

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA
DETERMINAÇÃO DE CANABINOIDES SINTÉTICOS EM AMOSTRAS DE
PLASMA BASEADO NA TÉCNICA DE MICROEXTRAÇÃO
LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA (DLLME)**

Talita Cristine Zeferino

Mauricio Yonamine

Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo

talitatzc@usp.br

Objetivos

O presente projeto tem como principal objetivo o desenvolvimento de uma metodologia para a detecção de 11 canabinoides sintéticos em amostras de plasma, utilizando a técnica de microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME), seguida pela cromatografia líquida de alta-performance acoplada ao detector por espectrometria de massas triplo quadrupolo (LC-MS/MS).

Métodos e Procedimentos

O método foi desenvolvido utilizando cromatógrafo líquido de alta pressão (LC/MS), acoplado a um espectrômetro de massa de quadrupolo triplo modelo LC-MS/MS 8045, ambos da Shimadzu. Como fase móvel A, utilizou-se formiato de amônio 1 mM e ácido fórmico (999:1, v/v), e para fase móvel B, metanol e ácido fórmico (999:1, v/v). O tempo total de separação cromatográfica foi de 8,5 min. Para a preparação da amostra, inicialmente um pool de analitos e o padrão interno foram adicionados a um tubo de vidro (1,5 mL) nas concentrações desejadas. Em seguida, 200 µL de amostra foram adicionados ao tubo. A solução foi então homogeneizada com o auxílio do vórtex e realizou-se o processo de precipitação de proteínas a partir da adição de 200 µL de acetona, seguindo a proporção 1:1. Essa solução foi novamente homogeneizada em vórtex e, para a extração

dos analitos, 200 µL de acetato de etila (agente extrator) foram inseridos, formando uma solução turva. O tubo foi, por fim, centrifugado a 3.000 rpm durante 5 minutos para sedimentação das gotículas finas de fase extratora e a fase orgânica contendo os analitos foi retirada com o auxílio de uma ponteira de eletroforese e transferida para um vial de 2 mL. O extrato foi então evaporado em fluxo de N₂, ressuspensionado em 50 µL de fase móvel B e transferido para um insert, do qual 10 µL foram injetados no LC/MS-MS para análise (Figura 1).

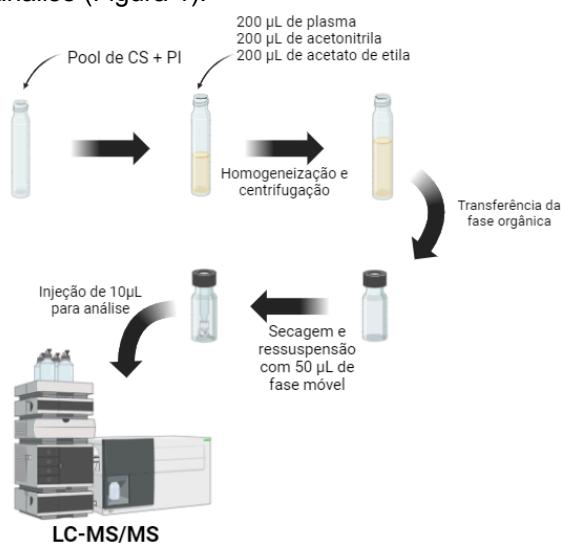


Figura 1. Resumo das etapas da DLLME realizadas no presente projeto. CS: canabinoides sintéticos; PI: padrão-interno.

Resultados

A partir do método cromatográfico definido, foi possível obter o seguinte cromatograma:

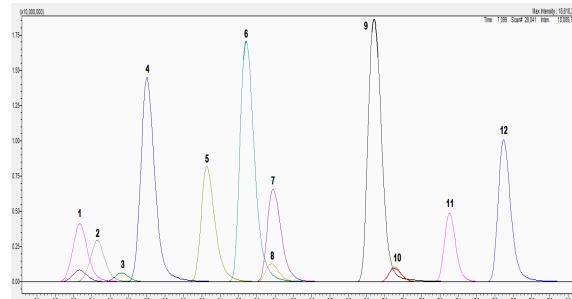


Figura 2. Cromatograma obtido após microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) e detecção por cromatografia líquida-espectrometria de massas triplo quadrupolo (LC-MS/MS) de canabinoides sintéticos em amostras de plasma.

Tendo em vista o cromatograma obtido (Figura 2), verifica-se que as condições espectrométricas e cromatográficas estabelecidas promoveram a identificação dos analitos, conforme pretendido, e observou-se que a utilização do modo MRM (Monitoramento de Reações Múltiplas) proporcionou uma sensibilidade ampliada para os analitos em questão. Na etapa de otimização, a partir da análise dos gráficos de pareto gerados pelo software Minitab®, foi possível observar que o volume de acetonitrila apresentou relevância estatística ($p < 0.05$) (Figura 3), isto é, mostrou-se significativo no desenvolvimento da técnica. Uma vez identificado o fator relevante à técnica, buscou-se definir os volumes de amostra, de acetonitrila e de acetato de etila mais adequados para a extração, os quais, a partir da análise do gráfico de contorno (Figura 4), foram definidos como 200 μ L, uma vez que, para a maioria dos analitos, estes valores permitiram uma extração e detecção dos canabinoides sintéticos em plasma.

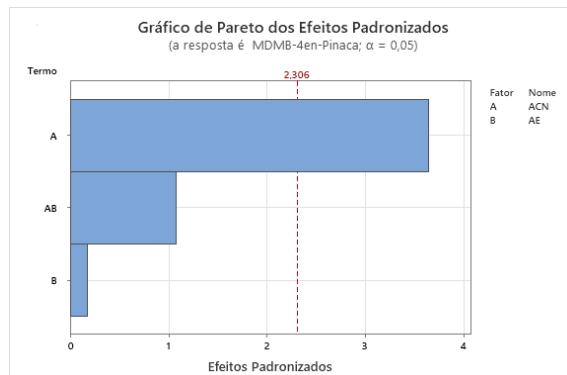


Figura 3. Gráfico de Pareto da MDMB-4en-Pinaca obtido na etapa de otimização da técnica DLLME.

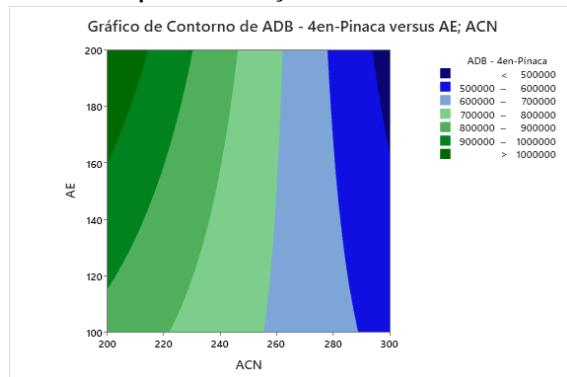


Figura 4. Gráfico de Contorno da ADB-4en-Pinaca referente à otimização dos parâmetros da DLLME.

Conclusões

O método cromatográfico, em conjunto com as informações de m/z de cada analito, foram estabelecidos e a técnica de extração foi definida e otimizada com sucesso. A técnica de DLLME tem se mostrado uma alternativa rápida, barata e prática para a análise de canabinoides sintéticos em plasma. Como próximos passos, planeja-se realizar a validação do método e análises de amostras reais.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer à CAPES/PROCAD (projeto INSPEQT), à FAPESP Processo 2021/09857-8, à CNPq e ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) da USP pela bolsa de estudos concedida. Agradeço também à Profa Dra

Vilma Leyton da Faculdade de Medicina pela disponibilização do LC-MS para realização do estudo.

Referências

- FABRIS, André. Luis & YONAMINE, Mauricio. **Development of a new microextraction technique for the analysis of synthetic cannabinoids in plasma based on the principles of Green Analytical Toxicology.** 2022, *Anais.. Clare*: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. p. S92-S93. 2016.
- ODOARDI, Sara; FISICHELLA, Marco; ROMOLO, Francesco S.; STRANO-ROSSI, Sabina. **High-throughput screening for new psychoactive substances (NPS) in whole blood by DLLME extraction and UHPLC-MS/MS analysis.** *Journal of Chromatography B*. v. 1000. p 57-68. 2015.
- ROQUE-BRAVO, R; SILVA, R.S; MALHEIRO, R.F.; CARMO, H; CARVALHO, F; da SILVA, D.D; SILVA, J.P. **Synthetic Cannabinoids: A Pharmacological and Toxicological Overview.** *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* v. 63, n. 1. p. 187–209. 2023.
- VAIANO, F. et al. **A novel screening method for 64 new psychoactive substances and 5 amphetamines in blood by LC-MS/MS and application to real cases.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 129. p. 441–449. 2016.