UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

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

Camila Marchioni

Ribeirão Preto
2018

RESUMO

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

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

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

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

INTRODUÇÃO GERAL

INTRODUÇÃO GERAL

I.1 Doença de Parkinson

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

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

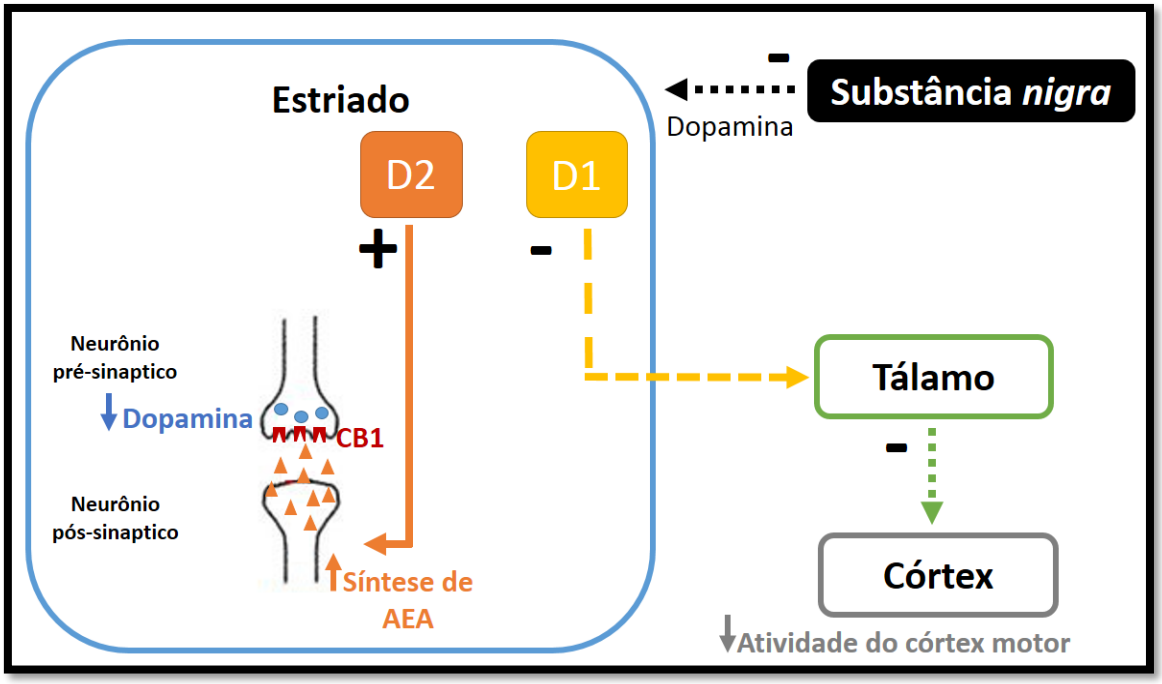
A DP é caracterizada por quatro sintomas clássicos: (1) tremor em repouso; (2) bradicinesia; (3) rigidez e (4) instabilidade postural. Além dessas alterações motoras, os pacientes apresentam inúmeros sinais e sintomas não motores como: distúrbios do sono, perda do olfato, alterações neuropsiquiátricas,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

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

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

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

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



Fonte: próprio autor

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

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

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

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

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

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

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

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

determinação deste fármaco alternativo em amostras biológicas têm sido desenvolvidos.

CAPÍTULO 1

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

CAPÍTULO 1

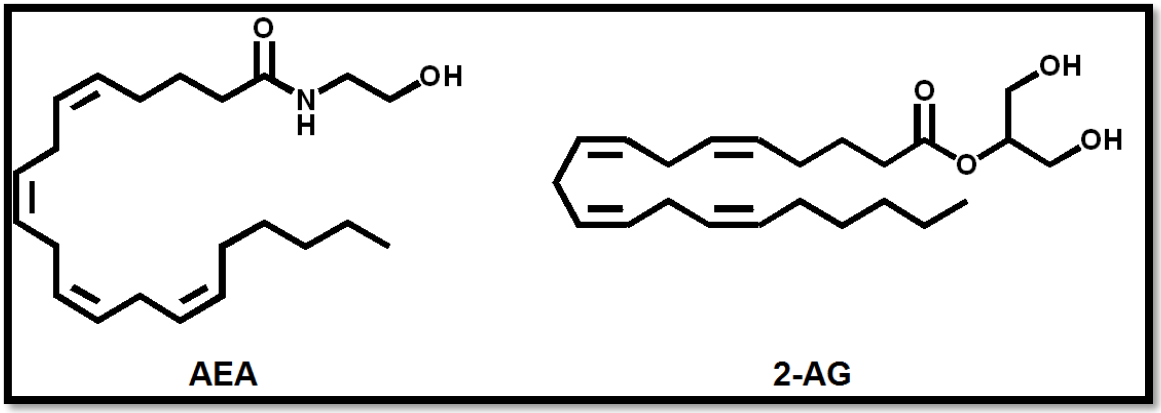
1.I Introdução

1.I.1 Endocanabinóides

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

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

Figura 2. Estrutura química dos endocanabinóides



Fonte: próprio autor

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tabela 1 continua...

Continuação da Tabela 1...

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

Tabela 1 continua...

Continuação da Tabela 1...

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

Tabela 1 continua...

Continuação da Tabela 1...

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

Tabela 1 continua...

Continuação da Tabela 1...

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

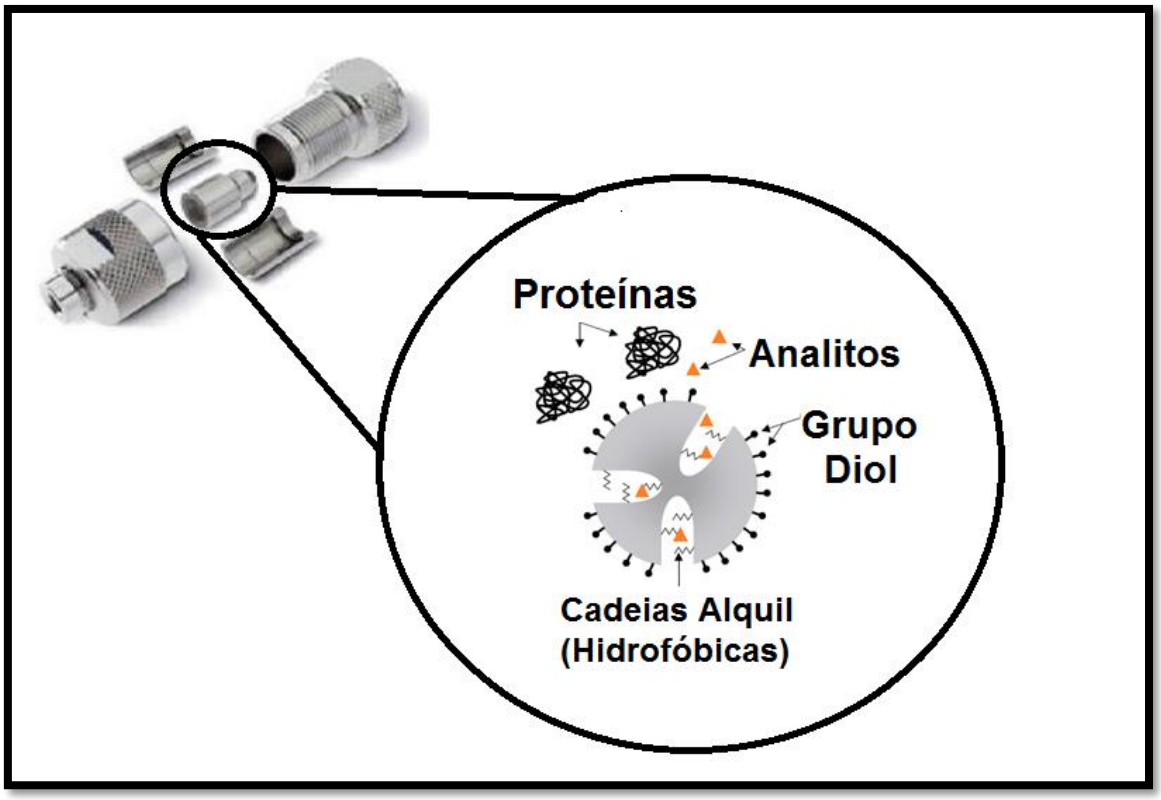
O desenvolvimento dessas fases estacionárias permite, na maioria das vezes, a introdução (injeção) direta das amostras biológicas em sistemas cromatográficos. A automação das análises permite o aumento da frequência analítica e minimiza tanto a exposição dos analistas aos fluidos biológicos, quanto os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

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

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

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

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



Fonte: próprio autor

1.V Conclusão

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

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

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

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

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

CAPÍTULO 2

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

CAPÍTULO 2

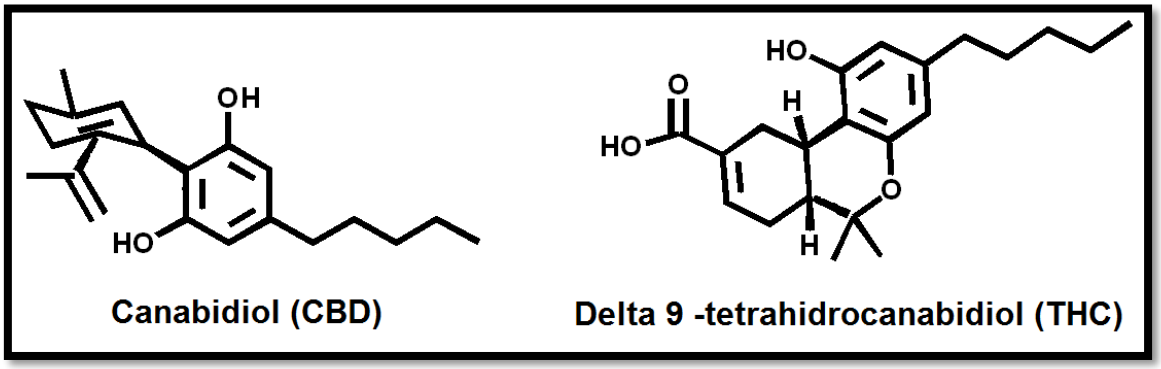
2.I Introdução

2.I.1 Canabinóides

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

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

Figura 12. Estrutura química CBD e Δ9-THC



Fonte: próprio autor

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tabela 10 continua...

Continuação da Tabela 10...

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

Tabela 10 continua...

Continuação da Tabela 10...

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

Tabela 10 continua...

Continuação da Tabela 10...

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

Tabela 10 continua...

Continuação da Tabela 10...

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tabela 11 continua...

Continuação da Tabela 11...

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

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

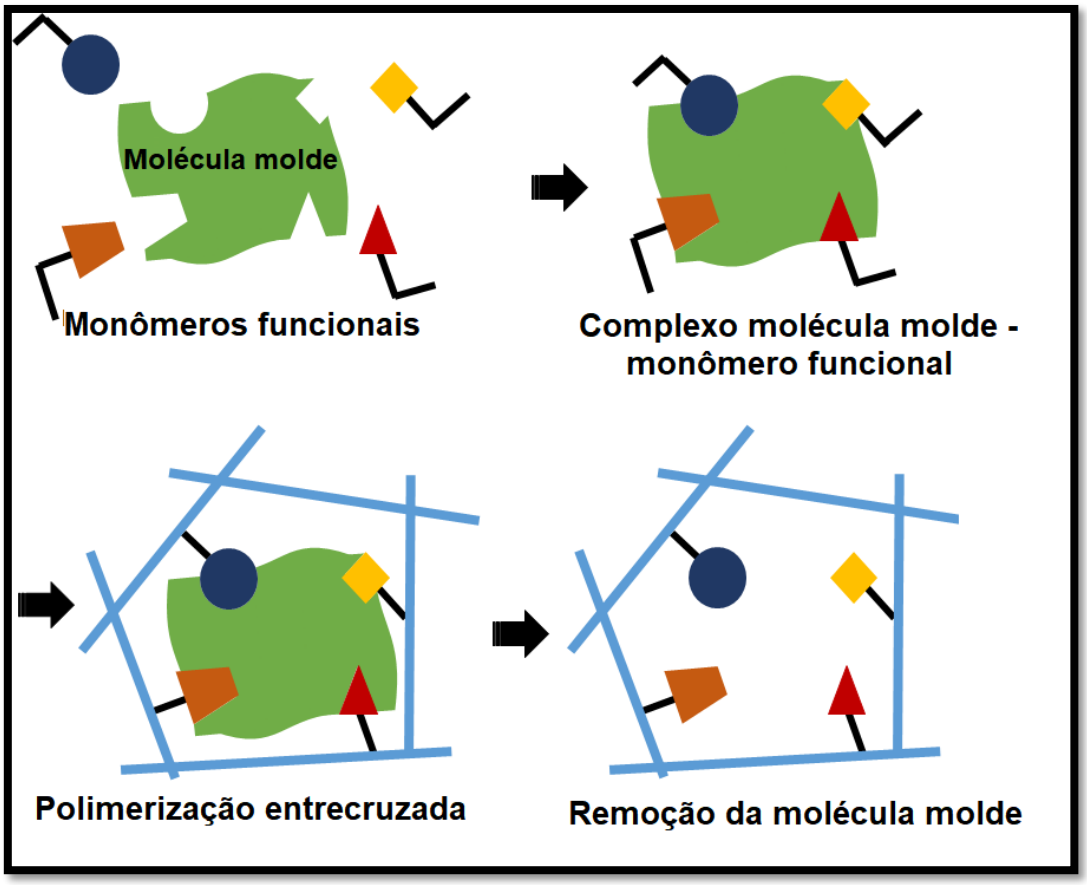
2.I.4 Polímeros Molecularmente Impressos (MIP)

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

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

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

Figura 13. Síntese do polímero molecularmente impresso (MIP)



Fonte: próprio autor

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.V Conclusões

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

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

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

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

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

CONCUSÃO FINAL

CONCLUSÃO FINAL

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

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

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

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

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

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

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

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ltd, 2006.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

EMÍDIO, E. S.; DE MENEZES PRATA, V.; DÓREA, H. S. Validation of an analytical method for analysis of cannabinoids in hair by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography–ion trap tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 670, n. 1-2, p. 63–71, 2010.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

LUÍS MIGUEL LOUREIRO FERNANDES. **Determinação de tetrahidrocanabinol e principais metabolitos em amostras de plasma com recurso à microextração em seringa empacotada e análise por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de espectrometria de massa em tandem**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior. Covilhã, p. 153. 2013.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SERGI, M. et al. Microextraction by packed sorbent coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry for the rapid and sensitive determination of cannabinoids in oral fluids. **Journal of Chromatography A**, v.

1301, p. 139–146, 2013a.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

YANG, R.; XIE, W. Determination of cannabinoids in biological samples using a new solid phase micro-extraction membrane and liquid chromatography-mass spectrometry. **Forensic Science International**, v. 162, n. 1-3, p. 135–139, 2006.

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

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

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

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