Douglas Morisue Sartore

Microextração de canabinoides em urina usando dispositivo empacotado com polímero molecularmente impresso e análise por cromatografia líquida – espectrometria de massas sequencial

São Carlos

2018

Douglas Morisue Sartore

Microextração de canabinoides em urina usando dispositivo empacotado com polímero molecularmente impresso e análise por cromatografia líquida – espectrometria de massas sequencial

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em ciências.

Área de concentração: Química analítica e inorgânica.

Orientador: Prof. Dr. Álvaro José dos Santos Neto.

São Carlos

2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO PARCIAL OU TOTAL DO CONTEÚDO PARA FINS
ACADÊMICOS OU CIENTÍFICOS, DESDE QUE CITADA A FONTE.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família, especialmente os meus pais José Luiz e Roberta por toda a minha criação e por acreditarem sempre no meu potencial, além de me darem as condições necessárias para seguir meus estudos e perseguir meus sonhos.

Agradeço à Universidade de São Paulo e o Instituto de Química de São Carlos pela minha formação desde a graduação e por toda a infraestrutura cedida.

Agradeço ao Prof. Álvaro pela oportunidade e por viabilizar a execução do meu projeto dentro do grupo de Cromatografia, também por todos os conhecimentos passados, as revisões, sugestões e discussões sempre produtivas, além da ajuda com o tratamento e interpretação dos dados e resultados.

Agradeço ao Prof. Fernando Mauro Lanças por ter disponibilizado toda a infraestrutura do grupo de Cromatografia, além dos conselhos dados durante minha Qualificação e por ter aceitado presidir a banca da minha defesa de Mestrado.

Agradeço à Elaine e ao Guilherme, funcionários do grupo de Cromatografia por toda a ajuda prestada durante o desenvolvimento do projeto e a constante disponibilidade e boa vontade em nos atender.

Agradeço aos demais colegas da pós-graduação do grupo de Cromatografia por todos os momentos de companheirismo, pelas comemorações e conquistas e por tornarem o dia-a-dia sempre agradável no laboratório. Agradecimento especial à Ana Lúcia e ao Pipe pela ajuda com o sistema on-line e ao Arley pelo conhecimento compartilhado, a objetividade e o apoio durante a finalização do projeto e validação do método MEPS.

Agradeço também ao LTA-CIATox-Campinas e à Universidade de Campinas, na figura do Prof. Dr. José Luiz da Costa, pelo fornecimento dos padrões analíticos dos canabinoides, sem os quais o projeto não seria possível, além do fornecimento de amostras e pelas análises realizadas para desenvolvimento do planejamento experimental do método de extração.

Por último, gostaria de agradecer às Instituições de fomento à pesquisa FAPESP, CAPES e CNPq pelo apoio institucional e fornecimento de recursos financeiros, em especial ao CNPq pela bolsa de Mestrado a mim concedida.

Muito obrigado a todos!

RESUMO

O preparo da amostra é uma das etapas mais importantes em toda a análise química. O isolamento e a concentração dos componentes da amostra são cruciais e busca-se sempre que essas etapas sejam as mais simples e consumam o mínimo possível de tempo e reagentes. Nos últimos anos, um tipo de material tem se mostrado bastante útil para análises químicas a partir de fluidos biológicos, os polímeros molecularmente impressos (MIPs). Os MIPs são sintetizados por reações de polimerização, na presença de uma molécula molde (*template*). A molécula molde se liga aos monômeros funcionais do polímero durante a reação de polimerização e permanece ligada à superfície das cadeias poliméricas quando a reação se completa. Terminada a polimerização, realiza-se a completa lavagem das moléculas molde, assim, restam na superfície polimérica cavidades tridimensionais complementares à molécula empregada como molde. Essas cavidades permitem a ligação reversível e preferencial da molécula molde ou outras com estrutura química semelhante. A *Cannabis sativa* é a droga ilícita mais consumida em todo o mundo e nos últimos anos muita atenção tem se voltado a seus efeitos toxicológicos no corpo humano e a aplicações medicinais. Nesta dissertação, foi sintetizado um MIP com a molécula molde catequina para a extração e posterior análise por LC-MS/MS dos canabinóides Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), 11-hidroxi- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC-OH) e 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-ácido carboxílico (THC-COOH) em amostras de urina. O MIP produzido foi empacotado em microdispositivo e empregado no preparo das amostras de urina por microextração por sorvente empacotado (MEPS). O método desenvolvido apresentou boa linearidade (valores de r de 0,977 para o THC e 0,994 para THC-OH e THC-COOH). Os limites de detecção e de quantificação foram respectivamente de 5 ng mL⁻¹ e 20 ng mL⁻¹, para os compostos THC e THC-OH, na faixa linear de 25 a 250 ng mL⁻¹. Para o composto THC-COOH os limites de detecção e quantificação alcançados foram de 1 ng mL⁻¹ e 5 ng mL⁻¹, respectivamente, na faixa linear de 5 a 170 ng mL⁻¹. O método apresentou valores razoáveis de precisão entre 3,2% (THC-COOH) e 25,1% (THC) e de exatidão, que variou entre -18,4 e 17,4 (ambos para o THC). O MIP empregado no preparo da amostra mostrou-se mais seletivo e específico do que materiais normalmente empregados para a extração dos canabinóides das amostras de urina, além de a técnica de extração por MEPS apresentar baixo consumo de solventes e amostra para a extração dos analitos e posterior análise por LC-MS/MS.

ABSTRACT

The sample preparation is one of the most important steps in every chemical analysis. The isolation and concentration of the sample components are crucial and it is always sought that these steps are simple and consume the lowest amount of time and reagents. In the recent years, a type of material has proved to be very useful for chemical analyzes of biological fluids, the molecularly imprinted polymers (MIPs). MIPs are synthesized by polymerization reactions in the presence of a template molecule. The template molecule binds to the functional monomers of the polymer during the polymerization reaction and remains bonded to the surface of the polymeric chains after the reaction is complete. After the polymerization is finished, the complete washing of the template molecules is carried out, thus, three-dimensional cavities, complementary to the molecule used as a template, remain on the polymer surface. These cavities allow the reversible and preferential bonding of the template molecule or others with similar chemical structure. *Cannabis sativa* is the most commonly consumed illicit drug in the world and in recent years much attention has focused on its toxicological effects on human body and for medical applications. In this master dissertation, a MIP was synthesized with the catechin molecule as template, for extraction and subsequent analysis by LC-MS/MS of the cannabinoids Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), 11-hydroxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC-OH), and 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid (THC-COOH) in urine samples. The MIP produced was packed in a microdevice and used in the preparation of the urine samples by microextraction by packed sorbent (MEPS). The developed method showed good linearity (r values of 0.977 for THC and 0.994 for THC-OH and THC-COOH). The detection and quantification limits were respectively 5 ng mL⁻¹ and 20 ng mL⁻¹ for THC and THC-OH in the linear range from 25 to 250 ng mL⁻¹. For the compound THC-COOH the limits of detection and quantification achieved were 1 ng mL⁻¹ and 5 ng mL⁻¹, respectively, in the linear range from 5 to 170 ng mL⁻¹. The method presented reasonable values of precision, between 3.2% (for THC-COOH) and 25.1% (for THC) and displayed accuracy ranging from -18.4 to 17.4 (both for THC). The MIP used in the sample preparation was more selective and specific than other materials usually employed for the extraction of the cannabinoids from the urine samples. The MEPS technique also showed low consumption of solvents and sample for sample preparation, extraction of analytes and subsequent analysis by LC-MS/MS.

SUMÁRIO

1	Introdução.....	8
1.1	Os canabinoides	8
1.2	Técnicas de preparo e extração de amostras.....	11
1.3	Polímeros molecularmente impressos	13
1.4	Microextração por sorvente empacotado (MEPS).....	15
1.5	Validação de métodos analíticos	20
1.5.1	Seletividade.....	20
1.5.2	Linearidade	21
1.5.3	Precisão	22
1.5.4	Exatidão	22
1.5.5	Limite de detecção	23
1.5.6	Limite de quantificação	23
1.5.7	Eficiência da extração	23
2	Objetivos	24
3	Materiais e métodos	25
3.1	Reagentes e solventes empregados para síntese dos polímeros	25
3.2	Síntese do MIP e NIP	26
3.3	Caracterização dos materiais	28
3.3.1	Espectroscopia vibracional no infravermelho por transformada de Fourier.....	28
3.3.2	Microscopia eletrônica de varredura.....	28
3.4	Reagentes e solventes empregados para desenvolvimento do método cromatográfico	28
3.5	Desenvolvimento do método cromatográfico.....	29
3.6	Preparo do sistema de microextração por MEPS	32
3.7	Otimização do método de preparo de amostra por MEPS.....	35
3.8	Hidrólise e preparo das amostras de urina.....	37
3.8.1	Hidrólise alcalina da urina	37
3.8.2	Fortificação das soluções calibradoras	37
3.9	Parâmetros de validação – figuras de mérito.....	38
3.9.1	Seletividade.....	38
3.9.2	Linearidade, limite de detecção e limite de quantificação	39
3.9.3	Precisão	40
3.9.4	Exatidão	41
3.9.5	Recuperação e eficiência do processo.....	41

3.9.6	Especificidade da fase sorvente MIP	42
4	Resultados e discussões.....	44
4.1	Caracterização dos materiais	44
4.1.1	Espectroscopia vibracional no infravermelho (FT-IR)	44
4.1.2	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	45
4.2	Desenvolvimento do método cromatográfico.....	46
4.3	Otimização do preparo de amostra por microextração por sorvente empacotado.....	51
4.4	Parâmetros de validação - figuras de mérito	55
4.4.1	Seletividade.....	55
4.4.2	Linearidade, limites de detecção e limites de quantificação	57
4.4.3	Precisão	69
4.4.4	Exatidão	69
4.4.5	Recuperação e eficiência do processo.....	70
4.4.6	Especificidade da fase sorvente MIP	71
4.5	Amostras reais	76
4.5.1	Aplicação do método a amostras reais.....	76
4.5.2	Teste da hidrólise alcalina.....	77
5	Conclusão	80
6	Perspectivas futuras	82
	Referência bibliográficas	83

1 Introdução

1.1 Os canabinoides

A *Cannabis sativa* é uma das plantas que o homem conhece há mais tempo e seu uso data de milênios nas regiões central e nordeste do continente asiático.¹ Em diversas partes do mundo a planta é ou já foi utilizada para diversos fins, desde a confecção de têxteis até em rituais religiosos.²

A *Cannabis* é a droga de abuso mais comum e mais traficada em todo o mundo^{1,3} e em 2015 estimavam-se cerca de 181,8 milhões de usuários de *Cannabis* ao redor do globo. Embora o número de usuários tenha se mantido relativamente estável nos últimos anos, a *Cannabis* tem ganhado espaço na área de pesquisa internacional de saúde, devido principalmente a mudanças em políticas de legalização e descriminalização em algumas partes do mundo.⁴

Identificaram-se mais de 400 compostos naturais nas plantas de *Cannabis sativa*⁵ uma planta quimicamente complexa que apresenta compostos de diversas classes: flavonoides, mono e sesquiterpenos, esteroides e diversos compostos nitrogenados. Entretanto, uma classe exclusiva de compostos marca essa planta, esses compostos são os canabinoides, caracterizados por estruturas do tipo terpeno-fenólicos com 21 átomos de carbono.^{1,6}

Dentre os mais de 100 compostos classificados como canabinoides, os que se encontram em maior concentração nas plantas de *Cannabis sativa* são o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) e o canabidiol (CBD). O THC é uma substância psicoativa, principal responsável pelos efeitos psicotomiméticos da *Cannabis*, o CBD por sua vez não é psicoativo.⁷ As estruturas dos dois compostos são representadas na Figura 1.

Figura 1 - Estruturas do THC e CBD.

Fonte: Autoria própria (<http://www.chemspider.com/StructureSearch.aspx>).

Uma vez consumido, o THC é metabolizado principalmente no fígado pela ação do citocromo P450 isoenzimas 2C9, 2C19 e 3A4/5^{8,9} sendo oxidado à espécie ativa 11-hidroxi- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC-OH). O THC-OH pode ainda passar por mais uma oxidação, dando origem à espécie 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-ácido carboxílico (THC-COOH).^{5,10} O THC-COOH não é, entretanto, o metabólito final do THC, já que esse composto pode passar ainda por reações de glicuronidação, dando origem ao conjugado glicurônico THC-COOH-glu⁸ que tem caráter mais polar e hidrossolúvel, sendo excretado principalmente na urina. Assim, em análises de rotina, o uso de *Cannabis* geralmente é confirmado pela detecção do THC-COOH livre, que foi liberado de seu conjugado glicurônico por reações de hidrólise química ou enzimática, antes do processo de extração da amostra.¹¹

A Figura 2 apresenta as estruturas químicas dos metabólitos THC-OH, THC-COOH e THC-COOH-glu.

Figura 2 - Estruturas dos principais metabólitos do THC no corpo humano.

11-hidroxi- Δ^9 -tetrahydrocannabinol

11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-ácido carboxílico

Conjugado glicurônico do 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-ácido carboxílico

Fonte: autoria própria (<http://www.chemspider.com/StructureSearch.aspx>).

A descoberta de canabinoides endógenos no corpo humano (endocanabinoides) e seus receptores CB₁ e CB₂ tem alavancado o interesse nos canabinoides como compostos farmacologicamente ativos.¹² Estudos recentes têm avaliado possíveis usos terapêuticos para os canabinoides, incluindo uma gama variada de enfermidades, dentre elas: alívio de dores renais¹³, possível papel como agente anticancerígeno¹⁴, distúrbios alimentares, náusea e vômito, glaucoma, esclerose múltipla, esquizofrenia, distúrbios neurológicos, epilepsia, estresse e ansiedade.¹⁵

Atualmente a *Cannabis* é aprovada para o tratamento de diversas patologias em países como Israel, Canadá e alguns estados dos EUA. Existem, entretanto, alguns estudos que apontam que a administração da planta “in-natura” pode não ter eficácia no tratamento ou ainda piorar as crises epiléticas em pacientes.⁷ Outros efeitos adversos como crises de ansiedade, pânico, euforia, percepção alterada¹⁶ e até mesmo um aumento na taxa de colisões veiculares foram observados em pessoas intoxicadas por canabinoides. Nesses casos, entretanto, torna-se difícil estabelecer os efeitos causados somente pelos canabinoides, pois são comuns os casos de policonsumo de drogas.¹⁷

Atualmente no Brasil, embora os canabinoides sejam ainda substâncias ilícitas, diversos olhares têm se voltado para eles, principalmente por medidas recentes tomadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Em 2016, a ANVISA permitiu que pessoas físicas que tivessem prescrição médica importassem medicamentos à base de canabinoides de maneira mais ágil¹⁸. No mesmo ano, a Agência permitiu o registro de medicamentos à base de *Cannabis sativa* no país, desde que respeitando concentração máxima de 30 mg mL⁻¹ tanto para o THC quanto para o CBD.¹⁹

Dessa forma, em janeiro de 2017, a ANVISA aprovou o registro do medicamento Mevatyl®, o primeiro do país composto de canabinoides. Trata-se de uma solução oral em spray contendo 27 mg mL⁻¹ de THC e 25 mg mL⁻¹ de CBD, indicado para o tratamento sintomático de espasticidade moderada a grave relacionada à esclerose múltipla, sendo destinado a pacientes adultos não responsivos aos tratamentos convencionais.²⁰ Mais recentemente, a ANVISA reconheceu a planta *Cannabis sativa* como planta com potencial medicinal e que pode ser utilizada como matéria-prima para a fabricação de medicamentos que recebam registros no Brasil.²¹

Assim, com o surgimento de novos medicamentos à base de canabinoides, monitorar e quantificar os níveis de THC e seus metabólitos no corpo humano é de extrema importância,

pois pode ajudar a elucidar a farmacocinética desses compostos e avaliação das relações de dose/resposta de medicamentos com canabinoides. Devido às suas características lipofílicas, os canabinoides são armazenados no tecido adiposo e lentamente excretados do corpo. O THC-COOH-glu, por exemplo, pode ser detectado na urina até mesmo semanas depois do consumo de THC ou até meses, em casos de abuso prolongado da substância, o que torna difícil estabelecer, por exemplo, concentrações limites que indiquem consumo recente de canabinoides ou ainda a detecção desses compostos causada pela liberação prolongada dessas substâncias nos tecidos do corpo humano.^{22,23}

Buscando ampliar o escopo forense e toxicológico (abuso ou abstinência de drogas, doping, uso ilegal de substâncias, entre outros) das análises de canabinoides em fluidos biológicos, de modo a auxiliar interpretações e diagnósticos médicos, torna-se necessário o desenvolvimento de métodos analíticos cada vez mais rápidos, precisos, robustos e de fácil. Dessa forma, é dever do químico analítico, o desenvolvimento de métodos de análise que possam ajudar a compreender os efeitos tóxicos e benéficos dos canabinoides, sua ação e seus efeitos no corpo humano ou ainda que possam ajudar na identificação e controle de qualidade de novos medicamentos. Além disso, deve-se sempre buscar o desenvolvimento de novos métodos que além de precisos e robustos, estejam alinhados com as novas tendências e inovações da química analítica, dentre elas a miniaturização dos métodos de preparo de amostra visando o aumento da eficiência dos processos e a diminuição da geração de resíduos químicos.

1.2 Técnicas de preparo e extração de amostras

Um das etapas mais importantes em todo procedimento analítico é a etapa de preparo da amostra. Essa é a etapa em que se extraem os analitos da amostra bruta, obtendo-se um extrato passível de ser analisado com métodos e instrumentos químico-analíticos. Somente com boas práticas de preparo de amostra, alcançam-se resultados analíticos precisos e confiáveis.

Os canabinoides, por exemplo, podem ser encontrados e extraídos de diversas matrizes biológicas: alimentos,²⁴ fluidos corporais tais como urina,²⁵ sangue,²⁶ plasma,²⁷ e saliva²⁸ ou ainda em de amostras ambientais de água e esgoto.^{29,30}

A matriz representa a maior parte da amostra e cada tipo de matriz apresenta suas particularidades, exigem-se assim métodos de preparo de amostra adequados para cada um deles. Uma característica, entretanto, é comum a todas as matrizes, a presença de compostos

interferentes. As matrizes biológicas, por exemplo, podem apresentar diversos interferentes, como proteínas, lipídios, sais e ácidos orgânicos dissolvidos, além de metabólitos diversos.

Os compostos interferentes, além de prejudicarem os resultados analíticos, podem danificar os equipamentos de análise se não forem eliminados de maneira correta. Além disso, os interferentes podem apresentar propriedades químicas similares às dos analitos de interesse, tornando as análises mais complexas. Assim, os objetivos da etapa de preparo de amostra são a eliminação do máximo de interferentes, a máxima extração dos analitos, de maneira a obter-se um extrato puro da amostra. Dessa forma, auxilia-se no bom funcionamento dos equipamentos de análise e melhora-se a detecção dos analitos, uma vez que a presença de interferentes da matriz pode alterar a ionização dos analitos (aumento ou supressão da ionização), quando se utiliza, por exemplo, a técnica de ionização por electrospray (*Electrospray Ionization* - ESI) na espectrometria de massas.³¹

Os métodos de preparo de amostra geralmente envolvem etapas de extração e pré-concentração dos analitos com o uso de diferentes solventes orgânicos. O preparo de amostra, além de diminuir as interferências causadas pela matriz, deve sempre trazer melhoras para os métodos analíticos, como redução nos tempos de extração e de análises e dos volumes de solventes e amostras necessários para cada análise.

Alinhados com os princípios da química verde,³² os novos métodos analíticos e de preparo de amostras buscam sempre utilizar pequena quantidade de solventes, para que se gere o mínimo possível de resíduos, tentando ainda elevar a eficiência dos processos químicos.

Surgiram nas últimas décadas as técnicas de microextração para o preparo de amostras. Destaca-se o trabalho de Arthur e Pawliszyn (1990)³³ que introduziu a técnica de SPME (solid phase microextraction), uma miniaturização da tradicional SPE (solid phase extraction). Os autores utilizaram uma fibra de sílica fundida recoberta com poliimida como fase sólida adsorvente. A fibra era exposta aos analitos e em seguida desorvida termicamente num cromatógrafo a gás.

Desde então, as técnicas de SPME passaram por muitas modificações e atualmente o foco de pesquisa inclui o estudo de novos materiais e recobrimentos mais seletivos, técnicas para extração de amostras *in-vivo*, produção de filmes finos e dispositivos de microextração.³⁴ O foco, entretanto, se mantém sempre em diminuir o tempo de preparo de amostra e de análise, o volume e toxicidade dos solventes orgânicos utilizados nas extrações e os volumes de amostra empregados.

1.3 Polímeros molecularmente impressos

O desenvolvimento de materiais de alta seletividade para SPME ganhou bastante visibilidade científica na última década. Destaca-se uma nova classe de materiais altamente seletivos para SPME, os polímeros molecularmente impressos (MIP, do inglês *molecularly imprinted polymer*).

O que torna os MIPs materiais altamente seletivos é o fato de que estes são sintetizados em um ambiente químico especificamente escolhido. Assim, os MIPs surgem de reações orgânicas de polimerização, que acontecem na presença de uma molécula molde (*template*). A molécula molde é o analito “alvo” ou composto para o qual se deseja maior seletividade do material. Dessa forma, para a síntese dos MIPs são necessários: uma molécula molde, monômeros funcionais e o agente de ligação cruzada (que formará a rede polimérica) e o iniciador radicalar, tudo em um solvente apropriado.^{35,36}

A introdução da molécula molde na reação de polimerização faz com que o polímero obtido ao final apresente cavidades superficiais específicas. Essas cavidades apresentam características complementares, em tamanho, forma e propriedades físico-químicas às da molécula molde empregada. A Figura 3 ilustra o processo de obtenção de MIPs.

Figura 3 - Esquema geral de síntese para os MIPs.

Fonte: Adaptado de Cabal (2013).³⁵

Antes que ocorra a polimerização, deve haver a formação de um complexo de pré-polimerização entre o monômero funcional e a molécula molde. No caso de se utilizar uma molécula molde idêntica aos analitos de interesse, a interação formada entre essas duas espécies definirá o tipo de interação formada também durante o processo de extração e preparo da amostra.

A organização entre monômero e a molécula molde pode ser estabelecida por meio de interações covalentes ou não-covalentes e definirá a disposição tridimensional dos grupos funcionais do MIP. O processo de moldagem molecular mais utilizado envolve interações do tipo não-covalente entre as moléculas de monômero e a molécula molde. Esta abordagem permite a obtenção de MIPs com ampla aplicabilidade e afinidade para uma grande variedade de compostos lipofílicos.³⁷

O ácido metacrílico (MAA, do inglês *methacrylic acid*) é um monômero funcional bastante comum e pode ser utilizado, juntamente com outros agentes de ligação cruzada, para a obtenção de diferentes MIPs para uma grande variedade de moléculas molde com grupos funcionais que sejam aceptadores de prótons ou estabeleçam ligações de hidrogênio.^{38,39}

Além da elevada capacidade de reconhecimento e seletividade moleculares apresentadas pelos MIPs, este tipo de material apresenta vantagens como resistência mecânica e estabilidade perante processos químicos e físicos como aquecimento, adição de solventes orgânicos, ácidos e bases. Isso é devido à natureza entrecruzada do MIP pela adição de agente de ligação cruzada em excesso que confere rigidez e resistência ao material.^{36,40}

De maneira geral, quaisquer compostos capazes de interagir reversivelmente com o monômero funcional podem ser utilizados como molécula molde para produção de MIPs. Podemos citar desde moléculas pequenas como alguns fármacos, aminoácidos ou pesticidas até macromoléculas como as proteínas, até mesmo células e vírus podem ser utilizados como molécula molde para obtenção de MIPs para as mais variadas aplicações.^{41,42}

Terminada a síntese do MIP, o polímero deve ser lavado com soluções ou solventes apropriados e de maneira suficiente para remoção de todas as moléculas molde, deixando livres as cavidades formadas na superfície polimérica. Nessas cavidades é onde acontecerá a adsorção preferencial da molécula utilizada como molde ou de moléculas com estruturas similares.

Se a molécula molde for idêntica a algum dos analitos e após a síntese do MIP, a lavagem do material para retirada da molécula molde for insuficiente podem permanecer na superfície polimérica moléculas molde residuais que durante a análise cromatográfica podem co-eluir com os analitos e levar a resultados falso-positivos.

Para contornar o problema de falso-positivos, principalmente quando o objetivo da análise é atingir limites de detecção e quantificação muito baixos, uma substituição da molécula molde pode ser empregada. Essa substituição consiste na utilização de uma molécula molde que não

seja exatamente o analito alvo e sim um composto com estrutura química similar, mas que apresente um perfil cromatográfico diferente. Dessa forma, utiliza-se uma molécula molde que mimetiza o analito alvo,^{41,43,44} a molécula molde empregada dessa maneira simula a molécula alvo e recebe o nome de “*dummy template*”.

A abordagem de se utilizar um *dummy template* pode ser empregada não apenas para evitar resultados falso-positivos, mas também como uma alternativa quando o analito alvo é uma substância de difícil obtenção, incluindo substâncias raras, de custo muito elevado ou até mesmo ilegais.

Os canabinoides são substâncias ilegais no Brasil e sujeitas a controle especial. Assim, apenas pacientes com prescrição médica ou instituições de pesquisa com permissão especial de importação da ANVISA têm autorização para aquisição legal desses compostos. Além do processo para obtenção da permissão de importação, o custo de soluções dos padrões ou os padrões sólidos de canabinoides, em quantidade suficiente (cerca de 300 mg por síntese) para serem empregados em uma única síntese de MIP, é muito alto, atingindo a casa das dezenas de milhares de reais.

Dessa forma, devido às limitações para obtenção de canabinoides para serem utilizados como moléculas molde para a síntese do MIP, optou-se por utilizar moléculas molde de fácil acesso e custo mais baixo, assim, foi escolhido como molécula molde o composto catequina, um composto polifenólico assim como os canabinoides e de ocorrência natural em plantas.

A escolha da catequina como molécula molde se deve à eficácia comprovada desse composto como molde em MIPs para o preparo de amostras de urina e saliva e posterior identificação de THC e seus metabólitos por LC-MS/MS. Em trabalho publicado, entretanto, os autores utilizaram formas cilíndricas de silicone para dar formato de pequenas pílulas, do tamanho de uma cabeça de alfinete, aos MIPs sintetizados.^{43,44} O objetivo deste projeto, entretanto, é a aplicação do MIP desenvolvido na extração de canabinóides por meio da microextração por sorvente empacotado.

1.4 Microextração por sorvente empacotado (MEPS)

A microextração por sorvente empacotado (MEPS) foi desenvolvida em 2004 por Abdel-Rehim para análise de anestésicos em plasma e é uma miniaturização da SPE convencional. Na MEPS, utiliza-se uma seringa empacotada ou um tipo de microcartucho (chamado BIN – *barrel insert and needle*, no sistema comercial) empacotado com a fase sorvente, que contém a agulha

e que se acopla a uma microseringa. Dessa forma, para a extração dos analitos, a amostra é aspirada para dentro da seringa, antes passando pela fase extratora, onde os analitos são sorvidos em um processo similar ao da SPE.^{45,46}

Entretanto, diferentemente da SPE, a MEPS permite que a amostra seja passada através da fase sorvente diversas vezes e não se faz necessário o uso de dispositivos adicionais como diversos cartuchos de extração, *manifolds* ou bombas de vácuo. O preparo da amostra é feito unicamente com o auxílio da microseringa em ciclos de aspirar e dispensar, quantas vezes forem necessários. A Figura 4 ilustra uma seringa utilizada em MEPS.

Figura 4 - Uma seringa comercialmente utilizada para MEPS e descrição de seus componentes.

Fonte: Adaptado de Abdel-Rehim (2010).⁴⁶

O procedimento de MEPS é realizado em diferentes etapas, nas quais se realizam ciclos de aspirar/dispensar solventes ou a amostra através da fase extratora empacotada no BIN e para dentro da microseringa. De maneira geral, destacam-se 4 etapas básicas no preparo de amostra por MEPS. Sendo que o número de ciclos de aspirar/dispensar da microseringa, podem ser repetidos quantas vezes necessário. Primeiramente, realiza-se o condicionamento da fase sorvente com um ou mais solventes apropriados, a depender da aplicação do método. Em seguida, realiza-se a etapa de amostragem, na qual se realizam os ciclos de aspirar/dispensar a amostra e acontece a retenção dos analitos na fase sorvente empacotada. Após a amostragem, realiza-se geralmente uma etapa de lavagem com objetivo de eliminar os compostos

interferentes pouco retidos da fase sorvente. Ao final do procedimento, com um solvente apropriado, faz-se a eluição dos analitos da fase sorvente para um frasco de coleta ou então diretamente para o equipamento analítico.^{47,48} A Figura 5 ilustra as etapas básicas de um preparo de amostra por MEPS.

Figura 5 - Etapas básicas de um procedimento de extração por MEPS.

Fonte: adaptado de Abdel-Rheim (2004).⁴⁵

A fase sorvente empregada é um dos aspectos mais importantes de um procedimento de MEPS, pois a seletividade do método vai depender do tipo de fase sorvente utilizada, uma vez que os analitos são retidos por diferentes tipos de interações reversíveis (hidrofóbicas, polares e iônicas) com a fase sorvente. Assim, diferentes analitos exigirão diferentes fases sorventes para uma boa extração. Diversos tipos de fases sorventes comerciais e não-comerciais vêm sendo utilizadas em MEPS. As fases comerciais incluem aquelas baseadas em sílica, como sílica não modificada; fases C₂ (etil); fases C₈ (octil), C₁₈ (octadecil); fases de troca aniônica e catiônica (SCX), entre outros. Dentre algumas fases não-comerciais, destacam-se: monolitos de sílica funcionalizada (aminopropil ou cianopropil-silanos); fases poliméricas como polipirrol (PPy), poliamidas (PA), nano fios de polianilina ou ainda fases mais seletivas como os MIPs. Além da versatilidade da MEPS, pela grande variedade de fases sorventes que podem ser empregadas nas extrações, a durabilidade é um fator importante, pois um mesmo dispositivo de extração pode ser reutilizado até 100 vezes (ou mais), dependendo da aplicação.^{48,49}

No caso da aplicação de MIPs como fase sorvente para MEPS, existem alguns estudos publicados nos últimos anos, entre eles: determinação de ácido trans,trans-mucônico em amostras de urina;⁵⁰ determinação de anestésicos locais (lidocaína, ropivacaína, mepicavaína e bupivacaína) em amostras de plasma e urina;⁵¹ determinação de ácido mandélico em urina;⁵² e determinação de fluoroquinolona⁵³ e compostos estrogênicos⁵⁴ em água.

Com relação à utilização de MEPS para a determinação de THC e seus metabólitos, foram encontradas apenas 2 publicações que tratam do assunto. Existe ainda uma terceira publicação, mas que trata da análise de canabinoides sintéticos entre outras novas substâncias psicoativas. Entretanto, nas 3 publicações os autores utilizam apenas fases sorventes comerciais.

A primeira publicação é de Sergi et al. (2013)⁵⁵ na qual os autores realizaram a determinação de 5 canabinoides (canabinol, CBD, THC, THC-OH e THC-COOH) em amostras de saliva. Os autores utilizam uma microseringa de 250 μL empacotada com fase sorvente C_{18} , da marca SGE (Itália). Nesse trabalho, foram utilizados 250 μL de amostra diluída (2 vezes com 50 mM de ácido fórmico em metanol) e ao final do preparo da amostra a eluição dos analitos foi feita com 50 μL de solução de hidróxido de amônio (50 mM) em metanol, dos quais 10 μL foram injetados num sistema de LC-MS/MS. Neste trabalho, os autores alcançaram LD de 0,008 ng mL^{-1} para o THC-COOH na faixa linear até 1 ng mL^{-1} ; e LDs de 0,08; 0,10; 0,12 e 0,12 ng mL^{-1} para o THC, CBD, CBN e THC-OH, respectivamente, na faixa linear até 250 ng mL^{-1} .

A segunda publicação é do ano de 2017, na qual Rosado et al.⁵⁶ realizaram a determinação de THC, THC-OH e THC-COOH em amostras de plasma. Nesse trabalho, os autores utilizaram uma microseringa de 250 μL empacotada com a fase mista “M1” (4 mg; 80% fase C_8 e 20% fase SCX), da marca SGE (Austrália). A extração foi feita a partir de 5,25 mL de amostra diluída (21 vezes com tampão fosfato pH 6,0) e, ao final, a eluição dos analitos foi feita com 100 μL de solução 10% de hidróxido de amônio em metanol. Esse extrato foi ainda evaporado sob fluxo de N_2 e depois de seco foi derivatizado com 65 μL de n-metil-n-(trimetilsilil)trifluoroacetamida e 5% de trimetilclorosilano em termobloco a 85 $^{\circ}\text{C}$ por 40 minutos. Após a derivatização, 2 μL dessa solução foram injetados em um sistema de GC-MS. Neste trabalho, os autores alcançaram LDs de 0,1 ng mL^{-1} para todos os analitos, na faixa linear de 0,1 até 30 ng mL^{-1} .

A terceira publicação é autoria de Rocchi et al. (2017)⁵⁷ e nela os autores realizam a determinação de catinonas sintéticas, piperazinas, feniletilaminas, canabinoides sintéticos e seus metabólitos, em saliva. Embora, não sejam obtidos da *Cannabis sativa*, os canabinoides sintéticos atuam nos mesmos receptores CB₁ e CB₂ que os canabinoides naturais. Para o preparo da amostra, os autores utilizaram uma microseringa empacotada com fase sorvente C₁₈, da marca SGE (Austrália) e 200 µL de amostra diluída (2,2 vezes com metanol e água). Ao final da extração, a eluição foi feita com 100 µL de metanol com 10 mM de ácido fórmico, esse extrato foi diluído com mais 100 µL de água e a análise se deu pela injeção de 2 µL dessa solução final, num sistema de UHPLC-MS/MS.

Neste projeto, para o empacotamento da fase sorvente, diferente dos dispositivos comerciais que empregam um BIN, empregou-se um microdispositivo projetado no próprio laboratório (pedido de patente BR1020130254517)⁵⁸ e confeccionado em politetrafluoretileno, na oficina mecânica do Instituto de Química de São Carlos (IQSC). O microdispositivo de extração é desmontável e reaproveitável e foi empacotado com as fases poliméricas sintetizadas. Esse microdispositivo permite que se empregue praticamente qualquer fase sólida sorvente numa extração por MEPS, tornando-o um dispositivo muito versátil e dinâmico. Maiores detalhes sobre o empacotamento, montagem do microdispositivo e sua utilização, encontram-se na seção 3.6 do tópico de materiais e métodos.

Para a operação da microseringa utilizada no preparo de amostra, utilizou-se outra tecnologia projetada no próprio laboratório e confeccionada na oficina mecânica do IQSC. Trata-se de um robô cartesiano, composto por um arranjo de atuadores lineares independentes, controlados por uma placa Arduino (Patente BR1020180046080).⁵⁹ O robô é capaz de realizar pipetagem e diversos procedimentos de microextração além de ser capaz de operar até 6 seringas simultaneamente em diferentes procedimentos de extração, permitindo a automatização do processo. Maiores detalhes sobre a montagem das seringas e operação do robô cartesiano, encontram-se na seção 3.6 do tópico de materiais e métodos.

Em razão do levantamento da literatura e conforme descrito sobre as características dos MIPs, neste trabalho foi proposto o desenvolvimento de um novo método de preparo de amostras de urina por MEPS com a utilização de um MIP como fase sólida sorvente. Por ser um método novo, o mesmo precisa ser avaliado estatisticamente para garantir a qualidade dos resultados obtidos.

1.5 Validação de métodos analíticos

A validação de um novo método analítico deve ser feita de modo a garantir que as informações obtidas sobre a amostra sejam confiáveis e interpretáveis. Um processo de validação oferece evidências objetivas de que os novos métodos e tecnologias são adequados para o uso desejado. Diversos parâmetros podem ser avaliados na validação de um método analítico, dentre eles, os escolhidos como relevantes para a avaliação do método aqui desenvolvido foram: seletividade, linearidade (curvas de calibração), precisão, exatidão, limite de quantificação, limite de detecção e eficiência da extração (ou recuperação). Esses parâmetros serão definidos a seguir, de acordo com algumas publicações sobre o assunto.⁶⁰⁻⁶²

1.5.1 Seletividade

A seletividade de um método analítico é a capacidade do método de avaliar, de forma indubitável, as substâncias e analitos de interesse na presença de compostos que possam interferir em sua determinação em uma amostra de matriz complexa, como metabólitos, produtos de degradação, fármacos coadministrados, compostos endógenos ou ainda compostos com propriedades similares aos analitos, que possam, por ventura, estar presentes.

Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, precisão, exatidão do método podem estar gravemente comprometidas, uma vez que é esse parâmetro que garante que a resposta (pico cromatográfico, no caso) seja exclusivamente do composto de interesse. Os métodos seletivos não devem apresentar nenhum interferente visível pelo detector empregado na região do analito de interesse.

A seletividade pode ser estudada de diversas formas. Uma das formas de avaliá-la é comparando-se resposta obtida pela análise da matriz isenta dos compostos de interesse com a resposta obtida da análise da matriz adicionada (fortificada) dessa substância. Para comprovação da seletividade do método, nenhum interferente deve eluir e ser detectado no mesmo tempo de retenção do composto de interesse. Caso exista algum composto interferente que apresente resposta no mesmo tempo de retenção do analito, este não deve apresentar-se com intensidade maior do que 20% daquela de um pico equivalente ao limite de quantificação do analito.

1.5.2 Linearidade

A linearidade do método avalia sua capacidade de fornecer respostas diretamente proporcionais à concentração do analito, dentro de uma faixa (intervalo) de aplicação. Para cada analito em estudo deve-se elaborar uma curva de calibração, um modelo matemático que relacione a resposta instrumental obtida (y = área do pico cromatográfico, por exemplo) com a concentração do analito (x).

Para a construção da curva de calibração, pode ser utilizada uma ferramenta matemática conhecida, como a regressão linear pelo método dos quadrados mínimos. Com uso da regressão linear, estimam-se os coeficientes da curva de calibração, a partir das medições experimentais, obtendo-se uma equação do tipo $y = a + bx$, além do coeficiente de correlação r . O coeficiente de correlação r , é uma estimativa da qualidade da curva de calibração obtida, quanto mais próximo de 1,0 o valor de r , menor é a dispersão dos dados experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão a e b .

De modo a conseguir métodos com a melhor exatidão possível, pode-se fazer a padronização/compensação das respostas para a construção da curva de calibração. Uma das maneiras de se realizar essa compensação é a utilização de padrão interno (PI), que permite avaliar a variação da resposta instrumental de acordo com as manipulações da amostra (quantidade do analito, procedimento de extração ou preparo da amostra, entre outros). O PI deve ser adicionado em quantidade fixa nas diferentes soluções calibradoras (matriz fortificada com os analitos de interesse) utilizadas para construção da curva de calibração e para a quantificação de amostras desconhecidas. O PI utilizado deve ser similar à substância a ser quantificada, apresentar tempo de retenção próximo a essa substância, não reagir com os analitos ou outros componentes da matriz e não fazer parte da amostra (é comum o uso de padrões deuterados ou com alguma outra marcação isotópica). Quando se utiliza o método da padronização interna, a resposta instrumental (y) considerada para a construção das curvas de calibração é dada pela razão área do pico do analito/área do pico do padrão interno.

Dentro da faixa de concentração da curva de calibração, a dispersão dos valores de y pode ser independente dos valores de x , seguindo uma distribuição normal, essa propriedade é conhecida como homocedasticidade. A homocedasticidade dos dados experimentais pode ser avaliada por um teste F de significância, onde se comparam as variâncias observadas nos pontos extremos da curva de calibração. Se a variância for constante por todo o intervalo da curva de

calibração, o modelo é denominado como homocedástico e os resíduos estarão aleatoriamente distribuídos no eixo x, caso contrário, o modelo é denominado heterocedástico.

Nos casos em que a variância não é constante por toda a faixa de concentração e o modelo apresentar falta de ajuste, algumas opções podem ser consideradas, dentre elas: 1) um novo intervalo para a curva de calibração e aplicação de um novo teste F de significância no novo intervalo; 2) uso de fator de ponderação (w) para contornar a heterocedasticidade e geração de um novo modelo ponderado de regressão.

No caso de modelos ponderados de regressão, utilizam-se fatores de ponderação que geralmente são valores empíricos, comumente $1/x$; $1/x^2$; $1/x^{1/2}$; $1/y$; $1/y^2$ e $1/y^{1/2}$, cada fator de ponderação diferente utilizado, gerará novos coeficientes a , b e r para a curva de calibração. A escolha do melhor fator de ponderação se dá pela somatória dos resíduos relativos, sendo que o fator de ponderação que apresentar o menor valor para a somatória dos resíduos deve ser escolhido.⁶²

1.5.3 Precisão

A precisão representa a dispersão dos resultados obtidos de repetições de ensaios independentes, de uma mesma amostra. A precisão pode ser expressa como uma estimativa do desvio padrão (s) ou do desvio padrão relativo (DPR) de uma série de repetições da mesma amostra, em diferentes extrações e análises. A precisão possibilita decidir se o método desenvolvido é confiável ou não para o objetivo da análise.

A precisão pode ser avaliada de algumas maneiras, dentre elas a precisão intra-dia e a precisão inter-dias. A precisão intra-dia é a medida da habilidade do método em fornecer os mesmos resultados em um curto espaço de tempo (durante mesmo dia), nas mesmas condições de análise, pelo mesmo analista, com o mesmo equipamento, no mesmo laboratório e utilizando os mesmos reagentes. Já a precisão inter-dias mede a habilidade do método em fornecer os mesmos resultados quando as análises são conduzidas no mesmo laboratório, mas em no mínimo dois dias diferentes.

1.5.4 Exatidão

A exatidão expressa a concordância entre os resultados obtidos pelo método (curva de calibração) e os valores nominais de concentração, usados de referência. A exatidão pode ser expressa como o erro relativo, em porcentagem, do valor nominal de concentração.

A precisão e exatidão devem ser avaliadas em no mínimo 3 níveis de controle de qualidade: baixo, médio e alto; de acordo com a faixa linear da curva de calibração. As amostras de controle de qualidade devem ser submetidas às mesmas etapas de preparo de amostra das soluções de calibração (em matriz) empregadas na curva de calibração e das amostras desconhecidas. A exatidão é então determinada para cada nível do controle de qualidade, pela medida da concordância entre a média das concentrações medidas e as nominais.

1.5.5 Limite de detecção

O limite de detecção é definido como a menor concentração de um analito que o método é capaz de discriminar confiavelmente do ruído de fundo. Nessa concentração, o analito é detectado com segurança, entretanto, não pode ser quantificado. Recomenda-se que essa concentração seja definida como a concentração em que o sinal obtido para o analito seja pelo menos 3 vezes maior que o ruído da linha de base nas proximidades do pico.

1.5.6 Limite de quantificação

O limite de quantificação, por sua vez, é definido como a menor concentração para o analito de interesse em uma amostra, que pode ser quantificado com valores aceitáveis de precisão e exatidão. Recomenda-se para o limite de quantificação que a razão entre o sinal do analito e o ruído da linha de base nas proximidades do pico seja de no mínimo 10.

1.5.7 Eficiência da extração

A eficiência da extração é calculada comparando-se a resposta obtida para os analitos adicionados na matriz e extraídos com as respostas obtidas para os analitos em amostras preparadas em solvente puro e que não são submetidas ao processo de extração, cujos valores de área são considerados como 100% de eficiência.

A eficiência da extração deve ser avaliada em 3 níveis de concentração. Usualmente utilizam-se os mesmos níveis baixo, médio e alto empregados no controle de qualidade. Os valores obtidos para a eficiência da extração devem ser consistentes, precisos e reprodutivos.

2 Objetivos

- Síntese e caracterização de um polímero molecularmente impresso (MIP) e um polímero equivalente sem impressão molecular (NIP) para fins de comparação.
- Desenvolvimento e aplicação de método em cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (HPLC-MS/MS) na separação e análise de canabinoides: THC e seus metabólitos THC-OH e THC-COOH.
- Aplicação do MIP como sorvente no preparo de amostra via MEPS e posterior análise de canabinoides em amostras de urina por cromatografia líquida.
- Utilização de planejamento experimental para otimização das etapas de amostragem e eluição do método de preparo de amostra via MEPS.
- Validação do método MEPS-HPLC-MS/MS desenvolvido pelas seguintes Figuras de mérito: linearidade, precisão, exatidão, eficiência de extração e seletividade.
- Análise de amostras reais desconhecidas de urina com o método desenvolvido.

3 Materiais e métodos

3.1 Reagentes e solventes empregados para síntese dos polímeros

Os reagentes utilizados no processo de síntese foram: a molécula molde hidrato de catequina (CT) ($\geq 98\%$), o monômero ácido metacrílico (MAA) (99%), o agente de ligação cruzada etilenoglicol dimetacrilato (EGDMA) (98%) e o iniciador radicalar diidrocloro de 2,2'-azobis(2-metilpropionamida) (AAPH) (97%), todos adquiridos de Sigma-Aldrich.

Os solventes orgânicos empregados no processo de síntese foram a acetonitrila (ACN) e metanol (MeOH), ambos de grau HPLC, da fabricante Tedia. Adicionalmente utilizou-se água ultrapura de um sistema Milli-Q da Millipore.

Os reagentes e monômeros empregados na síntese são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Reagentes empregados nas sínteses dos MIPs e NIP.

Ácido metacrílico

Etilenoglicol dimetacrilato

Diidrocloro de 2,2'-azobis(2-metilpropionamida)

Hidrato de catequina

Fonte: Autoria própria (<http://www.chemspider.com/StructureSearch.aspx>).

3.2 Síntese do MIP e NIP

Para a síntese dos polímeros foi empregado o método de precipitação adaptado de Lendoiro et al. (2013),⁴³ no qual utilizou-se excesso de solvente. Para as sínteses dos polímeros, a proporção inicialmente pensada de 6:6:1 entre o monômero funcional (MAA), o agente de ligação cruzada (EDGMA) e a molécula molde (CT), foi modificada para 4:10:1 que se mostrou uma proporção capaz de produzir um bom tamanho de partícula e rendimento, permitindo a filtragem e separação da fase polimérica do meio reacional.

Com a adaptação do método de síntese, mostrou-se importante a utilização de uma mistura de solventes que permitisse a solubilidade de todos os componentes da mistura reacional: monômeros funcionais, agente de ligação cruzada, molécula molde e o iniciador radicalar sólido. Dessa forma, o solvente inicialmente pensado para ser utilizado nas sínteses (ACN) foi substituído pela mistura de solventes de MeOH, ACN e H₂O. Assim, após alguns testes de misturas com diferentes proporções entre os 3 solventes, determinou-se a proporção de 3:2:3 entre água, metanol e acetonitrila como o solvente empregado na síntese. De acordo com Sousa e Barbosa (2009),³⁷ os MIPs obtidos em solventes orgânicos puros têm capacidade de reconhecer a molécula molde em solução aquosa. Entretanto, os autores destacam que é importante melhorar os processos de moldagem molecular ocorrido em meio aquoso, para a geração de materiais que funcionem mais eficientemente nas extrações em soluções aquosas.

Para a síntese do MIP, primeiramente realizou-se a dissolução da molécula molde (CT) em 25 mL de metanol, diretamente no balão reacional. Após 5 minutos no ultrassom, foram adicionados 37,5 mL de acetonitrila e levou-se o balão reacional ao ultrassom por outros 5 minutos. Em seguida, adicionou-se o monômero funcional (MAA) e o agente de ligação cruzada (EGDMA) nas proporções adequadas e a mistura permaneceu no ultrassom por mais 15 minutos, decorrido esse tempo, o iniciador radicalar foi dissolvido em 37,5 mL de água destilada e o balão reacional foi devidamente inserido no banho termostático aquecido a 55 °C.

Para evitar a perda dos solventes por evaporação, em uma das bocas do balão acoplou-se um condensador resfriado por água corrente e na outra boca, inseriu-se uma seringa ligada ao cilindro de gás N₂, de forma que houvesse fluxo constante de N₂ pelo balão reacional e a reação acontecesse em atmosfera inerte. Assim, a reação de polimerização prosseguiu por 24 h com auxílio de agitador magnético. A Figura 6 a seguir ilustra o aparato de síntese.

Figura 6 - Sistema reacional para síntese do MIP e NIP.

Fonte: Autoria própria.

Terminada a síntese, os materiais sintetizados foram filtrados em funil de Büchner e lavados com ACN, após a filtragem os materiais foram deixados em capela por uma noite para a evaporação de resíduos de solventes. Após isso, os materiais foram peneirados com peneiras metálicas de 400 e 200 mesh (38 e 75 μm , respectivamente). A fração que restou entre as duas peneiras, compreendendo as partículas com tamanho entre 38 e 75 μm foi suspensa em acetona.

A suspensão em acetona foi feita em um béquer pequeno. No béquer adicionava-se quantidades conhecidas de acetona, misturava-se e a suspensão era deixada em repouso por intervalos de tempo entre 7 e 10 minutos. Passado esse tempo, a fração sobrenadante, contendo acetona e particulado fino era coletada. A fase contendo o polímero sedimentado permanecia no fundo do béquer e adicionando-se mais acetona repetia-se esse procedimento até que se obtivesse a fração sobrenadante límpida, indicando que o particulado mais fino fora eliminado.

Para a síntese do polímero equivalente sem a impressão molecular (NIP) repetiu-se o mesmo procedimento anteriormente citado. Eliminando-se, entretanto, a primeira etapa de dissolução da molécula molde em metanol.

Ao final da síntese, obtiveram-se 2 materiais correspondentes às fases sólidas poliméricas: um MIP utilizando o composto catequina como molécula molde (MIP-CT) e o equivalente sem impressão molecular (NIP) sintetizado na ausência de molécula molde.

Terminadas as sínteses do MIP e do NIP, os polímeros obtidos foram lavados seguindo o mesmo procedimento para eliminação da molécula molde. Embora o NIP não seja sintetizado na presença de uma molécula molde, deve-se submetê-lo ao processo de lavagem para garantir que os materiais passaram pelos mesmos processos físicos e químicos, garantindo-se que a única diferença entre eles seja o uso da molécula molde durante o processo de síntese do MIP.

3.3 Caracterização dos materiais

3.3.1 Espectroscopia vibracional no infravermelho por transformada de Fourier

O MIP e o NIP foram levados para análise na Central de Análises Químicas Instrumentais do Instituto de Química de São Carlos (CAQI/IQSC/USP), lá foram homogeneizados com sal de KBr, pastilhados com auxílio de prensa mecânica e analisados em espectrofotômetro IRAffinity-1 (Shimadzu), na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} .

3.3.2 Microscopia eletrônica de varredura

O MIP e o NIP foram levados para análise na Central de Análises Químicas Instrumentais do Instituto de Química de São Carlos (CAQI/IQSC/USP) e previamente à análise fotomicrográfica, as amostras foram recobertas por uma camada nanométrica de ouro em um metalizador Coating System BAL-TEC MED 020 (BAL-TEC). Após o recobrimento, as fotomicrografias foram obtidas em um microscópio ZEISS LEO 440 (Zeiss) com detector OXFORD (modelo 7060), com feixe de elétrons de 15 kV, corrente de 2,82 A e I probe de 200 pA.

3.4 Reagentes e solventes empregados para desenvolvimento do método cromatográfico

Os solventes orgânicos empregados no desenvolvimento do método cromatográfico foram a acetonitrila (ACN) grau HPLC (Tedia) e água ultrapura (H_2O) de um sistema Millipore, adicionalmente utilizou-se ácido fórmico 98% grau MS (Fluka).

Por se tratarem de substâncias com consumo ilegal no Brasil, as amostras biológicas, assim como os padrões analíticos de canabinoides utilizados foram fornecidos por meio de parceria com a Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Laboratório de Toxicologia Analítica do

Centro de Informação e Assistência Toxicológica de Campinas (LTA-CIATox-Campinas), ambos da Unicamp, com aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/FCM/UNICAMP nº 07741412.6.0000.5404) e as autorizações necessárias para a compra desses padrões.

Os padrões fornecidos eram todos na forma de solução em metanol (MeOH), da marca Cerilliant. Os padrões analíticos utilizados e suas concentrações são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Padrões analíticos utilizados durante o desenvolvimento dos métodos.

Analito	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
THC	100
THC-OH	100
THC-COOH	20
THC-COOH-d3	20

THC: Δ^9 -tetrahydrocannabinol

THC-OH: 11-hidroxi- Δ^9 -tetrahydrocannabinol

THC-COOH: 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-ácido carboxílico

Fonte: Autoria própria.

3.5 Desenvolvimento do método cromatográfico

Para o desenvolvimento do método cromatográfico foram realizados testes preliminares em um cromatógrafo líquido, série Prominence 20A (Shimadzu), com detecção por UV-Vis. Para a detecção dos analitos, utilizaram-se o comprimento de onda de 209 nm⁶³ para o THC e o comprimento de onda de 220 nm⁶⁴ para os metabólitos THC-OH e THC-COOH, utilizando coluna analítica Poroshell 120 EC-C₁₈ (Agilent) de 100 mm de comprimento, 2,1 mm de diâmetro interno e partículas com tamanho de 2,7 μm .

Entretanto, durante o desenvolvimento do método cromatográfico, verificou-se que embora o THC fosse separado cromatograficamente dos dois metabólitos, estes últimos co-eluíam durante a corrida, impossibilitando sua detecção individual e simultânea por UV-Vis. Para a identificação simultânea dos dois metabólitos e buscando menores limites de detecção, a partir daí optou-se por utilizar a detecção por espectrometria de massas.

Dessa forma, utilizou-se um equipamento ACQUITY HPLC acoplado com o espectrômetro de massas Xevo TQ-MS (Waters, Milford, Massachusetts, EUA); que consiste de um analisador de massas do tipo triplo quadrupolo que foi operado no modo de aquisição “MRM - (*multiple reaction monitoring*)”. O desenvolvimento do método foi feito com injeções de água

ultrapura fortificada com os padrões analíticos do THC, THC-OH e THC-COOH, cada um na concentração de 100 ng mL⁻¹.

A separação cromatográfica foi feita no modo de gradiente. Foram testadas as fases móveis H₂O e acetonitrila (ACN) puras e com a adição de ácido fórmico. A combinação de fases móveis que resultou nas maiores áreas cromatográficas para a maioria dos analitos foi escolhida. Depois da escolha das fases móveis, avaliou-se também diferentes *dwell times* (150, 200 e 250 ms) para a aquisição dos dados. Foi escolhido o *dwell time* com os melhores valores de desvio padrão para as respostas dos analitos. As principais características do cromatógrafo e as condições de análise estão descritas na Tabela 3 a seguir.

Tabela 3 - Equipamento e características utilizadas para separação cromatográfica.

	Cromatógrafo Waters ACQUITY HPLC
Coluna analítica	Poroshell 120 EC-C18 - 2.7 µm (2,1 x 100 mm)
Temperatura do forno	40 °C
Fase móvel	H ₂ O* (A) / ACN* (B)
Volume de injeção	10 µL
Fluxo de análise	0,20 mL min ⁻¹
Software	Masslynx

*Ambas as fases foram acidificadas com 0,1% de ácido fórmico.

Fonte: Autoria própria.

Os parâmetros de funcionamento do espectrômetro de massas utilizado para a detecção dos analitos durante o desenvolvimento do método encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4 - Equipamento e características utilizadas para a detecção dos compostos.

Xevo TQ MS Detector	
Fonte de ionização	“ <i>Electrospray Ionization</i> – ESI”
Modo de ionização	Positivo
Temperatura do gás de secagem	400 °C
Fluxo do gás de secagem	800 L h ⁻¹
Temperatura da fonte	150 °C

Software	MS Tune
Fonte: Autoria própria.	

Durante o desenvolvimento do método foram realizados testes para determinar as melhores condições para a detecção por espectrometria de massas. Dessa maneira, foram realizados estudos para a determinação dos íons de quantificação e confirmação utilizados para a detecção dos analitos, assim como outros parâmetros instrumentais como *dwell time* e os potenciais do cone e da cela de colisão.

Os parâmetros selecionados assim como as transições monitoradas para cada analito são exibidos na Tabela 5 a seguir, todas as transições foram monitoradas no modo positivo. Embora o cromatógrafo utilizado tenha a ferramenta *IntelliStart* para infusão direta dos analitos no detector e otimização do método de espectrometria de massas, essa ferramenta consome um volume relativamente grande dos padrões analíticos e assim, devido aos volumes limitados dos padrões analíticos, optou-se por utilizar parâmetros publicados anteriormente^{26,65} para a detecção dos analitos por espectrometria de massas.

Tabela 5 - Parâmetros utilizados para a detecção por espectrometria de massas.

Composto	Íon precursor (m/z)	Íon fragmento (m/z)	<i>Dwell time</i> (s)	Potencial do cone (V)	Potencial de colisão (V)
THC	315,4	123,2 ^b	0,15	16	34
		193,3 ^a	0,15	16	24
THC-OH	331,0	201,0 ^b	0,15	30	20
		313,0 ^a	0,15	30	15
THC-COOH	345,0	299,0 ^a	0,15	35	21
		327,0 ^b	0,15	35	21
THC-COOH-d3	348,0	302,0 ^a	0,15	35	21
		330,0 ^b	0,15	35	21

a: íon de quantificação

b: íon de confirmação

Fonte: Autoria própria.

THC: Δ^9 -tetrahydrocannabinol

THC-OH: 11-hidroxi- Δ^9 -tetrahydrocannabinol

THC-COOH: 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-ácido carboxílico

3.6 Preparo do sistema de microextração por MEPS

O MIP e o NIP sintetizados foram utilizados como fase sorvente para o preparo dos microdispositivos de extração utilizados no desenvolvimento do projeto. Para o emprego dessas fases como sorvente, utilizou-se tecnologia desenvolvida no próprio laboratório, uma miniaturização da técnica SPE tradicional⁵⁸ que permite a adaptação a microseringas. A Figura 7 a seguir ilustra o microdispositivo utilizado para o emprego das fases sorventes e o preparo da amostra por MEPS.

Figura 7 - Seringa e demais dispositivos utilizados para preenchimento com fase adsorvente sólida e montagem da seringa.

Fonte: Autoria própria.

Para preenchimento do microdispositivo com a fase polimérica, primeiramente posicionou-se os *screens* metálicos cada um em uma das peças das extremidades. A peça do meio foi encaixada em uma das extremidades e preenchida com aproximadamente 1 mg da fase polimérica extratora, pouco a pouco, com auxílio de uma espátula. Após o microdispositivo estar completamente preenchido pela fase polimérica, a outra extremidade foi encaixada e a fase extratora ficou acondicionada entre os *screens* metálicos, dentro do microdispositivo. O BIN foi então acoplado à parte superior da agulha e conectado com auxílio da porca à uma seringa do tipo *gastight* de 500 µL da marca Hamilton.

Após sua conexão na seringa, realizaram-se alguns ciclos de aspirar e dispensar para verificar se havia vazamentos no microdispositivo. Constatada a ausência de vazamentos, a

seringa foi acoplada ao robô cartesiano que realizava as etapas do método de extração, como ilustrado na Figura 8 a seguir.

Figura 8 - Robô cartesiano e microseringas utilizados nas extrações MEPS.

Fonte: autoria própria.

Para o funcionamento do robô foi desenvolvido um *sketch* na IDE (*interface development environment*) do Arduino, baseado nas linguagens C++ e Processing. O *sketch*, pode ser editado para inclusão ou exclusão de etapas no procedimento de extração, mas de maneira geral, é suficiente programar o volume utilizado e o número de ciclos de aspirar e dispensar a ser realizado em cada etapa. Vale ressaltar que o volume de solvente ou amostra aspirado e dispensado da seringa é calculado com base no número de passos do motor, sendo que o volume completo da seringa (500 μL) equivalia à 12200 passos do motor. A Figura 9 a seguir ilustra a programação feita para uma etapa do método de extração.

Figura 9 – *Sketch* desenvolvido para operação do robô cartesiano.

Fonte: autoria própria.

O robô conta ainda com um suporte com capacidade para até 8 tubos ou vials com solventes de extração e lavagem, amostra ou para coleta do extrato final. As seringas extratoras foram então acopladas ao robô cartesiano para realização dos procedimentos de MEPS. Dessa maneira, o procedimento inicial proposto de acordo com relatos prévios na literatura⁵⁵ e que foi otimizado para o preparo de amostra via MEPS é o seguinte, partindo-se de 700 µL de amostra:

- Condicionamento 1: 90% ACN, 250 µL x 3 ciclos
- Condicionamento 2: água, 250 µL x 3 ciclos
- Amostragem: 250 µL x 3 ciclos
- Lavagem: água, 250 µL x 3 ciclos
- Secagem: ar, 250 µL x 3 ciclos

- Eluição: 90% ACN, 100 μL x 10 ciclos
- Lavagem da fase extratora: 90% ACN, 500 μL x 10 ciclos

3.7 Otimização do método de preparo de amostra por MEPS

Para a otimização do método de MEPS, as análises foram feitas no LTA-CIATox Campinas devido à problemas com o sistema ACQUITY HPLC. Assim, utilizou-se um cromatógrafo líquido, série Nexera X2 30AD acoplado a um espectrômetro de massas LCMS-8060 (ambos Shimadzu). Utilizaram-se métodos e parâmetros de rotina para análises de canabinoides desenvolvidos no próprio LTA-CIATox. Empregou-se uma coluna analítica Titan C18 (Sigma-Aldrich) de 100 mm de comprimento, 2,1 mm de diâmetro interno e partículas com tamanho de 1,9 μm .

Realizou-se um estudo de planejamento experimental do tipo composto central para as etapas de amostragem e eluição. O objetivo foi identificar as melhores condições de trabalho para essas duas etapas e propor um modelo que correlacionasse as variáveis volume e número de ciclos de cada uma das etapa, com as respostas⁶⁶ analíticas (área dos picos cromatográficos para os analitos), de modo a maximizá-las.

Para isso, as duas variáveis volume e número de ciclos foram testadas em 5 níveis diferentes, variando de $-\sqrt{2}$ a $\sqrt{2}$ com os analitos na concentração de 20 ng mL^{-1} . A Tabela 6 mostra as condições que foram testadas para a etapa de amostragem, as demais etapas permaneceram como descritas anteriormente e a etapa de eluição foi fixada em 20 ciclos de 100 μL , optou-se por um grande número de ciclos nessa etapa para se ter maior segurança de que todos os analitos fossem removidos da fase extratora.

Tabela 6 - Condições experimentais para otimização da etapa de amostragem

Exp. nº	Volume		nº de ciclos	
	Valor real (μL)	Valor normalizado	Valor real	Valor normalizado
1	138	-1	4	-1
2	438	1	4	-1
3	138	-1	14	1
4	438	1	14	1

5	288	0	9	0
6	288	0	9	0
7	288	0	9	0
8	76	$-\sqrt{2}$	9	0
9	288	0	2	$-\sqrt{2}$
10	500	$\sqrt{2}$	9	0
11	288	0	16	$\sqrt{2}$

Fonte: Autoria própria.

De maneira similar, realizou-se o planejamento experimental para a etapa da eluição dos analitos da fase extratora. Para isso uma nova série de experimentos foi planejada e executada, como mostrado na Tabela 7. De maneira análoga à otimização da etapa de amostragem, para o estudo e otimização da etapa de eluição, fixaram-se as outras etapas como descritas no item 3.6 e a etapa de amostragem foi fixada no ponto central (9 ciclos de 288 μL).

Tabela 7 - Condições experimentais para otimização da etapa de eluição.

Exp. nº	Volume		nº de ciclos	
	Valor real (μL)	Valor normalizado	Valor real	Valor normalizado
1	138	-1	4	-1
2	438	1	4	-1
3	138	-1	14	1
4	438	1	14	1
5	288	0	9	0
6	288	0	9	0
7	288	0	9	0
8	76	$-\sqrt{2}$	9	0
9	288	0	2	$-\sqrt{2}$
10	500	$\sqrt{2}$	9	0
11	288	0	16	$\sqrt{2}$

Fonte: autoria própria

Cada experimento realizado gerou um extrato diferente, esses extratos foram então analisados e as áreas cromatográficas obtidas para cada analito foram utilizadas para a construção de superfícies de resposta para cada analito individualmente e para a função desejabilidade. Além das superfícies de resposta, obtiveram-se os diagramas de Pareto para os experimentos realizados e avaliação das variáveis estudadas com utilização do software STATISTICA 10.

3.8 Hidrólise e preparo das amostras de urina

3.8.1 Hidrólise alcalina da urina

Para o preparo das amostras, primeiramente realizou-se a hidrólise alcalina da urina de modo a hidrolisar os conjugados glicurônicos formados pelo THC e THC-COOH^{43,67,68}, dessa maneira, seguiu-se o método proposto por Lendoiro et al. (2014)⁴³. Para o preparo das soluções de calibração para a validação do método, seguiu-se o mesmo procedimento, entretanto, utilizou-se urina branca, que não continha quaisquer quantidades dos analitos estudados.

Para a hidrólise alcalina, adicionaram-se 1250 µL de solução de hidróxido de potássio (12 mol L⁻¹) à 25 mL de urina branca, em tubo tipo falcon de 50 mL. A mistura foi mantida em banho termostático a 60 °C por 30 minutos para que a hidrólise acontecesse.

Após a hidrólise, a mistura foi neutralizada com 15,0 mL de solução de ácido clorídrico (1 mol L⁻¹) e centrifugada a 5000 RPM (4863 x g) durante 20 min. Após a centrifugação, coletou-se a fração sobrenadante da mistura. O sobrenadante coletado da urina branca foi utilizado para diluição da solução estoque e o preparo das soluções calibradoras utilizadas para avaliação dos parâmetros de validação do método analítico.

Para comparação, analisou-se uma amostra real de urina sem a realização da etapa de hidrólise. Entretanto, para que as amostras fossem submetidas aos mesmos processos, ao invés da adição de solução de hidróxido de potássio antes do aquecimento e ácido clorídrico antes da centrifugação, realizou-se a adição de volumes equivalentes de água ultrapura.

3.8.2 Fortificação das soluções calibradoras

Para o preparo das soluções de urina fortificadas, primeiramente enriqueceu-se 15 mL de urina branca (isenta de THC, THC-OH e THC-COOH) com os analitos, de modo a obter-se uma concentração de 500 ng mL⁻¹ de cada um deles. De maneira similar à descrita

anteriormente, a urina enriquecida com os analitos passou pelos mesmos processos de hidrólise básica, neutralização e centrifugação. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e esse constituiu a solução estoque de urina processada (500 ng mL^{-1}) para o preparo das demais soluções calibradoras de urina fortificada e processada.

Assim, com o auxílio (i) da urina branca processada; (ii) da solução estoque de urina fortificada e processada e (iii) de balões volumétricos de 5,0 mL; foram feitas as diluições de modo a obter-se diferentes soluções calibradoras de urina com concentrações de 5, 10, 25, 50, 80, 120, 170 e 250 ng mL^{-1} de cada um dos analitos mais o padrão interno (PI) THC-COOH-d3 na concentração de 60 ng mL^{-1} em cada uma das soluções. De maneira equivalente, as soluções de urina para o controle de qualidade nas concentrações de 20 ng mL^{-1} (nível baixo); 100 ng mL^{-1} (nível médio) e 150 ng mL^{-1} (nível alto) foram preparadas.

Após a realização da etapa otimizada de preparo de amostra por MEPS, todas essas soluções de urina processadas e fortificadas foram empregadas na validação do método analítico.

3.9 Parâmetros de validação – figuras de mérito

Devido à inexistência de guias específicos para análise de canabinoides em urina, optou-se por seguir algumas publicações⁶⁰⁻⁶² que dão apoio na escolha do protocolo utilizado. Os parâmetros avaliados foram: seletividade, linearidade, precisão (intra e inter-dias), exatidão, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e eficiência de extração.

3.9.1 Seletividade

Para avaliação da seletividade do método desenvolvido compararam-se os cromatogramas obtidos da extração de matriz isenta dos compostos de interesse (urina branca) com os cromatogramas obtidos da extração da mesma urina fortificada com os analitos de interesse.

O método é considerado seletivo se nenhum pico cromatográfico da análise de matriz isenta dos analitos eluir no mesmo tempo de retenção dos picos cromatográficos dos analitos de interesse. No caso de existirem picos de interferentes da matriz no mesmo tempo de retenção dos picos dos analitos de interesse, esses não podem apresentar respostas superiores a 20% da resposta para o analito no LQ do método^{60,61}.

Um estudo adicional de seletividade do sorvente MIP (item 3.9.6) complementou a avaliação da seletividade ora apresentada.

3.9.2 Linearidade, limite de detecção e limite de quantificação

A linearidade pode ser expressa pela curva de calibração do analito. A curva de calibração representa o modelo linear entre a resposta instrumental (y = área do pico cromatográfico ou área relativa ao padrão interno) com a concentração do analito (x), obtendo-se uma equação linear do tipo $y = a + bx$ que correlaciona a resposta obtida cromatograficamente com a concentração do analito.

As curvas de calibração foram construídas com no mínimo 6 pontos (em triplicata) de concentrações conhecidas do analito, fortificadas na mesma matriz para a qual o método foi desenvolvido.

Para a quantificação dos analitos e construção das curvas, utilizou-se o método de padronização interna. Assim, uma quantidade conhecida e constante de padrão interno (60 ng mL⁻¹) foi adicionada às amostras previamente à extração. A razão de áreas (área do analito/área do padrão interno) nos diferentes pontos de concentração conhecida foi utilizada para a construção das curvas de calibração.

Para avaliação do ajuste dos modelos lineares construídos, aplicou-se o teste F de significância para verificação da homocedasticidade dos dados analíticos. Assim, a partir dos modelos de regressão gerados, calculou-se o valor de F_{exp} (Equação 1)^{61,62} que foi comparado com o valor de F_{tab} teórico.

$$F_{exp} = \frac{s_2^2}{s_1^2} \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

s_1^2 = variância observada no primeiro nível da curva analítica

s_2^2 = variância observada no último nível da curva analítica

As curvas de calibração que apresentaram valores de $F_{exp} > F_{tab}$ representam dados heterocedásticos e para contornar esse problema, foram aplicados modelos ponderados de regressão que geraram novas curvas de calibração com melhor ajuste aos dados experimentais.

A escolha do melhor modelo de ponderação deu-se pela comparação da somatória dos valores absolutos dos resíduos relativos (%RE, Equação 2) para cada um dos modelos gerados (ponderados ou não), sendo que o modelo que apresentou o menor valor para a somatória dos resíduos por toda a faixa linear, foi o escolhido para a curva de calibração.

$$\%RE = \left(\frac{C_c - C_n}{C_n} \right) \times 100$$

Equação 2

Onde:

 C_c = Concentração calculada pelo modelo

gerado

 C_n = Concentração nominal da amostra

Já os valores dos limites de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) foram determinados instrumentalmente pelo método da relação sinal/ruído (S/N) para os picos dos analitos, sendo aceitos valores de S/N de no mínimo 3:1 para o LD e valores de S/N de no mínimo 10:1 para o LQ^{60,61} considerando-se esse critério para as duas transições (quantificação e confirmação) monitoradas de cada analito.

3.9.3 Precisão

A precisão é expressa como uma estimativa do desvio padrão relativo (DPR, Equação 3)^{60,61} de uma série de repetições da mesma solução calibradora em diferentes extrações.

$$DPR (\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

Equação 3

Onde:

s = desvio padrão entre as replicatas do mesmo controle de qualidade

$\bar{x}$ = média aritmética das replicatas do mesmo controle de qualidade

A precisão intra-dia levou em consideração as replicatas preparadas num mesmo dia e a precisão inter-dias levou em conta replicatas preparadas em pelo menos 2 dias diferentes.

Para os cálculos de precisão foram avaliados 3 níveis de concentração: baixo (20 ng mL⁻¹); médio (100 ng mL⁻¹) e alto (150 ng mL⁻¹), cada nível em triplicata na matriz para a qual o método foi desenvolvido. Para os métodos de análise de traços ou impurezas, são aceitos DPR de até 20% e esse foi o critério de aceitação para a precisão.

3.9.4 Exatidão

A exatidão (Equação 4)⁶¹ foi calculada com base nos valores de concentração calculados a partir das curvas analíticas para os diferentes compostos e os valores nominais das concentrações nas amostras.

$$Exatidão (\%) = \left(\frac{x_i - x}{x} \right) \times 100$$

Equação 4

Onde:

x_i = Concentração calculada pelas curvas
de calibração

x = Concentração nominal do controle de
qualidade

Para os cálculos da exatidão foram avaliados 3 níveis de concentração: baixo (20 ng mL⁻¹); médio (100 ng mL⁻¹) e alto (150 ng mL⁻¹), cada nível em triplicata na matriz para a qual o método foi desenvolvido. Foram considerados aceitos valores de até $\pm 20\%$ para a exatidão.

3.9.5 Recuperação e eficiência do processo

A recuperação e a eficiência do processo foi calculada comparando-se a resposta obtida para o analito na matriz e extraído com a resposta obtida para o analito em soluções preparadas em solvente e não-extraídas, que representam 100%⁶¹ da concentração nominal.

Para os cálculos de recuperação e eficiência do processo de extração utilizou-se uma curva de calibração construída após injeções diretas dos padrões analíticos, no mesmo solvente empregado como fase extratora utilizada no procedimento de extração⁶⁹ e injetado no sistema. Após construção dessa curva, determinou-se a concentração teórica (C_t , Equação 5), ou seja, a concentração esperada no extrato final para cada nível (baixo, médio e alto).

$$C_t = \frac{V_{am}}{V_{ext}} \times C_{nominal}$$

Equação 5

Onde:

V_{am} : volume da solução calibradora

V_{ext} : volume do extrato

$C_{nominal}$: concentração no nível baixo,
médio ou alto

Por meio da curva de calibração as respostas esperadas para as Ct (R_{Ct}) foram calculadas e compararam-se esses valores com as respostas obtidas após extrações das matrizes água ultrapura e urina (R_{ext}), fortificadas. Calcularam-se a recuperação e a eficiência do processo conforme a Equação 6. No caso das extrações realizadas em água ultrapura, denomina-se como recuperação já que não existe influência da matriz nas respostas obtidas, apenas a recuperação dos analitos observada para o método de extração. Para os extratos obtidos a partir de amostras de urina fortificada, denomina-se eficiência do processo, já que esse valor representa não só a recuperação do método de extração, mas também a influência dos componentes da matriz nas respostas obtidas para os analitos.

$$E(\%) = \left(\frac{R_{ext}}{R_{Ct}} \right) \times 100$$

Equação 6

Onde:

R_{ext} : resposta na matriz

R_{Ct} : resposta calculada em solvente

3.9.6 Especificidade da fase sorvente MIP

Para avaliação da especificidade da fase sorvente extratora, foram empacotados outros dois microdispositivos com diferentes fases, um com o NIP e outro com fase comercial C₁₈ (partículas com tamanho entre 35 a 75 µm, marca Alltech).

Assim, após a extração da matriz fortificada por meio das diferentes fases sorventes, avaliou-se a especificidade do MIP comparado com as outras 2 fases NIP e C₁₈, no nível baixo de concentração (20 ng mL⁻¹), na presença de interferentes.

Para isso, seguindo o mesmo procedimento descrito na parte experimental, foram preparadas soluções de urina com 7 substâncias interferentes conhecidas: paracetamol; carbamazepina; diclofenaco; hormônio etinilestradiol; naproxeno; metilparabeno e propilparabeno; cada um na concentração de 100 ng mL⁻¹.

Para avaliar a especificidade das fases sorventes e a presença dos interferentes nos diferentes extratos obtidos por MEPS, realizou-se uma análise espectrofotométrica UV-Vis em

fluxo. A detecção foi feita com um detector de arranjo de diodos (DAD 20A, Shimadzu), na faixa de 200 a 800 nm.

Outra maneira de avaliar a especificidade da fase sorvente foi a comparação dos cromatogramas obtidos pela espectrometria de massas, utilizando-se as diferentes fases sorventes, na presença dos interferentes. Para comparação, normalizou-se a intensidade do cromatograma pela intensidade do pico do analito. A avaliação se deu pela comparação da intensidade do ruído com a intensidade do pico do analito para cada uma das fases sorventes empregadas.

4 Resultados e discussões

4.1 Caracterização dos materiais

4.1.1 Espectroscopia vibracional no infravermelho (FT-IR)

A técnica de espectroscopia na região do infravermelho foi utilizada para confirmar a síntese dos polímeros por meio da identificação de grupos funcionais característicos.

Os espectros de infravermelho para o MIP e o NIP estão apresentados na Figura 10.

Figura 10 - Espectros de infravermelho para os MIPs e o NIP.

Fonte: Autoria própria.

Essencialmente, os 2 polímeros têm a mesma composição química, o que os difere é apenas o fato da presença da molécula molde no caso do MIP. O NIP trata-se do polímero equivalente sem impressão molecular e, portanto, não há adição de molécula molde durante sua síntese. Observa-se grande semelhança entre os 2 espectros.

Do espectro no infravermelho, pode-se destacar algumas bandas vibracionais⁷⁰⁻⁷²: banda larga e intensa na região de 3300-3600 cm^{-1} referente a grupos OH ligados, possivelmente por associação polimérica; estiramento da ligação C-H em 2989 sobreposta com a banda de estiramento O-H em 2957 cm^{-1} ; a banda em 1732 cm^{-1} indica a presença de grupamento C=O de ésteres, provavelmente da associação polimérica entre monômero e agente de ligação cruzada, assim como a banda em 1635 cm^{-1} que indica a presença de grupos vinílicos; a bandas

em 1261 cm^{-1} e 958 cm^{-1} se devem à grupamentos C-O-C; deformação angular no plano do C-O-H em 1456 cm^{-1} ; deformação da ligação O-H em 1383 cm^{-1} e estiramento da ligação C-O de ésteres em 1163 cm^{-1} .

4.1.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura foi empregada com o objetivo de analisar a morfologia, estimar o tamanho e a forma das partículas formadas. As imagens obtidas para os diferentes polímeros estão apresentadas nas Figuras 11 e 12.

Figura 11 - Imagens obtidas por MEV para os dois polímeros particulados sintetizados, em ampliação de 10000 x.

Fonte: Autoria própria.

Figura 12 - Imagens obtidas por MEV para os dois polímeros particulados sintetizados, em ampliação de 25000 x.

Fonte: Autoria própria.

As imagens obtidas por MEV mostram os macroporos formados pelos aglomerados de microesferas que formam uma partícula. Durante o processo de polimerização, formam-se núcleos (da dimensão de nanômetros) em contato com o iniciador e esses núcleos crescem e agregam-se, formando aglomerados maiores, em destaque na imagem, que compõe o corpo das partículas.³⁷

As microesferas observadas na microscopia do MIP aparentam ser ligeiramente menores que as observadas na microscopia do NIP, consequentemente os poros aparentam ser maiores na superfície do MIP. De modo geral, a porosidade observada nos MIPs resulta de diversos fatores superficiais e espaciais: os espaços irregulares entre um aglomerado de microesferas e outro, os espaços intersticiais dos aglomerados e a superfície e interior das próprias microesferas⁷³, além disso, Lv et al. (2013)⁷⁴ observaram que, em certa extensão, a própria molécula molde pode atuar como agente porogênico.

4.2 Desenvolvimento do método cromatográfico

O método cromatográfico desenvolvido tem seu gradiente exibido na Tabela 8. O tempo cromatográfico total é de 11,5 minutos; incluindo uma etapa final de 5,0 minutos para condicionamento da coluna analítica às condições cromatográficas iniciais.

Tabela 8 – Gradiente usado no método cromatográfico.

Tempo (min)	Fluxo (mL min⁻¹)	Fase móvel A (%)	Fase móvel B (%)
0,0	0,2	30	70
2,0	0,2	30	70
2,5	0,2	10	90
5,5	0,2	10	90
6,5	0,2	30	70
11,5	0,2	30	70

Fonte: Autoria própria.

Embora alguns métodos apresentem um tempo cromatográfico menor (entre 9 e 11 minutos), eles utilizam-se de vazões maiores.^{25,44,75} Dessa maneira, o método aqui desenvolvido representa maior economia em termos de consumo de fase móvel. Além disso, como o método foi desenvolvido em HPLC, não é necessária uma etapa de derivatização dos analitos, diferentemente de métodos desenvolvidos para a cromatografia gasosa,^{56,76} o que significa uma etapa a menos no preparo da amostra e economia de tempo e reagentes químicos.

Como descrito na parte experimental, avaliou-se o efeito da adição de 0,1% de ácido fórmico aos solventes A e B (água Mill-Q e acetonitrila, respectivamente) da fase móvel. Para isso, foram realizadas injeções dos padrões analíticos em água ultrapura, na concentração de 100 ng mL⁻¹ de cada.

A partir dos cromatogramas obtidos e as áreas integradas para cada um dos analitos, pode-se avaliar a influência da acidificação das fases móveis nas áreas dos picos cromatográficos. A Figura 13 ilustra a influência da adição de ácido fórmico à fase móvel.

Figura 13 - Influência da acidificação das fases móveis (n = 5) nas áreas dos picos cromatográficos.

Fonte: Autoria própria.

Como pode-se observar na Figura 13, quando se utilizou os solventes A e B não acidificados, o composto THC não foi identificado. Utilizando-se apenas a fase móvel A acidificada, os 3 analitos foram identificados e observa-se um pequeno aumento da resposta para todos. Entretanto, observou-se que utilizando os dois solventes (A e B) acidificados, as respostas obtidas para o THC e o THC-COOH aumentavam razoavelmente. Embora a resposta para o analito THC-OH não aumentasse da mesma maneira, optou-se por utilizar essa combinação de fases móveis pois a resposta era melhor para 2 dos 3 analitos estudados.

O resultado acima está de acordo com o observado por Maralikova & Weinmann (2004)⁷⁵ que desenvolveram um método para análise de drogas de abuso, dentre eles o THC e seus 2 metabólitos, em urina e plasma. Os autores observaram que embora o pH das fases móveis não influencie tanto na ionização do THC-OH, as ionizações observadas para o THC-COOH e especialmente para o THC são significativamente influenciadas pelo pH da fase móvel.

Definida a melhor combinação de solventes, realizaram-se alguns testes variando-se um dos parâmetros instrumentais do método de espectrometria de massas, o *dwell time*. Para isso, foram testados 3 diferentes tempos: 150; 200 e 250 ms e avaliou-se o desvio padrão relativo para cada um dos analitos nessas condições. A Figura 14 a seguir ilustra os DPR observados para cada um dos valores de *dwell time* utilizados.

Figura 14 - Diferentes *dwell times* testados para a aquisição dos dados.

Fonte: Autoria própria.

Como pode ser visto na Figura 14, há uma variação nos valores de DPR em função do *dwell time* utilizado para a aquisição dos dados. Observa-se que para os *dwell times* de 200 (obtem-se 11 pontos por pico para o THC e 19 pontos por pico para ambos THC-OH e THC-COOH) e 250 ms (obtem-se 9 pontos por pico para o THC e 15 pontos por pico para ambos THC-OH e THC-COOH), o DPR calculado para as respostas do THC atingiu valores maiores do que 20%. Como definiu-se o valor de até 20% para o DPR (precisão), optou-se por utilizar o *dwell time* de 150 ms (obtem-se 15 pontos por pico para o THC e 25 pontos por pico para ambos THC-OH e THC-COOH). Embora utilizando-se 150 ms para o *dwell time* não se obtenha os menores valores de DPR, essa é a única condição em que o DPR está abaixo de 20% para todos os analitos, assim, foi a condição escolhida.

A Figura 15 a seguir ilustra as transições monitoradas para o íon de quantificação de cada analito. O cromatograma foi obtido a partir da injeção dos padrões analíticos em água com as condições cromatográficas escolhidas anteriormente: solventes A e B acidificados com 0,1 % de ácido fórmico e *dwell time* de 150 ms.

Figura 15 - Padrões analíticos em água ultrapura na concentração de de $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ cada.

Fonte: Autoria própria.

No artigo publicado por Maralikova & Weinmann (2004)²², os autores utilizam algumas transições para os íons de quantificação e de confirmação iguais às utilizadas nesse estudo. A Figura 16 a seguir ilustra o padrão de fragmentação encontrado pelos autores para os canabinóides estudados, detectados em um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo, operando no modo ESI positivo, em uma corrida cromatográfica em condições acídicas (pH 6,5).²²

Figura 16 - Padrão de fragmentação MS para os analitos estudados.

Fonte: Adaptado de Maralikova & Weinmann (2004).²²

4.3 Otimização do preparo de amostra por microextração por sorvente empacotado

A partir dos resultados obtidos nos estudos da otimização da etapa de amostragem, onde se empregou um planejamento experimental do tipo composto central (Tabela 6) foram construídos os diagramas de Pareto para cada um dos analitos, que estão representados na Figura 17.

Figura 17 - Diagramas de Pareto e superfície de resposta global do planejamento com composto central, onde se avaliaram o volume de amostra aspirado e número de ciclos de aspirar/dispensar para a etapa da amostragem.

Fonte: Autoria própria.

Observa-se na Figura 17 que as duas variáveis volume e número de ciclos não são significativas para nenhum dos analitos já que todos os efeitos observados não foram significativos com um limite de confiança de 95%. Observa-se também um máximo na superfície de resposta global, em valores um pouco acima do ponto central (288 μ L e 9 ciclos) indicando que trabalhando em condições perto desses valores espera-se obter o máximo de resposta dos analitos, embora sem diferença significativa dos valores menores ao redor desse ponto.

Dessa maneira, não se prosseguiu com estudos mais detalhados para o planejamento experimental da etapa de amostragem e escolheram-se como valores otimizados o volume de amostragem de 300 μL e o número de ciclos aspirar/dispensar de 10 vezes.

A partir dos resultados obtidos nos estudos da otimização para a etapa de eluição, onde novamente se empregou um planejamento experimental com composto central (Tabela 7) e foram construídos os diagramas de Pareto para cada um dos analitos, que são apresentados na Figura 18.

Figura 18 - Diagramas de Pareto e superfície de resposta global do planejamento com composto central, onde se avaliaram o volume de solvente aspirado e número de ciclos de aspirar/dispensar para a etapa da eluição.

Fonte: Autoria própria.

Analisando os diagramas de Pareto, observa-se na Figura 18 que as duas variáveis volume e número de ciclos novamente não foram significativas para quaisquer dos analitos pois todos

os efeitos observados não foram significativos com um limite de confiança de 95%. Entretanto, na superfície de resposta global, observam-se valores mais altos nas regiões de alto volume de solvente, independentemente do número de ciclos e na região de baixo volume de solvente e baixo número de ciclos.

Assim, não se prosseguiu com um estudo mais detalhado para a otimização da etapa de eluição dos analitos, porém, visando alcançar maiores fatores de concentração dos analitos durante o preparo de amostra via MEPS, optou-se por utilizar um baixo volume de solvente para a eluição dos analitos, dessa forma, escolheram-se os valores otimizados de 100 μL de solvente e 4 ciclos aspirar/dispensar para realizar a eluição dos compostos.

Após o estudo para otimização, o procedimento final desenvolvido para o preparo de amostra via MEPS, partindo-se de 700 μL de amostra, foi definido como:

- Condicionamento 1: 90% ACN, 250 μL x 3 ciclos
- Condicionamento 2: água, 250 μL x 3 ciclos
- Amostragem: 300 μL x 10 ciclos
- Lavagem: água, 250 μL x 3 ciclos
- Secagem: ar, 250 μL x 3 ciclos
- Eluição: 90% ACN, 100 μL x 4 ciclos
- Lavagem da fase extratora: 90% ACN, 500 μL x 10 ciclos

A Figura 19 mostra um cromatograma obtido da extração dos padrões analíticos em urina fortificada na concentração de 80 ng mL^{-1} nas condições anteriormente definidas como otimizadas. Observa-se na figura as transições utilizadas para a quantificação dos 3 analitos.

Figura 19 - Cromatograma obtido para urina fortificada com os analitos na concentração de 80 ng mL⁻¹ e preparada de acordo com o método MEPS proposto.

Fonte: Autoria própria.

4.4 Parâmetros de validação - figuras de mérito

4.4.1 Seletividade

Os cromatogramas na Figura 20 mostram as transições de quantificação monitoradas para cada um dos analitos. Os cromatogramas à esquerda são resultados da análise de solução de urina branca preparada e extraída pelo método MEPS otimizado. Já os cromatogramas à direita são resultados obtidos da análise de urina fortificada com os analitos na concentração de 20 ng mL⁻¹, extraídos pelo método MEPS otimizado. Observa-se que todos os cromatogramas estão com a sua amplitude de sinal normalizadas para o sinal mais alto de cada cromatograma.

Figura 20 - Cromatogramas dos extratos obtidos de urina branca (à esquerda) e de urina fortificada com os analitos de interesse (à direita).

Fonte: Autoria própria.

Comparando os cromatogramas obtidos para a solução de urina branca com os cromatogramas obtidos para a solução de urina fortificada com os analitos na concentração de 20 ng mL^{-1} , não se observam quaisquer picos de interferentes da matriz que tenham o mesmo tempo de retenção dos analitos em suas respectivas transições. Dessa forma, o método desenvolvido foi considerado seletivo para a análise de THC e seus dois metabólitos THC-OH e THC-COOH em urina.

4.4.2 Linearidade, limites de detecção e limites de quantificação

A Tabela 9 apresenta os valores obtidos para o teste F de significância para avaliação da homocedasticidade e linearidade dos dados experimentais obtidos para construção das curvas de calibração dos 3 analitos. Para os 3 compostos, observaram-se valores calculados de F_{exp} maiores do que os valores de F_{tab} com intervalo de confiança de 95% ($F_{(95\%; 2; 2)} = 19$), evidenciando a heterocedasticidade dos dados experimentais.

Tabela 9 - Valores do teste F de significância e parâmetros dos dados experimentais.

Analito	F_{exp}	$F_{\text{exp}}/F_{\text{tab}}$	$\sum \%RE$	Faixa de concentração (ng mL⁻¹)
THC	105,9	5,6	377,6	10 - 250
THC-OH	540,1	28,4	380,3	10 - 250
THC-COOH	235,0	12,3	798,2	5 - 250

Fonte: Autoria própria.

O comportamento heterocedástico dos dados experimentais indica que a variância observada para os conjuntos de dados não é aleatoriamente distribuída no eixo da concentração. Dessa forma, optou-se pela diminuição das faixas de concentrações das curvas de calibração para os analitos e aplicação de modelos ponderados para contornar a heterocedasticidade observada e geração de novos modelos para os dados experimentais^{61,62,77} e construção de novas curvas de calibração com melhor ajuste aos dados experimentais.

Testaram-se diferentes fatores de ponderação (w_i) e com a geração dos modelos ponderados avaliou-se qual deles resultava numa menor somatória para os resíduos relativos observados. O modelo 1 onde $w_i = 1$ é igual à regressão linear não ponderada dos dados.

A Tabela 10 a seguir mostra os coeficientes obtidos para os diferentes modelos gerados para a curva de calibração do THC.

Tabela 10 - Modelos ponderados para o THC

Modelo	w_i	b	a	r	$\sum \%RE$
1	1	437,74	1829,00	0,9618	333,9
2	$1/y^{1/2}$	449,86	-449,73	0,9705	269,4

3	1/y	457,50	-1769,5	0,9747	233,4
4	1/y ²	465,42	-2973,20	0,9720	267,6
5	1/x ^{1/2}	454,44	-311,95	0,9702	273,4
6	1/x	467,56	-1624,9	0,9751	248,3
7	1/x ²	486,42	-2872,8	0,9775	216,5

Fonte: Autoria própria.

Observa-se que o modelo 7 apresentou os menores valores para a somatória dos resíduos relativos, com fator de ponderação $1/x^2$. Assim definiu-se a nova faixa linear (25 – 250 ng mL⁻¹) e a equação para a curva de calibração do THC (Figura 21) e avaliação das demais figuras de mérito para o analito.

Figura 21 - Curva de calibração para o THC.

Fonte: Autoria própria.

A Figura 22 a seguir apresenta o gráfico de resíduos relativos observados para o THC com a nova curva de calibração definida. Vale ressaltar que para a maioria dos pontos (níveis de 1 a 6) da curva de calibração foram observados valores de resíduos relativos abaixo de 20% (valor máximo de 25,2%) que indicam um ajuste razoável dos dados experimentais à curva.

Figura 22 - Gráfico de resíduos relativos da reta ponderada para o THC.

Fonte: Autoria própria.

A Tabela 11 a seguir mostra os coeficientes obtidos para os diferentes modelos gerados para a curva de calibração do THC-OH.

Tabela 11 - Modelos ponderados para o THC-OH.

Modelo	w_i	b	a	r	$\sum \%RE$
1	1	0,0054	0,0753	0,9946	139,56
2	$1/y^{1/2}$	0,0055	0,0641	0,9946	127,15
3	$1/y$	0,0055	0,0568	0,9941	127,94
4	$1/y^2$	0,0056	0,0505	0,9904	130,22
5	$1/x^{1/2}$	0,0055	0,0649	0,9944	127,96
6	$1/x$	0,0056	0,0589	0,9936	127,48
7	$1/x^2$	0,0056	0,056	0,9883	128,79

Fonte: Autoria própria.

Observa-se que o modelo 2 apresentou os menores valores para a somatória dos resíduos relativos, com fator de ponderação $1/y^{1/2}$. Assim definiu-se a nova faixa linear (25 – 250 ng mL⁻¹) e a equação para a curva de calibração do THC-OH (Figura 23) e avaliação das demais figuras de mérito para o analito.

Figura 23 - Curva de calibração para o THC-OH.

Fonte: Autoria própria.

A Figura 24 a seguir apresenta o gráfico de resíduos relativos observados para o THC-OH com a nova curva de calibração definida. Vale ressaltar que para a maioria dos pontos (níveis de 1 a 6) da curva de calibração foram observados valores de resíduos muito próximos de 20% (valor máximo de 21,2%) que indicam o ajuste razoável dos dados experimentais à curva.

Figura 24 - Gráfico de resíduos relativos da reta ponderada para o THC-OH.

Fonte: Autoria própria

A Tabela 12 a seguir mostra os coeficientes obtidos para os diferentes modelos gerados para a curva de calibração do THC-COOH.

Tabela 12 - Modelos ponderados para o THC-COOH.

Modelo	w_i	b	a	r	$\sum \%RE$
1	1	0,0112	0,0505	0,9932	402,9
2	$1/y^{1/2}$	0,0115	0,0254	0,9951	229,5
3	$1/y$	0,0117	0,0126	0,9958	170,6
4	$1/y^2$	0,0122	0,0020	0,9945	148,0
5	$1/x^{1/2}$	0,0115	0,0250	0,9951	225,6
6	$1/x$	0,0118	0,0126	0,9958	164,9
7	$1/x^2$	0,0123	0,0028	0,9946	143,4

Fonte: Autoria própria.

Observa-se que o modelo 7 apresentou os menores valores para a somatória dos resíduos relativos, com fator de ponderação $1/x^2$. Assim definiu-se a nova faixa linear (5 – 170 ng mL⁻¹) e a equação para a curva de calibração do THC-COOH (Figura 25) e avaliação das demais figuras de mérito para o analito.

Figura 25 - Curva de calibração para o THC-COOH.

Fonte: Autoria própria.

A Figura 26 a seguir apresenta o gráfico de resíduos relativos observados para o THC-COOH com a nova curva de calibração definida. Vale ressaltar que para todos os pontos (níveis de 1 a 7) da curva de calibração foram observados valores de resíduos inferiores de 20% que indicam o bom ajuste dos dados experimentais à curva. Como para a construção das curvas de calibração utilizou-se somente como padrão interno o composto THC-COOH-d3, com estrutura mais semelhante ao do composto THC-COOH do que dos outros dois analitos THC e THC-OH, dentre as curvas de calibração obtidas a que mais se ajustou aos dados experimentais foi a do THC-COOH.

Figura 26 - Gráfico de resíduos relativos da reta ponderada para o THC-COOH.

Fonte: Autoria própria.

A Tabela 13 apresenta os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) estabelecidos para os 3 analitos no método desenvolvido.

Tabela 13 - Limites de detecção e de quantificação dos analitos no método desenvolvido.

Analito	LD (ng mL ⁻¹)	LQ (ng mL ⁻¹)
THC	5,0	20,0
THC-OH	5,0	20,0
THC-COOH	1,0	5,0

Fonte: Autoria própria.

As Figuras 27 a 32 a seguir mostram os cromatogramas obtidos para as transições de quantificação e confirmação dos 3 analitos nos seus respectivos limites de detecção e de quantificação. Nas Figuras são exibidos também os valores da relação sinal/ruído para os picos referentes aos analitos.

Figura 27 - Cromatograma obtido no limite de detecção para as duas transições monitoradas para o THC.

Fonte: Autoria própria.

Figura 28 - Cromatograma obtido no limite de quantificação para as duas transições monitoradas para o THC.

Fonte: Autoria própria.

Figura 29 - Cromatograma obtido no limite de detecção para as duas transições monitoradas para o THC-OH.

Fonte: Autoria própria.

Figura 30 - Cromatograma obtido no limite de quantificação para as duas transições monitoradas para o THC-OH.

Fonte: Autoria própria.

Figura 31 - Cromatograma obtido no limite de detecção para as duas transições monitoradas para o THC-COOH.

Fonte: Autoria própria.

Figura 32 - Cromatograma obtido no limite de quantificação para as duas transições monitoradas para o THC-COOH.

Fonte: Autoria própria.

4.4.3 Precisão

A Tabela 14 apresenta as precisões (intra-dia e inter-dias) calculadas nos níveis baixo, médio e alto de controle de qualidade para os 3 analitos.

Tabela 14 - Valores de precisão calculados nos níveis de controle de qualidade.

Analito	Precisão intra-dia (% DPR) (n = 6)			Precisão inter-dias (% DPR) (n = 9)		
	Baixo	Médio	Alto	Baixo	Médio	Alto
THC	18,0	9,7	25,1	23,0	13,8	21,8
THC-OH	6,8	7,3	7,7	11,8	5,9	10,1
THC-COOH	6,4	3,2	6,8	8,9	3,4	5,6

Fonte: Autoria própria.

Observa-se que apenas o THC apresentou valores de DPR maiores do que 20% que se definiu como o critério de aceitação para este parâmetro. Embora ultrapassem os 20%, esses valores ainda estão próximos do nível aceitável. Possivelmente esse resultado não se deve à incapacidade do método de preparo de amostras, sendo esperados melhores resultados se fosse feita uma correção com o padrão interno isotópico específico de cada analito.

Para os outros dois analitos, os valores de DPR estão abaixo dos 20% o que demonstra a precisão adequada do método para a análise desses compostos.

4.4.4 Exatidão

A Tabela 15 apresenta a exatidão calculada nos 3 níveis de controle de qualidade para cada um dos analitos.

Tabela 15 - Exatidão calculada para os analitos nos diferentes níveis.

Analito	Exatidão
	(%)
	(n = 6)

	Baixo	Médio	Alto
THC	17,4	- 6,11	- 18,4
THC-OH	- 15,2	- 16,9	- 17,5
THC-COOH	0,1	- 14,0	- 17,0

Fonte: Autoria própria.

No estudo da exatidão do método desenvolvido todos os analitos apresentaram valores de exatidão entre $\pm 20\%$ nos 3 níveis de controle de qualidade, dessa maneira fica demonstrada a exatidão adequada do método para a análise e quantificação dos 3 analitos estudados, dentro do intervalo de concentração definido no método.

4.4.5 Recuperação e eficiência do processo

A Tabela 16 apresenta os valores calculados para a recuperação em água no nível baixo e a eficiência total do processo em urina nos 3 níveis de controle de qualidade. Adicionalmente, estão apresentados os desvios padrões observados para cada série de medidas utilizadas nos cálculos.

Tabela 16 - Recuperação em água e eficiência do processo calculadas nos níveis de controle de qualidade.

Analito	Recuperação em água (%) $\pm$ DP (n = 3)	Eficiência do processo em urina (%) $\pm$ DP (n = 6)		
		Baixo	Médio	Alto
THC	65,3 $\pm$ 10,8	1,4 $\pm$ 0,1	1,5 $\pm$ 0,2	1,2 $\pm$ 0,2
THC-OH	20,0 $\pm$ 2,8	10,3 $\pm$ 0,9	11,4 $\pm$ 1,8	10,9 $\pm$ 1,6
THC-COOH	73,7 $\pm$ 5,8	15,1 $\pm$ 2,0	16,8 $\pm$ 1,6	16,5 $\pm$ 1,2

DP: desvio padrão

Fonte: Autoria própria.

Observa-se que os valores de recuperação em água são superiores aos valores da eficiência do processo em urina, isso se deve ao fato de a recuperação ter sido calculada com

base nas respostas obtidas dos analitos extraídos em água ultrapura, ou seja, que não apresenta interferentes provenientes da matriz.

Já a eficiência do processo apresentou valores mais baixos devido ao fato de os componentes da matriz atuarem suprimindo a extração dos analitos durante o preparo da amostra e possivelmente durante a ionização dos analitos na detecção pela espectrometria de massas. Observa-se também que a eficiência de extração em urina aumenta do analito mais apolar (THC) para o analito menos apolar (THC-COOH).

Embora os valores calculados de recuperação e eficiência do processo não sejam altos, observa-se pelos valores do desvio padrão que o DPR de cada série de medidas não ultrapassa os 20%, evidenciando a consistência, precisão e reprodutibilidade dos valores calculados.

Uma vez que valores adequados de detectabilidade são atingidos por essa microtécnica e com o consumo de quantidade relativamente pequena de amostra, esses baixos valores não se mostram como um problema que inviabilize a aplicabilidade do método.

4.4.6 Especificidade da fase sorvente MIP

A Figura 33 mostra a aparência da solução dos extratos finais obtidos da extração de urina fortificada com 20 ng mL⁻¹ de cada um dos analitos e outras 7 substâncias interferentes na concentração de 100 ng mL⁻¹ cada com as 3 fases sorventes avaliadas para o preparo da amostra.

Figura 33 – Aparência das soluções dos extratos obtidos com o uso de diferentes fases sorventes no preparo de amostra via MEPS: NIP (à esquerda); MIP (no centro) e C₁₈ (à direita).

Fonte: Autoria própria.

Observa-se no extrato obtido com uso da fase sorvente C₁₈ uma coloração amarelada, bastante semelhante com a coloração da amostra de urina antes da etapa de preparo de amostra, isso ilustra a baixa especificidade dessa fase sorvente para a extração de substâncias mais apolares presentes na amostra de urina e indica por si só uma maior extração de interferentes da matriz.

O extrato obtido com o uso da fase sorvente NIP também aparentava uma coloração um pouco mais intensa do que aquela do extrato obtido com a fase sorvente MIP. Assim, para confirmação desse possível efeito, realizou-se (em duplicata) a varredura espectrométrica dos 3 extratos, empregando a injeção em fluxo em um detector de arranjo de diodos, na faixa de 200 a 800 nm, que é apresentado na Figura 34.

Vale ressaltar que as 7 substâncias interferentes adicionadas à amostra na concentração de 100 ng mL^{-1} cada, absorvem na faixa do ultravioleta compreendida entre 210 e 280 nm,⁷⁸⁻⁸⁵ assim uma maior absorbância nessa faixa espectral pode indicar uma maior presença dessas substâncias interferentes.

Figura 34 - Varredura espectrofotométrica na faixa de 200 a 800 nm para as soluções dos 3 extratos obtidos com diferentes fases sorventes no procedimento de MEPS.

Fonte: Autoria própria.

Além da varredura espectral, avaliou-se a especificidade das fases sorventes observando os cromatogramas obtidos para as transições de quantificação dos analitos na espectrometria de massas, os cromatogramas foram normalizados pela intensidade do pico do analito em 100%.

A Figura 35 a seguir mostra a transição de quantificação monitorada para o THC nos extratos obtidos com as diferentes fases sorventes.

Figura 35 – Cromatograma do íon de quantificação para o THC nos extratos obtidos com uso das diferentes fases sorventes empregadas no procedimento de MEPS.

Fonte: Autoria própria.

Para o caso do THC, observa-se bastante similaridade nos extratos obtidos, entretanto, os extratos obtidos com as fases sorventes MIP e C₁₈ apresentam picos interferentes mais intensos na região até os 4 minutos do tempo de retenção se comparados com o extrato obtido com a fase NIP.

A Figura 36 a seguir mostra a transição de quantificação monitorada para o THC-OH nos extratos obtidos com as diferentes fases sorventes.

Figura 36 – Cromatograma do íon de quantificação para o THC-OH nos extratos obtidos com uso das diferentes fases sorventes empregadas no procedimento de MEPS.

Fonte: Autoria própria.

Para as transições monitoradas para o THC-OH, a fase C₁₈ apresentou picos interferentes mais intensos na região entre 1 e 3 minutos do tempo de retenção, enquanto as fases MIP e NIP apresentaram picos de intensidade bastante similar. O extrato obtido com a fase NIP, entretanto, revela uma intensidade maior para os picos interferentes na região entre os 4 e 8 minutos do tempo de retenção se comparado com os extratos obtidos com a fase sorvente MIP e C₁₈.

A Figura 37 a seguir mostra a transição de quantificação monitorada para o THC-COOH nos extratos obtidos com as diferentes fases sorventes.

Figura 37 – Cromatograma do íon de quantificação para o THC-COOH nos extratos obtidos com uso das diferentes fases sorventes empregadas no procedimento de MEPS.

Fonte: Autoria própria.

Analisando as transições monitoradas para o THC-COOH, pode-se observar que o extrato obtido com a fase sorvente C₁₈ apresenta picos interferentes mais intensos na região até os 2 minutos do tempo de retenção, embora os extratos obtidos com o MIP e o NIP tenham picos de intensidade bastante parecidas nessa mesma região, para o MIP esses picos são um pouco mais intensos. Na região acima dos 4 minutos do tempo de retenção, os extratos obtidos com as 3 fases sorventes apresentam picos de intensidade muito semelhantes.

4.5 Amostras reais

4.5.1 Aplicação do método a amostras reais

O método de preparo de amostra e análise cromatográfica aqui desenvolvido e validado foi aplicado na análise de 2 amostras reais de urina. Uma das amostras (amostra 1) estava armazenada em congelador (-4 °C) e foi fornecida pelo LTA-CIATox – Campinas da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp e já havia sido testada positiva para a presença de canabinoides. A outra amostra (amostra 2) fora coletada recentemente e armazenada em geladeira por um dia antes de ser analisada.

As amostras foram então preparadas conforme procedimento de hidrólise alcalina, neutralização com ácido, centrifugação e fortificação com padrão interno, conforme descrito na seção 3.8. As amostras foram analisadas em triplicata e nas duas amostras analisadas, apenas o composto THC-COOH foi detectado, entretanto, a amostra 2 apresentou concentrações do analito acima da faixa linear da curva de calibração, dessa maneira, a amostra 2 foi diluída 10 vezes com urina branca e reanalisada. A Tabela 17 apresenta os valores encontrados para os analitos de estudo nas duas amostras analisadas.

Tabela 17 - Resultados obtidos das análises das amostras reais.

Analito	Amostra 1 (ng mL⁻¹)	Amostra 2 (ng mL⁻¹)	Amostra 2 diluída ± DP (ng mL⁻¹)
THC	n.d.	n.d.	n.d.
THC-OH	n.d.	n.d.	n.d.
THC-COOH	abaixo do LQ	acima da faixa linear	102,0 ± 5,6*

n.d. = não detectado

* = concentração estimada após diluição

Fonte: Autoria própria.

A amostra 1 foi mantida em recipiente plástico no congelador durante um período superior a 12 meses. Estudos relatam que o THC-COOH pode aderir às paredes do recipiente que contém a amostra de urina (ou outro fluido biológico), por meio de adsorção e absorção, além desse composto ser alterado por ação microbiana.⁸⁶ A combinação desses fatores pode ter contribuído para que a concentração de THC-COOH encontrada na amostra 1 de urina ficasse abaixo do LQ, embora o composto tenha sido detectado.

Embora a amostra 2 diluída dez vezes com urina branca tenha apresentado uma concentração para o THC-COOH dentro da faixa linear da curva de calibração do analito e embora o resultado apresente baixo desvio padrão, não se pode garantir a precisão ou exatidão desse valor já que o método não foi validado quanto ao parâmetro de integridade de diluição.

4.5.2 Teste da hidrólise alcalina

Para avaliação da eficiência da hidrólise alcalina realizada antes do preparo da amostra de urina por MEPS comparou-se a área obtida para o íon de quantificação do analito THC-COOH

na amostra 2 diluída com e sem a realização da etapa de hidrólise alcalina. A Figura 38 a seguir mostra os cromatogramas obtidos com e sem a realização da etapa de hidrólise.

Figura 38 - Cromatogramas obtidos da análise de amostras submetidas ou não ao processo de hidrólise alcalina.

Fonte: Autoria própria.

A Figura 38 mostra que quando a amostra não é submetida ao processo de hidrólise alcalina para a quebra dos conjugados glicurônicos, a área observada para o pico do composto THC-COOH é cerca de 19 vezes menor do que o resultado para a mesma amostra submetida ao processo de hidrólise alcalina. Isso evidencia a necessidade e eficiência da etapa de hidrólise para a correta quantificação do metabólito THC-COOH.

Observa-se ainda para a amostra que não foi hidrolisada o aparecimento de um pico com tempo de retenção de 1,9 minutos na mesma transição de quantificação do THC-COOH.

Embora não houvesse padrão analítico para confirmação, esse pico pode ser atribuído ao conjugado glicurônico do THC-COOH pois o mesmo apresenta-se somente na amostra de urina não hidrolisada. Além disso, o conjugado glicurônico do THC-COOH apresenta essa transição na espectrometria de massas e tempo de retenção menor do que o THC-COOH em fase móvel majoritariamente orgânica.⁶⁸

5 Conclusão

A caracterização do material serviu como suporte para evidenciar o sucesso da síntese dos polímeros. Na análise por espectroscopia vibracional no infravermelho foram identificadas bandas características dos grupos funcionais esperados nos polímeros além de bandas que indicam associação polimérica entre os reagentes utilizados na síntese. Já a análise por microscopia eletrônica de varredura foi importante para avaliar a morfologia dos aglomerados poliméricos que compõe as fases sorventes avaliadas durante o desenvolvimento do projeto.

Neste trabalho foi desenvolvido um método cromatográfico para identificação e quantificação de THC e seus dois metabólitos THC-OH e THC-COOH em urina, o qual foi precedido pelo método para preparo de amostras de urina para a extração dos canabinoides utilizando MEPS. A aplicação do polímero molecularmente impresso com a molécula molde catequina mostrou-se eficiente como fase sorvente extratora para o preparo das amostras de urina e análise por HPLC-MS/MS.

Com o emprego do planejamento experimental pôde-se avaliar a influência dos fatores volume e número de ciclos para as etapas de amostragem e eluição do método de preparo de amostra. Com um número reduzido de experimentos construiu-se diagramas de Pareto e superfícies de resposta para auxiliar na determinação das condições ótimas para essas duas etapas no preparo da amostra.

Durante a avaliação das figuras de mérito para o método desenvolvido, observou-se que o método desenvolvido é seletivo para a análise dos canabinoides em urina. Além disso, com exceção do THC (valor máximo 25,1%); os outros dois analitos apresentaram valores de desvio padrão relativo (precisão) na faixa aceitável de até 20%. Com relação à exatidão, o método se mostrou exato para os 3 analitos pois não foram observados valores fora da faixa aceitável de $\pm 20\%$. Com relação à recuperação dos analitos e eficiência do processo em urina, os valores calculados não são altos, entretanto, apresentam-se consistentes com desvio padrão relativo menor do que 20%. A comparação da fase extratora MIP com a fase NIP e a fase C₁₈ mostrou a maior especificidade da fase extratora MIP, fato evidenciado pela varredura espectrométrica na faixa de 200 a 800 nm para os extratos obtidos com as 3 fases extradoras, sendo que o extrato obtido com a fase extratora MIP apresenta a menor absorção nesse intervalo de comprimento de ondas, além de picos interferentes pouco intensos nas transições monitoradas para a quantificação e confirmação dos analitos por LC-MS/MS.

O método MEPS-HPLC-MS/MS desenvolvido foi ainda aplicado a duas amostras reais, onde foi identificado apenas o composto THC-COOH. Uma das amostras foi analisada sem ser

submetida ao processo de hidrólise alcalina, sendo então observado um pico referente ao conjugado glicurônico formado pelo THC-COOH e áreas cerca de 19 vezes menores para esse analito quando comparado à mesma amostra hidrolisada. Esse fato evidencia a importância da etapa de hidrólise alcalina para a correta quantificação do THC-COOH na urina, pois a maior parte desse composto está presente na amostra na sua forma de conjugado glicurônico.

6 Perspectivas futuras

- Determinação simultânea de THC-COOH e THC-COOH-glu e estudo para eliminação das etapas de hidrólise básica e neutralização da urina.
- Inclusão de novas figuras de mérito como efeito de matriz, recuperação em matriz de urina e estabilidade.
- Desenvolvimento de novos métodos miniaturizados de preparo de amostra e para análises cromatográficas em escala capilar.
- Incluir outros canabinoides (canabidiol, canabinol, dentre outros) e demais compostos de interesse como terpenos nos próximos métodos analíticos a serem desenvolvidos.
- Ampliação do escopo de análise e busca de novas matrizes para determinação de canabinoides, visando aplicações no campo medicinal.
- Aplicação do MIP desenvolvido em outras técnicas de preparo de amostra on-line como column switching.

Referência bibliográficas

1. Borille, B. T. *et al.* Near infrared spectroscopy combined with chemometrics for growth stage classification of cannabis cultivated in a greenhouse from seized seeds. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **173**, 318–323 (2017).
2. Jain, R. & Singh, R. Trends in Analytical Chemistry Microextraction techniques for analysis of cannabinoids. *Trends Anal. Chem.* **80**, 156–166 (2016).
3. United Nations Office On Drugs And Crime. *World Drug Report 2015*. (2015).
4. UNODC. *World drug report. United Nations publication* (2016). doi:10.1007/s13398-014-0173-7.2
5. Dinis-Oliveira, R. J. Metabolomics of delta-9-tetrahydrocannabinol: implications in toxicity. *Toxicol. Mech. Methods* **48**, 80–87 (2015).
6. Mohamed M. Radwan, Mahmoud A. ElSohly, Abir T. El-Alfy, Safwat A. Ahmed, Desmond Slade, Afeef S. Husni, Susan P. Manly, Lisa Wilson, Suzanne Seale, Stephen J. Cutler, S. A. R. Isolation and Pharmacological Evaluation of Minor Cannabinoids from High-Potency Cannabis sativa. *J Nat Prod* **78**, 1271–1276 (2015).
7. Crippa, J. A. S., Crippa, A. C. S., Hallak, J. E. C., Martín-Santos, R. & Zuardi, A. W. Δ 9-THC intoxication by cannabidiol-enriched cannabis extract in two children with refractory epilepsy: Full remission after switching to purified cannabidiol. *Front. Pharmacol.* **7**, 1–6 (2016).
8. Kevin, R. C. *et al.* Urinary cannabinoid levels during nabiximols (Sativex®)-medicated inpatient cannabis withdrawal. *Forensic Toxicol.* **35**, 33–44 (2016).
9. Bouchene, S., Sadeg, N. & Belhadj-tahar, H. New extraction method of THC and its metabolites, 11-OH-THC and THC-COOH, in plasma. **25**, 1–5 (2013).
10. Racamonde, I., Villaverde-de-Sáa, E., Rodil, R., Quintana, J. B. & Cela, R. Determination of delta-9-tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-carboxy-delta-9-tetrahydrocannabinol in water samples by solid-phase microextraction with on-fiber derivatization and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1245**, 167–174 (2012).
11. Dong, X., Li, L., Ye, Y., Zheng, L. & Jiang, Y. Simultaneous determination of major phytocannabinoids, their main metabolites, and common synthetic cannabinoids in urine samples by LC–MS/MS. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1033–1034**, 55–64 (2016).
12. Zgair, A. *et al.* Development of a simple and sensitive HPLC-UV method for the

- simultaneous determination of cannabidiol and δ^9 -tetrahydrocannabinol in rat plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **114**, 145–151 (2015).
13. Baker, D., Pryce, G., Giovannoni, G. & Thompson, A. J. Review The therapeutic potential of cannabis. **44**, 291–298 (1990).
 14. Velasco, G., Hernández-tiedra, S., Dávila, D. & Lorente, M. Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry The use of cannabinoids as anticancer agents. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **64**, 259–266 (2016).
 15. Alexander, S. P. H. Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry Therapeutic potential of cannabis-related drugs ☆. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **64**, 157–166 (2016).
 16. Hall, W. D. & Solowij, N. Adverse effects of cannabis. *Lancet* **352**, 1611–1616 (1998).
 17. Huestis, M. A. Cannabis-impaired driving: A public health and safety concern. *Clin. Chem.* **61**, 1223–1225 (2015).
 18. ANVISA. Produtos à base de Canabidiol tem importação agilizada.
 19. ANVISA. Canabidiol e THC: norma permitirá registro de produto.
 20. ANVISA. Registrado primeiro medicamento à base de Cannabis sativa.
 21. ANVISA. Lista oficial de fármacos inclui Cannabis.
 22. Maralikova, B. & Weinmann, W. Simultaneous determination of Δ^9 - tetrahydrocannabinol, 11-hydroxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol and 11 -nor-9-carboxy- Δ^9 - tetrahydrocannabinol in human plasma by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **39**, 526–531 (2004).
 23. Thieme, D., Sachs, H. & Uhl, M. Proof of cannabis administration by sensitive detection of 11-nor-Delta(9)-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in hair using selective methylation and application of liquid chromatography- tandem and multistage mass spectrometry. *Drug Test. Anal.* **6**, 112–118 (2014).
 24. Escrivá, Ú., Andrés-Costa, M. J., Andreu, V. & Picó, Y. Analysis of cannabinoids by liquid chromatography–mass spectrometry in milk, liver and hemp seed to ensure food safety. *Food Chem.* **228**, 177–185 (2017).
 25. Sánchez-González, J. *et al.* Cannabinoids assessment in plasma and urine by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry after molecularly imprinted polymer microsolid-phase extraction. *Anal. Bioanal. Chem.* **409**, 1207–1220 (2017).
 26. del Mar Ramirez Fernandez, M., De Boeck, G., Wood, M., Lopez-Rivadulla, M. & Samyn, N. Simultaneous analysis of THC and its metabolites in blood using liquid

- chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **875**, 465–470 (2008).
27. Aizpurua-Olaizola, O. *et al.* Simultaneous quantification of major cannabinoids and metabolites in human urine and plasma by HPLC-MS/MS and enzyme-alkaline hydrolysis. *Drug Test. Anal.* **9**, 626–633 (2017).
 28. Desrosiers, N. A., Scheidweiler, K. B. & Huestis, M. A. Quantification of six cannabinoids and metabolites in oral fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Test. Anal.* **7**, 684–694 (2015).
 29. Boix, C., Ibáñez, M., Bijlsma, L., Sancho, J. V. & Hernández, F. Investigation of cannabis biomarkers and transformation products in waters by liquid chromatography coupled to time of flight and triple quadrupole mass spectrometry. *Chemosphere* **99**, 64–71 (2014).
 30. Bijlsma, L., Emke, E., Hernández, F. & De Voogt, P. Performance of the linear ion trap Orbitrap mass analyzer for qualitative and quantitative analysis of drugs of abuse and relevant metabolites in sewage water. *Anal. Chim. Acta* **768**, 102–110 (2013).
 31. Sánchez-González, J. *et al.* Development of a micro-solid-phase extraction molecularly imprinted polymer technique for synthetic cannabinoids assessment in urine followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1550**, 8–20 (2018).
 32. American Chemical Society. 12 Principles of Green Chemistry.
 33. Arthur, C. L. & Pawliszyn, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Anal. Chem.* **62**, 2145–2148 (1990).
 34. Ocaña-González, J. A., Fernández-Torres, R., Bello-López, M. Á. & Ramos-Payán, M. New developments in microextraction techniques in bioanalysis. A review. *Anal. Chim. Acta* **905**, 8–23 (2016).
 35. Cabal, L. F. R. Síntese e avaliação de polímeros molecularmente impressos restritos a interação com macromoléculas para determinação analítica de sulfonamidas em águas residuais. (Universidade de São Paulo, 2013).
 36. Cheong, W. J., Yang, S. H. & Ali, F. Molecular imprinted polymers for separation science: A review of reviews. *J. Sep. Sci.* **36**, 609–628 (2013).
 37. Souza, M. D. & Barbosa, C. M. Polímeros com capacidade de reconhecimento molecular no controle da liberação de fármacos. Parte 1: Síntese e caracterização. *Quim. Nov.* **32**, 1609–1619 (2009).
 38. Du, B. *et al.* A novel restricted access material combined to molecularly imprinted

- polymers for selective solid-phase extraction and high performance liquid chromatography determination of 2-methoxyestradiol in plasma samples. *Talanta* **129**, 465–472 (2014).
39. Tunc, Y., Hasirci, N., Yesilada, A. & Ulubayram, K. Comonomer effects on binding performances and morphology of acrylate-based imprinted polymers. *Polymer (Guildf)*. **47**, 6931–6940 (2006).
 40. Gama, M. R. & Bottoli, C. B. G. Molecularly imprinted polymers for bioanalytical sample preparation. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1043**, 107–121 (2017).
 41. Dmitrienko, S. G., Irkha, V. V, Kuznetsova, A. Y. & Zolotov, Y. A. Use of Molecular Imprinted Polymers for the Separation and Preconcentration of Organic Compounds. **59**, 808–817 (2004).
 42. Płotka-Wasyłka, J., Szczepańska, N., de la Guardia, M. & Namieśnik, J. Modern trends in solid phase extraction: New sorbent media. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **77**, 23–43 (2016).
 43. Lendoiro, E. *et al.* Molecularly imprinted polymer for selective determination of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and 11-nor- Δ^9 - tetrahydrocannabinol carboxylic acid using LC-MS/MS in urine and oral fluid Forensic Toxicology. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **406**, 3589–3597 (2014).
 44. Cela-Pérez, M. C. *et al.* Water-compatible imprinted pills for sensitive determination of cannabinoids in urine and oral fluid. *J. Chromatogr. A* **1429**, 53–64 (2016).
 45. Abdel-Rehim, M. New trend in sample preparation: On-line microextraction in packed syringe for liquid and gas chromatography applications I. Determination of local anaesthetics in human plasma samples using gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **801**, 317–321 (2004).
 46. Abdel-Rehim, M. Recent advances in microextraction by packed sorbent for bioanalysis. *J. Chromatogr. A* **1217**, 2569–2580 (2010).
 47. Pereira, J., Câmara, J. S., Colmsjö, A. & Abdel-Rehim, M. Microextraction by packed sorbent: An emerging, selective and high-throughput extraction technique in bioanalysis. *Biomed. Chromatogr.* **28**, 839–847 (2014).
 48. Yang, L., Said, R. & Abdel-Rehim, M. Sorbent, device, matrix and application in microextraction by packed sorbent (MEPS): A review. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1043**, 33–43 (2017).
 49. Silva, C., Cavaco, C., Perestrelo, R., Pereira, J. & Câmara, J. Microextraction by

- Packed Sorbent (MEPS) and Solid-Phase Microextraction (SPME) as Sample Preparation Procedures for the Metabolomic Profiling of Urine. *Metabolites* **4**, 71–97 (2014).
50. Soleimani, E., Bahrami, A., Afkhami, A. & Shahna, F. G. Determination of urinary trans,trans-muconic acid using molecularly imprinted polymer in microextraction by packed sorbent followed by liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1061–1062**, 65–71 (2017).
 51. Daryanavard, S. M. *et al.* Molecularly imprinted polymer in microextraction by packed sorbent for the simultaneous determination of local anesthetics: Lidocaine, ropivacaine, mepivacaine and bupivacaine in plasma and urine samples. *Biomed. Chromatogr.* **27**, 1481–1488 (2013).
 52. Soleimani, E., Bahrami, A., Afkhami, A. & Shahna, F. G. Selective determination of mandelic acid in urine using molecularly imprinted polymer in microextraction by packed sorbent. *Arch. Toxicol.* **92**, 213–222 (2018).
 53. Prieto, A., Schrader, S., Bauer, C. & Möder, M. Synthesis of a molecularly imprinted polymer and its application for microextraction by packed sorbent for the determination of fluoroquinolone related compounds in water. *Anal. Chim. Acta* **685**, 146–152 (2011).
 54. Prieto, A. *et al.* Selective determination of estrogenic compounds in water by microextraction by packed sorbents and a molecularly imprinted polymer coupled with large volume injection-in-port-derivatization gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **703**, 41–51 (2011).
 55. Sergi, M. *et al.* Micro extraction by packed sorbent coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry for the rapid and sensitive determination of cannabinoids in oral fluids. *J. Chromatogr. A* **1301**, 139–146 (2013).
 56. Rosado, T., Fernandes, L., Barroso, M. & Gallardo, E. Sensitive determination of THC and main metabolites in human plasma by means of microextraction in packed sorbent and gas chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1043**, 63–73 (2017).
 57. Rocchi, R. *et al.* Analysis of new psychoactive substances in oral fluids by means of microextraction by packed sorbent followed by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Test. Anal.* 1–9 (2017). doi:10.1002/dta.2330
 58. Santos Neto, A. J. dos, Lanças, F. M., Contadori, A. S., Ortega, S. N., & Amparo, M.

- R. Microdispositivo de extração desmontável para adaptação a microseringas de agulha removível. (2016).
59. Santos Neto, A. J. dos; & Medina, D. A. V. SISTEMA CARTESIANO MULTI-SERINGA E MÉTODO DE OPERAÇÃO DE SISTEMA CARTESIANO MULTI-SERINGA. (2018).
 60. Ribani, M; Bottoli, C; Colins, C; Jardim, I; Melo, L. VALIDAÇÃO EM MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS E ELETROFORÉTICOS. *Quim. Nov.* **27**, 771–780 (2004).
 61. Cassiano, N. M. *et al.* VALIDAÇÃO EM MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS PARA ANÁLISES DE PEQUENAS MOLÉCULAS EM MATRIZES BIOLÓGICAS. *Quim. Nov.* **32**, 1021–1030 (2009).
 62. Almeida, A. M., Castel-Branco, M. M. & Falcão, A. C. Linear regression for calibration lines revisited: Weighting schemes for bioanalytical methods. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **774**, 215–222 (2002).
 63. Manoel, M. *et al.* Analysis of δ 9-THC in cosmetics by high performance liquid chromatography with UV- Vis detection. *Brazilian J. Anal. Chem.* 341–344 (2012).
 64. Karlsson, L. Direct injection of urine on a high-performance liquid chromatographic column-switching system for determination of delta-9-tetrahydrocannabinol-11-oic acid with both ultraviolet and electrochemical detection. *J. Chromatogr.* **417**, 309–317 (1987).
 65. Simões, S. S., Ajenjo, A. C. & Dias, M. J. Qualitative and quantitative analysis of THC, 11-hydroxy-THC and 11-nor-9-carboxy-THC in whole blood by ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **25**, 2603–2610 (2011).
 66. Edenir Rodrigues Pereira Filho. *Planejamento fatorial em química: maximizando a obtenção de resultados*. (EdUFSCar, 2015).
 67. Hegstad, S., Hermansson, S., Betnér, I., Spigset, O. & Falch, B. M. H. Screening and quantitative determination of drugs of abuse in diluted urine by UPLC-MS/MS. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **947–948**, 83–95 (2014).
 68. Weinmann, W., Vogt, S., Goerke, R., Muller, C. & Bromberger, A. Simultaneous determination of THC-COOH and THC-COOH-glucuronide in urine samples by LC / MS / MS. **113**, 381–387 (2000).
 69. Rezaee, M. *et al.* Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *J. Chromatogr. A* **1116**, 1–9 (2006).
 70. Bow, Y., Sutriyono, E., Nasir, S. & Iskandar, I. Preparation of molecularly imprinted

- polymers simazine as material potentiometric sensor. **01002**, 8–12 (2017).
71. Robert M. Silverstein, Francis X. Webster, D. J. K. *Spectrometric identification of organic compounds*. (John Wiley & Sons, INC., 2005).
 72. Santos, M. G., Moraes, G. O. I., Nakamura, M. G., Santos-Neto, A. J. & Figueiredo, E. C. Restricted access molecularly imprinted polymers obtained by bovine serum albumin and/or hydrophilic monomers' external layers: a comparison related to physical and chemical properties. *Analyst* **140**, 7768–7775 (2015).
 73. Spivak, D. A. Optimization, evaluation, and characterization of molecularly imprinted polymers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**, 1779–1794 (2005).
 74. Lv, Y.-K., Jia, C.-L., Zhang, J.-Q., Li, P. & Sun, H.-W. Preparation and characterization of molecularly imprinted monolithic column for on-line solid-phase extraction coupled with HPLC for determination of the fluoroquinolone residues in honey samples. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **36**, 249–260 (2013).
 75. Maralikova, B. & Weinmann, W. Confirmatory analysis for drugs of abuse in plasma and urine by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with respect to criteria for compound identification. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **811**, 21–30 (2004).
 76. Stefanelli, F., Pesci, F. G., Giusiani, M. & Chericoni, S. A novel fast method for aqueous derivatization of THC, OH-THC and THC-COOH in human whole blood and urine samples for routine forensic analyses. *Biomed. Chromatogr.* **32**, 1–10 (2018).
 77. Kiser, M. M. & Dolan, W. Selecting the Best Curve Fit. *Lc Gc Eur* **17**, 138–143 (2004).
 78. Silva, G. H. R. da *et al.* Methylparaben concentration in commercial Brazilian local anesthetics solutions. *J. Appl. Oral Sci.* **20**, 444–448 (2012).
 79. Kim, J. M. & Myung, S. W. Determination of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in Urine by HPLC-UV/Vis Analysis Coupled with Electromembrane Extraction. *Bull. Korean Chem. Soc.* 1–6 (2018). doi:10.1002/bkcs.11391
 80. Ali, M. S., Ghori, M. & Khatri, A. R. Stability indicating simultaneous determination of domperidone (DP), methylparaben (MP) and propylparaben by high performance liquid chromatography (HPLC). *J. Pharm. Biomed. Anal.* **41**, 358–365 (2006).
 81. Moon, Y.-J. & Myung, S.-W. Determination of Estrogens in Environmental Aqueous Samples Using Dispersive Liquid-Liquid Microextraction and HPLC/UV-Vis System. *Bull. Korean Chem. Soc.* 1–6 (2016). doi:10.1002/bkcs.11016
 82. Rohman, A., Ardiyanti, Y., Sudjadi & Riyanto, S. Simultaneous determination of

- paracetamol, guaiphenesin and chlorpheniramine maleate using ultraviolet spectroscopy in combination with multivariate calibration. *J. Med. Sci.* **15**, 221–228 (2015).
83. Kulkarni, V. G., Gandhi, S. V., Deshpande, P. B. & Chaube, P. H. A validated RP-HPLC method for simultaneous estimation of Paracetamol and Lornoxicam in combined tablet dosage form. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **3**, 225–227 (2011).
 84. Bhoir, I.C., Patil, S.T., Sundaresan, M. Performance comparison for the assay of carbamazepine in human blood plasma using HPLC and packed column super critical fluid chromatography. *Indian Drugs* **36**, 231–37 (1999).
 85. Paichamnan, S., Ovatlarnporn, C. & Klinpituksa, P. Method for quantitative determination of diclofenac in chitosan microspheres and chitosan films by HPLC – UV and UV spectroscopic methods. *Der Pharma Chem.* **6**, 279–284 (2014).
 86. White, R. M. Forensic Instability and Poor Recovery of Cannabinoids in Urine , Oral Fluid , and Hair. *Forensic Sci. Rev.* **30**, 33–49 (2018).