



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS TRINDADE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Luisa Raspini e Silva

Síntese e caracterização de nanopartícula magnética funcionalizada com zeólitas: um material biosortivo para extração de canabinoides em amostras de urina de pacientes com suspeita de intoxicação

Florianópolis

2025

Síntese e caracterização de nanopartícula magnética funcionalizada com zeólitas: um material biossortivo para extração de canabinoides em amostras de urina de pacientes com suspeita de intoxicação

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção de título do Mestra em Farmacologia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Camila Marchioni

Florianópolis

2025

Raspini e Silva, Luisa

Síntese e caracterização de nanopartícula magnética funcionalizada com zeólitas: um material bioseletivo para extração de canabinoides em amostras de urina de pacientes com suspeita de intoxicação / Luisa Raspini e Silva ; orientadora, Camila Marchioni, 2024.

77 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Análise Toxicológica de Urgência. 3. Canabinoides. 4. Bioseletivos. 5. Extração em fase sólida magnética dispersiva. I. Marchioni, Camila. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

Luisa Raspini e Silva

Síntese e caracterização de nanopartícula magnética funcionalizada com zeólitas: um material biossortivo para extração de canabinoides em amostras de urina de pacientes com suspeita de intoxicação

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 13 de dezembro de 2024, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof^a. Dr^a. Camila Marchioni.

Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC

Prof^a. Dr^a. Claudia Regina dos Santos.

Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC

Prof. Dr. Eduardo Carasek.

Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre/Mestra em Farmacologia.

Insira neste espaço a
assinatura digital

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a
assinatura digital

Prof^a. Dr^a Camila Marchioni,
Orientadora

Florianópolis, 2025.

*Dedico este trabalho a todos que contribuíram
para meu crescimento pessoal e acadêmico.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha sincera gratidão à minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Camila Marchioni, por todo o apoio, orientação e paciência ao longo desta jornada. Sua expertise, dedicação e incentivo foram fundamentais para o meu crescimento acadêmico e para a realização deste trabalho. Agradeço imensamente pelas valiosas contribuições, pela confiança depositada em mim e pelo compromisso com o meu desenvolvimento profissional. Agradeço também pelas risadas e pelos momentos de descontração que foram essenciais para a leveza desta caminhada. Seu exemplo de excelência será sempre uma inspiração.

Quero dedicar um agradecimento especial à minha família e aos meus amigos, que foram fundamentais ao longo desta trajetória. Agradeço pelo amor, paciência e apoio incondicional que sempre me deram. Sem vocês, não teria sido possível superar os desafios e obstáculos que surgiram ao longo do caminho. À família, agradeço pelo suporte emocional e por sempre estarem ao meu lado, mesmo nos momentos de maior pressão e cansaço. Sem o amor, o cuidado, o conforto e a dedicação de vocês, esse trabalho não teria se tornado realidade.

Aos meus amigos, que sempre acreditaram no meu potencial e estiveram ao meu lado nos momentos de alegria e de dificuldades, sou eternamente grata. Vocês tornaram essa jornada mais leve e significativa. Obrigada por cada palavra de incentivo, por cada risada, e até mesmo pelos momentos de distração, que me ajudaram a manter a sanidade em tempos de pressão. Vocês foram a força extra quando eu mais precisei e o motivo de tantos momentos de alegria.

Muito obrigada a todos vocês, por fazerem parte desta conquista e por estarem comigo nesta fase importante da minha vida.

Por último, agradeço à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da minha bolsa de pesquisa.

“A imaginação é mais importante que o conhecimento, porque o conhecimento é limitado, ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro”.

- Albert Einstein.

RESUMO

Os aspectos legais envolvendo a *Cannabis sativa* estão em debate mundialmente e mudanças nos padrões de consumo são notadas. O aumento nos casos de exposições acidentais, atendimentos de urgência e intoxicações pela droga deixam preocupações sobretudo quanto à população jovem, visto que essa está em modulação neuroanatômica. Com o avanço tecnológico e com a preocupação quanto à sustentabilidade, novas técnicas analíticas rápidas, de fácil aplicabilidade e que atendam à Química Verde se fazem necessárias para a quantificação de canabinoides em amostras biológicas. Uma nova proposta é a utilização da extração em fase sólida magnética dispersiva (DMSPE), a qual baseia-se na manipulação de nanopartículas magnéticas (MNPs) para separação das fases reduzindo o número de etapas sem reduzir a eficiência da extração. Somado a isso, o uso de sorventes naturais como materiais extrativos alternativos e sustentáveis tem promovido avanços importantes em estratégias de preparo de amostras mais ecológicas. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método analítico utilizando fase sortiva magnética funcionalizada com material biossortivo para sorção de canabinoides em amostras de urina de pacientes com suspeita de intoxicação por *Cannabis sativa* recebidas pelo CIATox de Santa Catarina. Foi desenvolvida uma metodologia cromatográfica por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD) para identificação e quantificação de THC e CBD. A fase móvel consistiu em Acetonitrila:Ácido Fórmico 0,1% (80:20, v/v) em fluxo de 1,0 mL/min. Para fase estacionária foi utilizada a coluna C18 (250 x 4,6 mm x 5 µm) e o detector foi ajustado com comprimento de onda entre 190-210 nm. As MNPs foram sintetizadas pelo método de coprecipitação a partir de cloreto férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e de cloreto ferroso tetra hidratado ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), e posteriormente ancoradas à zeólita, fase biossortiva definida como melhor extratora. As MNPs funcionalizadas com zeólitas (MNPs@ZEO) foram caracterizadas por difratometria de raios-x, microscopia eletrônica de varredura e de transmissão, espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR), potencial zeta e tamanho de partícula. Foi realizado planejamento multifatorial para otimização da técnica DMSPE utilizando MNPs@ZEO, definindo a melhor condição experimental como 15 mg de fase sortiva, pH da amostra igual a 7, volume de amostra de 400 µL, 1 minuto de agitação e 250 µL de volume de solvente de dessorção. A metodologia foi validada de acordo com guias bioanalíticos da ANVISA, da UNODC e do SWGTOX obtendo linearidade entre 400 e 4000 ng/mL para CBD e THC. Os valores de exatidão ficaram abaixo de 8,14% e de precisão abaixo de 14,93% para ambos os analitos. O método confirmou-se ser seletivo e não apresentou efeito residual. Por fim, a DMSPE foi aplicada satisfatoriamente na determinação de THC e CBD em amostras reais de pacientes com suspeita de intoxicação por *Cannabis sativa*.

Palavras-chave: nanomaterial; biossorção; canabinoides; zeólita magnética; DMSPE.

ABSTRACT

The legal aspects related to *Cannabis sativa* are under debate worldwide and changes in consumption patterns are noted. The increase in cases of accidental exposure, emergency care and drug poisoning leaves concerns especially regarding the young population, as it is undergoing neuroanatomical modulation. With technological advances and concerns about sustainability, new analytical techniques that are fast, easy to apply and that comply with Green Chemistry are being developed for the quantification of cannabinoids in biological samples. A new proposal is the use of dispersive magnetic solid phase extraction (DMSPE), which is based on the manipulation of magnetic nanoparticles (MNPs) to separate the phases, reducing the number of steps without reducing extraction efficiency. In addition, the use of natural sorbents as alternative and sustainable extractive materials has promoted important advances in more ecological sample preparation strategies. The objective of this work was to develop and validate an analytical method using a magnetic sorption phase functionalized with biosorption material for the sorption of cannabinoids in urine samples from patients suspected of *Cannabis sativa* poisoning from CIATox in Santa Catarina. A chromatographic methodology using high-performance liquid chromatography coupled to a diode array detector (HPLC-DAD) was developed for the identification and quantification of THC and CBD. The mobile phase consisted of Acetonitrile:0.1% Formic Acid (80:20, v/v) at a flow rate of 1.0 mL/min. For stationary phase, the C18 column (250 x 4.6 mm x 5 m) was used and the detector was adjusted to a wavelength between 190-210 nm. The MNPs were synthesized by the coprecipitation method from ferric chloride hexahydrate ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) and ferrous chloride tetrahydrate ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), and subsequently anchored to zeolite, the biosorption phase defined as the best extractor. MNPs functionalized with zeolites (MNPs@ZEO) were characterized by x-ray diffractometry, scanning and transmission electron microscopy, Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), zeta potential and particle size. Multifactorial planning was carried out to optimize the DMSPE technique using MNPs@ZEO, defining the best experimental condition as 15 mg of sorptive phase, sample pH equal to 7, sample volume of 400 μL , 1 minute of agitation and 250 μL of desorption solvent. The methodology was validated according to ANVISA, UNODC and SWGTOX bioanalytical guidelines, obtaining linearity between 400 and 4000 ng/mL for CBD and THC. Accuracy values were below 8,14% and precision below 14.93% for both analytes. The method was confirmed to be selective and showed no residual effect. Finally, DMSPE was satisfactorily applied to determine THC and CBD in real samples from patients suspected of *Cannabis sativa* intoxication.

Keywords: nanomaterial; biosorption; cannabinoids; magnetic zeolite; DMSPE.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura dos fitocanabinoides mais predominantes na Cannabis sativa.....	16
Figura 2. Representação esquemática da DMSPE.....	24
Figura 3. Esquema da síntese das MNPs.....	29
Figura 4. Esquema da funcionalização das MNPs com zeólitas.....	30
Figura 5. A) MNPs em suspensão; B) MNPs@ZEO em repouso; C) MNPs sob ação de campo magnético externo.....	30
Figura 6. Esquema do protocolo de extração na fase avaliativa da fase sortiva.....	32
Figura 7. Esquema do protocolo de DMSPE.....	33
Figura 8. Varredura do comprimento de onda dos padrões analíticos de CBD (A) e THC (B)..	39
Figura 9. Cromatograma dos padrões analíticos em fase móvel de Acetonitrila:Água Milli-Q (90:10, v/v), fluxo de 0,8 mL/min (A) e em fase móvel de Acetonitrila:Ácido fórmico 0,1% (80:20, v/v), fluxo de 1,0 mL/min (B). Concentrações de THC e CBD de 1600 ng/mL em A e 3200 ng/mL em B.....	42
Figura 10. Teste de extração de THC e CBD de amostra de urina enriquecida com padrão analítico de 1600 ng/mL para quatro fases sortivas.....	46
Figura 11. Teste de extração de THC e CBD de amostra de urina enriquecida com padrão analítico para duas fases biossortivas e para C18-E.....	47
Figura 12. Esquema da representação química da ancoragem das MNPs com zeólita (Asanu; Beyene; Befekadu, 2022. Adaptado).....	48
Figura 13. Espectros de FT-IR da zeólita (em preto), das nanopartículas magnéticas (em azul) e das MNPs@ZEO (em vermelho).....	51
Figura 14. Imagens de microscopia eletrônica de varredura das MNPs@ZEO (A) e MNPs (B) e microscopia eletrônica de transmissão das MNPs@ZEO (C e D).....	53
Figura 15. Padrões DRX experimentais e calculados na análise de Rietveld da zeólita (a) e da MNPs@ZEO (b).....	54
Figura 16. Distribuição de potencial zeta (mV) das MNPs@ZEO em água (A) e triplicata do tamanho de partícula das MNPs@ZEO em água (B).....	56
Figura 17. Gráficos de resposta da DMSPE para comparação da taxa de recuperação dos analitos para MNPs funcionalizadas com C18-E e zeólita.....	57
Figura 18. Representação do Diagrama de Pareto dos efeitos para os cinco fatores estudados com significância dos mesmos avaliada com erro padrão de 5%, THC (A) e CBD (B).....	59
Figura 19. Gráficos de superfície de resposta para os analitos estudados, em A e B) THC; C e D) CBD.....	60
Figura 20. Cromatograma de amostra de urina branco (isenta do analito) (A) e do LIQ (B). 63	
Figura 21. Cromatograma da DMSPE aplicada à amostra real.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros da toxicocinética da <i>Cannabis</i>	16
Tabela 2. Alguns exemplos das técnicas analíticas para detecção de canabinoides em amostras biológicas de acordo com a literatura.....	21
Tabela 3. Níveis dos fatores avaliados no planejamento fatorial fracionado 2^{5-1}	33
Tabela 4. Matriz experimental codificada para planejamento fatorial fracionado 2^{5-1}	34
Tabela 5. Níveis dos fatores avaliados no planejamento fatorial completo 2^2	35
Tabela 6. Matriz experimental codificada para planejamento fatorial completo 2^2	35
Tabela 7. Parâmetros avaliados para determinação da fase móvel.....	40
Tabela 8. Parâmetros do teste de eluição em gradiente.....	40
Tabela 9. Medidas, condições e resoluções das colunas cromatográficas avaliadas.....	43
Tabela 10. Características das fases sortivas utilizadas na primeira etapa do método.....	44
Tabela 11. Parâmetros estruturais e microestruturais dos pós de zeólita e MNPs@ZEO obtidos pela análise-Rietveld dos dados DRX (* considerando apenas as fases cristalinas identificadas).....	54
Tabela 12. Principais vantagens da DMSPE utilizando zeólitas em comparação às técnicas convencionais de extração.....	60
Tabela 13. Parâmetros de validação analítica para o método DMSPE.....	61
Tabela 14. Concentrações de CBD e THC em ng/mL encontradas nas amostras reais.....	64

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 EPIDEMIOLOGIA E ASPECTOS LEGAIS.....	15
1.2 FITOCANABINOIDES.....	16
1.3 INTOXICAÇÃO POR CANNABIS.....	19
1.4 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS E PREPARO DE AMOSTRA.....	22
2. OBJETIVOS.....	26
2.1 OBJETIVO GERAL.....	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
3. MATERIAIS E MÉTODO.....	27
3.1 AMOSTRAS BIOLÓGICAS E ASPECTOS ÉTICOS.....	27
3.2 REAGENTES E PADRÕES ANALÍTICOS.....	27
3.3 MÉTODO DE DETECÇÃO CROMATOGRÁFICA.....	28
3.4 SÍNTESE E FUNCIONALIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS (MNPs) - Fe ₃ O ₄ @ZEO ou MNPs@ZEO.....	29
3.5 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS ANCORADAS POR ZEÓLITA.....	31
3.6 MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRA.....	32
3.6.1 Seleção da fase sortiva para protocolo de DMSPE.....	32
3.6.2 Protocolo da DMSPE.....	33
3.6.3 Otimização da DMSPE.....	34
3.7 VALIDAÇÃO ANALÍTICA.....	35
3.7.1 Limite inferior de quantificação (LIQ).....	36
3.7.2 Limite inferior de detecção (LD).....	36
3.7.3 Linearidade.....	36
3.7.4 Exatidão.....	37
3.7.5 Precisão.....	37
3.7.6 Efeito residual.....	37
3.7.7 Seletividade.....	37
3.7.8 Efeito matriz.....	38
3.7.9 Estabilidade.....	38
3.8 APLICAÇÃO DA DMSPE EM AMOSTRAS REAIS.....	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO.....	38
4.1.1 Determinação das condições do detector de arranjo de diodos (DAD).....	38
4.1.2 Determinação das condições cromatográficas.....	39
4.1.3 Determinação da composição da fase estacionária.....	42
4.2 DETERMINAÇÃO DA FASE SORTIVA PARA O PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DMSPE.....	43

4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS ANCORADAS ÀS ZEÓLITAS (MNPs@ZEO).....	48
4.3.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR).....	48
4.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	50
4.3.3 Difractometria por raios X (DRX).....	51
4.3.4 Potencial zeta e tamanho de partícula.....	53
4.4 ANÁLISE E OTIMIZAÇÃO DA DMSPE COM MNPs@ZEO.....	54
4.4.1 Extração em fase sólida magnética dispersiva.....	54
4.4.2 Planejamento Multifatorial Fracionado 25-1 para otimização do protocolo de DMSPE.....	56
4.4.3 Planejamento Fatorial Completo.....	57
4.5 VALIDAÇÃO ANALÍTICA.....	59
4.5.1 Limite inferior de quantificação (LIQ) e Limite inferior de detecção (LD).....	59
4.5.2 Linearidade.....	59
4.5.3 Exatidão.....	59
4.5.4 Precisão.....	60
4.5.5 Efeito residual.....	60
4.5.6 Seletividade.....	60
4.5.7 Efeito matriz.....	61
4.5.8 Estabilidade.....	62
4.6 APLICAÇÃO DA DMSPE EM AMOSTRAS REAIS.....	62
5. CONCLUSÃO.....	62
REFERÊNCIAS.....	64

1. INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA E ASPECTOS LEGAIS

A *Cannabis sativa*, denominada popularmente como maconha, é a droga ilícita mais consumida no mundo de acordo com o Relatório Mundial sobre drogas de 2024 do Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime (UNODC, 2024), somando 228 milhões de usuários. No Brasil, o consumo de maconha segue o padrão internacional, tendo jovens e adultos como os maiores consumidores (Bastos *et al.*, 2017).

Por outro lado, a *Cannabis sativa* vem sendo utilizada por muitos anos para alívio de dores e convulsões. Desde a década de 1990, cresceu-se o interesse pelo potencial medicinal da planta através de extratos e produtos farmacêuticos contendo fitocanabinoides. Esse interesse aumentou depois da descoberta do sistema endocanabinoide (Amin; Ali, 2019). O uso da *Cannabis* medicinal tem mostrado eficácia para dor crônica, epilepsia, espasticidade associada à esclerose múltipla, além de alguns canabinoides serem sugeridos como antieméticos para o tratamento de náuseas e vômitos induzidos por quimioterapia em pacientes que não respondem aos medicamentos tradicionais (Herbert; Hardy, 2021).

No cenário brasileiro, embora a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) tenha aprovado a regulamentação de produtos de *Cannabis sativa* para fins medicinais no país (BRASIL, 2019b), a descriminalização e a legalização ainda estão em discussão e o consumo da droga só cresce todo ano (Duarte, 2021). Em 2022, a ANVISA publicou a autorização sanitária de mais um produto medicinal à base de *Cannabis* através da Resolução nº 3.893, de 24 de novembro de 2022, chegando a 23 o número de produtos autorizados. O embasamento para a autorização desses produtos se dá pela RDC nº 327/2019, que estabelece que os produtos de *Cannabis* contendo como ativos exclusivamente derivados vegetais ou fitofármacos da *Cannabis sativa*, devem possuir predominantemente, canabidiol (CBD) e não mais que 0,2% de tetrahydrocannabinol (THC) (ANVISA, 2022).

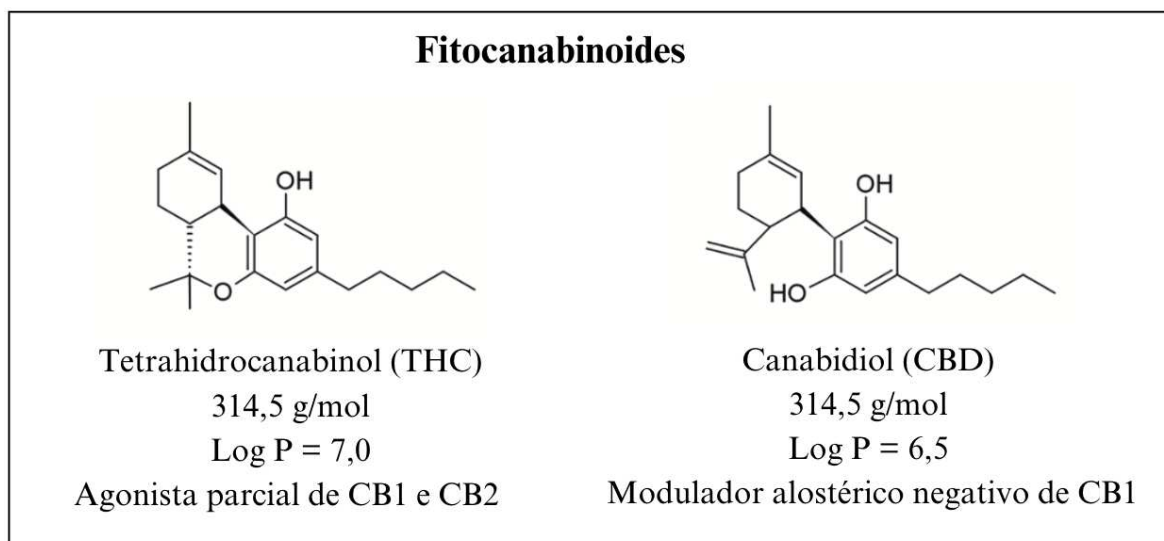
Por outro lado, quanto à discussão da legalização da droga, alguns estudos apontam o crescimento do consumo recreativo por adolescentes e dos casos de intoxicação por *Cannabis* em países e estados que promoveram políticas de descriminalização ou legalizaram o uso medicinal da *Cannabis* (Wadsworth; Hammond, 2019; Gaudet *et al.*, 2022). Essa ampliação do uso de *Cannabis* aumentou concomitantemente as exposições acidentais na

população pediátrica e os atendimentos de urgência relacionados a esses pacientes (Chen; Klig, 2019).

1.2 FITOCANABINOIDES

A *Cannabis* é conhecida por suas propriedades psicoativas e possui mais de 500 compostos elucidados, entre eles flavonoides, terpenos, ácidos graxos e fitocanabinoides, sendo estes os compostos ativos da planta. Dentre eles, o delta 9-tetrahydrocannabinol (THC) e o canabidiol (CBD) são os canabinoides mais investigados devido seus efeitos e potenciais terapêuticos (Figura 1) (Amin; Ali, 2019). Os fitocanabinoides estão sob a forma de seus ácidos carboxílicos correspondentes na planta *in natura*, sendo necessária sua descarboxilação para produção de seus efeitos psicoativos. A descarboxilação pode ocorrer de forma espontânea durante o processo de secagem e armazenamento, e sobretudo durante a pirólise, quando a *Cannabis* é fumada. Além disso, os fitocanabinoides são termo e fotossensíveis, podendo os produtos à base de *Cannabis* perderem a potência ao longo do tempo dependendo das condições de armazenamento (Sannikova, 2020; Franco *et al.*, 2022).

Figura 1. Estrutura dos fitocanabinoides mais predominantes na *Cannabis sativa*.



Fonte: Inamassu; Raspini e Silva; Marchioni. Adaptado, 2024.

As preparações de *Cannabis* são normalmente consumidas via pulmonar, por meio do fumo de cigarros, cachimbos ou vaporizadores, via oral, pela ingestão de produtos comestíveis contendo canabinoides, ou via sublingual para o uso medicinal. A forma que a *Cannabis* é utilizada impacta diretamente em sua toxicocinética (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros da toxicocinética da *Cannabis*.

Via de administração	Velocidade de absorção	Biodisponibilidade (%)		Início dos efeitos (min)	Duração dos efeitos (horas)
		THC	CBD		
Oral	Lenta e irregular	4-12	6-19	30-60	4-6
Pulmonar	Rápida	10-35	11-45	6-10	1-3
Sublingual	Rápida	10-35	13-35	15-45	2-6

Fonte: Lucas; Galettis; Schneider, 2018; Chayasirisobhon, 2020; Millar *et al.*, 2018; Wong; Baum, 2019. Adaptado, 2024.

Quando fumada, o THC e o CBD são absorvidos nos pulmões, seguindo para a corrente sanguínea dentro de 6 a 10 minutos e atingindo o nível plasmático máximo dentro de 3 a 10 minutos após o início do ato de fumar. A biodisponibilidade para o THC inalado é, em geral, entre 10-35%, sendo variável. Essa diferença é atribuível à variabilidade intra e intersujeitos nas características inalatórias (número, duração e intervalo de inalações, tempo de apneia, volume de inalação), dispositivo utilizado, tamanho das partículas inaladas e local de deposição no sistema respiratório. Já o CBD apresenta uma biodisponibilidade de 11-45% quando inalado, um pouco maior em relação ao THC (Lucas; Galettis; Schneider, 2018; Chayasirisobhon, 2020).

Quando a *Cannabis* é ingerida, através do consumo de produtos alimentícios, uma grande parcela do THC e do CBD é degradada pelo ácido estomacal e pelos microrganismos presentes no trato gastrointestinal. A porção restante desses fitocanabinoides atinge o fígado, onde ocorre o metabolismo de primeira passagem. Os fitocanabinoides e seus produtos de biotransformação serão absorvidos posteriormente na porção superior do intestino delgado, sendo a biodisponibilidade do THC de 4 a 12% e do CBD de 6%, alcançando a concentração plasmática máxima após 1 a 2 horas da ingestão (Lucas; Galettis; Schneider, 2018; Chayasirisobhon, 2020). Por último, tem-se a via sublingual. A mucosa sublingual é rica em vasos sanguíneos proporcionando uma absorção mais rápida em comparação com outras vias, permitindo a absorção direta na corrente sanguínea (Millar *et al.*, 2018).

Uma vez absorvido, o THC é ligado às proteínas plasmáticas em cerca de 97%, principalmente às lipoproteínas, e é rapidamente distribuído para os tecidos altamente vascularizados, como coração, pulmão, cérebro, rins e fígado, podendo ser armazenado no tecido adiposo. Devido sua alta lipofilicidade, o THC atravessa facilmente a barreira placentária, sendo excretado no leite materno. O THC é biotransformado pelo complexo enzimático do sistema microsômico do citocromo P-450 (CYP) e seus principais produtos de

biotransformação são o 11-hidroxi-tetrahydrocannabinol (11-OH-THC) e o 11-nor-9-carboxi-tetrahydrocannabinol (THC-COOH). Esse último é conjugado com ácido glicurônico e excretado em quantidades significativas na urina. Mais de 65% da *Cannabis* é excretada nas fezes e aproximadamente 20% é excretada na urina. A maior parte da *Cannabis* (80% a 90%) é excretada dentro de 5 dias como produtos de biotransformação hidroxilados e carboxilados (Wong; Baum, 2019).

Os fitocanabinoides atuam nos receptores canabinoides (CB1 e CB2) do sistema endocanabinoide e evidências demonstram que podem atuar também sobre os sistemas dopaminérgico, glutamatérgico e gabaérgico (Bloomfield *et al.*, 2019). O sistema endocanabinoide é uma ampla rede neuromoduladora constituída por substâncias endógenas derivadas do ácido araquidônico, sendo os principais endocanabinoides o N-araquidonoil etanolamina ou anandamida (AEA) e o 2-araquidonilglicerol (2-AG) (Alves *et al.*, 2020). Eles se ligam aos receptores canabinoides CB1 e CB2, os quais pertencem a família de receptores acoplados à proteína G e estão presentes tanto no sistema nervoso central (SNC) quanto no sistema nervoso periférico (SNP) (Amin; Ali, 2019).

O receptor CB1 encontra-se em neurônios pré-sinápticos, medula espinhal e nos gânglios da raiz dorsal. Quando ativado, atua em diferentes mecanismos celulares, tais como inibição de canais de cálcio voltagem-dependentes em neurônios excitatórios e inibitórios, resultando no bloqueio da liberação de neurotransmissores glutamatérgicos e gabaérgicos na fenda sináptica e inibindo a neurotransmissão (Lu; Mackie, 2020). Já o receptor CB2 está localizado sobretudo no SNP, em células do sistema imune, além de estar associado à microglia e a neurônios, particularmente em estados patológicos, sugerindo um papel protetor deste receptor estando associado a neurogênese (Cristino; Bisogno; Di Marzo, 2020).

Ao relacionar o sistema endocanabinoide e o aumento das exposições acidentais de maconha na população jovem, é notória a preocupação quanto ao neurodesenvolvimento desses jovens. Um fator importante, é que a expressão de CB1 atinge seu pico durante o período fetal e na adolescência, períodos associados à remodelação neuroanatômica, e esse potencial dano está relacionado à exposição materna à droga durante a gestação e as exposições agudas entre a população jovem (Bloomfield *et al.*, 2019; Hurd *et al.*, 2019). Sabe-se que os receptores do sistema endocanabinoide estão situados na região cerebral e em crianças essa expressão é aumentada, podendo levar desde um mau neurodesenvolvimento em crianças e adolescentes e até a produção de outros efeitos adversos mais acentuados, como desenvolvimento de transtornos mentais e comprometimento cognitivo (Carvalho *et al.*, 2019; Hurd *et al.*, 2019).

1.3 INTOXICAÇÃO POR *CANNABIS*

O uso de *Cannabis* pode levar a efeitos desejados pelo usuário, mas também a efeitos indesejáveis na fase aguda após o consumo. Além dos efeitos psicóticos e motores provenientes do uso da droga, como sedação, euforia, alteração na percepção de tempo-espaço e coordenação motora diminuída, em casos de intoxicação aguda por *Cannabis*, pode ocorrer problemas cardiorrespiratórios, incluindo a taquicardia, a hipertensão e a taquipneia; gastrointestinais, como náusea e vômitos; e psicóticos, como ansiedade e disforia (Chen; Klig, 2019; Schep *et al.*, 2020). A intoxicação é a manifestação clínica nociva devido ao contato com um agente tóxico, sendo que a intoxicação aguda pode ser decorrente de uma única exposição (dose única) ou de múltiplos contatos (doses repetidas) em um curto período de tempo (geralmente dentro de 24 horas). Ademais, de acordo com a Organização Mundial da Saúde, as intoxicações agudas demandam atendimento rápido, sendo consideradas emergências (WHO, 2020).

Usualmente, a conduta terapêutica em casos de intoxicação leve a moderada é a monitorização dos sinais e sintomas e/ou a administração de benzodiazepínicos para redução da ansiedade e disforia. Já em casos mais graves, que normalmente envolvem a co-exposição com outras drogas, outras intervenções são necessárias (Chen; Klig, 2019). Os casos mais comuns relacionados à intoxicação por maconha ocorrem na própria casa do paciente devido a ingestão acidental, uma vez que a forma comestível da droga (biscoitos e bolos) é muito atraente, sobretudo para crianças e adolescentes. Ainda nesse cenário, a ingestão acidental de produtos medicinais contendo canabinoides levou ao aumento de casos de intoxicação por *Cannabis* na população pediátrica após as mudanças no *status* legal da droga em alguns países, incluindo casos de coma e depressão respiratória (Wong; Baum, 2019).

Um estudo retrospectivo de coorte pediátrico realizado na França em 2017 analisou 24 departamentos de emergência pediátrica, com inclusão de 235 crianças, sendo 71% delas com 18 meses de idade ou menos. Concluiu-se na pesquisa que o número de admissões de crianças com intoxicação por *Cannabis* aumentou mais de 133% em 11 anos. A resina de haxixe (exsudato resinoso seco extraído do tricoma da *Cannabis*) foi a forma majoritariamente ingerida (72%), caracterizando um aumento de casos de intoxicação da população pediátrica simultâneo ao crescimento no consumo da droga e relacionado à descriminalização (Claudet *et al.*, 2017).

No Brasil, intoxicações agudas são escopo dos Centros de Informação e Assistência Toxicológica (CIATox), os quais são especializados em prover informações para o

diagnóstico e auxiliar no tratamento das manifestações tóxicas ocasionadas por substâncias químicas (Costa; Alonzo, 2019). Segundo a Associação Brasileira de Centros de Informação e Assistência Toxicológica e Toxicologistas Clínicos (ABRACIT), existem 32 CIAToxs distribuídos em 22 Unidades Federativas em todo o território nacional (ABRACIT, 2024). Alguns destes centros contam com suporte laboratorial específico para o atendimento de Análises Toxicológicas, as quais são importantes para elucidar a identificação da substância tóxica e auxiliar no manejo da intoxicação (Azevedo, 2010). O CIATox de Santa Catarina (CIATox/SC) tem sede em Florianópolis e é um dos centros que ofertam as Análises Toxicológicas de Urgência, além de atender todo o estado de Santa Catarina (CIATox/SC, 2024a).

De acordo com o CIATox/SC, a exposição à *Cannabis* se distribuiu nas faixas etárias de 0 a 9 anos (16 casos), de 10 a 19 anos (20 casos), 20 a 59 anos (83 casos) e maiores que 60 anos (2 casos), ficando atrás apenas do álcool etílico e da cocaína, quando analisado o grupo de substâncias classificados como drogas de abuso (CIATox/SC, 2024b). Vale ressaltar a preocupação com o número de casos entre as faixas etárias de 0 a 19 anos. Reunindo dados do CIATox/SC, notou-se um aumento de 105,1% nos casos de exposição ao THC registrados pelo centro do ano de 2022 para 2023.

A Análise Toxicológica de Urgência, por auxiliar através de exames de detecção e quantificação de substâncias tóxicas, é normalmente solicitada para confirmação ou exclusão da identificação das mesmas, criando, então, uma margem de segurança para o diagnóstico, para o prognóstico e para o tratamento. Além disso, no atendimento aos casos de intoxicação há uma necessidade de urgência quanto aos resultados dos exames toxicológicos (Moreau; Siqueira, 2017).

É importante que os toxicologistas levem em conta as necessidades locais e implantem novas técnicas que atendam essas necessidades. Atualmente, em Santa Catarina, o Laboratório de Pesquisas Toxicológicas – Unidade II (LPTox II) é um setor da Divisão de Análises Clínicas do Hospital Universitário (HU-UFSC/EBSERH) que realiza os exames laboratoriais que auxiliam o CIATox/SC. O LPTox conta com a disponibilidade de 16 exames toxicológicos validados e aplicados na rotina (LPTox/UFSC, 2024). Um estudo recente constatou que mais da metade dos profissionais do CIATox/SC acreditam que esses testes não são suficientes e relatam a necessidade da implementação de novos exames para identificação e quantificação de medicamentos e drogas de abuso (Neves, 2020). Em casos de intoxicação por *Cannabis sativa*, no LPTox II é realizada a triagem primária de drogas de abuso em urina. Imunoensaios, apesar de serem de rápida execução e necessitar de pouco volume de amostra,

são testes caros que carecem de especificidade e que são suscetíveis a reações cruzadas (Scanferla *et al.*, 2022). Para detecção de canabinoides, o teste imunocromatográfico serve apenas para detecção de THC e seus produtos de biotransformação. A fins de tratamento da intoxicação, o ensaio imunocromatográfico é suficiente, mas para confirmação é necessário um método analítico mais sensível e seletivo, visto que imunoenaios estão associados a falsos-positivos ou falsos-negativos (Antunes; Barroso; Gallardo, 2023).

Diante dos avanços tecnológicos, os métodos cromatográficos vêm sendo empregados para confirmação e quantificação de substâncias presentes em amostras biológicas. Métodos cromatográficos oferecem alta sensibilidade e seletividade, proporcionando uma análise detalhada com baixo consumo de amostra e gerando maior confiabilidade aos resultados obtidos (Scanferla *et al.*, 2022; Antunes; Barroso; Gallardo, 2023; Inamassu; Raspini e Silva; Marchioni; 2024).

Sendo assim, é importante a realização de novas técnicas analíticas rápidas e de fácil aplicabilidade, principalmente para quantificação de canabinoides em amostras biológicas (Moreira e Souza *et al.*, 2021), sobretudo em urina, tendo em vista que essa é a principal via de eliminação de substâncias com elevadas concentrações de produtos de biotransformação, de coleta fácil e não invasiva e que outras amostras biológicas, como o sangue, pode apresentar falso negativo devido ao tempo de ingestão da *Cannabis* (Bordin *et al.*, 2015; Inamassu; Raspini e Silva; Marchioni; 2024; Murray *et al.*, 2016).

1.4 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS E PREPARO DE AMOSTRA

Os métodos cromatográficos têm sido empregados para análises confirmatórias, sobretudo aqueles acoplados a diferentes detectores (Carvalho; Rocha, 2020). Dentre as técnicas cromatográficas mais aplicadas estão a cromatografia gasosa (GC - *gas chromatography*) e a cromatografia líquida (LC - *liquid chromatography*) e podem ser acopladas à detectores como espectrômetro de massas (MS - *mass spectrometry*) e de arranjo de diodo (DAD - *diodo array detection*) (Inamassu; Raspini e Silva; Marchioni, 2024).

Ademais, há escassez de estudos na literatura quanto à identificação e quantificação de canabinoides em amostras biológicas utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD) (Tabela 2), sobretudo em amostras de urina. Vale ressaltar também que não foram encontrados trabalhos que quantificaram THC em matriz biológica utilizando HPLC-DAD a fim de elucidar casos de suspeita de intoxicação por *Cannabis*.

A HPLC é um modelo versátil e amplamente utilizado para cromatografia por eluição, a qual consiste no bombeamento de um solvente líquido pressurizado (fase móvel) que passa por uma coluna preenchida com um material sorvente (fase estacionária) (Hayes *et al.*, 2014; Nahar; Onder; Sarker, 2020).

Tabela 2. Alguns exemplos das técnicas analíticas para detecção de canabinoides em amostras biológicas de acordo com a literatura.

Analito	Amostra	Volume de amostra	Extração	Descrição do método			Referências
				Condições cromatográficas	Sistema de detecção	Comprimento de onda (nm)	
CBD, THC, CBDA, THCA e CBN	Produtos comerciais à base de Cannabis	0,03 - 2,5 g	LLE	FE: MacMod ACE 5 C18-AR (5mm x 4.6 mm x 250 mm) FM: acetonitrila:0,5% ácido acético, pH 2.9 (66:34) Eluição: Isocrática Fluxo: 1,0 mL/min	HPLC-DAD	220 - 307	Ciolino; Ranieri; Taylor, 2018
CBD, CBN, CBG e CBC	Plasma humano e matrizes de roedores	100 µL	LLE	FE: InfinityLab Poroshell® 120 C18 column (4.6 mm × 100 mm, 2.7 µm) FM: água:acetonitrila Eluição: Gradiente Fluxo: 1,0 mL/min	HPLC-DAD	220 - 350	Carona <i>et al.</i> , 2024
CBD e THC	Plasma	400 µL	µ-SPE-PT	FE: Kinetex® C18 (1.7 µm, 2.1 ×100 mm) FM: solução de 5 mmol/L de formiato de amônio (com 0,1% de ácido fórmico):acetonitrila Eluição: Gradiente Fluxo: 0,3 mL/min	UHPLC-MS/MS	Não aplicável	Cruz; Miranda; Queiroz, 2021
CBD e THC	Plasma	300 µL	MSPE	FE: Kinetex® C18 (1.7 µm, 2.1 ×100 mm) FM: solução de 5 mmol/L de formiato de amônio (com 0,1% de ácido fórmico):acetonitrila Eluição: Gradiente Fluxo: 0,3 mL/min	UHPLC-MS/MS	Não aplicável	Cruz <i>et al.</i> , 2022

THC, 11-OH-THC, THCCOOH e CBD	Sangue e urina	200 µL	LLE	FE: Mercury Synergi 4 µm Polar RP (20 x 2.0 mm) e Kinetex C8 analytical (2.6 µm x 50 x 2.1 mm) FM: 0,1% ácido fórmico em água:0,1% ácido fórmico em acetonitrila Eluição: Gradiente Fluxo: 0,3 mL/min	HPLC-MS/MS	Não aplicável	Hädener <i>et al.</i> , 2019.pdf
11-OH-THC, THC, CBD, CBG, CBN, THCV, THCCOOH, THCCOOH-glu, THCVCOOH e CBDCOOH	Urina	1000 µL	SPE	FE: Restek Raptor™ Biphenyl column (100 x 2.1 mm x 2.7 µm) FM: 0,1% ácido fórmico em água:0,1% ácido fórmico em acetonitrila Eluição: Gradiente Fluxo: 0,5 mL/min	HPLC-MS/MS	Não aplicável	Reber <i>et al.</i> , 2021

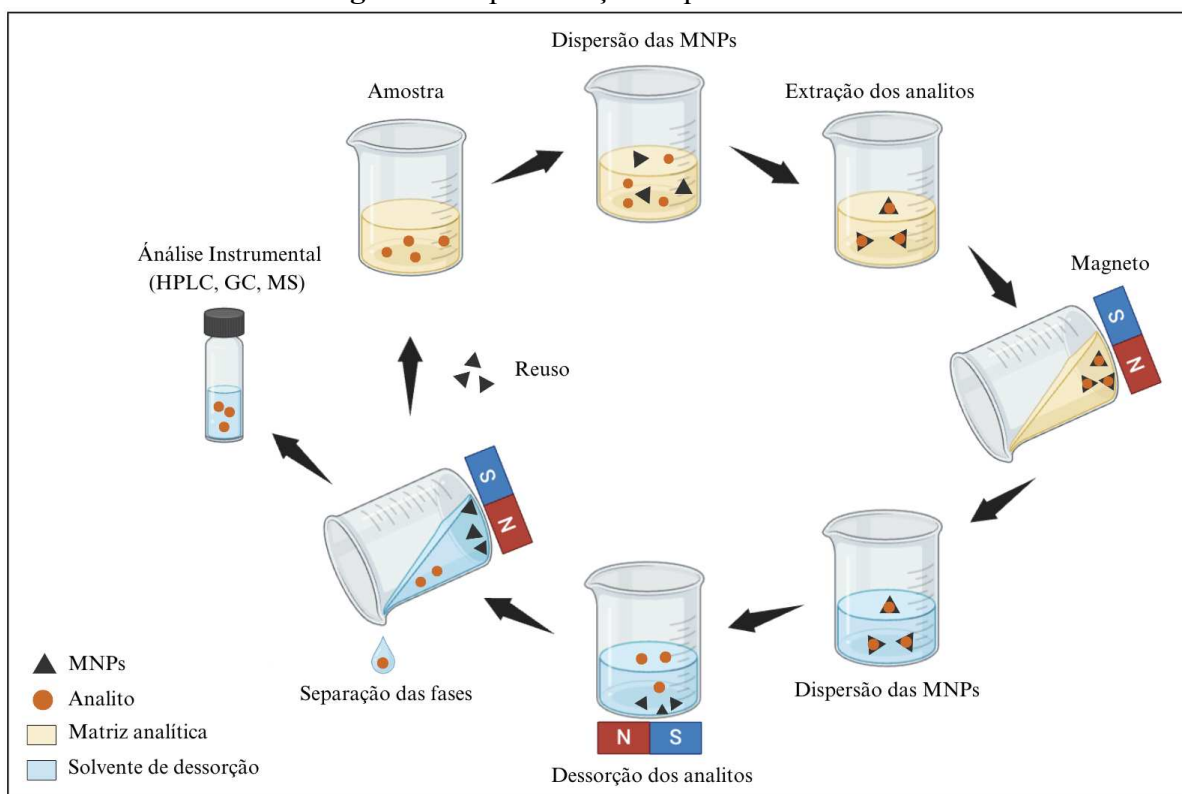
Legenda: CBD = canabidiol; THC = tetrahydrocannabinol; CBDA = ácido canabidiólico; THCA = ácido tetrahydrocannabinol; CBN = canabinol; CBG = canabigerol; CBC = canabicromeno; 11-OH-THC = 11-hidroxi-THC; THCCOOH = 11-nor-9-carboxi-THC; THCV = tetrahydrocannabivarina; THCCOOH-glu = 11-carboxi-THC-glucoronídeo; THCVCOOH = ácido 11-nor-9-carboxi-tetrahydrocannabivarina; CBDCOOH = 7-carboxi-canabidiol; LLE = extração líquido-líquido (do inglês, *liquid-liquid extraction*); µ-SPE-PT = microextração em fase sólida em ponta de pipeta (do inglês, *pipette tip micro-solid phase extraction*); MSPE = extração em fase sólida magnética (do inglês, *magnetic solid phase extraction*); SPE = extração em fase sólida (do inglês, *solid phase extraction*); FE = fase estacionária; FM = fase móvel.

Independentemente do método cromatográfico, é importante a etapa prévia, que consiste no preparo da amostra. Entre as principais e convencionais técnicas de preparo de amostra estão a extração líquido-líquido (LLE - *liquid-liquid extraction*) e a extração em fase sólida (SPE - *solid phase extraction*). Nota-se na Tabela 2 que estas são ainda as técnicas mais utilizadas para a análise de fitocanabinoides, independentemente da matriz analisada. Diversas estratégias têm sido desenvolvidas para diminuir o tempo de análise e a manipulação de amostras, maximizando a pré-concentração dos analitos em matrizes complexas, como as técnicas miniaturizadas (Bordin *et al.*, 2015; Inamassu, Raspini e Silva; Marchioni, 2024).

Como nos últimos anos as técnicas de extração vêm sendo direcionadas para técnicas miniaturizadas, existem ainda outras variações de técnicas, como a extração em fase sólida dispersiva (d-SPE - *dispersive solid phase extraction*), a microextração em fase sólida (SPME - *solid phase microextraction*) e a extração em fase sólida magnética dispersiva (DMSPE – *magnetic dispersive solid phase extraction*) (Figura 2). Neste conceito, a DMSPE baseia-se na manipulação de nanopartículas magnéticas para separação das fases reduzindo o número de etapas sem reduzir a eficiência da extração, uma vez que não é necessário o uso de centrífugas ou sistema de filtração (da Silva *et al.*, 2016). A primeira etapa consiste na

dispersão dos sorbentes na amostra por agitação mecânica para extração dos analitos, os quais são removidos com um magneto após o tempo de equilíbrio. Por fim, esses analitos são eluídos em solvente e seguem para análise (da Silva *et al.*, 2016).

Figura 2. Representação esquemática da DMSPE.



Legenda: MNPs = nanopartículas magnéticas; HPLC = cromatografia líquida de alta eficiência (*high performance liquid chromatography*); GC = cromatografia gasosa (*gas chromatography*); MS = espectrometria de massas (*mass spectrometer*). **Fonte:** Autoria própria, 2024.

As nanopartículas magnéticas (MNPs) são sorventes pertencentes ao grupo dos nanomateriais, possuem propriedades superparamagnéticas e apresentam baixa toxicidade. Em termos gerais, essas partículas são fortemente atraídas quando expostas a um campo magnético externo, mas, uma vez que o campo é removido, elas não apresentam magnetismo residual (Kyeong *et al.*, 2021). As terminologias "núcleo magnético@recobrimento" ou "*core-shell*" se aplicam quando as MNPs consistem em um núcleo rígido com propriedades magnéticas, revestido por uma camada de polímero ou fase sortiva que proporciona a seletividade necessária para a extração dos analitos (da Silva *et al.*, 2016; Kyeong *et al.*, 2021).

Por outro lado, tem-se a proposta da utilização de materiais biossorbitivos em substituição às fases sortivas comerciais. A utilização de sorventes naturais como materiais extrativos alternativos e sustentáveis tem impulsionado avanços significativos em estratégias

de preparo de amostras mais ecológicas. Esses materiais favorecem a miniaturização dos dispositivos de amostragem e diminuem a quantidade de fase sorvente necessária para a extração eficaz de moléculas-alvo, além de oferecerem baixa toxicidade, serem biodegradáveis e baratos (Godage; Gionfriddo, 2020). Dentre esses materiais estão o carvão ativado (Nia; Hadjmohammadi, 2021), serragem (Mallakpour; Sirous; Dinari, 2022), bambu (Yang *et al.*, 2023), fibra de coco (Monhanta *et al.*, 2021) e zeólitas (Kazemi; Javanbakht, 2020).

Com a crescente preocupação em se utilizar métodos analíticos sustentáveis, esses biossorventes têm sido adotados para reduzir o uso de solventes orgânicos em extrações, sobretudo biossorventes de resíduos industriais, que além de ecologicamente favoráveis, atendem aos princípios da Química Verde (Godage; Gionfriddo, 2020). Ainda, outros avanços recentes incluem o desenvolvimento de técnicas como SPE e SPME, que usam menores volumes de solventes e que sigam os princípios da Química Verde. Isso inclui a utilização de estruturas metal-orgânicas (MOFs) e nanopartículas, que são projetadas para aumentar a eficiência de extração e minimizar impactos ambientais (Gionfriddo, 2020; Billiard; Dershem; Gionfriddo, 2020). Nesta linha, pesquisadores têm utilizado compósitos de zeólitas e materiais magnéticos para remoção de corantes de efluentes. Kazemi e Javanbakht desenvolveram um bionanocompósito magnético de alginato de sódio e quitosana impregnado com zeólita natural para remoção do azul de metileno de efluentes (Kazemi; Javanbakht, 2020). Singh *et al.* incorporaram nanopartículas de óxido de ferro à zeólitas para melhorar a remoção de corante vermelho congo de águas residuais (Singh *et al.*, 2022).

Vale ressaltar que os biomateriais utilizados para remover íons metálicos e contaminantes orgânicos de amostras de água, normalmente apresentam extração irreversível, limitada pelo ponto de saturação do material. Ao traduzir estas técnicas para o preparo de amostras biológicas, a aplicação é diferente, pois é necessária uma interação reversível entre o sorvente e o analito, permitindo a dessorção completa antes da análise instrumental (Godage; Gionfriddo, 2020).

Diante do exposto, hipotetizamos que ao desenvolver uma metodologia para extrair canabinoides de amostras de pacientes com suspeita de intoxicação por *Cannabis sativa* por meio da extração em fase sólida magnética dispersiva (DMSPE) utilizando uma fase magnética com material biossortivo, será possível a identificação e quantificação por HPLC utilizando um método de preparo de amostra barato e rápido.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar um método analítico utilizando fase sortiva magnética funcionalizada com zeólita para sorção de canabinoides em amostras de urina de pacientes com suspeita de intoxicação por *Cannabis sativa* acompanhadas pelo CIATox/SC.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um método cromatográfico por HPLC-DAD para análise de THC e CBD;
- Sintetizar fase sortiva magnética funcionalizada com material biossortivo para sorção de canabinoides;
- Caracterizar fase sortiva magnética funcionalizada com zeólita;
- Otimizar as condições de preparo de amostras de urina (DMSPE) para extração de canabinoides;
- Validar o método desenvolvido para análise de canabinoides em amostras de urina com base nos guias nacionais e internacionais;
- Aplicar a metodologia em casos de intoxicações registrados pelo CIATox/SC, a fim de confirmar a aplicabilidade da técnica em casos de suspeita de intoxicação por *Cannabis*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS BIOLÓGICAS E ASPECTOS ÉTICOS

O *pool* de amostras branco (urina) foi obtido junto a Unidade de Laboratório de Análises Clínicas (ULAC) do Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago da Universidade Federal de Santa Catarina (HU-UFSC/EBSERH). Foram utilizadas amostras que seriam descartadas para desenvolvimento e validação do método analítico e todas estavam isentas dos analitos investigados, de acordo com o resultado do Teste de Triagem de Drogas de Abuso. Amostras procedentes de pacientes com suspeita de intoxicação por *Cannabis sativa* (n = 5) foram utilizadas para confirmar a aplicabilidade do método.

Tanto as amostras que foram utilizadas como branco, quanto as amostras procedentes dos pacientes com suspeita de intoxicação não foram coletadas pelos pesquisadores envolvidos neste projeto de pesquisa. Essas amostras foram coletadas na ULAC do HU e analisadas no Laboratório de Pesquisas Toxicológicas do Centro de Ciências da Saúde da UFSC (LPTox I/CCS/UFSC). O estudo (CAAE: 71904423.3.0000.0121) foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC/SC com parecer nº 6.319.248 (Anexo I).

3.2 REAGENTES E PADRÕES ANALÍTICOS

Os padrões analíticos de THC e CBD foram adquiridos da Merck[®] (Texas, USA). Foram preparadas soluções padrão estoques nas concentrações de 200 e 10 µg/mL para cada analito, as quais foram preparadas em acetonitrila e armazenadas a -20°C em frascos âmbar. A partir destas soluções foram preparadas as soluções diluídas nas concentrações de 800; 1600; 5000 ng/mL.

A acetonitrila grau HPLC e o ácido fórmico 85% P.A. foram adquiridos da fornecedora Êxodo Científica[®] (São Paula, Brasil) e da Halogenn[®] (São Paulo, Brasil), respectivamente. A água utilizada foi purificada por sistema Milli-Q[®] (18 ΩM) (Millipore, São Paulo, Brasil). As fases sortivas Strata C18-E e Strata X-AW foram adquiridas do fornecedor Phenomenex Inc[®] (Califórnia, EUA). A fase sortiva Discovery[®] DSC-MCAX foi adquirida da Merck[®] (Darmstadt, Alemanha). A sílica gel foi adquirida da Synth[®] (São Paulo, Brasil). Os materiais biossorbitivos: a serragem não possui dados do fornecedor e a zeólita clinoptolita em pó foi obtida da Arehum Produtos Naturais[®] (São Paulo, Brasil). Os demais - fibra de coco e carvão ativo em pó - foram adquiridos da Petz e Dinâmica Química

Contemporânea LTDA[®] (São Paulo, Brasil), respectivamente. Os produtos utilizados para síntese das nanopartículas magnéticas: cloreto de ferro II tetra hidratado e cloreto de ferro III hexa hidratado foram obtidos da Êxodo Científica[®] (São Paulo, Brasil) e da Neon[®] (São Paulo, Brasil), respectivamente. A N,N-dimetilformamida foi obtida do fabricante Neon[®] (São Paulo, Brasil), o ácido clorídrico 37% da Êxodo Científica[®] (São Paulo, Brasil) e o hidróxido de sódio micropérolas da Dinâmica Química Contemporânea LTDA[®] (São Paulo, Brasil).

3.3 MÉTODO DE DETECÇÃO CROMATOGRÁFICA

Para identificação e quantificação dos analitos foi utilizado o cromatógrafo líquido de alta eficiência da Thermo Fisher SCIENTIFIC[®], com amostrador automático Surveyor Autosampler Plus e detector de arranjos de diodos Surveyor PDA Plus Detector do (LPTox/CCS/UFSC). A coluna utilizada na fase estacionária foi a C18 (250 mm de comprimento x 4,6 mm de diâmetro x partículas de 5 µm). Utilizando padrões analíticos de CBD e THC, ambos na concentração de 1 µg/mL, foi realizada a varredura do comprimento de onda (λ). Os padrões foram eluídos no equipamento com fase móvel de 100% de acetonitrila em fluxo 0,7 mL/min e determinou-se, para cada analito, o comprimento de onda de máxima absorvância, sendo avaliada a faixa de 190 a 800 nm.

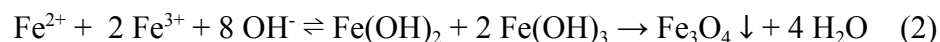
A composição da fase móvel para a separação cromatográfica foi avaliada por análise univariada, visando obter-se os melhores parâmetros analíticos para análise, tais como vazão, temperatura, fluxo e volume injetado no sistema, além de determinar a forma de eluição (gradiente ou isocrática). Neste sentido, os parâmetros avaliados foram a resolução cromatográfica e a simetria dos picos obtidos na análise por meio da Equação 1 (Collins; Braga; Bonato, 2006).

$$R_S = 1,77 (d_{R2} - d_{R1}) / (w_{h2} + w_{h1}) \quad (1)$$

A resolução (R_S) foi calculada a partir da distância (d) que separa os pontos máximos dos picos e da média das larguras na meia altura, w_h . Para a medida da largura de base, tomou-se sempre a distância entre as tangentes traçadas nas laterais do pico.

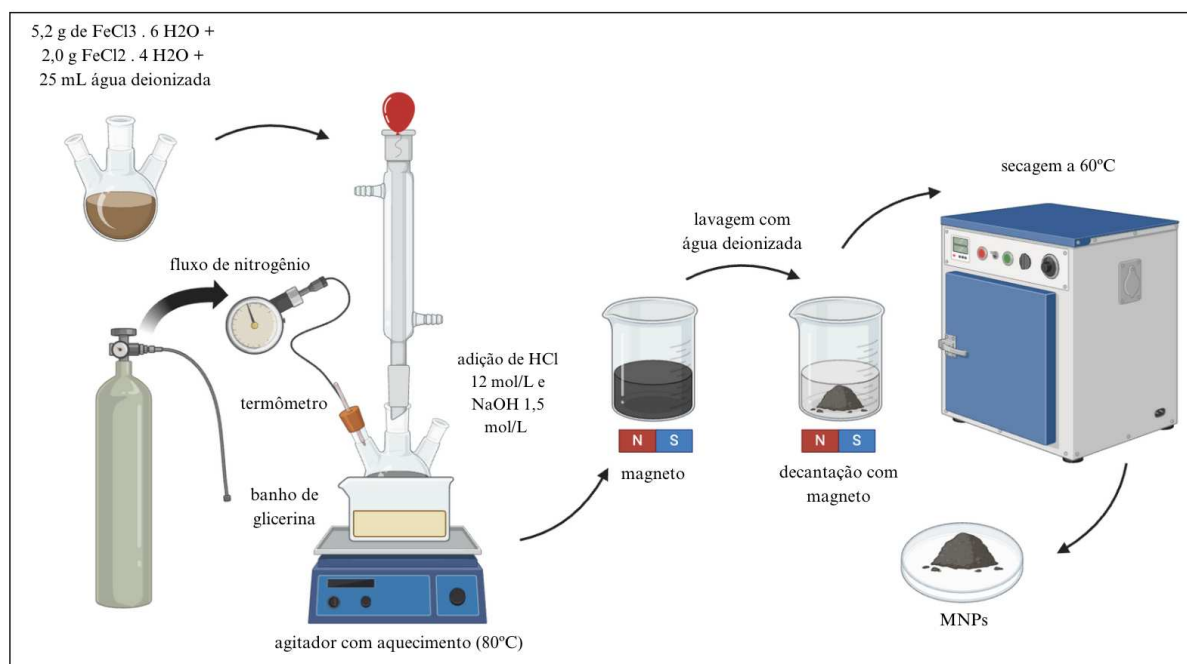
3.4 SÍNTESE E FUNCIONALIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS (MNPs) - $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{ZEO}$ ou $\text{MNPs}@\text{ZEO}$

As nanopartículas magnéticas foram sintetizadas pelo método de coprecipitação, que envolveu a adição de uma solução alcalina a uma solução aquosa contendo Fe(II) e Fe(III) em proporção molar de 1:2, realizada sob aquecimento conforme Equação 2 (da Silva *et al.*, 2016; Kyeong *et al.*, 2021).



Foram adicionados 5,2 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ e 2,0 g $\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ em um balão de fundo redondo de 3 bocas dissolvidos em 25 mL de água deionizada. A síntese ocorreu em banho de glicerina, sob agitação, com controle de temperatura e em atmosfera de N_2 . Acrescentou-se à solução 0,85 mL de HCl 12 mol.L⁻¹ em atmosfera controlada de N_2 . Adicionou-se gota a gota 50 mL de NaOH 1,5 mol.L⁻¹ com agitação vigorosa em atmosfera N_2 à 80°C com auxílio de barra magnética. Após a síntese, as MNPs foram lavadas com água deionizada e deixou-se a mistura decantando com auxílio de um ímã por 48 horas. Por fim, o sobrenadante foi removido e o material restante colocado em estufa a 60°C para secagem (Figura 3).

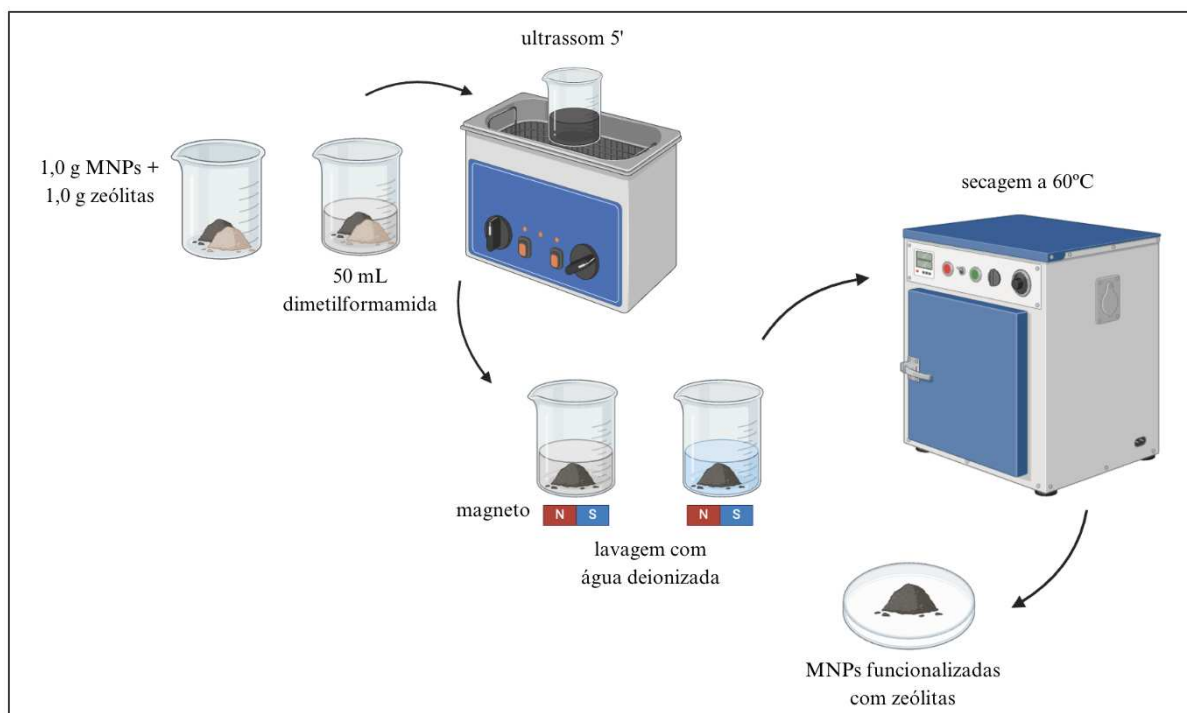
Figura 3. Esquema da síntese das MNPs.



Fonte: Autoria própria, 2024.

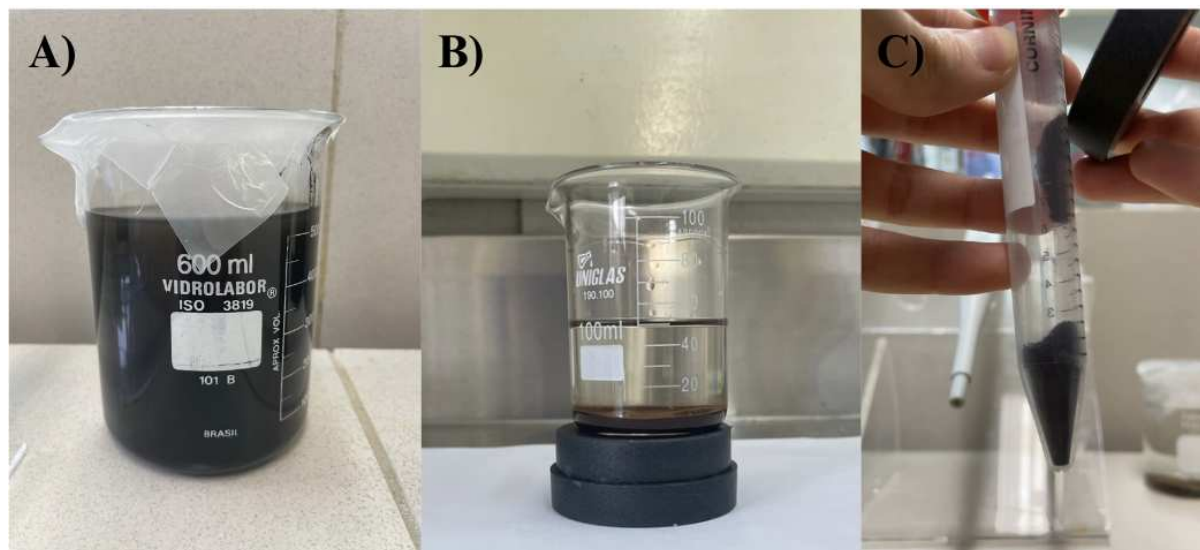
Para funcionalização das MNPs, adicionou-se em um béquer 50 mL de dimetilformamida, 1,0 g de fase biossortiva zeólita (fase definida conforme descrito no item 3.6.1) e 1,0 g de MNPs e colocou-se em ultrassom por 5 minutos. Com auxílio de um ímã, removeu-se o sobrenadante e foi realizada a lavagem das MNPs funcionalizadas com água deionizada. Posteriormente, o material foi deixado em estufa a 60°C para secagem por 24 horas (Figura 4). Por fim, a atração magnética foi testada utilizando um ímã, como demonstrado na Figura 5.

Figura 4. Esquema da funcionalização das MNPs com zeólitas.



Fonte: Autoria própria, 2024.

Figura 5. A) MNPs em suspensão; B) MNPs@ZEO em repouso; C) MNPs sob ação de campo magnético externo.



Fonte: Autoria própria, 2024.

3.5 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS ANCORADAS POR ZEÓLITA (MNPs@ZEO)

As amostras contendo MNPs funcionalizadas com zeólitas (MNPs@ZEO) foram caracterizadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME-UFSC) por microscopia eletrônica de varredura (MEV), no equipamento JEOL JSM-6390LV com ampliação de 5.000x, e por microscopia eletrônica de transmissão (MET) no equipamento JEM-1011 TEM 100 kV.

As amostras foram também encaminhadas ao Laboratório de Controle de Qualidade da UFSC para análise por espectroscopia por absorção no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) no equipamento Perkin Elmer Frontier FT-IR Spectrometer, UATR, e ao Laboratório do Grupo de Estudos de Interações entre Micro e Macromoléculas (GEIMM-UFSC) para análise do potencial zeta e tamanho de partícula no equipamento Zetasizer Nano ZS.

Medidas de difração de raios X (DRX) das amostras MNPs@ZEO e zeolita foram realizadas no Laboratório de Difração de Raios X da UFSC (LDRX-UFSC) usando um difratômetro de raios X de pó Xpert MPD com radiação k_{α} -Cu na faixa de ângulo 2θ de 5 a 97°, com tamanho de passo de 0,033° e tempo de contagem de 179 s por passo, realizado três vezes (3 varreduras) para melhores estatísticas. As análises de dados de DRX foram realizadas usando o método Rietveld implementado no pacote de software TOPAS (Coelho, 2018). Os Arquivos de Difração de Pó (PDF, do inglês, *powder diffraction files*) do ICDD

(Centro Internacional de Dados de Difração) e os Arquivos Cristalográficos de Informações (CIF, do inglês, *crystallographic information file*) do Banco de Dados de Estrutura Cristalina Inorgânica (ICSD) foram utilizados na modelagem inicial. A qualidade dos ajustes foi monitorada pelos parâmetros de concordância R_{wp} (R-perfil ponderado) e GOF (*Goodness of Fit*).

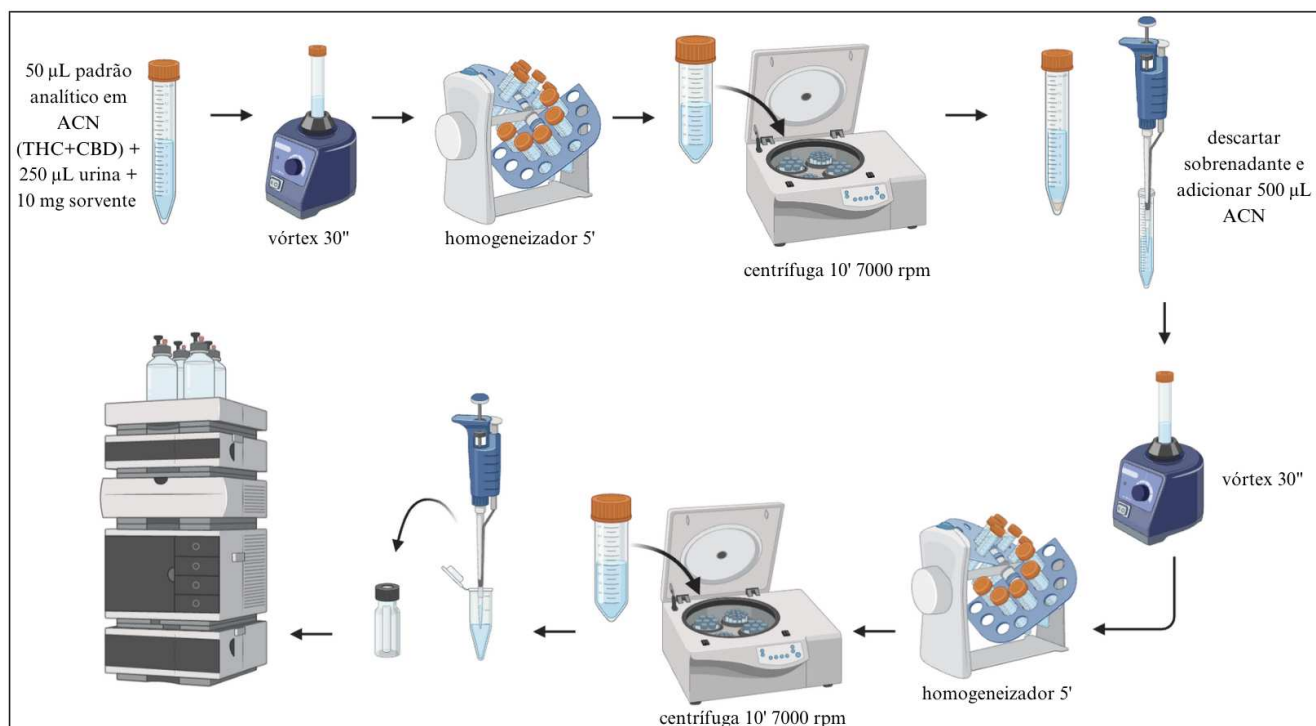
3.6 MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRA

3.6.1 Seleção da fase sortiva para protocolo de DMSPE

Foi definido o protocolo de extração (Figura 6) para avaliação da fase sortiva que seria utilizada para funcionalizar as MNPs. Em primeiro momento foram avaliadas de forma univariada quatro fases sortivas comerciais: C18-E, X-AW, DSC-MCAX e Sílica. Para isso, 250 μL das amostras brancas de urina (isentas do analito) foram enriquecidas com os padrões analíticos de THC e CBD nas concentrações de 1600 ng/mL. Adicionou-se à amostra 10 mg de cada fase sortiva separadamente e utilizou-se o vórtex (30 s) para dispersar a fase na amostra. Seguiu-se para homogeneização por 5 minutos e centrifugação por 10 minutos a 7000 rpm. Após a centrifugação, removeu-se o sobrenadante e partiu-se para dessorção dos analitos adicionando-se 500 μL de acetonitrila. Novamente essa amostra foi homogeneizada por 5 minutos e centrifugada por 10 minutos e 7000 rpm. Separou-se 400 μL do sobrenadante em *ependorf*, o qual foi colocado no concentrador durante 30 minutos em temperatura ambiente para concentrar os analitos. Por fim, ressuspendeu-se o material em 100 μL de acetonitrila e injetou-se no HPLC-DAD. A partir dos resultados obtidos das áreas de pico de THC e CBD nos cromatogramas foi realizada a avaliação estatística utilizando o *Software Graphpad Prism* Versão 9.0.1.

Em segundo momento, foram avaliadas quatro fases biossortivas: serragem, fibra de coco, carvão ativado e zeólita. Para isso, 250 μL das amostras brancas de urina (isentas do analito) foram enriquecidas com os padrões analíticos de THC e CBD nas concentrações de 1600 ng/mL e seguiu-se o mesmo protocolo de extração (Figura 6). Apenas após este teste que foi realizada a funcionalização das nanopartículas magnéticas conforme descrito em 3.4.

Figura 6. Esquema do protocolo de extração na fase avaliativa da fase sortiva.

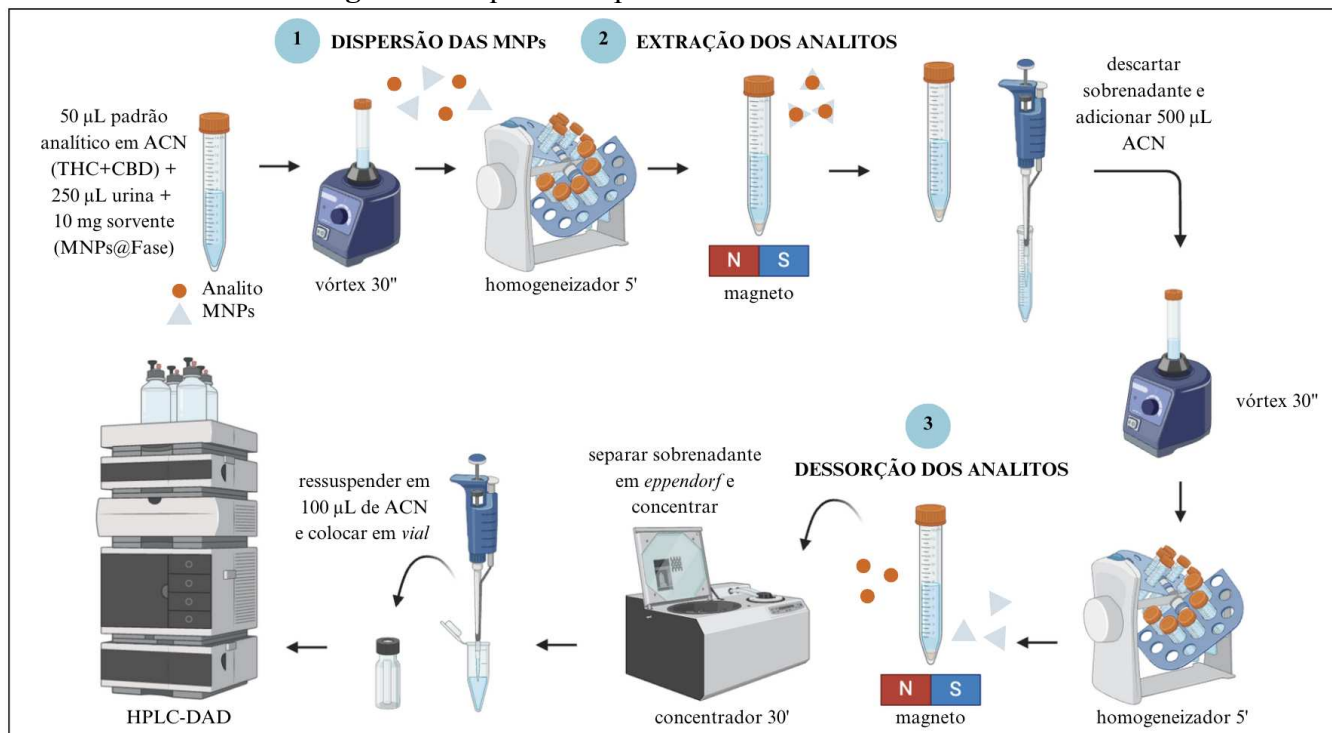


Fonte: Autoria própria, 2024.

3.6.2 Protocolo da DMSPE

Após a funcionalização das MNPs com a fase determinada no item 3.6.1, definiu-se o protocolo inicial para a DMSPE: 250 µL das amostras brancas de urina (isentas do analito) foram enriquecidas com os padrões analíticos de THC e CBD nas concentrações de 1600 ng/mL. Adicionou-se à amostra 10 mg da fase sortiva magnetizada (MNPs@ZEO) e utilizou-se o vórtex (30 s) para dispersar a fase. Seguiu-se para homogeneização por 5 minutos e decantação utilizando-se um magneto. Após a extração dos canabinoides, removeu-se o sobrenadante e partiu-se para dessorção dos analitos adicionando-se 500 µL de acetonitrila. Novamente essa amostra foi homogeneizada por 5 minutos e separadas as fases com auxílio do magneto. Separou-se 400 µL do sobrenadante em eppendorf, o qual foi colocado no concentrador durante 30 minutos em temperatura ambiente para concentrar os analitos. Por fim, ressuspendeu-se o material em 100 µL de acetonitrila e injetou-se no HPLC-DAD (Figura 7). A partir dos resultados obtidos das áreas de pico de THC e CBD nos cromatogramas, foi realizada a avaliação estatística utilizando o *Software Graphpad Prism* Versão 9.0.1.

Figura 7. Esquema do protocolo de DMSPE inicial.



Fonte: Autoria própria, 2024.

3.6.3 Otimização da DMSPE

Para otimização da DMSPE avaliou-se os parâmetros: (1) massa do sorvente (mg); (2) volume de solvente de deissorção (μL); (3) tempo de agitação (minutos); (4) pH da amostra; e (5) volume de amostra (μL) por planejamento multifatorial. Essa avaliação foi dada pelas análises estatísticas utilizando o *Software Statistica* Versão 13.5 a partir das áreas dos picos de THC e CBD obtidos nos cromatogramas.

Primeiramente foi realizado um planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} com as cinco variáveis a fim de determinar a influência desses fatores na resposta do processo de extração, totalizando 19 experimentos. As variáveis avaliadas neste planejamento inicial, com os respectivos níveis estudados, estão representadas na Tabela 3. Para os 19 ensaios realizados (Tabela 4) foram utilizadas concentrações de $3,2 \mu\text{g/mL}$ de THC e CBD. As respostas analisadas corresponderam à área dos analitos obtida por cromatografia.

Tabela 3. Níveis dos fatores avaliados no planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} .

Variáveis	-1	0	1
Massa do sorvente (mg)	10	15	20
Volume do solvente de deissorção (μL)	300	500	700

Tempo de agitação (min)	1	5	9
Volume da amostra (μL)	100	250	400
pH da amostra	5	7	9

Fonte: Autoria própria, 2024.

Tabela 4. Matriz experimental codificada para planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} .

Ensaio	Variáveis				
	Massa de MNPs@ZEO (mg)	Volume de solvente (μL)	Tempo de agitação (min)	Volume de amostra (μL)	pH da amostra
1	-1	-1	-1	-1	1
2	1	-1	-1	-1	-1
3	-1	1	-1	-1	-1
4	1	1	-1	-1	1
5	-1	-1	1	-1	-1
6	1	-1	1	-1	1
7	-1	1	1	-1	1
8	1	1	1	-1	-1
9	-1	-1	-1	1	-1
10	1	-1	-1	1	1
11	-1	1	-1	1	1
12	1	1	-1	1	-1
13	-1	-1	1	1	1
14	1	-1	1	1	-1
15	-1	1	1	1	-1
16	1	1	1	1	1
17 (C)	0	0	0	0	0
18 (C)	0	0	0	0	0
19 (C)	0	0	0	0	0

Fonte: Autoria própria, 2024.

De acordo com a significância estatística dos parâmetros investigados no planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} , foi realizado um planejamento fatorial completo ou Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para dois fatores, volume de solvente e volume de amostra (Tabela 5). Para isso, determinou-se uma nova matriz (Tabela 6), fixando-se as variáveis não significativas em: pH da amostra igual a 7; tempo de agitação de um minuto; e massa de MNPs@ZEO igual a 15 mg. Foram utilizadas soluções padrões de 3,2

$\mu\text{g/mL}$ de THC e CBD para os 10 ensaios realizados. As respostas analisadas corresponderam à área dos analitos obtida por cromatografia.

Tabela 5. Níveis dos fatores avaliados no planejamento fatorial completo 2^2 .

Variáveis	$-\alpha$	-1	0	1	$+\alpha$
Volume do solvente (μL)	159	200	300	400	441
Volume da amostra (μL)	329	350	400	450	471

Fonte: Autoria própria, 2024.

Tabela 6. Matriz experimental codificada para planejamento fatorial completo 2^2 .

Ensaios	Volume de solvente de dessorção (μL)	Volume de amostra (μL)
1	-1	-1
2	-1	1
3	1	-1
4	1	1
5	-1,41	0
6	1,41	0
7	0	-1,41
8	0	1,41
9 (C)	0	0
10 (C)	0	0

Fonte: Autoria própria, 2024.

3.7 VALIDAÇÃO ANALÍTICA

O método analítico desenvolvido (DMSPE-HPLC-DAD) foi validado com base nos Guias da Anvisa para Validação de Métodos Bioanalíticos (Guia nº 72/2024 – versão 1 da ANVISA; RDC nº 166/2017 da ANVISA; RDC nº 27/2012 da ANVISA) e internacionais (UNODC, 2009; SWGTOX, 2013). Foram mensurados os seguintes parâmetros para validação analítica: limite de quantificação, limite de detecção, linearidade, precisão, exatidão, seletividade, efeito matriz, efeito residual e estabilidade. Para esse processo foi utilizado um *pool* de amostra branco (urina) enriquecidos com a solução dos padrões dos analitos em diferentes concentrações.

3.7.1 Limite inferior de quantificação (LIQ)

O limite de quantificação foi definido experimentalmente, sendo a menor concentração da curva analítica que pode ser determinada com precisão e exatidão. Foram analisadas de forma decrescente diferentes concentrações dos analitos, sendo avaliado as seguintes soluções: 400; 600; e 800 ng/mL (SWGTOX, 2013).

3.7.2 Limite inferior de detecção (LD)

O limite de detecção foi estimado utilizando a Equação 3, de acordo com a RDC N° 166/2017 da ANVISA (BRASIL, 2017).

$$LD = \frac{3,3 \cdot \sigma}{IC} \quad (3)$$

Onde:

LD: Limite de detecção;

σ : desvio padrão médio do intercepto de, no mínimo, 3 curvas;

IC: inclinação média da curva.

3.7.3 Linearidade

A linearidade foi avaliada por meio de uma curva de calibração. Para a obtenção da curva de calibração foram avaliados seis pontos analíticos, cada um deles representando uma concentração diferente, preconizada pela RDC n° 166/2017: 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). Além destes, um ponto intermediário (P2) foi adicionado. Os valores de concentração avaliados, em triplicata para o CBD e THC foram 400 ng/mL (LIQ), 800 ng/mL (P2), 1200 ng/mL (CQB), 1800 ng/mL (CQM), 3200 ng/mL (CQA) e 4000 ng/mL (LSQ). Analisou-se a área dos picos nos cromatogramas e foi construído um gráfico no Excel em relação a concentração adicionada. A partir do gráfico avaliou-se o coeficiente de correlação, que, para indicar linearidade, deve aproximar-se o máximo possível de 1,0. De acordo com a ANIVSA, $R > 0,990$ (BRASIL, 2017). Ainda, avaliou-se o valor do coeficiente angular da curva de calibração, que deve ser diferente de zero (BRASIL, 2024). O teste de falta de ajuste (*lack-of-fit*) foi realizado para identificar possíveis valores anormais nos resíduos e avaliar a adequação do modelo aos dados. Os cálculos foram efetuados utilizando o *Software Statistica*, versão 13.5. Para o

modelo matemático ser bem ajustado, o valor de p deve ser maior que 0,05 ($p > 0,05$) (Ramsey; Schafer, 1997).

3.7.4 Exatidão

Para avaliar a exatidão, foi calculado o Erro Padrão Relativo (EPR) conforme Equação 4. A concentração experimental foi obtida por meio da média de 6 replicatas, em pelo menos três concentrações diferentes: baixa, média e alta. O valor de aceitabilidade foi de $\pm 15\%$ do teórico para todos os pontos da curva, exceto para o LIQ, para o qual aceitou-se $\pm 20\%$ (BRASIL, 2017).

$$EPR = \frac{\text{concentração experimental} - \text{concentração teórica}}{\text{concentração teórica}} \times 100 \quad (4)$$

3.7.5 Precisão

Para avaliação da precisão foi calculado o Coeficiente de Variação (CV), o desvio padrão dos resultados dividido por sua média, expresso em porcentagem (Equação 5). A precisão depende da concentração e deve ser medido em diferentes concentrações dentro da faixa de trabalho, normalmente nos níveis baixo, médio e alto. A precisão aceitável nas concentrações mais baixas é de 20%. Para concentrações mais altas é esperado uma melhor precisão. O valor de aceitabilidade do CV foi de até 15% para todos os pontos da curva, exceto para o LIQ, para o qual aceitou-se até 20% (UNODC, 2009).

$$CV = \frac{DP}{\bar{X}} \times 100 \quad (5)$$

3.7.6 Efeito residual

Para avaliar o efeito residual, foram realizadas três injeções da amostra em branco, uma antes da injeção do LSQ e outras duas após a injeção do LSQ. Comparou-se a área do cromatograma do branco com a área do cromatograma do LIQ. O critério de aceitabilidade do efeito residual foi que as respostas de picos interferentes no tempo de retenção do analito deveriam ser inferiores a 20% da resposta do analito nas amostras processadas do LIQ (BRASIL, 2024).

3.7.7 Seletividade

A seletividade foi avaliada utilizando amostras branco (isentas dos analitos) obtidas de seis fontes independentes. A avaliação desse parâmetro deveria demonstrar que não se observa qualquer resposta significativa atribuível a componentes interferentes no(s) tempo(s) de retenção do(s) analito(s) nas amostras branco. Para cada matriz, as respostas atribuíveis aos componentes interferentes não devem ser superiores a 20% da resposta do analito no LIQ (BRASIL, 2024).

3.7.8 Efeito matriz

Para avaliar o efeito matriz, comparou-se os coeficientes angulares de seis retas, três construídas com a matriz enriquecida dos analitos e três construídas com soluções aquosas dos analitos, nas mesmas concentrações. O paralelismo das retas evidencia a ausência de efeito matriz, o qual foi constatado por meio de um teste T de hipóteses com 5% de significância, realizado no *software Microsoft Excel* (BRASIL, 2017).

3.7.9 Estabilidade

Demonstrou-se a preservação dos analitos por meio da estabilidade de curta duração pós-processamento da amostra. Preparou-se e analisou-se um ponto da curva analítica no dia 0: LSQ, 4 µg/mL, para THC e CBD. Os pontos foram preparados no dia 0 e as amostras secas foram armazenadas a -20°C por 24 horas (Dia 1), 48 horas (Dia 2) e 72 horas (Dia 3), comparando a proximidade dos resultados das concentrações por meio do coeficiente de variação. Aceitou-se uma variação de até 15% entre os resultados (BRASIL, 2012).

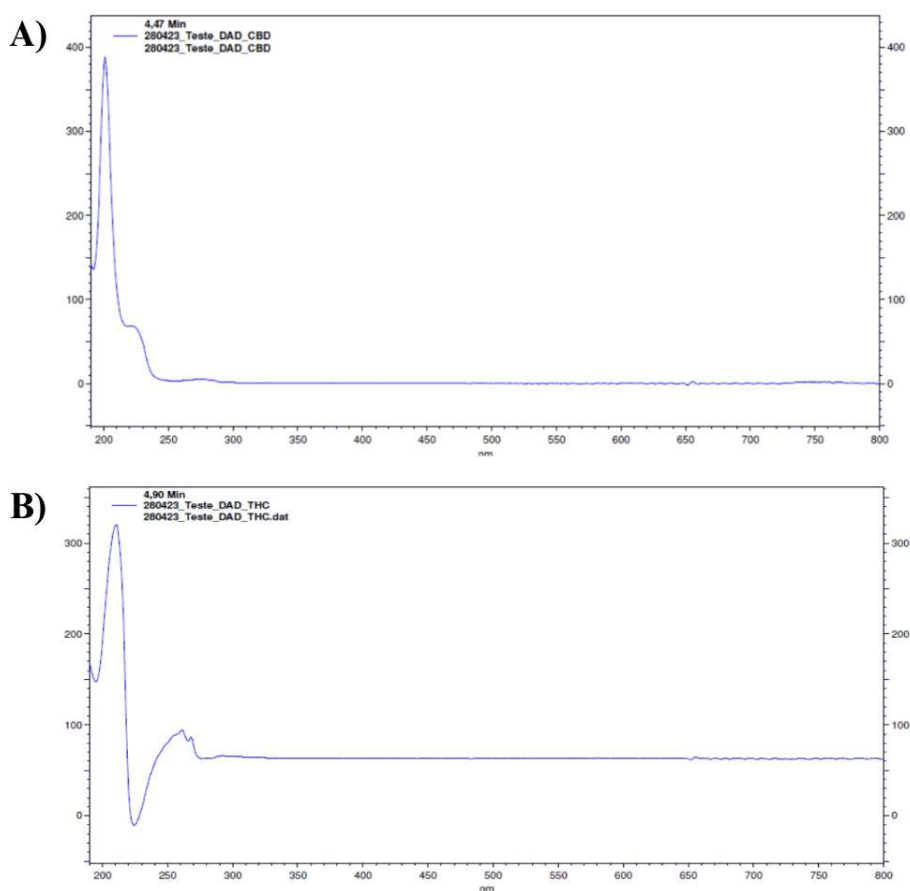
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

4.1.1 Determinação das condições do detector de arranjo de diodos (DAD)

O CBD apresentou melhor absorbância em 200 nm e o THC em 210 nm (Figura 8), apresentando proximidade com valores encontrados na literatura na faixa de 220 a 350 nm (Tabela 2). Os detectores de arranjo de diodos, assim como detectores de absorção no ultravioleta (UV), apresentam robustez e baixo custo, são de fácil manuseio e possibilitam a detecção de diferentes compostos em uma mistura complexa. Apesar das vantagens, não são os mais utilizados atualmente por não oferecerem boa seletividade e sensibilidade comparado à espectrometria de massas (Inamassu; Raspini e Silva; Marchioni, 2024; Nahar; Onder; Sarker, 2020).

Figura 8. Varredura do comprimento de onda dos padrões analíticos de CBD (A) e THC (B).



Fonte: Autoria própria, 2024.

4.1.2 Determinação das condições cromatográficas

Nesta etapa foram avaliadas 10 fases móveis de forma univariada com base na literatura alterando-as em proporção e composição em eluição isocrática (Tabela 7), a fim de averiguar a influência do pH e a mudança de polaridade no perfil cromatográfico, o tempo de corrida necessário para a detecção dos analitos e o fluxo para obter uma separação adequada.

Tabela 7. Parâmetros avaliados para determinação da fase móvel.

Fase Móvel	Fluxo (mL/min)	Tempo de corrida (min)
Acetonitrila:Tampão acetato de amônio 0,25 M pH 5,5 (85:15, v/v)	0,7	15
Acetonitrila:Tampão acetato de amônio 0,25 M pH 5,5 (75:25, v/v)	1,0	15
Acetonitrila:Água Milli Q (80:20, v/v)	1,0	15
Acetonitrila:Água Milli Q (90:10, v/v)	1,0	15
Acetonitrila:Água Milli Q (90:10, v/v)	1,4	10
Metanol:Água Milli Q (90:10, v/v)	1,4	15
Acetonitrila:Água Milli Q (90:10, v/v)	0,6	15
Acetonitrila:Água Milli Q (90:10, v/v)	0,7	15
Acetonitrila:Água Milli Q (90:10, v/v)	0,8	10
Acetonitrila:Ácido fórmico 0,1% (80:20, v/v)	1,0	15

Fonte: Autoria própria, 2024.

Inicialmente, as seis primeiras fases foram avaliadas. Com base nas áreas obtidas, no perfil de separação dos picos e na aparência da linha de base, definiu-se a fase móvel composta de Acetonitrila:Água Milli Q (90:10, v/v) de 10 minutos de corrida com eluição isocrática e 1,4 mL/min de fluxo para o método. Investigou-se também a influência da eluição gradiente (Tabela 8), utilizada na maior parte dos métodos encontrados na literatura.

Tabela 8. Parâmetros do teste de eluição em gradiente.

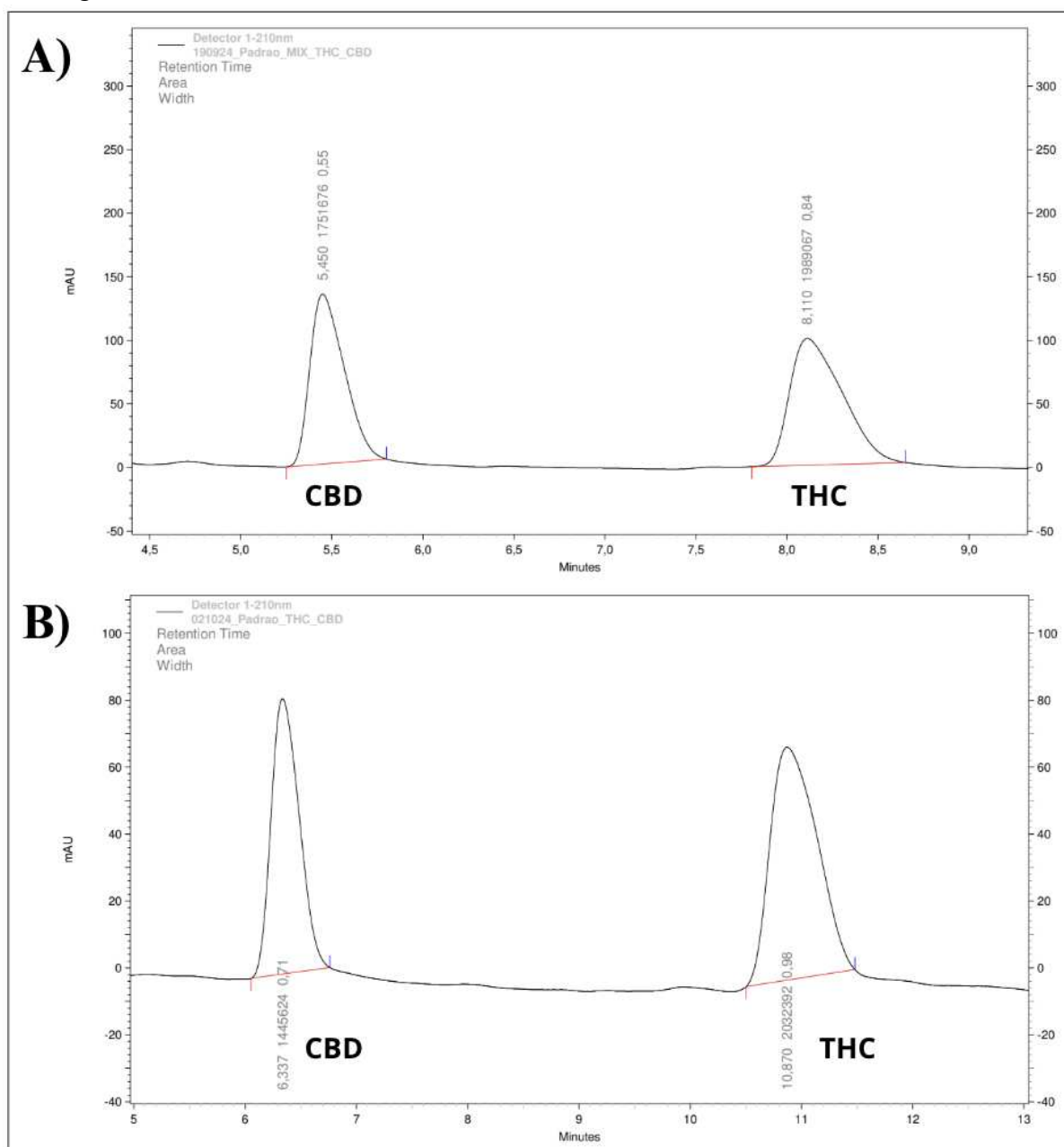
Tempo (min)	Gradiente
0,01	Acetonitrila:Água Milli Q (60:40 v/v)
1	Acetonitrila:Água Milli Q (65:35 v/v)
2	Acetonitrila:Água Milli Q (70:30 v/v)
3	Acetonitrila:Água Milli Q (75:25 v/v)
4	Acetonitrila:Água Milli Q (80:20 v/v)
5	Acetonitrila:Água Milli Q (85:15 v/v)
6	Acetonitrila:Água Milli Q (90:10 v/v)
10	Acetonitrila:Água Milli Q (90:10 v/v)

12	Acetonitrila:Água Milli Q (60:40 v/v)
15	Acetonitrila:Água Milli Q (60:40 v/v)

Fonte: Autoria própria, 2024.

Devido ao consumo excessivo de solvente utilizando o fluxo de 1,4 mL/min, foi necessário realizar uma alteração na fase móvel, onde foram avaliados três novos fluxos para a corrida (0,6; 0,7; 0,8 mL/min). Passou-se a adotar a fase móvel de Acetonitrila:Água Milli Q (90:10, v/v), 10 minutos de corrida com eluição isocrática e fluxo de 0,8 mL/min (Figura 9A). Por fim, por um problema de efeito matriz em que se observou a coeluição do pico de CBD com a matriz, foi necessário realizar uma nova alteração na fase móvel, passando-se a adotar a fase móvel de Acetonitrila:Ácido fórmico 0,1% (80:20, v/v) de 15 minutos de corrida e 1,0 mL/min de fluxo para o método (Figura 9B). O uso de ácido fórmico na fase móvel melhora a forma dos picos cromatográficos e contribui para uma melhor resolução, produzindo resultados superiores em comparação com outras fases móveis (Citti *et al.*, 2016). Com essa fase foi possível obter uma melhor separação dos analitos entre si e entre a matriz. Portanto, o tempo de retenção para o CBD foi de 6,3 minutos e para o THC foi de 10,9 minutos.

Figura 9. Cromatograma dos padrões analíticos em fase móvel de Acetonitrila:Água Milli-Q (90:10, v/v), fluxo de 0,8 mL/min (A) e em fase móvel de Acetonitrila:Ácido fórmico 0,1% (80:20, v/v), fluxo de 1,0 mL/min (B). Concentrações de THC e CBD de 1600 ng/mL em A e 3200 ng/mL em B.



Fonte: Autoria própria, 2024.

4.1.3 Determinação da composição da fase estacionária

Foram avaliadas 3 colunas cromatográficas a fim de definir quais condições cromatográficas melhor separavam os analitos (CBD e THC), entre elas a C18 (250 mm x 4,6 mm x 5 μ m), C18 (125 mm x 4,6 mm x 5 μ m) e C8 (25 mm x 4,6 mm x 5 μ m) (Tabela 9). De acordo com a Equação 1, quando $R_s = 1$, os dois picos são razoavelmente separados. Maiores

valores de resolução indicam melhor separação: $R_s = 1,25$ é suficiente para fins quantitativos e $R_s > 1,5$ indica separação completa (Collins; Braga; Bonato, 2006).

Tabela 9. Medidas, condições e resoluções das colunas cromatográficas avaliadas.

Coluna (FE)	Condições cromatográficas	d_{R1}	d_{R2}	w_{h1}	w_{h2}	R_s
C18 (250 x 4,6 mm x 5 μ m)	FM: 90% ACN + 10% Água Milli Q Fluxo: 1,4 ml/min	3,277	3,41	0,05	0,06	1,42
C18 (250 x 4,6 mm x 5 μ m)	FM: 90% ACN + 10% Água Milli Q Fluxo: 1,0 ml/min	4,587	4,763	0,08	0,075	1,27
C18 (125 x 4,6 mm x 5 μ m)	FM: 90% ACN + 10% Água Milli Q Fluxo: 1,0 ml/min	2,27	2,483	0,07	0,055	2,0
C8 (25 x 4,6 mm x 5 μ m)	FM: 90% ACN + 10% Água Milli Q Fluxo: 1,0 ml/min	4,3	4,137	0,085	0,075	1,19

Legenda. FE = fase estacionária; FM = fase móvel; ACN = acetonitrila; d_{R1} = distância da injeção até o ponto máximo do primeiro pico; d_{R2} = distância da injeção até o ponto máximo do segundo pico; w_{h1} = largura na meia altura do primeiro pico; w_{h2} = largura na meia altura do segundo pico.

Por conseguinte, definiu-se a coluna com fase estacionária C18 (250 x 4,6 mm x 5 μ m) como a melhor coluna para separar os analitos estudados, visto que sua resolução foi superior a 1,25, indicando separação completa, além de apresentar melhor simetria dos picos, estando de acordo com o encontrado na literatura (Tabela 2). A coluna C18 (125 x 4,6 mm x 5 μ m), apesar de apresentar um R_s de 2,00, não apresentou visualmente boa simetria dos picos.

As características da fase estacionária estão diretamente ligadas à eficiência da separação cromatográfica. Essas características incluem a composição química, a polaridade, o tamanho das partículas, a porosidade da fase estacionária e as dimensões da coluna, que influenciam diretamente a resolução e eficiência da coluna (Broeckhoven; Desmet, 2021; Scanferla *et al.*, 2022).

Colunas com fase estacionária C18 são as mais utilizadas para análise de fitocanabinoides devido suas características lipofílicas e a diferença entre elas está em suas dimensões e tamanho de partícula (Lazarjani *et al.*, 2020; Inamassu; Raspini e Silva; Marchioni, 2024). Colunas C18 apresentam alta resolução e são capazes de diferenciar os

canabinoides (Citti *et al.*, 2018). Nessas colunas, o grupo octadecila está ligado quimicamente à superfície da sílica, formando uma fase não polar. Essa estrutura permite interações hidrofóbicas com os analitos, sendo ideal para compostos menos polares como o THC e o CBD (Scanferla *et al.*, 2022).

O tamanho da coluna cromatográfica líquida é outro aspecto que influencia diretamente na resolução, na separação dos analitos e no tempo de análise. Colunas mais longas fornecem uma maior eficiência de separação e melhor resolução, visto que aumentam o número de pratos teóricos. O número de pratos teóricos é diretamente proporcional ao comprimento da coluna e inversamente proporcional para o diâmetro da partícula (Agilent Technologies, 2012). A coluna mais comumente utilizada atualmente é a de 25 cm de comprimento e 4,6 mm no diâmetro interno (ID). Colunas deste tipo contém 40.000 a 60.000 pratos teóricos/metro (Ali, 2022). Porém, colunas mais longas também refletem no tempo de corrida da análise, uma vez que o fluxo é diretamente proporcional ao comprimento da coluna. Assim, deve-se aumentar o fluxo para evitar corridas cromatográficas muito longas ou aumenta-se o tempo de corrida (Agilent Technologies, 2012).

4.2 DETERMINAÇÃO DA FASE SORTIVA PARA O PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DMSPE

Inicialmente foram avaliadas 4 fases sortivas comerciais de forma univariada, a fim de determinar qual melhor fase para extração dos canabinoides CBD e THC (Tabela 10). Para isso, utilizou-se o protocolo inicial para fase avaliativa sem as nanopartículas magnéticas, conforme descrito no item 3.6.1.

Tabela 10. Características das fases sortivas utilizadas na primeira etapa do método.

Fase sortiva	Cartucho	Descrição	Tamanho de partícula	Analito alvo
Strata C18-E	Fase reversa	Fase C18 com <i>end-capping</i> que oferece forte retenção hidrofóbica com poucas interações polares secundárias de grupos silanóis ativos. Composta de sílica modificada com cadeias alquílicas de 18 carbonos (C18), altamente hidrofóbica.	40-60 μm	Moléculas hidrofóbicas, compostos apolares ou levemente polares
Strata X-AW	Troca aniônica fraca	Baseada em um polímero sintético com grupos funcionalizados que interagem seletivamente com ânions fracos. O cartucho apresenta uma combinação de interações hidrofóbicas e troca aniônica fraca, o que permite a retenção de analitos aniônicos	33-100 μm	Compostos ácidos fracos ou moléculas com grupos carboxílicos (-COOH), fosfatos (-PO ₄ ³⁻) ou sulfonatos (-SO ₃ ⁻) que possuem caráter aniônico

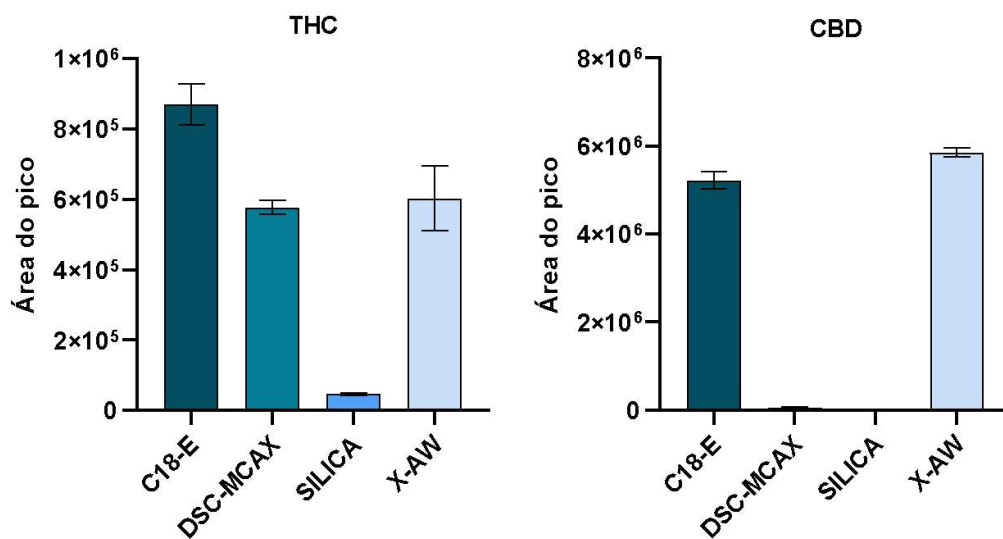
		(compostos com carga negativa) que podem ser eluídos com ajuste de pH		em pH alcalino ou neutro (pKa < 5)
Discovery DSC-MCAX	Troca catiônica de modo misto - SCX (Fase Reversa e Troca Catiônica)	Empacotado contém ligações de ácido octil (C8) e ácido benzeno sulfônico. Combina interações de troca catiônica com interações hidrofóbicas, permitindo a retenção de compostos básicos que podem ser protonados em solução. A eluição é feita com solventes ácidos, que neutralizam as cargas dos analitos e permitem sua liberação	50 µm	Maior capacidade de troca iônica para isolar compostos polares básicos. Pode ser usado para fracionar compostos básicos de compostos ácidos e neutros
SÍLICA	Fase normal	Composta por sílica não modificada, que possui grupos silanol (-SiOH) em sua superfície. A separação ocorre por meio de interações polares, como pontes de hidrogênio, dipolo-dipolo e interações ácidas ou básicas. É usada principalmente para reter compostos polares em solventes não polares	40-75 µm	Compostos polares ou moderadamente polares, como ácidos orgânicos, álcoois, aminas e compostos contendo grupos funcionais como -OH, -NH ₂ , -COOH

Fonte: Badawy *et al.*, 2022; Phenomenex, sd; Sigma-Aldrich, sd; Hawach Scientific, sd; AuroraPro Scientific, sd.

A partir das áreas dos picos de THC e CBD encontrados, determinou-se que com a fase sortiva Strata C18-E obteve-se a melhor extração de THC e CBD e a mesma apresentou a melhor área de pico de THC com coeficiente de variância (CV) de 11,68% e 6,41% para CBD (Figura 10). C18-E consiste na fase reversa C18 com *end cap* à base de sílica, proporcionando retenção hidrofóbica robusta enquanto minimiza interações polares secundárias decorrentes de grupos silanol ativos. Este sorvente é particularmente eficaz para extrair analitos orgânicos hidrofóbicos ou polares de matrizes aquosas, como a urina (Badawy *et al.*, 2022; Phenomenex, sd). Dado que, tanto o THC como o CBD são compostos apolares com afinidade por substâncias lipofílicas, é seguro utilizar um sorvente com forte retenção hidrofóbica durante os processos de remoção ou purificação.

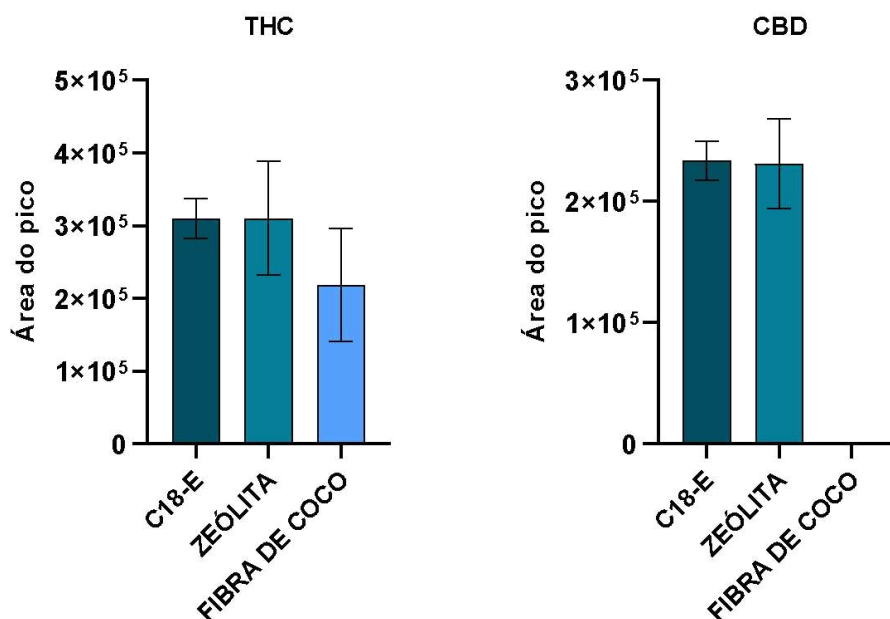
A extração em fase sólida, utilizando diversos adsorventes comerciais à base de C18, é amplamente aplicada para o isolamento e pré-concentração de canabinoides. Essa técnica é eficaz para a purificação de amostras complexas, aproveitando a afinidade entre os analitos e a fase estacionária para concentrar compostos de interesse, como os canabinoides (Montesano *et al.*, 2014). Meier *et al.* realizaram preparação automática de amostras *online* com cartuchos C18 para identificação de canabinoides em amostras de sangue e urina (Meier *et al.*, 2018). Essa fase foi utilizada como controle para a segunda etapa, na qual foram avaliadas quatro fases biossortivas: carvão ativado, serragem, fibra de coco e zeólita clinoptilolita.

Figura 10. Teste de extração de THC e CBD de amostra de urina enriquecida com padrão analítico de 1600 ng/mL para quatro fases sortivas.



Dentre as fases biossortivas testadas, apenas a zeólita e a fibra de coco foram capazes de extrair os fitocanabinoides da matriz biológica. A zeólita apresentou áreas de pico de THC e CBD bem semelhantes à fase sortiva C18-E, porém, com coeficientes de variância (CV) maiores (25,23% para THC e 20,26% para CBD) (Figura 11). Portanto, determinou-se que a zeólita foi a melhor fase biossortiva para extração desses fitocanabinoides.

Figura 11. Teste de extração de THC e CBD de amostra de urina enriquecida com padrão analítico para duas fases biossortivas e para C18-E.



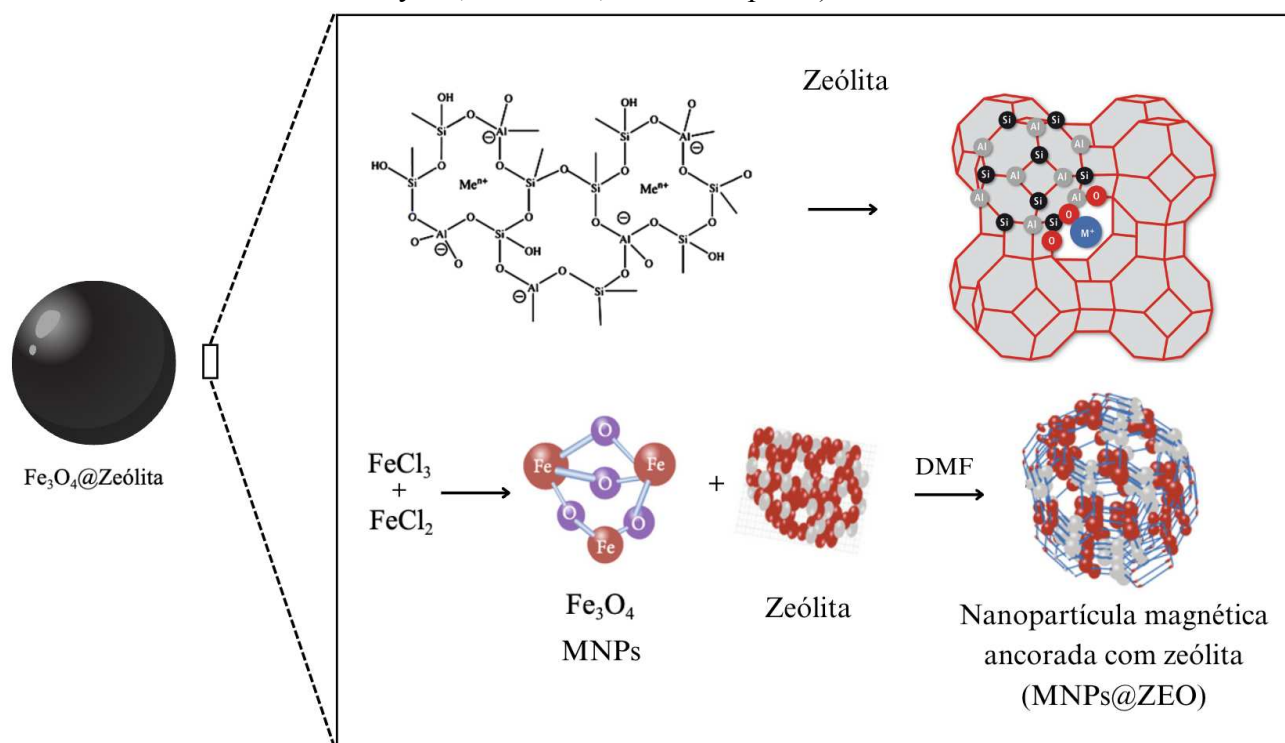
Zeólitas são aluminossilicatos hidratados formados por tetraedros de sílica (SiO_4)⁴ e alumina (AlO_4)⁵ com estrutura cristalina regular. Existem cerca de 40 espécies de zeólitas naturais conhecidas, como a mordenita, clinoptilolita e heulandita, porém, apenas algumas espécies são amplamente utilizadas, sobretudo na área industrial para remoção de contaminantes à base de hidrocarbonetos de efluentes (Silva *et al.*, 2016; Loiola *et al.*, 2022). Devido sua estabilidade térmica, alta área superficial e a carga líquida negativa em sua estrutura microporosa, possuem alta capacidade adsorvente de cátions pesados e podem servir para incorporação com óxidos de nano metais para adsorção (Kazemi; Javanbakht, 2020).

Algumas zeólitas também possuem a capacidade de adsorver ânions e compostos orgânicos em soluções aquosas e a modificação de zeólitas naturais pode ser realizada por diferentes métodos, como tratamento ácido, troca iônica e funcionalização com surfactantes, o que aumenta sua capacidade de adsorção de substâncias orgânicas e ânions (Khanday *et al.*, 2017). A zeólita clinoptilolita é uma das zeólitas naturais mais utilizadas devido sua capacidade de troca iônica e seu baixo custo, sendo que essa característica de ligação e a formação de unidades estruturais únicas resultam em materiais altamente porosos, com canais e cavidades que possuem formas e tamanhos de poros característicos (Montégut *et al.*, 2016).

Na estrutura complexa das zeólitas, uma carga eletrônica não compensada está presente nos locais de Al devido à substituição de Si por Al (substituição isomórfica de Si por

Al, definindo a carga negativa da estrutura cristalina) e estas cargas possuem alta afinidade com outros cátions. Essa substituição não é limitada à Al^{3+} e Si^{4+} , uma vez que átomos de ferro, titânio, boro, entre outros, podem substituir o silício (Silva *et al.*, 2016; Singh *et al.*, 2022). Desta forma, tem-se a incorporação das MNPs nas cavidades da zeólita (Figura 12).

Figura 12. Esquema da representação química da ancoragem das MNPs com zeólita (Asanu; Beyene; Befekadu, 2022. Adaptado).



Legenda: $Fe_3O_4@Zeólita$ = óxido de ferro incorporado à zeólita; $FeCl_3$ = cloreto férrico; $FeCl_2$ = cloreto ferroso; Fe_3O_4 = óxido de ferro ou magnetita; MNPs = nanopartículas magnéticas; DMF = dimetilformamida.

Como visto anteriormente, tanto o THC quanto o CBD são substâncias apolares, o que facilita a interação com a superfície apolar da zeólita, permitindo sua adsorção nos canais e cavidades da estrutura porosa da zeólita. Esta estrutura, por oferecer uma alta área superficial, favorece a captura dessas moléculas (Loiola *et al.*, 2022; Nyankson *et al.*, 2019). O ambiente interno das zeólitas pode favorecer a interação com esses compostos através de ligações de Van der Waals. Ainda, devido a carga negativa da zeólita, é possível que ocorram interações de hidrogênio com as hidroxilas presentes nas moléculas de THC e CBD e o uso de solventes adequados permite a dessorção dos analitos.

Diante disso, a zeólita (*Clinoptilolite-Na*) foi utilizada para a funcionalização das nanopartículas magnéticas. A vantagem da utilização das MNPs@ZEO é referente a facilidade de separação após a extração dos analitos, uma vez que as nanopartículas

magnéticas ancoradas às zeólitas e com os fitocanabinoides adsorvidos podem ser facilmente separadas da amostra de urina através da aplicação de um campo magnético externo.

Em outro trabalho, Cruz *et al.* determinaram THC e CBD em plasma humano através de nanotubos magnéticos de carbono de acesso restrito (M-RACNTs) para uso como sorvente SPME (Cruz *et al.*, 2022). Rad, Dalali e Baheri combinaram DMSPE e a microextração líquido-líquido (DLLME) para extração de dois fitocanabinoides sintéticos de plasma humano, AB-FUBINACA e 5F-ADB-PINACA, com MNPs revestidas com polioroaminofenol ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PoAP}$) (Rad; Dalali; Baheri, 2020). Chen *et al.* propuseram um novo poli(ácido metacrílico-co-etilenoglicol dimetacrilato) revestido com nanopartícula de Fe_3O_4 com polidopamina funcionalizada ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PDA}@poly(\text{MAA-co-EGDMA})$) como adsorvente para a detecção de cinco canabinoides sintéticos e um produto de biotransformação (THC-COOH) em águas residuais (Chen *et al.*, 2023). Ding *et al.* desenvolveram uma estrutura de imidazolato de zeólita magnética para extração de brucina e estricnina de urina humana (Ding *et al.*, 2021). Não foram encontrados na literatura trabalhos que utilizassem MNPs funcionalizadas com zeólitas para extração de fitocanabinoides, sobretudo em urina.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS ANCORADAS ÀS ZEÓLITAS (MNPs@ZEO)

4.3.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

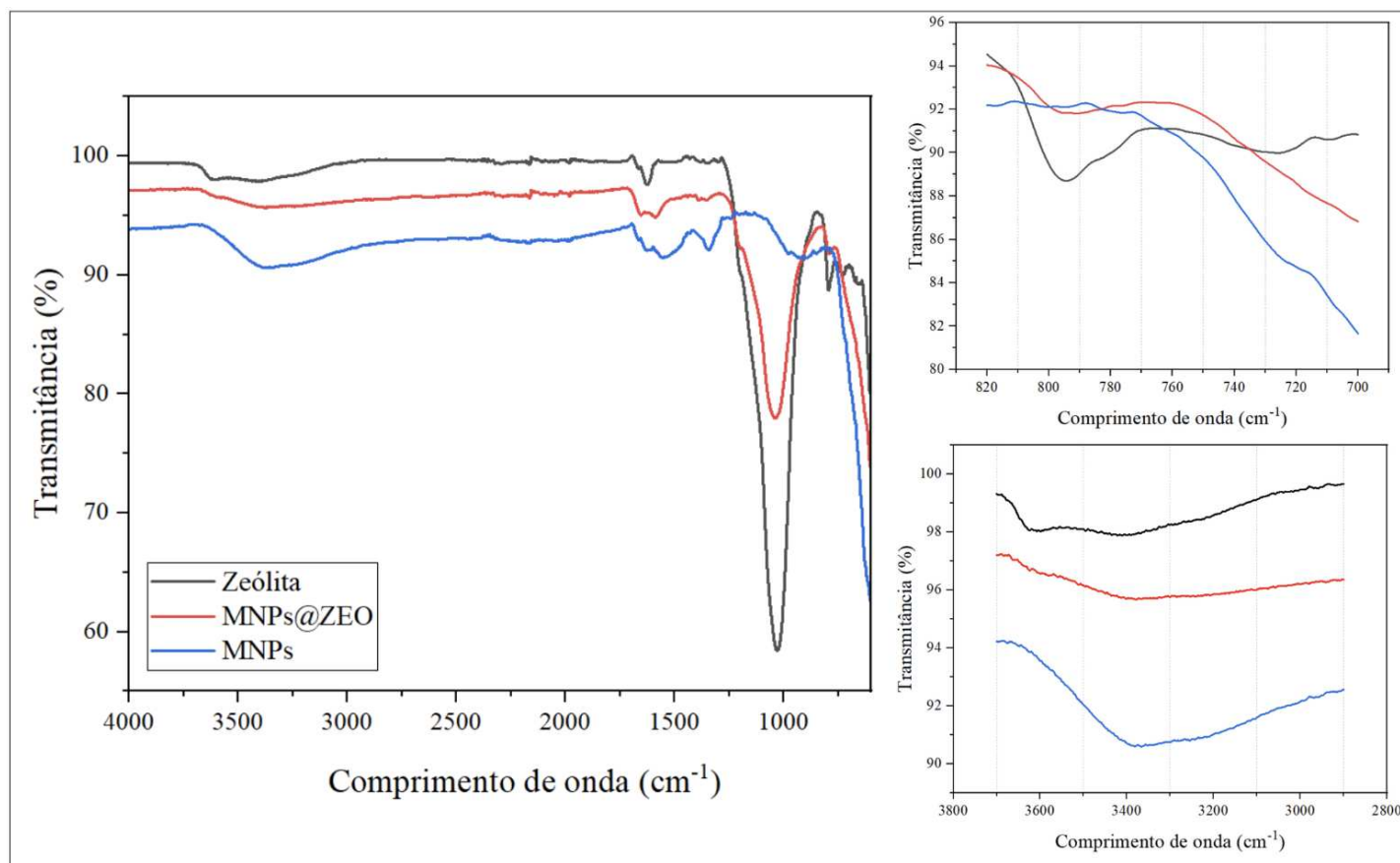
Os espectros de FT-IR da zeólita, das MNPs e das MNPs@ZEO são apresentados na Figura 13. Nessa figura pode-se observar facilmente que o traço azul, das MNPs@ZEO, é uma combinação dos traços vermelho e laranja, respectivamente, da zeólita e das MNPs. Isso corrobora com a estabilidade estrutural da zeólita e das MNPs após a mistura realizada para formar as MNPs@ZEO.

A referência utilizada para as bandas referentes à zeólita, mais especificamente àquelas relacionadas às ligações de sílica, foram as bandas caracterizadas por Brian Smith em 1999. As bandas encontradas na região abaixo de 900 cm^{-1} são normalmente associadas a ligações do tipo metal-oxigênio, portanto, a banda analisada em torno de 600 cm^{-1} , tanto das MNPs@ZEO quanto das MNPs, pode ser atribuída à vibração da ligação ferro-oxigênio (Fe-O) da magnetita (Kazemi; Javanbakht, 2020; Cruz *et al.*, 2022). Porém, como o espectro permite a visualização apenas até 600 cm^{-1} , a visualização desta banda fica prejudicada.

Ainda, nas MNPs@ZEO dever-se-ia encontrar uma banda em 578 cm^{-1} referente ao estiramento assimétrico de Si-O-Fe, também não sendo possível sua visualização devido à limitação do espectro. Em 800 cm^{-1} pode-se ver uma banda de baixa intensidade referente ao estiramento simétrico de Si-O-Si da zeólita (da Silva, 2016). Já a banda intensa aproximadamente em 1050 cm^{-1} é proveniente do alongamento assimétrico da vibração de ligações Si-O do tetraedro de SiO_4 , principal vibração da clinoptilolita, comprovando a presença dessas ligações tanto na zeólita quanto nas MNPs@ZEO (Kazemi; Javanbakht, 2020). A diferença entre essa banda presente na zeólita e na nanopartícula funcionalizada é a intensidade, visto que na zeólita isolada a banda apresenta uma intensidade maior, podendo ser relacionada a quantidade dessas ligações presentes na amostra.

Entre 750 e 700 cm^{-1} o espectro da zeólita apresenta também pequenas bandas referentes a deformações angulares das ligações de Si-O-Si, as quais não estão presentes na MNPs@ZEO. Por outro lado, na amostra de zeólita deveria ser observado uma banda larga em torno de 3600 e 3400 cm^{-1} das ligações de O-H em Al-OH-Si, mas é verificado apenas um alargamento dessa região (da Silva, 2016). O mesmo ocorre na amostra de MNPs@ZEO, podendo ser notado um alargamento ainda maior referente ao modo vibracional de estiramento de íons hidroxila de moléculas de água presentes na superfície do material (Kazemi; Javanbakht, 2020). A banda em aproximadamente 1625 cm^{-1} na zeólita clinoptilolita pode ser atribuída aos modos de flexão vibratória de grupos coordenados (-OH) fixados nas superfícies dos cristais da zeólita (Tran; Duong; Le, 2021). Diante disso, pode-se confirmar que as nanopartículas magnéticas foram incorporadas à zeólita por apresentarem tanto bandas recorrentes das ligações metal-oxigênio quanto das ligações da zeólita.

Figura 13. Espectros de FT-IR da zeólita (em preto), das nanopartículas magnéticas (em azul) e das MNPs@ZEO (em vermelho) de 600 a 4000 cm^{-1} .



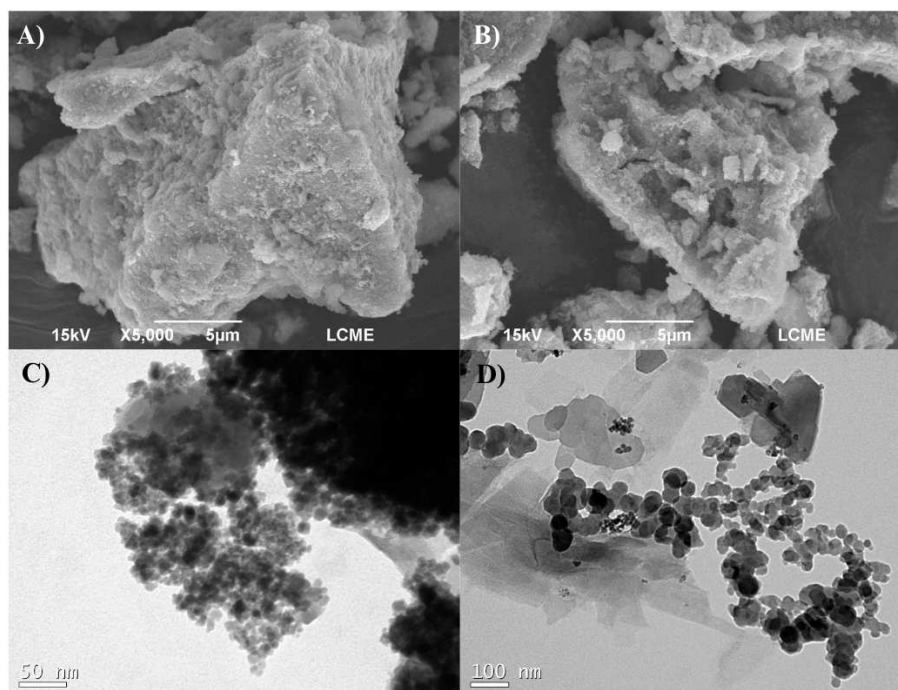
Fonte: A autoria própria, 2024.

4.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Os aspectos morfológicos das MNPs@ZEO foram caracterizados por MEV e MET 100 kV. A Figura 14 A e B demonstra a superfície irregular das MNPs@ZEO e das MNPs puras, respectivamente. Nota-se que as MNPs@ZEO apresentam uma superfície menos rugosa em relação às MNPs, ambas com aspecto denso. Nota-se a presença de nanopartículas aglomeradas, as quais não apresentam formato esférico e homogeneidade na amostra como esperado. Isso pode estar relacionado com a síntese, uma vez que o tamanho e a estrutura das nanopartículas são controlados ajustando-se a velocidade de agitação, a concentração e o tipo de base utilizada, o sal de ferro empregado e a temperatura da reação. Além disso, relata-se que a adição de hidróxido de tetrametilamônio após a etapa de lavagem pode ser utilizada como uma medida preventiva para evitar a formação de aglomerados, algo que não foi realizado (da Silva *et al.*, 2016). Por outro lado, vale ressaltar ainda que essa morfologia da

superfície porosa pode levar ao aumento da área de superfície específica facilitando a capacidade de adsorção (Tran; Duong; Le, 2021).

Figura 14. Imagens de microscopia eletrônica de varredura das MNPs@ZEO (A) e MNPs (B) e microscopia eletrônica de transmissão das MNPs@ZEO (C e D).



Fonte: Autoria própria, 2024.

Nas micrografias por MET da Figura 14 (C e D) é possível ver aglomerados de nanopartículas com uma distribuição bem larga de tamanhos. Vê-se também na imagem D, partículas translúcidas e com centenas de nanômetros, por serem muito finas, provavelmente, contendo somente a zeólita. As regiões mais escuras das imagens sugerem que as nanopartículas são mais espessas, mas podem estar associadas a presença da fase Fe_3O_4 magnetita, de forma que poder-se-ia especular que as regiões mais claras no entorno das nanopartículas, especialmente as mais arredondadas, correspondem à zeólita. Mais estudos e experimentos TEM, incluindo difração de elétrons, análises químicas (por espectroscopia EDS) e imagens de alta resolução, serão realizados futuramente para elucidar a possibilidade de existirem nanoestruturas do tipo *core-shell* nas amostras MNPs@ZEO.

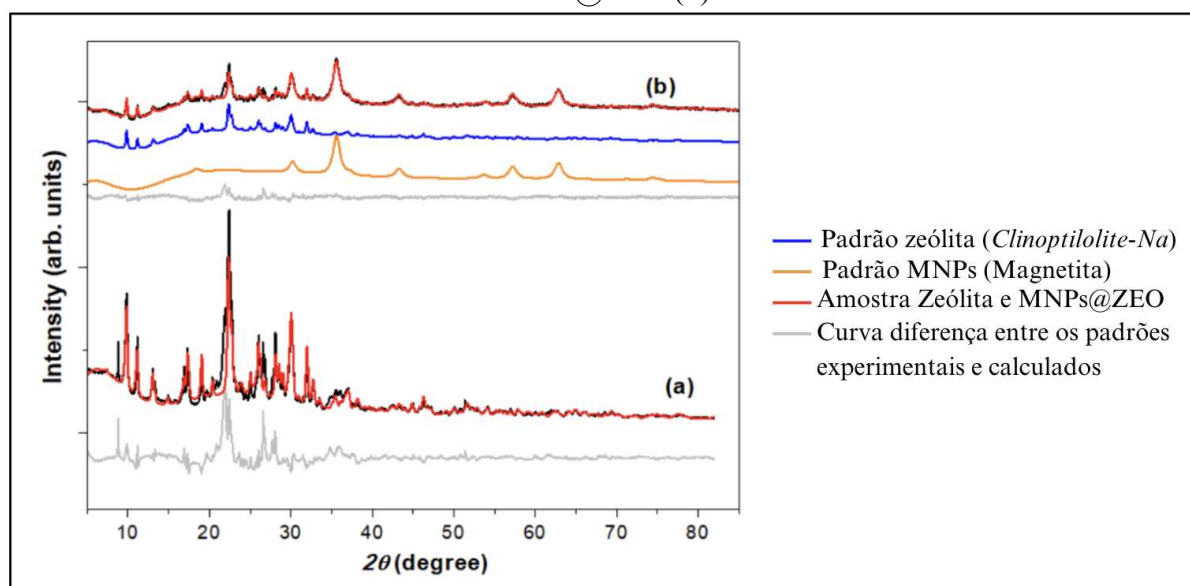
4.3.3 Difratometria por raios X (DRX)

De acordo com as análises de DRX realizadas no LDRX-UFSC, mostradas na Figura 15, observa-se que o padrão DRX da amostra de zeólita utilizada nesse trabalho apresenta todos picos de Bragg da fase zeólita (*Clinoptilolite-Na*), porém, outros sinais são observados

(ver traço cinza da Figura 15 a) e as tentativas e identificação da(s) fase(s) cristalina(s) coexistente(s) não foram exitosas. Estudos futuros mais detalhados, envolvendo análises químicas, serão realizados para elucidar essa questão em aberto, podendo uma das hipóteses ser devido à presença de impurezas na zeólita utilizada.

O padrão DRX da amostra de MNPs@ZEO (Figura 15 b) apresenta muitos dos picos de Bragg da fase *Clinoptilolite-Na*, da fase não identificada, e os picos correspondentes a fase magnetita Fe_3O_4 . Quando em contato com partículas magnéticas, a zeólita manteve sua estrutura, de forma que não foram observadas alterações significativas nos picos característicos de seus padrões de DRX, indicando que a estrutura cristalina da zeólita permanece estável durante a preparação da combinação. No entanto, o aumento na proporção de nanopartículas magnéticas resulta em uma diminuição na intensidade dos picos da zeólita, o que é esperado, já que a quantidade relativa de zeólita se torna menor (Loiola *et al.*, 2022).

Figura 15. Padrões DRX experimentais e calculados na análise de Rietveld da zeólita (a) e da MNPs@ZEO (b).



Fonte: LDRX-UFSC. Adaptado, 2024.

A análise Rietveld permitiu obter os parâmetros estruturais e microestruturais dos pós de zeólita e MNPs@ZEO, como mostrado na Tabela 11. A análise quantitativa de fases revelou a presença de 57% da fase zeólita (*Clinoptilolite-Na*) e 43% da fase magnetita na amostra de MNPs@ZEO. Visto que a proporção utilizada para funcionalização das MNPs com zeólitas foi de 1:1, e que existem picos de Bragg não identificados nos padrões DRX, pode-se comprovar que a proporção inicial foi preservada após a mistura. Portanto, de acordo com os resultados, a incorporação da fase magnética na zeólita se deu de forma efetiva na

amostra MNPs@ZEO. Os traços cinzas, que mostram a curva diferença entre os padrões experimentais e calculados, permitem avaliar visualmente a concordância entre a modelagem e os dados experimentais. Ademais, os valores de R_{wp} e GOF ratificam a confiabilidade das análises Rietveld apresentadas, mas também reforçam a necessidade de identificação da(s) fase(s) cristalina(s) (impurezas) coexistente(s).

Tabela 11. Parâmetros estruturais e microestruturais dos pós de zeólita e MNPs@ZEO obtidos pela análise-Rietveld dos dados DRX (* considerando apenas as fases cristalinas identificadas).

Amostra	Fase	Grupo Espacial	% Fase*	Parâmetros de rede	Microestrutura		R_{wp}	GOF
					L (nm)	Strain		
Zeólita pura	<i>Clinoptilolite-Na</i>	C2/m	100	a (Å) = 17,680(4) b (Å) = 17,955(4) c (Å) = 7,4138(16) β (°) = 116,307(15) ρ (g/cm ³) = 2.1539(9) [ICSD 66458]	53(3)	0,47(4)	14,06	16,65
MNPs@ZEO	<i>Clinoptilolite-Na</i>	C2/m	56,8(7)	a (Å) = 17,657 (18) b (Å) = 17,923(19) c (Å) = 7,403(8) β (°) = 116,33(9) ρ (g/cm ³) = 2.1641(11)	47(14)	0,2(4)	1,47	2,92
	Fe ₃ O ₄ (magnetita)	Fm-3m	43,2(7)	a (Å) = 8,3591(9) b (Å) = 8,3591(9) c (Å) = 8,3591(9) β (°) = 90 ρ (g/cm ³) = 5,2658(17) [ICSD 84611]	8,6(3)	0,54(13)		

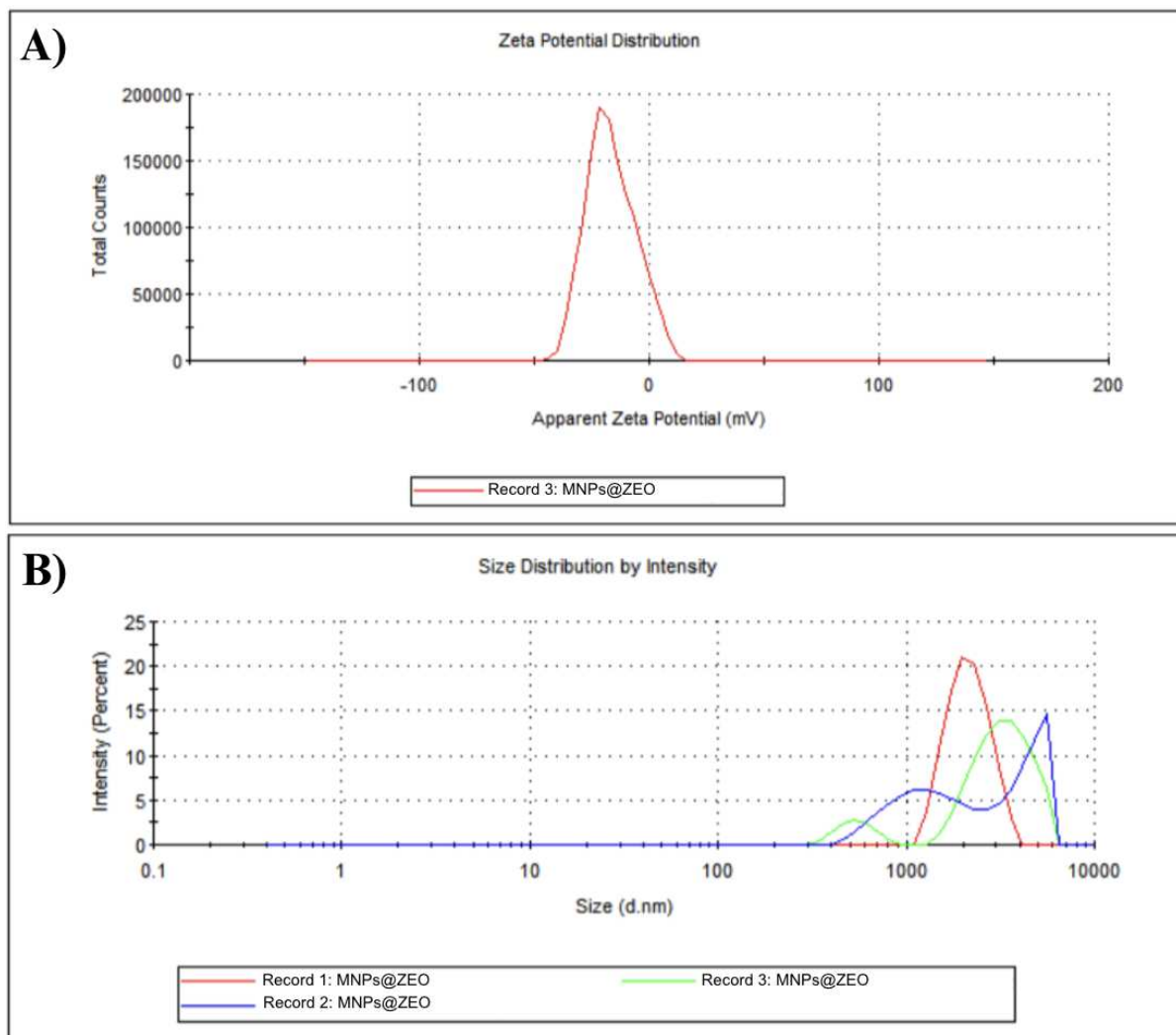
Fonte: C.E.M. Campos. Adaptado, 2024.

Em relação aos parâmetros estruturais, comparando-se os valores obtidos para zeólitas isoladas e MNPs@ZEO, observa-se que os tamanhos da rede da fase zeólita clinoptilolita aumentaram quando as MNPs foram incorporadas, assim como os parâmetros de rede da magnetita são menores quando comparados com a literatura, sugerindo que a incorporação da magnetita se deu nas cavidades e poros da zeólita. Já a microestrutura da zeólita foi afetada de maneira sutil, com tamanhos médios de domínio cristalino (cristalitos) passando de 53 para 47 nm com a incorporação das MNPs, as quais apresentaram tamanhos médios de cristalinos da ordem de $8,6 \pm 0,3$ nm. Um tamanho de cristalito menor, como observado na amostra MNPs@ZEO, pode afetar a capacidade de adsorção e a reatividade da zeólita, especialmente quando funcionaliza-se a magnetita na forma nanométrica.

4.3.4 Potencial zeta e tamanho de partícula

A análise do potencial zeta mostrou que as MNPs@ZEO possuem uma carga superficial levemente negativa em pH 5,0 ($-16,5 \pm 10,7$ mV), sugerindo moderada e limitada estabilidade da suspensão em água. Isso indica que as MNPs@ZEO podem tender à aglomeração, especialmente em condições de força iônica elevada (Tessarolli *et al.*, 2019). A formação de aglomerados pode ser prejudicial para extração de THC e CBD, visto que os aglomerados tendem a diminuir a área superficial e, conseqüentemente, a quantidade de sítios acessíveis para interação com esses analitos. Além de dificultar a separação e redistribuição homogênea das MNPs@ZEO na amostra, o que comprometeria a reprodutibilidade da extração. O tamanho médio das MNPs@ZEO foi de 1901 nm com um índice de polidispersão (PDI) de 0,169 evidenciando uma distribuição de tamanhos relativamente homogênea (Figura 16). Esses dados complementam as análises de microscopia eletrônica realizadas e mostram o tamanho não uniforme entre as MNPs@ZEO, as quais apresentam duas principais populações de tamanhos distintos na amostra analisada.

Figura 16. Distribuição de potencial zeta (mV) das MNPs@ZEO em água (A) e triplicata do tamanho de partícula das MNPs@ZEO em água (B).



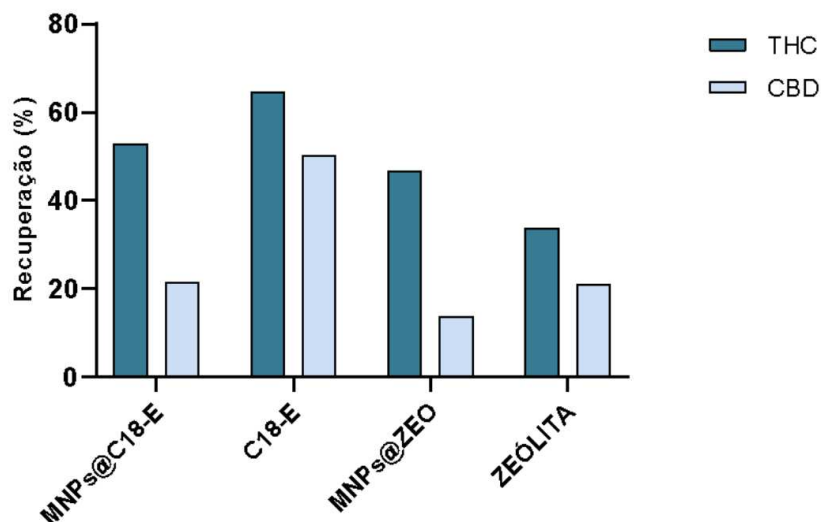
Fonte: Autoria própria, 2024.

4.4 ANÁLISE E OTIMIZAÇÃO DA DMSPE COM MNPs@ZEO

4.4.1 Extração em fase sólida magnética dispersiva

Foi realizado um teste para avaliar a taxa de recuperação dos analitos utilizando MNPs funcionalizadas com zeólita (MNPs@ZEO) em comparação às MNPs funcionalizadas com fase C18 (MNPs@C18). Para isso, foi necessário funcionalizar MNPs com C18 seguindo o mesmo protocolo utilizado para zeólita (Figura 4). A taxa de recuperação para MNPs@C18 foi de 52,80% para THC e 21,46% para o CBD. Já para MNPs@ZEO foi de 46,73% para THC e 13,65% para CBD (Figura 17). Ainda, comparou-se com as taxas de recuperação das fases sortivas isoladas (C18-E e zeólita) que serviram de controle.

Figura 17. Gráficos de resposta da DMSPE para comparação da taxa de recuperação dos analitos para MNPs funcionalizadas com C18-E e zeólita.



Fonte: Autoria própria, 2024.

A adsorção dos analitos por MNPs@C18 e por MNPs@ZEO apresenta características distintas devido à diferença na natureza dessas fases sorventes. Como visto anteriormente, a C18-E possui uma cadeia de hidrocarbonetos longa, portanto, MNPs@C18 oferecem uma superfície predominantemente hidrofóbica promovendo boa interação com os analitos em questão. Ainda, apresenta oxigênio e silício, que servem para interação secundária de compostos polares. Porém, comparado à fase isolada, apresentou menor taxa de recuperação, o que pode ser explicado pela quantidade de C18-E presente nas MNPs (menor massa). Já a zeólita possui uma estrutura cristalina que proporciona a adsorção dos analitos nos canais e cavidades por interação hidrofóbica, mas apresenta uma superfície com átomos de oxigênio e silício que podem interagir com moléculas mais polares. Dependendo da razão de alumínio e silício presente na composição da zeólita, muda-se a força de interação por moléculas apolares (Kordala; Wyszowski, 2024). Ambos os fitocanabinoides são apolares, sendo o CBD ligeiramente mais polar que o THC. A funcionalização das MNPs com zeólita pode alterar a afinidade da superfície para compostos mais polares, dificultando a extração do CBD. O THC, sendo menos polar, interage mais efetivamente com a superfície funcionalizada.

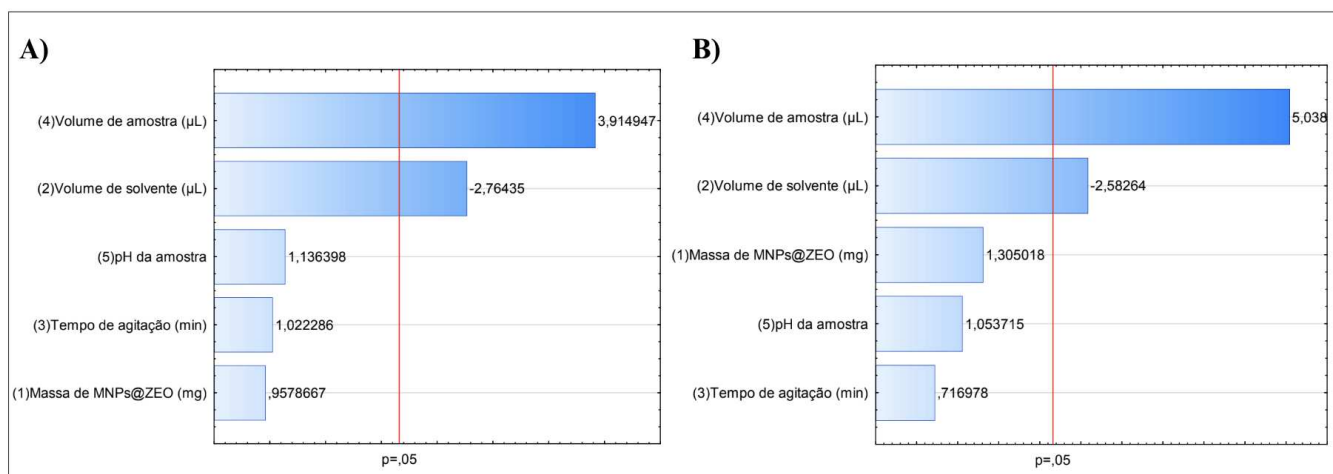
Diante disso, ambas fases são eficazes para extração dos fitocanabinoides ao funcionalizar as MNPs e, apesar de a C18-E ser mais propícia para extração de compostos

hidrofóbicos, a zeólita apresenta resultados semelhantes sendo um composto natural bioativo mais sustentável, ecológico e barato.

4.4.2 Planejamento Multifatorial Fracionado 2⁵⁻¹ para otimização do protocolo de DMSPE

Os resultados do planejamento fatorial fracionado estão representados na Figura 18, onde as barras horizontais maiores que a linha vertical dada por $p = 0,05$ representam a significância dos fatores. Conforme o diagrama de Pareto (Figura 18), determinou-se que apenas o volume de solvente de dessorção (acetonitrila) e o volume de amostra foram significativos, ao passo que o primeiro deve-se diminuir e o segundo aumentar. O fato de o volume de amostra ser significativo positivamente está relacionado com a quantidade de fitocanabinoides presentes na alíquota da amostra. Portanto, quanto maior a alíquota, maior a quantidade de analitos presentes no meio (Frugeri, 2019). Por outro lado, um volume de solvente de dessorção negativo, indica que ao reduzir o volume de solvente, tende-se a concentrar o analito extraído da amostra melhorando a sensibilidade analítica (Muniandy; Mohamad; Raoov, 2024; Kabir; Locatelli; Ulusoy, 2017).

Figura 18. Representação do Diagrama de Pareto dos efeitos para os cinco fatores estudados com significância dos mesmos avaliada com erro padrão de 5%, THC (A) e CBD (B).



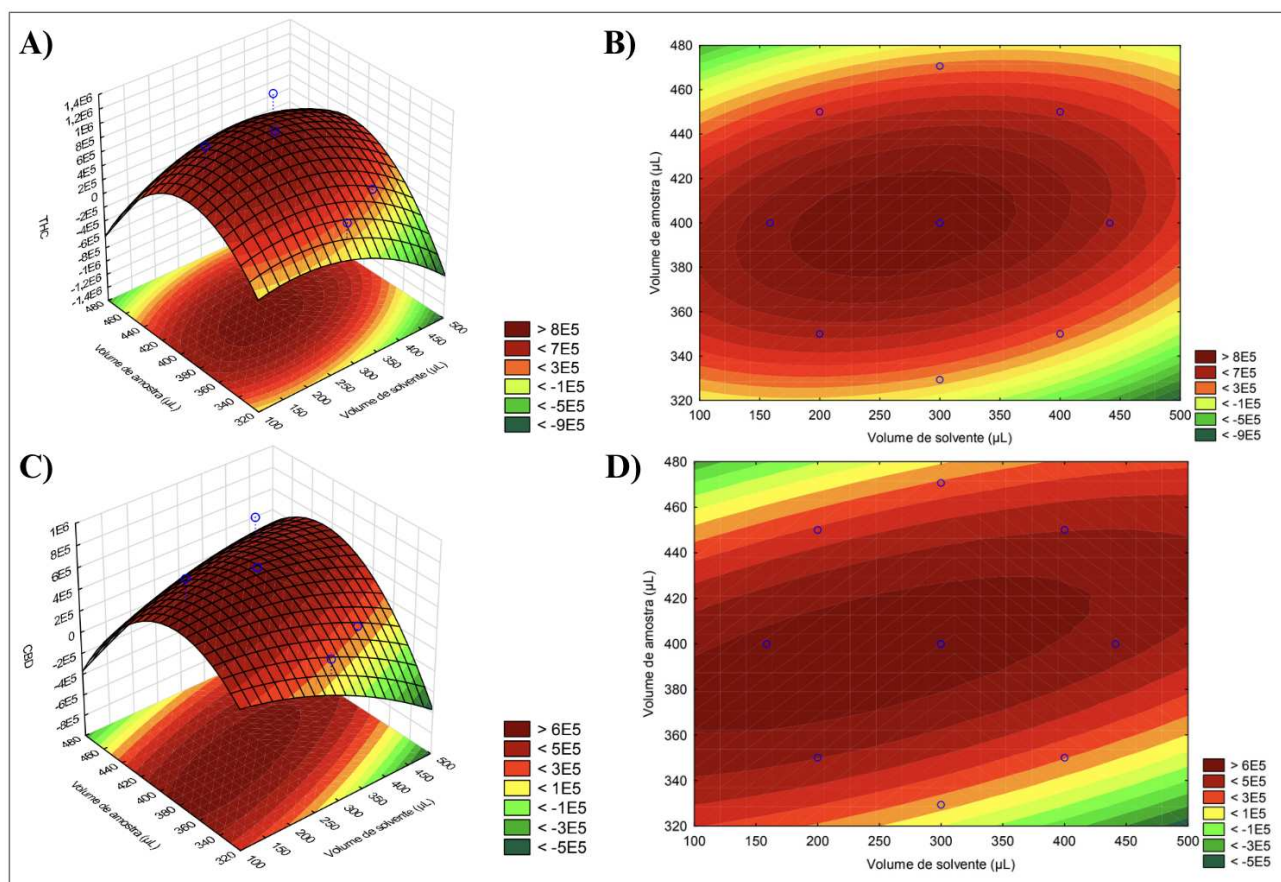
Fonte: Autoria própria, 2024.

4.4.3 Planejamento Fatorial Completo

A partir dos gráficos de superfície de resposta (Figura 19), nota-se que há um valor máximo de resposta dentro do domínio experimental. Portanto, definiu-se como melhor condição experimental para a DMSPE o volume de 400 µL de amostra e 250 µL de volume

de solvente de dessorção. A relação entre o volume de amostra e o volume de solvente é importante. Quando essa proporção é ideal, o processo de transferência dos fitocanabinoides é eficiente. Fora desse equilíbrio, a eficiência da extração cai, pois pode haver saturação ou diluição excessiva dos fitocanabinoides no solvente de dessorção, o que afeta diretamente a área de resposta dos analitos na cromatografia (Muniandy; Mohamad; Raoov, 2024).

Figura 19. Gráficos de superfície de resposta para os analitos estudados, em A e B) THC; C e D) CBD.



Fonte: Autoria própria, 2024.

Comparado a outras técnicas e trabalhos na literatura, a DMSPE utilizando MNPs@ZEO oferece um preparo de amostra rápido e barato, com pouco volume de solvente de dessorção e de amostra, atendendo aos princípios da Química Verde. A melhor condição experimental encontrada foi o uso de 15 mg de MNPs@ZEO, 1 minuto de agitação, 400 µL de amostra, 250 µL de volume de solvente de dessorção e pH da amostra igual a 7. As principais vantagens da DMSPE utilizando zeólita em relação à SPE e LLE convencionais estão listadas na Tabela 12.

Tabela 12. Principais vantagens da DMSPE utilizando zeólitas em comparação às técnicas convencionais de extração.

Critério	SPE convencional	LLE convencional	DMSPE com zeólita	Referência
Consumo de solvente	Moderado a alto	Alto	Baixo	Inamassu; Raspini e Silva; Marchioni, 2024; Wojnowski <i>et al.</i> , 2022; Badawy <i>et al.</i> , 2022; Kazemi; Javanbakht, 2020; Bordin <i>et al.</i> , 2015.
Consumo de material sortivo	Moderado (uso de cartuchos)	Não aplicável	Baixo	
Quantidade de amostra	Moderada a alta	Geralmente alta	Baixa	
Complexidade do procedimento	Moderada	Moderada	Baixa (etapas rápidas com separação magnética)	
Tempo de análise	Moderado	Moderado	Rápido	
Eficácia na extração	Alta	Alta	Alta	
Custo operacional	Moderado a alto	Baixo a moderado	Baixo	
Impacto ambiental	Moderado	Alto	Baixo	

Legenda: SPE = extração em fase sólida (do inglês, *solid phase extraction*); LLE = extração líquido-líquido (do inglês, *liquid-liquid extraction*); DMSPE = extração em fase sólida magnética dispersiva (do inglês, *magnetic dispersive solid phase extraction*). **Fonte:** Autoria própria, 2024.

A principal vantagem em relação à LLE é referente a redução do volume de solventes orgânicos utilizados, além da velocidade da extração por não depender de centrífugas para separação das fases (Li *et al.*, 2021). Já em relação à SPE convencional, que geralmente necessita de grandes volumes de amostra e de cartuchos caros que geram resíduos contaminantes (Badawy *et al.*, 2022), a DMSPE utiliza pouco volume de amostra e pouca fase sortiva. Ainda, referente à área superficial e à eficiência de extração, as MNPs@ZEO são de tamanho nanométrico, enquanto as fases sortivas convencionais, como C18-E e X-AW, são de tamanho micrométrico. Isso implica em maiores áreas superficiais, aumentando a adsorção dos analitos e a eficiência da extração, permitindo extrações mais rápidas e em menores volumes de amostra (Loiola *et al.*, 2022; Kyeong *et al.*, 2021).

4.5 VALIDAÇÃO ANALÍTICA

4.5.1 Limite inferior de quantificação (LIQ) e Limite inferior de detecção (LD)

A menor concentração da curva analítica que pode ser determinada com precisão e exatidão adequadas é 400 ng/mL para CBD e THC, sendo esse o limite inferior de

quantificação. Já o limite de detecção obtido para CBD foi de 82,25 ng/mL e para o THC foi de 348,21 ng/mL.

4.5.2 Linearidade

O método DMSPE apresentou uma linearidade na faixa de concentração de 400 a 4000 ng/mL para CBD e THC. Considerando o valor do coeficiente de correlação como maior ou igual a 0,990 ($r \geq 0,990$), comprova-se a linearidade para ambos os analitos (Tabela 13). Para o CBD obteve-se um r igual a 0,994 e para o THC um r igual a 0,991. Ainda, obteve-se coeficientes angulares diferentes de zero, cumprindo o requisito da RDC nº 166, 2017 da ANVISA. Os valores de *lack-of-fit* para CBD e THC foram de 0,968 e 0,7945, respectivamente, indicando que não há falta de ajuste dentro do nível de confiança estabelecido de $p > 0,05$.

Tabela 13. Parâmetros de validação analítica para o método DMSPE.

Analito	Linearidade			Concentração (ng/mL)	Exatidão (EPR) %	Precisão (CV) %	Efeito Residual (%)	Efeito Matriz (teste t)	Estabilidade (CV%)
	Equação da reta	r	<i>Lack-of-fit</i>						
CBD	$y = 158,91x + 22058$	0,994	0,9681	400 (LIQ)	3,16	10,89	2,5	0,068	8,75
				800 (P2)	5,69	1,16			
				1200 (CQB)	-3,57	0,32			
				1800 (CQM)	2,84	0,77			
				3200 (CQA)	-8,66	12,15			
				4000 (LSQ)	4,73	6,31			
THC	$y = 150,81x + 199270$	0,991	0,7945	400 (LIQ)	7,89	6,76	18,8	0,007	13,22
				800 (P2)	-6,91	0,45			
				1200 (CQB)	8,14	8,29			
				1800 (CQM)	-2,67	14,93			
				3200 (CQA)	-2,77	0,86			
				4000 (LSQ)	0,50	1,29			

Fonte: Autoria própria, 2024.

4.5.3 Exatidão

Os valores de exatidão obtidos em EPR (%) estão representados na Tabela 13. Para CBD obteve-se valores na faixa de -8,66 a 5,69% e para THC valores na faixa de -6,91 a 8,14%. Todos os valores estão dentro do valor de aceitabilidade, o qual é de $\pm 15\%$ do valor teórico para todos os pontos da curva.

4.5.4 Precisão

A precisão foi avaliada em termos de repetibilidade. Nestas condições, os resultados independentes são obtidos sob as mesmas condições de operação, mesmo analista e mesma instrumentação, em uma única corrida analítica. Os resultados estão agrupados na Tabela 13 e variaram de 0,32 a 12,15% para o CBD e de 0,45 a 14,93% para o THC. Todos os valores ficaram dentro do critério de aceitabilidade de CV até 15% para todos os pontos da curva.

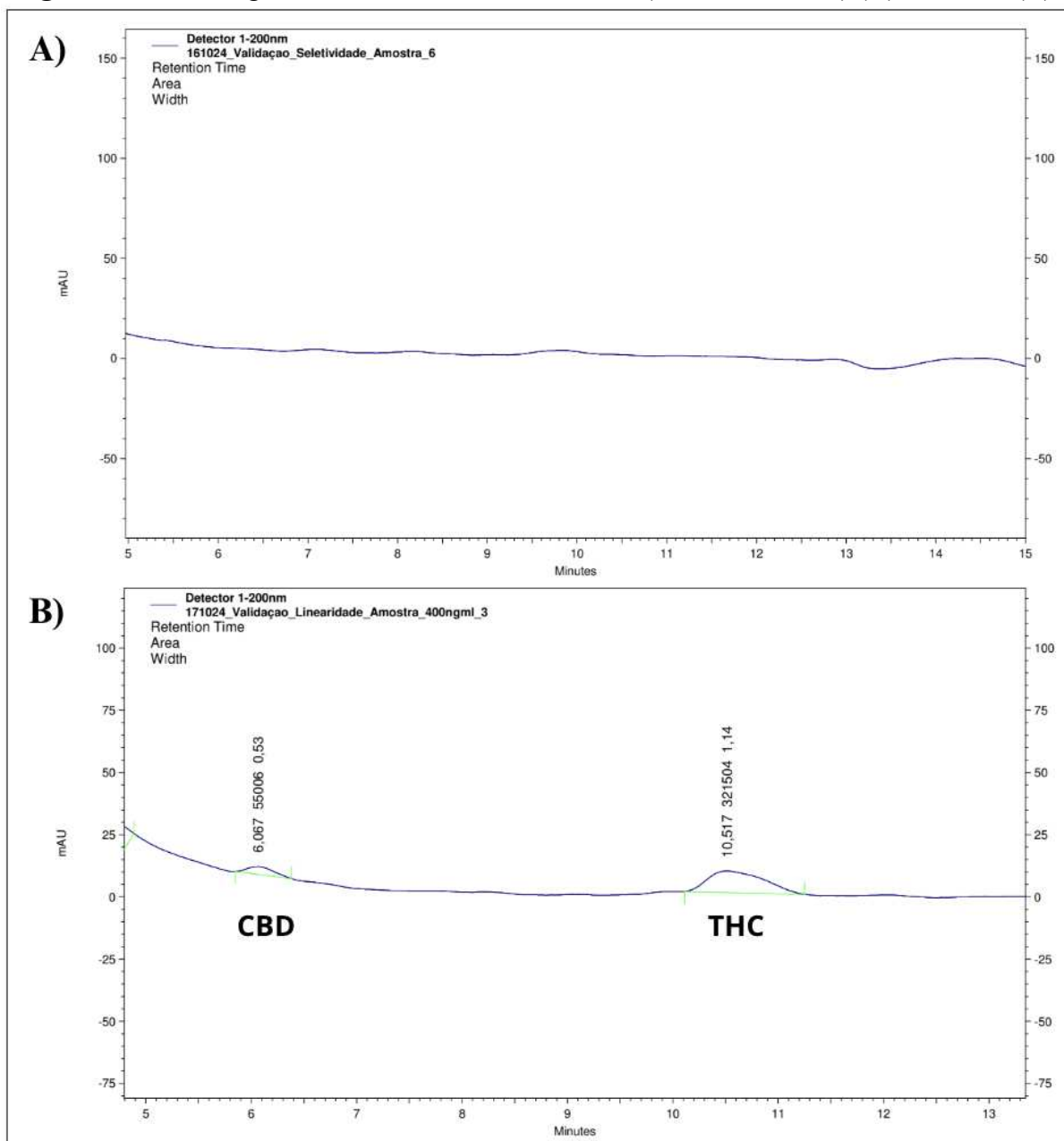
4.5.5 Efeito residual

O efeito residual apresentou valores de 2,5% para o CBD e 18,8% para o THC em amostras de urina. Visto que o critério de aceitabilidade do efeito residual são respostas de picos interferentes no tempo de retenção dos analitos inferiores a 20% da resposta do analito nas amostras processadas do LIQ, o requisito foi cumprido e não há efeito residual para nenhum dos analitos (Tabela 13).

4.5.6 Seletividade

A seletividade foi avaliada através dos cromatogramas das amostras de urina branco em comparação aos cromatogramas das amostras de urina enriquecidas com os analitos, ambas processadas sob as mesmas condições experimentais de extração. Não foram observadas quaisquer respostas atribuíveis a componentes interferentes nos tempos de retenção do CBD e do THC nas seis amostras branco analisadas (Figura 20).

Figura 20. Cromatograma de amostra de urina branco (isenta do analito) (A) e do LIQ (B).



Fonte: Autoria própria, 2024.

4.5.7 Efeito matriz

Para análise do efeito matriz, dados dos coeficientes angulares de seis curvas, três em urina e três em água, foram submetidos a um teste T de hipóteses, com 5% de significância. Os valores do teste estão condensados na Tabela 13.

Visto que adotou-se um valor de significância α de 5% para o teste de hipóteses, a rejeição da hipótese nula (não há efeito matriz) ocorre quando t valor for menor ou igual ao valor de 0,05. Observa-se que o t valor para THC é menor que 0,05, portanto, há efeito matriz

para o THC. Porém, para o CBD, o t valor foi superior a 0,05. Assim, não rejeita-se a hipótese nula e, por conseguinte, não há efeito matriz para o CBD.

4.5.8 Estabilidade

Ao longo de três dias, a mesma amostra de urina enriquecida com o LSQ de THC e CBD e preparada no dia 0 pela técnica DMSPE foi analisada e as áreas médias obtidas nos cromatogramas foram utilizadas para calcular as concentrações médias de THC e CBD em cada uma das análises. Os dados das variações estão organizados na Tabela 13.

Ao longo dos três dias não houve alteração significativa na concentração de THC e CBD no nível de concentração estudado (LSQ), obtendo-se valores de coeficiente de variação (CV) de 13,22% e 8,75% para THC e CBD, respectivamente. Como aceitou-se um coeficiente de variação de $\pm 15\%$ do valor nominal, a amostra processada pela técnica DMSPE mostrou-se estável para análise em até três dias após processamento no nível avaliado.

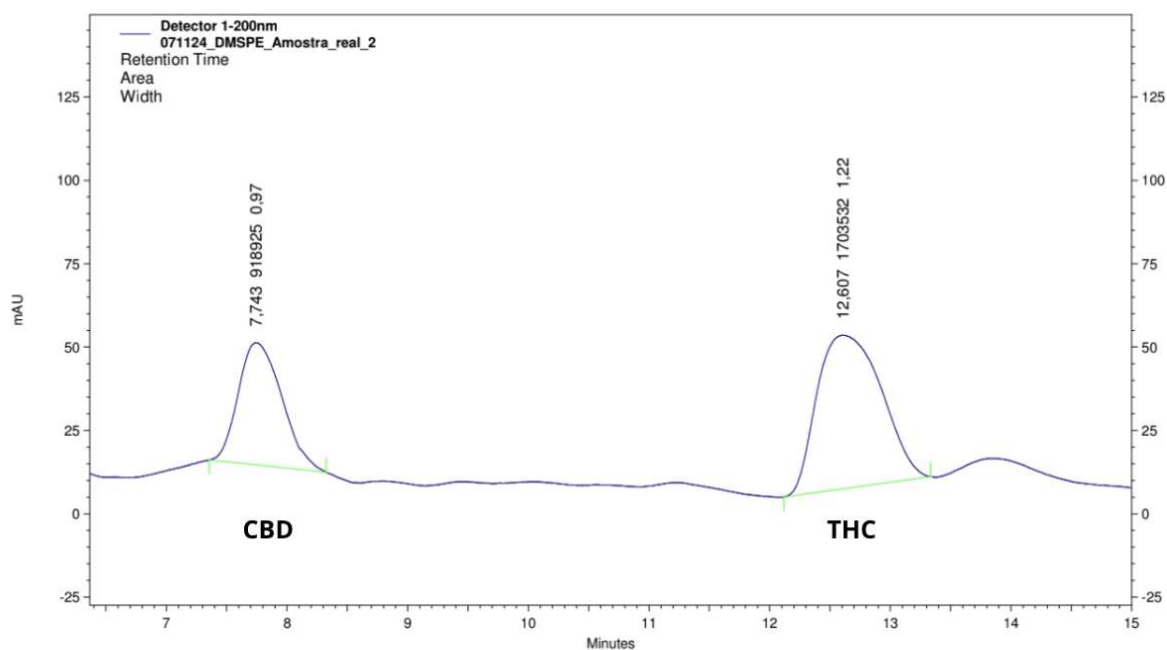
4.6 APLICAÇÃO DA DMSPE EM AMOSTRAS REAIS

O método foi aplicado satisfatoriamente em amostras de urina de pacientes com suspeita de intoxicação por *Cannabis* provenientes do CIATox/SC (Figura 21). A partir da curva de calibração foi possível quantificar os valores das áreas dos picos de CBD e THC (Tabela 14).

Tabela 14. Concentrações de CBD e THC em ng/mL encontradas nas amostras reais.

Amostra	Concentração de CBD (ng/mL)	Concentração de THC (ng/mL)
1	2563,75	8722,21
2	4385,29	9974,55
3	4592,38	10199,31
4	4064,48	11162,71
5	4070,62	9987,02

Fonte: Autoria própria, 2024.

Figura 21. Cromatograma da DMSPE aplicada à amostra real.

Fonte: Autoria própria, 2024.

Vale ressaltar que a concentração de canabinoides encontrados na urina é muito variável entre indivíduos. Isso deve-se a diversos fatores, como a composição corporal, hidratação, taxa metabólica, frequência de uso, potência e dose da *Cannabis* utilizada (Sholler *et al.*, 2022; Schep *et al.*, 2020). Por exemplo, de acordo com o Relatório da UNODC de 2024, algumas jurisdições parecem ter acelerado o consumo nocivo da droga e levado a uma diversificação dos produtos de *Cannabis*, muitos deles com alto teor de THC e, conseqüentemente, maior potência. Este fator aumenta ainda mais o risco e a severidade dos casos de intoxicação, além de aumentar a concentração de THC que pode ser excretada na urina (UNODC, 2024; Wong; Baum, 2019). Ainda, a composição corporal, a taxa de hidratação e metabólica são aspectos que influenciam diretamente na toxicocinética do THC e CBD (Schep *et al.*, 2020; Chayasirisobhon, 2020), podendo alterar as concentrações excretadas nas amostras de urina.

Diante disso, salienta-se que mais amostras serão analisadas futuramente, em confronto com o quadro clínico e histórico do paciente a fim de elucidar melhor os dados em amostras biológicas.

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho, o método inovador DMSPE-HPLC-DAD utilizando MNPs@ZEO foi desenvolvido, validado e aplicado com sucesso para determinar CBD e THC em amostras de urina de pacientes com suspeita de intoxicação por *Cannabis sativa*. As MNPs@ZEO sintetizadas e funcionalizadas forneceram uma extração com biossorvente com propriedades magnéticas e boa capacidade de adsorção, sobretudo devido interações hidrofóbicas nas cavidades e poros das zeólitas, sendo um nano e biomaterial mais sustentável, ecológico e econômico, que não necessita de centrifugação para separação das fases, economizando pelo menos 15 minutos no processo de extração. Ficou definido como melhor condição experimental o uso de 15 mg de MNPs@ZEO, 1 minuto de agitação, 400 µL de amostra, 250 µL de volume de solvente de dessorção e pH da amostra igual a 7. As técnicas de caracterização utilizadas forneceram dados essenciais para a compreensão quanto às MNPs@ZEO sintetizadas, sendo possível determinar a proporção entre as fases e o tamanho médio das partículas geradas.

O método desenvolvido e otimizado foi validado de acordo com os guias nacionais da ANVISA e internacionais da UNODC e do SWGTOX e foi aplicado a amostras de urina de pacientes com suspeita de intoxicação por *Cannabis sativa* registrados pelo CIATox/SC de forma satisfatória. A técnica apresentou seletividade, linearidade, com exatidão e precisão, não apresentando efeito residual, e reportando efeito matriz apenas para THC. Portanto, a metodologia pode ser aplicada em casos de intoxicação aguda por *Cannabis* a fim de confirmar o diagnóstico de intoxicação e contribuir para Análise Toxicológica de Urgência. A metodologia desenvolvida pode ainda ser aplicada para avaliação da exposição aos canabinoides, auxiliando na interpretação de resultados duvidosos, em pesquisas relacionadas à toxicocinética desses analitos e, ainda, futuramente, em casos de monitoramento terapêutico para pacientes que utilizam medicamentos à base de *Cannabis*.

Perspectivas futuras consistem em avaliar o *carryover* e a possibilidade de reutilização das MNPs@ZEO e inserir produtos de biotransformação do THC na metodologia. Mais estudos e experimentos TEM, incluindo difração de elétrons, análises químicas (por espectroscopia EDS) e imagens de alta resolução, serão realizados para elucidar a possibilidade de existirem nanoestruturas do tipo *core-shell* nas amostras MNPs@ZEO e corroborar com a caracterização das mesmas, além da plotagem de um histograma com o tamanho médio das partículas a fim de obter um caráter quantitativo da análise TEM. Ainda,

avaliar mais lotes das nanopartículas magnéticas ancoradas à zeólitas a fim de avaliar melhor a reprodutibilidade.

REFERÊNCIAS

ABRACIT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CENTROS DE INFORMAÇÃO E ASSISTÊNCIA TOXICOLÓGICA. **Lista dos centros.** Disponível em: <<https://www.gov.br/mj/pt-br/assuntos/sua-protecao/politicas-sobre-drogas/subsistema-de-alerta-rapido-sobre-drogas-sar/terceiro-informe-sar-3nov.pdf>> . Acesso 25 mar. 2023.

ABRACIT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CENTROS DE INFORMAÇÃO E ASSISTÊNCIA TOXICOLÓGICA. Sobre. Disponível em: <https://abracit.org.br/sobre/>. Acesso em: 17 nov. 2024.

AGILENT TECHNOLOGIES. Increasing resolution using longer columns while maintaining analysis time: advantages of the wide power range of the Agilent 1290 Infinity LC System. 2012. Disponível em: <https://www.agilent.com/Library/applications/5991-0513EN.pdf>. Acesso em: 17 de nov. 2024.

ALI, Abdu Hussen. High-performance liquid chromatography (HPLC): A review. **Annals of advances in chemistry**, v. 6, n. 1, p. 010-020, 2022.

ALVES, P.; AMARAL, C.; TEIXEIRA, N.; CORREIA-DA-SILVA, G. *Cannabis sativa*: Much more beyond Δ^9 -tetrahydrocannabinol. **Pharmacological Research**, v. 157, p. 104822, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104822>.

ANVISA. **Anvisa aprova novo produto de Cannabis a ser fabricado no Brasil.** Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2022/anvisa-aprova-novo-produto-de-cannabis-a-ser-fabricado-no-brasil#:~:text=A%20Ag%C3%Aancia%20Nacional%20de%20Vigil%C3%A2ncia,a%20ser%20fabricado%20no%20Brasil.>>. Acesso em: 12 nov. 2024.

ANTUNES, M.; BARROSO, M.; GALLARDO, E. Analysis of cannabinoids in biological specimens: an update. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 20, n. 3, p. 2312, 2023.

AMIN, M. R.; ALI, D. W. Pharmacology of medical cannabis. **Recent advances in cannabinoid physiology and pathology**, 2019, p. 151-165.

ASANU, M.; BEYENE, D.; BEFEKADU, A.; OUESLATI, W. Removal of Hexavalent Chromium from Aqueous Solutions Using Natural Zeolite Coated with Magnetic Nanoparticles: Optimization, Kinetics, and Equilibrium Studies. **Adsorption Science & Technology**, v. 2022, p. 1–12, 2022. DOI: 10.1155/2022/8625489.

AURORA PROSCI. SPE Cartridges, C18. Disponível em: <https://www.auroraprosci.com/SPE-Cartridges-C18#:~:text=SPE%20Cartridges%2C%20C18%2C%20Particle%20Size.%CE%BCm%2C%20Pore%20Size%20120%20%20%20C3%85>. Acesso em: 10 nov. 2024.

AZEVEDO, J. L. S. A importância dos centros de informação e assistência toxicológica e sua contribuição na minimização dos agravos à saúde e ao meio ambiente no Brasil. 2010.

BADAWY, Mohamed EI et al. A review of the modern principles and applications of solid-phase extraction techniques in chromatographic analysis. **Analytical Sciences**, v. 38, n. 12, p. 1457-1487, 2022.

BASTOS, F. I. P. M.; VASCONCELLOS, M. T. L. D.; DE BONI, R. B.; REIS, N. B. D.; COUTINHO, C. F. D. **III Levantamento Nacional sobre o uso de drogas pela população brasileira.** 2017. Rio de Janeiro: FIOCRUZ/ICICT, 2017. 528 p.

BILLIARD, Kayla M.; DERSHEM, Amanda R.; GIONFRIDDO, Emanuela. Implementing green analytical methodologies using solid-phase microextraction: a review. **Molecules**, v. 25, n. 22, p. 5297, 2020.

BLOOMFIELD, M. A.; HINDOCHA, C.; GREEN, S. F.; WALL, M. B.; LEES, R.; PETRILLI, K.; FREEMAN, T. P. The neuropsychopharmacology of cannabis: A review of human imaging studies. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 195, p. 132-161, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.10.006>.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC N° 325, de 3 de dezembro de 2019**, p. 33. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2019/rdc0325_03_12_2019.pdf. Acesso 08 mar. 2023.

BRASIL. **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC n° 327, de 9 de dezembro de 2019**. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, n. 239, p. 84, 11 dez. 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Guia para validação de métodos bioanalíticos e análise de amostras de estudo para submissões regulatórias de medicamentos industrializados de uso humano. **Guia n° 72/2024 – versão 1**. Brasília, 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br>. Acesso em: 16 de nov. 2024.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução - RDC n° 27, de 17 de maio de 2012**. Dispõe sobre requisitos para a realização de ensaios clínicos com medicamentos no Brasil. Diário Oficial da União, Brasília, 17 maio 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC n° 166, de 24 de julho de 2017**. Estabelece os requisitos técnicos e regulatórios para a realização de estudos clínicos com medicamentos no Brasil. Diário Oficial da União, Brasília, 24 jul. 2017.

BROECKHOVEN, K.; DESMET, Gert. Advances and innovations in liquid chromatography stationary phase supports. **Analytical Chemistry**, v. 93, n. 1, p. 257-272, 2020.

BORDIN, D. C. M.; MONEDEIRO, F. F. S. S.; CAMPOS, E. D.; ALVES, M.; BUENO, L.; MARTINIS, B. Técnicas de preparo de amostras biológicas com interesse forense. **Sci Chromatogr**, v. 7, n. 2, p. 125-143, 2015.

CARONA, A.; BICKER, J.; FONSECA, C.; DA GRAÇA CAMPOS, M.; FALCÃO, A.; FORTUNA, A. Development and validation of an HPLC-DAD method for the quantification of cannabigerol, cannabidiol, cannabinol and cannabichromene in human plasma and mouse matrices. **The Analyst**, v. 149, n. 14, p. 3815–3827, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1039/d4an00070f>.

CARVALHO, A. F.; STUBBS, B.; VANCAMPFORT, D.; KLOIBER, S.; MAES, M.; FIRTH, J.; KOYANAGI, A. Cannabis use and suicide attempts among 86,254 adolescents aged 12–15 years from 21 low-and middle-income countries. **European Psychiatry**, v. 56, n. 1, p. 8-13, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eurpsy.2018.11.004>.

CARVALHO, V.M.; ROCHA, E.D. Toxicologia analítica: da triagem à confirmação. In: Peixe, T.S.; Ribeiro Neto, L.M.; Graff, S.; Santos, C.E.M. **Toxicologia: tópicos aplicados**. Curitiba: Brazil Publishing, 2020, p.303-347.

CIATOX - CENTRO DE INFORMAÇÃO E ASSISTÊNCIA TOXICOLÓGICA. Página inicial. Disponível em: <http://ciatox.sc.gov.br/index.php>. Acesso em: 17 nov. 2024a.

CIATOX - UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA. HOSPITAL UNIVERSITÁRIO POLYDORO ERNANI DE SÃO THIAGO. CENTRO DE INFORMAÇÃO E ASSISTÊNCIA TOXICOLÓGICA DE SANTA CATARINA: **Relatório Anual 2023** / Universidade Federal de Santa Catarina, Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago; Secretaria de Estado da Saúde de Santa Catarina; Organizadores, Claudia Regina dos Santos et al. - Florianópolis, SC: HU/UFSC, 2024b.

CITTI, Cinzia et al. Medicinal cannabis: Principal cannabinoids concentration and their stability evaluated by a high performance liquid chromatography coupled to diode array and quadrupole time of flight mass spectrometry method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 128, p. 201-209, 2016.

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

CHAYASIRISOBHON, Sirichai. Mechanisms of Action and Pharmacokinetics of Cannabis. **The Permanente Journal**, v. 25, p. 1-3, 2020. DOI: <https://doi.org/10.7812/TPP/19.200>.

CHEN, Simin et al. Preparation of poly (methacrylic acid-co-ethylene glycol dimethacrylate)-functionalized magnetic polydopamine nanoparticles for the extraction of six cannabinoids in wastewater followed by UHPLC-MS/MS. **Talanta**, v. 264, p. 124752, 2023.

CHEN, Y.; KLIG, J. Cannabis-related emergencies in children and teens. **Current opinion in pediatrics**, v. 31, n. 3, p. 291-296, 2019.

CIOLINO, L. A.; RANIERI, T. L.; TAYLOR, A. M. Commercial cannabis consumer products part 2: HPLC-DAD quantitative analysis of cannabis cannabinoids. **Forensic Science International**, v. 289, p. 438-447, 2018.

CLAUDET, I.; MOUVIER, S.; LABADIE, M.; MANIN, C.; MICHARD-LENOIR, A. P.; EYER, D.; MARIE-JEANNE STUDY GROUP. Unintentional cannabis intoxication in toddlers. **Pediatrics**, v. 140, n. 3, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1542/peds.2017-0017>

COELHO, A. A. TOPAS and TOPAS-Academic: an optimization program integrating computer algebra and crystallographic objects written in C++. **J. Appl. Crystallogr.** 51, (2018) 210–218. <https://doi.org/10.1107/S1600576718000183>.

COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006. 452p.

COSTA, A. D. O.; ALONZO, H. G. A. Centros de Informação e Assistência Toxicológica no Brasil: descrição preliminar sobre sua organização e funções. **Saúde em Debate**, v. 43, p. 110-121, 2019.

CRISTINO, L.; BISOGNO, T.; DI MARZO, V. Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. **Nature Reviews Neurology**, v. 16, n. 1, p. 9-29, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0302-7>.

CRUZ, J. C.; MIRANDA, L. F. C.; QUEIROZ, M. E. C. 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. **Journal of Separation Science**, v. 44, n. 8, p. 1621-1632, 2021.

CRUZ, J. C.; ROSA, M. A.; MORÉS, L.; CARASEK, E.; DE SOUZA CRIPPA, J. A.; FIGUEIREDO, E. C.; QUEIROZ, M. E. C. Magnetic restricted-access carbon nanotubes for SPME to determine cannabinoids in plasma samples by UHPLC-MS/MS. **Analytica Chimica Acta**, v. 1226, p. 340160, 2022.

DA SILVA, A. K.; SOBIESKI, E.; VIANA, L. H.; LANÇAS, F. M.; NAZARIO, C. E. D. Extração em fase sólida magnética (MSPE): fundamentos e aplicações. **Sci. Chromatogr.**, v. 8, p. 239-256, 2016.

DING, Ya-Wen et al. Core-shell magnetic zeolite imidazolate framework-8 as adsorbent for magnetic solid phase extraction of brucine and strychnine from human urine. **Journal of Chromatography B**, v. 1173, p. 122702, 2021.

DUARTE, J. A. Metodologias de detecção e de confirmação de canabinoides em amostras brutas de cannabis sativa L. e em amostras biológicas de fluido oral. 2021.

FRANCO, C.; PROTTI, S.; PORTA, A.; POLLASTRO, F.; PROFUMO, A.; MANNUCCI, B.; MERLI, D. Stability of cannabidiol (CBD) in solvents and formulations: A GC-MS approach. **Results in Chemistry**, v. 4, p. 100465, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2022.100465>.

FRUGERI, P. M. Determinação de sulfaguanidina sódica empregando sistema FIA. Pré- concentração e determinação de organofosforados utilizando material de acesso restrito. Alfenas/MG, 2019.

GAUDET, L.; HOGUE, K.; SCOTT, S. D.; HARTLING, L.; ELLIOTT, S. A. Acute pediatric cannabis intoxication: A scoping review. **Journal of Child Health Care**, v. 28, n. 1, p. 196-214, 2022.

GIONFRIDDO, Emanuela. Green analytical solutions for sample preparation: Solid phase microextraction and related techniques. **Physical Sciences Reviews**, v. 5, n. 8, p. 20200006, 2020.

GODAGE, N. H.; GIONFRIDDO, E. Use of natural sorbents as alternative and green extractive materials: A critical review. **Analytica Chimica Acta**, v. 1125, p. 187-200, 2020.

HÄDENER, M.; GELMI, T. J.; MARTIN-FABRITIUS, M.; WEINMANN, W.; PFÄFFLI, M. Cannabinoid concentrations in confiscated cannabis samples and in whole blood and urine after smoking CBD-rich cannabis as a “tobacco substitute”. **International Journal of Legal Medicine**, v. 133, p. 821-832, 2019.

HAWACH SCIENTIFIC. Normal Phase Silica SPE Cartridges. Disponível em: <https://www.specartridge.com/product/normal-phase-silica-spe-cartridges/#:~:text=Particle%20size%3A%2040%2D75%CE%BCm%3B.Average%20pore%20size%3A%2070%C3%85>. Acesso em: 10 nov. 2024.

HAYES, R.; AHMED, A.; EDGE, T.; ZHANG, H. Core-shell particles: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1357, p. 36-52, 2014.

HERBERT, A.; HARDY, J. Medicinal cannabis use in palliative care. **Australian Journal of General Practice**, v. 50, n. 6, p. 363-368, 2021.

HURD, Y. L.; MANZONI, O. J.; PLETNIKOV, M. V.; LEE, F. S.; BHATTACHARYYA, S.; MELIS, M. Cannabis and the developing brain: insights into its long-lasting effects. **Journal of Neuroscience**, v. 39, n. 42, p. 8250-8258, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2067-19.2019>.

INAMASSU, C. H.; E SILVA, L. R.; MARCHIONI, C. Recent advances in the chromatographic analysis of endocannabinoids and phytocannabinoids in biological samples. **Journal of Chromatography A**, v. 465225, 2024.

KABIR, Abuzar; LOCATELLI, Marcello; ULUSOY, Halil Ibrahim. Recent trends in microextraction techniques employed in analytical and bioanalytical sample preparation. **Separations**, v. 4, n. 4, p. 36, 2017.

KAZEMI, Javad; JAVANBAKHT, Vahid. Alginate beads impregnated with magnetic Chitosan@Zeolite nanocomposite for cationic methylene blue dye removal from aqueous solution. **International journal of biological macromolecules**, v. 154, p. 1426-1437, 2020.

KHANDAY, W. A. et al. Mesoporous zeolite-activated carbon composite from oil palm ash as an effective adsorbent for methylene blue. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 70, p. 32-41, 2017.

KORDALA, Natalia; WYSZKOWSKI, Mirosław. Zeolite Properties, Methods of Synthesis, and Selected Applications. **Molecules**, v. 29, n. 5, p. 1069, 2024.

KYEONG, S.; KIM, J.; CHANG, H.; LEE, S. H.; SON, B. S.; LEE, J. H.; RHO, W.; PHAM, X.; JUN, B. Magnetic nanoparticles. In: **Nanotechnology for bioapplications**. p. 191-215, 2021.

LAZARJANI, M. P. et al. Methods for quantification of cannabinoids: a narrative review. **Journal of Cannabis Research**, v. 2, p. 1-10, 2020.

LI, Nan et al. Recent advances in sample preparation techniques for quantitative detection of pharmaceuticals in biological samples. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 142, p. 116318, 2021.

LU, H. C.; MACKIE, K. Review of the endocannabinoid system. **Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging**, v. 6, n. 6, p. 607-615, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bpsc.2020.10.002>.

LUCAS, C. J.; GALETTIS, P.; SCHNEIDER, J. The pharmacokinetics and the pharmacodynamics of cannabinoids. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 84, n. 11, p. 2477-2482, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/bcp.13710>.

LOIOLA, Adonay R. et al. Magnetic zeolite composites: Classification, synthesis routes, and technological applications. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 560, p. 169651, 2022.

LPTOX/UFSC - LABORATÓRIO DE PESQUISA EM TOXICOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA. Prestação de serviços. Disponível em: <https://lptox.paginas.ufsc.br/prestacao-de-servicos/>. Acesso em: 17 nov. 2024.

MALLAKPOUR, S.; SIROUS, F.; DINARI, M. Bio-sorbent alginate/citric acid-sawdust/Fe₃O₄ nanocomposite beads for highly efficient removal of malachite green from water. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 222, p. 2683-2696, 2022.

MEIER, Ulf et al. Cannabinoid concentrations in blood and urine after smoking cannabidiol joints. **Forensic science international**, v. 291, p. 62-67, 2018.

MILLAR, S. A.; STONE, N. L.; YATES, A. S.; O'SULLIVAN, S. E. A systematic review on the pharmacokinetics of cannabidiol in humans. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 425858, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01365>.

MOHANTA, Jhilirani et al. Alkali assisted hydrophobic reinforcement of coconut fiber for enhanced removal of cationic dyes: equilibrium, kinetics, and thermodynamic insight. **International Journal of Phytoremediation**, v. 23, n. 13, p. 1423-1431, 2021.

MONTÉGUT, Gaëtan et al. Ammonium and potassium removal from swine liquid manure using clinoptilolite, chabazite and faujasite zeolites. **Journal of environmental management**, v. 167, p. 147-155, 2016.

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

MOREAU, R. L. de M.; SIQUEIRA, M. E. P. B. de. *Toxicologia analítica*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

MOREIRA E SOUZA, P. P.; MADIA, M. A. O.; SCANFERLA, D. T. P.; BACCULE, N. S.; MARTINS, M. D.; MARCHIONI, C.; MOSSINI, S. A. G.. Validação de metodologia analítica para a determinação de canabinoides em fluido oral por microextração em fase sólida e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. **Anais do 8th International Meeting of Biosciences and Physiopathology e 12 Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia**, p. 42, 2021.

MUNIANDY, Yagulan; MOHAMAD, Sharifah; RAOOV, Muggundha. Green and efficient magnetic micro-solid phase extraction utilizing tea waste impregnated with magnetic nanoparticles for the analysis of ibuprofen in water samples by using UV-vis spectrophotometry. **RSC advances**, v. 14, n. 17, p. 11977-11985, 2024.

MURRAY, D.; OLSON, J.; LOPEZ, A. S. When the grass isn't greener: a case series of young children with accidental marijuana ingestion. **Canadian Journal of Emergency Medicine**, v. 18, n. 6, p. 480-483, 2016.

NAHAR, L.; ONDER, A.; SARKER, S. D. A review on the recent advances in HPLC, UHPLC and UPLC analyses of naturally occurring cannabinoids (2010–2019). **Phytochemical Analysis**, v. 31, n. 4, p. 413-457, 2020.

NEVES, M. B. R. Evaluation of the efficiency of a toxicology laboratory, 2020.

NIA, N. N., & HADJMOHAMMADI, M. R. (2021). Nanofluid of magnetic-activated charcoal and hydrophobic deep eutectic solvent: Application in dispersive magnetic solid-phase extraction for the determination and preconcentration of warfarin in biological samples by high-performance liquid chromatography. **Biomedical Chromatography**, 35(8), e5113.

NYANKSON, Emmanuel et al. Characterization and evaluation of zeolite A/Fe₃O₄ nanocomposite as a potential adsorbent for removal of organic molecules from wastewater. **Journal of Chemistry**, v. 2019, n. 1, p. 8090756, 2019.

PHENOMENEX. Strata C18-E Solid Phase Extraction Cartridges. Disponível em: <https://www.phenomenex.com/products/strata-solid-phase-extraction-products/strata-c18-e#documents>. Acesso em: 10 nov. 2024.

PHENOMENEX. Strata-X AW Solid Phase Extraction Cartridges. Disponível em: https://www.phenomenex.com/products/strata-x-solid-phase-extraction-products/strata-x-aw?srsltid=AfmBOosKs_IzkZKSug-p4PTCBBAYi0crJzt0vUtlL4hI99QGFAmOsPU. Acesso em: 10 nov. 2024.

RAD, S. S.; DALALI, N.; BAHERI, T. Combination of magnetic solid-phase extraction with dispersive liquid-liquid microextraction followed by GC-MS for trace analysis of synthetic cannabinoids in plasma samples. **Micro & Nano Letters**, v. 15, n. 8, p. 545-549, 2020.

RAMSEY, F. L.; SCHAFER, D. W. **The statistical sleuth - a course in methods of data analysis**. Belmont: Duxbury Press, 1997.

REBER, J. D.; KARSCHNER, E. L.; SEITHER, J. Z.; KNITTEL, J. L.; WALTERSCHEID, J. P. Screening and confirmation methods for the qualitative identification of nine phytocannabinoids in urine by LC-MS/MS. **Clinical Biochemistry**, v. 98, p. 54-62, 2021.

SANNIKOVA, Natalia. The Effect of Storage Conditions on Cannabinoid Stability. **Ascension Sciences Inc.**, 2020. Disponível em: <https://ascensionsciences.com/newsroom/technical-articles/effects-of-storage-conditions-on-cannabinoid-conditions/>. Acesso em: 17 nov. 2024.

SCANFERLA, D. T. P.; LINI, R. S.; MARCHIONI, C.; MOSSINI, S. A. G. Drugs of abuse: A narrative review of recent trends in biological sample preparation and chromatographic techniques. **Forensic Chemistry**, v. 30, p. 100442, 2022.

SCHEP, L. J.; SLAUGHTER, R. J.; GLUE, P.; GEE, P. The clinical toxicology of cannabis. **The New Zealand Medical Journal (Online)**, v. 133, n. 1523, p. 96-103, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1101/nzmedj.2020.133.1523>.

SHOLLER, Dennis J. et al. Urinary excretion profile of cannabinoid analytes following acute administration of oral and vaporized cannabis in infrequent cannabis users. **Journal of analytical toxicology**, v. 46, n. 8, p. 882-890, 2022.

SIGMA-ALDRICH. Supelco SPE Cartridge, C18. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/supelco/52788u?srsltid=AfmBOorEhlEVKkQBHnUGpkBAr7ettwDHyd9ZN1bAvEEEx0fXxaUIyvvo4>. Acesso em: 10 nov. 2024.

SILVA, Amanda Meira da. **Caracterização química e mineralógica de zeólitas naturais com potencial para aplicação em tratamentos de efluentes**. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

SINGH, Ningthoujam Joseph et al. Zeolite incorporated iron oxide nanoparticle composites for enhanced congo red dye removal. **Journal of Materials Research**, v. 38, n. 4, p. 1149-1161, 2022.

SMITH, Brian C. **Infrared spectral interpretation: a systematic approach**. Boca Raton: CRC Press, 1999.

SWGTOX - SCIENTIFIC WORKING GROUP FOR FORENSIC TOXICOLOGY. **Standard practices for method validation in forensic toxicology**. 2013. Disponível em: <https://www.swgtox.org>. Acesso em: 17 de nov. 2024.

TESSAROLLI, Barbara Oliveira et al. Síntese e caracterização de nanopartículas de Fe₃O₄@ SiO₂. **Matéria (Rio de Janeiro)**, v. 24, n. 4, p. e12506, 2019.

TRAN, Ngoc Bich Thi; DUONG, Ngoc Bich; LE, Ngoc Long. Synthesis and characterization of magnetic Fe₃O₄/zeolite NaA nanocomposite for the adsorption removal of methylene blue potential in wastewater treatment. **Journal of Chemistry**, v. 2021, n. 1, p. 6678588, 2021.

UNODC, United Nations Office on Drugs and Crime. **Relatório Mundial sobre Drogas: 2024**. Contemporary issues on drugs. Vienna: UNODC, 2024. Disponível em: <https://www.unodc.org/documents/data-and-analysis/WDR_2024/WDR24_Contemporary_issues.pdf>. Acesso em: 12 nov. 2024.

UNODC - UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. **Guidance for the validation of analytical methodology and calibration of equipment used for testing of illicit drugs in seized materials and biological specimens. 2009**. Disponível em: <https://www.unodc.org>. Acesso em: 17 de nov. 2024.

WADSWORTH, E.; HAMMOND, D. International differences in patterns of cannabis use among youth: Prevalence, perceptions of harm, and driving under the influence in Canada, England & United States. **Addictive Behaviors**, v. 90, p. 171–175, mar. 2019.

WONG, K. U.; BAUM, C. R. Acute cannabis toxicity. **Pediatric Emergency Care**, v. 35, n. 11, p. 799-804, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Guidelines for establishing a poison centre**. Geneva, 2020.

YANG, Fan et al. Bamboo-based magnetic activated carbon for efficient removal of sulfadiazine: Application and adsorption mechanism. **Chemosphere**, v. 323, p. 138245, 2023.

ANEXO 1 - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos da UFSC/SC

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Desenvolvimento e validação de metodologia cromatográfica para quantificação de canabinoides em amostras biológicas de pacientes com intoxicação por Cannabis sativa

Pesquisador: LUISA RASPINI E SILVA

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 71904423.3.0000.0121

Instituição Proponente: Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 6.319,248

Apresentação do Projeto:

Segundo os pesquisadores:

Desenho:

Será, primeiramente, desenvolvido e validado métodos analíticos para identificação e quantificação de canabinoides em urina. Para essa etapa o pool de amostras branco (urina), de 30 diferentes fontes, será obtido junto ao Laboratório de Análises Clínicas do HU/UFSC. As amostras procedentes de pacientes com suspeita de intoxicação (maiores de 18 anos) serão utilizadas para confirmar a aplicabilidade do método. Ao todo, serão selecionadas 30 amostras de pacientes com suspeita de intoxicação por Cannabis sativa para o método.

Objetivo da Pesquisa:

Segundo os pesquisadores:

Objetivo Primário:

Desenvolver e validar um método analítico para identificação e quantificação de canabinoides em amostras de urina de pacientes com suspeita de intoxicação por Cannabis sativa provenientes CIATox/SC por meio de DMSPE e HPLC-DAD.

Objetivo Secundário:

Desenvolver um método cromatográfico por HPLC-DAD para análise de THC e CBD;

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 701

Bairro: Trindade

CEP: 88.040-400

UF: SC

Município: FLORIANOPOLIS

Telefone: (48)3721-6094

E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Parecer: 6.319.248

Avaliar as condições de preparo de amostras de urina através da DMSPE para extração de canabinoides;
Sintetizar fase sortiva DMSPE para sorção de canabinoides;
Validar o método desenvolvido para análise de canabinoides em amostras de urina com base nos guias da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e internacionais;
Aplicar a metodologia em casos de intoxicações atendidos pelo CIATox/SC, a fim de confirmar a aplicabilidade da técnica na análise de canabinoides em casos de suspeita de intoxicação por Cannabis sp.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os pesquisadores:

Riscos:

O estudo será realizado com o objetivo de desenvolver e validar um método cromatográfico para identificar e quantificar THC e CBD em amostras de urina. Para o desenvolvimento serão utilizadas amostras que seriam descartadas após a realização dos exames laboratoriais solicitados pela equipe médica responsável, não havendo nenhum contato ou coleta de informações do paciente, sendo essas amostras identificadas apenas com o código da amostra.

Benefícios:

Este estudo denota a importância do desenvolvimento de novos métodos para identificação de canabinoides em amostras biológicas de pacientes com intoxicação por Cannabis sativa, a fim de aplicá-los em casos de intoxicação atendidos pelo CIATox/SC para contribuir no diagnóstico e ampliar a lista de testes já realizados.

Portanto, pretende-se auxiliar a Análise Toxicológica de Urgência e o serviço de atendimento em saúde.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Vide campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Vide campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 701
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 6.319.248

Recomendações:

Vide campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A pendência apontada no parecer da versão anterior foi esclarecida adequadamente.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2144883.pdf	15/09/2023 17:22:54		Aceito
Outros	Carta_de_Resposta_as_pendenciasassinado.pdf	15/09/2023 17:21:36	LUISA RASPINI E SILVA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_assinado.pdf	15/09/2023 17:20:57	LUISA RASPINI E SILVA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Dissertacao.pdf	27/08/2023 15:22:53	LUISA RASPINI E SILVA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_Compromisso_assinado.pdf	27/07/2023 15:28:12	Camila Marchioni	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Anuencia_HU.pdf	27/07/2023 15:11:11	Camila Marchioni	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_CIATox_assinado.pdf	25/05/2023 11:34:40	LUISA RASPINI E SILVA	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_assinado_final.pdf	25/05/2023 10:34:40	LUISA RASPINI E SILVA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 701
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 6.319.248

FLORIANOPOLIS, 22 de Setembro de 2023

Assinado por:
Nelson Canzian da Silva
(Coordenador(a))

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 701
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br