



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Departamento de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

JONAS CARNEIRO CRUZ

Desenvolvimento de nanotubos de carbono de acesso restrito como fase extratora para a microextração de fármacos e canabinóides em amostras de plasma e análise por UHPLC-MS/MS

RIBEIRÃO PRETO - SP

2022

JONAS CARNEIRO CRUZ

**Desenvolvimento de nanotubos de carbono de acesso restrito como fase
extratora para a microextração de fármacos e canabinóides em amostras de
plasma e análise por UHPLC-MS/MS**

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das
exigências para a obtenção do título de Doutor em
Ciências

Área: Química

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

Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo Costa
Figureiredo

RIBEIRÃO PRETO - SP

2022

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

Catálogo na publicação
Biblioteca
Escola de Artes, Ciências e Humanidades

Cruz, Jonas Carneiro

Desenvolvimento de nanotubos de carbono de acesso restrito como fase extratora para a microextração de fármacos e canabinóides em amostras de plasma e análise por UHPLC-MS/MS. Ribeirão Preto, 2022

111 p. : il. ; 30 cm

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022. Área de concentração: Química analítica.

Orientadora: Maria Eugênia Queiroz Nassur.

1. UHPLC-MS/MS. 2. Microextração em Sorvente empacotado. 3. Microextração em fase sólida. 4. Nanotubos de carbono de acesso restrito. 5. Nanopartículas magnéticas. 6. Canabinóides. 7. Antipsicóticos. 8. Amostras biológicas.

CRUZ, J. C Desenvolvimento de nanotubos de carbono de acesso restrito como fase extratora para a microextração de fármacos e canabinóides em amostras de plasma e análise por UHPLC-MS/MS. 2022. Tese (Doutorado) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Aprovado em: 07/10/2022

Banca Examinadora:

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

Instituição: Universidade de São Paulo

Julgamento: Aprovado

Prof. Dr. José Manuel Nogueira

Instituição: Universidade de Lisboa

Julgamento: Aprovado

Prof. Dr. Keyller Bastos Borges

Instituição: Universidade Federal de São João Del-Rei

Julgamento: Aprovado

Prof^a. Dr^a. Mariane Gonçalves Santos

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Julgamento: Aprovado

Prof. Dr. Jemmyson Romário de Jesus

Instituição: Universidade Federal de Viçosa

Julgamento: Aprovado

Prof. Dr. Pedro Orival Luccas

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Julgamento: Aprovado

RESUMO

CRUZ, J. C. **Desenvolvimento de nanotubos de carbono de acesso restrito como fase extratora para a microextração de fármacos e canabinóides em amostras de plasma e análise por UHPLC-MS/MS.** 2022. Tese (Doutorado em ciências) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Em razão da complexidade das amostras biológicas, a etapa de preparo de amostras tem sido requerida para remover macromoléculas (principalmente proteínas) e pré-concentrar os analitos, quase sempre presentes em níveis de traços. Dentre os recentes avanços das técnicas de preparo de amostras, podemos destacar o desenvolvimento de fases extratoras seletivas e a miniaturização dos sistemas analíticos, que possibilita a redução tanto do consumo de solvente orgânico quanto do volume de amostras biológicas. Nesta tese, o capítulo I apresenta os principais desafios: (i) do preparo de amostras para aplicações bioanalíticas e (ii) do desenvolvimento de fases extratoras inovadoras para técnicas de microextração, como os materiais de acesso restrito e os nanotubos de carbono funcionalizados. O capítulo II descreve o desenvolvimento de nanotubos de carbono de acesso restrito (RACNTs) como fase extratora para a técnica de microextração em sorvente empacotado (MEPS) para a determinação de antipsicóticos (clorpromazina, clozapina, olanzapina e quetiapina) em amostras de plasma por UHPLC-MS/MS. As fases extratoras RACNTs foram sintetizadas através do entrecruzamento de albumina sérica bovina na superfície externa de nanotubos de carbono comerciais, criando uma barreira de exclusão por tamanho. Os RACNTs sintetizados excluíram cerca de 97% das proteínas plasmáticas e foram reutilizados em aproximadamente 100 ensaios, sem perda da performance analítica (exatidão e precisão $\leq 15\%$). A avaliação das variáveis MEPS (pH da amostra, ciclos de extração, solvente e volume de dessorção) favoreceu a sensibilidade e seletividade analítica. O método MEPS/UHPLC-MS/MS apresentou linearidade na faixa de concentração do limite inferior de quantificação ($10,0 \text{ ng.mL}^{-1}$) até o limite superior de quantificação ($200\text{-}700 \text{ ng.mL}^{-1}$) com coeficientes de determinações superiores a 0,99. A exatidão e precisão variaram de -8,01 a 11,53 % e 2,98 a 12,85, respectivamente. O efeito residual e o efeito matriz (CV: 5,6 a 14,33 %) não foram considerados significativos. Este método inovador foi aplicado com sucesso para a determinação de antipsicóticos em amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos para fins de monitorização terapêutica. O capítulo III descreve o desenvolvimento de RACNTs contendo nanopartículas magnéticas incorporadas (M-RACNTs) como fase extratora para microextração em fase sólida (SPME) para determinação direta (sem pré-preparo de amostra) de canabinóides (canabidiol e tetrahydrocannabinol) em amostras de plasma por UHPLC-MS/MS. A fase adsorptiva foi imobilizada em um dispositivo SPME por interações eletromagnéticas entre os M-RACNTs e um ímã cilíndrico de neodímio (3 mm de diâmetro x 8 mm de altura) fixado a uma haste de aço inoxidável (3 mm de diâmetro x 40 mm altura). A fase RACNT foi caracterizada por microscopia eletrônica de varredura, infravermelho com transformada de Fourier, análise termogravimétrica e calorimetria diferencial exploratória. A avaliação da influência das variáveis na SPME: pH da solução diluente (5,0; 9,0), tempo de sorção (1 min; 20 min), tempo de dessorção (1 min; 5 min), solvente de dessorção (acetonitrila; metanol), volume de dessorção ($100\mu\text{L}$; $300\mu\text{L}$) foi realizada através do planejamento fatorial fracionário ($2^k - 1$) ($k = 5$). O tempo de sorção e o volume de dessorção foram consideradas variáveis estatisticamente significativas no processo SPME. O método SPME/UHPLC-MS/MS foi validado em conformidade com as diretrizes de validação internacional (*Food and drug administration*), apresentando linearidade adequada (coeficiente de determinação superior a 0,99) em concentrações que variam do limite inferior de quantificação (LIQ) (10 ng.mL^{-1}) ao limite

superior de quantificação (300 ng.mL⁻¹). A exatidão e precisão variaram de -4.47 a 19.84% (LIQ) e -6.90 a 17.78% (LIQ). O carry over e o efeito matriz (4,07 a 12,31 %) não foram considerados significativos. Por fim, o método inovador foi aplicado para a determinação de canabinóides em amostras plasma de voluntários em dois cenários envolvendo a administração de canabinóides.

Palavras-chave: UHPLC-MS/MS. Microextração em sorvente empacotado. Microextração em fase sólida. Nanotubos de carbono de acesso restrito. Nanopartículas magnéticas. Canabinóides. Antipsicóticos. Amostras biológicas

ABSTRACT

CRUZ, J. C. **Development of the restricted access carbon nanotubes as extracting phase for microextraction of drugs and cannabinoids in plasma samples and UHPLC-MS/MS analysis.** 2022. Tese (Doutorado) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Due to the complexity of biological samples, the sample preparation step has been required to remove macromolecules (mainly proteins) and pre-concentrate the analytes, almost always present at trace levels. Among the recent advances in sample preparation techniques, we can highlight the development of selective extractor phases and the miniaturization of analytical systems that make it possible to reduce both the consumption of organic solvent and the volume of biological samples. In this thesis, chapter I presents the main challenges: (i) of the sample preparation for bioanalytical applications and (ii) of the development of innovative extractive phases for microextraction techniques, such as restricted access materials and functionalized carbon nanotubes. Chapter II describes the development of restricted access carbon nanotubes (RACNTs) as an extractive phase for the packed sorbent microextraction (MEPS) technique for the determination of antipsychotics (chlorpromazine, clozapine, olanzapine and quetiapine) in plasma samples by UHPLC– MS/MS. The RACNTs extractive phases were synthesized by crossing bovine serum albumin on the external surface of commercial carbon nanotubes, creating a size exclusion barrier. The RACNTs synthesized excluded approximately 97% of plasma proteins and they were reused in approximately 100 assays without loss of analytical performance (accuracy and precision $\leq 15\%$). The evaluation of MEPS variables (sample pH, extraction cycles, solvent and desorption volume) favored analytical sensitivity and selectivity. The MEPS/UHPLC-MS/MS method showed linearity in the concentration range from the lower limit of quantification (10.0 ng.mL^{-1}) to the upper limit of quantification ($200\text{-}700 \text{ ng.mL}^{-1}$) with coefficients of determinations greater than 0.99. Accuracy and precision ranged from - 8.01 to 11.53% and 2.98 to 12.85, respectively. Carry over and matrix effect (CV: 5.6 to 14.33%) were not considered significant. This innovative method has been successfully applied for the determination of antipsychotics in plasma samples from schizophrenic patients for therapeutic monitoring purposes. Chapter III describes the development of RACNTs containing embedded magnetic nanoparticles (M-RACNTs) as extractive phase for solid phase microextraction (SPME) for direct determination (without sample pre-preparation) of cannabinoids (cannabidiol and tetrahydrocannabinol) in plasma samples by UHPLC-MS/MS. The adsorptive phase was immobilized in an SPME device by electromagnetic interactions between the M-RACNTs and a cylindrical neodymium magnet (3 mm in diameter x 8 mm in height) fixed to a stainless steel rod (3 mm in diameter x 40 mm in height). The RACNT phase was characterized by scanning electron microscopy, infrared with Fourier transform, thermogravimetric analysis and differential scanning calorimetry. The evaluation of the influence of variables on SPME: pH of the diluent solution (5.0 - 9.0), sorption time (1 min; 20 min), desorption time (1 min; 5 min), desorption solvent (acetonitrile and methanol), desorption volume ($100\mu\text{L}$; $300\mu\text{L}$) was performed using fractional factorial design ($2^k - 1$) ($k = 5$). Sorption time and desorption volume were considered statistically significant variables in the SPME process. The SPME/UHPLC-MS/MS method was validated in accordance with international validation guidelines (Food and drug administration), showing adequate linearity (coefficient of determination greater than 0.99) at concentrations that vary from the lower limit of quantification (LOQ) (10 ng.mL^{-1}) to the upper limit of quantification (300 ng.mL^{-1}), The accuracy and precision ranged from -4.47 to 19.84% (LOQ) and -6.90 to 17.78% (LOQ). Carry over and matrix effect (4.07 to 12.31%) were not considered significant. Finally, the innovative

method was applied for the determination of cannabinoids in plasma samples from volunteers in two scenarios involving the administration of cannabinoids.

Keywords: UHPLC-MS/MS. Microextraction by packed sorbent. Solid-phase microextraction. Restricted access carbon nanotubes. Magnetic nanoparticles. Cannabinoids. Antipsychotics. biological samples

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação esquemática dos tipos de fase RAM à base de sílica.....	21
Figura 2- Arranjo dos CNTs de acordo com a estrutura das paredes	24
Figura 3- Processo adsorptivo em diferentes materiais (a) porosos, (b) filmes finos, (c) CNTs	25
Figura 4- Etapas da MEPS	34
Figura 5- Dispositivo MEPS	37
Figura 6- Otimização dos parâmetros MEPS: (a) pH; (b) Número de ciclos; (c) Tipo de solvente; (d) Volume de dessorção	44
Figura 7- Sinais analíticos obtidos a partir da injeção direta de 100µL de plasma diluído com 400µL de tampão borato (pH 9) a 280 nm (A), após o procedimento de extração com RACNT (B) e com CNT convencional (C). A—área de pico, 9.196.219; B—área de pico, 8.926.7	46
Figura 8- Cromatogramas MEPS/LC–MS/MS de uma amostra de plasma sem antipsicóticos e uma amostra de plasma enriquecida com os antipsicóticos na concentração do LIQ.....	49
Figura 9- Estrutura química do CBD e do THC.....	56
Figura 10- Dispositivo commercial para SPME da marca Supelco®	59
Figura 11- (a) Dessorção térmica dos solutos extraídos para análises GC. (b) Dessorção em fase líquida na interface LC. (c) Dessorção <i>offline</i>	61
Figura 12- Método Sol-gel nos revestimentos de fibras SPME com CNTs.....	65
Figura 13- Ilustração do processo de preparação dos CNTs ligados quimicamente a fibras SPME à base de sílica (b) micrografias da fibra SPME em uma ampliação de 400 e 30.000X	66
Figura 14- Representação esquemática do dispositivo SPME desenvolvido	74
Figura 15- Representação esquemática do procedimento SPME.....	76
Figura 16- Microscopia eletrônica de varredura dos (a) MNPs, (b) CNTs e (c) M-RACNTs.	78
Figura 17- Influência do campo magnético nos M-RACNTs	79
Figura 18- Espectro FTIR dos RACNTs	80
Figura 19- Análise termogravimétrica e calometria diferencial exploratória para os M-RACNTs sintetizados	81
Figura 20- Representação gráfica do potencial Zeta obtido para os M-RACNTs.....	81
Figura 21- Teste de exclusão de proteínas para os M-RACNTs	82
Figura 22- Diagrama de Pareto obtido pelo planejamento fatorial fracionário para otimização do método SPME-UHPLC-MS/MS	85

Figura 23- Otimização univariada dos parâmetros SPME-UHPLC-MS/MS: (a) volume de dessorção e (b) tempo de sorção.....	86
Figura 24- Cromatograma obtido através da injeção de plasma branco enriquecido com os canabinóides na concentração referente ao LIQ.....	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Métodos UHPLC-MS/MS associados à técnicas convencionais de preparo de amostras para a determinação de antipsicóticos em amostras de plasma.....	31
Tabela 2- Configurações dos ions, do equipamento e tempo de retenção para os antipsicóticos	40
Tabela 3- Faixas lineares, coeficientes de determinação, LIQ e padrões internos para os antipsicóticos	47
Tabela 4- Exatidão e precisão para o método para as amostras de plasma com os fármacos em diferentes concentrações (n=5).....	48
Tabela 5- Fator de matriz normalizada (%CV) dos antipsicóticos adicionados em amostras de plasma no CQB e CQA	49
Tabela 6- Comparação do método MEPS-UHPLC-MS/MS proposto com outros métodos para a determinação de antipsicóticos em amostras biológicas.....	50
Tabela 7 - Concentrações dos antipsicóticos em amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos.....	52
Tabela 8- Métodos cromatográficos associados à técnicas de preparo de amostras convencionais têm sido empregados nas determinações de canabinóides e seus metabólitos em amostras biológicas.....	57
Tabela 9 - Vantagens e desvantagens das técnicas de recobrimento de dispositivos SPME com CNTs.....	68
Tabela 10- Paramentros cromatográficos e de MS para os canabinoides avaliados	72
Tabela 11- Design fatorial fracionário para a otimização das variáveis SPME	84
Tabela 12- Parâmetros de validação do método SME-UHPLC-MS/MS (n=5)	89
Tabela 13- Comparação do método SPME-UHPLC-MS/MS com outros métodos de microextração para a determinação de CBD e THC em fluidos biológicos.....	90
Tabela 14- Concentração de canabinoides no plasma de pacientes incluídos no estudo	91

LISTA DE SIGLAS

2-AG	2-araquidonilglicerol
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BSA	Albumina sérica bovina
CBD	Canabidiol
CE	Eletroforese capilar
CID	Dissociação induzida por colisão
CLOR	Clorpromazina
CLOZ	Clozapina
CNTs	Nanotubos de carbono
CQB	Controle de qualidade baixo
CQM	Controle de qualidade médio
CV	Coefficiente de variação
DSC	Calorimetria diferencial exploratória
d-SPE	Extração em fase sólida dispersiva
EC	Energia do capilar
EM	Efeito matriz
EMA	<i>European Medicine Agency</i>
EPR	Erro padrão relativo
ESI	Ionização por eletrospray
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FMN	Fator de matriz normalizado
FT-IR	Infravermelho com transformada de Fourier
GC	Cromatografia gasosa
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HLB	Balanco hidrofílico-lipofílico
LATF	Laboratório de fármacos e toxicantes
LIQ	Limite inferior de quantificação
LLE	Extração líquido-líquido
LSQ	Limite superior de quantificação

MCNTs	Nanotubos de carbono magnéticos
MEPS	Microextração em sorvente empacotado
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MIP	Polímeros molecularmente impressos
M-RACNTs	Nanotubos de carbono de acesso restrito magnético
MS/MS	Espectrometria de massas em tandem
MWCNTs	<i>Multi-walled carbono nanotubes</i>
OLA	Olanzapina
PC	Potencial de <i>declustering</i> (DP)
PI	Padrão interno
PPT	Precipitação de proteínas
QUET	Quetiapina
R ²	Coefficiente de determinação
RACNTs	Nanotubos de carbonbo de acesso restrito
RAM	Materiais de acesso restrito
SEC	Sistema Endocanabinóide humano
SPE	Extração em fase sólida
SPME	Microextração em fase sólida
SRM	monitoramento de reações únicas
SOCI	Cloreto de tionida
SWCNTs	<i>Single-walled carbono nanotubes</i>
TDM	Monitorização terapêutica
TSO-OH	Ólep de silicone
TG	Análise termogravimétrica
THC	Tetrahydrocannabinol
THC-d3	Tetrahydrocannabinol deuterado
Tr	Tempo de retenção
UHPLC	Cromatografia de ultra-alta eficiência
UNIFAL	Universidade Federal de Alfenas
USP	Universidade de São Paulo
UV	Espectroscopia no ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

μL	microlitro
min	minuto
°C	grau Celsius
L/h	litro/hora
kV	kilovolt
μm	micrômetro
g	grama
mg	miligrama
nm	nanômetro
v/v	volume/volume
hrs	horas
ppm	partes por milhão

SUMÁRIO

Capítulo I: <i>Introdução Geral</i>	18
1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Preparo de amostra biológica.....	19
1.2 Materiais de acesso restrito.....	20
1.3 Nanotubos de carbono	23
1.4 Nanotubos de carbono de acesso restrito	25
Capítulo II: <i>Nanotubo de carbono de acesso restrito para microextração por sorvente empacotado para determinação de antipsicóticos em amostras de plasma por UHPLC-MS/MS</i>	28
1 INTRODUÇÃO	29
1.1 Esquizofrenia	29
1.2 Microextração em sorvente empacotado	32
2 OBJETIVOS.....	35
2.1 Objetivo principal	35
2.2 Objetivos específicos	35
3 MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1 Materiais	36
3.2 Revestimento dos RACNTs.....	36
3.3 Amostras de plasma	37
3.4 Otimização do procedimento de extração de MEPS.....	38
3.5 Condições MEPS otimizadas.....	38
3.6 Teste de exclusão de proteínas.....	38
3.7 UHPLC-MS/MS	39
3.8 Validação analítica.....	40
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1 Otimização do procedimento de extração.....	43
4.2 Teste de exclusão de proteínas.....	45

4.3 Validação Analítica.....	46
4.4 Comparação com outras metodologias	50
4.4 Aplicação clínica para análise de amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos..	51
5 CONCLUSÕES.....	53
Capítulo III: Revestimento magnético do dispositivo de microextração em fase sólida com nanotubos de carbono de acesso restrito (com nanopartículas de Fe₂O₃ incorporadas) para a determinação de canabinóides em amostras de plasma por UHPLC-MS/MS	54
1 INTRODUÇÃO	55
1.1 Canabinóides.....	55
1.2 Microextração em fase sólida	58
1.3 Técnicas de revestimento do dispositivo SPME com nanotubos de carbono.....	63
2 OBJETIVOS.....	68
2.1 Objetivo principal	68
2.2 Objetivos específicos	68
3 MATERIAIS E MÉTODOS	70
3.1 Materiais	70
3.2 Amostras de plasma de voluntários saudáveis que participaram de uma única sessão de administração de CBD ou de fumantes crônicos de <i>Cannabis</i>	70
3.3 Condições cromatográficas	71
3.6 Teste de exclusão de proteínas.....	73
3.7 Dispositivo M-RACNT SPME	74
3.8 Otimização das condições da M-RACNTs SPME.....	75
3.9 Condições SPME otimizadas.....	75
3.10 Validação analítica.....	76
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
4.1 Caracterização da fase M-RACNT	78
4.2 Teste de exclusão de proteínas.....	82
4.3 Otimização das condições do M-RACNT SPME.....	82

4.4 Validação analítica.....	87
4.5 Avaliação do método proposto em amostras de plasma de voluntários saudáveis.....	91
5 CONCLUSÕES.....	92
CONCLUSÃO GERAL	93
REFERÊNCIAS	94
ANEXOS	113
ANEXO A.....	114
ANEXO B	115
ANEXO C	116
ANEXO D.....	117

Capítulo I:
Introdução Geral

1 INTRODUÇÃO

1.1 Preparo de amostra biológica

O termo bioanálise vem sendo utilizado para descrever a área da química analítica dedicada à determinação de xenobióticos e bióticos em fluidos biológicos para diferentes fins (VAGHELA *et al.*, 2016). A cromatografia líquida de ultra-eficiência acoplada a espectrometria de massas em tandem (UHPLC-MS/MS) têm sido a técnica analítica de referência para as bioanálises. A grande versatilidade e eficiência desta técnica analítica permite a determinação simultânea de várias classes de substâncias com diferentes características físico químicas, como antibióticos, vitaminas, antivirais, e até imunossupressores (RATHOD *et al.*, 2019; XU *et al.*, 2007).

Em razão da complexidade das amostras biológicas, o desenvolvimento de métodos cromatográficos requer a etapa do preparo de amostra para a pré-concentração dos analitos (quase sempre presentes em níveis de traços) e remoção de grande parte das substâncias endógenas da matriz, principalmente as macromoléculas (BORGES *et al.*, 2015; QUEIROZ; MELO, 2013).

A etapa do preparo de amostras tem sido considerada a mais complexa e dispendiosa durante todo o processo analítico, sendo responsável por até 80% do tempo total de análise. Sendo assim, a seleção da técnica de preparo de amostra e otimização das variáveis são fatores significativos para o bom desempenho do método analítico (BORGES *et al.*, 2015; KATAOKA *et al.*, 2009). As técnicas de preparo de amostra convencionais, como a precipitação de proteínas (*protein precipitation*, PPT), extração líquido-líquido (*liquid-liquid extraction*, LLE) e extração em fase sólida (*solid-phase extraction*, SPE) com fases extratoras à base de sílica (como por exemplo: octadecilsilano - C18) têm sido as mais utilizadas para as bioanálises (KOLE *et al.*, 2011).

Nas últimas décadas, a química analítica moderna tem se direcionado para a miniaturização dos sistemas analíticos e o desenvolvimento de fases extratoras seletivas. Os sistemas miniaturizados diminuem tanto o consumo de solvente orgânico (tecnologias ambientalmente corretas) quanto o volume das amostras biológicas (NOVÁKOVÁ; VLČKOVÁ, 2009; SOARES *et al.*, 2020). Já o desenvolvimento de fases extratoras inovadoras favorece a seletividade dos métodos cromatográficos e diminui o número de etapas das técnicas de preparo de amostra. Dentre as fases inovadoras, podemos destacar os materiais de acesso restrito (RAMs) (CRUZ *et al.*, 2022; KNEISEL; AUWÄRTER, 2012; SOUZA *et al.*, 2021).

1.2 Materiais de acesso restrito

O termo RAM foi inicialmente proposto em 1985 por Hagestam e Pinkerton para descrever fases estacionárias que combinam os modos de separação cromatográfica por partição em fase reversa com o de exclusão molecular. Estes materiais têm sido amplamente utilizados como fase extratora pois extraem e pré-concentram, simultaneamente, analitos orgânicos presentes em amostras biológicas, sem a necessidade da etapa de pré-preparo da amostra (como por exemplo, precipitação de proteínas) (MULLETT, 2007).

Nas fases extradoras do tipo RAM, a superfície externa das partículas, geralmente, é revestida por uma rede hidrofílica, enquanto que no interior dos poros situam-se as fases que realizam interações hidrofóbicas, iônicas ou de afinidade. Devido ao tamanho reduzido dos poros, apenas pequenas moléculas (analitos) são capazes de acessar o interior da fase, já que uma barreira de difusão química ou física impede que as macromoléculas consigam adentrar no interior destes poros. Além disso, a presença de grupos hidrofílicos ou carregados na superfície externa pode evitar o acúmulo de proteínas através de um processo de repulsão eletrostática. (SOUVERAIN *et al.*, 2004).

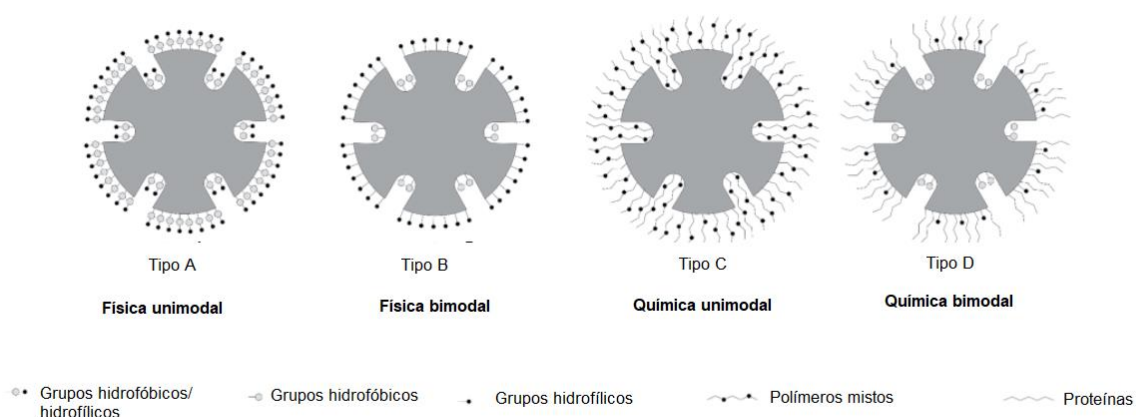
As fases extradoras RAMs têm sido utilizados em técnicas preparo de amostras *offline*, como a SPE e extração sortiva em barra de agitação (*stir bar sorptive extraction*, SBSE), ou *online*, como a microextração de fase sólida no capilar (*in-tube solid-phase microextraction*, *in-tube-SPME*). O procedimento de extração, geralmente, inicia-se com o condicionamento da fase e em seguida com a percolação da amostra pela fase extratora. Após esta etapa, temos o *clean-up* para a exclusão das proteínas/interferentes sorvidas na fase RAM; e por fim, o analito é eluído em solvente adequado. Para as extrações *offline*, os eluatos são evaporados à secura e os resíduos ressolubilizados em pequenos volumes da fase móvel para a concentração dos analitos, aumentando a detectabilidade do método. Para os sistemas *online*, a fase móvel elui os analitos diretamente para a coluna cromatográfica (FARIA *et al.*, 2017).

Materiais à base de sílica modificada são os mais utilizados como fases RAMs. Com o amplo desenvolvimento destas fases, estas passaram a ser divididas em quatro categorias distintas baseadas no seu mecanismo de exclusão (físico ou químico) ou com relação a natureza (hidrofílica ou hidrofóbica) de suas superfícies (interna e externa). O método de exclusão físico é caracterizado pelo tamanho reduzido dos poros (superfície externa), que restringe a passagem de macromoléculas para a estrutura interna da fase através de limitações de tamanho. Por outro lado, as barreiras de difusão química atuam evitando a ligação irreversível de proteínas através

da geração de uma superfície externa hidrofílica que gera uma repulsão eletroestática (CASSIANO *et al.*, 2006).

Com relação a natureza de suas superfícies, quando os tipos de ligantes às superfícies externa e interna têm propriedades físico-químicas semelhantes, estes são chamados de fases unimodais, enquanto que se esses ligantes têm propriedades diferentes (superfície externa hidrofílica e superfície interna hidrofóbica) estes são chamados de bimodais. Assim, combinando ambas as classificações, os sorventes RAM podem ser divididos em quatro grupos (FARIA *et al.*, 2017) (Figura 1):

Figura 1- Representação esquemática dos tipos de fase RAM à base de sílica



Fonte: adaptado de Faria *et al.*, (2017).

1.2.1 Barreiras físicas de difusão com fases unimodais

Essas fases de sílica porosa possuem propriedades hidrofóbicas ou hidrofílicas em ambas as superfícies internas e externas. O acesso e acúmulo de macromoléculas é evitado pelos pequenos poros e a natureza hidrofílica da superfície externa. Neste tipo de fase, os analitos (pequenas moléculas) permeiam pelas cadeias externas devido à baixa massa molar. A principal vantagem das RAMs com fase física unimodal é a facilidade de preparo, já que a síntese é realizada em único passo. Todavia, os analitos podem ser retidos tanto na superfície externa quanto nos poros, o que pode levar a picos cromatográficos com baixas resoluções (FARIA *et al.* 2017).

1.2.2 Barreiras físicas de difusão com fases bimodais

As fases físicas bimodais também usam o mecanismo de exclusão por tamanho, mas a diferença de natureza da superfície externa e interna garantem uma vantagem adicional. Neste sistema, os analitos de baixa massa molecular são retidos pela região interna hidrofóbica através do mecanismo de partição, enquanto as macromoléculas são excluídas pelo tamanho por camada hidrofílica que impede o acúmulo na superfície externa. Nesta categoria, as fases alquil-diol-sílica são as mais conhecidas. Neste tipo de material, grupos gliceril-propil ou diol fazem parte do revestimento externo enquanto grupos butil, octil ou octadecil podem estar presentes internamente (FARIA *et al.* 2017).

1.2.3 Barreiras de difusão química com fases unimodais

Esse tipo de fase pode ser obtido por meio de diferentes tipos de sílicas porosas contendo grupos hidrofóbicos ou hidrofílicos, onde as superfícies interna e externa são revestidas pela mesma barreira de difusão química. Apesar da existência de colunas comerciais, esses sorventes não são amplamente utilizados devido sua baixa estabilidade em comparação aos outros RAMs (FARIA *et al.* 2017).

1.2.4 Barreiras de difusão química com fases bimodais

RAMs com fases químicas bimodais apresentam uma camada externa hidrofílica, normalmente realizada com alfa-glicoproteína ácida ou BSA. No caso das alfa-proteínas, estas passam por uma etapa de oxidação de cadeias de carboidratos para se ligarem a um suporte ativado por hidrazida, por meio de uma reação com ácido. Já no caso da BSA, a imobilização ocorre através de uma reação com glutaraldeído como o agente de reticulação. Ao contrário da imobilização da glicoproteína α -1-ácida, os grupos amina da BSA são interconectados pelo glutaraldeído, resultando em uma camada de BSA reticulada não ligada à sílica. Embora este tipo de material possa ser considerado biocompatível e de fácil síntese, o tempo de vida útil pode ser considerada menor que as fases físicas bimodais. Este fato pode ser explicado pela perda gradual das camadas de proteína durante as análises. Além disso, a difusividade dos analitos através desta rede apresenta uma cinética de ligação mais lenta, devido à intensa rede polimérica formado no núcleo de sílica (FARIA *et al.* (2017).

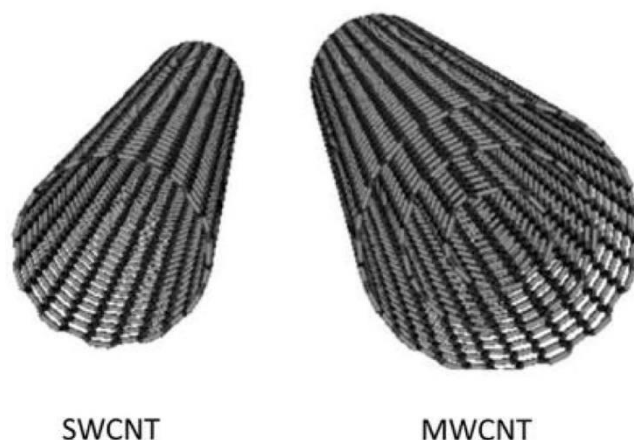
Apesar das fases RAM à base de sílica apresentarem diversas vantagens, como longo tempo de vida útil, alta capacidade de exclusão de proteínas e grande variedade de colunas comerciais, esse tipo de material também apresenta limitações. Neste contexto, é possível mencionar principalmente a baixa seletividade e estabilidade em ampla faixa de pH (devido à possível degradação da sílica). Dado aos bons resultados das fases RAM no campo de preparo de amostras, novas pesquisas vêm sendo realizadas objetivando transformar fases sortivas convencionais em materiais com propriedades de acesso restrito. Neste contexto, as propriedades individuais de sorção e seletividade das fases convencionais têm sido associadas à habilidade de exclusão de macromoléculas da fase RAM. Como exemplos podemos destacar os polímeros molecularmente impressos, os solventes supramoleculares e os nanotubos de carbono (CNTs) (FARIA *et al.*, 2017; SOUVERAIN *et al.*, 2004).

1.3 Nanotubos de carbono

Os CNTs podem ser considerados nanoestruturas alótropas de carbono. Os CNTs foram reportados inicialmente por IJIMA (1991), que revelou materiais com estrutura grafítica cilíndrica (com variadas camadas e diâmetros) ligados entre si em configuração sp^2 . Esta configuração é responsável por aumentar a resistência à tração e módulo de elasticidade dos CNTs, os tornando mais fortes e duros. Deste modo, estes materiais tem sido reconhecido por apresentar propriedades estruturais, eletrônicas, mecânicas, térmicas e químicas superiores a outras isoformas de carbono (ALOTHMAN; WABAIDUR, 2019; DRESSELHAUS *et al.*, 1998).

Dependendo da disposição de camadas na estrutura do material, os CNTs podem ser ainda classificados em dois grupos: os SWCNTs (*Single-Walled Carbon Nanotubes*), para o material contendo única folha de grafite enrolada sobre si mesma e os MWCNTs (*Multi-Walled Carbon Nanotubes*) para os nanomateriais correspondendo as múltiplas paredes (THOSTENSON *et al.*, 2001). Os diâmetros de SWCNTs e MWCNTs são tipicamente de 0,8 a 2 nm e 5 a 20 nm e os comprimentos variam de menos de 100 nm a vários centímetros (DE VOLDER *et al.*, 2013) (Figura 2).

Figura 2- Arranjo dos CNTs de acordo com a estrutura das paredes

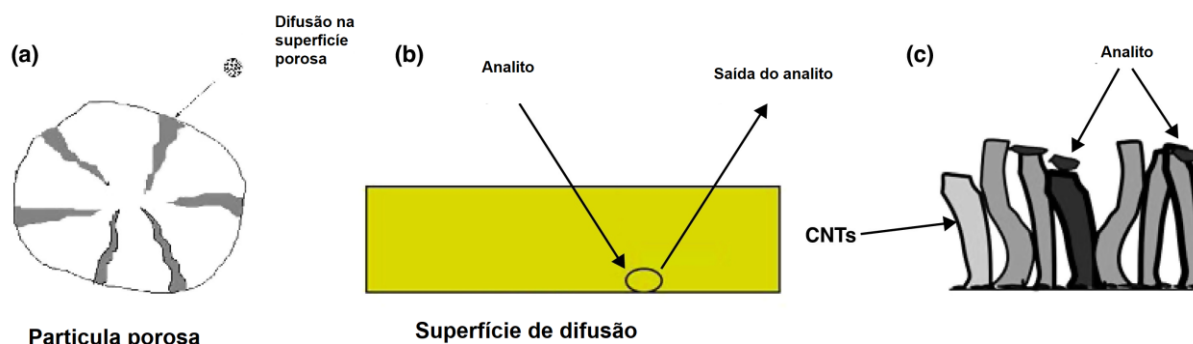


Fonte: ALOTHMAN e WABAIDUR (2019).

Os CNTs podem ser considerados nanomateriais com elevada estabilidade físico-química, térmica e mecânica. Tais propriedades fazem com que este tipo de material venha sendo utilizado em diversas áreas do conhecimento, como: engenharia eletrônica, de materiais e biomédica. Neste cenário, os CNTs tem sido destinado principalmente para produção de sensores, chips e fibras (DE VOLDER *et al.*, 2013; INTRCHOM; MITRA, 2017).

Além disso, a grande área superficial também faz com que os CNTs apresentem grande aplicabilidade na área da química analítica. Ao contrário dos materiais mesoporosos e microporosos, os CNTs não são possuem poros (embora existam espaços intersticiais), e os analitos ficam retido na superfície (Figura 3). Essa característica elimina a difusão e aumenta capacidade sortiva (50-1000 m²/g) (INTRCHOM; MITRA, 2017). Além disso, a capacidade destes materiais de estabelecer interações π - π e de Van der Waals com outras moléculas tornam os CNTs uma excelente alternativa para processos adsortivos, principalmente para análise de compostos orgânicos (TROJANOWICZ, 2006).

Figura 3- Processo adsortivo em diferentes materiais (a) porosos, (b) filmes finos, (c) CNTs



Fonte: INTRCHOM e MITRA (2017).

Deste modo, pode-se afirmar que os CNTs tem se destacado na área do preparo de amostras como fase extratora para SPME (LIU *et al.*, 2007; MA *et al.*, 2011; RIAHI-ZANJANI *et al.*, 2018) e principalmente para SPE (LIU *et al.*, 2004; MA *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2007). Desta maneira, é possível destacar a aplicação dos nanotubos para a pré-concentração de analitos em amostras ambientais (CAI *et al.*, 2005; MA *et al.*, 2016), biológicas (FU *et al.*, 2021; JALILIAN *et al.*, 2018), alimentícias (FANG *et al.*, 2006; FRUGERI *et al.*, 2020) e farmacêuticas (ARANCIBIA *et al.*, 2019; ZHAO *et al.*, 2016).

Além disso, é possível realizar alterações nas superfícies nanométrica dos CNTs, expandindo suas áreas de aplicação. A funcionalização destes materiais tem sido vista como uma forma de explorar seu potencial na nanotecnologia. Os nanotubos funcionalizados podem ter propriedades eletrônicas e mecânicas substancialmente superior aos nanotubos não funcionalizados. Com isso, pode-se dizer que a funcionalização da superfície dos CNTs pode se tornar uma solução para superar algumas características químicas, além de aumentar a compatibilidade com diferentes matrizes (HERRERA-HERRERA *et al.*, 2012; TROJANOWICZ, 2006).

Recentemente, CNTs funcionalizados com materiais de acesso restrito foram utilizados como fases extratoras em amostras biológicas sem pré-preparo da amostra. Estes materiais foram denominados de RACNTs (BALDUINO *et al.*, 2019; BARBOSA *et al.*, 2015; FARIA *et al.*, 2017; LAGO *et al.*, 2020; SANTOS *et al.*, 2017).

1.4 Nanotubos de carbono de acesso restrito

Basicamente, os RACNTs são CNTs que tiveram sua superfície externa modificada com um recobrimento hidrofílico. Esta estratégia tem como principal finalidade combinar a alta

capacidade sortiva dos nanotubos com a habilidade dos materiais RAM de excluir macromoléculas. Dessa maneira, a combinação dessas propriedades fazem dos RACNTs uma excelente alternativa para a extração de ampla gama de analitos em matrizes biológicas, sem pré-preparo da amostra (por exemplo: precipitação de proteínas) (FARIA *et al.*, 2017; GOMES *et al.*, 2016).

Os RACNTs foram introduzidos por BARBOSA *et al.* (2015) para a determinação direta de íons chumbo em soro humano por espectrometria de absorção atômica em chama. A produção dos sorventes foi realizada através do revestimento dos CNTs com uma camada externa de albumina sérica bovina (BSA). A fixação na superfície externa do material foi realizada através do intercruzamento dos grupos amina da BSA utilizando-se glutaraldeído como reagente de ligação cruzada e borohidreto como estabilizador (reduzidor de grupos iminas residuais). Estes RACNTs excluíram 100% das proteínas das amostras de soro humano.

Deste modo, a exclusão de macromoléculas (principalmente proteínas) pelos RACNTs pode ser explicada pela repulsão eletrostática das moléculas das proteínas do plasma. Quando o pH da amostra é superior ao ponto isoelétrico (pI 4,8) da camada de BSA (que reveste os CNTs), as proteínas da amostra e do recobrimento externo do material são ionizadas negativamente, o que acarreta em uma dificuldade de adsorção material/proteína devido a forte repulsão eletrostática.

Após a bem sucedida aplicação dos RACNT para a extração de compostos inorgânicos, SANTOS *et al.* (2017) desenvolveram um método *column switching* utilizando estes sorventes para a extração de anticonvulsivantes (fenobarbital, carbamazepina e primidona) em amostras de plasma humano por UHPLC com detecção por ultravioleta (UV). A síntese do material também foi realizada através do revestimento dos CNTs com BSA. A aplicação dos RACNTs permitiu a análise direta das amostras não tratadas com uma taxa de exclusão de 96% das proteínas. O método forneceu LIDs (limites inferiores de detecção) na ordem de $0,01 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e foi utilizado adequadamente na monitorização terapêutica de pacientes com epilepsia.

Outra estratégia de funcionalização dos CNTs que merece destaque é através da incorporação de nanopartículas de ferro. Estes materiais híbridos recebem o nome de M-CNTs, do inglês, *magnetic carbon nanotubes*. Essa associação resulta em um material com elevada área superficial (proveniente dos CNTs) e alta suscetibilidade magnética (proveniente das nanopartículas de ferro). Além disso, ainda é possível inserir um recobrimento adicional de BSA na superfícies externa destes novos materiais. Essa estratégia tem como finalidade conferir aos M-CNTs propriedades de fases do tipo RAM, similaramente como feito com os

RACNTs. Nesta situação, os materiais passam a ser denominados de M-RACNTs, do inglês, *magnetic restricted-access carbon nanotubes* (BALDUINO *et al.*, 2019; LAGO *et al.*, 2020).

O primeiro trabalho descrevendo os M-RACNTs foi conduzido por BALDUINO *et al.* (2019). Os autores modificaram CNTs comerciais contendo nanopartículas de ferro incorporados com uma camada de BSA quimicamente reticulada (similarmente a síntese dos RACNTs). Em suas primeiras aplicações, os M-RACNTs foram usados como sorventes para a captura de cobre e zinco em metaloenzimas por extração em fase sólida dispersiva (d-SPE). Devido à sua suscetibilidade magnética, os materiais foram facilmente separados da amostra/solvente usando um ímã de neodímio. Neste contexto, o método foi capaz de remover mais de 60% das espécies iônicas enquanto reteve apenas 5% das porções enzimáticas.

Em seguida, LAGO *et al.* (2020) utilizaram os M-RACNTs como sorventes d-SPE para extrair pesticidas organofosforados em amostras comerciais de leite bovino (sem tratamento) seguida de análise por cromatografia gasosa (GC) com detecção por MS/MS. Os sorventes foram capazes de excluir cerca de 100% das proteínas do leite, atestando a eficiência da camada de BSA em evitar a ligação proteica. Além disso, o método apresentou limites de detecção inferiores a 1ppm e foi aplicado na determinação de organofosforados em cinco amostras comerciais de leite integral. Além disso, a aplicação do campo magnético permitiu a retirada de todo material adsorvente do sobrenadante, sem nenhum vestígio.

Capítulo II:

*Nanotubo de carbono de acesso restrito para
microextração por sorvente empacotado para
determinação de antipsicóticos em amostras de
plasma por UHPLC-MS/MS*

1 INTRODUÇÃO

1.1 Esquizofrenia

A esquizofrenia é uma das manifestações psiquiátricas mais importantes da atualidade. Atualmente, mais de 21 milhões de pessoas receberam o diagnóstico da doença (cerca de 0,28% da população mundial) (CHARLSON *et al.*, 2018). O diagnóstico da esquizofrenia baseia-se exclusivamente em sua sintomatologia clínica, uma vez que ainda não existe nenhum teste ou biomarcador para esta doença (JANOUTOVA *et al.*, 2016). Os sinais clínicos podem ser divididos em duas categorias: os sintomas positivos e os negativos. Os primeiros são aqueles que estão diretamente relacionados aos eventos psicóticos, os quais incluem delírios, alucinações e outras distorções da realidade. Os segundos estão relacionados a perda de alguma habilidade mental, incluindo: isolamento social, embotamento ou até mesmo deficiência intelectual (TANDON *et al.*, 2009).

Apesar da etiologia não ser conhecida, existem várias teorias para explicar os mecanismos da esquizofrenia (LISMAN *et al.*, 2008; STAHL, 2018). A teoria dopaminérgica é a mais aceita e fundamenta-se no princípio que os antipsicóticos (tipicamente utilizados no tratamento da doença) alteram os níveis de catecolaminas em determinadas regiões do cérebro (CARLSSON; LINDQVIST, 1963). A teoria se concretizou quando comprovado que a eficácia clínica de antipsicóticos de primeira geração estava diretamente ligada à sua capacidade inibitória aos receptores dopaminérgicos, resultando no que ficou conhecido como hipótese hiperdopaminérgica (CREESE *et al.*, 1976; SEEMAN; LEE, 1975).

Até a metade do século XX, os recursos que se dispunham para tratar pacientes psiquiátricos eram muito limitados. Entretanto, com a descoberta ao acaso da clorpromazina (o primeiro medicamento neuroléptico), grandes avanços no tratamento de pacientes com transtornos mentais foram alcançados. Neste cenário, o uso deste fármaco resultou na melhora clínica (e até mesmo na recuperação social) de muitos pacientes. Após este marco, novos fármacos baseados na estrutura química da clorpromazina foram descobertos ao longo dos anos (BAN, 2007; LOPEZ-MUNOZ *et al.*, 2005).

Deste modo, os antipsicóticos passaram a ser divididos em duas categorias: os antipsicóticos de primeira geração (típicos) e os antipsicóticos de segunda geração (atípicos). Os primeiros (como por exemplo, flufenazina, haloperidol, clotiapina) detinham como propriedade farmacológica comum a forte inibição dos receptores dopaminérgicos D2 (HONS *et al.*, 2012; TANDON *et al.*, 2010; YAMADA *et al.*, 2005). Entretanto, apesar destes

medicamentos apresentarem eficiente melhora dos sintomas positivos da doença, não havia melhora significativa dos sintomas negativos, além de gerar uma série de efeitos extrapiramidais, como o tremor de Parkinson e distonia (HONS *et al.*, 2012; YAMADA *et al.*, 2005).

No início da década de 60, surgiu a clozapina, o primeiro antipsicótico de segunda geração (BENDIKOV *et al.*, 2007). Deste modo, após o descobrimento desta nova classe, acreditava-se que seria possível separar os efeitos terapêuticos dos antipsicóticos de seus efeitos extrapiramidais (KANE; CORRELL, 2010). Desta maneira, após a clozapina, novos antipsicóticos atípicos, como a quetiapina, aripiprazol e olanzapina foram descobertos. Estes novos fármacos tinham suas propriedades farmacodinâmicas baseada na forte inibição dos receptores serotoninérgicos (5-HT₂) e fraca inibição dos receptores dopaminérgicos (D2) (HASHIMOTO *et al.*, 2003; MIYAMOTO *et al.*, 2004).

Na maioria dos casos, a eficácia do tratamento e os efeitos adversos destes medicamentos estão diretamente relacionados à dose administrada. Por consequência, a otimização da farmacoterapia pode estar diretamente relacionada com a concentração plasmática alcançada pelos fármacos, podendo variar amplamente entre os pacientes devido à variabilidade interindividual (HADDAD *et al.*, 2014). Nesse contexto, a monitorização terapêutica de fármacos (TDM) se torna essencial para o gerenciamento da estratégia clínica dos pacientes em uso constante de agentes antipsicóticos. Essa ferramenta constitui um recurso importante para avaliar a adesão à terapia, aumentando a eficiência terapêutica e minimizando o risco de efeitos adversos ou toxicidade. Portanto, métodos bioanalíticos sensíveis e seletivos são necessários para realizar determinações confiáveis (GERLACH *et al.*, 2007; KANG, J. S.; LEE, M. H., 2009). Métodos LC-MS/MS associados a técnicas de preparo de amostra convencionais (LLE, PPT e SPE) têm sido utilizados para a determinação de antipsicóticos em amostras de plasma (Tabela 1).

Tabela 1- Métodos UHPLC-MS/MS associados à técnicas convencionais de preparo de amostras para a determinação de antipsicóticos em amostras de plasma

Analitos	Volume de amostra (µL)	Técnica de prepare de amostra	Coluna analítica (mm x mm; µm)	LIQ (ng.ml⁻¹)	Referência
CLOR; HAL; LEV; OLA; RIS; SUL	500	SPE Oasis HLB	Restek PFP C18 (50 x 2,1; 5)	1,2-13,2	KHELFI, ABDERR EZAK <i>et al.</i> (2018)
CLOR; HAL	200	SPE C ₈ +SCX	Waters BEH C ₁₈ (50 x 2,1; 1,7)	1-100	ZHANG <i>et al.</i> (2018)
OLA	500	LLE dietil-éster:éter isopropílico (1:1 v/v) 5 mL	Agilent C18 (250 x 4,6; 5)	2	ALBAYR AK <i>et al.</i> (2019)
OLA	200	LLE Acetato de etila 1 mL	Agilent Eclipse C18 (100 x 4,6; 5)	0,2	NI <i>et al.</i> (2018)
OLA	95	PPT Metanol 400 µL	Waters BEH C18 (50 x 2,1; 3,5)	0,1	DU <i>et al.</i> (2019)
QUET	50	PPT Acetonitrila 400 µL	Eclipse XDB C18 (150 x 4,6; 5)	10-25	CHEN <i>et al.</i> (2019)
AMI; ARI; CLOR; CLOZ; FLU; HAL; LEV;	2000	SPE Elut NexuS	Waters BEH C18 (100 x 2,1; 1,7)	0,1-10	WONG <i>et al.</i> (2020)

OLA; PAL; PER;
QUET; RIS;
SUL; ZIP

A Tabela 1 continua ...

Continuação da Tabela 1...

Analitos	Volume de amostra (µL)	Técnica de prepare de amostra	Coluna analítica (mm x mm; µm)	LIQ (ng.ml ⁻¹)	Referência
CLORT ; FLU ; PER ; TIO	200	LLE Acetato de etila:éter tert-butil (2:3 v/v) 1 mL	Waters BEH C18 (100 x 2,1; 2,5),	n.i	FAN <i>et al.</i> (2021)
AMI; ARI; CLOR; CLOZ; HAL; LEV; OLA; PAL; QUET; RIS; SUL; ZIP	200	LLE metil-tert-butil eter 800 µL	Zorbax Eclipse C8 (2,1 x 150; 3,5)	n.i	DEGREE F <i>et al.</i> (2021)
PERO	95	PPT Acetonitrila 500 µL	Hypersil GOLD C18 (50 x 2,1; 3)	0,1	DING <i>et al.</i> (2022)

Fonte: do autor.

AMI: amissulprida; ARI: aripiprazol; CLOR: clorpromazina; CLOT: clorprotioxeno; CLOZ: clozapina; FLU: flufenazina; HAL: haloperidol; HLB: balanço hidrofílico-lipofílico; LEV: levomepromazina; LIQ: Limite de quantificação; LLE: extração líquido-líquido; OLA: olanzapine; PAL: paliperidona; PER: perfenazina; PERO: Perospirona; PPT: precipitação de proteínas; QUET: quetiapina; RIS: risperidona; SPE: extração em fase sólida; SUL: sulpirida; TIO: tioridazina; ZIP: ziprasidona.

1.2 Microextração em sorvente empacotado

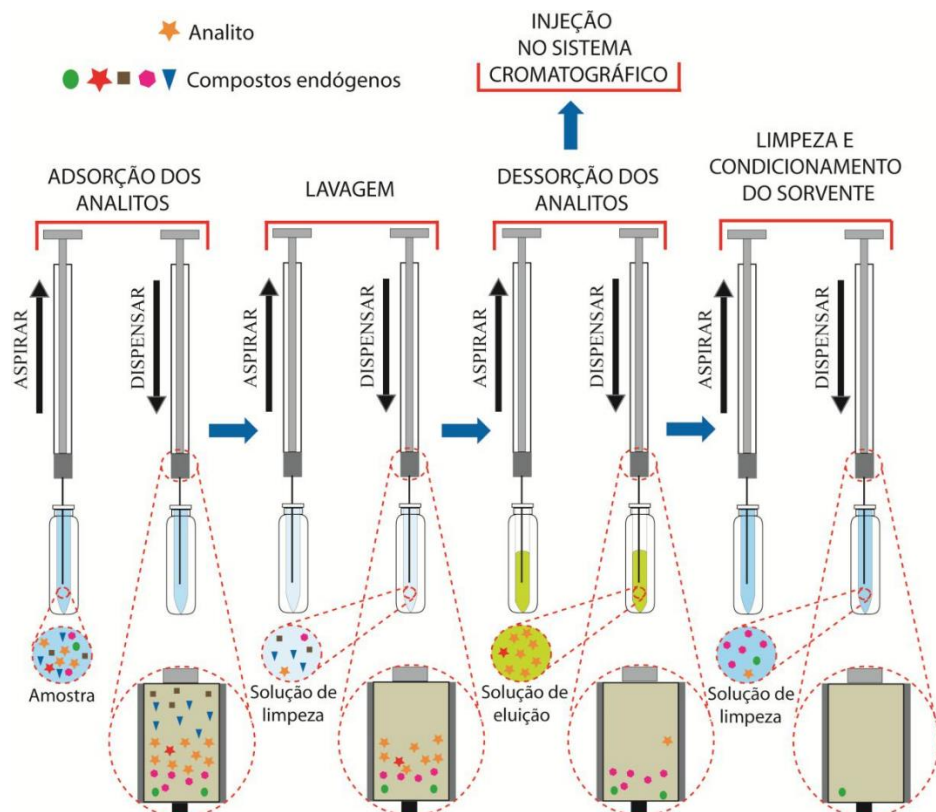
A MEPS pode ser compreendida como uma miniaturização da técnica de SPE. Neste sistema, os volumes da amostra e do solvente orgânico são reduzidos da magnitude de mililitros

para microlitros. Devido à miniaturização do sistema de extração, os analitos sorvidos podem ser eluídos diretamente da fase extrativa para o sistema analítico usando baixos volumes de solvente orgânico ou fase móvel. Portanto, a técnica foi hifenizada com sucesso para LC, GC ou eletroforese capilar (CE). Além disso, a pequena quantidade de fase estacionária e baixo volume de solventes orgânicos utilizados fazem da MEPS um procedimento atrativo e sustentável em relação aos princípios da química analítica verde (MOEIN *et al.*, 2015).

Em razão do pequeno volume de amostra requerido para análises, a MEPS pode ser considerada uma técnica de preparo de amostra muito atrativa para a extração de fármacos em fluidos biológicos. Todavia, em razão da complexidade das matrizes biológicas, a etapa de pré-preparo da amostra (precipitação das proteínas ou diluição da amostra) tem sido requerida para aumentar o tempo de vida útil da fase extratora (QUEIROZ, 2011; YANG, LIU *et al.*, 2017).

Na MEPS, uma microcoluna (~1 cm x 0,2 mm d.i.) recheada, com cerca de 1-4 mg de material sólido é conectada à agulha de uma microsseringa (gas-tight, 100 –250 mL). Basicamente, a amostra utilizada é diluída em solução aquosa ou solução tampão adequada, de forma a reduzir a sua viscosidade. Durante o processo de extração, a amostra é aspirada/dispensada várias vezes pela microsseringa para sorção dos analitos da matriz. Estes ciclos são repetidos várias vezes até que o equilíbrio de partição seja estabelecido entre as fases. Estes ciclos (aspirar/dispensar) podem ser realizados no mesmo frasco ou as frações podem ser aspiradas e dispensadas em um frasco de descarte. Em seguida, a fase extratora é lavada com um solvente fraco para remover interferentes e os analitos são finalmente eluídos com uma pequena quantidade de solvente orgânico adequado (QUEIROZ, 2015; YANG, LIU *et al.*, 2017) (Figura 4).

Figura 4- Etapas da MEPS



Fonte: SOUZA (2016).

Sendo assim, todas as variáveis da técnica incluindo, número de ciclos aspirar/dispensar, pH da amostra e tipo e volume da solução de eluição e limpeza devem ser otimizadas experimentalmente para se garantir níveis aceitáveis de recuperação e eficiência de extração.

A Seleção do solvente também deve ser considerado um parâmetro importante durante o procedimento MEPS. Neste contexto, as propriedades físico-químicas dos analitos devem ser levadas em consideração na escolha do tipo de fase sólida (BLOMBERG, 2009). Atualmente, fases extratoras de várias naturezas químicas estão disponíveis comercialmente, tais como: sílica, C2, C8, C18, trocadores de cátions e ânions forte e fases mista. Todavia, estas fases apresentam como desvantagem baixa seletividade, estreita faixa de pH e a necessidade da utilização de filtros para manter a fase particulada contida na microcoluna (potenciais meios para adsorção de compostos endógenos). Devido a estas limitações, o uso de solventes não comerciais, incluindo MIPs, monolitos e entre outros vem ganhando destaque.(YANG, L. *et al.*, 2017).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal

Desenvolver e validar um método UHPLC-MS/MS utilizando RACNTs como fase extratora para MEPS para determinação de antipsicóticos em amostra de plasma.

2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar RACNTs para serem utilizados como sorvente para MEPS
- Avaliar a habilidade das fases RAM de excluir proteínas.
- Otimizar as condições MEPS para a extração de antipsicóticos em amostras de plasma
- Validar o método MEPS/UHPLC-MS/MS para a determinação de antipsicóticos em amostras de plasma.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido em parceria com o laboratório de fármacos e toxicantes (LATF) da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), através da co-orientação do Prof. Dr. Eduardo Figueiredo. Todos os procedimentos de síntese e de caracterização das fases RACNTs foram realizadas no LATF, enquanto as análises cromatográficas foram realizadas no Laboratório de Cromatografia de Ribeirão Preto, (Departamento de Química USP) coordenado pela Profa. Dra. Maria Eugênia Queiroz Nassur.

3.1 Materiais

Os padrões de clorpromazina (CLOR), clozapina (CLOZ), olanzapina (OLA) e quetiapina (QUET) foram adquiridos da Cerilliant[®] (Round Rock, TX, EUA). A clorpromazina-d3 (CLOR-d3) e a quetiapina-d8 (QUET-d8) foram obtidas da Cerilliant[®] (Round Rock, TX, EUA) e utilizadas como padrões internos (PIs). Os CNTs de paredes múltiplas (diâmetros de 6 nm a 9 nm) foram adquiridos da Sigma-Aldrich[®] (St. Louis, MO, EUA). A BSA, glutaraldeído e borohidreto de sódio utilizados para a obtenção dos RACNTs foram adquiridos da Sigma-Aldrich[®] (St. Louis, MO, EUA). Acetonitrila, etanol (ambos de grau HPLC), acetato de amônio e ácido fórmico foram fornecidos por JT Baker[®] (Phillipsburg, SXM, EUA). A água ultrapura utilizada para preparar a fase móvel foi previamente purificada em sistema Milli-Q[®] (São Paulo, SP, Brasil).

3.2 Revestimento dos RACNTs

Primeiramente, um cartucho de polipropileno (SPE) contendo 500 mg de CNTs comercial foi acoplado a um sistema Manifold à vácuo. Em seguida, 20 mL de uma solução de BSA 10 g.L⁻¹ preparada em tampão fosfato 50 mmol.L⁻¹ (pH = 6,0) foram percolados através do material a uma vazão de 1,0 mL.min⁻¹. Em seguida, 5 mL de uma solução aquosa de glutaraldeído 250 g.L⁻¹ foram percolados pela fase à vazão de aproximadamente 0,2 mL.min⁻¹. Após manter o sistema em repouso por 5 h (tempo necessário para garantir que todo o glutaraldeído reagisse com BSA), 10 mL de solução aquosa de borohidreto de sódio 10 g.L⁻¹ foi percolada através do cartucho à vazão de 0,5 mL.min⁻¹. O material obtido foi lavado exaustivamente com água ultrapura para remover possíveis resíduos do produto e seco à temperatura ambiente por aproximadamente 24 h. Uma massa de 10 mg de RACNTs foi

acondicionada em um tubo cônico de polietileno (1000 μL) usando lã de vidro na extremidade inferior e um filtro de aço (2,4 mm de diâmetro) na parte superior (para evitar a perda do material adsorvente). O filtro foi empurrado em direção ao sorvente até que nenhum espaço vazio permanecesse. O tubo foi devidamente adaptado a uma seringa de vidro (3 mL) para MEPS (Figura 5).

Figura 5- Dispositivo MEPS



Fonte: do autor.

3.3 Amostras de plasma

Amostras de plasma branco e de pacientes esquizofrênicos foram fornecidas pelo Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (Universidade de São Paulo). As amostras de plasma dos pacientes esquizofrênicos foram coletadas de acordo com os critérios estabelecidos pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP, Universidade de São Paulo) e armazenado a -80°C .

Para a fortificação das amostras de plasma, 100 μL de soluções padrão metanólicas dos analitos nas concentrações correspondentes a cada ponto de calibração foram transferidos para um tubo Eppendorf® (1,5 mL). O solvente foi seco sob fluxo de gás N_2 , reconstituído em 100 μL de plasma branco e diluído com 400 μL de solução tampão.

3.4 Otimização do procedimento de extração de MEPS

Para investigar as melhores condições MEPS, 40 μL de soluções padrão metanólicas de todos os antipsicóticos ($1000 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) foram transferidos para um tubo Eppendorf[®] (1,5 mL), secos sob fluxo de gás N_2 e reconstituídos em 100 μL de branco plasma. As amostras enriquecidas foram diluídas com 400 μL de soluções tampão. As seguintes variáveis de extração foram otimizadas univariadamente: pH da amostra, número de ciclos de aspirar/dispensar, tipo de solvente e volume de dessorção. Todos os experimentos foram realizados em triplicata ($n=3$).

3.5 Condições MEPS otimizadas

A amostra de plasma (100 μL) foi diluída com 400 μL de solução tampão de borato de sódio ($10 \text{ mmol}\cdot\text{mL}^{-1}$; pH 9) e os analitos foram extraídos pelo dispositivo MEPS, através de três ciclos aspirar/dispensar. Em seguida, a fase extratora foi lavada com 150 μL de água ultrapura para remover proteínas e outros interferentes. Na etapa de eluição, duas alíquotas de 100 μL de acetonitrila foram aspiradas e dispensadas pelo dispositivo MEPS, para dessorver os analitos. O eluato foi recolhido em um tubo Eppendorf[®] (1,5 mL) e seco sob fluxo de gás N_2 . O resíduo seco foi reconstituído com 50 μL da fase móvel inicial (acetato de amônio 80:20 $5 \text{ mmol L}^{-1} + 0,1\%$ ácido fórmico/Acetonitrila). Finalmente, para a etapa de limpeza e condicionamento, duas alíquotas de acetonitrila (100 μL), seguidas de duas alíquotas de água ultrapura (100 μL) foram percoladas pela fase RACNT, após cada extração. Esta etapa teve como objetivo aumentar a vida útil da fase extratora e diminuir o efeito de *carry over*. A vazão aspirar/dispensar foi de aproximadamente 3 gotas por segundo. A fase RACNT foi armazenada à temperatura ambiente em água ultrapura.

3.6 Teste de exclusão de proteínas

Para realizar o teste de exclusão de proteínas, 100 μL de plasma branco foram diluídos com 400 μL de solução tampão de borato (pH 9). 10 μL do plasma diluído foram injetados diretamente no sistema UHPLC-UV sem qualquer coluna analítica. A área de sinal obtida correspondeu a 100% de compostos endógenos (proteína). A capacidade dos RACNTs para excluir macromoléculas foi avaliada manualmente após os ciclos aspirar/dispensar da amostra de plasma diluída, usando RACNT e CNT como fases extratoras. Os eluatos foram analisados no sistema UHPLC e as áreas dos picos foram comparadas. A fase móvel consistiu em tampão

fosfato $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 7) a uma vazão de $0,4 \text{ mL.min}^{-1}$ com um detector de UV operando a 280 nm. Todos os testes foram realizados em triplicata.

3.7 UHPLC-MS/MS

As análises MEPS/UHPLC-MS/MS foram realizadas em um sistema Waters ACQUITY UPLC H-Class acoplado ao quadrupolo Xevos TQ-D (Waters Corporation, Milford, MA, EUA) equipado com uma fonte Z-spray operando em o modo ESI positivo. As amostras foram mantidas a $10 \text{ }^\circ\text{C}$ e $10 \text{ }\mu\text{L}$ foram injetados no sistema cromatográfico. Os antipsicóticos foram separados em uma coluna XSelecta CSH C18 ($2,5 \text{ }\mu\text{m}$, $2,1 \times 100 \text{ mm}$) a $40 \text{ }^\circ\text{C}$. A fase móvel binária constituída de (A) solução aquosa de acetato de amônio 5 mmol L^{-1} (com 0,1% de ácido fórmico) e (B) acetonitrila a uma taxa de fluxo de $300 \text{ }\mu\text{L min}^{-1}$ foi utilizada com eluição por gradiente de 20% B, aumentando gradativamente até 85% B (0-3 min) que permaneceu nesta condição até 4,5 min. Subsequentemente, o gradiente retornou a 20% B (4,5-6,0 min), seguido por 5 min de reequilíbrio. O tempo total de análise foi de 11 minutos. Os parâmetros da fonte e MS/MS foram determinados automaticamente pelo Programa Intellistart[®] da seguinte forma: tensão capilar: 3,2 kV; temperatura da fonte, 150°C ; temperatura de dessolvatação, 400°C ; fluxo de gás de dessolvatação, 700 Lh^{-1} (N_2 , 99,9% de pureza); e fluxo de gás em cone, 150 Lh^{-1} (N_2 , 99,9% de pureza). Argônio (99,9999% de pureza) foi usado como gás de colisão. Todos os analitos e ISs foram analisados no modo SRM. Os valores de energia do capilar (EC), potencial de *declustering* (DP) e tempo de retenção (t_r) foram obtidos individualmente. O tempo de permanência estabelecido para cada transição foi de 0,048 s. O atraso entre varreduras foi definido para o modo automático. Os dados foram adquiridos por meio do software MassLynx V4.1. A tabela 2 mostra as transições de SRM para cada analito determinado. A transição primária foi usada para quantificação e a transição secundária para confirmação.

Tabela 2- Configurações dos ions, do equipamento e tempo de retenção para os antipsicóticos

Analitos	Ion precursor (m/z)	Ion produto (m/z)	DP (V)	CE (eV)	Ion de confirmação (m/z)	Tr (min)
Clorpromazina	319,0	85,9	18	38	57,9	3,95
Clozapina	327,0	270,0	30	44	122,8	3,24
Olanzapina	313,0	256,0	20	22	84,0	1,4
Quetiapina	384,0	253,0	18	36	221,0	3,32
Clorpromazina d-3	322,0	89,0	42	34	60,9	3,95
Quetiapina d-8	392,0	225,9	48	38	257,8	3,32

Fonte: do autor.

3.8 Validação analítica

A validação analítica foi baseada nas diretrizes internacionais atuais emitidas pela EMA (European Medicines Agency), FDA (Food and Drug Administration) e ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação (LIQ), seletividade, efeito de matriz e efeito residual foram avaliados.

3.8.1 Linearidade

Um pool de amostra de plasma humano (amostra branco) foi enriquecido com clozapina, quetiapina, clorpromazida de 10 a 700 ng mL⁻¹, bem como de 10 a 200 ng mL⁻¹ para olanzapina. O PI quetiapina-d8 e clorpromazida-d3 foram utilizados nas concentrações de 150 e 350 ng mL⁻¹, respectivamente. Cinco curvas analíticas foram traçadas e a razão entre os valores da área do analito e do padrão interno foi plotada como eixo y, e a concentração nominal dos analitos no eixo x. Os calibradores (pontos da curva analítica) e controles de qualidade foram aprovados somente quando o coeficiente de variação (CV) foi inferior ou igual a 15 %, com exceção do LIQ em que o limite aceito foi de 20 %. Além disso, a linearidade foi expressa pelo coeficiente de determinação (R²) calculado a partir das curvas analíticas intra-ensaio.

3.8.2 Exatidão, precisão e limite inferior de quantificação

Os ensaios de exatidão e precisão foram realizados utilizando-se 5 replicatas em 5

diferentes concentrações: limite inferior de quantificação (LIQ), controle de qualidade baixo (CQB), controle de qualidade médio (CQM), controle de qualidade alto (CQA) e limite superior de quantificação (LSQ). As determinações foram realizadas em um mesmo dia (exatidão intraensaios) e em 3 dias consecutivos (exatidão interensaios). Para a exatidão, não foram admitidos nenhum valor de EPR (erro padrão relativo) fora da faixa de $\pm 15\%$, com exceção do LIQ, o qual não se admitiu valores superiores a $\pm 20\%$. Para a precisão, não se admitiu valores de coeficiente de variação (CV%) superiores a 15% (quinze por cento), com exceção para o LIQ, o qual não se admitiu valores maiores que 20% (vinte por cento). O limite inferior de quantificação (LIQ) foi definido como a concentração mais baixa que pode ser medida com precisão e exatidão aceitáveis (dentro de $\pm 20\%$). Os valores obtidos foram determinados pela fórmula a seguir.

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

$$CV = \frac{\text{Desvio Padrão}}{\text{Concentração média experimental}} \times 100$$

3.8.3 Efeito residual

O efeito residual foi avaliado através da comparação dos cromatogramas de plasma branco de referência injetados antes (2 vezes) e após (1 vez) amostras de plasma com concentração correspondente ao LSQ. Os cromatogramas obtidos foram comparados com os obtidos no LIQ. Sinais analíticos nos tempos de retenção dos analitos e dos PI abaixo de 20% e 5% (correspondentes às amostras no LIQ) foram estabelecidos como critérios de aceitação

3.8.4 Seletividade

A seletividade foi realizada comparando os cromatogramas (modo MRM) de uma amostra de plasma humano em branco e uma amostra de plasma humano em branco fortificada com os analitos em concentrações correspondentes ao LLOQ.

3.8.5 Efeito de matriz

Para realizar o ensaio de efeito de matriz (EM), o CV do fator de matriz normalizado (FMN) pelo PI foi calculado usando as áreas de pico dos analitos dissolvidos em água em comparação com o plasma em branco enriquecido com os farmacos (n = 3) em duas concentrações (CQB e CQA). Os resultados obtidos foram comparados e um valor de FMN inferior a 15% foi adotado como critério de aceitação, conforme a fórmula a seguir:

$$\text{FMN} = \frac{\text{Resposta do analito em matriz/Resposta do PI em matriz}}{\text{Resposta do analito em solução/Resposta do PI em solução}} \times 100$$

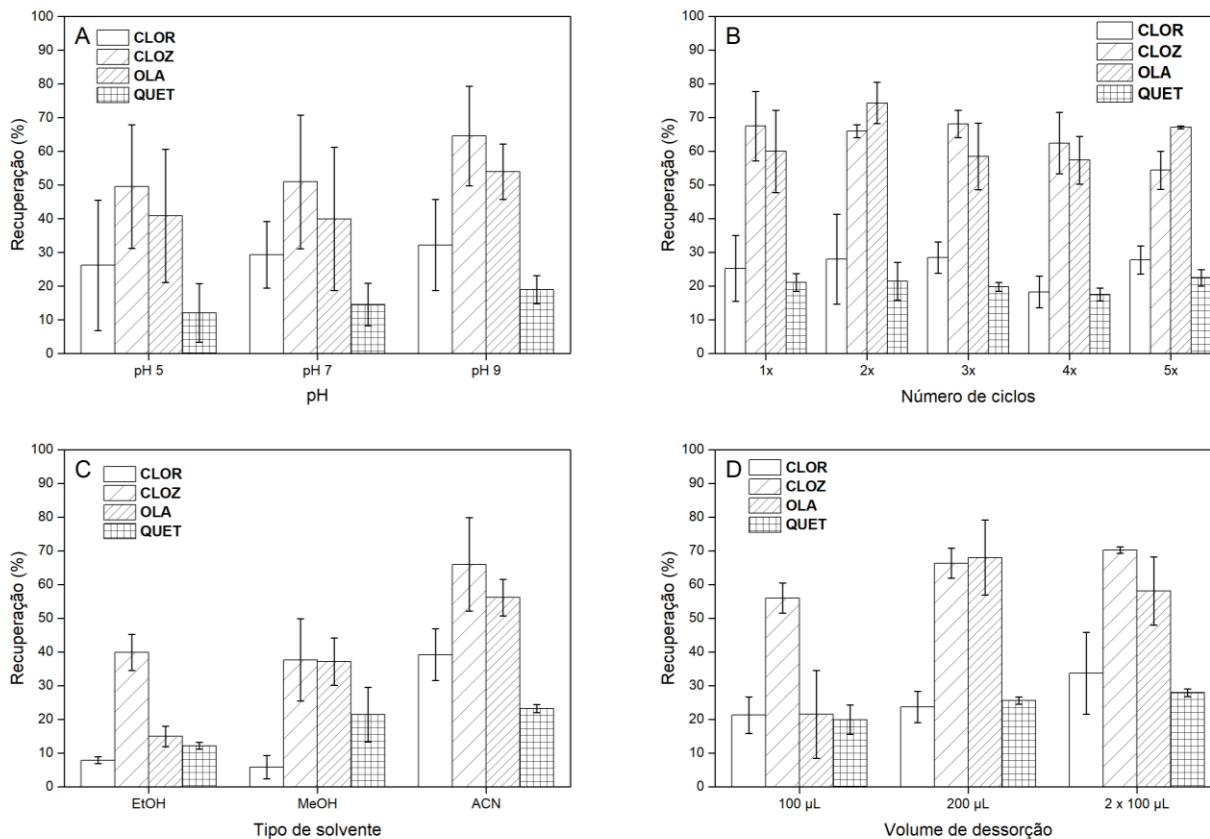
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Otimização do procedimento de extração

4.1.1 Efeito do pH da amostra

O efeito do pH na sorção dos analitos foi investigado através da diluição da amostra de plasma com solução tampão de acetato de amônio (pH 5,0; 10 mM), fosfato de amônio (pH 7,0; 10 mM) e tetraborato de sódio (pH 9,0; 10 mM). Condições extremas de pH não foram avaliadas com o objetivo de evitar a precipitação de proteínas. Dentre as condições avaliadas, o tampão borato em pH 9 alcançou a maior recuperação (Figura 6A). Nesse cenário, a maioria dos antipsicóticos (valores de pKa de 7,24 a 9,3) estavam parcialmente ou totalmente em suas formas não-iônicas. Essa condição favorece as fracas forças intermoleculares entre os analitos e a superfície hidrofóbica interna do o RACNT. Essa etapa de diluição também foi essencial para diminuir a viscosidade da matriz, aumentando a transferência de massas.

Figura 6- Otimização dos parâmetros MEPS: (a) pH; (b) Número de ciclos; (c) Tipo de solvente; (d) Volume de dessorção



Fonte: do autor.

4.1.2 Número de ciclos de extração e ejeção

Neste ensaio, os ciclos aspirar/dispensar foram realizados no mesmo frasco para a obtenção do equilíbrio de sorção. A recuperação dos antipsicóticos não apresentou diferença significativa variando o número de ciclos de 1 a 5 (Figura 6B). Esses resultados atestaram a alta capacidade adsorptiva dos nanotubos de carbono. Esses dados corroboram dados da literatura que demonstram que os CNTs são capazes de interagir rapidamente com compostos orgânicos por forças de Van der Waals devido sua alta área superficial. Portanto, 3 ciclos de extração-ejeção foram escolhidos para garantir extrações reproduzíveis visando baixos valores de EPR.

4.1.3 Natureza e volume do eluente

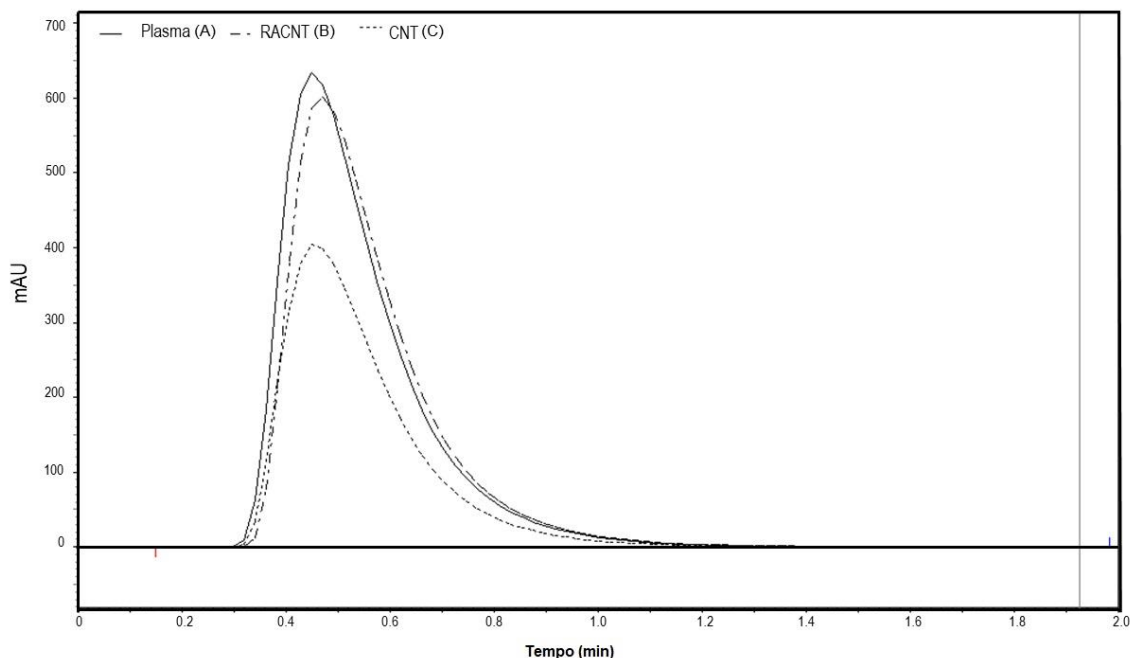
A otimização das condições de dessorção foi realizada visando garantir a eluição completa dos analitos com o mínimo consumo de solvente. Neste contexto, acetonitrila, metanol e etanol foram avaliados como solventes de eluição (Figura 6C). Além disso, os volumes de 100 μL , 200 μL e 2x 100 μL foram avaliados. Como resultados, duas alíquotas de 100 μL de acetonitrila proporcionaram o maior valor de recuperação, provavelmente devido ao caráter hidrofóbico e baixa viscosidade deste solvente (Figura 6D).

4.2 Teste de exclusão de proteínas

O pH da amostra pode afetar diretamente a sorção dos analitos no sorvente, bem como interferir na capacidade do material de excluir macromoléculas. Quando uma amostra biológica é percolada através de um sorvente RACNT em um pH superior ao ponto isoelétrico das proteínas da amostra e da camada BSA, todas as proteínas são carregadas negativamente. Neste caso, as macromoléculas são excluídas por repulsão eletrostática, enquanto compostos de baixa massa molar interagem com o núcleo dos CNTs.

Sendo assim, os RACNTs e CNTs foram comparados de acordo com sua capacidade de excluir proteínas, conforme mostrado na Figura 7. Quando a amostra de plasma diluído em branco foi extraída usando o RACNTs como sorvente, a área de pico obtida do sobrenadante foi praticamente igual à obtida pela injeção direta do plasma branco no sistema HPLC-UV ($\lambda = 280 \text{ nm}$), atestando a alta capacidade do RACNT em excluir proteínas (cerca de 97%). Por outro lado, quando os CNTs comerciais foram utilizados como fase estacionária, o pico da proteína também foi consideravelmente menor quando comparado à injeção direta de plasma. Neste caso, cerca de 50% das proteínas ficaram retidas no sorvente (CNTs).

Figura 7- Sinais analíticos obtidos a partir da injeção direta de 100 μ L de plasma diluído com 400 μ L de tampão borato (pH 9) a 280 nm (A), após o procedimento de extração com RACNT (B) e com CNT convencional (C). A—área de pico, 9.196.219; B—área de pico, 8.926.7



Fonte: do autor.

4.3 Validação Analítica

O método foi linear para todos os antipsicóticos do LIQ (10 ng.mL⁻¹) ao LSQ (200 - 700 ng.mL⁻¹). Os coeficientes de determinação (R²) foram superiores a 0,99 (Tabela 3). Todos os intervalos analíticos propostos neste método foram condizentes com os intervalos terapêuticos.

Tabela 3- Faixas lineares, coeficientes de determinação, LIQ e padrões internos para os antipsicóticos

Analitos	Faixa linear (ng.mL⁻¹)	R²	LIQ (ng.m L⁻¹)	Equação linear	Padrão interno
Clorproma zina	10-700	0,9944	10	y = 0,0128x - 0,0405	Clorpromazina d-3
Clozapina	10-700	0,9946	10	y = 0,0067x + 0,0649	Quetiapina d-8
Olanzapina	10-200	0,9918	10	y = 0,0058x - 0,0374	Quetiapina d-8
Quetiapina	10-700	0,9937	10	y = 0,0078x - 0,0214	Quetiapina d-8

Fonte: do autor.

O método apresentou precisão e exatidão intra e inter-ensaios de forma adequada. Esses dados foram avaliados no controle qualidade baixa, média e alta. A precisão resultou em valores de EPR que variaram de -5,86% a 5,79% (precisão intra-ensaio) e -8,01 a 11,53% (precisão inter-ensaio). A precisão foi expressa em valores de CV que variaram de 2,98 a 11,71% (precisão intra-ensaio) e 4,29% a 12,85% (precisão inter-ensaio). Esses dados são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4- Exatidão e precisão para o método para as amostras de plasma com os fármacos em diferentes concentrações (n=5)

Analitos	Quantidade adicionada (ng.mL⁻¹)	Exatidão intra-ensaio (EPR%)	Exatidão inter-ensaio (EPR%)	Precisão intra-ensaio (CV%)	Precisão inter-ensaio (CV%)
Clorpromazina	25	3,82	-0,21	11,41	10,1
	400	1,85	-0,28	2,98	10,5
	600	3,37	-0,67	6,5	4,92
Clozapina	25	5,79	11,53	4,09	7,81
	400	2,49	3,53	4,8	8,71
	600	2,71	4,69	5,74	7,33
Quetiapina	25	-5,86	-0,21	10,45	10,15
	500	1,41	-0,28	2,98	10,49
	600	0,95	-0,67	7,66	4,92
Olanzapina	25	-1,75	-8,01	6,26	9,36
	125	2,79	-0,93	11,71	11,44
	175	-2,94	-5,04	7,8	12,85

Fonte: do autor.

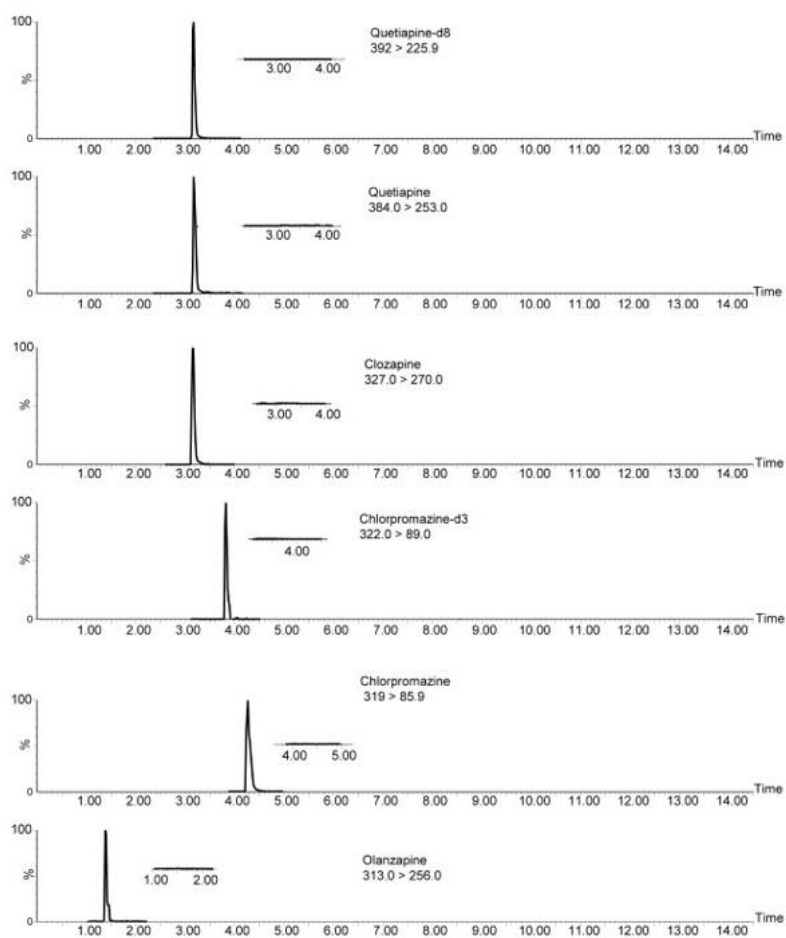
Os resultados do efeito de matriz demonstraram que não houve supressão iônica significativa. Os valores dos CVs do FMN para todos os fármacos não foram superiores a 15% (Tabela 5). Além disso, nenhum efeito residual significativo foi observado ao injetar uma amostra branco imediatamente após a análise da amostra ULOQ. Sinais inferiores a 20% para os analitos e não superiores a 5% no caso do PI foram obtidos ao comparar os cromatogramas branco e os cromatogramas no LIQ (Figura 8).

Tabela 5- Fator de matriz normalizada (%CV) dos antipsicóticos adicionados em amostras de plasma no CQB e CQA

Analitos	FMN CQB (%CV)	FNN CQA (%CV)
Chlorpromazina	9,85	9,87
Clozapina	7,35	5,61
Olanzapina	14,33	11,34
Quetiapina	5,13	12,81

Fonte: do autor.

Figura 8- Cromatogramas MEPS/LC–MS/MS de uma amostra de plasma sem antipsicóticos e uma amostra de plasma enriquecida com os antipsicóticos na concentração do LIQ



Fonte: do autor

4.4 Comparação com outras metodologias

Comparado a outras técnicas miniaturizadas, o método reduziu o consumo de solvente orgânico, o tempo de análise e o volume da amostra. Além disso, a estabilidade química da fase extratora permitiu sua reutilização mais de 120 vezes sem perda significativa da eficiência da extração (Tabela 6).

Tabela 6- Comparação do método MEPS-UHPLC-MS/MS proposto com outros métodos para a determinação de antipsicóticos em amostras biológicas

Analitos	matriz	VOLUME amostra (µL)	Preparo de amostra	Técnica analítica	LIQ (ng.mL ⁻¹)	Ref
CLOZ QUET	plasma	200	d-SPE	HPLC-UV	54 50	LI <i>et al.</i> (2016)
CLOR CLOZ OLA QUET	plasma	500	SPE	GC- MS/MS	5 5 2 5	ROSADO <i>et al.</i> (2018)
CLOR OLA	plasma	500	SPE (Oasis HLB)	HPLC- MS/MS	13,2 2,9	KHELFI, A. <i>et al.</i> (2018)
CLOR CLOZ OLA QUET	plasma	300	In-tube SPME (monolith)	HPLC- MS/MS	10 10 10 10	BELOTI <i>et al.</i> (2019)
CLOR CLOZ OLA QUET	Plasma	250	MEPS	GC- MS/MS	100 100 200 100	FONSEC A <i>et al.</i> (2013)
CLOR CLOZ OLA QUET	Urina	500	MEPS (C18)	HPLC-UV	10 10 10 10	GONÇAL VES <i>et al.</i> (2015)
CLOR CLOZ OLA QUET	Plasma	100	MEPS	HPLC- MS/MS	10 10 10 10	Este trabalho

Fonte: do autor.

4.4 Aplicação clínica para análise de amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos

O método proposto foi avaliado para a determinação de antipsicóticos em amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos em terapia (Tabela 7). As concentrações plasmáticas determinadas variaram de níveis terapêuticos a tóxicos. Essa variação pode ser explicada por diferenças na capacidade dos pacientes de absorver, distribuir, metabolizar e excretar o composto ativo devido à variabilidade interindividual (doença pré-existente, idade, sexo ou medicação concomitante). Portanto, a TDM é uma ferramenta importante para melhorar a resposta terapêutica, o ajuste de dosagens e avaliar a adesão do paciente ao tratamento.

Tabela 7 - Concentrações dos antipsicóticos em amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos.

Os valores inferiores ao LIQ foram omitidos

Analitos	Faixa Terapêutica (ng.mL ⁻¹)	Concentração plasmática (ng.mL ⁻¹)										
		P 1	P 2	P 3	P 4	P 5	P 6	P 7	P 8	P 9	P 10	P 11
Clorpromazina	30-300	-	-	-	150,1	-	-	317,4	-	-	-	-
Clozapina	350-600	-	449,9	445,9	-	-	465,2	-	-	-	-	275,5
Olanzapina	20-80	-	-	-	-	34,4	-	-	90,9	-	125	-
Quetiapina	100-500	381,6	-	-	-	-	-	-	-	615,6	-	-

Fonte: do autor.

5 CONCLUSÕES

A fase extratora RACNTs foi aplicada com sucesso pela primeira vez em uma extração *offline* como sorvente MEPS. O método desenvolvido alcançou sensibilidade adequada para a determinação antipsicóticos em volume reduzido de amostras de plasma (100 µL) em níveis subterapêuticos. O método MEPS-LC-MS/MS permitiu a análise direta do plasma humano (sem a etapa de precipitação de proteínas) com a exclusão de cerca de 97% das proteínas e outros componentes endógenos. Os parâmetros de validação avaliados estão de acordo com as diretrizes da EMA e FDA. Por fim, o presente método contribuiu para a prospecção dos RACNTs como fase extratora para a MEPS e apresentou linearidade adequada para a determinação da concentração plasmática de antipsicóticos em amostras de plasma de pacientes esquizofrênicos.

Capítulo III:

Revestimento magnético do dispositivo de microextração em fase sólida com nanotubos de carbono de acesso restrito (com nanopartículas de Fe_2O_3 incorporadas) para a determinação de canabinóides em amostras de plasma por UHPLC-MS/MS

1 INTRODUÇÃO

1.1 Canabinóides

A *cannabis sativa*, popularmente conhecida no Brasil como “maconha”, é uma planta reconhecida por conter mais de 500 compostos farmacologicamente ativos (ELSOHLY; SLADE, 2005). Entre estes, estão os terpenos, fenóis e, principalmente, os canabinóides (AIZPURUA-OLAIZOLA *et al.*, 2016). A maioria das propriedades farmacológicas relacionadas aos canabinóides em humanos dependem de suas interações com o sistema endocanabinóide (SEC). O SEC é caracterizada por receptores específicos (CB1 e CB2) (HERKENHAM *et al.*, 1991) e seus ligantes endógenos, anandamida e 2-araquidonilglicerol (2-AG) (DEVANE *et al.*, 1992; MECHOULAM *et al.*, 1995).

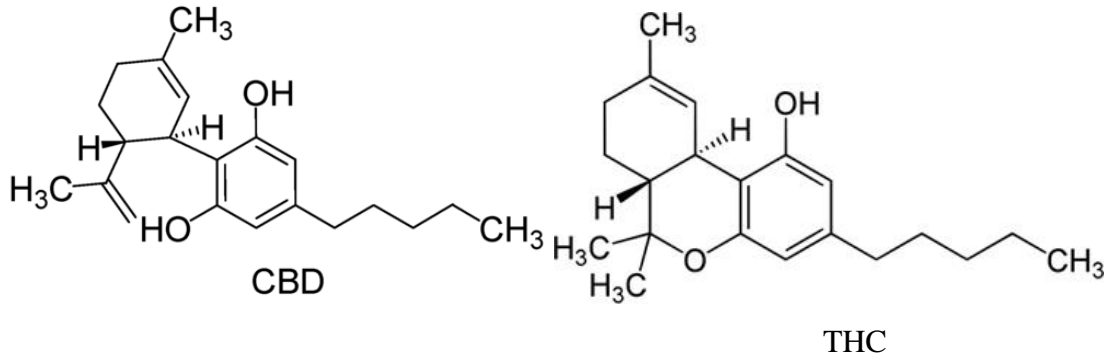
Após a descoberta do SEC (HERKENHAM *et al.*, 1991), os fitocanabinóides presentes na planta *Cannabis sativa* (especialmente CBD e THC) têm sido reconhecidos como potenciais alvos terapêuticos para diversas doenças (MAURYA; VELMURUGAN, 2018).

O Tetrahydrocannabinol (THC) é o principal canabinóide psicotrópico (HOWLETT *et al.*, 2002) e componente natural da *Cannabis*. Devido sua ação direta no SEC, o THC tem sido utilizado como alternativa no tratamento de algumas patologias, como: a anorexia proveniente de HIV e a náusea resultante de quimioterapia (BADOWSKI, 2017). Nestes casos, o THC utilizado é de origem sintética, produzido na forma de medicamento oral, chamado de Nabilona.

O Canabidiol (CBD) também está entre os principais componentes da *Cannabis*. O mecanismo de ação exato pelo qual o CBD exerce suas atividades no organismo ainda é desconhecido. Todavia, sabe-se que CBD tem relativamente pouca afinidade pelos sítios ortostáticos dos receptores canabinóides e pode inibir a ligação do THC aos receptores CB1 por meio de outros mecanismos. Mesmo assim, o CBD possui maior número de aplicações na área clínica, pois não apresenta as propriedades psicoativas do THC (GROTENHERMEN, 2003) (Figura 9). Neste contexto, o CBD têm sido avaliado como agente terapêutico em modelos pré-clínicos de doenças do sistema nervoso central, incluindo ansiedade (BLESSING *et al.*, 2015), esquizofrenia (DEIANA, 2013), doença de Parkinson (CHAGAS *et al.*, 2014). No entanto, sua

principal aplicação é para o tratamento de epilepsia refratária, que ocorre principalmente em crianças (SEKAR; PACK, 2019).

Figura 9- Estrutura química do CBD e do THC



Fonte: do autor.

A TDM desses canabinóides é essencial para aumentar a eficiência terapêutica e minimizar o risco de efeitos adversos (GHERZI *et al.*, 2020; KANG, JU SEOP; LEE, MIN HO, 2009). Nesse cenário, a técnica UHPLC-MS/MS têm sido aplicada como técnica analítica de referência para determinar canabinóides e seus metabólitos para fins de TDM (CITTI *et al.*, 2018; ZNALEZIONA *et al.*, 2015). A maioria dos métodos relatados para determinação desses fármacos em fluidos biológicos utiliza técnicas convencionais de preparo de amostras, como SPE (JAMEY *et al.*, 2008; SIMÕES *et al.*, 2011) e LLE (ANDREWS; PATERSON, 2012; KNEISEL; AUWÄRTER, 2012). No entanto, esses procedimentos foram recentemente substituídos por técnicas de microextração, como a SPME (MUSTEATA; PAWLISZYN, 2007; NOVÁKOVÁ; VLČKOVÁ, 2009). Métodos cromatográficos (GC-MS e LC-MS/MS) associados à técnicas de preparo de amostras convencionais têm sido empregados nas determinações de canabinóides e seus metabólitos em amostras biológicas (Tabela 8).

Tabela 8- Métodos cromatográficos associados à técnicas de preparo de amostras convencionais têm sido empregados nas determinações de canabinóides e seus metabólitos em amostras biológicas

Analitos	Amostra (volume)	Técnica de preparo de amostra	Técnica de separação	LIQ	Referência
CBD THC e metabólitos	Plasma (1 mL)	LLE Hexano/acetato de etila (9:1, v/v) (3 mL)	GC- MS/MS	0,1 -0,5 ng.mL ⁻¹	ANDRENYAK <i>et al.</i> (2017)
CBD CBN THC e metabólitos	Mecônio (250 mg)	SPE Oasis MCX Waters	LC- MS/MS	4 ng.g ⁻¹	PREGO- MELEIRO <i>et al.</i> (2017)
THC e metabólitos	Urina (1 mL)	LLE Hexano (2 mL)	GC- MS/MS	1,3 -2,6 ng.mL ⁻¹	STEFANELLI <i>et al.</i> (2018)
CBD CBN THC e metabólito	Cabelo	LLE 4 mL hexano/acetate de etila (9:1, v/v)	GC- MS/MS	0,1 - 4,7 ng.mL ⁻¹	ANGELI <i>et al.</i> (2018)
CBD CBG CBN THC e metabólitos	Plasma (200 µL)	PPT Acetonitrila: NH ₄ OH (98:2, v/v) (600 µL)	LC- MS/MS	0,5-50 ng.mL ⁻¹	ROSLAWSKI <i>et al.</i> (2019)
CBD CBG CBN	Saliva (1 mL)	SPE Oasis Prime HLB	LC- MS/MS	0,4–1 ng.mL ⁻¹ ¹	SOBOLESKY <i>et al.</i> (2019)

THC THCV e metabólitos

A tabela 8 continua ...

Continuação da tabela 8 ...

Analitos	Amostra (volume)	Técnica de prepare de amostra	Técnica de separação	LIQ	Referência
CBD CBN THC 1 metabólito	Saliva (100 µL)	PPT Acetonitrila (100 µL)	LC- MS/MS	100 ng.mL ⁻¹	CALÒ <i>et al.</i> (2020)
CBD CBN THC 2 metabólitos	Plasma (500 µL)	LLE Hexano/ acetato de etila (8: 2 v/v) (5 mL)	LC/MS- MS	0,2 ng.mL ⁻¹	MOHAMED <i>et al.</i> (2021)
CBD THC 6 metabólitos	Cabelo (20 mg)	LLE Diclorometano (0,5 mL)	LC- MS/MS	0,35-2,87 ng.mg ⁻¹	LO FARO <i>et al.</i> (2022)
THC 1 metabólito	Sangue (500 µL)	SPE Styre Screen®	LC- MS/MS	1 ng.mL ⁻¹	REBER <i>et al.</i> (2022)

Fonte: do autor.

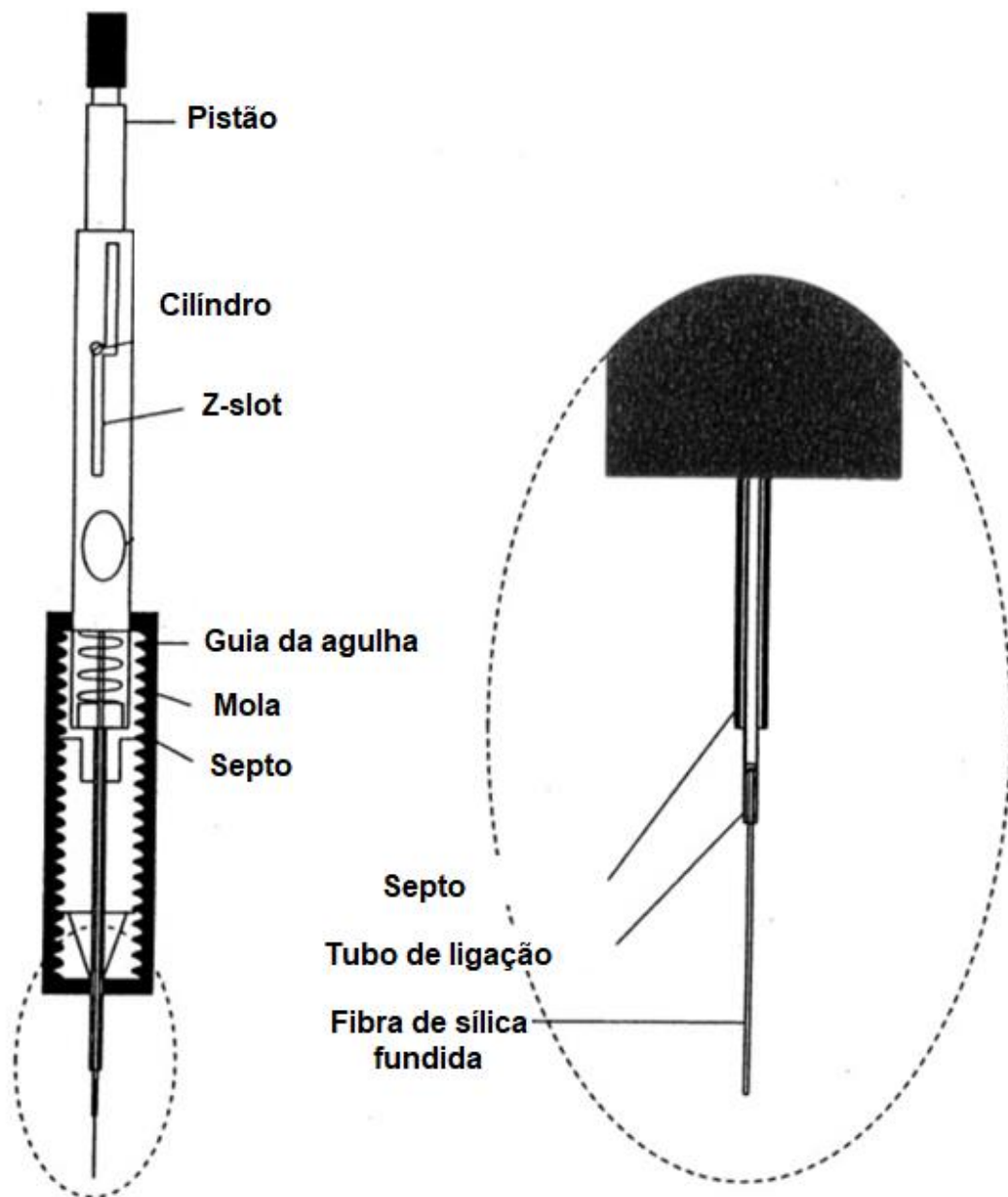
CBD: Canabidiol; CBG: Canabigerol; Extração em Fase Sólida; LIQ: Limite de quantificação; LLE: SPE: Extração líquido-líquido; PPT: Precipitação de proteínas; THC: Tetrahydrocannabinol; THCV: tetrahydrocannabivarina.

1.2 Microextração em fase sólida

A SPME, técnica de preparo de amostra introduzida por ARTHUR e PAWLISZYN (1990), integra, em um único dispositivo as etapas de amostragem, extração e injeção da amostra em sistemas cromatográficos. O processo de extração por SPME ocorre em uma fina camada de fase

extratora (7 a 100 μm de espessura) que reveste a superfície externa de uma fibra de sílica fundida (10 mm de comprimento e 110 a 160 μm de diâmetro). O dispositivo SPME consiste em uma microseringa com uma agulha de aço inoxidável contendo a fibra de sílica fundida. Com o movimento do êmbulo da microseringa, a fibra é exposta ou retraída para o interior da agulha (QUEIROZ, 2009) (Figura 10).

Figura 10- Dispositivo commercial para SPME da marca Supelco®

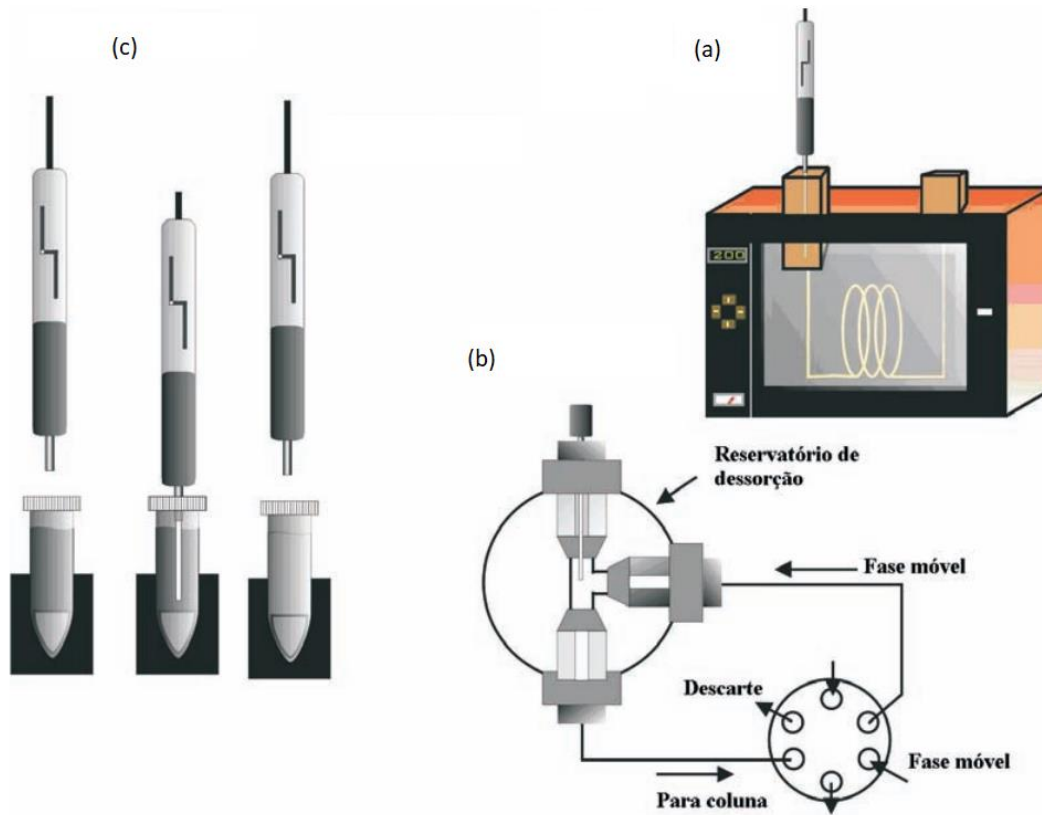


Fonte: Kataoka *et al* (2000).

Durante a etapa de extração, o septo de um frasco vedado (com tampa e septo) contendo a amostra é perfurado pela agulha do dispositivo SPME (fibra recolhida). A fibra, através do movimento do êmbolo do dispositivo SPME, é exposta à amostra no modo direto (inserção direta na amostra aquosa) ou indireto (exposição da fibra no headspace do frasco). A seleção do modo de extração tem sido baseada na composição da amostra e na volatilidade dos analitos. A extração é realizada sob agitação à temperatura constante até que o equilíbrio de partição seja estabelecido.

A etapa de dessorção irá depender da natureza química dos analitos e do modo de extração empregado. Para compostos voláteis ou semivoláteis analisados por cromatografia gasosa (SPME-CG), a agulha do dispositivo SPME é inserida diretamente no septo do injetor e com o movimento de septo a fibra é exposta no liner para a dessorção térmica dos analitos (Figura 11a). Para compostos não voláteis analisados por cromatografia líquida, a etapa de dessorção pode ocorrer em uma interface SPME-LC em forma de um T (Figura 11b). Nessa configuração, a fibra é inserida em uma extremidade e as demais são conectadas à válvula de seis pórticos do sistema cromatográfico. A dessorção de analitos não voláteis também pode ser realizada no modo *off-line*, no qual a fibra SPME é inserida em vials cônicos contendo um pequeno volume de solvente (fase móvel ou solvente orgânico), geralmente sob agitação e controle de temperatura (Figura 11c).

Figura 11- (a) Dessorção térmica dos solutos extraídos para análises GC. (b) Dessorção em fase líquida na interface LC. (c) Dessorção *offline*



Fonte: Queiroz (2009).

A SPME é uma técnica não exaustiva, baseada no equilíbrio de partição dos analitos entre uma matriz líquida/gasosa (*headspace*) e uma fase extratora sólida. Sendo assim, a quantidade de analito extraído está relacionada a distribuição de massas do soluto nas fases do sistema, que deverá permanecer constante durante a extração. Para as extrações realizadas no modo direto (inserção da fibra na amostra aquosa), podemos considerar as seguintes equações:(PAWLISZYN, 2011).

Para sistema binário:

$$C_0 V_s = C_f^\infty V_f + C_s^\infty V_s \quad \wedge \quad K_{fs} = \frac{C_f^\infty}{C_s^\infty} \quad \therefore \quad C_f^\infty = C_0 \frac{K_{fs} V_s}{K_{fs} V_f + V_s} \quad \therefore$$

$$n = C_f^\infty V_f = C_0 \frac{K_{fs} V_s V_f}{K_{fs} V_f + V_s} \Leftrightarrow V_s \gg K_{fs} V_f \therefore n = C_0 K_{fs} V_f$$

Para sistemas com três fases:

$$C_0 V_s = C_f^\infty V_f + C_s^\infty V_s + C_h^\infty V_h \quad n = \frac{K_{fh} K_{hs} V_f V_s C_0}{K_{fh} K_{hs} V_f + K_{hs} V_h V_s}$$

C_0 = Concentração de soluto na amostra

K_{fh} = partição do soluto entre as fases extratora/gasosa

K_{fs} = partição do soluto entre as fases extratora/aquosa

K_{hs} = partição do soluto entre as fases gasosa/aquosa

$V_f; V_h; V_s$ = volumes das fases extratora; headspace e amostra

$C_f; C_h; C_s$ = volumes das fases extratora; headspace e amostra

n = número de mols do analito

Neste sistema, a concentração do analito na fibra aumenta rapidamente no início da extração e depois vai aumentando lentamente até que o equilíbrio seja alcançado. Esse período é inversamente proporcional ao coeficiente de difusão do analito no revestimento e proporcional ao quadrado da espessura da fase estacionária. Portanto, quanto mais espessa a fase estacionária, mais analito será adsorvido na fibra, embora o tempo de equilíbrio seja maior. Quando as condições de equilíbrio são atingidas, a quantidade de analitos extraída é constante e independe do aumento do tempo de extração (PROSEN; ZUPANČIČ-KRALJ, 1999).

Embora a SPME tenha sido desenvolvida inicialmente com fibras de sílica fundida, vários outros tipos de fibras, tais como aço inoxidável, nitinol e entre outros têm sido avaliados com diferentes fases extratoras. Além disso, algumas variações da técnica original, através do uso de membranas/discos e capilares (*in-tube SPME*) têm sido empregadas. Essas abordagens podem melhorar limitações associados as fibras SPME convencionais, como instabilidade mecânica e resistência a solventes orgânicos (LORD; PAWLISZYN, 2000).

Comparado aos métodos convencionais de preparo de amostras, a SPME pode ser considerada um procedimento mais rápido, simples e sem solvente orgânico ou com volume reduzido de solvente e de amostra. Sendo assim, esta técnica têm sido aplicada com eficiência para extrair uma ampla gama de substâncias (principalmente substâncias orgânicas voláteis e semivoláteis) de diferentes tipos de amostras, incluindo: ambientais, biológicas e de alimentos (BOJKO *et al.*, 2012; PAWLISZYN, 2011).

A seletividade da fase extratora SPME desempenha um papel significativo no processo de extração, uma vez que a eficiência da técnica depende da constante de distribuição entre os analitos e a fase extrativa. Neste contexto, muitas fases comerciais, incluindo: polidimetilsiloxano,

divinilbenzeno, carboxeno e suas combinações estão disponíveis para uso em SPME. No entanto, quando o efeito da matriz é significativo, os revestimentos comerciais podem não ser viáveis ou eficientes. Portanto, a seleção de um sorvente adequado é fundamental para obter métodos seletivos e de alta sensibilidade analítica (LASHGARI; YAMINI, 2019).

O desenvolvimento de fases extratoras mais seletivas, geralmente *labmade*, para a determinação de analitos específicos em amostras complexas tem sido o grande desafio da maioria dos estudos envolvendo SPME. (LASHGARI; YAMINI, 2019). Dentre estas fases inovadoras, podemos destacar os MIPs (ABRÃO; FIGUEIREDO, 2019; SARAFRAZ-YAZDI; RAZAVI, 2015), líquidos iônicos (HO *et al.*, 2011; YU *et al.*, 2013), e principalmente, os CNTs (LI *et al.*, 2021; SONG *et al.*, 2018).

1.3 Técnicas de revestimento do dispositivo SPME com nanotubos de carbono

Os nanomateriais, comparados às fases extratoras convencionais para SPME, apresentam uma relação área-volume significativamente maior, o que resulta em extrações mais eficientes. Adicionalmente, a estabilidade térmica, alta resistência mecânica (estrutura robusta) e grande área superficial proporcionam aos CNTs excelentes propriedades para serem utilizados como fase extratora em SPME. No entanto, devido à rigidez, inércia química e as fortes interações π - π , os CNTs puros não podem ser diretamente utilizados nos dispositivos SPME. Tal fato se deve a dificuldade de dissolver ou dispersar estes materiais em solventes orgânicos comuns ou matrizes poliméricas. Sendo assim, os CNTs devem ser modificados para possibilitar sua incorporação nas fibras SPME (GHAEMI *et al.*, 2014; SONG *et al.*, 2017). Neste contexto, quatro procedimentos (deposição física, processo sol-gel, ligação química e eletrodeposição) têm sido utilizados para o revestimento dos dispositivos SPME com os CNTs (GHAEMI *et al.*, 2014).

1.3.1 Deposição física

O processo de revestimento por deposição física é considerado o método mais simples para o revestimento de fibras SPME com nanomateriais. A deposição física é realizada mergulhando-se o suporte da fibra em uma suspensão na qual os nanomateriais estão dispersos em um solvente ou ligante orgânico. O procedimento é comumente repetido várias vezes até a obtenção da espessura

desejada. Assim, a fase extratora fica depositada na fibra, quando o solvente é evaporado por secagem (AZIZ-ZANJANI; MEHDINIA, 2014; GHAEMI *et al.*, 2014). WANG *et al.* (2006) foram os primeiros a incorporar CNTs em fibras SPME pelo método de deposição física. O recobrimento foi feito através da suspensão de MWCNT em n-dimetilformamida e o procedimento foi repetido para atingir espessura de aproximadamente 40 μm .

Além desse processo, o uso de substâncias adesivas, como as colas epóxi (LIU *et al.*, 2007) e borrachas de silicone (WU *et al.*, 2010) também vem sendo frequentemente utilizadas. Neste procedimento, a cola atua como agente fixador do material ao suporte SPME. Uma das principais vantagens dessa metodologia é que diferentes fases extratoras com funcionalidades específicas podem ser facilmente incorporadas no suporte de fibra. No entanto, a ausência de ligações químicas entre o suporte SPME e o revestimento resulta em fibras com baixa estabilidade térmica e menor resistência a solventes orgânicos (AZIZ-ZANJANI; MEHDINIA, 2014; GHAEMI *et al.*, 2014).

1.3.2 Processo sol-gel

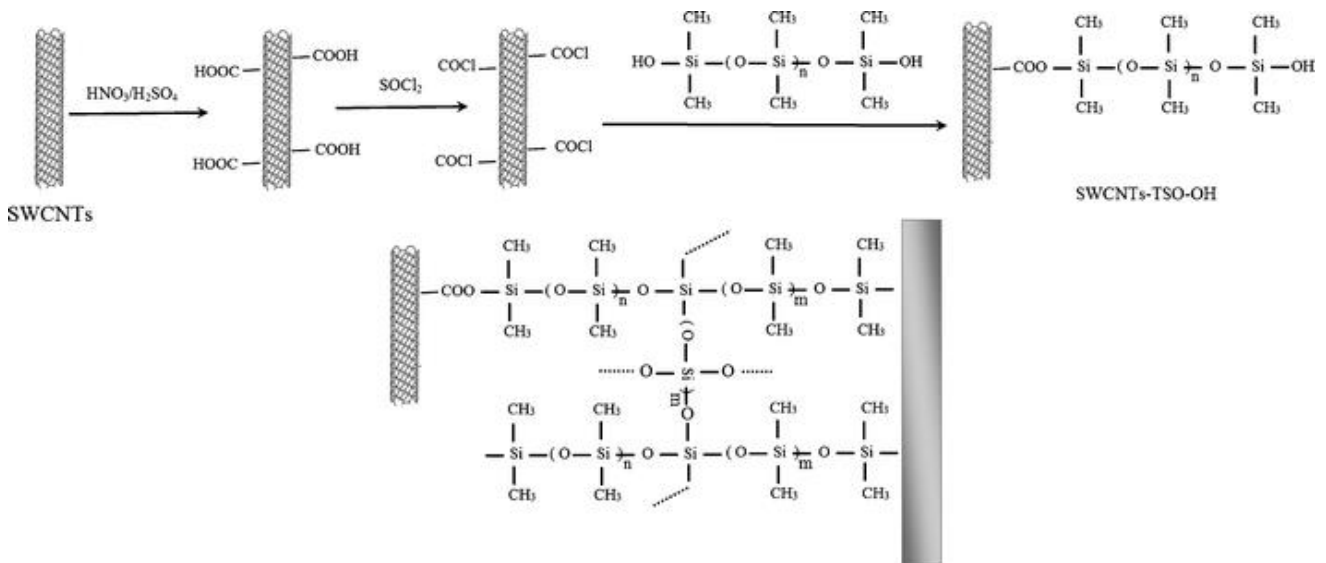
O processo sol-gel, como alternativa aos métodos de revestimento físico, para o revestimento de fibras SPME foi proposto por CHONG *et al.* (1997). O termo sol-gel refere-se ao processo no qual as partículas sólidas dispersas em um líquido (sol, principalmente soluções coloidais) se aglomeram para formar uma rede tridimensional contínua que se estende por todo o líquido (gel). Basicamente, esse processo inclui a hidrólise dos precursores e policondensação dos produtos hidrolisados para formar uma estrutura homogênea.

A estrutura porosa do revestimento sol-gel oferece uma grande área superficial e alta adesão do revestimento ao suporte através de ligações covalente. Além disso, o processo oferece melhor homogeneidade, controle mais fácil de tamanho e possibilidade de uso diferentes tipos de composição (materiais híbridos). Essas propriedades garantem uma alta capacidade de extração e elevada estabilidade química (principalmente em relação a solventes orgânicos), o que tornou a tecnologia sol-gel aplicável em diferentes campos científicos (AZIZ-ZANJANI; MEHDINIA, 2014; GHAEMI *et al.*, 2014).

Embora esta tecnologia seja amplamente difundida e aplicável para diversos materiais (principalmente à base de sílica), é possível afirmar que o processo sol-gel pode ser considerado complicado quando envolve a utilização de CNTs. Isso ocorre principalmente devido às fortes interações intermoleculares de van der Waals entre as estruturas dos nanotubos. Nesta ocasião, modificações estruturais dos CNTs envolvendo reações químicas são necessárias para promover este tipo de revestimento. Além disso, as fibras são tipicamente produzidas uma a uma, o que torna sua reprodutibilidade insatisfatória (GHAEMI *et al.*, 2014; SPIETELUN *et al.*, 2010).

ZHANG *et al.* (2009) realizaram o revestimento de fibras SPME com CNTs a partir da modificação de SWCNTs. Primeiramente, nanotubos comerciais foram modificados com soluções de ácido sulfúrico/ácido nítrico para formar SWNTs-COOH. Estes materiais foram agitados em solução de cloreto de tionida (SOCl_2) em dimetilformamida para produzir SWNT-COCl. Em seguida, 30 mg desses materiais foram misturado com óleo de silicone (TSO-OH) (500 mg) aquecido (75°C) sob agitação constante por 24 horas para produzir os SWCNTs-TSO-OH. Para a etapa sol-gel, o material produzido foi dissolvido em $300\ \mu\text{L}$ de diclorometano contendo TEOS (tetraetil ortosilicato), poli(metil-hidrosiloxano) e ácido trifluoroacético. A mistura foi então centrifugada e a solução obtida foi usada para revestimento de fibra (Figura 12).

Figura 12- Método Sol-gel nos revestimentos de fibras SPME com CNTs



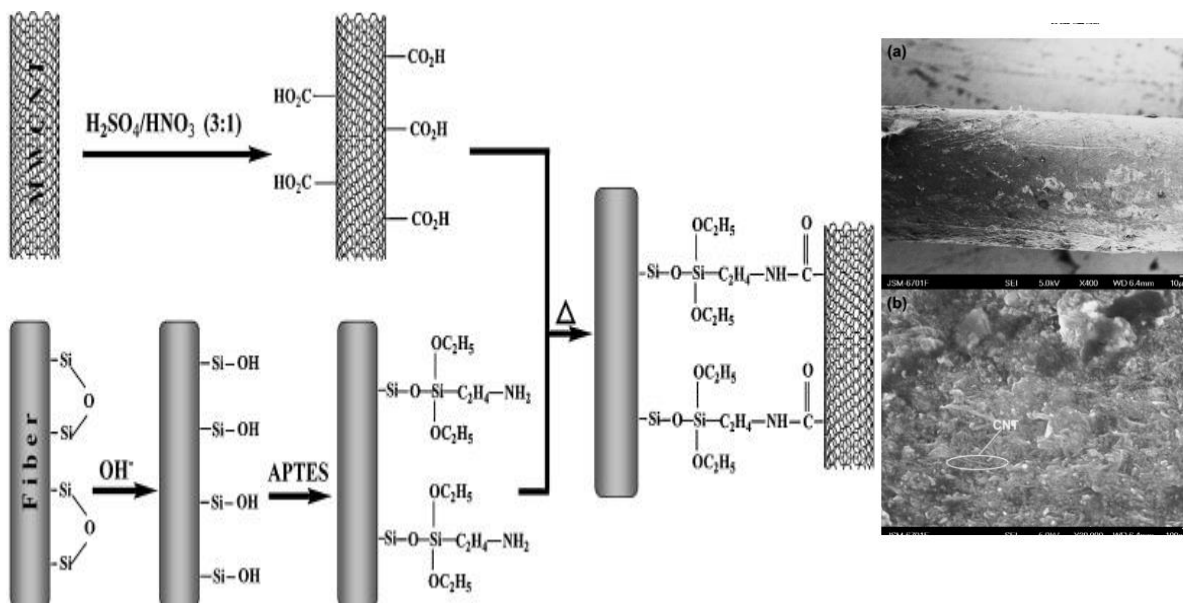
Fonte: Aziz-Janjani e Mehdinia (2014).

1.3.3 Ligação química

O recobrimento químico é feito através da funcionalização das fibras SPME (à base de sílica) e dos CNTs. Essas modificações estruturais tem a função de viabilizar a ligação covalente entre os materiais. Devido à ligação química entre o revestimento e o suporte, as fibras com fases quimicamente ligadas têm uma longa vida útil e estabilidade química adequada. Porém, essas fibras possuem superfícies não porosas que levam a uma capacidade de extração moderada para análise de microextração. Além disso, o processo de síntese também pode ser complicado, o que dificulta a reprodutibilidade (AZIZ-ZANJANI; MEHDINIA, 2014; GHAEMI *et al.*, 2014).

LIU *et al.* (2009) descreveram o primeiro trabalho envolvendo o recobrimento de fibras SPME de fibra de sílica fundida com CNTs. Para isso, os nanotubos foram oxidados por ataque ácido para criar grupos carbonílicos e as fibras de sílica foram transformados em grupos amino (NH_2) por reação com 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES). A reação ocorreu entre as fibras pela reação entre os grupos $-\text{COOH}$ e $-\text{NH}_2$ após tratamento térmico. O material foi empregado para a extração de sete poluentes fenólicos em amostras de água por GC-MS. O dispositivo SPME apresentou estabilidade em alta temperatura (300°C) e na presença de solventes orgânicos (polares e apolares), sem perda de desempenho analítico (Figura 13).

Figura 13- Ilustração do processo de preparação dos CNTs ligados quimicamente a fibras SPME à base de sílica (b) micrografias da fibra SPME em uma ampliação de 400 e 30.000X



Fonte: Liu *et al.* (2009).

1.3.4 Eletrodeposição

Os métodos de preparação eletroquímica para revestimentos de SPME permitem que os recobrimentos possam ser realizados de maneira simples e de baixo custo. A técnica ocorre através da formação de um filme ou revestimentos de polímero condutor em um suporte que ocorre através da redução eletroquímica de íons metálicos. Neste processo, os CNTs podem ser eletrodepositados diretamente em fios que servem como suporte do dispositivo SPME. Estes suportes possuem maior resistência mecânica que as fibras de sílica fundida, além de boa estabilidade térmica, e a solventes orgânicos. Em comparação com outros métodos de revestimento (como sol-gel e ligação química), a ausência de ligações covalentes adequada entre o revestimento e a superfície do fio metálico pode resultar em uma vida útil curta para as fibras por eletrodeposição (AZIZ-ZANJANI; MEHDINIA, 2014; GHAEMI *et al.*, 2014).

DU *et al.* (2009) utilizaram CNTs modificados com polianilina para revestir diretamente fibras SPME de platina. O procedimento foi realizado em solução de ácido sulfúrico usando voltametria cíclica. O dispositivo SPME foi utilizado para extrair compostos fenólicos em matrizes aquosas e apresentou propriedades térmicas estáveis (até 320°C) e resistência a solventes orgânicos.

As características de cada técnica de revestimento são ilustradas na Tabela 9. Embora essas técnicas apresentem vantagens e desvantagens, a maioria delas é laboriosa, frágil ou apresenta baixa estabilidade térmica e química. Neste estudo, M-RACNTs foram facilmente imobilizados em uma fibra SPME por meio de interações eletromagnéticas através de um ímã de neodímio. Um método simples de SPME-UHPLC-MS/MS foi aplicado com sucesso para determinar CBD e THC em amostras de plasma humano. Os M-RACNTs sintetizados usados como fase extartora de SPME permitiram que os analitos fossem pré-concentrados após a exclusão de macromoléculas da amostra biológica. O método SPME-UHPLC-MS/MS foi validado e aplicado em um estudo clínico envolvendo administração oral de CBD (dose única).

Tabela 9 - Vantagens e desvantagens das técnicas de recobrimento de dispositivos SPME com CNTs

Metodologia	Vantagens	Desvantagens
Deposição física	Simples, barato, qualquer material pode ser usado,	Baixa estabilidade química, térmica e perda de seletividade (devido as ligações químicas cola-material)
Sol-gel	Pureza, homogeneidade, fácil produção das fibras, estabilidade química e térmica	Síntese complicada, CNTs precisam ser funcionalizados, difícil reprodutibilidade, necessidade de otimizar muitas etapas
Ligação química	Simples, estabilidade química, longa vida útil	Dificuldade de incorporação do material na fibra, baixa capacidade extrativa (poucos poros)
Eletrodeposição	Resistência mecânica, estabilidade térmica	Processo difícil, baixa vida útil, material pouco aderido ao suporte

Fonte: do autor.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal

Desenvolver e validar o método UHPLC-MS/MS utilizando M-RACNTs como fase extratora para SPME para a determinação de canabinoides em amostra de plasma de voluntários saudáveis.

2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar M-RACNTs para serem utilizados como fase extratora SPME.

- Caracterizar as fases M-RACNTs sintetizadas por MEV, FTIR, DSC, TG e potencial zeta.
- Avaliar a capacidade de exclusão das proteínas das amostras de plasma pela fase M-RACNT.
- Otimizar as condições SPME para a extração de canabinóides em amostras de plasma.
- Validar o método SPME/UHPLC-MS/MS para a determinação de canabinóides em amostras de plasma.
- Determinar a concentração de canabinóides nas amostras de plasma de voluntários saudáveis pelo método SPME/UHPLC-MS/MS validado.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido em parceria com o laboratório de fármacos e toxicantes (LATF) da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), através da co-orientação do professor Eduardo Figueiredo. Todo o procedimento de síntese e caracterização das fases RACNTs foram realizadas no LATF, enquanto as análises cromatográficas foram realizadas no Laboratório de Cromatografia de Ribeirão Preto, (Departamento de Química USP) coordenado pela prof Dra Maria Eugênia Queiroz Nassur.

3.1 Materiais

Os padrões de CBD, THC e THC-d3 foram adquiridos da Cerilliant® (Round Rock, EUA). Os CNTs de paredes múltiplas (95% de pureza) com diâmetros de parede externa variando de 6 a 9 nm e 5 mm, BSA, glutaraldeído e borohidreto de sódio foram adquiridos da Sigma- Aldrich® (St. Louis, MO, EUA). Metanol (grau HPLC) e acetato de amônio foram fornecidos por JT Baker® (Phillipsburg, SXM, EUA). A água de ultra-alta pureza (18,2 Ω m) utilizada para preparar a fase móvel foi previamente purificada em sistema Milli-Q® (São Paulo, SP, Brasil). O vórtice orbital digital utilizado para realizar o procedimento de preparo da amostra foi adquirido da Fisher Scientific®.

Soluções estoque de canabinóides (1 mg.mL⁻¹) foram preparadas em metanol. As soluções padrão diluídas para o preparo da curva analítica e controle de qualidade foram preparadas por diluição seriada da solução estoque em um volume apropriado de metanol e armazenadas em tubos de vidro a -4 °C.

3.2 Amostras de plasma de voluntários saudáveis que participaram de uma única sessão de administração de CBD ou de fumantes crônicos de *Cannabis*

Cada voluntário participou de uma única sessão experimental de administração oral de 200 mg de CBD (99,6% de pureza, sem outros canabinóides, THC-Pharm, Frankfurt, Alemanha). A posologia foi escolhida com base no intervalo mínimo seguro observado em estudos anteriores para detecção de efeitos ansiolíticos agudos (CRIPPA *et al.*, 2021).

Amostras de sangue de fumantes crônicos de *Cannabis* foram coletadas, uma hora após a administração de um único cigarro (aproximadamente 0,3 g).

As amostras de sangue foram coletadas por punção venosa e acondicionadas em tubos contendo heparina, como anticoagulante. As amostras de sangue foram centrifugadas imediatamente após a coleta e o plasma obtido foi armazenado a -80 °C. Todas as amostras foram coletadas de acordo com os critérios estabelecidos pelo Comitê de Ética do Ribeirão Faculdade de Medicina de Preto, Universidade de São Paulo, Brasil.

Todos os parâmetros analíticos foram avaliados com amostras de plasma branco (300 µL) enriquecidas com soluções padrão dos analitos em diferentes concentrações.

3.3 Condições cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas em um sistema Waters ACQUITY[®]-Xevo-TQD UHPLC-MS/MS (Waters[®] Corporation, Milford, MA, EUA) no modo SRM. Dado que o CBD e o THC apresentam os mesmos espectros CID (dissociação induzida por colisão) no modo de ionização positiva, a transição m/z 315.2 → 192.8 foi usada para quantificação e a transição 315.2 → 122.8 foi usada para confirmação qualitativa para ambos os canabinóides (BROECKER; PRAGST, 2012). A transição 315,2 → 192,8 foi empregada para quantificar o padrão interno (THC-d3) (Tabela 10). A fase móvel (A: solução de formato de amônio 5 mmol.L⁻¹ com 0,1% de ácido fórmico e B: acetonitrila) foi usada no modo eluição por gradiente a uma vazão de 300 µL.min⁻¹. A corrida cromatográfica foi a seguinte: 60% B (0–1,2 min), 60% B a 75% B (1,2–2,2 min), 75% B (2,2–2,8 min), 100% B (2,8–3,5 min), 100% B (3,5–7,0 min), 60% B (7,01–9,0 min). A separação foi realizada em uma coluna Kinetex[®] C18 (1,7 µm, 2,1 x 100 mm), mantida a 40 °C. As amostras foram mantidas a 10 °C no injetor automático e 10 µL da amostra foram injetados no sistema cromatográfico. Os parâmetros da fonte e MS foram os seguintes: tensão capilar, 3,5 kV; temperatura da fonte, 150°C; temperatura de dessolvatação, 450°C; fluxo de gás de dessolvatação, 900 Lh⁻¹ (N₂, 99,9% de pureza); e fluxo de gás em cone, 150 Lh⁻¹ (N₂, 99,9% de pureza). Os dados foram adquiridos com o software MassLynx[®] V4.1.

Tabela 10- Paramentros cromatográficos e de MS para os canabinoides avaliados

Analitos	Ion Precursor (m/z)	Ion Quantificação (m/z)	DP (V)	EC (eV)	Ion confirmação (m/z)	Tempo retenção (min)
Cannabidiol	315,2	192,8	46	32	122,8	3,9
Tetrahydrocannabinol	315,2	192,8	46	32	122,8	4,8
Tetrahydrocannabinol d-3	318,2	195,8	46	32	125,8	4,8

Fonte: do autor.

3.4 Revestimento das fases M-RACNT

Para obter as nanopartículas magnéticas, 1,255g de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e 0,856g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ foram dissolvidos em 100 mL de água ultrapura em um frasco de fundo redondo a 50°C sob atmosfera de N_2 . Para a magnetização dos nanotubos, 500 mg de CNTs comerciais foram dispersos na solução e agitados por 10 min. Subsequentemente, 5 mL de solução de NH_4OH foram adicionados à solução a uma vazão de aproximadamente $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ sob agitação vigorosa por 30 min. O material magnético resultante (M-CNTs) foi lavado extensivamente com água ultrapura (até que o pH fosse completamente neutralizado) e seco a 60°C por 24 h. Em seguida, os M-CNTs foram revestidos com BSA de acordo com o procedimento descrito por Barbosa et al. (BARBOSA *et al.*, 2015), com pequenas modificações. Nesta etapa, 500 mg de M-CNTs foram colocados em um frasco de vidro de 50 mL contendo 20 mL de solução de BSA a 1% (v/v) (preparada em tampão fosfato $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 6,0). Em seguida, 5 mL de solução aquosa de glutaraldeído a 25% (p/v) foram adicionados ao frasco de vidro e deixados em espera por 5 h. Esta etapa teve como objetivo reticular os grupos amina BSA com glutaraldeído, resultando no revestimento do material. Em seguida, a mistura foi removida com um ímã e 10 mL de solução aquosa de borohidreto de sódio a 1% (v/v) foram adicionados ao frasco. Nesta etapa, o borohidreto de sódio atuou como agente redutor e converteu os grupos imina (formados na reação entre BSA e glutaraldeído) em grupos amina, que são mais estáveis. O material obtido foi exaustivamente lavado com cerca de 100 mL de água ultrapura, para remoção de possíveis resíduos, e seco a 60°C por aproximadamente 24 h.

3.5 Caracterização dos M-RACNTs

Os aspectos morfológicos do M-RACNT foram avaliados por MEV e FTIR. As micrografias foram analisadas em um microscópio eletrônico de Shimadzu SS-550 depois que os M-RACNTs foram pulverizados com ouro em um instrumento Bal-Tec SCD050 Sputter coater (Fürstentum Liechtenstein) por 180 s. As informações sobre a estrutura química do M-RACNT foram obtidas em um espectrômetro FTIR Shimadzu-IRPrestige-21; Foram utilizados pellets de KBr.

As análises TGA e DSC foram realizadas em um equipamento SII TG/DTA 7300 (SII Nanotechnology®, Tóquio, Japão) e um DSC Q20V24.11 Build 124 (TA Instruments®, Delaware, EUA) sob atmosfera de ar sintético ($100 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$). Cerca de 2,3 mg de M-RACNTs foram colocados em um suporte de alumina e aquecidos ($10 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) de 40 a $1000 \text{ }^\circ\text{C}$ para TGA e de 30 a $200 \text{ }^\circ\text{C}$ para DSC.

Velocimetria Laser Doppler (Zetasizer ZS Nano, Malvern Penalytical®, São Paulo, Brasil) com ângulo de detecção de 173° e operando a 25°C foi utilizada para determinar o potencial zeta em função do pH. Nove suspensões de M-RACNT ($0,015 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) foram preparadas em água ultrapura; O pH foi ajustado de 2,0 a 10,0. As suspensões foram deixadas em espera e as medições ($n = 3$) foram realizadas após 3 h.

3.6 Teste de exclusão de proteínas

Para avaliar a exclusão das proteínas da amostra de plasma, $300 \mu\text{L}$ de plasma branco foram diluídos com $650 \mu\text{L}$ de solução de acetato (50 mM , $\text{pH } 5,0$) e $50 \mu\text{L}$ de solução metanólica contendo THC-d3 ($600 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$). $30 \mu\text{L}$ da solução resultante foram injetados diretamente no sistema HPLC-UV ($\lambda = 280 \text{ nm}$) sem qualquer coluna. A área do pico obtido foi atribuída como 100% das proteínas presentes na amostra de plasma. Em seguida, a capacidade de exclusão de proteínas pela fase M-RACNT foi avaliada inserindo o dispositivo M-RACNTs-SPME no tubo Eppendorf contendo o plasma diluído. A amostra foi agitada (vórtex a 500 rpm por 5 min), e $30 \mu\text{L}$ do plasma restante foram analisados no sistema HPLC. O mesmo procedimento foi realizado usando M-CNTs (sem o revestimento BSA) como fase estacionária no dispositivo SPME. As áreas

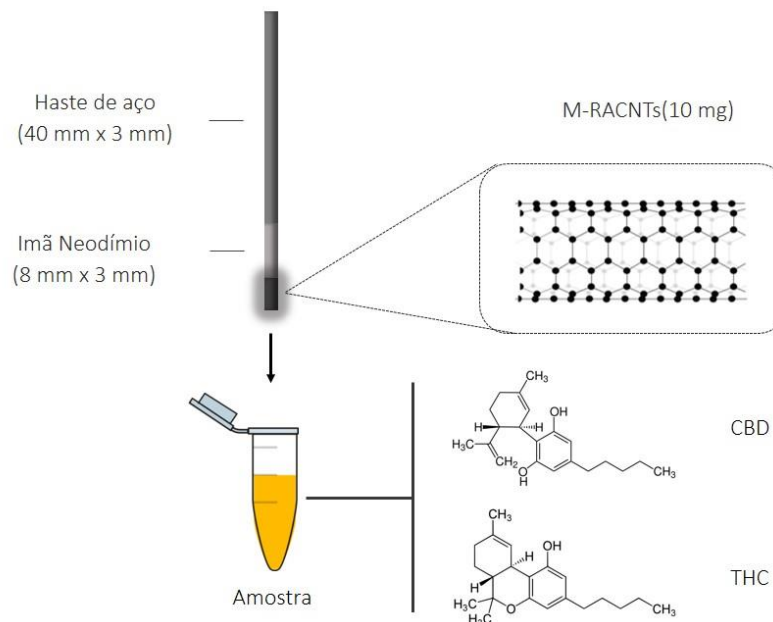
dos picos das proteínas obtidas nestes três procedimentos foram comparadas. A fase móvel consistiu em solução de tampão fosfato $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$, com pH ajustado para 5,0, com vazão de $0,4 \text{ mL.min}^{-1}$. O detector de UV foi operado a 280 nm. Todos os testes foram realizados em triplicata.

3.7 Dispositivo M-RACNT SPME

Para desenvolver o dispositivo M-RACNT SPME, um ímã cilíndrico de neodímio (3 mm de diâmetro x 8 mm de altura) foi atraído para a cabeça circular de uma haste de aço inoxidável (3 mm de diâmetro x 50 mm de altura). Posteriormente, 10 mg de M-RACNTs previamente pesados foram dispersos por toda a superfície do suporte magnético.

Para a extração, o dispositivo M-RACNT SPME foi inserido em um tubo Eppendorf (2 mL) contendo a amostra de plasma diluída. Este tubo foi colocado em um suporte e agitado em um vórtice orbital a 500 rpm (Figura 14). Essa configuração foi empregada para otimizar todas as etapas do procedimento SPME.

Figura 14- Representação esquemática do dispositivo SPME desenvolvido



Fonte: do autor.

3.8 Otimização das condições da M-RACNTs SPME

As condições da SPME foram otimizadas por meio de triagem (desenho de experimentos, DOE) com base no planejamento fatorial fracionário. As seguintes variáveis foram avaliadas: pH da amostra, tempo de dessorção, tempo de dessorção, tipo de solvente de dessorção e volume de solvente de dessorção.

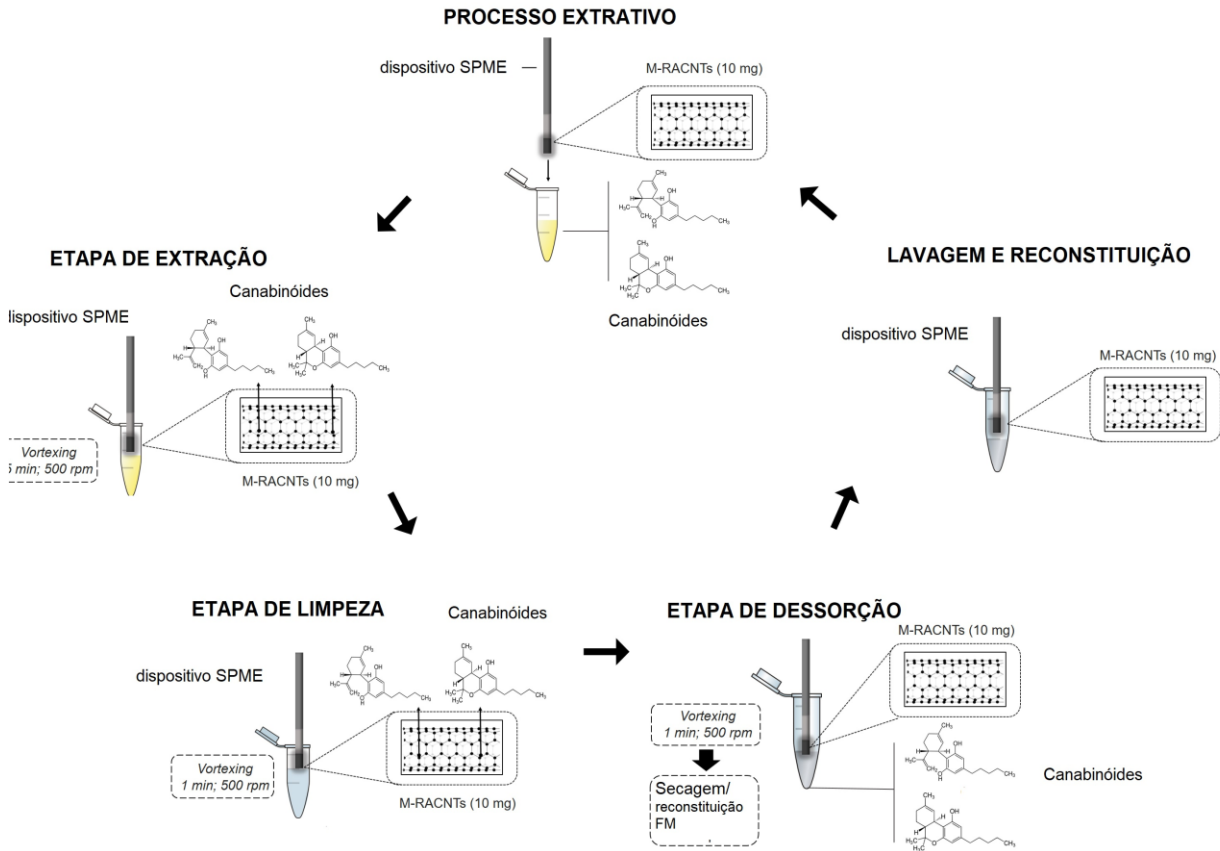
A influência das variáveis pH da amostra (5,0 e 9,0) (10 mmol.L^{-1} de tampão acetato e borato, respectivamente), tempo de sorção (1 e 20 min), tempo de dessorção (1 e 5 min), tipo de solvente de dessorção (acetonitrila e metanol), e o volume do solvente de dessorção (100 e 300 μL) foi avaliada através do planejamento fatorial fracionário 2^{k-1} ($k = 5$). Os valores das variáveis foram propostos com base em trabalhos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa (CRUZ *et al.*, 2020; CRUZ *et al.*, 2021; LAGO *et al.*, 2020). O planejamento gerou 16 experimentos nos pontos fatoriais (-1, +1). A variável de resposta foi a recuperação dos canabinoides (%) (ONU, 2009). Os resultados foram usados para construir o gráfico de Pareto para determinar quais variáveis foram estatisticamente significativas. As análises foram realizadas com o software Statistica ® 7.0 (Statsoft, 2004). Para as variáveis que afetaram a resposta do analito, foi realizado um novo teste de otimização univariada. Para as variáveis que não foram estatisticamente significativas, o nível indicado pelo gráfico de Pareto foi estabelecido como condição fixa. O volume da amostra de plasma foi fixado em 300 μL , e a concentração de canabinóides foi fixada em 333 ng.mL^{-1} .

3.9 Condições SPME otimizadas

Nas condições otimizadas, 50 μL de uma solução metanólica contendo THC-d3 (600 ng.mL^{-1}) foram adicionados a um tubo Eppendorf (2 mL) contendo 300 μL de plasma (100 ng.mL^{-1}) diluído com 650 μL de solução tampão de acetato (10 mmol.L^{-1} , pH 5,0). O dispositivo M-RACNT-SPME foi adicionado ao tubo Eppendorf (2 mL) e agitado em vórtex a 500 rpm por 5 minutos (Fisher Cientific ®). Em seguida, o dispositivo foi transferido para outro tubo Eppendorf contendo 1 mL de água ultrapura e agitado a 500 rpm por um minuto para a etapa de lavagem. Posteriormente, o dispositivo foi transferido para um tubo Eppendorf contendo 200 μL de acetonitrila. O tubo foi agitado em vórtex a 500 rpm por um minuto, para dessorver os analitos, e

o dispositivo foi mantido para recuperação do ímã. O eluato vaporizado em um secador a vácuo sob atmosfera de nitrogênio e o resíduo seco reconstituído com 50 μL da composição inicial da fase móvel (40% de 5 mmol.L^{-1} de solução de formato de amônio com 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila) para as análises cromatográficas (Figura 15).

Figura 15- Representação esquemática do procedimento SPME



Fonte: do autor.

3.10 Validação analítica

A metodologia foi validada de acordo com as diretrizes internacionalmente aceitas emitidas pela EMA (European Medicines Agency) e FDA (Food and Drug Administration), conforme descrito no item 3.8 do capítulo II. Linearidade, seletividade, efeito matriz, exatidão, *carry-over*, precisão e limite inferior de quantificação foram os principais parâmetros avaliados.

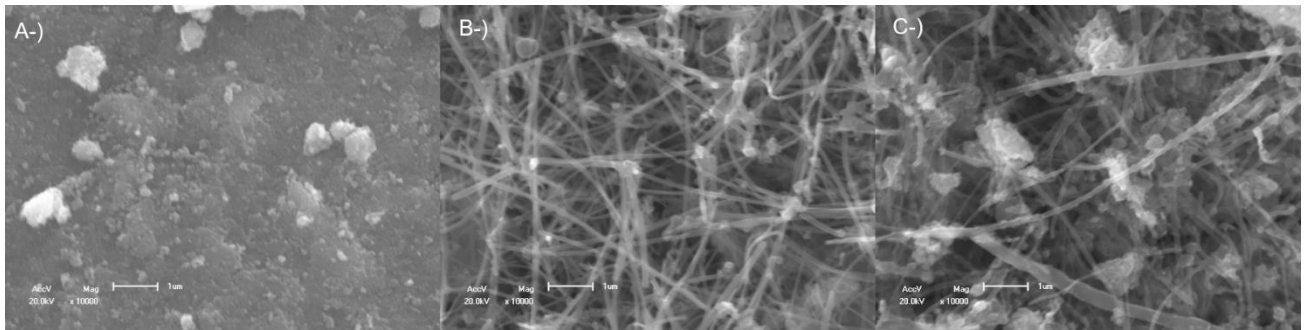
Para a construção das curvas analíticas, uma alíquota (300 μL) de um pool de plasma branco foi enriquecida com 50 μL da solução do padrão interno (THC-d3, 100 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) e com os canabinóides em concentrações que variaram de 10 a 300 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$. Esses valores foram baseados nos intervalos plasmáticos esperados de estudos farmacocinéticos envolvendo a administração oral de canabinóides (MILLAR *et al.*, 2018). A reutilização do dispositivo SPME foi avaliada por sua capacidade de realizar ciclos de extração (n=5) sem perda de desempenho analítico (precisão e exatidão < 15%)

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização da fase M-RACNT

Os aspectos morfológicos dos MNPs, CNTs e M-RACNTs foram caracterizados por MEV com aumento de 10.000X. A Figura 16a mostra a forma esférica e densa das NMPs. A Figura 16b mostra a estrutura dos CNTs comerciais. A Figura 16c mostra a presença de MNPs dispersos por toda a estrutura dos M-RACNTs, o que atestou o sucesso do procedimento de magnetização. Além disso, os CNTs estavam mais distantes nos M-RACNTs sintetizados, provavelmente devido à introdução das moléculas de BSA na superfície externa do material.

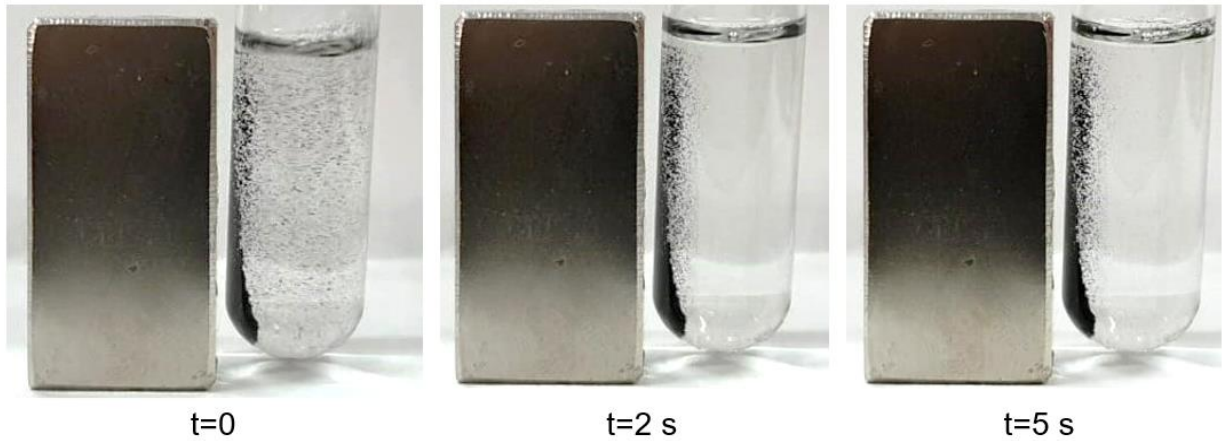
Figura 16- Microscopia eletrônica de varredura dos (a) MNPs, (b) CNTs e (c) M-RACNTs



Fonte: do autor.

A Figura 17 mostra o uso de um ímã de neodímio para atrair os M-RACNTs após agitação em vórtice. O ímã atraiu rapidamente o material (10 mg) disperso em 5 mL de solução tampão fosfato 10 mmol.L⁻¹ (pH 5,0), o que ilustra as propriedades magnéticas adequadas do material sintetizado.

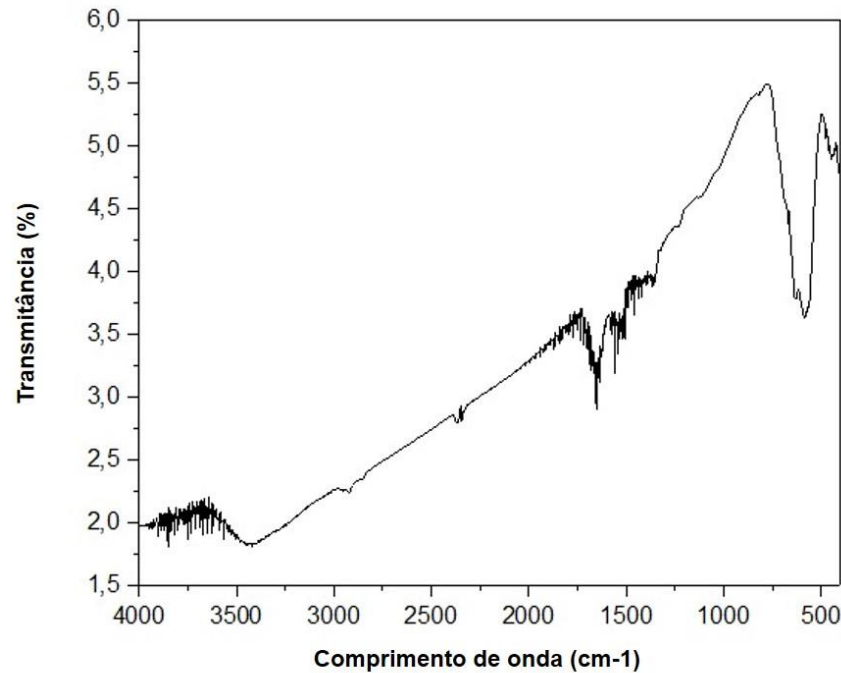
Figura 17- Influência do campo magnético nos M-RACNTs



Fonte: do autor.

O espectro de FTIR dos M-RACNT é apresentado na Figura 18. No entanto, a alta absorção de radiação pelos CNTs forneceu poucas informações sobre o espectro (LEHMAN *et al.*, 2011). A presença de bandas sutis em 550 cm^{-1} pode estar relacionada ao ferro presente nas nanopartículas de Fe_3O_4 incorporadas. As bandas em 1200 e 1650 cm^{-1} podem estar relacionadas à presença de grupos amina na camada BSA na superfície externa do M-RACNT (CASILLAS *et al.*, 2012; PENG *et al.*, 2004; SILVERSTEIN *et al.*, 2005).

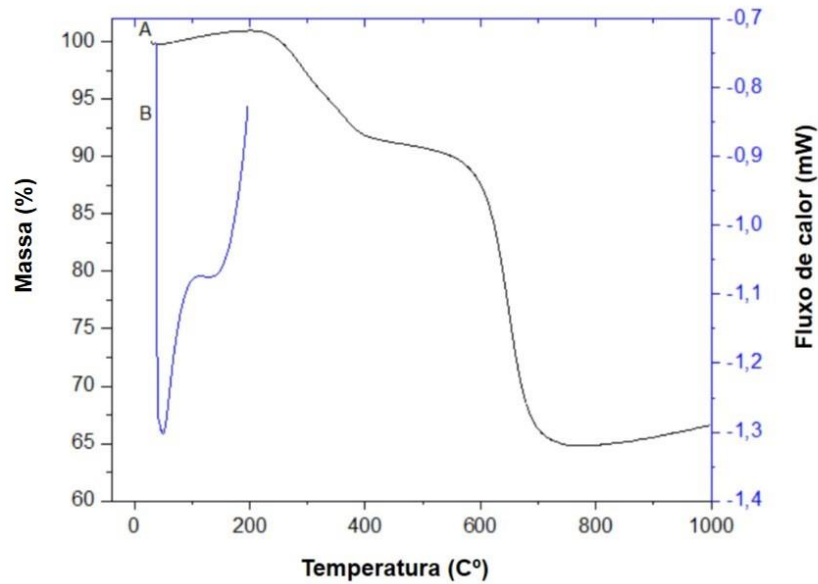
Figura 18- Espectro FTIR dos RACNTs



Fonte: do autor.

A Figura 19 ilustra as análises térmicas dos M-RACNTs. Os eventos de TGA podem estar associados à desnaturação e degradação da BSA (233–408 °C) e decomposição dos CNTs (594–749 °C). Esses resultados estão em congruência com a literatura (DURKIN *et al.*, 2017), que mostram que os CNTs intactos perdem mais de 90% do peso em temperaturas superiores a 560°C. Assim, a incorporação de nanopartículas aumentou a resistência térmica do M-RACNT. A análise de DSC revelou um pico endotérmico começando em torno de 100 °C, que pode estar associado à fase de transição da camada BSA (desnaturação). De acordo com Jones e colaboradores (2013), a BSA pura degrada a 250°C (JONES *et al.*, 2013). O primeiro pico observado (48°C) provavelmente se refere à eliminação de qualquer solvente de síntese remanescente. Por fim, os resultados mostraram que os M-RACNTs são estáveis em altas temperaturas, possibilitando seu uso em diferentes condições e técnicas de preparo de amostras.

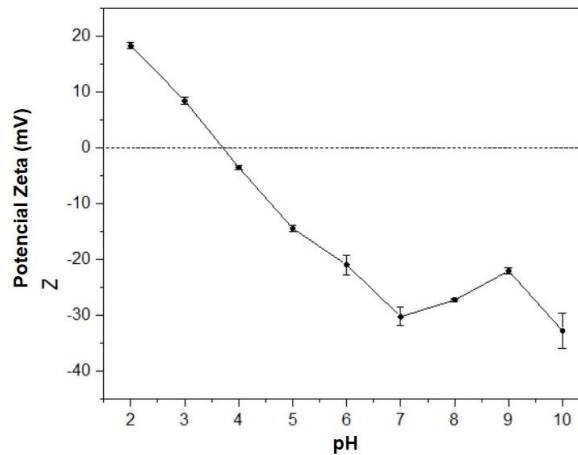
Figura 19- Análise termogravimétrica e calometria diferencial exploratória para os M-RACNTs sintetizados



Fonte: do autor.

A análise do potencial zeta mostrou que os M-RACNTs tinham uma carga superficial ligeiramente negativa em pH 5,0 ($-14,7 \pm 0,5$) (Figura 20). Além disso, o ponto isoelétrico desses materiais foi estimado em 3,72.

Figura 20- Representação gráfica do potencial Zeta obtido para os M-RACNTs



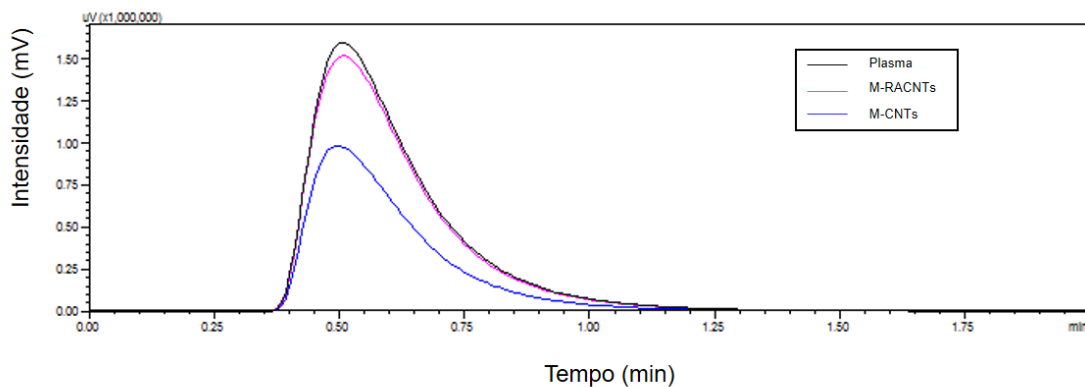
Fonte: do autor.

Outras caracterizações dos M-RACNT, incluindo difração de raios-X, análise elementar e microscopia eletrônica de varredura de emissão de campo foram descritas em outros trabalhos (BALDUINO *et al.*, 2019; LAGO *et al.*, 2020).

4.2 Teste de exclusão de proteínas

Neste ensaio, os M-RACNTs foram avaliados quanto à sua capacidade de excluir macromoléculas. A análise cromatográfica revelou que a área do pico obtida do sobrenadante coletado após a etapa de extração com o dispositivo M-RACNT SPME foi praticamente a mesma (98,5% em média) em comparação com a injeção direta da amostra de plasma. Em contraste, quando o CNT magnetizado comercial foi empregado como o sorvente do dispositivo SPME, a área do pico foi consideravelmente menor em comparação com a injeção direta de plasma (73% em média). Portanto, este ensaio atestou que a fase M-RACNT foi capaz de excluir as proteínas (cerca de 97%) (Figura 21).

Figura 21- Teste de exclusão de proteínas para os M-RACNTs



Fonte: do autor.

4.3 Otimização das condições do M-RACNT SPME

O planejamento fatorial fracionário gerou a matriz de experimentos (Tabela 11) e o gráfico de Pareto (com intervalo de confiança de 95%) ilustra a influência das variáveis na eficiência (taxa

de recuperação dos canabinóides) da extração. O tempo de sorção e o volume de solvente de dessorção foram as variáveis que influenciaram significativamente as taxas de extração, apresentando diferenças estatisticamente significativas na recuperação dos analitos ($p < 0,05$). Em contraste, as variáveis pH da amostra, tempo de dessorção e tipo de solvente de dessorção não foram consideradas estatisticamente significativas ($p > 0,05$) (Figura 22).

Tabela 11- Design fatorial fracionário para a otimização das variáveis SPME

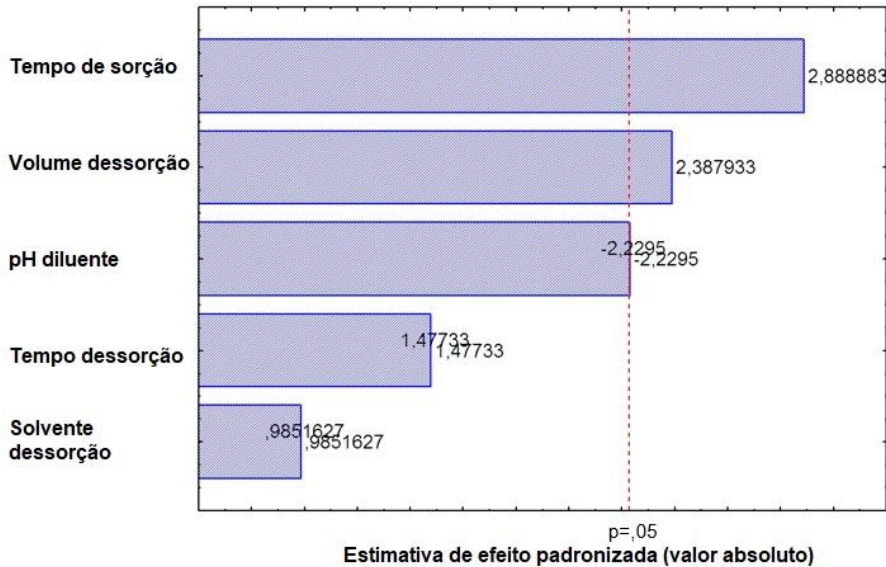
Experi- mento	Tempo sorção	pH diluyente	Solvente dessorção	Volume dessorção	Tempo de dessorção	CBD recuperação (%)	THC recuperação (%)
1	-1	-1	-1	-1	+1	6,41	5,11
2	+1	-1	-1	-1	-1	9,77	8,99
3	-1	+1	-1	-1	-1	10,33	7,24
4	+1	+1	-1	-1	+1	12,14	9,09
5	-1	-1	+1	-1	-1	4,88	3,87
6	+1	-1	+1	-1	+1	6,02	4,03
7	-1	+1	+1	-1	+1	6,40	5,22
8	+1	+1	+1	-1	-1	6,07	3,68
9	-1	-1	-1	-1	-1	6,47	4,15
10	+1	-1	-1	+1	+1	19,11	13,19
11	-1	+1	-1	+1	+1	13,82	11,98
12	+1	+1	-1	+1	-1	12,68	9,36
13	-1	-1	+1	+1	+1	4,27	4,93
14	+1	-1	+1	+1	-1	11,91	11,34
15	-1	+1	+1	+1	-1	4,34	4,02
16	+1	+1	+1	+1	+1	15,54	13,95

Variáveis**Codificação**

	-1	+1
Tempo de sorção	1 min	10 min
pH do diluyente	5	9
Tipo de solvente de dessorção	Metanol	Acetonitrila
Volume de dessorção	100 µL	300 µL
Tempo de sorção	1 min	5 min

Fonte: do autor.

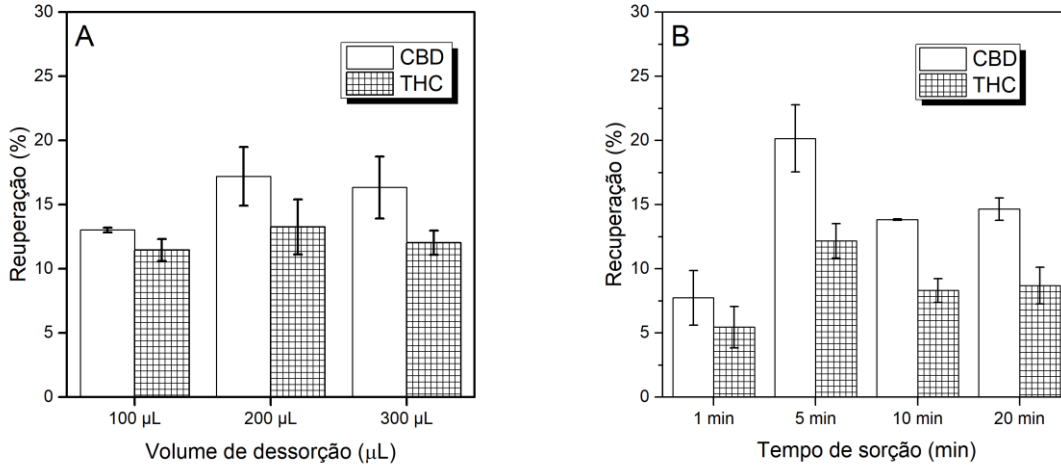
Figura 22- Diagrama de Pareto obtido pelo planejamento fatorial fracionário para otimização do método SPME-UHPLC-MS/MS



Fonte: do autor.

A análise univariada para avaliação do volume de solvente de dessorção (100, 200 e 300 μL) revelou que 200 μL de solvente de dessorção foram suficientes para garantir a dessorção adequada do analito. Os baixos valores de recuperação obtidos quando um volume menor de solvente de dessorção (100 μL) foi utilizado podem ser explicados pelo menor contato entre o dispositivo SPME e o solvente (devido às dimensões do tubo Eppendorf). Nessas condições, o volume de dessorção do solvente pode ter sido insuficiente para envolver toda a fase extrativa. Quando o volume de dessorção do solvente foi aumentado (200 ou 300 μL), a quantidade de solvente foi suficiente para envolver o dispositivo completamente, mantendo os níveis de recuperação do analito constantes (Figura 23a). Assim, 200 μL foi o volume selecionado por representar menor consumo de solvente orgânico.

Figura 23- Otimização univariada dos parâmetros SPME-UHPLC-MS/MS: (a) volume de dessorção e (b) tempo de sorção



Fonte: do autor.

Como a técnica SPME é baseada no equilíbrio do analito entre a matriz/ solvente de dessorção e a fase extrativa, esperava-se que o tempo de sorção afetasse a recuperação dos analitos. Com base na Figura 23b, cinco minutos foram suficientes para promover a recuperação adequada dos canabinóides, possivelmente associada a um menor efeito da matriz. Para períodos superiores a cinco minutos, a fase M-RACNTs pode ter adsorvido interferentes do plasma, aumentando o efeito da matriz.

Em relação ao pH da amostra, o gráfico de Pareto não revelou diferença estatisticamente significativa na recuperação de canabinóides entre as condições avaliadas. Os resultados podem ser explicados pelas características neutras dos analitos. O pKa do grupo fenólico nos canabinóides é estimado em 9,6 e 10,6 para CBD e THC, respectivamente (KARAFFA, 2013). Nas condições avaliadas (pH 5,0-9,0), os analitos estavam presentes em sua forma não ionizada, o que favoreceu sua adsorção na fase extratora hidrofóbica. Ainda assim, de acordo com o gráfico de Pareto, os resultados indicaram uma tendência de maiores taxas de recuperação em condições de pH mais próximas de 5,0. Nesta condição, os analitos estavam presentes principalmente em sua forma não iônica. Portanto, as análises foram realizadas usando um tampão em pH 5,0 como diluente.

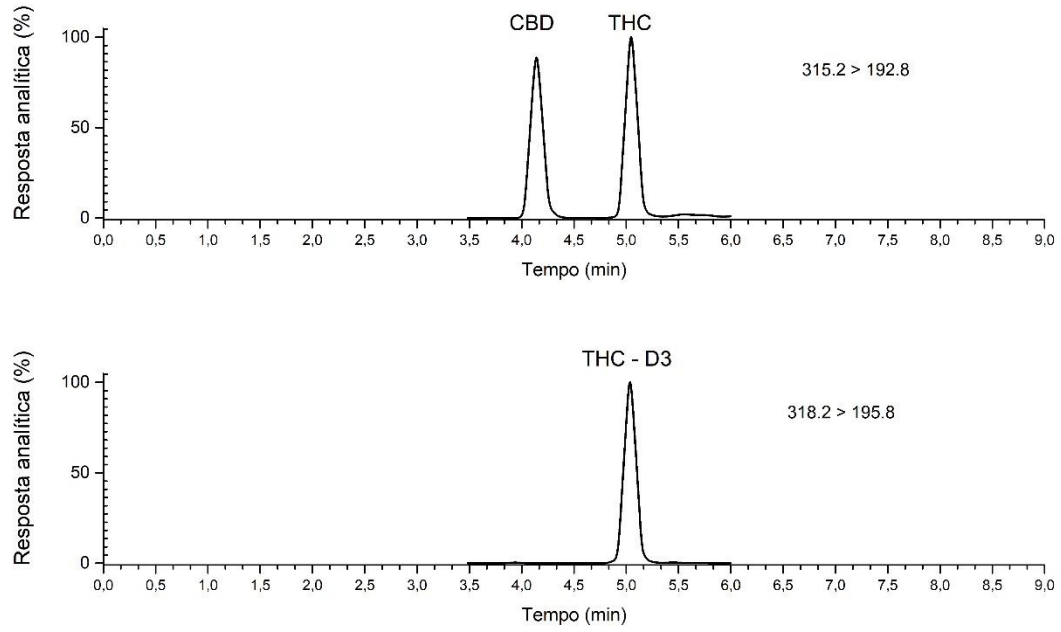
De acordo com o gráfico de Pareto, a recuperação dos analitos também não diferiu significativamente em termos de tipo de solvente de dessorção e tempo de dessorção. Isso pode ser

explicado pela alta solubilidade dos canabinóides na maioria dos solventes orgânicos (GARRETT; HUNT, 1974). Portanto, a dessorção em acetonitrila em um minuto foi selecionada para experimentos subsequentes porque este solvente orgânico tem baixa viscosidade.

4.4 Validação analítica

O método proposto apresentou linearidade nos intervalos avaliados ($10 - 300 \text{ ng.mL}^{-1}$) para todas as curvas analíticas com coeficientes de correlação superiores a 0,99. As curvas analíticas foram plotadas do LIQ (10 ng.mL^{-1}) ao LSQ (300 ng.mL^{-1}) para o CBD e THC. Esses intervalos lineares contemplam as concentrações plasmáticas esperadas após a administração oral de canabinóides para fins terapêuticos. Os ensaios de precisão e exatidão intra e inter-dia também estão adequados de acordo com a diretriz de validação. A exatidão foi avaliada pelos valores de EPR, que variaram de -6,90 a 17,78% para os intra-ensaios e de -4,81 a 14,28% para os inter-ensaios. A precisão (expressa como valores de CV) variou de 2,87 a 16,74% e de 4,47 a 19,84% para os intra e inter-ensaios, respectivamente. No cromatograma das amostras de plasma em branco, os picos de substâncias endógenas no mesmo tempo de retenção dos analitos foram inferiores a 20% do LLOQ (e 5% para o IS), atestando que a seletividade do método proposto foi adequada. Os valores de CV relacionados ao EM para os canabinóides não foram superiores a 15% para o CQA e CQB (Tabela 12). A Figura 24 ilustra a separação cromatográfica de canabinóides e PI no nível LLOQ. O dispositivo SPME foi reutilizado pelo menos 10 vezes (extrações adicionais não foram investigadas) sem perda de desempenho analítico (níveis de precisão e exatidão < 15%)

Figura 24- Cromatograma obtido através da injeção de plasma branco enriquecido com os canabinóides na concentração referente ao LIQ



Fonte: do autor.

Tabela 12- Parâmetros de validação do método SME-UHPLC-MS/MS (n=5)

	Faixa linear (ng.mL⁻¹)	R²	Level (ng.mL⁻¹)	Exatidão intra-ensaio (%EPR)	Exatidão inter-ensaio (%EPR)	Precisão intra-ensaio (%CV)	Precisão inter-ensaio (%CV)	FMN (CV%) (n=3)
CBD	10-300	0,9909	LIQ (10)	-6,9	1,25	16,74	19,84	
			CQB (25)	-0,42	2,42	9,79	13,17	12,31
			CQM (125)	4,69	0,27	7,78	10,36	
			CQA (225)	6,01	0,77	5,11	6,35	6,45
THC	10-300	0,9958	LIQ (10)	17,88	14,28	5,59	17,79	9,56
			CQB (25)	0,95	7,13	2,87	8,56	
			CQM (125)	-3,87	-4,81	2,85	4,54	4,07
			CQA (225)	-3,01	1,43	6,25	4,47	

Fonte: do autor.

4.5 Comparação com outras metodologias miniaturizadas

Comparada a outros métodos miniaturizados para determinação de CBD e THC em fluidos biológicos, a técnica SPME proposta apresentou valores de LLOQ (10 ng.mL⁻¹) e consumo de volume de amostra semelhantes (300 µL). No entanto, esta técnica foi rápida, simples, fácil de executar e permitiu que as amostras biológicas fossem analisadas diretamente, reduzindo substancialmente o manuseio das amostras e o tempo total de análise. Neste contexto, a presente técnica permitiu preparar cerca de 50 amostras em cerca de uma hora. Além disso, a técnica exigiu pequenas quantidades de material adsorvente (10 mg) e solvente orgânico (200 µL). Essas características garantiram as características econômicas e ambientalmente corretas do método (Tabela 13).

Tabela 13- Comparação do método SPME-UHPLC-MS/MS com outros métodos de microextração para a determinação de CBD e THC em fluidos biológicos

Analitos	matriz	Volume de amostra (µL)	Preparo de amostra	Intrumento	LIQ (ng.mL⁻¹)	Ref
CBD THC	Leite materno	500	Headspace SPME	GC-MS	20 20	SILVEIRA <i>et al.</i> (2017)
CBD THC	Saliva	1000	SPME	GC-MS/MS	10 1	ANZILLOTTI <i>et al.</i> (2019)
THC	Urina	9000	SPME	UHPLC-MS/MS	5	BOYACI <i>et al.</i> (2014)
CBD THC	Urina	90	micro-SPME	UHPLC-MS/MS	10 8	MONTESANO <i>et al.</i> (2014)
CBD THC	plasma	300	In-tube SPME	UHPLC-MS/MS	10 10	MARCHIONI <i>et al.</i> (2020)
CBD THC	plasma	400	Microextração em ponteira	UHPLC-MS/MS	10 10	CRUZ <i>et al.</i> (2021)
THC	Urine	1000	MEPS	UHPLC-MS/MS	20	SARTORE <i>et al.</i> (2020)
CBD THC	plasma	300	SPME	UHPLC-MS/MS	10	This work

Fonte: do autor.

Além disso, em comparação aos outros métodos de revestimento do dispositivo SPME, a imobilização da fase M-RACNT por interações magnéticas junto ao cilindro neodímio magnético ligado à haste de aço inoxidável (dispositivo SPME) resultou em uma fase extratora altamente resistente (especialmente em relação a solventes orgânicos) e robusta. Esta estratégia permite que qualquer material magnético seja empregado como sorvente de SPME. Até onde sabemos, este é o primeiro estudo que descreve esse tipo de revestimento. Embora LAN *et al.* (2014) tenham relatado uma estratégia semelhante para detectar traços de estrogênios em leite em pó por HPLC-UV, seu

procedimento de preparo de amostras exigia um circuito externo controlado por software, o que dificulta sua aplicabilidade. Entretanto, o método descrito aqui provou ser uma estratégia rápida e facilmente reprodutível para a determinação das concentrações plasmáticas de CBD e THC em estudos envolvendo a administração oral de canabinóides.

4.5 Avaliação do método proposto em amostras de plasma de voluntários saudáveis

O método foi aplicado com sucesso para a determinação de CBD em amostras de plasma de voluntários saudáveis e de THC em fumantes crônicos de *Cannabis* (Tabela 14). Os níveis plasmáticos variaram de 10.14 a 17.34 ng.mL⁻¹ e 14.92 a 21.13 ng.mL⁻¹ para o CBD e THC, respectivamente. Essas variações podem ser explicadas pela capacidade interindividual de absorver, distribuir, metabolizar e excretar o composto ativo devido a parâmetros farmacocinéticos interindividuais.

Tabela 14- Concentração de canabinoides no plasma de pacientes incluídos no estudo

Voluntários	Níveis de CBD (ng.mL ⁻¹)	Níveis de THC (ng.mL ⁻¹)
Administração oral de CBD 200 mg		
Voluntário 1	13,85	<LLOQ
Voluntário 2	10,14	<LLOQ
Voluntário 3	17,34	<LLOQ
Fumantes crônicos de <i>Cannabis</i>		
Voluntário 1	<LLOQ	15,73
Voluntário 2	<LLOQ	14,92
Voluntário 3	<LLOQ	21,13

Fonte: do autor.

5 CONCLUSÕES

Neste trabalho, o desenvolvimento da fase M-RACNTs como fase extratora para SPME resultou em uma técnica rápida, simples e adequada para a determinação de canabinóides (CBD e THC) em amostras de plasma por UHPLC-MS/MS. A fase sintetizada apresentou propriedades magnéticas e capacidade de adsorção adequadas (principalmente devido à sua capacidade de estabelecer interações $\pi - \pi$). As técnicas de caracterização confirmaram a presença da camada BSA na estrutura dos CNTs que permitiu análises diretas do plasma humano (com taxas de exclusão de cerca de 98,5%). A imobilização da fase M-RACNT por interações magnéticas junto ao cilindro neodímio magnético, ligado à haste de aço inoxidável (dispositivo SPME), resultou em uma fase extratora altamente resistente (especialmente em relação a solventes orgânicos) e robusta. O método inovador foi validado de acordo com as principais diretrizes de validação (EMA e FDA) e aplicado com sucesso em um estudo para determinar os níveis plasmáticos de CBD em voluntários saudáveis após a administração de uma dose oral única (200 mg) e de THC em fumantes crônicos de *Cannabis*.

CONCLUSÃO GERAL

As microtécnicas de preparo de amostras biológicas, SPME e MEPS, empregadas no desenvolvimento de métodos cromatográficos nesta tese, quando comparadas às técnicas convencionais, como SPE e LLE apresentaram vantagens como a redução do volume de amostra amostra biológica e consumo de solvente orgânico. Além disso, o uso de sorventes inovadores, como os RACNTs, favoreceram a seletividade e sensibilidade analítica dos métodos LC-MS/MS desenvolvidos, os quais apresentaram faixa de linearidade adequados para fins de monitorização terapêutica. Assim, essa associação de técnicas foi usada com sucesso na determinação de antipsicóticos e canabinóides em amostras de plasma de voluntários. Deste modo, espera-se que esta tese possa contribuir para a prospecção das fases e técnicas utilizadas, visando a miniaturização dos sistemas analíticos e a disseminação da química analítica verde.

REFERÊNCIAS

ABRÃO, L. C. d. C.; FIGUEIREDO, E. C. A new restricted access molecularly imprinted fiber for direct solid phase microextraction of benzodiazepines from plasma samples. **Analyst**, v. 144, n. 14, p. 4320-4330, 2019.

AIZPURUA-OLAIZOLA, O. *et al.* Evolution of the Cannabinoid and Terpene Content during the Growth of Cannabis sativa Plants from Different Chemotypes. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 2, p. 324-331, 2016.

ALBAYRAK, M. *et al.* Determination of olanzapine for therapeutic drug monitoring in schizophrenia patients by LC/MS method. **Biomedical Chromatography**, v. 33, n. 4, p. e4468, 2019.

ALOTHMAN, Z. A.; WABAIDUR, S. M. Application of carbon nanotubes in extraction and chromatographic analysis: A review. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 12, n. 5, p. 633-651, 2019.

ANDRENYAK, D. M. *et al.* Determination of Δ -9-Tetrahydrocannabinol (THC), 11-hydroxy-THC, 11-nor-9-carboxy-THC and Cannabidiol in Human Plasma using Gas Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. **J Anal Toxicol**, v. 41, n. 4, p. 277-288, 2017.

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

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

ANZILLOTTI, L. *et al.* Determination of synthetic and natural cannabinoids in oral fluid by solid-phase microextraction coupled to gas chromatography/mass spectrometry: A pilot study. **Talanta**, v. 201, p. 335-341, 2019.

ARANCIBIA, V. *et al.* Development of a microcomposite with single-walled carbon nanotubes and Nd₂O₃ for determination of paracetamol in pharmaceutical dosage by adsorptive voltammetry. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 9, n. 1, p. 62-69, 2019.

ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, v. 62, n. 19, p. 2145-2148, 1990.

AZIZ-ZANJANI, M. O.; MEHDINIA, A. A review on procedures for the preparation of coatings for solid phase microextraction. **Microchimica Acta**, v. 181, n. 11, p. 1169-1190, 2014.

BADOWSKI, M. E. A review of oral cannabinoids and medical marijuana for the treatment of chemotherapy-induced nausea and vomiting: a focus on pharmacokinetic variability and pharmacodynamics. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 80, n. 3, p. 441-449, 2017.

BALDUINO, J. S. *et al.* Magnetic restricted access carbon nanotubes for smooth Cu and Zn extraction from Cu, Zn-superoxide dismutase. **SN Applied Sciences**, v. 1, n. 10, p. 1246, 2019.

BAN, T. A. Fifty years chlorpromazine: a historical perspective. **Neuropsychiatr Dis Treat**, v. 3, n. 4, p. 495-500, 2007.

BARBOSA, A. F. *et al.* Restricted access carbon nanotubes for direct extraction of cadmium from human serum samples followed by atomic absorption spectrometry analysis. **Talanta**, v. 131, p. 213-220, 2015.

BELOTI, L. G. M. *et al.* Butyl Methacrylate-Co-Ethylene Glycol Dimethacrylate Monolith for Online in-Tube SPME-UHPLC-MS/MS to Determine Chlorpromazine, Clozapine, Quetiapine, Olanzapine, and Their Metabolites in Plasma Samples. **Molecules**, v. 24, n. 2, 2019.

BENDIKOV, I. *et al.* A CSF and postmortem brain study of d-serine metabolic parameters in schizophrenia. **Schizophrenia Research**, v. 90, n. 1, p. 41-51, 2007.

BLESSING, E. M. *et al.* Cannabidiol as a Potential Treatment for Anxiety Disorders. **Neurotherapeutics**, v. 12, n. 4, p. 825-836, 2015.

BLOMBERG, L. G. Two new techniques for sample preparation in bioanalysis: microextraction in packed sorbent (MEPS) and use of a bonded monolith as sorbent for sample preparation in polypropylene tips for 96-well plates. **Anal Bioanal Chem**, v. 393, n. 3, p. 797-807, 2009.

BOJKO, B. *et al.* SPME – Quo vadis? **Anal Chim Acta**, v. 750, p. 132-151, 2012.

BORGES, K. *et al.* **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: TLC, 2015.

BOYACI, E. *et al.* Introduction of solid-phase microextraction as a high-throughput sample preparation tool in laboratory analysis of prohibited substances. **Anal Chim Acta**, v. 809, p. 69-81, 2014.

BROECKER, S.; PRAGST, F. Isomerization of cannabidiol and Delta9-tetrahydrocannabinol during positive electrospray ionization. In-source hydrogen/deuterium exchange experiments by flow injection hybrid quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Commun Mass Spectrom**, v. 26, n. 12, p. 1407-1414, 2012.

CAI, Y.-q. *et al.* Multi-walled carbon nanotubes as a solid-phase extraction adsorbent for the determination of chlorophenols in environmental water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1081, n. 2, p. 245-247, 2005.

CALÒ, L. *et al.* Validation of a Bioanalytical Method for the Determination of Synthetic and Natural Cannabinoids (New Psychoactive Substances) in Oral Fluid Samples by Means of HPLC-MS/MS. v. 8, 2020.

CARLSSON, A.; LINDQVIST, M. Effect of Chlorpromazine or Haloperidol on Formation of 3methoxytyramine and Normetanephrine in Mouse Brain. **Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)**, v. 20, p. 140-144, 1963.

CASILLAS, P. E. G. *et al.* Infrared spectroscopy of functionalized magnetic nanoparticles. *In*: THEOPHANIDES, T. (Ed.). **Infrared Spectroscopy-Materials Science, Engineering**. London, 2012. v. 405, cap. 21, p. 405-421.

CASSIANO, N. M. *et al.* Development of restricted-access media supports and their application to the direct analysis of biological fluid samples via high-performance liquid chromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 384, n. 7, p. 1462-1469, 2006.

CHAGAS, M. H. *et al.* Effects of cannabidiol in the treatment of patients with Parkinson's disease: an exploratory double-blind trial. **J Psychopharmacol**, v. 28, n. 11, p. 1088-1098, 2014.

CHARLSON, F. J. *et al.* Global Epidemiology and Burden of Schizophrenia: Findings From the Global Burden of Disease Study 2016. **Schizophrenia Bulletin**, v. p. sby058-sby058, 2018.

CHEN, X. *et al.* A rapid LC-MS/MS method for simultaneous determination of quetiapine and duloxetine in rat plasma and its application to pharmacokinetic interaction study. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 27, n. 1, p. 323-331, 2019.

CHONG, S. L. *et al.* Sol-Gel Coating Technology for the Preparation of Solid-Phase Microextraction Fibers of Enhanced Thermal Stability. **Analytical Chemistry**, v. 69, n. 19, p. 3889-3898, 1997.

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

CREESE, I. *et al.* Dopamine receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs. **Science**, v. 192, n. 4238, p. 481-483, 1976.

CRIPPA, J. A. *et al.* Effect of two oral formulations of cannabidiol on responses to emotional stimuli in healthy human volunteers: pharmaceutical vehicle matters. **Braz J Psychiatry**, v. 2021.

CRUZ, J. C. *et al.* Restricted access carbon nanotube for microextraction by packed sorbent to determine antipsychotics in plasma samples by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Anal Bioanal Chem**, v. 412, n. 11, p. 2465-2475, 2020.

CRUZ, J. C. *et al.* Pipette tip micro-solid phase extraction (octyl-functionalized hybrid silica monolith) and ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry to determine cannabidiol and tetrahydrocannabinol in plasma samples. **J Sep Sci**, v. 44, n. 8, p. 1621-1632, 2021.

CRUZ, J. C. *et al.* Current advances and applications of online sample preparation techniques for miniaturized liquid chromatography systems. **J Chromatogr A**, v. 1668, p. 462925, 2022.

DE VOLDER, M. F. *et al.* Carbon nanotubes: present and future commercial applications. **Science**, v. 339, n. 6119, p. 535-539, 2013.

DEGREEF, M. *et al.* Multi-analyte LC-MS/MS quantification of 38 antipsychotics and metabolites in plasma: Method validation & application to routine analyses. **Journal of Chromatography B**, v. 1179, p. 122867, 2021.

DEIANA, S. Medical use of cannabis. Cannabidiol: A new light for schizophrenia? **Drug Testing and Analysis**, v. 5, n. 1, p. 46-51, 2013.

DEVANE, W. A. *et al.* Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. **Science**, v. 258, n. 5090, p. 1946-1949, 1992.

DING, J. *et al.* A novel and robust analytical method for the quantification of perospirone in human plasma using an LC–MS/MS system with self-internal standard calibration. **Clinical Biochemistry**, v. 105-106, p. 49-56, 2022.

DRESSELHAUS, G. *et al.* **Physical properties of carbon nanotubes**. London: World scientific, 1998. 1783262419.

DU, P. *et al.* Optimized UPLC–MS/MS method for the quantitation of olanzapine in human plasma: application to a bioequivalence study. **Biomedical Chromatography**, v. 11, n. 13, p. 1291-1302, 2019.

DU, W. *et al.* Novel multiwalled carbon nanotubes–polyaniline composite film coated platinum wire for headspace solid-phase microextraction and gas chromatographic determination of phenolic compounds. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 18, p. 3751-3757, 2009.

DURKIN, D. P. *et al.* Phosphorus-functionalized multi-wall carbon nanotubes as flame-retardant additives for polystyrene and poly (methyl methacrylate). **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 130, n. 2, p. 735-753, 2017.

ELSOHLY, M. A.; SLADE, D. Chemical constituents of marijuana: the complex mixture of natural cannabinoids. **Life Sci**, v. 78, n. 5, p. 539-548, 2005.

FAN, L. *et al.* Development, validation, and application of a simple UPLC–MS/MS method for simultaneous quantification of five traditional antipsychotics in human plasma. **Biomedical Chromatography**, v. 35, n. 9, p. e5143, 2021.

FANG, G.-Z. *et al.* Multiwalled carbon nanotubes as sorbent for on-line coupling of solid-phase extraction to high-performance liquid chromatography for simultaneous determination of 10 sulfonamides in eggs and pork. **Journal of Chromatography A**, v. 1127, n. 1, p. 12-17, 2006.

FARIA, H. D. *et al.* New advances in restricted access materials for sample preparation: A review. **Anal Chim Acta**, v. 959, p. 43-65, 2017.

FONSECA, B. M. *et al.* Determination of seven selected antipsychotic drugs in human plasma using microextraction in packed sorbent and gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Anal Bioanal Chem**, v. 405, n. 12, p. 3953-3963, 2013.

FRUGERI, P. M. *et al.* Magnetic restricted-access carbon nanotubes for the extraction/pre-concentration of organophosphates from food samples followed by spectrophotometric determination. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 241, p. 118632, 2020.

FU, L. *et al.* Magnetic carbon nanotubes-molecularly imprinted polymer coupled with HPLC for selective enrichment and determination of ferulic acid in traditional Chinese medicine and biological samples. **Journal of Chromatography B**, v. 1180, p. 122870, 2021.

GARRETT, E. R.; HUNT, C. A. Physicochemical properties, solubility, and protein binding of Δ^9 -tetrahydrocannabinol. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 63, n. 7, p. 1056-1064, 1974.

GERLACH, M. *et al.* Therapeutic drug monitoring of quetiapine in adolescents with psychotic disorders. **Pharmacopsychiatry**, v. 40, n. 2, p. 72-76, 2007.

GHAEMI, F. *et al.* Methods for coating solid-phase microextraction fibers with carbon nanotubes. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 59, p. 133-143, 2014.

GHERZI, M. *et al.* Safety and pharmacokinetics of medical cannabis preparation in a monocentric series of young patients with drug resistant epilepsy. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 51, p. 102402, 2020.

GOMES, R. *et al.* Evaluation of the pH influence on protein exclusion by restricted access carbon nanotubes coated with bovine serum albumin. **Journal of Materials Science**, v. 51, 2016.

GONÇALVES, J. L. *et al.* Development of MEPS–UHPLC/PDA methodology for the quantification of clozapine, risperidone and their major active metabolites in human urine. **Microchemical Journal**, v. 123, p. 90-98, 2015.

GROTENHERMEN, F. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids. **Clin Pharmacokinet**, v. 42, n. 4, p. 327-360, 2003.

HADDAD, P. M. *et al.* Nonadherence with antipsychotic medication in schizophrenia: challenges and management strategies. **Patient Relat Outcome Meas**, v. 5, p. 43-62, 2014.

HASHIMOTO, K. *et al.* Decreased serum levels of D-serine in patients with schizophrenia: evidence in support of the N-methyl-D-aspartate receptor hypofunction hypothesis of schizophrenia. **Arch Gen Psychiatry**, v. 60, n. 6, p. 572-576, 2003.

HERKENHAM, M. *et al.* Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. **J Neurosci**, v. 11, n. 2, p. 563-583, 1991.

HERRERA-HERRERA, A. V. *et al.* Carbon nanotubes applications in separation science: A review. **Anal Chim Acta**, v. 734, p. 1-30, 2012.

HO, T. D. *et al.* Ionic liquids in solid-phase microextraction: A review. **Anal Chim Acta**, v. 695, n. 1, p. 18-43, 2011.

HONS, J. *et al.* Different serine and glycine metabolism in patients with schizophrenia receiving clozapine. **Journal of Psychiatric Research**, v. 46, n. 6, p. 811-818, 2012.

HOWLETT, A. C. *et al.* International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. **Pharmacol Rev**, v. 54, n. 2, p. 161-202, 2002.

IJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. **Nature**, v. 354, n. 6348, p. 56-58, 1991.

INTRCHOM, W.; MITRA, S. Analytical sample preparation, preconcentration and chromatographic separation on carbon nanotubes. **Current Opinion in Chemical Engineering**, v. 16, p. 102-114, 2017.

JALILIAN, N. *et al.* Determination of acidic, basic and amphoteric drugs in biological fluids and wastewater after their simultaneous dispersive micro-solid phase extraction using multiwalled carbon nanotubes/magnetite nanoparticles@poly(2-aminopyrimidine) composite. **Microchemical Journal**, v. 143, p. 337-349, 2018.

JAMEY, C. *et al.* Determination of cannabinoids in whole blood by UPLC-MS-MS. **J Anal Toxicol**, v. 32, n. 5, p. 349-354, 2008.

JANOUTOVA, J. *et al.* Epidemiology and risk factors of schizophrenia. **Neuro Endocrinol Lett**, v. 37, n. 1, p. 1-8, 2016.

JONES, A. *et al.* Thermal, mechanical, and moisture absorption properties of egg white protein bioplastics with natural rubber and glycerol. **Progress in Biomaterials**, v. 2, n. 1, p. 12, 2013.

KANE, J. M.; CORRELL, C. U. Pharmacologic treatment of schizophrenia. **Dialogues Clin Neurosci**, v. 12, n. 3, p. 345-357, 2010.

KANG, J. S.; LEE, M. H. Overview of therapeutic drug monitoring. **Korean J Intern Med**, v. 24, n. 1, p. 1-10, 2009.

KANG, J. S.; LEE, M. H. Overview of therapeutic drug monitoring. **The Korean journal of internal medicine**, v. 24, n. 1, p. 1-10, 2009.

KARAFFA, L. S. **The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals**. RSC Publishing, 2013. 1849736707.

KATAOKA, H. *et al.* Developments and applications of capillary microextraction techniques: a review. **Anal Chim Acta**, v. 655, n. 1-2, p. 8-29, 2009.

KHELFI, A. *et al.* Determination of Chlorpromazine, Haloperidol, Levomepromazine, Olanzapine, Risperidone, and Sulpiride in Human Plasma by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS). **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2018, p. 5807218, 2018.

KHELFI, A. *et al.* Determination of Chlorpromazine, Haloperidol, Levomepromazine, Olanzapine, Risperidone, and Sulpiride in Human Plasma by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS). **Int J Anal Chem**, v. 2018, p. 5807218, 2018.

KNEISEL, S.; AUWÄRTER, V. Analysis of 30 synthetic cannabinoids in serum by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry after liquid-liquid extraction. **J Mass Spectrom**, v. 47, n. 7, p. 825-835, 2012.

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

LAGO, A. C. *et al.* Magnetic restricted-access carbon nanotubes for dispersive solid phase extraction of organophosphates pesticides from bovine milk samples. **Anal Chim Acta**, v. 1102, p. 11-23, 2020.

LAN, H. *et al.* An automated solid-phase microextraction method based on magnetic molecularly imprinted polymer as fiber coating for detection of trace estrogens in milk powder. **Journal of Chromatography A**, v. 1331, p. 10-18, 2014.

LASHGARI, M.; YAMINI, Y. An overview of the most common lab-made coating materials in solid phase microextraction. **Talanta**, v. 191, p. 283-306, 2019.

LEHMAN, J. H. *et al.* Evaluating the characteristics of multiwall carbon nanotubes. **Carbon**, v. 49, n. 8, p. 2581-2602, 2011.

LI, D. *et al.* Preparation of magnetic ODS-PAN thin-films for microextraction of quetiapine and clozapine in plasma and urine samples followed by HPLC-UV detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 125, p. 319-328, 2016.

LI, Q. *et al.* Oxygenated carbon nanotubes cages coated solid-phase microextraction fiber for selective extraction of migrated aromatic amines from food contact materials. **Journal of Chromatography A**, v. 1646, p. 462031, 2021.

LISMAN, J. E. *et al.* Circuit-based framework for understanding neurotransmitter and risk gene interactions in schizophrenia. **Trends Neurosci**, v. 31, n. 5, p. 234-242, 2008.

LIU, G. *et al.* Application of Multiwalled Carbon Nanotubes as a Solid-Phase Extraction Sorbent for Chlorobenzenes. **Analytical Letters**, v. 37, n. 14, p. 3085-3104, 2004.

LIU, H. *et al.* A novel multiwalled carbon nanotubes bonded fused-silica fiber for solid phase microextraction–gas chromatographic analysis of phenols in water samples. **Talanta**, v. 78, n. 3, p. 929-935, 2009.

LIU, X. *et al.* Oxidized multiwalled carbon nanotubes as a novel solid-phase microextraction fiber for determination of phenols in aqueous samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1165, n. 1, p. 10-17, 2007.

LO FARO, A. F. *et al.* Ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for quantifying THC, CBD and their metabolites in hair. Application to patients treated with medical cannabis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 217, p. 114841, 2022.

LOPEZ-MUNOZ, F. *et al.* History of the discovery and clinical introduction of chlorpromazine. **Ann Clin Psychiatry**, v. 17, n. 3, p. 113-135, 2005.

LORD, H.; PAWLISZYN, J. Evolution of solid-phase microextraction technology. **Journal of Chromatography A**, v. 885, n. 1, p. 153-193, 2000.

MA, J. *et al.* Determination of six sulfonylurea herbicides in environmental water samples by magnetic solid-phase extraction using multi-walled carbon nanotubes as adsorbents coupled with high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1466, p. 12-20, 2016.

MA, X. *et al.* Determination of endocrine-disrupting compounds in water by carbon nanotubes solid-phase microextraction fiber coupled online with high performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 85, n. 4, p. 2212-2217, 2011.

MARCHIONI, C. *et al.* In-tube solid-phase microextraction with a dummy molecularly imprinted monolithic capillary coupled to ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry to determine cannabinoids in plasma samples. **Anal Chim Acta**, v. 1099, p. 145-154, 2020.

MAURYA, N.; VELMURUGAN, B. K. Therapeutic applications of cannabinoids. **Chemico-Biological Interactions**, v. 293, p. 77-88, 2018.

MECHOULAM, R. *et al.* Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. **Biochem Pharmacol**, v. 50, n. 1, p. 83-90, 1995.

MILLAR, S. A. *et al.* A Systematic Review on the Pharmacokinetics of Cannabidiol in Humans. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, p. 1365-1365, 2018.

MIYAMOTO, S. *et al.* Treatments for schizophrenia: a critical review of pharmacology and mechanisms of action of antipsychotic drugs. **Molecular Psychiatry**, v. 10, p. 79, 2004.

MOEIN, M. M. *et al.* Microextraction by packed sorbent (MEPS). **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 67, p. 34-44, 2015.

MOHAMED, M. K. *et al.* Development and validation of a LC-HRMS method for the quantification of cannabinoids and their metabolites in human plasma. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 159, p. 105705, 2021.

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

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

MUSTEATA, F. M.; PAWLISZYN, J. Bioanalytical applications of solid-phase microextraction. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 1, p. 36-45, 2007.

NI, X.-J. *et al.* Simultaneous analysis of olanzapine, fluoxetine, and norfluoxetine in human plasma using liquid chromatography-mass spectrometry and its application to a pharmacokinetic study. **Journal of Chromatography B**, v. 1092, p. 506-514, 2018.

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

ONU, U. N. O. o. D. **Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment Used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens: A Commitment to Quality and Continuous Improvement.** United Nations Publications, 2009. 9211482437.

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

PENG, Z. G. *et al.* Adsorption of bovine serum albumin on nanosized magnetic particles. **J Colloid Interface Sci**, v. 271, n. 2, p. 277-283, 2004.

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

PROSEN, H.; ZUPANČIČ-KRALJ, L. Solid-phase microextraction. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, n. 4, p. 272-282, 1999.

QUEIROZ, M. Microextração em sorvente empacotado (MEPS). *In*: BORGES, K.; FIGUEIREDO, E., *et al* (Ed.). **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos.** Rio de Janeiro: TLC, 2015.

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

QUEIROZ, M. E.; MELO, L. Recentes avanços da in-tube SPME-LC para bioanálises. **Scientia Chromatographica**, v. 5, p. 167-179, 2013.

QUEIROZ, M. E. C. Microextração em fase sólida para análise de fármacos em fluídos biológicos. **Scientia Chromatography**, v. 1, n. 3, p. 11-19, 2009.

RATHOD, R. H. *et al.* Ultra-high performance liquid chromatography-MS/MS (UHPLC-MS/MS) in practice: analysis of drugs and pharmaceutical formulations. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 1, p. 6, 2019.

REBER, J. D. *et al.* An Enhanced LC–MS-MS Technique for Distinguishing Δ 8- and Δ 9-Tetrahydrocannabinol Isomers in Blood and Urine Specimens. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 46, n. 4, p. 343-349, 2022.

RIAHI-ZANJANI, B. *et al.* Developing a new sensitive solid-phase microextraction fiber based on carbon nanotubes for preconcentration of morphine. **Applied Nanoscience**, v. 8, n. 8, p. 2047-2056, 2018.

ROSADO, T. *et al.* Development and validation of a gas chromatography/tandem mass spectrometry method for simultaneous quantitation of several antipsychotics in human plasma and oral fluid. **Rapid Commun Mass Spectrom**, v. 32, n. 23, p. 2081-2095, 2018.

ROSLAWSKI, M. J. *et al.* Simultaneous Quantification of 13 Cannabinoids and Metabolites in Human Plasma by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry in Adult Epilepsy Patients. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 41, n. 3, 2019.

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

SARAFRAZ-YAZDI, A.; RAZAVI, N. Application of molecularly-imprinted polymers in solid-phase microextraction techniques. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 73, p. 81-90, 2015.

SARTORE, D. M. *et al.* Automated microextraction by packed sorbent of cannabinoids from human urine using a lab-made device packed with molecularly imprinted polymer. **Talanta**, v. 219, p. 121185, 2020.

SEEMAN, P.; LEE, T. Antipsychotic drugs: Direct correlation between clinical potency and presynaptic action on dopamine neurons. **Science**, v. 188, n. 4194, p. 1217-1219, 1975.

SEKAR, K.; PACK, A. Epidiolex as adjunct therapy for treatment of refractory epilepsy: a comprehensive review with a focus on adverse effects. **F1000Research**, v. 8, p. F1000 Faculty Rev-1234, 2019.

SILVEIRA, G. d. O. *et al.* Headspace solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry for determination of cannabinoids in human breast milk. **Forensic Toxicology**, v. 35, n. 1, p. 125-132, 2017.

SILVERSTEIN, R. M. *et al.* **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 7th ed. Hoboken: Wiley, 2005. 9781118311653.

SIMÕES, S. S. *et al.* 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**, v. 25, n. 18, p. 2603-2610, 2011.

SOARES, d. S. B. J. *et al.* Recent advances and trends in miniaturized sample preparation techniques. **Journal of Separations Science**, v. 43, n. 1, p. 202-225, 2020.

SOBOLESKY, P. M. *et al.* Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for analyzing cannabinoids in oral fluid. **Clinica Chimica Acta**, v. 491, p. 30-38, 2019.

SONG, A. *et al.* Oxidized multiwalled carbon nanotubes coated fibers for headspace solid-phase microextraction of amphetamine-type stimulants in human urine. **Forensic Science International**, v. 290, p. 49-55, 2018.

SONG, X.-Y. *et al.* Different configurations of carbon nanotubes reinforced solid-phase microextraction techniques and their applications in the environmental analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 86, p. 263-275, 2017.

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

SOUZA, I. D. **Desenvolvimento de fases monolíticas de sílica híbrida para microextração em sorvente empacotado (MEPS) de fármacos em amostras de plasma e análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS)**. 2016. 124 f. (Dissertação) - Faculdade de Filosofia Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

SOUZA, I. D. *et al.* Innovative extraction materials for fiber-in-tube solid phase microextraction: A review. **Anal Chim Acta**, v. 1165, p. 238110, 2021.

SPIETELUN, A. *et al.* Current trends in solid-phase microextraction (SPME) fibre coatings. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 11, p. 4524-4537, 2010.

STAHL, S. M. Beyond the dopamine hypothesis of schizophrenia to three neural networks of psychosis: dopamine, serotonin, and glutamate. **CNS Spectr**, v. 23, n. 3, p. 187-191, 2018.

STEFANELLI, F. *et al.* 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. **Biomedical Chromatography**, v. 32, n. 4, p. e4136, 2018.

TANDON, R. *et al.* Schizophrenia, “just the facts” 4. Clinical features and conceptualization. **Schizophrenia Research**, v. 110, n. 1, p. 1-23, 2009.

TANDON, R. *et al.* Schizophrenia, Just the Facts. Treatment and prevention Past, present, and future. **Schizophrenia Research**, v. 122, n. 1, p. 1-23, 2010.

THOSTENSON, E. T. *et al.* Advances in the science and technology of carbon nanotubes and their composites: a review. **Composites Science and Technology**, v. 61, n. 13, p. 1899-1912, 2001.

TROJANOWICZ, M. Analytical applications of carbon nanotubes: a review. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, n. 5, p. 480-489, 2006.

VAGHELA, A. *et al.* Sample preparation in bioanalysis: a review. **International Journal of Scientific Technology Research**, v. 5, n. 05, p. 6-10, 2016.

WANG, J.-X. *et al.* Multiwalled carbon nanotubes coated fibers for solid-phase microextraction of polybrominated diphenyl ethers in water and milk samples before gas chromatography with electron-capture detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1137, n. 1, p. 8-14, 2006.

WANG, S. *et al.* Multi-residue determination of pesticides in water using multi-walled carbon nanotubes solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1165, n. 1, p. 166-171, 2007.

WONG, A. S. Y. *et al.* Doping control analysis of antipsychotics and other prohibited substances in equine plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 1147, p. 122132, 2020.

WU, F. *et al.* Single-walled carbon nanotubes coated fibers for solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometric determination of pesticides in Tea samples. **Talanta**, v. 82, n. 3, p. 1038-1043, 2010.

XU, R. N. *et al.* Recent advances in high-throughput quantitative bioanalysis by LC–MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, n. 2, p. 342-355, 2007.

YAMADA, K. *et al.* Identification of Multiple Serine Racemase (SRR) mRNA Isoforms and Genetic Analyses of SRR and DAO in Schizophrenia and d-Serine Levels. **Biological Psychiatry**, v. 57, n. 12, p. 1493-1503, 2005.

YANG, L. *et al.* Sorbent, device, matrix and application in microextraction by packed sorbent (MEPS): a review. **Journal of Chromatography B**, v. 1043, p. 33-43, 2017.

YANG, L. *et al.* Sorbent, device, matrix and application in microextraction by packed sorbent (MEPS): A review. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 1043, p. 33-43, 2017.

YU, H. *et al.* Ionic liquid and polymeric ionic liquid coatings in solid-phase microextraction. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 45, p. 219-232, 2013.

ZHANG, L. *et al.* Multi-residue analysis of sedative drugs in human plasma by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **J Chromatogr B**, v. 1072, p. 305-314, 2018.

ZHANG, W. *et al.* Polymer-Functionalized Single-Walled Carbon Nanotubes as a Novel Sol–Gel Solid-Phase Micro-extraction Coated Fiber for Determination of Poly-brominated Diphenyl Ethers in Water Samples with Gas Chromatography–Electron Capture Detection. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 8, p. 2912-2920, 2009.

ZHAO, H. *et al.* Adsorption behavior and mechanism of chloramphenicols, sulfonamides, and non-antibiotic pharmaceuticals on multi-walled carbon nanotubes. **Journal of Hazardous Materials**, v. 310, p. 235-245, 2016.

ZNALEZIONA, J. *et al.* Determination and identification of synthetic cannabinoids and their metabolites in different matrices by modern analytical techniques – a review. **Anal Chim Acta**, v. 874, p. 11-25, 2015.

ANEXOS



ANEXO A

Analytical and Bioanalytical Chemistry (2020) 412:2465–2475
<https://doi.org/10.1007/s00216-020-02464-4>

RESEARCH PAPER



Restricted access carbon nanotube for microextraction by packed sorbent to determine antipsychotics in plasma samples by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

Jonas Carneiro Cruz¹ · Henrique Dipe de Faria² · Eduardo Costa Figueiredo² · Maria Eugênia Costa Queiroz¹

Received: 11 December 2019 / Revised: 15 January 2020 / Accepted: 28 January 2020 / Published online: 5 February 2020
 © Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

Abstract

This manuscript describes the development of the restricted access carbon nanotube (RACNT) as a selective stationary phase for microextraction by packed sorbent (MEPS) to determine antipsychotics (chlorpromazine, clozapine, olanzapine, and quetiapine) in untreated plasma samples from schizophrenic patients by ultra-high liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC–MS/MS). The synthesis was achieved by chemically covering commercial multi-walled carbon nanotubes with bovine serum albumin (BSA) to subsequently pack the material in a polyethylene conical tube (1000 μL). The RACNTs' sorbents were able to exclude about 97% of the plasma proteins, maintaining the same performance for about 100 assays. The MEPS variables (sample pH, draw–eject cycles, desorption and phase cleanup) were evaluated to improve sensibility and selectivity. The MEPS/UHPLC–MS/MS method was linear at concentrations ranging from the lower limit of quantification (10.0 ng mL^{-1}) to the upper limit of quantification (200–700 ng mL^{-1}) with coefficients of determinations higher than 0.99. The precision assays presented relative standard deviation (RSD) values lower than 13%, and the accuracy assays presented relative error (RE) values that ranged from –8.01 to 11.53%. Neither significant matrix effects nor carryover was observed. The developed method was successfully applied to determine antipsychotics drugs for therapeutic drug monitoring of schizophrenic patients.

Keywords Restricted access carbon nanotubes · Microextraction by packed sorbent · Antipsychotics · UHPLC–MS/MS

Introduction

Schizophrenia is recognizably a severe and chronic psychiatric disorder that affects approximately 0.5% of the world's general population [1, 2]. Antipsychotics are the first-line evidence-based treatment for schizophrenia. These drugs are usually prescribed to implement rehabilitation programs and to manage the risk of new psychotic episodes [3–5]. In routine

clinical practice, the antipsychotic drugs can be classified in first-generation antipsychotics (FGAs) (such as haloperidol and chlorpromazine) and second-generation antipsychotics (SGAs) (including clozapine, quetiapine) [6].

In most cases, the effectiveness of treatment and side effects of the antipsychotic drugs are dose-related and the plasma concentrations of these drugs can vary widely between patients due to their interindividual variability [7]. In this context, therapeutic drug monitoring (TDM) of antipsychotic drugs is essential for managing the patient's medication strategy. TDM constitutes an important resource to evaluate the adherence to therapy, increasing the therapeutic efficiency and minimizing the risk of side effects or toxicity [8, 9]. Therefore, sensitive and selective bioanalytical methods are required to carry out reliable determinations. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) has been used as the reference analytical technique to determine antipsychotic drugs and their metabolites in biological samples for TDM purposes [10].

✉ Maria Eugênia Costa Queiroz
 mariaeqn@fêlfp.usp.br

¹ Departamento de Química – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo 14040-901, Brazil

² Laboratory of Toxicant and Drug Analyses - LATF, Gabriel Monteiro da Silva St. 700, Federal University of Alfenas – Unifal-MG, Alfenas, MG 37130-000, Brazil

ANEXO B

Analytica Chimica Acta xxx (xxxx) 340160



Contents lists available at ScienceDirect

Analytica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aca

Magnetic restricted-access carbon nanotubes for SPME to determine cannabinoids in plasma samples by UHPLC-MS/MS

Jonas Carneiro Cruz^a, Mariana Azevedo Rosa^b, Lucas Morés^c, Eduardo Carasek^c,
José Alexandre de Souza Crippa^d, Eduardo Costa Figueiredo^b, Maria Bugênia Costa Queiroz^{a,*}

^a Departamento de Química – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, 14040-901, Brazil

^b Laboratory of Toxicant and Drug Analysis - LATA, Gabriel Monteiro de Silva St. 700, Federal University of Alfenas - Unifal-MG, 37130-000, Alfenas, MG, Brazil

^c Departamento de Química - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 68040-900, SC, Brazil

^d Department of Neuroscience and Behavior, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 May 2022

Received in revised form 5 July 2022

Accepted 7 July 2022

Keywords:

Magnetic restricted-access carbon nanotubes

Solid-phase microextraction

Cannabinoids

LC-MS/MS

Magnetic coating

ABSTRACT

This manuscript describes the development of magnetic restricted-access carbon nanotubes (M-RACNTs) for use as SPME sorbent to determine cannabidiol (CBD) and delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) in human plasma samples by UHPLC-MS/MS. The adsorptive phase was immobilized on an SPME device by electromagnetic interactions between the M-RACNTs and a cylindrical neodymium magnet (3-mm diameter x 8-mm height) attached to a stainless-steel rod (3-mm diameter x 40-mm height). The M-RACNTs were synthesized by incorporating Fe₃O₄ magnetic nanoparticles (MNPs) into commercial carbon nanotubes (CNTs); then the surface of the resulting sorbent was further coated with a layer of bovine serum albumin (BSA). Characterization techniques (SEM, FTIR, and Zeta potential) confirmed the presence of both MNPs and BSA layer dispersed through the structure of the CNTs. The M-RACNTs presented adequate sorption capacity, stable physical/chemical characteristics, and appropriate magnetic properties. Protein exclusion capacity (about 98.5%) was attributed to the chemical diffusion barrier created by the BSA network at the outer surface of the sorbent. The SPME parameters (sample pH, equilibrium time, and desorption conditions) were optimized by design of experiments (fraction factorial planning). The method (validated according to the FDA guidelines) presented adequate selectivity and linearity (coefficient of determination higher than 0.99) at concentrations ranging from the lower limit of quantification (LLOQ) (10 ng mL⁻¹) to the upper limit of quantification (ULOQ) (300 ng mL⁻¹) for both CBD and THC. Precision and accuracy varied from 4.47 to 19.84% (LLOQ) and -6.90 to 17.78% (ULOQ), respectively. Carry-over and matrix effect were not significant. The method was successfully applied to determine plasmatic CBD levels in healthy volunteers attending a single session of oral drug administration and THC levels in frequent cannabis smokers.

© 20XX

1. Introduction

After the endocannabinoid system was discovered [1], the phytocannabinoids present in the *Cannabis sativa* plant (especially CBD and THC) have been recognized as potential therapeutic targets for several diseases [2]. Therapeutic drug monitoring (TDM) of cannabinoids is essential for managing the patient's medication strategy, increasing the therapeutic efficiency and minimizing the risk of adverse events [3,4]. Therefore, reliable bioanalytical methods are required for accurately and sensitively determining these drugs in biological fluids [3,5].

In this scenario, ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) has been applied as the

analytical reference technique to determine cannabinoids and their metabolites in biological samples [5,6]. Most of these methods use conventional sample preparation techniques, such as solid-phase extraction (SPE) [7,8] and liquid-liquid extraction (LLE) [9,10]. However, these procedures have recently been replaced with miniaturized techniques, such as solid-phase microextraction (SPME), to minimize the organic solvent consumption, and sample volume [11,12].

SPME is a non-exhaustive sample preparation technique based on the partition equilibrium of the target analytes between the matrix and a solid sorbent, thus a selective sorbent is critical to obtain sensitive analytical methods. Therefore, lab-made production of fibers with task-specific coating [13], including molecularly imprinted polymers (MIPs) [14], ionic liquids [15], and mainly, CNTs [16] have been developed for SPME.

* Corresponding author.

E-mail address: mariaqueiroz@ffclrp.usp.br (M.E.C. Queiroz).

<https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.340160>

0003-2670/© 20XX

ANEXO C

Sustainable Chemistry and Pharmacy 21 (2021) 100431



Contents lists available at ScienceDirect

Sustainable Chemistry and Pharmacy

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/scp>

Recent advances in column switching high-performance liquid chromatography for bioanalysis

Jonas Carneiro Cruz^a, Israel Donizeti de Souza^a, Caroline Fernandes Grecco^a, Eduardo Costa Figueiredo^b, Maria Eugênia Costa Queiroz^{a,*}^a Departamento de Química, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 14040-901, Brazil
^b Laboratory of Toxicant and Drug Analysis, Federal University of Alfenas - UNIFAL-MG, Alfenas, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Column switching liquid chromatography
Online sample preparation
High-performance liquid chromatography
Bioanalysis

ABSTRACT

Bioanalysis is a relevant area of analytical chemistry for clinical studies. Biological samples are complex and diverse, so sample preparation represents a challenge when chromatographic methods are developed. According to the principles of green analytical chemistry (GAC), recent trends in sample preparation include miniaturization, automation (online coupling to the analytical instrument), and high-throughput performance. In this context, column switching liquid chromatography stands out as a multidimensional chromatographic method in which an extraction column is directly coupled to high-performance liquid chromatography (HPLC) systems. This online method consists of two steps and involves two columns, the extraction and the chromatographic columns. In the former column, the analytes are isolated from the sample and preconcentrated; in the latter column, the analytes are separated. Online systems improve the sensitivity and accuracy of analytical methods, consume lower amounts of organic solvents, and minimize sample handling. This review summarizes state-of-the-art column switching liquid chromatography and focuses on selective stationary phases for preconcentration of analytes (first dimension), including reversed phases, monolithic phases, restricted access materials (RAMs), and molecularly imprinted polymers (MIP). Principles, instrumental aspects, applications in bioanalysis, and future trends in column switching liquid chromatography are also discussed.

1. Introduction

Bioanalysis, an area of analytical chemistry, is applied in medical diagnosis, clinical treatment, anti-doping tests, studies on biomarkers, and forensic and pharmacokinetic investigations (Ocaña-González et al., 2016). However, analyzing target molecules in biological samples is no easy task: analytes often exist at trace levels and must be isolated from complex biological matrices at an adequate level, so that they can be quantified without interferences (Nazario et al., 2017). Previous sample preparation is required even for the most sensitive and selective analytical instruments.

Sample preparation is the most complex and polluting step in analytical chemistry (Tobiszewski et al., 2009). Conventional extraction techniques based on solid or liquid sorbents have been employed, but

they involve manual procedures and demand large solvent and sample volumes, thereby exposing the analyst to biological hazards and toxic reagents. Additionally, manual procedures are repetitive and time-consuming, which may result in occupational diseases, errors, and reproducibility loss. Therefore, the scientific community has engaged in developing safer strategies that comply with the principles of green analytical chemistry (GAC).

GAC, a concept originating from green chemistry, recommends the use of safer analytical procedures with low environmental impact (Silveira et al., 2019). When it comes to adjusting the analysis to the GAC concept, sample preparation is the most critical step in the analytical sequence. Miniaturized sample preparation techniques like solid and liquid phase microextraction consume lower amounts of reagents (Armenta et al., 2019; Ocaña-González et al., 2016; Spietelun et al.,

Abbreviations: AD6, Alkyl-diol-silica; BSA, Bovine serum albumin; GAC, Green analytical chemistry; LC, Liquid chromatography; LC-MS/MS, Liquid chromatography-tandem mass spectrometry; LOD, Limit of detection; LOQ, Limit of quantification; MIP, Molecularly imprinted polymer; RACNT, Restricted access to carbon nanotubes; RAMIP, Restricted access molecularly imprinted polymer (RAMIP); RAMs, Restricted access materials; RP, Reversed-phase; TDM, therapeutic drug monitoring; THCOOH, 11-Nor-9-carboxy- Δ^8 -tetrahydrocannabinol; UV, Ultraviolet.

* Corresponding author.

E-mail address: mariaeqn@fclrp.usp.br (M.E.C. Queiroz).<https://doi.org/10.1016/j.scp.2021.100431>

Received 26 November 2020; Received in revised form 12 March 2021; Accepted 3 April 2021

Available online 28 April 2021

2352-5541/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

ANEXO D

Journal of Chromatography A 1668 (2022) 462925



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma

Review article

Current advances and applications of online sample preparation techniques for miniaturized liquid chromatography systems

Jonas Carneiro Cruz^a, Israel Donizeti de Souza^a, Fernando Mauro Lanças^b,
Maria Eugênia Costa Queiroz^{a,*}^aDepartamento de Química—Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo 14040-900, Brazil^bUniversity of São Paulo, São Carlos, Institute of Chemistry of São Carlos, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 January 2022

Revised 25 February 2022

Accepted 27 February 2022

Available online 1 March 2022

Keywords:

Capillary-LC-MS/MS

Nano-LC-MS/MS

Sample preparation

Miniaturization

ABSTRACT

Miniaturized liquid chromatography (LC) has been recognized as one of the most important analytical methods in several research fields. Reduced analytical work-scale provides superior chromatographic resolution and decreases sample and organic solvent consumption. However, frequent clogging of tubing connections and use of small sample volumes are significant limitations when high throughput and sensitive analyses are required. Effective sample preparation could help to overcome these limitations. On-line coupling of sample preparation techniques (such as column switching and in-tube solid-phase microextraction) with these miniaturized systems may result in more sensitive and reproducible analyses, improving analytical efficiency. This review describes the most common online miniaturized LC configurations, and the main applications of current online sample preparation techniques coupled to miniaturized LC systems in the bioanalytical, omics, and environmental areas. Relevant features, and challenges of these systems, and innovative sorbents, including restricted access materials, monoliths, and immunosorbents is also discussed.

© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The term miniaturized liquid chromatography (LC) describes chromatographic techniques that use columns with internal diameter (i.d.) below 1.0 mm [1,2]. To categorize miniaturized systems, authors have proposed several classifications correlating the chromatographic column i.d. and the mobile phase flow rate [1,3–5]. Fig. 1 illustrates the most popular and widely used denomination based on the chromatographic column inner diameter. According to this denomination, chromatography systems that employ columns with i.d. ranging from 100 to 500 μm (flow rate ranging from 1 to 10 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) are called capillary-liquid chromatography (cap-LC), whereas systems that use columns with i.d. less than 100 μm (flow rate ranging from 10 to 1000 $\text{nL}\cdot\text{min}^{-1}$) are called nano-liquid chromatography (nano-LC) [2].

Theoretical maximum injection volumes handled by cap-LC and nano-LC systems are in the range of a few microliters (usually less than 2 μL) and nanoliters (usually less than 5 nL), respectively. Considering that chromatographic columns have small dimensions and that mobile phase flow rates are reduced in these systems,

small volumes are needed to obtain narrow chromatographic peaks [1,4].

Small-i.d. chromatographic columns require reduced sample volumes and low mobile phase flow rates: the degree of band dilution (radial dilution) on the chromatographic column is reduced, enhancing mass sensitivity. Other benefits of these columns include minimum solvent and additive volume requirements, which agree with the principles of green analytical chemistry. Moreover, compared to conventional LC columns, small-i.d. chromatographic columns dissipate heat better, which facilitates temperature control and improves analytical performance [1,6].

Advances in detector instrumentation (including the development of efficient interfaces to couple LC with a suitable detector) have followed the LC system's miniaturization. In this context, mass spectrometry (MS) is considered a powerful detection technique for miniaturized LC. This system presents high selectivity, sensitivity, and the ability to generate additional chemical structural information, mainly when MS in tandem (MS/MS) is applied. Moreover, low mobile phase flow rates are ideal for mass spectrometry (MS) detection because spray droplet sizes are reduced, thereby increasing electrospray ionization (ESI) efficiency [1,6]. Despite MS has become an ideal detector for miniaturized LC, other techniques such as laser-induced fluorescence (LIF) have also been

* Corresponding author

E-mail address: mariaeqn@fcrp.usp.br (M.E.C. Queiroz).