com tamanho, forma e funcionalidade adequada para pré-concentrar e extrair, seletivamente, a AEA, a partir da fase MIP.

Conclusão

A otimização dos parâmetros in-tube SPME, assegurou a eficiência da extração de forma simples e rápida, com emprego de pequenos volumes de amostra de plasma (200 µL) e solvente orgânico.

O sorvente MIP apresentou excelente resistência mecânica, o que possibilitou a reutilização dos capilares, por mais de 50 vezes, sem perda significativa da eficiência de extração.

Segundo os parâmetros de validação analítica, o método in-tube SPME/LC-MS/MS proposto, apresentou linearidade, exatidão e precisão adequada.

A aplicabilidade do método padronizado para quantificação de AEA, em amostras de plasma de pacientes com Doença de Parkinson, foi comprovada empregando o método de adição de padrão. Valores de concentração de AEA, em concordância com os encontrados na literatura, foram obtidos para as amostras analisadas.

REFERÊNCIAS¹

ADDINGTON, J.; ADDINGTON, D. Positive and negative symptoms of schizophrenia: Their course and relationship over time. **Schizophrenia Research**, v. 5, p. 51–59, 1991.

ANDREASEN, N. Symptoms, signs, and diagnosis of schizophrenia. **The Lancet**, v. 346, n. 8973, p. 477–481, 1995.

BALLON, J.; STROUP, T. S. Polypharmacy for schizophrenia. **Current Opinion in Psychiatry**, v. 26, n. 2, p. 208–213, 2013.

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

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

BARBOSA, M. T. et al. Parkinsonism and Parkinson's disease in the elderly: A community-based survey in Brazil (the Bambuí Study). **Movement Disorders**, v. 21, n. 6, p. 800–808, 2006.

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.

BORDIN, D. C. M. et al. Disposable pipette tips extraction: Fundamentals, applications and state of the art. **Journal of Separation Science**, v. 39, n. 6, p. 1168–1172, 2016.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248–54, 1976.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023)

CASS, Q. B. et al. Determination of amoxycillin in human plasma by direct injection and coupled-column high-performance liquid chromatography. **Journal of chromatography. A**, v. 987, n. 1–2, p. 235–41, 2003.

CASSIANO, N. M. et al. Determination of the plasma levels of metyrapone and its enantiomeric metyrapol metabolites by direct plasma injection and multidimensional achiral-chiral chromatography. **Chirality**, v. 14, n. 9, p. 731–5, 2002.

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

CHAVES, A. R. et al. The development of a new disposable pipette extraction phase based on polyaniline composites for the determination of levels of antidepressants in plasma samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1399, p. 1–7, 2015.

CHEONG, W. J.; YANG, S. H.; ALI, F. Molecular imprinted polymers for separation science: A review of reviews. **Journal of Separation Science**, v. 36, n. 3, p. 609–628, 2013.

CLARKE, C. E. Parkinson's disease. **Bmj**, v. 335, n. 7617, p. 441–445, 2007.

COATES, J. Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach. In: **Encyclopedia of Analytical Chemistry**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2006. p. 1–23.

COMPTON, S. J.; JONES, C. G. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. **Analytical biochemistry**, v. 151, n. 2, p. 369–74, 1985.

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

DE OLIVEIRA ISAC MORAES, G. 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.

DE SOUZA, I. D.; DOMINGUES, D. S.; QUEIROZ, M. E. C. Hybrid silica monolith for microextraction by packed sorbent to determine drugs from plasma samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 140, p. 166–175, 2015.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023)

DENADAI, M.; CASS, Q. B. Simultaneous determination of fluoroquinolones in environmental water by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with direct injection: A green approach. **Journal of chromatography. A**, v. 1418, p. 177–84, 2015.

DEVANE, W. A. et al. Constituent Receptor. **Science**, v. 258, n. 10, p. 1946–1949, 1992.

DOMINGUES, D. S. et al. Determination of Drugs in Plasma Samples by High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry for Therapeutic Drug Monitoring of Schizophrenic Patients. **Journal of analytical toxicology**, v. 40, n. 1, p. 28–36, 2015.

EISERT, R.; PAWLISZYN, J. Automated In-Tube Solid-Phase Microextraction Coupled to High-Performance Liquid Chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 69, n. 16, p. 3140–3147, 1997.

ELLISON, S. T.; BREWER, W. E.; MORGAN, S. L. Comprehensive analysis of drugs of abuse in urine using disposable pipette extraction. **Journal of analytical toxicology**, v. 33, n. 7, p. 356–365, 2009.

FAN, Y. et al. In-tube solid phase microextraction using a beta-cyclodextrin coated capillary coupled to high performance liquid chromatography for determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in urine samples. **Talanta**, v. 65, n. 1, p. 111–7, 2005.

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

FERNÁNDEZ-RUIZ, J. The endocannabinoid system as a target for the treatment of motor dysfunction. **British Journal of Pharmacology**, v. 156, p. 1029–1040, 2009.

FERRAZ, H. B. Tratamento da Doença de Parkinson. **Revista Neurociências**, v. 7, n. 1, p. 6–12, 1999.

FERRER, B. et al. Effects of levodopa on endocannabinoid levels in rat basal ganglia: implications for the treatment of levodopa-induced dyskinesias. **European journal of neuroscience**, v. 18, p. 1607–1614, 2003.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023)

FIGUEIREDO, E. C. et al. Impressão molecular: uma estratégia promissora na elaboração de matrizes para a liberação controlada de fármacos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 3, 2008.

FISICHELLA, M.; ODOARDI, S.; STRANO-ROSSI, S. High-throughput dispersive liquid/liquid microextraction (DLLME) method for the rapid determination of drugs of abuse, benzodiazepines and other psychotropic medications in blood samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and app. **Microchemical Journal**, v. 123, p. 33–41, 2015.

FONTANELLA, C. A.; CAMPO, J. V. Benzodiazepine Use and Risk of Mortality Among Patients With Schizophrenia: A Retrospective Longitudinal Study. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 77, p. 661–667, 2014.

FRANGOU, S.; KINGTON, J. Schizophrenia. **Medicine**, v. 32, n. 7, p. 21–25, 2004.

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

GOFF, D. C.; HECKERS, S.; FREUDENREICH, O. Schizophrenia. **Medical Clinics of North America**, v. 85, n. 3, p. 663–89, 2001.

GOLDSTEIN, L.; HENDERSON, D. C. Atypical antipsychotic agents and diabetes. **Primary Psychiatry**, v. 7, n. 5, p. 65–68, 2000.

GRADINARU, J. et al. Quantification of typical antipsychotics in human plasma by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for therapeutic drug monitoring. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 88, p. 36–44, 2014.

GUAN, H.; BREWER, W. E.; MORGAN, S. L. New Approach to Multiresidue Pesticide Determination in Foods with High Fat Content Using Disposable Pipette Extraction (DPX) and Gas Chromatography?Mass spectrometry (GC-MS). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 22, p. 10531–10538, 2009.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023)

- HARRISON, P. J. Neuropathology of schizophrenia. **Psychiatry**, v. 4, n. 10, p. 18–21, 2005.
- HASEGAWA, C. et al. Pipette tip solid-phase extraction and gas chromatography - mass spectrometry for the determination of methamphetamine and amphetamine in human whole blood. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 389, n. 2, p. 563–70, 2007.
- HERMANN, H.; MARSICANO, G.; LUTZ, B. Coexpression of the cannabinoid receptor type 1 with dopamine and serotonin receptors in distinct neuronal subpopulations of the adult mouse forebrain. **Neuroscience**, v. 109, n. 3, p. 451–460, 2002.
- 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**, v. 660, p. 119–129, 1994.
- HIEMKE, C. et al. AGNP consensus guidelines for therapeutic drug monitoring in psychiatry: Update 2011. **Psychopharmakotherapie**, v. 19, n. 3, p. 91–122, 2012.
- HO, T. D. et al. Chemical immobilization of crosslinked polymeric ionic liquids on nitinol wires produces highly robust sorbent coatings for solid-phase microextraction. **Analytica Chimica Acta**, v. 843, p. 18–26, 2014.
- HOSÁK, L.; LIBIGER, J. Antiepileptic drugs in schizophrenia: a review. **European Psychiatry**, v. 17, p. 371–378, 2002.
- HOWES, O. D.; KAPUR, S. The dopamine hypothesis of schizophrenia: Version III - The final common pathway. **Schizophrenia Bulletin**, v. 35, n. 3, p. 549–562, 2009.
- HU, Y. et al. Novel applications of molecularly-imprinted polymers in sample preparation. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 43, p. 37–52, 2013.
- JANKOVIC, J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. **Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry**, v. 79, n. 4, p. 368–76, 2008.
- KALIA, L. V.; LANG, A. E. Parkinson's disease. **The Lancet**, v. 386, n. 9996, p. 896–912, 2015.
- KANE, J. M.; CORRELL, C. U. Pharmacologic treatment of schizophrenia. **Dialogues in clinical neuroscience**, v. 12, n. 3, p. 345–57, 2010.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023)

KANE, J. M.; MCGLASHAN, T. H. Treatment of schizophrenia. **The Lancet**, v. 346, n. 8978, p. 820–825, 1995.

KANG, J.; LEE, M. Overview of Therapeutic Drug Monitoring. **The Korean journal of internal medicine**, v. 24, n. 1, p. 1, 2009.

KATAOKA, H. New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 4, p. 232–244, 2003.

KATAOKA, H. et al. Determination of nicotine, cotinine, and related alkaloids in human urine and saliva by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, n. 1, p. 108–114, 2009.

KENNEDY, W. K.; JANN, M. W.; KUTSCHER, E. C. Clinically significant drug interactions with atypical antipsychotics. **CNS drugs**, v. 27, n. 12, p. 1021–48, 2013.

KOLE, P. L. et al. Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods. **Biomedical Chromatography**, v. 25, n. 1–2, p. 199–217, 2011.

KOVATSI, L. et al. Disposable pipette extraction for gas chromatographic determination of codeine, morphine, and 6-monoacetylmorphine in vitreous humor. **Journal of Separation Science**, v. 34, n. 14, p. 1716–1721, 2011.

KUMAZAWA, T. et al. Pipette tip solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry for the determination of mequitazine in human plasma. **Talanta**, v. 70, n. 2, p. 474–478, 2006.

KUMAZAWA, T. et al. Simultaneous determination of methamphetamine and amphetamine in human urine using pipette tip solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 44, n. 2, p. 602–607, 2007.

LAMBERT, S. Disposable pipette tip extraction—leaner, greener sample preparation. **Chromatography Today**, p. 12–14, 2009.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023)

LAVIGNAC, N.; ALLENDER, C. J.; BRAIN, K. R. Current status of molecularly imprinted polymers as alternatives to antibodies in sorbent assays. **Analytica Chimica Acta**, v. 510, n. 2, p. 139–145, 2004.

LEHOTAY, S. J. et al. Rapid analysis of aminoglycoside antibiotics in bovine tissues using disposable pipette extraction and ultrahigh performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1313, p. 103–112, 2013.

LI, Z. et al. Multiresidue Analysis of 58 Pesticides in Bean Products by Disposable Pipette Extraction (DPX) Cleanup and Gas Chromatography - Mass Spectrometry Determination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 19, p. 4788–4798, 2012.

LIMA, V. V. DE; CASSIANO, N. M.; CASS, Q. B. Desenvolvimento de colunas cromatográficas de meios de acesso restrito proteína-imobilizada e suas avaliações para análise de fármacos com injeções direta de plasma humano. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 72–78, 2006.

LIU, Z. S. et al. Molecularly imprinted polymers as a tool for separation in CEC. **Electrophoresis**, v. 28, n. 1–2, p. 127–136, 2007.

LOPES, B. R. et al. Quantification of carbamazepine and its active metabolite by direct injection of human milk serum using liquid chromatography tandem ion trap mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 889–890, p. 17–23, 2012.

MAHONY, J. O. et al. Molecularly imprinted polymers - Potential and challenges in analytical chemistry. **Analytica Chimica Acta**, v. 534, n. 1, p. 31–39, 2005.

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

MENEZES, M. L.; FÈLIX, G. On Line Extraction and Separation of Bendiocarb, Methomyl, Methylparathion, and Pentachlorophenol Pesticides from Raw Milk. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 21, n. 18, p. 2863–2871, 1998.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023)

MIRANDA, L. F. C.; DOMINGUES, D. S.; QUEIROZ, M. E. C. Selective solid-phase extraction using molecularly imprinted polymers for analysis of venlafaxine, O-desmethylvenlafaxine, and N-desmethylvenlafaxine in plasma samples by liquid chromatography - tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1458, p. 46–53, 2016.

MONTENARH, D. et al. Detection and quantification of benzodiazepines and Z-drugs in human whole blood, plasma, and serum samples as part of a comprehensive multi-analyte LC-MS/MS approach. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, n. 3, p. 803–818, 2014.

MORRISSETTE, D. A.; STAHL, S. M. Affective symptoms in schizophrenia. **Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies**, v. 8, n. 1–2, p. 3–9, 2012.

MOSKOWITZ, A.; HEIM, G. Eugen Bleuler's Dementia Praecox or the Group of Schizophrenias (1911): A centenary appreciation and reconsideration. **Schizophrenia Bulletin**, v. 37, n. 3, p. 471–479, 2011.

MOURA, F. et al. Quantification of ampicillin in bovine milk by coupled-column ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of separation science**, v. 35, n. 19, p. 2615–2620, 2012.

MOZANER BORDIN, D. C. et al. A rapid assay for the simultaneous determination of nicotine, cocaine and metabolites in meconium using disposable pipette extraction and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). **Journal of analytical toxicology**, v. 38, n. 1, p. 31–38, 2013.

MUESER, K. T.; MCGURK, S. R. Schizophrenia. **The Lancet**, v. 363, n. 9426, p. 2063–2072, 2004.

MULLETT, W. M. et al. Bio-compatible in-tube solid-phase microextraction capillary for the direct extraction and high-performance liquid chromatographic determination of drugs in human serum. **Journal of chromatography. A**, v. 963, n. 1–2, p. 325–340, 2002.

MULLETT, W. M. Determination of drugs in biological fluids by direct injection of samples for liquid-chromatographic analysis. **Journal of biochemical and biophysical methods**, v. 70, n. 2, p. 263–273, 2007.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023)

MULLETT, W. M.; MARTIN, P.; PAWLISZYN, J. In-tube molecular imprinted polymer solid-phase microextraction for the selective determination of propranolol. **Analytical chemistry**, v. 73, n. 11, p. 2383–2389, 2001.

MULLETT, W. M.; PAWLISZYN, J. Direct LC analysis of five benzodiazepines in human urine and plasma using an ADS restricted access extraction column. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 26, n. 5–6, p. 899–908, 2001.

NETO, A. J. S. et al. Automated microcolumn-switching system for drug analysis by direct injection of human plasma. **Journal of chromatography. A**, v. 1105, p. 71–76, 2006.

NOVÁKOVÁ, L.; VLCKOVÁ, H. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. **Analytica Chimica Acta**, v. 656, n. 1–2, p. 8–35, 2009.

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.

PATTEET, L. et al. High throughput identification and quantification of 16 antipsychotics and 8 major metabolites in serum using ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 429, p. 51–58, 2014.

PICHON, V.; CHAPUIS-HUGON, F. Role of molecularly imprinted polymers for selective determination of environmental pollutants-A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 622, n. 1–2, p. 48–61, 2008.

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

QUEIROZ, M. E. C. et al. Solid-phase microextraction-liquid chromatography (SPME-LC) determination of lamotrigine simultaneously with carbamazepine and carbamazepine 10,11-epoxide in human plasma. **Journal of Separation Science**, v. 25, n. 1–2, p. 91–95, 2002.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023)

QUEIROZ, M. E. C.; LANÇAS, F. M. Análise de fármacos em material biológico: acoplamento microextração em fase sólida “no tubo” e cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 880–886, 2005.

QUEIROZ, M. E. C.; MELO, L. P. Selective capillary coating materials for in-tube solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography to determine drugs and biomarkers in biological samples: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 826, n. 1, p. 1–11, 2014.

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

RÖSSLER, W. et al. Size of burden of schizophrenia and psychotic disorders. **European Neuropsychopharmacology**, v. 15, n. 4, p. 399–409, 2005.

SAITO, V. M.; WOTJAK, C. T.; MOREIRA, F. A. Exploração farmacológica do sistema endocanabinoide: Novas perspectivas para o tratamento de transtornos de ansiedade e depressão. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 32, p. 7–14, 2010.

SALOKANGAS, R. K. R. et al. Mortality in chronic schizophrenia during decreasing number of psychiatric beds in Finland. **Schizophrenia Research**, v. 54, n. 3, p. 265–275, 2002.

SAMANIDOU, V. et al. Disposable pipette extraction for the simultaneous determination of biperiden and three antipsychotic drugs in human urine by GC-nitrogen phosphorus detection. **Bioanalysis**, v. 5, n. 1, p. 21–29, 2013.

SANTOS-NETO, A. J. et al. Fluoxetine and norfluoxetine analysis by direct injection of human plasma in a column switching liquid chromatographic system. **Journal of separation science**, v. 31, n. 1, p. 78–85, 2008.

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

SCHUITZ, S. K.; ANDREASEN, N. C. Schizophrenia. **The Lancet**, v. 353, n. 9162, p. 1425–1430, 1999.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023)

SILVA, R. C. B. DA. Esquiosofrenia: uma revisão. **Psicologia USP**, v. 17, n. 4, p. 263–285, 2006.

SOLINAS, M. et al. Anandamide administration alone and after inhibition of fatty acid amide hydrolase (FAAH) increases dopamine levels in the nucleus accumbens shell in rats. **Journal of Neurochemistry**, v. 98, p. 408–419, 2006.

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.

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.

SPINA, E.; DE LEON, J. Metabolic drug interactions with newer antipsychotics: a comparative review. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 100, n. 1, p. 4–22, 2007.

SPINA, E.; DE LEON, J. Clinically relevant interactions between newer antidepressants and second-generation antipsychotics. **Expert opinion on drug metabolism & toxicology**, v. 10, n. 5, p. 721–46, 2014.

STONE, J. M.; MORRISON, P. D.; PILOWSKY, L. S. Glutamate and dopamine dysregulation in schizophrenia - a synthesis and selective review. **Journal of psychopharmacology**, v. 21, n. 4, p. 440–452, 2007.

TAMAYO, F. G.; TURIEL, E.; MARTÍN-ESTEBAN, A. Molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction and solid-phase microextraction: Recent developments and future trends. **Journal of Chromatography A**, v. 1152, n. 1–2, p. 32–40, 2007.

TANDON, R.; NASRALLAH, H. A.; KESHAVAN, M. S. Schizophrenia, “Just the Facts” 5. Treatment and prevention Past, present, and future. **Schizophrenia Research**, v. 122, n. 1–3, p. 1–23, 2010.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023)

TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, L. T. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 2: aplicações de MIP (“Molecularly Imprinted Polymers”) no desenvolvimento de sensores químicos. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1087–1101, 2005.

TEREZA, A. N. A. et al. Ansiedade Patológica: Bases Neurais e Avanços na Abordagem Psicofarmacológica. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 14, n. 2, p. 93–100, 2010.

TSOI, D. T.; HUNTER, M. D.; WOODRUFF, P. W. R. History, aetiology, and symptomatology of schizophrenia. **Psychiatry**, v.7, n.10, p. 404 - 409, 2008.

URICHUK, L. et al. Metabolism of atypical antipsychotics: involvement of cytochrome P 450 enzymes and relevance for drug-drug interactions. **Current drug metabolism**, v. 9, n. 5, p. 410–418, 2008.

VEDANA, K. G. G. et al. Agindo em busca de alívio: enfrentamento da esquizofrenia e dos incômodos ocasionados pelo tratamento medicamentoso. **Ciência, Cuidado e Saúde**, v. 12, n. 2, p. 365–374, 2013.

WALLES, M.; MULLETT, W; PAWLISZYN, J. Monitoring of drugs and metabolites in whole blood by restricted-access solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1025, n. 1, p. 85–92, 2004.

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

YU, Z.; WESTERLUND, D. Influence of mobile phase conditions on the clean-up effect of restricted-access media precolumns for plasma samples injected in a column-switching system. **Chromatographia**, v. 44, n. 11–12, p. 589–594, 1997.

YU, Z.; WESTERLUND, D.; BOOS, K. S. Evaluation of liquid chromatographic behavior of restricted-access media precolumns in the course of direct injection of large volumes of plasma samples in column-switching systems. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v. 704, n. 1–2, p. 53–62, 1997.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023)

ZHANG, G.; JR, A. V. T.; BARTLETT, M. G. Simultaneous determination of five antipsychotic drugs in rat plasma by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **Journal of Chromatography B**, v. 856, n. 1–2, p. 20–28, 2009.

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 - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1811, n. 11, p. 706–723, 2011.

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

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023)

ANEXO

Anexo 1 - Termo de consentimento 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.ffclrp.usp.br> - e-mail: coetp@ffclrp.usp.br