



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS (UFG)
INSTITUTO DE QUÍMICA (IQ)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA (PPGQ)

ALESSANDRA TIMÓTEO CARDOSO

**Avaliação de sorvente MIP em sistema de microextração hifenado
ao HPLC-DAD, para determinação de taninos condensados em
amostras de casca de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*).**

GOIÂNIA
2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese

2. Nome completo do autor

Alessandra Timóteo Cardoso

3. Título do trabalho

Avaliação de sorvente MIP em sistema de microextração hifenado ao HPLC-DAD, para determinação de taninos condensados em amostras de casca de jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*)

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

- a) consulta ao(a) autor(a) e ao(a) orientador(a);
- b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Andrea Rodrigues Chaves, Professor do Magistério Superior**, em 04/03/2022, às 16:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **ALESSANDRA TIMÓTEO CARDOSO, Discente**, em 07/03/2022, às 13:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2717703** e o código CRC **56C1ACAE**.

ALESSANDRA TIMÓTEO CARDOSO

Avaliação de sorvente MIP em sistema de microextração hifenado ao HPLC-DAD, para determinação de taninos condensados em amostras de casca de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*).

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás (UFG), como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestra em Química.

Área de Concentração: Química.

Linha de Pesquisa: Instrumentação Analítica.

Orientador(a): Dra. Andrea Rodrigues Chaves.

GOIÂNIA
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Cardoso, Alessandra Timóteo

Avaliação de sorvente MIP em sistema de microextração hifenado ao HPLC-DAD, para determinação de taninos condensados em amostras de casca de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) [manuscrito] / Alessandra Timóteo Cardoso. - 2022.

LXXV, 75 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Andrea Rodrigues Chaves.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química (IQ), Programa de Pós-Graduação em Química, Goiânia, 2022.

Bibliografia.

Inclui siglas, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Jabuticaba. 2. Métodos de extração online. 3. Catequina. 4. MIP. 5. HPLC-DAD. I. Chaves, Andrea Rodrigues, orient. II. Título.

CDU 54



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE QUÍMICA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº **352** da sessão da Defesa de Mestrado de **Alessandra Timóteo Cardoso**, que confere o título de **Mestra em Química**, na área de concentração em **Química**.

Aos **21 (vinte e um) do mês de fevereiro de 2022 (dois mil e vinte e dois)**, a partir das **9h00m**, via **videoconferência**, realizou-se a sessão pública da Defesa de Mestrado da discente Alessandra Timóteo Cardoso intitulada "**Avaliação de sorvente MIP em sistema de microextração hifenado ao HPLC/DAD, para determinação de taninos condensados em amostras de frutos brasileiros**". Os trabalhos foram instalados pela Orientadora, **Prof^a. Dr^a. Andrea Rodrigues Chaves (IQ - UFG)**, com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Prof. Dr. Anizio Marcio de Faria (UFU) e Dr. Gabriel Rocha Martins (INT). Durante a arguição os membros da banca fizeram sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Defesa de Mestrado, tendo sido a candidata **aprovada** pelos seus membros. Proclamados os resultados pela Prof^a. Dr^a. Andrea Rodrigues Chaves, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos 21 (vinte e um) de fevereiro de 2022 (dois mil e vinte e dois).

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

Avaliação de sorvente MIP em sistema de microextração hifenado ao HPLC-DAD, para determinação de taninos condensados em amostras de casca de jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*)



Documento assinado eletronicamente por **Gabriel Rocha Martins, Usuário Externo**, em 23/02/2022, às 11:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **ANIZIO MARCIO DE FARIA, Usuário Externo**, em 23/02/2022, às 11:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Andrea Rodrigues Chaves, Professor do Magistério Superior**, em 23/02/2022, às 15:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2717422** e o código CRC **A52F9B6E**.

Referência: Processo nº 23070.006484/2022-96

SEI nº 2717422

Dedico este trabalho a minha mãe, Luzia Timóteo da Silva. Uma mulher forte que criou outra mulher forte!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me carregar no colo em todos os momentos dessa trajetória, que esteve me sustentando para que eu nunca desistisse. Toda a honra e glória seja dada a Ele, para sempre!

Agradeço a minha mãe Luzia Timóteo, por sempre me dar força, apoiar os meus sonhos e me incentivar a estudar, desde o ensino básico até aqui, e por ser a maior inspiração de como ser uma mulher forte! Agradeço ao meu pai Cláudio Alves, pelo suporte, e por todo orgulho que sente de mim independente dos laços de sangue.

Agradeço aos meus irmãos Júlio César Timóteo e Ana Julia Timóteo pela segurança, e por me escutar em todos momentos em que eu chorava, e pensava que não ia conseguir. Grata por poder abrir o caminho, para que eles acreditassem que só a educação transforma vidas.

A minha orientadora, Profa. Dra. Andrea Rodrigues Chaves por tanta compreensão, e disposição para ensinar, e escutar as minhas lamúrias nesses dois anos, principalmente por confiar a mim esse projeto e acreditar na minha capacidade quanto pesquisadora. Uma das minhas inspirações, como ser humano e profissional. Que Deus a abençoe grandemente!

Agradeço aos meus amigos Rafael, Matheus, Talita e Rodrigo pelo apoio, e força! Com vocês essa caminhada ficou mais leve, amo vocês!

Agradeço ao Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas – LaCEM, e ao Prof. Dr. Boniek Gontijo Vaz por fornecer toda estrutura necessária para que esse projeto fosse realizado. A Central de Análises Multiusuários (CAM-IQ-UFG), ao Laboratório Multiusuário de Microscopia de alta resolução (LabMic), e ao Laboratório de Pesquisas em Materiais de Separação e Cromatografia na Universidade Federal de Uberlândia *campus* Pontal, pelo suporte nas análises de caracterização desse projeto.

Ao meu amigo e quase “co-orientador” Me. Lucas Santos Machado, por toda ajuda, contribuição, e puxões de orelha ao longo desse projeto, e da minha vida nesses dois anos. Toda a minha gratidão! Agradeço a todos os demais membros do Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas – LaCEM que me auxiliaram de alguma forma nessa caminhada.

Agradeço também a minha primeira orientadora Profa. Dra. Simone Machado Goulart, por apresentar-me o caminho científico e ser uma inspiração para que eu chegasse até aqui, além do apoio que me deu nessa trajetória.

Agradeço ao CNPq pelo apoio financeiro, ao Programa de Pós Graduação em Química (PPGQ-IQ) da UFG pela oportunidade.

“Eu poderia ter todo o conhecimento, entender todos os segredos e ter tanta fé, que até poderia tirar as montanhas do lugar, mas, sem amor eu nada seria” (I Coríntios 13:2).

RESUMO

A jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) é uma fruta de grande consumo e importância nutricional no Brasil. Dentre os compostos presentes neste fruto podemos destacar os taninos condensados, classe amplamente investigada acerca de suas propriedades químicas, biológicas e farmacológicas, o que torna a extração e isolamento desses compostos de grande importância econômica e ambiental. De acordo com a literatura, a extração de taninos da jabuticaba para isolamento em técnicas de separação vem sendo realizada por métodos convencionais como a *solid phase extraction* (SPE). Contudo, estas técnicas apresentam grau de seletividade limitada, além disso, necessitam de utilizar um elevado volume de solventes, o que conseqüentemente gera grande quantidade de resíduos. Nesse sentido, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos mais seletivos e ecologicamente amigáveis. Dessa forma, o presente trabalho propôs o desenvolvimento e a otimização de um método de extração online baseado em polímeros de impressão molecular (MIP) empregados em coluna capilar para o isolamento e identificação sequencial de taninos condensados na casca da jabuticaba. Para tanto, a molécula da catequina foi utilizada como *template* para síntese do MIP, sendo também sintetizado para fins de comparação, um polímero não impresso (NIP). A caracterização dos sorventes foi realizada por meio de análises de microscopia eletrônica de varredura, análises de dessorção e adsorção de nitrogênio, microscopia eletrônica de transmissão, espectroscopia na região do infravermelho, termogravimetria e difração de raios-x. Os dados obtidos com a caracterização da fase mostraram coerência com a literatura, no que se refere a possibilidade de aplicação desses materiais como fase extratora em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (*high performance liquid chromatography* – HPLC) com detector de arranjo de diodos. Os sorventes MIP e NIP foram empregados como fases estacionárias em colunas capilares. Quando avaliada a aplicabilidade da coluna preenchida com o polímero molecularmente impresso em HPLC-DAD nota-se que esta apresentou eficiência para a extração da catequina, principalmente quando comparada ao polímero não impresso. Os resultados da otimização da técnica indicaram que o fluxo de fase móvel de 20 $\mu\text{L min}^{-1}$ e volume de injeção de 40 μL foram responsáveis pela obtenção de picos cromatográficos com os melhores parâmetros em termo de simetria e resolução de pico, além de manter a eficiência de extração, diminuindo a geração de resíduos orgânicos. Já as figuras de mérito avaliadas, indicaram maior seletividade no MIP em relação ao NIP para a catequina, coeficientes de variação de 2,6 a 7,3% entre as extrações indicando adequada Repetibilidade das colunas e fator de pré-concentração da fase MIP de 151,14%. Em relação a capacidade de reuso das colunas, um valor de desvio padrão relativo de 3,83% foi encontrado, indicando que as colunas podem ser utilizadas mais de 40 vezes sem perder a eficiência de extração, o que é coerente com o resultado obtido para o efeito de memória, em que o cromatograma do solvente não apresentou picos no mesmo tempo de retenção para a catequina. A quantificação de taninos condensados na matriz utilizando método da vanilina pelo espectro UV-vis à 500 nm, indicou um teor de 59,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dos compostos presentes nos extratos aquosos da jabuticaba com base na curva padrão de catequina construídas nas concentrações de 0,01 a 1 mg mL^{-1} , o que mostrou relevância, quanto a escolha dessa matriz. Além disso, as análises feitas por HPLC-DAD para as amostras reais mostraram eficiência da coluna MIP para extração da catequina, eliminando os interferentes e concentrando o analito, possibilitando o acoplamento entre a fase extratora e o sistema analítico (HPLC-DAD).

Palavras-chave: Jabuticaba. Métodos de extração *online*. Catequina. MIP. HPLC-DAD.

ABSTRACT

Jaboticaba (Myrciaria cauliflora) is a fruit widely consumed in Brazil and of great nutritional importance. Among the compounds of this fruit are the condensed tannins, which have already been widely investigated regarding their chemical, biological and pharmaceutical properties, which makes the extraction and isolation of these compounds of great economic and environmental importance. According to the literature, the extraction of tannins from jaboticaba for isolation in separation techniques has been carried out by conventional methods such as solid phase extraction (SPE). However, these techniques have a limited selectivity, in addition, a high volume of solvents is necessary, which consequently generates a large amount of waste. Thus, it is necessary to research more selective and ecologically correct methods. Thus, the present work proposed the development and optimization of an online extraction method based on molecularly imprinted polymers (MIP) used in a capillary column for the isolation and identification of condensed tannins in jaboticaba peel. Therefore, catechin was used as a template molecule for MIP and non-imprinted polymer (NIP) was synthesized for comparison studies. The sorbent characterization was performed using scanning electron microscopy (SEM), nitrogen desorption and adsorption analysis, transmission electron microscopy (TEM), infrared spectroscopy (FTIR), thermogravimetry (TG) and diffraction X-ray (XRD). The data obtained with the characterization of the phase showed similarity with the literature, regarding to the possibility of applying these materials as an extractor phase in liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD). When evaluating the applicability of the column filled with the molecularly printed polymer in HPLC-DAD, it was noted that it presented good results for the extraction of catechin, especially when compared to the non-imprinted polymer. The results of the method optimization indicated that the mobile phase flow of $20 \mu\text{L min}^{-1}$ and injection volume of $40 \mu\text{L}$ were the best in terms of asymmetry and peak resolution, in addition to maintaining the extraction efficiency, decreasing the generation of organic residues. On the other hand, the figures of merit evaluated showed greater selectivity in the MIP in relation to the NIP for catechin, coefficients of variation from 2.6 to 7.3% between extractions, indicating excellent reproducibility of the columns and pre-concentration factor of the MIP phase of 5.14%. Regarding the reuse capacity of the columns, a value of relative standard deviation of 3.83% was found, indicating that the columns can be used more than 40 times without losing the extraction efficiency, which is consistent with the result obtained for the memory effect, in which the solvent chromatogram showed no peaks at the same retention time for catechin. The quantification of tannins condensed in the matrix using the vanillin method by the UV-vis spectrum at 500 nm, indicated a content of $59.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ of the compounds present in jaboticaba's aqueous extracts based on the standard curve of catechin constructed in the concentrations of 0.01 to 1 mg mL^{-1} , which showed relevance in terms of the choice of this matrix. Furthermore, the analyzes performed by HPLC-DAD for the real samples showed efficiency of the MIP column for catechin extraction, eliminating the interferences and concentrating the analyte.

Keywords: *Jaboticaba. Online extraction methods. Catechin. MIP. HPLC-DAD*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Jaboticabeira carregada.....	19
Figura 2 -	a) Estrutura química de flavan-3-ol. b) monômeros (+)-catequina e (-)-epicatequina.....	21
Figura 3 -	Resultados obtidos a partir da busca feita na base <i>Web of Science</i> mostrando a relação da quantidade de trabalhos desenvolvidos entre os anos de 2012-2021 acerca do tema “taninos condensados” e “atividades biológicas”	22
Figura 4 -	Esquema de uma técnica automatizada de extração e separação em LC.....	25
Figura 5 -	Ilustração esquemática de preparo do MIP.....	28
Figura 6 -	Esquema do enchimento das colunas cromatográficas.....	31
Figura 7 -	Colunas extratoras MIP e NIP de 0,13 mm (esquerda) e 0,25 mm (direita).....	37
Figura 8 -	Curva analítica para o método vanilina/HCL, em concentrações equivalentes de catequina (n=3).....	42
Figura 9 -	Micrografia obtida para o NIP nas magnitudes de 15.000× (a) e 10.000× (b).	43
Figura 10 -	Micrografia obtida para o MIP anterior à lavagem nas magnitudes de 15.000× (a) e 10.000× (b).	43
Figura 11 -	Micrografia obtida para o MIP posterior à lavagem nas magnitudes de 15.000× (a) e 10.000× (b).	44
Figura 12 -	Micrografia obtida para a sílica “pura” nas magnitudes de 10.000× (a) e 200× (b).....	44
Figura 13 -	Micrografia de transmissão do NIP obtida à 1µm (a) 200 nm (b).....	46
Figura 14 -	Micrografia de transmissão do MIP anterior à lavagem obtida à 1µm (a) 200nm (b).....	47
Figura 15 -	Micrografia de transmissão do MIP posterior à lavagem obtida à 1µm (a) 200 nm (b).....	47
Figura 16 -	Difratogramas obtidos para o MIP e o NIP.....	48
Figura 17 -	Espectro de IV de comparação entre o MIP lavado com o NIP na faixa de 450 a 4500 cm ⁻¹	49
Figura 18 -	Termogramas das amostras de MIP antes da lavagem em comparação com o MIP após a lavagem e o NIP.....	50
Figura 19 -	Cromatogramas obtidos para a solução padrão de catequina a 1µg mL ⁻¹ nos comprimentos de onda de 200, 280, e 320 nm.....	52
Figura 20 -	Cromatograma obtido em 280 nm para a solução padrão de catequina à 1 µg mL ⁻¹	53
Figura 21 -	Cromatograma obtido a partir da coluna NIP, para a solução padrão de catequina à 1 µg mL ⁻¹	54
Figura 22 -	Relação entre volume de injeção avaliado (µL) e área normalizada do pico (n=3).....	55
Figura 23 -	Cromatogramas obtidos para a solução padrão de catequina a 50 µg mL ⁻¹ nos fluxos de fase móvel de 15, 20, 25, 50 e 75 µL min ⁻¹	56

Figura 24 -	Relação entre fluxo de fase móvel ($\mu\text{L min}^{-1}$), e pressão MIP e NIP nas colunas extratoras de 0,25 mm.....	57
Figura 25 -	Seletividade do MIP em comparação com o NIP para a solução padrão de catequina $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($n=3$).....	58
Figura 26 -	Cromatogramas obtidos para a solução padrão de catequina a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ em comparação com o branco de metanol pós corrida.....	61
Figura 27 -	Cromatogramas obtidos para a solução padrão de catequina a $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ em comparação com os extratos de jabuticaba submetidos a extração pela coluna MIP e pela coluna NIP.	62
Figura 28 -	Espectro de massas ESI (-) Orbitrap-MS do padrão de catequina ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) de m/z 289,07181.....	63
Figura 29 -	Espectro de massas ESI (-) Orbitrap-MS da matriz de jabuticaba extraída com a coluna MIP para a catequina de m/z 289,07181.....	63
Figura 30 -	Espectro de massas ESI (-) Orbitrap-MS/MS da matriz de jabuticaba extraída com a coluna MIP para a catequina de m/z 289,07181. Os íons assinalados correspondem a m/z 205,05052(perda do $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_2$) e m/z 245,08191 (perda do CO_2).	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Aplicações dos MIPs em sistemas de extração e separação automatizados em LC.....	28
Tabela 2 -	Resultados obtidos das análises de dessorção e adsorção de nitrogênio para as esferas de MIP e NIP.....	45
Tabela 3 -	Fatores de assimetria para cada volume de injeção avaliado (n=3).....	55
Tabela 4 -	Fatores de assimetria para cada fluxo de fase móvel (n=3).....	57
Tabela 5 -	Repetibilidade para as colunas MIP nas concentrações baixa, média e alta expressas em % CV, e fator de pré-concentração para a solução de catequina na solução de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
C18 –	<i>Octadecyl silane stationary phase</i>
CDs-DMIPS –	<i>Carbon Quantum Dots - Molecularly Imprinted Polymers</i>
CV –	Coefficiente de variação
DAD –	Detector de Arranjo de Diodos
DM2 –	Diabetes Tipo 2
DP –	<i>Degree of Polymerization</i>
DPR –	Desvio Padrão Relativo
DPX –	<i>Disposable Pipette Extraction</i>
DRX –	Difratometria de Raios-X
FTIR –	Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier
H –	Horas
HPLC –	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HPLC – UV –	<i>High Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detector</i>
HPLC-FLD –	<i>High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detector</i>
HPLC-MS/MS –	<i>High Performance Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry</i>
IT-SPME –	<i>In-Tube solid phase microextraction</i>
LC –	<i>Liquid Chromatography</i>
MEPS –	<i>Microextraction by Packed Sorbent</i>
MET –	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV –	Microscopia Eletrônica de Varredura
Min –	Minutos
MIP –	<i>Molecularly Imprinted Polymer</i>
MIP-IL –	<i>Molecularly Imprinted Ionic Liquids Polymer</i>
MS –	<i>Mass Spectrometry</i>
NIP –	<i>Non-Imprinted Polymer</i>
Peek –	Polyether-ether-ketone
RAM –	<i>Restrict Access Media</i>

SBSE – *Stir bar Sorptive Extraction*
SPE – *Solid Phase Extraction*
SPME – *Solid Phase Microextraction*
TGA – Termogravimetria
UPLC-MS/MS – *Ultra Performance liquid chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry*
SPME – *Solid Phase Microextraction*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Taninos condensados.....	20
1.2 <i>High Performance Liquid Chromatography</i> (HPLC) para separação e identificação de taninos condensados.....	23
1.3 Técnicas de extração e separação automatizadas em HPLC.....	24
1.4 Polímeros Molecularmente Impressos (MIP).....	26
2 OBJETIVO GERAL.....	31
2.1 Objetivos específicos.....	31
3 METODOLOGIA.....	33
3.1 Solventes e Instrumentação.....	33
3.2 Obtenção de extrato aquoso das amostras de jabuticaba.....	33
3.3 Determinação do teor de taninos condensados.....	34
3.4 Síntese do MIP à base de sílica.....	34
3.5 Caracterização do MIP e do NIP.....	35
3.6 Enchimento das colunas analíticas.....	36
3.7 Avaliação da aplicabilidade da coluna cromatográfica.....	38
3.8 Otimização das condições analíticas.....	38
3.9 Avaliação de Figuras de Mérito.....	39
3.10 Extração das amostras reais em extrato de casca de jabuticaba.....	39
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.1 Determinação do teor de taninos condensados.....	42
4.2 Caracterização dos polímeros.....	43
4.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV.....	43
4.2.2 Dessorção e Adsorção de Nitrogênio.....	45
4.2.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	46
4.2.4 Difração de Raios – X.....	48
4.2.5 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR).....	49
4.2.6 TG/DTA.....	50
4.3 Avaliação da aplicabilidade da coluna cromatográfica.....	51
4.4 Otimização das condições analíticas.....	54
4.5 Avaliação das Figuras de Mérito.....	58

4.5.1 Seletividade.....	58
4.5.2 Repetibilidade das colunas e fator de pré-concentração.....	59
4.5.3 Capacidade de reuso das colunas.....	60
4.5.4 Efeito de memória (<i>carryover</i>).....	60
4.6 Análise em amostras reais de extrato de jabuticaba.....	61
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	61
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um país que apresenta ao longo de seu território, fauna e flora extremamente ricas, ressaltando a diversidade de frutos presentes, os quais possuem compostos bioativos com propriedades antioxidantes, tornando-os atraentes para serem pesquisados e comercializados (REIS; SCHMIELE, 2019). Dentre os frutos nativos do Brasil, encontra-se a jaboticaba (Figura 1), a qual pertencente à família Myrtaceae e ao gênero *Myrciaria*, sinônimo de *Plinia*, originalmente encontrada na Mata Atlântica, sendo seu fruto conhecido como uma das mais ricas fontes brasileiras de compostos fenólicos.



Figura 1 – Jaboticabeira carregada.

Fonte: Autoria Própria (2022).

As espécies predominantes no Brasil são a jaboticaba Sabará (*Myrciaria jaboticaba*) e a jaboticaba Paulista (*Myrciaria cauliflora*), as quais são bastante investigadas acerca da presença de compostos fenólicos no fruto responsáveis por inúmeras propriedades biológicas, como capacidade antioxidante (WANG et al., 2014), antidiabética (MOURA et al., 2018), prevenção de enfermidades cardiovasculares, circulatórias, cancerígenas, (SÁ et al., 2014; LEITTE -LEGATTI et al., 2012), prevenção do mal de Alzheimer (TOMÁS-BARBERÁN et al., 2017), além de auxiliar no aprimoramento da memória (BATISTA et al., 2017).

Entretanto embora a maior parte dos fenólicos esteja presente na casca da jaboticaba, esta

parte não é usualmente consumida com a polpa sendo na maioria das vezes descartadas, ou quando há reaproveitamento, enviadas para para a fabricação de geleias, extratos, e até a fermentação para produção de vinhos (FARIA et al., 2016; RODRIGUES et al., 2015; FERNANDES; SILVA, 2018; QUATRIN et al., 2019; INADA et al., 2021).

Dentre as classes desses compostos fenólicos recorrentes na jabuticaba, destacam-se os taninos condensados. Esses compostos podem ser naturalmente encontrados em folhas, frutos, sementes, castanhas e cascas de uma grande variedade de plantas, e em frutos são característicos pela cor escura, adstringência, aroma e estabilidade oxidativa (TORRES-NARANJO et al., 2016; FERNANDES; SILVA 2018). Estudos apontam que o consumo de alimentos que apresentam teores de taninos condensados em sua composição aliados a uma dieta, têm um importante papel no tratamento e prevenção de doenças imunológicas, circulatórias, obesidade, diabetes, e também em doenças cardiovasculares (LOBO; VELASQUE 2016; ROWLEY, et al.; 2017; XING et al., 2019). Pesquisas anteriores mostraram que taninos condensados isolados da jabuticaba como galato de catequina e epicatequina exibiram excelente atividade antimicrobiana (MACHADO et al., 2018) e outros tipos foram capazes de apresentar efeitos antidiabéticos inibindo enzimas como α -glucosidase (MOURA, et al., 2018) e α -amylase (FIDELIS et al., 2020).

1.1. Taninos condensados

Os taninos condensados correspondem a um grupo de polifenóis. A estrutura básica de uma unidade de tanino condensado é o flavan-3-ol (Figura 2a), que apresenta dois tipos de configuração espacial do grupo de hidroxila substituinte (2,3-trans e 2,3-cis), resultando em dois monômeros principais, a (+)-catequina e a (-)-epicatequina (Figura 2b e 2c), que se polimerizam formando misturas de oligômeros com polímeros (YANG et al., 2021; FRAGA-CORRAL et al., 2020).

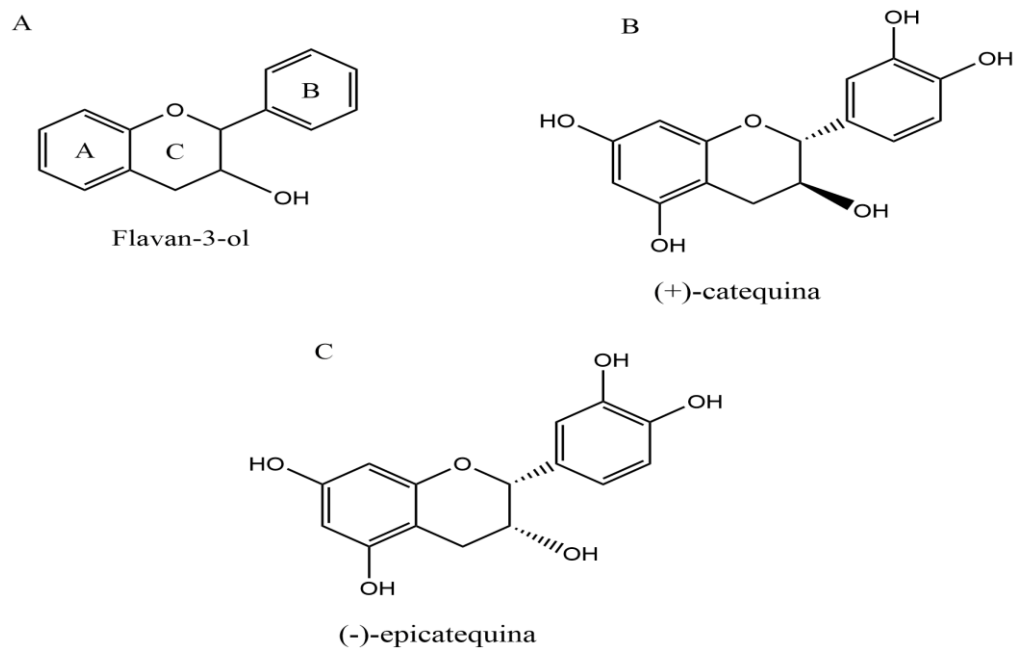


Figura 2 – a) Estrutura química de flavan-3-ol. b) monômeros (+)-catequina e (-)-epicatequina.
Fonte: Autoria Própria (2022).

De acordo com Yang e colaboradores (2021), o teor de taninos condensados em uma matriz e o grau de polimerização – do inglês *degree of polymerization* (DP) – que está relacionado com o número de unidades estruturais flavânicas constituindo uma molécula de tanino condensado (monômeros), varia significativamente em diferentes tecidos de uma mesma planta. Assim, estudos apontam que terores significativos de taninos condensados com alto DP são encontrados com maior frequência na casca dos frutos. Além disso, na maioria dos casos, um alto DP pode configurar maior sucesso na bioatividade desses compostos, tais como benefícios antioxidantes e anti-inflamatórios (BITZER et al., 2015).

Na literatura, diversos trabalhos que vêm sendo desenvolvidos mostram as aplicações biológicas dos taninos condensados, como mostra a Figura 3.

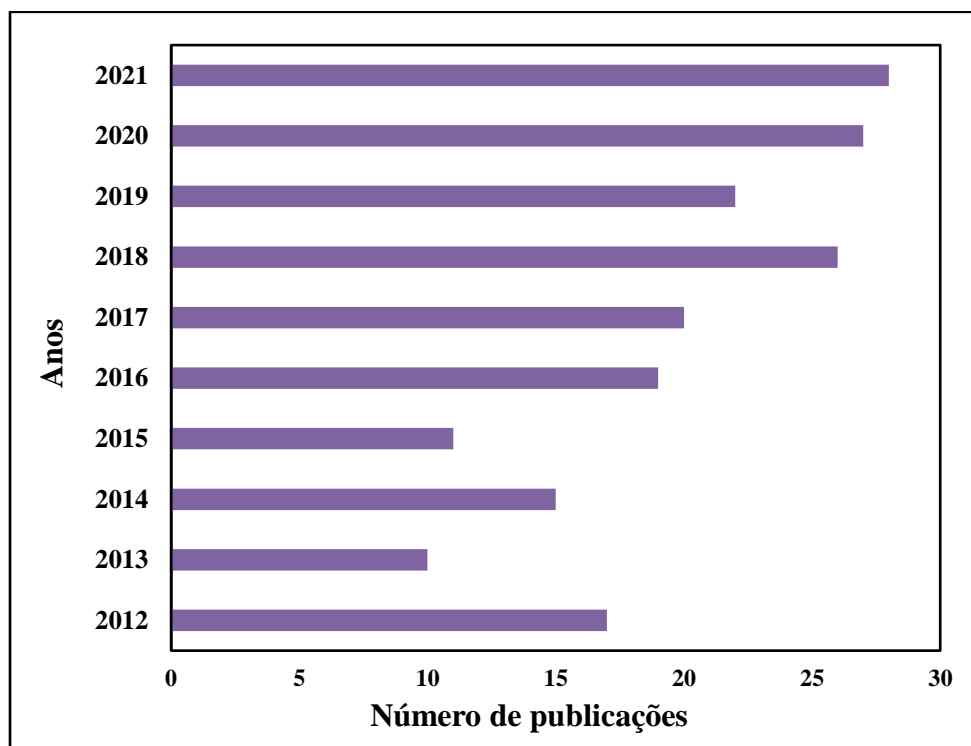


Figura 3 – Resultados obtidos a partir da busca feita na base *Web of Science* mostrando a relação da quantidade de trabalhos desenvolvidos entre os anos de 2012-2021 acerca do tema “taninos condensados” e “atividades biológicas”. Data da consulta: 28/01/2022.

Como é possível ver no gráfico de barras da Figura 3, para a última década (2012-2021) a quantidade de trabalhos envolvendo a investigação das propriedades biológicas dos taninos condensados em diversas matrizes cresceu significativamente. Em consonância a esses dados, estudos mostram que taninos condensados obtidos de espécies da família *Myrtaceae* (mesma família da jabuticaba), são capazes de inibir a ação de enzimas, que hidrolisam os polissacarídeos e os converte em açúcares simples, sendo prejudiciais para pessoas que têm Diabetes Tipo 2 (DM2), e resistência à insulina (OLIVEIRA; PEREIRA, 2015; TORRES-NARANJO et al., 2016).

Lima e colaboradores (2018), analisaram extratos de espécies da planta *Myrcia rubella* Cambess, para avaliar o perfil duplo de inibição de α -glucosidase / PTP1B, que são capazes de metabolizar carboidratos. Como resultado, os autores obtiveram que sete compostos da planta apresentaram efeito inibitório positivo e puderam ser identificados após separação em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ressonância magnética nuclear.

Oliveira e Pereira (2015), avaliaram a atividade inibitória da α -amilase por extratos aquosos de cinco amostras de *Myrcia sphaerocarpa*, por diferentes métodos de extração (decoção, infusão

e maceração). Os resultados demonstraram que antes da exposição ao líquido gástrico, duas amostras extraídas por decocção demonstraram uma inibição superior a 50% da atividade enzimática, e uma amostra apresentou o mesmo resultado em todos os métodos de extração. Torres-Naranjo e colaboradores (2016) investigaram nove compostos isolados da planta *Muehlenbeckia tamnifolia*, que é comumente usada por povos indígenas do Equador para o tratamento de doenças renais. Entre os compostos isolados estava a catequina, que demonstrou ser o terceiro composto que mais inibiu a ação de α -glucosidase.

Tendo em vista a diversidade de estruturas que podem ser encontradas ao longo deste grupo, junto com suas propriedades químicas, é de suma importância o desenvolvimento de metodologias analíticas eficientes para a extração desses compostos. No entanto, a obtenção destes é sempre um desafio, pois o extrato de uma matriz vegetal é uma amostra complexa e apresenta vários outros compostos além dos taninos condensados, que podem atuar como interferentes e diminuir a performance analítica do método de quantificação. Esse fator pode ser superado por meio de metodologias de separação adequadas, para o isolamento e uma análise real do teor de taninos condensados em matrizes complexas, tais como um extrato vegetal.

1.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (High Performance Liquid Chromatography – HPLC) para separação e identificação de taninos condensados.

Os métodos de separação têm sido empregados em larga escala para separar e isolar produtos naturais em diferentes matrizes. O uso da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês – *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) se destaca no que tange a separação e quantificação de compostos bioativos, ainda mais no campo dos compostos fenólicos como os taninos condensados. Nas últimas décadas, os avanços caminharam para o desenvolvimento de novos e mais robustos sistemas de instrumentação em HPLC o que propicia melhora na sensibilidade e detectabilidade do método (MARTINS et al.; 2020; MACIEL et al., 2019).

Nessa vertente, alguns autores já relataram o uso de sistemas de HPLC para o estudo das propriedades de matrizes de frutos brasileiros, como, Quatrin e colaboradores (2019) que forneceram em seu estudo um perfil polifenólico dos compostos fenólicos livres presentes na casca de duas espécies de jaboticaba por HPLC com detecção por Espectrometria de Massas – *Mass Spectrometry* (MS). Os autores relataram que a partir dessa técnica foi possível separar, quantificar e identificar uma grande variedade de compostos fenólicos, que podem ser utilizados inclusive para fins medicinais.

Um estudo mais recente feito por Martins e colaboradores (2021) propôs a quantificação e determinação de compostos fenólicos nas sementes de três variedades de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.), utilizando HPLC com detector de arranjo de diodos (DAD) para separação e quantificação das espécies. Já a identificação e confirmação da identidade dos compostos foram feitas por espectrometria de massas. Como resultado, os autores confirmaram um alto teor de taninos condensados nas matrizes avaliadas.

Entretanto, a maioria dos trabalhos envolvendo a utilização de métodos cromatográficos para separação de amostras complexas como os produtos naturais, aponta para a utilização de mais de uma etapa de preparo de amostras anterior às análises cromatográficas, com vista a reduzir o número de interferentes que podem co-eluir com os analitos alvo e, assim, prejudicar a performance do método analítico (MACIEL, TOFFOLI e LANÇAS, 2019). Algumas das técnicas de preparo de amostra muito utilizadas podem ser aqui citadas, como MEPS - *Microextraction by Packed Sorbent* (JORDAN-SINISTERRA, LANÇAS 2021), SBSE - *Stir bar Sorptive Extraction* (BENI et al., 2017), SPME - *Solid Phase Microextraction* (WU ET AL., 2020), ou DPX - *Disposable Pipette Extraction* (PINTO et al., 2017).

No entanto, apesar das técnicas miniaturizadas *offline* apresentarem ótimas características como redução da quantidade de amostra, do uso de solventes orgânicos necessários, essas técnicas ainda contam com impasses como alto manuseamento da amostra e longo tempo de preparo, o que pode ser susceptível a erros analíticos devido a quantidade de etapas em que estas são submetidas antes das análises cromatográficas. Assim, nos últimos anos a abordagem das técnicas de extração acopladas diretamente ao sistema de cromatografia líquida vem ganhando espaço na literatura, e são conhecidas como técnicas de extração automatizadas (MACIEL, et al., 2021).

1.3. Técnicas de extração e separação automatizadas em HPLC

O princípio dos métodos de extração automatizados é o mesmo do método *offline*, no entanto, o processo é realizado em duas dimensões (Figura 4): a primeira constituída da coluna extratora, na qual são empregados sorventes que tenham afinidade pelo analito, com a função de extrair e concentrar o analito e fazer o *clean-up* da matriz antes da análise, encaminhando a matriz da amostra para o descarte. Posteriormente, o analito é então eluído pela fase móvel para segunda dimensão por meio de uma válvula, que consiste da coluna analítica que separa os componentes de

interesse para posterior detecção (QUEIROZ, ACQUARO JÚNIOR 2017; CRUZ, ET AL., 2021; MACIEL et al., 2019).

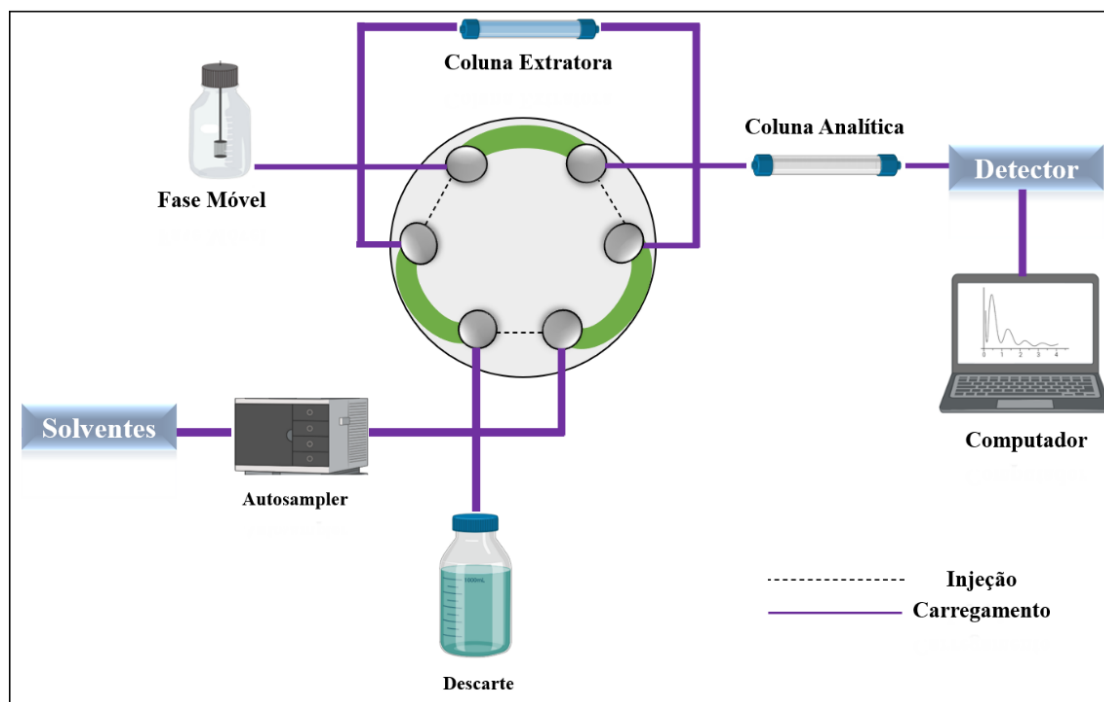


Figura 4 - Esquema de uma técnica automatizada de extração e separação em LC.
Fonte: Adaptado (ANDRADE; LANÇAS, 2017).

A escolha da melhor técnica depende exclusivamente do objetivo que se deseja alcançar, na separação dos analitos. Algumas técnicas podem aqui ser citadas como SPE-*online* (LHOTSKÁ et al., 2018), in-tube SPME (ANDRADE; LANÇAS, 2017), *column switching liquid chromatography* (CRUZ et al., 2021), e *heart-cut 2D-LC* (MACIEL et al., 2019). No entanto, o principal aspecto que define o sucesso de qualquer um desses métodos é a interação que o empregado na coluna extratora (primeira dimensão) terá com os analitos. Ou seja, quanto mais seletiva for a fase estacionária da primeira dimensão para o analito, maior será a eficiência analítica do método. Dentre os sorventes empregados nas técnicas extratoras, pode-se aqui destacar alguns como, C18 - *Octadecyl silane stationary phase* (KHESINA et al., 2021), RAM (*Restrict Access Media*) (TAVARES, et al., 2021) e Polímeros Monolíticos (MACHADO et al., 2021).

Além desses, um material que vem sendo empregado com sucesso em várias técnicas de extração são os Polímeros Molecularmente Impressos - MIPs. Esses materiais, como o próprio nome já diz, são uma classe de polímeros que recriam sítios específicos capazes de reconhecer um ou mais compostos de uma mesma classe, a partir de sínteses, nas quais são empregadas uma

molécula alvo denominada de *template*, que tem uma estrutura química igual ou semelhante à do analito (BOUVAREL et al., 2021; ARABI et al., 2016; BELBRUNO, 2019).

1.4. Polímeros Molecularmente Impressos (MIP)

A rota de síntese dos MIPs, em geral, ocorre em duas etapas: na primeira, a interação das moléculas precursoras do polímero (monômeros) com um *template* formando um complexo monômero-*template*. Essa interação leva a posições específicas das extremidades dos monômeros ao redor da molécula alvo e é chamada de complexação (Figura 5). A segunda etapa consiste da reação de polimerização, na qual ocorre fixação dos grupamentos dos monômeros no material polimérico, por meio de um *cross-linker* (reagente de entrecruzamento) e, em alguns casos, um iniciador radicalar. Por fim, após a remoção do *template*, por um processo de lavagem com reagente específico que tenha afinidade com ele, o polímero passa a ter cavidades e sítios seletivos para a interação de moléculas de estruturas iguais ou semelhantes a da molécula alvo (*template*) usada na síntese (ARABI et al., 2016; BERNARDO et al., 2019; SANTOS et al., 2020).

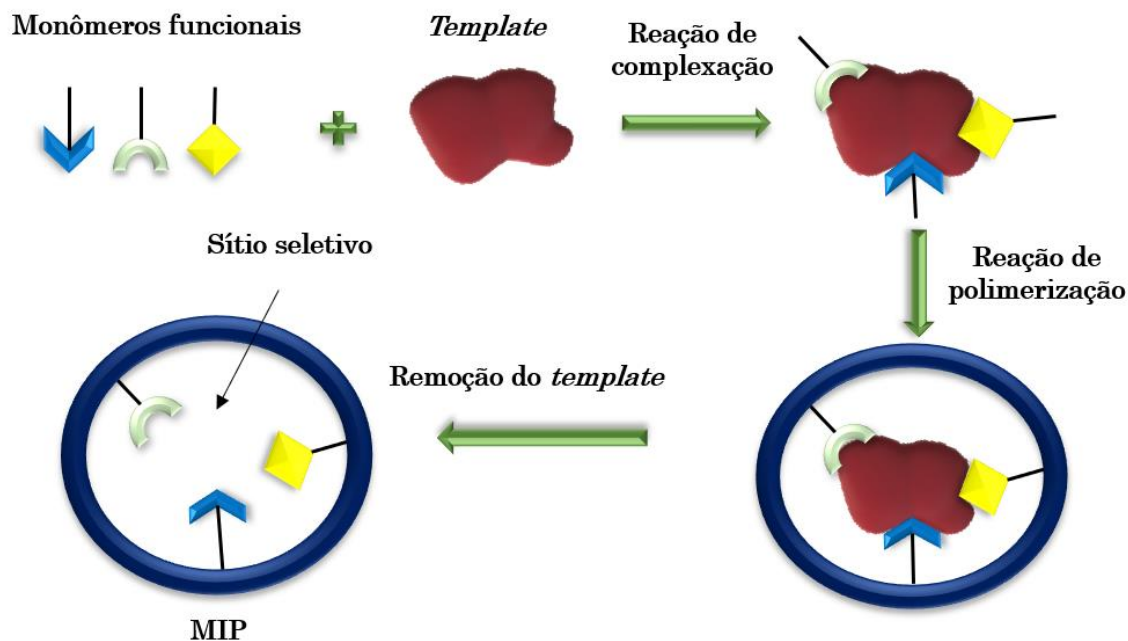


Figura 5 - Ilustração esquemática de preparo do MIP.
Fonte: Adaptado (Nazário e Lanças, 2013).

Os MIPs são conhecidos por serem empregados tanto em técnicas convencionais como a SPE sendo a técnica denominada MISPE (MARTINS et al., 2020; SAAD et al., 2021) quanto em técnicas miniaturizadas de preparo de amostra *offline* (DINALI et al., 2021; WANG et al., 2019; SANTOS et al., 2020). No entanto, com o desenvolvimento das técnicas de extração e separação automatizadas, alguns estudos já realizados mostram que os MIPs utilizados como fase extratora online, apresentam boa estabilidade química, e alto reconhecimento para a extração e pré-concentração de analitos em matrizes complexas, além da vantagem da sua reutilização, características essas que tornam os MIPs ótimos sorventes para serem utilizados em técnicas *online* de extração (LHOTSKÁ et al., 2018; ZHEN et al., 2013; KHOLOVA, 2021). A Tabela 1 apresenta alguns estudos realizados com a utilização dos MIPs como sorventes para primeira dimensão em técnicas de extração e separação automatizadas em LC para diversos analitos.

Tabela 1 – Aplicações dos MIPs em sistemas de extração e separação automatizados em LC.

Amostra	Analito	Técnica	Sorvente extrator	Sistema cromatográfico	Referência
Cerveja	Micotoxina	SPE online	MIP	HPLC-FLD	(LHOTSKÁ et al., 2018)
Água	Herbicida	SPE online	MIP-IL	HPLC – UV	(GUO et al., 2011)
Plasma	Canabinoides	IT-SPME	MIP monolítico	HPLC-MSMS	(MARCHIONI et al., 2020)
Amendoim	Alfatoxinas	SPE online	CDs-DMIP	HPLC-FLD	(LIANG et al., 2018)
Leite Materno	Parabenos	IT-SPME	RAMIP	UHPLC-MS/MS	(SOUZA et al., 2016)
Plasma	Clorpromazina	SPE online	RAMIP	HPLC – UV	(MORAES et al., 2013)
Sérum	Peptídeos	SPE online	MIP	HPLC - UV	(MCKITTERICK et al., 2021)
Plasma	Inibidores de Serotonina	SPE online	RAMIP	HPLC – UV	(SILVA et al., 2015)

MIP: *molecularly imprinted polymers*; **MIP-IL:** *molecularly imprinted ionic liquids polymer*; **CDs-DMIPS:** *Carbon quantum dots - molecularly imprinted polymers*; **RAMIP:** *Restricted access molecularly imprinted polymers*; **IT-SPME:** *in-tube solid phase microextraction*; **SPE:** *solid phase extraction*; **HPLC-UV:** *high performance liquid chromatography with ultraviolet detector*; **HPLC-FLD:** *high performance liquid chromatography with fluorescence detector*; **UPLC-MS/MS:** *Ultra Performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*; **HPLC-MS/MS:** *High Performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*;

Para taninos condensados, um estudo desenvolvido por Martins e colaboradores (2020), propôs o desenvolvimento de um MIP, que foi empregado como fase extratora na técnica de *solid phase extraction* – SPE, utilizando polímero molecularmente impresso para a determinação de taninos condensados em cascas de frutos brasileiros. Os autores demonstraram que o MIP sintetizado obteve alto coeficiente de impressão e os resultados mostraram que a utilização do MIP como fase extratora foi capaz de obter taninos condensados de amostras de jabuticaba, umbu e angico, apresentando seletividade e sensibilidade para as análises.

Entretanto como é de nosso conhecimento, até o presente momento inexistem pesquisas que envolvam isolamento e identificação de taninos condensados utilizando MIP como fase extratora na primeira dimensão de sistemas cromatográficos automatizados em especial, para análises de amostras de frutos brasileiros. Dessa forma, desenvolver um método de extração acoplado ao sistema analítico e eficiente, que diminua erros analíticos e superem os desafios encontrados nas metodologias *offlines* com *clean-up* destes compostos é relevante e pode contribuir para o desenvolvimento regional e nacional, dado o potencial interesse econômico, e medicinal que os taninos condensados apresentam.

OBJETIVOS

2 OBJETIVO GERAL

Este trabalho propõe a avaliação de um sistema de separação, utilizando MIP como sorvente extrator em coluna capilar em linha com o sistema analítico de cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos, para promover a extração, pré-concentração e *clean-up*, de taninos condensados presentes em casca de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*).

2.1. Objetivos específicos:

- Sintetizar MIPs para extração e separação de taninos condensados;
- Caracterizar o polímero sintetizado empregando diferentes técnicas analíticas;
- Preparar colunas cromatográficas miniaturizadas contendo a fase de MIP sintetizado;
- Verificar aplicabilidade da coluna desenvolvida quanto ao acoplamento direto em sistema de análise HPLC-DAD;
- Otimizar os principais parâmetros envolvidos na eficiência de extração para o sistema proposto;
- Avaliar as figuras de mérito para o método desenvolvido;
- Aplicar a metodologia proposta para pré-concentrar taninos condensados presentes em amostras de casca de jabuticaba Paulista (*Myrciaria cauliflora*).

METODOLOGIA

3 METODOLOGIA

3.1. Solventes e Instrumentação

Neste estudo foram utilizados solventes grau HPLC, sendo metanol (TEDIA – 99,8%) acetonitrila (TEDIA – 99,95%). Reagentes líquidos: etanol (SOL – 92,8° INPM), ácido clorídrico (Basic Scharlaw – 36,5-38%), ácido fórmico (Sigma Aldrich – 95%), ácido acético (Sigma Aldrich – 98%) hidróxido de amônio (Sigma Aldrich – 28-30%), tetraortoetilsilicato (Sigma Aldrich – 98%), APTS (3- aminopropiltrióxissilano, Sigma Aldrich – 99%). Reagentes sólidos: sílica em gel 60 (Mesh – 0,063-0,2 mm); Padrões: (+)-catequina (Sigma Aldrich – 98%), vanilina (Sigma Aldrich – 99%).

A secagem das amostras foi feita em estufa (Retilínea – Fanem São Paulo) mantida em 38 °C (± 2 °C). As amostras foram trituradas em moinho de facas (IKA - A11). Para a extração dos taninos foram empregados sistema soxhlet com aquecedor (ethiktechnology), utilizando água ultrapura (Purificador Gehaka) apresentando condutividade de 18,2 M Ω . Foi utilizado o rotaevaporador (IKA – RV 10 auto, equipado com banho IKA HB Digital e recirculador Chiller IKA Vacstar Digital mantido a 15°C) para concentração do extrato aquoso e um SpeedVac (Concentrator Savant SPD 131 PDA, com refrigerador VaporTrap Savant RVT 5105 da marca ThermoScientific) para secagem do mesmo. A identificação do teor de procianidinas foi feita utilizando o espectrofotômetro operando na região do ultravioleta a 500 nm (BEL PHOTONICS – 1105). A fim de selecionar uma faixa de tamanho homogênea dos polímeros, estes foram triturados em almofariz de ágata, e as partículas submetidas ao agitador de peneiras eletromecânico (Agitador granulométrico – Betel) e separados por tamanhos das peneiras de aço na escala mesh (Tyler 20 – 100).

3.2. Obtenção de extrato aquoso das amostras de jaboticaba

As amostras de jaboticaba foram obtidas na Fazenda Jaboticabal no município de Hidrolândia- GO (16° 55' 32.35 “S, e 49° 21' 39.76”W), à 36,5 Km de Goiânia-GO, no dia 08 de agosto, de 2020 (temperatura máxima do dia: 36 °C com mínima de 21 °C). As amostras foram armazenadas em sacos plásticos sob refrigeração (18 °C) até a secagem. Posteriormente, as polpas foram separadas das cascas, as quais foram previamente limpas e pesadas antes da secagem. Ao todo foram obtidos 172,30 g de casca úmida, levadas para estufa em temperatura de 35 °C (± 2 °C)

por cerca de três dias, onde foram totalmente secas até aspecto quebradiço. As cascas secas foram então pesadas novamente, obtendo-se um valor de 31,43 g (rendimento de 18,2%) e posteriormente trituradas em um moinho de facas.

Posteriormente, 25 gramas da amostra foram transferidos para um balão de fundo chato e submetidos à extração por refluxo em sistema soxhlet, utilizando 500 mL de água ultrapurificada. O procedimento foi conduzido sob aquecimento a 100 °C, por 6 h. O extrato ainda quente foi filtrado e transferido para um béquer, coberto com papel filme e devidamente armazenado sob refrigeração (4 °C) até a concentração do extrato em rotaevaporador, e posterior secagem do extrato em SpeedVac. Foram separadas alíquotas das amostras concentradas, antes da secagem para determinação do teor de procianidinas no extrato aquoso obtido.

3.3. Determinação do teor de taninos condensados

O teor de procianidinas foi determinado pelo método de reação com a vanilina/HCl seguindo a metodologia de Palacios e colaboradores (2021). Para isso, 1 mL do extrato aquoso das cascas de jabuticaba foi adicionado a 5 mL de mistura de HCl 8% e solução de vanilina 1% (v:v). Essa mistura foi acondicionada em tubos tipo falcon (15 mL) e coberta com papel alumínio para reação por 20 min em banho-maria a uma temperatura de 30 °C. Os experimentos foram realizados em triplicata. Após este período, a solução foi analisada por espectroscopia UV-vis. O branco das amostras foi preparado utilizando solução vanilina 1% e HCl 4% (v:v). O mesmo procedimento foi realizado para a construção da curva de calibração, utilizando solução padrão de catequina, em faixa de concentração de 0,010, 0,025, 0,050, 0,080, 0,100, 0,200, 0,350, 0,500, 0,800 e 1 mg mL⁻¹.

3.4. Síntese do MIP à base de sílica

A metodologia de síntese dos polímeros foi baseada na proposta por Martins e colaboradores(2020). Para a síntese do MIP foram adicionados 0,5 g de sílica, dispersos em 160 mL de água deionizada, 100 mL de metanol (solvente porogênico), com 20 mL de hidróxido de amônio a 25%, misturados com 8,0 mL de tetraetilortosilicato (*cross-linker*), 1,0 mL de APTES (3- Aminopropil-trietoxisilano) (monômero funcional), e como *template* foi utilizado 5 mL de uma solução (1 mg mL⁻¹) de catequina.

Após homogeneização, a reação foi mantida em agitação média (velocidade 3 do agitador não possuindo controle em RPM) por 24 h, a 25 °C. Passado esse período, a mistura foi filtrada a

vácuo e os polímeros acondicionados em estufa a 50 °C por 24 h. Posterior à secagem, os polímeros foram submetidos à lavagem por refluxo com etanol 92,8% em sistema Soxhlet por 24 h e acetona (grau HPLC) por mais 3 h. Após essa etapa, os polímeros foram mantidos em repouso por 24 h à 25 °C para secagem. A fim de comparar a seletividade do MIP de catequina, foi realizada também a síntese do polímero não impresso (NIP), utilizando a mesma metodologia descrita, porém sem adição do *template*. Subsequentemente, os polímeros foram enviados aos respectivos laboratórios para as análises de caracterização.

3.5. Caracterização do MIP e do NIP

Para verificar a morfologia do NIP e do MIP e da sílica utilizada na síntese, foram realizadas análises por microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão no Laboratório Multiusuário de Microscopia de alta resolução (LabMic) da Universidade Federal de Goiás. As micrografias de varredura foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura Jeol, JSM – 6610, equipado com EDS (Thermo Scientific NSS Spectral Imaging) à uma magnitude de 10.000×, 15.000× e 200×. Para analisar a densidade dos polímeros foram obtidas micrografias de transmissão em Microscópio Eletrônico de Transmissão Jeol, JEM– 2100, equipado com EDS (Thermo Scientific) a um comprimento de onda de 500nm, 200nm.

Para estudar a estrutura dos polímeros sintetizados, e obter informações sobre os grupos funcionais presentes nas amostras, foram realizadas análises de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (*FTIR*), empregando-se o equipamento PerkinElmer, modelo Spectrum 400. Os espectros foram obtidos na faixa de 450 a 4500 cm^{-1} . Para verificar o grau de cristalinidade dos polímeros foram realizadas análises de Difractometria de Raios-X. Os difratogramas foram obtidos em um Difrátômetro SHIMADZU modelo DRX-6000 programado para 40 kV de voltagem e 30 mA de corrente, utilizando radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,54 \text{ \AA}$) com default em ângulos entre 10 e 80 graus (2θ), passo de 0,02 ° (2θ), e constante de tempo de 0,60 s/passos. As amostras em faixa de tamanho de 150 μm foram escolhidas para esta análise. Os experimentos foram conduzidos na Central de Análises Multiusuários (CAM), IQ-UFG.

A estabilidade térmica dos sólidos foi avaliada por análises termogravimétricas (TGA). O equipamento empregado foi o STA 449 F3 da Netzsch, utilizando-se aproximadamente 7,5 mg de amostra, em atmosfera de gás nitrogênio, e fluxo de 50 mL min^{-1} , cadinho de alumina (85 μL) com a razão de aquecimento de $-263 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ e faixa de aquecimento de 25 a 1000 °C. Esses

experimentos foram conduzidos no Centro Regional para o Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (CRTI) da UFG.

Análises de dessorção e adsorção de nitrogênio foram realizadas para verificar propriedades como tamanho e volume de poros. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Pesquisas em Materiais de Separação e Cromatografia na Universidade Federal de Uberlândia *campus* Pontal no equipamento ASAP 2020 Plus Version 1.03, utilizando aproximadamente 300 mg de amostra, aquecidas a 350 °C por 10 h e então submetidas ao gás de adsorção nitrogênio. As isotermas de adsorção de nitrogênio foram obtidas a -195,5 °C usando um instrumento de fisissorção automático ASAP2020 Plus (Micromeritics, Norcross, GA, EUA) na faixa de pressões relativas (P/P_0) de 0 a 0,995. Antes das medidas, todas as amostras foram submetidas a pré-tratamento a 300 °C por 12 h para eliminação de voláteis, até obtenção de vácuo de 10 μ m Torr no frasco porta-amostra. A área superficial específica (S_{BET}) foi determinada pelo método BET (Brunauer-Emmett-Teller) usando dados de adsorção na faixa P/P_0 de 0,05 a 0,30. O diâmetro médio de poros (d_p) foi calculado método BJH (Barrett-Joyner-Halenda) ($d_p = 4V_p/S_{BET}$, onde V_p é o volume total de poros). O volume total de poros foi calculado pela conversão da quantidade de gás N_2 adsorvido a P/P_0 de 0,995 para o volume do adsorbato líquido.

3.6. Enchimento das colunas analíticas

Para a montagem das colunas cromatográficas foram utilizadas tubulações Peek (1-161N OD 0.02IN ID; 100 mm, – Agilent) nos diâmetros de 0,13 e 0,25 mm para avaliação da influência do diâmetro na eficiência da coluna desenvolvida, com anilha frontal de aço inoxidável de 1/16 polegadas; Adaptador de aço inoxidável de 1/16 polegadas e filtro em linha de baixa dispersão (2,1 mm x 0,2 μ m – Agilent). A fim de escolher uma faixa granulométrica homogênea, o sólido foi peneirado e selecionou-se as partículas de tamanho 150 μ m. Dessa forma, 1 g do MIP foi pesado e imerso em 10 mL de metanol, e essa solução foi deixada em repouso por 24 h a temperatura ambiente (25°C). Posteriormente, a solução foi introduzida na tubulação Peek com o auxílio de uma coluna oca (150 mm x 1/4 in x 4,6 mm) sob fluxo de gás nitrogênio (Figura 6).

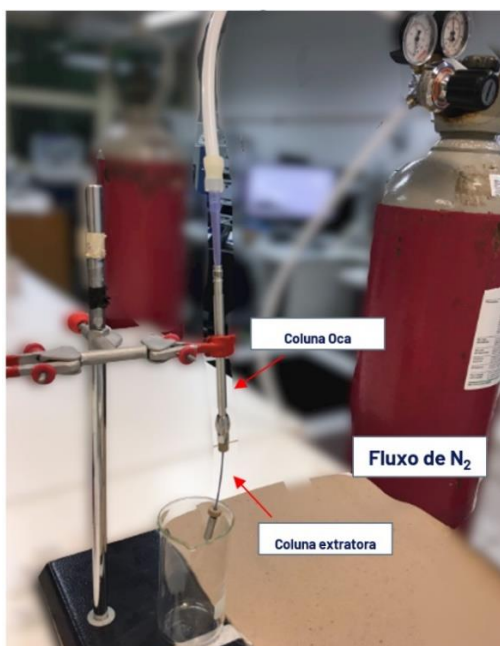


Figura 6 – Esquema do enchimento das colunas cromatográficas.
Fonte: Autoria Própria.

As colunas foram submetidas à análise cromatográfica em fluxo isocrático de metanol ($0,05 \text{ mL min}^{-1}$) e seu preenchimento foi considerado completo após a obtenção de pressão constante no sistema HPLC (Prominence modelo LC-20AD da Shidmadzu). Para a montagem das colunas com o polímero não impresso – NIP, o procedimento se deu da mesma forma descrita para as colunas contendo MIP, no entanto, utilizando-se a solução de NIP:Metanol. A Figura 7 mostra as colunas MIP e NIP de 0,13 e 0,25 mm montadas.

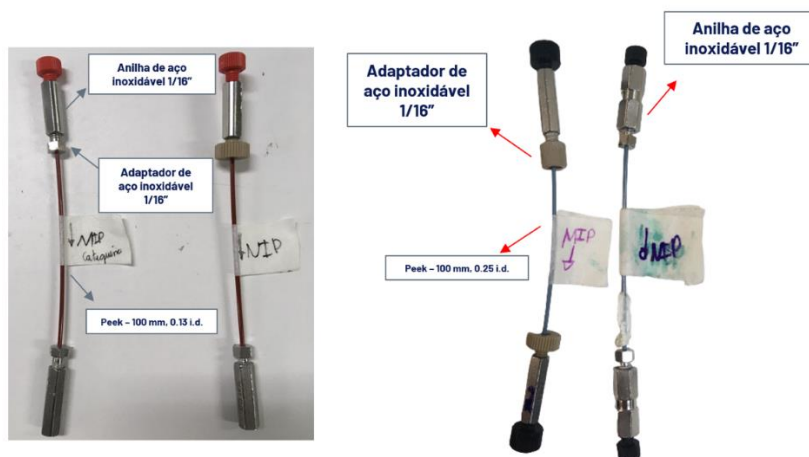


Figura 7 – Colunas extratoras MIP e NIP de 0,13 mm (esquerda) e 0,25 mm (direita).
Fonte: Autoria Própria.

3.7. Avaliação da aplicabilidade da fase extratora em sistema *online*

Após o enchimento das colunas capilares, foram realizados testes afim de se verificar a aplicabilidade da coluna para a extração. Para tanto, foi empregada solução padrão de catequina em metanol ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$). Estes experimentos foram conduzidos no Laboratório do Grupo de Cromatografia de Bioafinidade e Produtos Naturais do DQ-FFCLRP USP-RP sob supervisão da Profa Dra. Carmen Lúcia Cardoso.

Inicialmente a coluna de 0,13 mm foi utilizada, sendo condicionada previamente com metanol para a eliminação de possíveis resíduos de síntese do polímero por 1h, e posteriormente condicionada com acetonitrila:ácido acético (0,1% v/v) por mais 1h. As análises foram realizadas em HPLC Prominence LC-20AD da Shidmazu, autosampler (SIL-20 A), conjunto de bombas quaternário, acoplado ao detector de arranjo de diodos (PDA, SPD-M 20 A) e controlador (CBM-20 A) conectado ao software LC Solutions.

As condições de análises foram as seguintes: uma fase móvel binária constituída por A: água:ácido fórmico (0,1% v/v), e B: metanol:ácido acético (0,1%) como fase B; Foram testados fluxos de 15, 20 e 25 $\mu\text{L min}^{-1}$, e comprimentos de onda de 200, 280, 320 nm, com um tempo de corrida de 40 min num modo isocrático de 20% de A, e 80% de B e um volume de injeção de amostra de 10 μL de solução padrão de catequina ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$).

3.8. Otimização das condições analíticas

Após a avaliação preliminar a cerca da aplicabilidade das colunas, os parâmetros de análise tais como, fluxo de fase móvel, e volumes de injeções foram otimizados para a coluna de 0,25 mm, pois esta apresentou maior estabilidade nos testes iniciais. O modo de condicionamento da coluna foi feito da mesma forma que a de 0,13 mm.

As condições de análises foram as seguintes: uma fase móvel binária constituída por A: água:ácido fórmico (0,1%), e B: acetonitrila:ácido fórmico (0,1%) com um tempo de corrida de 10 min, num modo isocrático de 85% de A, e 15% de B utilizando como amostra, a solução padrão de catequina à $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ no comprimento de onda de 280 nm.

Para o fluxo de fase móvel volumes de 15, 20, 25, 50 e 75 $\mu\text{L min}^{-1}$, foram avaliados nas mesmas nas condições descritas acima, com o volume de injeção de amostra de 40 μL . Nessa etapa, a pressão das colunas MIP e NIP também foram verificadas para esses fluxos de fase móvel. Referente aos volumes de injeção, foram avaliados oito volumes sendo eles: 5, 10, 20, 30, 40, 50, 75 e 100 μL ,

também nas mesmas condições de análise, utilizando um fluxo constante de fase móvel de 25 μL .

3.9. Avaliação de Figuras de Mérito

A partir dos resultados de otimização das condições de análise, procedeu-se a avaliação das figuras de mérito. A seletividade da fase extratora foi avaliada comparando-se as áreas dos cromatogramas obtidos com as injeções do padrão de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ na coluna MIP. As análises foram feitas em triplicata.

O fator de enriquecimento da fase em relação a amostra foi feito pela comparação das áreas do padrão de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ na coluna MIP, em relação as áreas do padrão injetado no tubo peek sem fase extratora. As análises foram feitas em triplicata.

A Repetibilidade da fase no sistema cromatográfico foi avaliado em termos de coeficiente de variação ($\text{CV} < 15\%$) – estabelecido pela ANVISA – em três diferentes concentrações: baixa, média e alta (30, 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$), utilizando três colunas do mesmo diâmetro enchidas com MIP. A Fórmula utilizada para calcular foi $\text{Cv} = (s/\bar{x}) * 100$, onde s: desvio padrão entre as replicatas e, \bar{x} : média das injeções. A capacidade de reuso das colunas foi feita avaliando-se o desvio padrão relativo ($\text{DPR} < 20\%$) entre as injeções do padrão de catequina utilizando coluna MIP, de modo em que não se observasse variações significativas entre as extrações. Além destes, o efeito de memória (*carryover*) na coluna MIP foi avaliado, a partir da comparação entre os cromatogramas de injeção do padrão com o branco (metanol) pós corrida.

3.10. Extração das amostras reais em extrato de casca de jabuticaba

Os extratos secos de casca de jabuticaba foram ressuspensos em metanol 1 mg mL^{-1} (solução estoque) diluídos na concentração de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (cerca de 100 x), e então injetados na coluna MIP e na coluna NIP para extração de catequina nas amostras reais. Para separação dos compostos extraídos, o extrato foi enviado para uma coluna analítica (Agilent Technologies – 4.6 x 50 mm; 1.8 μm), conectada ao sistema cromatográfico, após a coluna extratora. As condições de análise foram as seguintes: uma fase móvel binária constituída por A: água:ácido fórmico (0,1%), e B: metanol:ácido fórmico (0,1%); Fluxo de fase móvel de 300 $\mu\text{L min}^{-1}$, $\lambda = 280 \text{ nm}$, tempo de corrida de 20 min, em um modo isocrático de 85% de A, e 15% de B e um volume de injeção de amostra de 10 μL . A fins de comparação com o padrão do composto, foi injetado um padrão de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de catequina.

Para confirmar a identidade do composto extraído pela coluna MIP, foi utilizado um espectrômetro de massas de alta resolução da marca Thermo Scientific do tipo Q Exactive hybrid Quadrupole-Orbitrap. Os parâmetros instrumentais empregados foram os seguintes: modo íon negativo; scan type: MS/MS de 289,1 \pm 0,45 m/z ; Scan range: 150 a 300 m/z ; Tempo máximo de injeção: 50 ms; Fluxo de nitrogênio: 10; Fluxo de gás auxiliar: 5; Voltagem do spray: 3,10 kV; Temperatura do capilar: 320 °C; Os espectros foram processados usando o software *Xcalibur Analysis* (versão 2.0, Service Release 2, Thermo Electron Corporation).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Determinação do teor de taninos condensados

Para a determinação do teor de taninos condensados presentes no extrato aquoso de casca de jaboticaba pelo método vanilina/HCl foi construída a seguinte curva analítica utilizando o padrão de catequina (Figura 8).

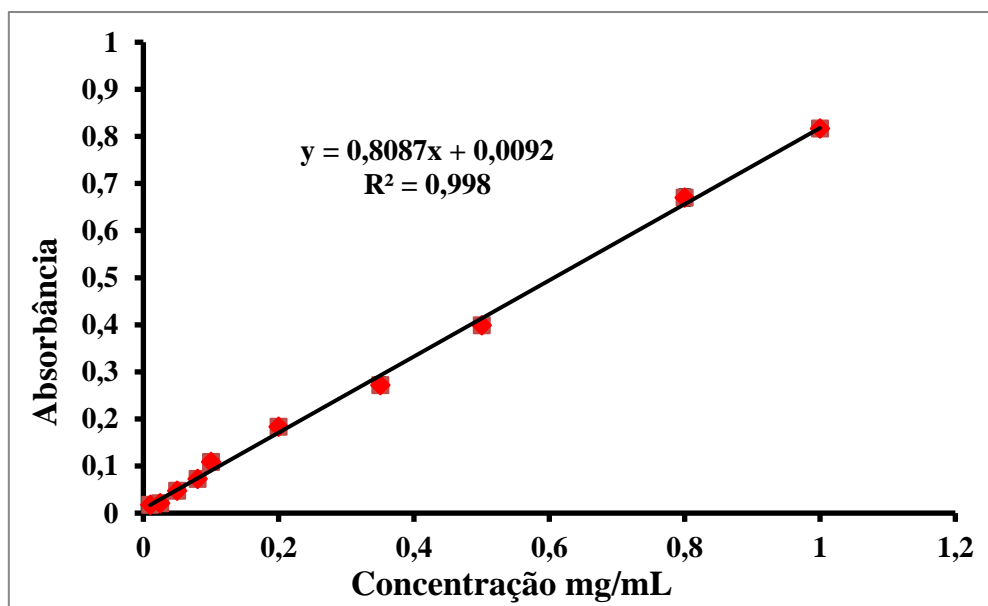


Figura 8 – Curva analítica para o método vanilina/HCl, em concentrações equivalentes de catequina (n=3).

A partir da curva analítica, foi possível realizar a quantificação dos derivados de taninos condensados nas amostras de extratos da casca de jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*), obtendo-se um teor de $59,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($5,91 \text{ mg}/100\text{g}$ do extrato) de procianidinas. Um estudo feito por Machado e colaboradores (2018), mostrou para o extrato da casca de *M. jaboticaba* um teor de $10,54 \text{ mg}$ de catequina, a cada 100 g do extrato. Entretanto, alguns fatores devem ser considerados quando se trata da concentração de compostos fenólicos na fruta, como, secagem das amostras, método de extração, e técnicas de identificação usados, e também aspectos agrícolas, tais como, local de plantação, estágio de desenvolvimento dos frutos, características de solo, incidência de luz e clima (INADA et al., 2021; TOMAK et al., 2018).

4.2. Caracterização dos polímeros

4.2.1. Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV

Conhecer a faixa do tamanho do MIP é muito importante para evitar possíveis problemas de contrapressão no preenchimento de colunas. Técnicas como microscopia eletrônica de varredura (MEV) são capazes de fornecer informações sobre a geometria e o tamanho das partículas. No que se refere ao particulado, quando partículas esféricas são usadas mais eficiente será o enchimento da coluna, contribuindo para a redução dos múltiplos caminhos no leito cromatográfico (MIDDELEER; DUBRUEL, SAEGUER, 2016). As micrografias obtidas a uma magnitude de 15.000 \times e 10.000 \times para os polímeros (MIP, NIP, e MIP anterior a lavagem) estão dispostas nas Figuras 9, 10 e 11. Já as micrografias obtidas para a sílica precursora da síntese dos polímeros estão apresentadas na Figura 12 nas magnitudes de 10.000 \times e 200 \times .

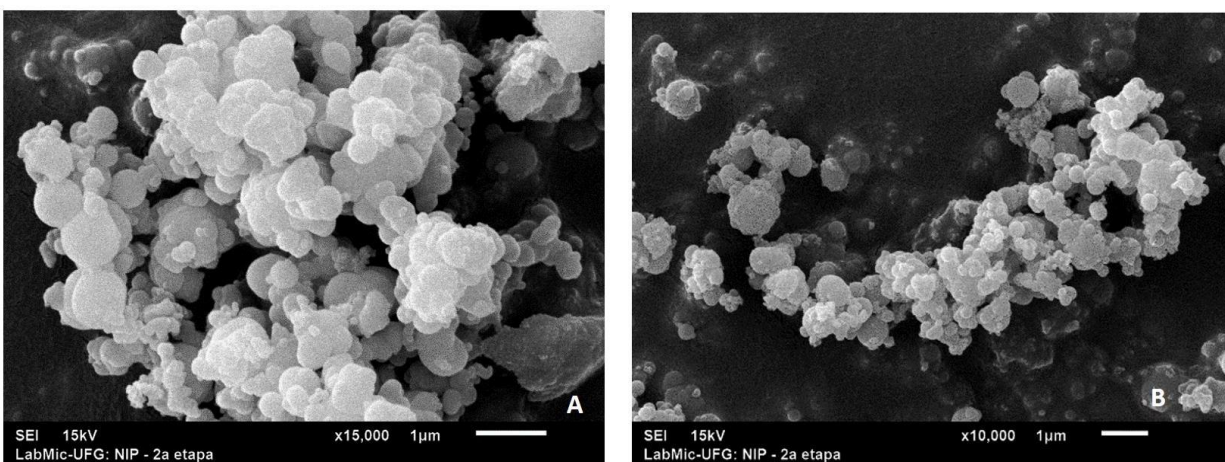


Figura 9 – Micrografia obtida para o NIP nas magnitudes de 15.000 \times (a) e 10.000 \times (b).

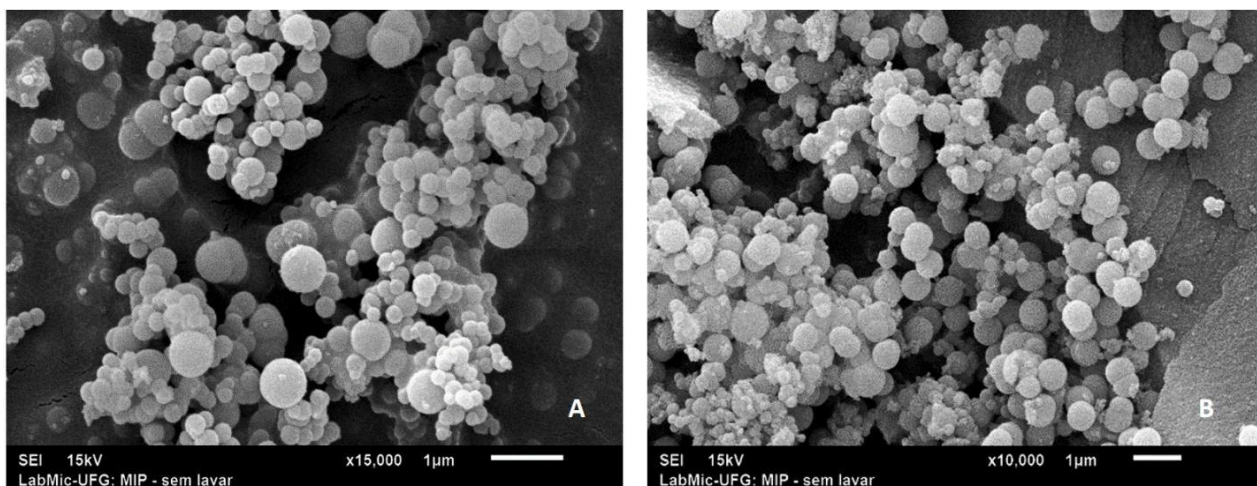


Figura 10 – Micrografia obtida para o MIP anterior à lavagem nas magnitudes de 15.000× (a) e 10.000× (b).

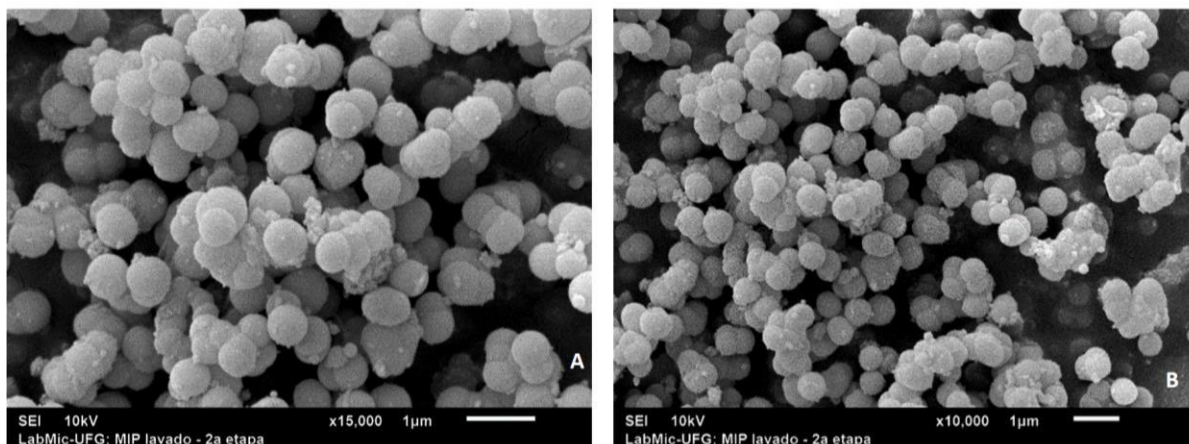


Figura 11 – Micrografia obtida para o MIP posterior à lavagem nas magnitudes de 15.000× (a) e 10.000× (b).

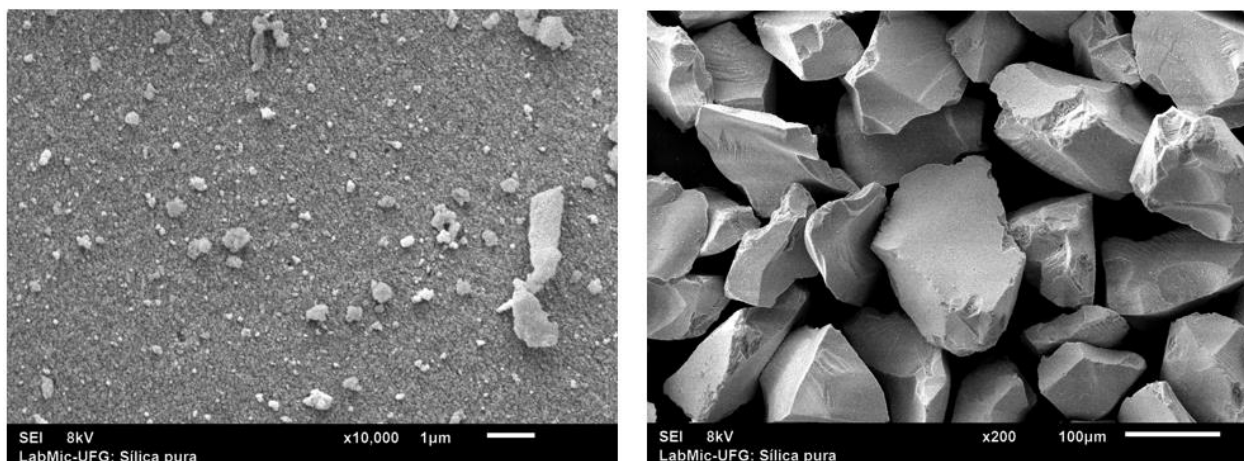


Figura 12 – Micrografia obtida para a sílica “pura” nas magnitudes de 10.000× (a) e 200× (b).

Como pode ser observado nas Figuras 9 a 11 nota-se uma característica de sólido regular, com partículas esféricas e aglomeradas as quais são bem estabelecidas na literatura para os MIPs. Já quando comparado o NIP (Figura 9) com os MIPs (Figura 11) nota-se, que apesar de também ocorrer a polimerização no polímero não impresso, indicado por significativas diferenças visuais entre as micrografias, com poucas cavidades isto é, canais entre as partículas para o NIP, além de uma rede polimérica não tão bem estabelecida (regular e homogênea) quando comparado aos MIPs.

Middleleer e colaboradores (2016) discorrem que, quanto maior a superfície de contato relativamente disponível, maior chance de ligação das moléculas alvo. Logo, quando se trata de polímero molecularmente impresso a presença de espaçamento entre as partículas é desejável, pois além de aumentar a área superficial disponível, permite que a fase móvel seja eluída com facilidade no interior da coluna, diminuindo a pressão no sistema miniaturizado e o carryover entre as análises, e conseqüentemente possibilitando a sua reutilização (VASCONCELOS et al., 2020). Se tratando do MIP anterior à lavagem, este apresentou bastante semelhança com a morfologia do MIP após a lavagem, diferindo apenas pelo fato de ainda apresentar alguns resíduos de síntese, representados na forma de bastonetes nas micrografias.

4.2.2. Dessorção e Adsorção de Nitrogênio

Na tentativa de correlacionar o possível efeito da área superficial sobre a eficiência de extração do MIP sintetizado, dados de área superficial foram obtidos através de análises de adsorção e desorção de nitrogênio. Na Tabela 2 encontram-se os valores de área de superfície, tamanho e volumes de poro obtidos para o MIP e o NIP sintetizados.

Tabela 2 – Resultados obtidos das análises de desorção e adsorção de nitrogênio para as microesferas de MIP e NIP.

Polímero	Área Superficial (m ² g ⁻¹)	Volume de poro (cm ³ g ⁻¹)	Média dos Tamanhos de poro (nm)
MIP	93,9929	0,405582	17,2601
NIP	88,2622	0,349222	15,8266

Como é possível observar na Tabela 2, há pequenas diferenças quando comparado os valores de área superficial, volume e tamanho de poros para os dois polímeros. Como a literatura reporta, a área de superfície para o MIP é normalmente maior do que a do NIP, isso porque, a porosidade é diretamente influenciada pela presença do *template* no processo de polimerização, o que contribui para uma boa capacidade adsorvente. Estudos apontam que os sítios de impressão do MIP estão localizados na superfície e que isso promove uma melhora no processo no reconhecimento dos analitos, sendo assim uma grande área superficial é desejada (HE et al., 2021).

Além disso, o menor tamanho de poro do NIP indica que a sua estrutura é mais compacta

que a dos MIPs, o que corrobora com a morfologia apresentada nas micrografias (Figura 9) (MIDDELEER et al., 2016; GU et al., 2011). A faixa de tamanho dos poros para ambos os polímeros, indicam que as partículas têm uma característica de mesoporos no entanto, estudos apontam que para utilização do polímero em sistemas de HPLC tamanhos entre 10-18 nm são adequados. Dessa forma, os resultados obtidos viabilizam a aplicação do MIP sintetizado como fase extratora em sistema *online* de cromatografia líquida (TEIXEIRA et al., 2021, GU et al., 2011). Martins e colaboradores (2020), obtiveram valores de volume ($0,464 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$) e tamanho de (12,5830 nm) de poros, coerentes aos obtidos nesse trabalho, indicando uma eficiência no uso do MIP sintetizado no processo de preparo de amostra. As propriedades como a porosidade e a área de superfície são determinadas pelo tipo de solvente porogênio utilizado. Os porogênios termodinamicamente favoráveis à reação, tendem a se separar do polímero em crescimento após a polimerização, e isso resulta em materiais mais porosos e com maior área de superfície (LI et al., 2017; ABDOUSS et al., 2012).

4.2.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão – MET

Assim como a MEV, a MET é baseada em um feixe de elétrons interagindo com a amostra, entretanto, em vez dos elétrons serem ejetados no substrato como na MEV, a MET mede os elétrons transmitidos. Esta técnica é frequentemente utilizada para investigar propriedades como tamanho e geometria na partícula (MIDDELEER; DUBRUEL, SAEGUER, 2016). Nas Figuras 13, 14 e 15, estão apresentadas as micrografias de transmissão para os polímeros sintetizados obtidas à 1 μm , e 200 nm.

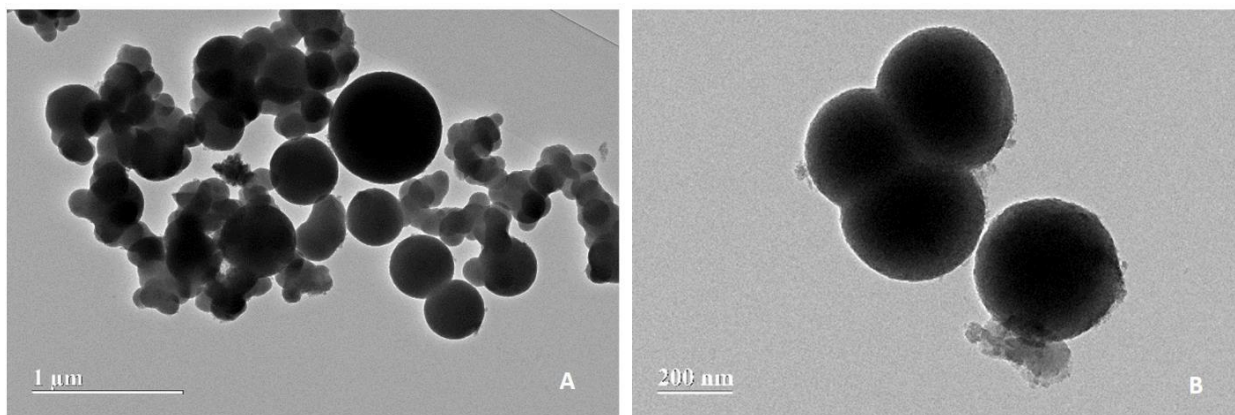


Figura 13 – Micrografia de transmissão do NIP obtida à 1 μm (a) 200 nm (b).

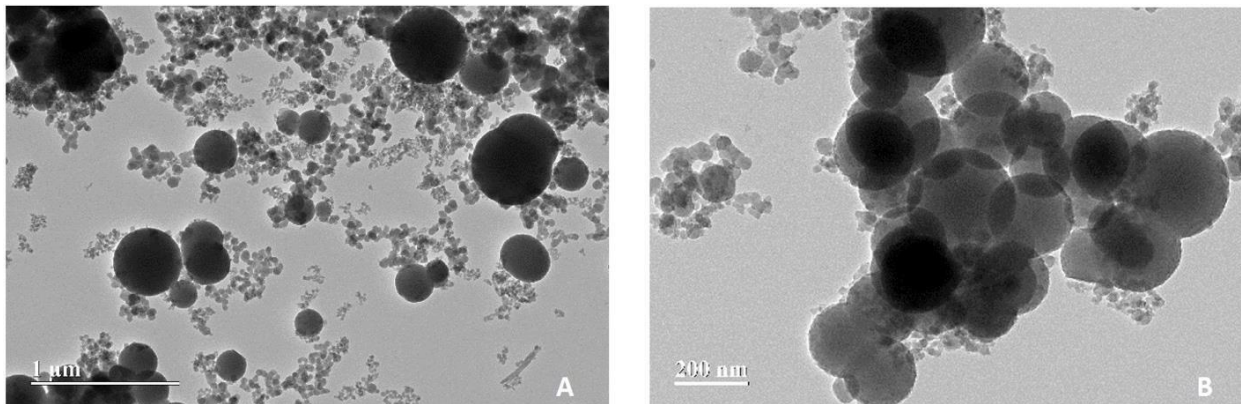


Figura 14 – Micrografia de transmissão do MIP anterior à lavagem obtida à 1µm (a) 200 nm (b).

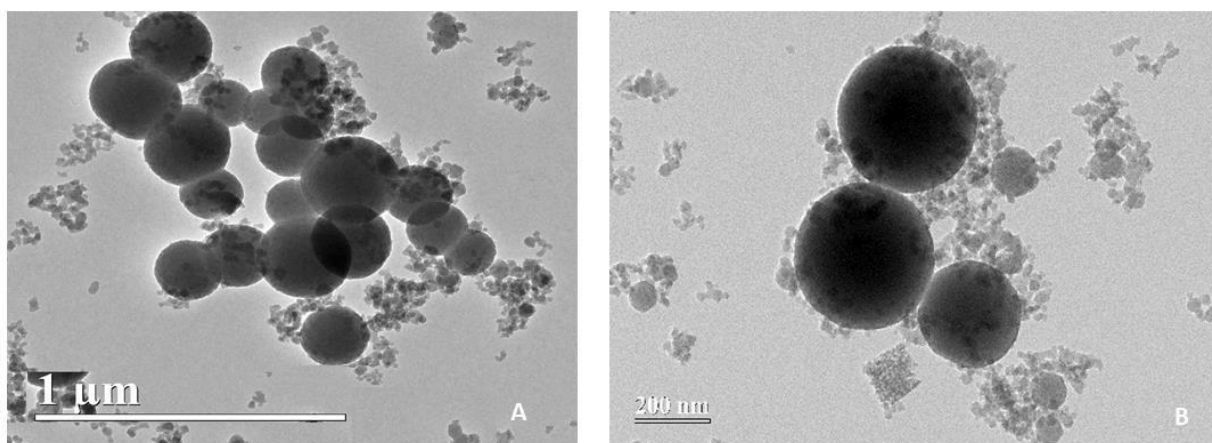


Figura 15 – Micrografia de transmissão do MIP posterior à lavagem obtida à 1µm (a) 200 nm (b).

De acordo com as Figuras 13 a 15 apresentadas, nota-se que as partículas de ambas as amostras apresentaram bastante similaridade, entretanto é perceptível que ambos os MIPs apresentaram maior quantidade de micropartículas aglomeradas, complementando a análise de MEV que indicou uma rede polimerica mais bem estabelecida para o MIP. O NIP por sua vez, apresentou maior dispersibilidade entre as partículas (Figura 13). De acordo com Liu Wan e Cao (2018), a presença do *template* no momento da polimerização pode ter influência na superfície do polímero impresso.

Outro fator que chama a atenção nas imagens, e o mais relevante para esta análise, é a

coloração mais escura das partículas, que pode ser explicado pela maior densidade destes materiais. Objetos mais densos reduzem ou impossibilitam a transmissão do feixe de elétrons, geralmente, essa característica é observada em materiais cristalinos, onde há interação dos elétrons transmitidos com o núcleo dos átomos da amostra. Canevarolo Júnior (2017) afirmam que, quando há passagem de elétrons através de sólidos semicristalinos acontece um maior espalhamento de elétrons, ou seja, poucos elétrons conseguem atravessar a amostra. Assim, quanto mais denso ou espessa for a amostra ou, uma determinada região dela, mais escura será a coloração destas na micrografia. Contudo, polímeros são materiais usualmente amorfos na maior parte de sua estrutura. Dessa forma, para verificar o grau de cristalinidade destes compostos foi empregada também a análise de Difração de Raios-X.

4.2.4. Difração de Raios – X

A técnica de DRX é utilizada na caracterização de MIP para verificar o grau de cristalinidade de determinada amostra. Os difratogramas da Figura 16, mostra a comparação do MIP e do NIP, indicando que ambos polímeros apresentaram perfis semelhantes.

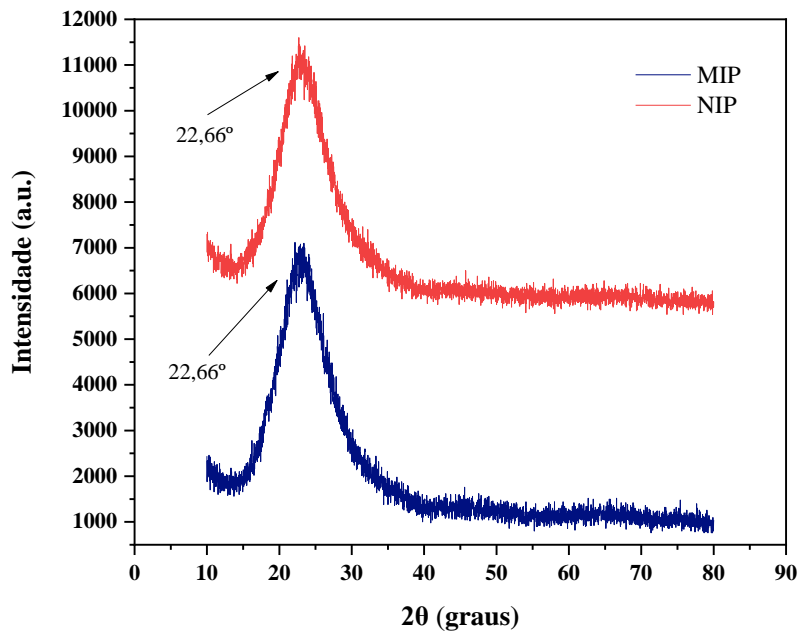


Figura 16 – Difratogramas obtidos para o MIP e o NIP.

O halo centrado em 22,66° apresentado na Figura 16, é característico de sólido amorfo e

mostra que há distâncias interatômicas médias, calculadas a partir da lei de Bragg, com uma amplitude considerável de valores que não remetem a distâncias precisas e bem definidas, que seriam características de sólido cristalino.

A cristalinidade dos materiais poliméricos está diretamente ligada com o modo em que as cadeias moleculares estão dispostas, podendo ser ordenadas, possuindo alinhamento paralelo (formando a fase cristalina), ou desorganizadas, possuindo alinhamento não paralelo (formando a fase amorfa). Em uma estrutura polimérica, os domínios cristalinos são poucos e estão intercalados com as regiões amorfas. Dessa forma, na análise por DRX, os polímeros apresentam reflexões de Bragg largas ou superpostas a um padrão – o que aponta para a existência de regiões ordenadas e desordenadas no mesmo material, o que é o oposto de materiais ligeiramente cristalinos, que apresentam padrões bem definidos (TROVATI, 2010). Por esta razão, onde há a existência de regiões ordenadas, e parcialmente cristalinas, as análises de MET demonstraram regiões mais escuras em algumas micrografias.

4.2.5. Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)

A espectroscopia na região do infravermelho é utilizada geralmente para visualizar os grupos funcionais presentes no sólido, e nesse caso, um indicativo do sucesso da síntese. Na Figura 17, estão dispostos o espectro de IR das amostras MIP e NIP realizadas de 450 a 4000 cm^{-1} .

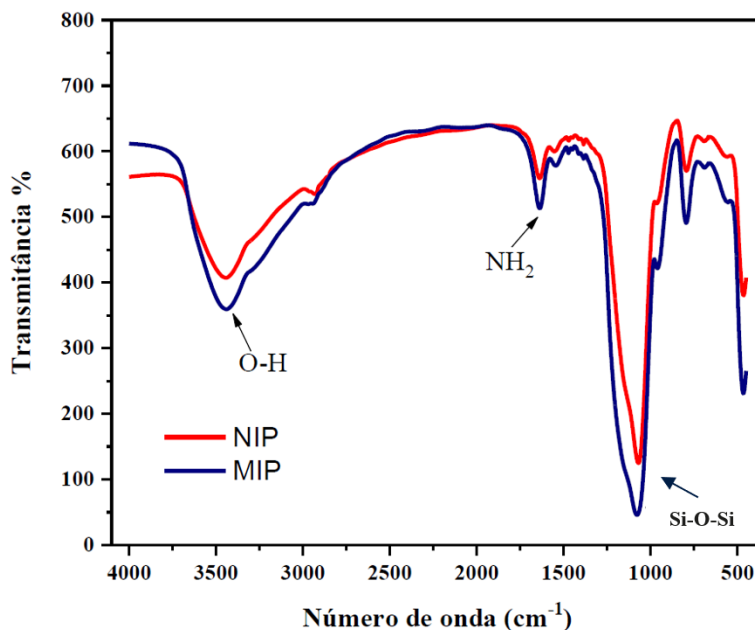


Figura 17 - Espectro de IV de comparação entre o MIP lavado com o NIP na faixa de 450 a 4500 cm^{-1} .

Na literatura é relatado que os espectros do MIP e do NIP são muito semelhantes devido ao mesmo modo de síntese, diferindo apenas na ausência do *template* no NIP. Entretanto, a presença característica de algumas bandas da molécula molde pode ser observada no MIP (MARTINS et al., 2020).

De acordo com a Figura 17, observa-se que o perfil dos espectros e ambos polímeros são muito semelhantes. O APTES foi o monômero funcional usado na síntese, e possui em sua estrutura um grupo de amina primária (NH_2), que apresenta dobramento com absorção de luz na faixa de comprimentos de onda entre $1640\text{-}1560\text{ cm}^{-1}$, e tanto no MIP quanto no NIP, as absorções se deram em aproximadamente 1640 cm^{-1} . O alongamento da banda em 3440 cm^{-1} está relacionado a absorção O-H, sendo devido forte ligação de hidrogênio destes compostos (PAVIA et al., 2015). Essa banda é característica da água presente na amostra, explicado pela umidade do ar. A banda intensa em 1078 cm^{-1} em ambos polímeros representa uma vibração das ligações Si-O-Si provenientes da sílica (SILVEIRA; DIB; FARIA, 2014).

4.2.6. TG/DTA

A Figura 18 apresenta as curvas de TG obtidas das variações de massa entre o MIP anterior à lavagem e posterior à lavagem, bem como o do NIP.

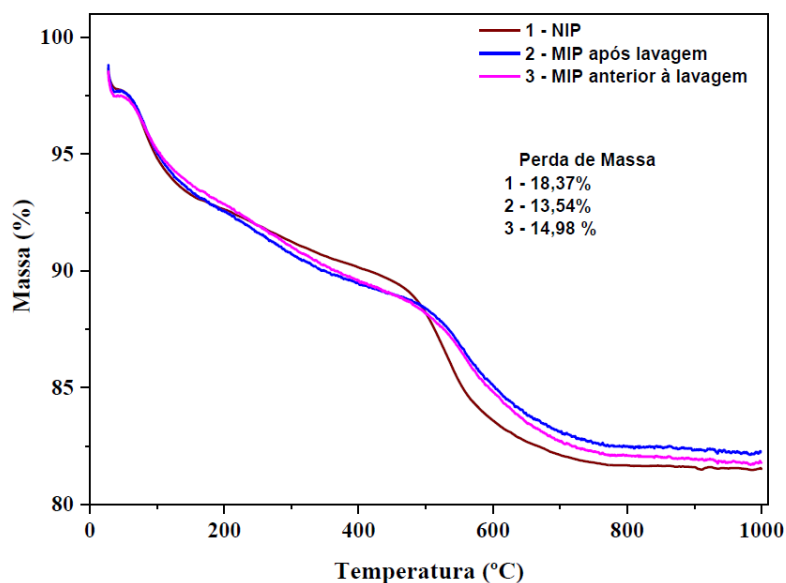


Figura 18 – Termogramas das amostras de MIP antes da lavagem em comparação com o MIP após a lavagem e o NIP.

Os resultados indicam que o polímero não apresentou curvas de decomposição, apenas uma constante perda de massa, relativamente pequena ao final do processo. As perdas de massa iniciais dos três polímeros (até 100 °C) podem ser associadas ao processo de desidratação, visto que foram utilizados metanol e água como solventes no processo de polimerização. Resíduos de reagentes apresentaram perda até (500 °C), e até 700 °C a perda pode ser associada a desidroxilação do polímero. Os polímeros apresentaram perda de massa de aproximadamente 4,7% nessa temperatura.

Nota-se, que os três polímeros apresentaram perfis térmicos semelhantes, com perdas de massa total inferiores a 20% como mostrado na legenda. O NIP foi o polímero que se mostrou menos estável em comparação aos polímeros molecularmente impressos. Pode-se associar esse fator à interação do template com os monômeros funcionais durante o processo de polimerização, o que torna o polímero menos propício a perda de massa (ABDOLLAH, AHMAD E OMAR, 2021). Apesar da perda de massa constante em temperaturas elevadas, observa-se que na temperatura usual para o forno da coluna cromatográfica (até 40 °C), compreende-se que os polímeros não apresentam fenômenos como decomposição e nem perdas de massa que poderão influenciar no funcionamento e eficiência da coluna.

4.3. Avaliação da aplicabilidade da fase extratora em sistema *online*

A aplicabilidade da fase extratora MIP foi avaliada para a solução padrão de catequina à $1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Para otimização das condições de análise três comprimentos de onda foram avaliados 200, 280 e 320 nm sendo estes indicados pela literatura para detecção de polifenóis. Na Figura 19 estão apresentados os cromatogramas obtidos em cada comprimento de onda avaliado.

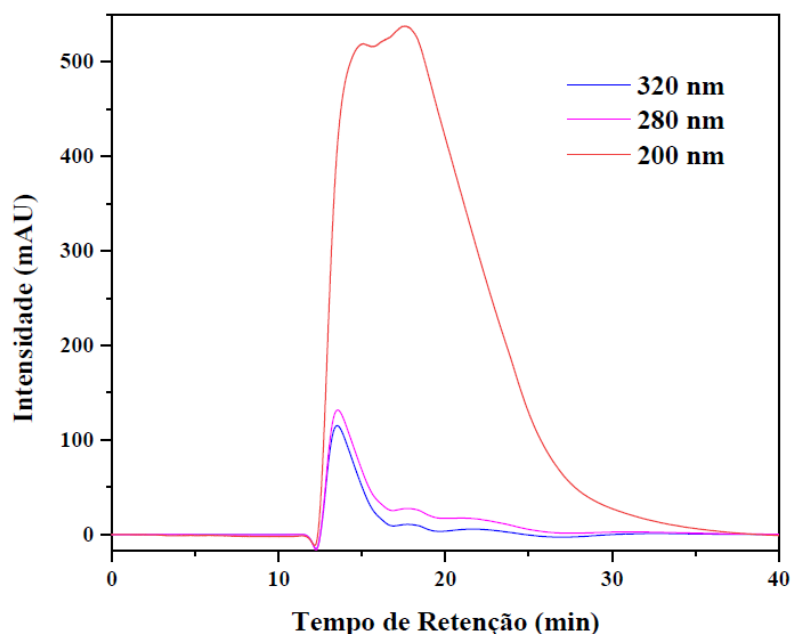


Figura 19 – Cromatogramas obtidos para a solução padrão de catequina a $1\mu\text{g mL}^{-1}$ nos comprimentos de onda de 200, 280, e 320 nm. Condições cromatográficas: fase móvel binária água:ácido acético (0,1%) A; metanol:ácido acético (0,1%) B, Fluxo de fase móvel: $25\mu\text{L min}^{-1}$; $\lambda = 200, 280$ e 320 nm ; tempo de corrida: 40 min.; Modo isocrático de 20% de A, e 80% de B; volume de injeção: $10\mu\text{L}$.

Como é possível observar na Figura 19, o sinal de maior intensidade obtido foi para o comprimento de onda de 200 nm. Entretanto, a assimetria de pico para esse comprimento apresentou valor mais elevado ($\cong 2,6$). Além disso, a pureza do pico ficou comprometida, pois nesse comprimento de onda, o metanol pode apresentar resposta acarretando na medida superestimada do sinal do composto em análise. Já os sinais de 280 e 320nm apesar de não apresentarem uma intensidade tão alta, apresentaram valores de assimetria ($\cong 1,91$) e pureza de pico melhores, no que se refere a uma maior sensibilidade para a análise da molécula de catequina. Dessa forma, foi escolhido o comprimento de onda de 280 nm para dar continuidade nas análises.

Foram avaliados três fluxos de fase móvel: $15, 20$ e $25\mu\text{L min}^{-1}$. Destes o que apresentou melhor resultado, demonstrado por menor tempo de análise e picos com menos assimetria e maior Repetibilidade de análise foi o de $25\mu\text{L min}^{-1}$. Os fluxos de fase móvel menores que $25\mu\text{L min}^{-1}$ resultam em maior tempo de análise para eluição do analito fazendo com que o composto ficasse retido na fase extratora e o pico resultante apresentasse um alargamento não desejável. Por outro lado, os fluxos maiores para esse diâmetro de 0,13 mm, causaram aumento na pressão do sistema, o que viria a ser prejudicial uma vez que isso iria acarretar na menor vida útil de conexões e coluna, além de gerar uma maior quantidade de resíduos (LANÇAS, 2016).

A Figura 20 mostra o cromatograma obtido nas condições otimizadas para a solução padrão de catequina, onde o tempo de retenção foi de 13,5 min.

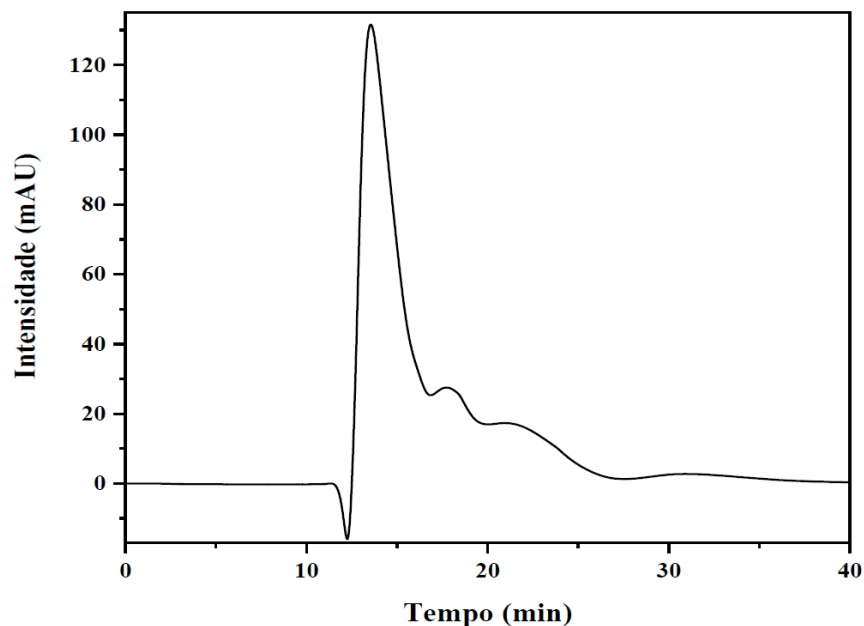


Figura 20 – Cromatograma obtido em 280 nm para a solução padrão de catequina à $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ na coluna preenchida com o MIP. Condições cromatográficas: fase móvel binária água:ácido acético (0,1%) A; metanol:ácido acético (0,1%) B, Fluxo de fase móvel: $25 \mu\text{L min}^{-1}$; $\lambda = 200, 280$ e 320 nm ; tempo de corrida: 40 min.; Modo isocrático de 20% de A, e 80% de B; volume de injeção: $10 \mu\text{L}$.

Já para a coluna NIP, a solução padrão na mesma concentração apresentou uma intensidade para o composto, inferior à obtida pela coluna MIP. A redução no tempo de retenção é um forte indicativo para mostrar a fraca interação do analito com o polímero NIP sintetizado, o que é desejável para o sistema avaliado (Figura 21).

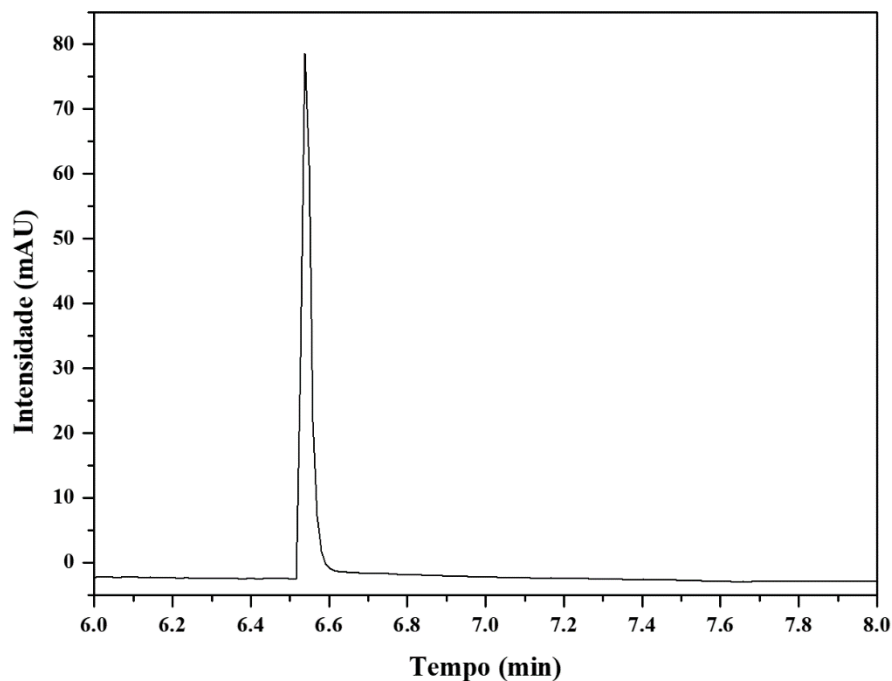


Figura 21 – Cromatograma obtido a partir da coluna NIP, para a solução padrão de catequina à $1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Condições cromatográficas: fase móvel binária água:ácido acético (0,1%) A; metanol:ácido acético (0,1%) B, Fluxo de fase móvel: $25 \mu\text{L min}^{-1}$; $\lambda = 200, 280$ e 320 nm ; tempo de corrida: 40 min.; Modo isocrático de 20% de A, e 80% de B; volume de injeção: $10 \mu\text{L}$.

Esses resultados são coerentes com o da literatura, visto que o NIP não tem locais de reconhecimento para a molécula alvo, e o composto pode ficar menos tempo retido dentro da coluna (LI et al., 2017). Outra explicação pode ser a forma de enchimento visto que manualmente as partículas podem não se assentar uniformemente no interior da coluna, fazendo com que fiquem espaços vazios dentro do tubo (LANÇAS, 2016). Apesar dos resultados de aplicabilidade serem favoráveis para as colunas de 0,13 mm, o equipamento em que se faz as análises necessita suportar a pressão que esse diâmetro causa. Dessa forma, observou-se que uso dessas colunas se tornou inviável depois de três injeções. Assim, as próximas etapas foram realizadas nas colunas de diâmetro 0,25 mm.

4.4. Otimização das condições analíticas

Parâmetros como fluxo de fase móvel e volume de injeção da amostra são de extrema importância na determinação da eficiência do processo de extração. Se tratando do volume de injeção da amostra, foram avaliados os volumes de 5, 10, 20, 30, 40, 50, 75 e $100 \mu\text{L}$ de injeção, nas

condições descritas na seção 3.9. A Figura 22 mostra os dados obtidos em porcentagem de área de pico normalizada em relação à maior resposta obtida.

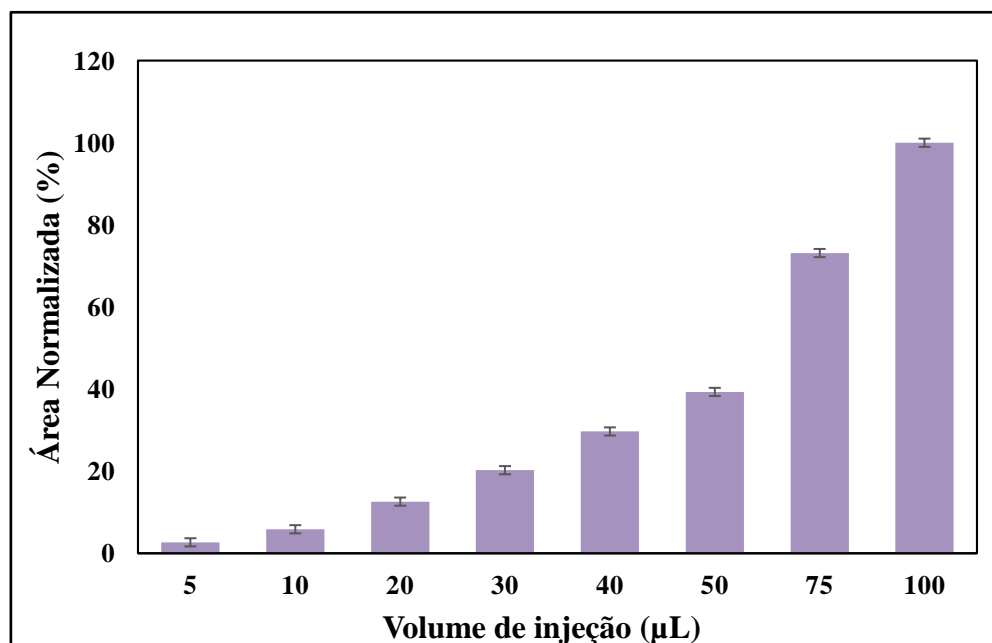


Figura 22 – Relação entre volume de injeção avaliado (µL) e área normalizada do pico (n=3).

Como pode ser observado no gráfico da Figura 22, quanto maior o volume de injeção, maior a área do pico obtida. Esse fator se deve a quantidade de analito que está sendo injetada na coluna, e conseqüentemente proporciona uma faixa maior de recuperação. Entretanto, outro valor que é necessário avaliar nesse caso é o fator de assimetria para o pico da catequina, pois esse pode comprometer a resolução cromatográfica do método. A Tabela 3 mostra a relação da simetria para cada volume de injeção.

Tabela 3 – Fatores de assimetria para cada volume de injeção avaliado (n=3).

Volume de injeção	Fator de assimetria
5 µL	1,61
10 µL	1,45
20 µL	1,21
30 µL	1,28
40 µL	0,93
50 µL	0,84
75 µL	0,99
100 µL	0,87

A literatura aponta que para colunas de HPLC recém montadas, um valor de 0.9 a 1.1 é

aceitável, sendo que valores superiores a este podem trazer problemas na resolução do pico cromatográfico (SANTOS NETO, 2009). Apesar do volume de 75 μL também estar dentro da faixa aceitável, esse volume resulta em uma maior quantidade injetada na coluna, o que não condiz com a ideia da técnica de miniaturizar a quantidade de amostra necessária, além de aumentar a vida útil da coluna extratora, uma vez que se trabalha distante de pontos de saturação da fase. Dessa forma, o volume de 40 μL foi o escolhido para dar continuidade nas análises.

O fluxo de fase móvel foi avaliado em 15, 20, 25, 50 e 75 $\mu\text{L min}^{-1}$. A Figura 23 mostra a comparação dos cromatogramas obtidos.

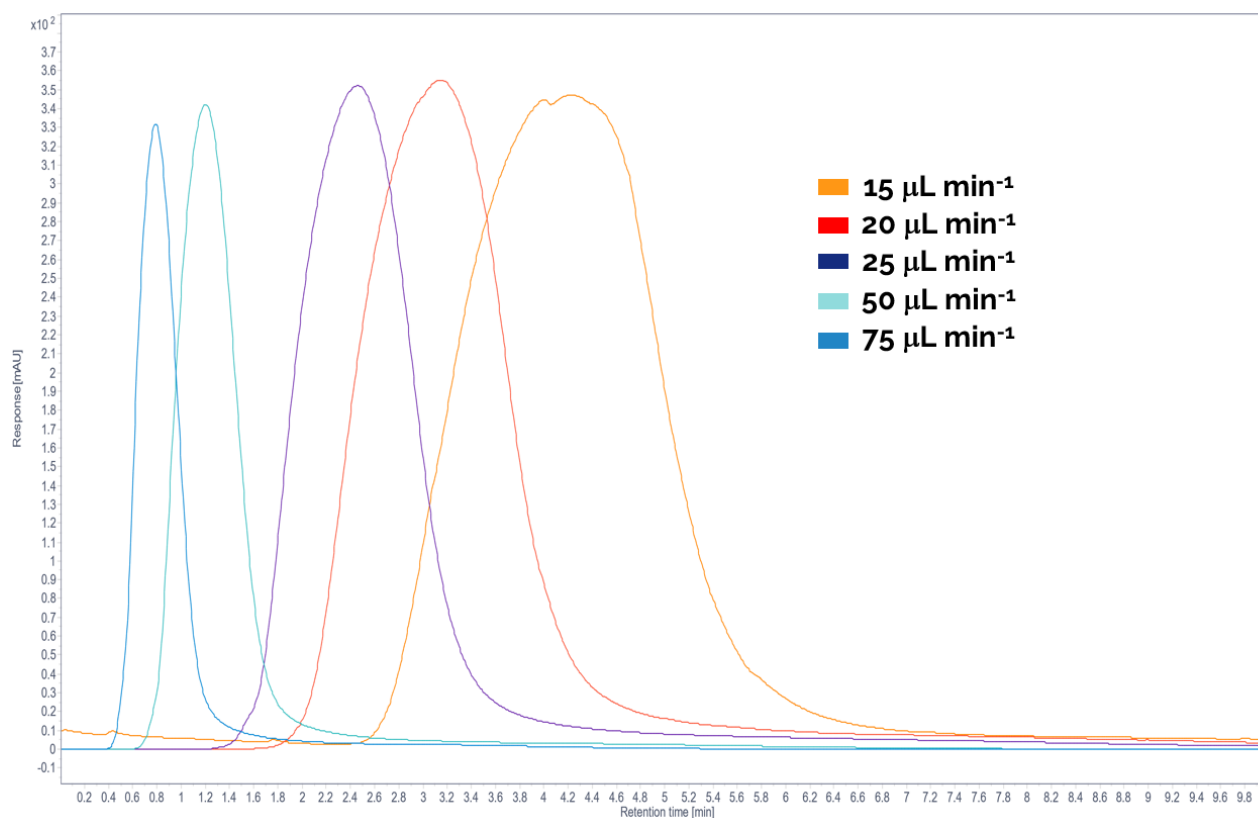


Figura 23 – Cromatogramas obtidos para a solução padrão de catequina a $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ nos fluxos de fase móvel de 15, 20, 25, 50 e 75 $\mu\text{L min}^{-1}$. Condições cromatográficas: fase móvel binária água:ácido fórmico (0,1%) A; acetonitrila:ácido fórmico (0,1%) B, $\lambda = 280$; tempo de corrida: 10 min.; Modo isocrático de 85% de A, e 15% de B; volume de injeção: 40 μL .

Como pode ser observado nos cromatogramas, fluxos de fase móvel muito baixos indicam deformações do pico e comprometem a resolução do mesmo. Por outro lado fluxos altos reduzem sobremaneira o tempo de retenção, propiciando a coeluição com os compostos interferentes da matriz real (extratos de jabuticaba). Contudo, para uma melhor escolha, o fator de assimetria

também foi avaliado, como consta na Tabela 4.

Tabela 4 – Fatores de assimetria para cada fluxo de fase móvel (n=3).

Fluxo de fase móvel	Fator de assimetria
15 $\mu\text{L min}^{-1}$	1,16
20 $\mu\text{L min}^{-1}$	1,09
25 $\mu\text{L min}^{-1}$	1,23
50 $\mu\text{L min}^{-1}$	1,28
75 $\mu\text{L min}^{-1}$	0,92

Como pode ser observado na Tabela 4, o fluxo de 20 μL é o mais adequado dentro da faixa de assimetria aceitável, além de diminuir a geração de resíduos ao longo do processo de extração automatizada.

Nesses fluxos, a pressão das colunas MIP e NIP foram avaliadas e os resultados encontram-se na Figura 24.

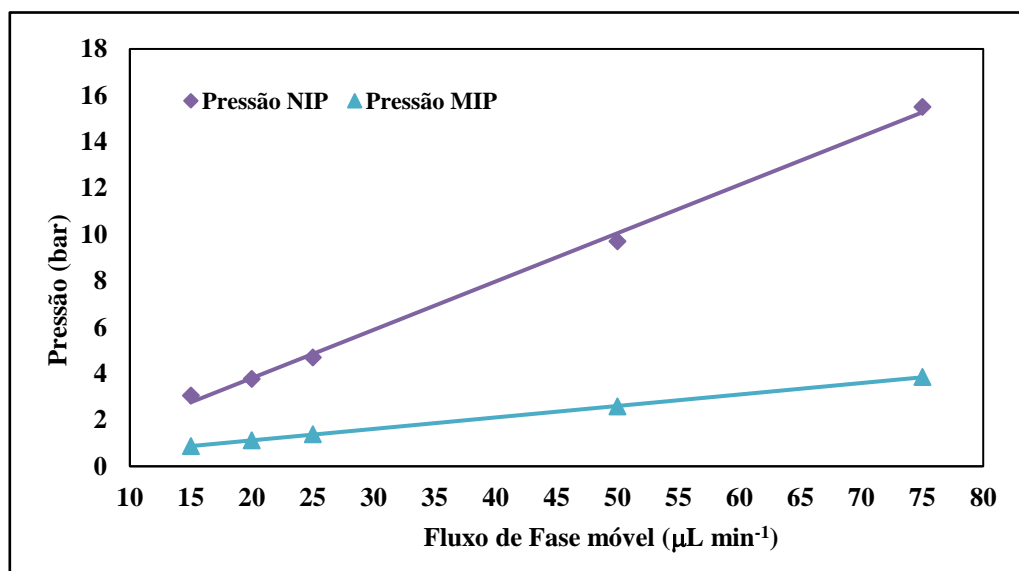


Figura 24 – Relação entre fluxo de fase móvel ($\mu\text{L min}^{-1}$), e pressão MIP e NIP nas colunas extratoras de 0,25 mm.

Como pode ser observado na Figura 24 quando era aumentado o fluxo de fase móvel, a pressão também era maior para ambas as colunas. Quando comparadas, verifica-se a pressão exerce uma maior influência sobre as colunas contendo a fase NIP quando comparada a fase MIP em todos

os fluxos. Isso acontece pois, como visto nas análises de dessorção e adsorção de nitrogênio (Tabela 2), os valores de volume e tamanho de poro para o NIP são menores que a para o MIP, sendo que esse fator pode dificultar a eluição da fase móvel e gerar uma contrapressão maior no interior da coluna. De acordo com Li e colaboradores (2017), uma superfície porosa no polímero facilita a transferência da fase móvel, além de fornecer canais de entrada e saída para as moléculas alvo, permitindo maior exposição aos locais de reconhecimento, facilitando a impressão molecular.

Além disso, o preenchimento manual também pode ter influenciado no entumescimento do material dentro da coluna NIP, gerando uma maior resistência à passagem do solvente. No entanto, apesar dessa diferença os resultados indicaram que as duas colunas exibiram performance adequada no que se refere a resistência de pressão.

4.5. Avaliação das Figuras de Mérito

4.5.1 Seletividade

A seletividade aqui avaliada, está relacionada com a capacidade que o sorvente MIP tem de determinar o analito em relação a fase NIP (que não possui sítios de impressão). Nesse trabalho, a seletividade foi determinada pela comparação das áreas obtidas para os cromatogramas de injeção da solução padrão de catequina ($50 \mu\text{L mL}^{-1}$) na colunas de 0,25 mm preenchidas com MIP e NIP. Os resultados estão apresentados na Figura 25. Os dados foram dispostos em porcentagem de área de pico normalizada em relação à maior resposta obtida.

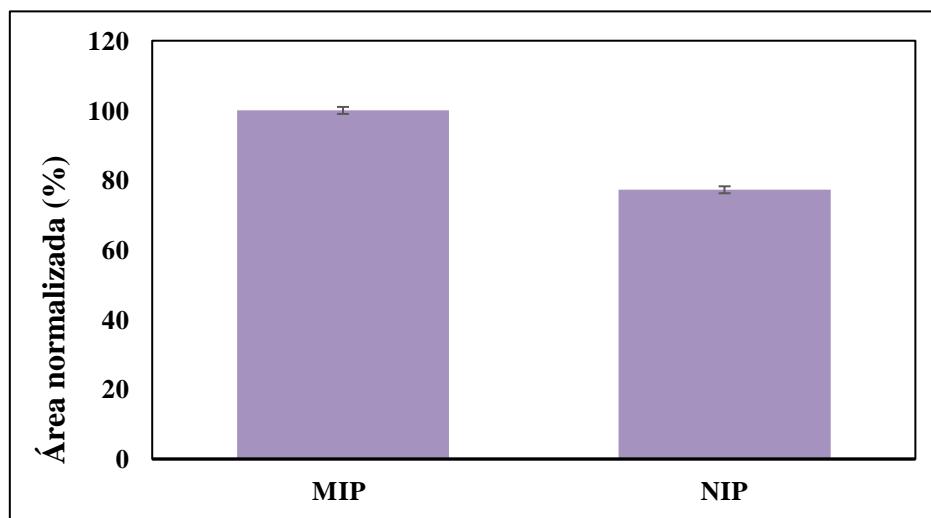


Figura 25 – Seletividade do MIP em comparação com o NIP para a solução padrão de catequina $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($n=3$).

Analisando os resultados na Figura 25, nota-se que o MIP apresentou uma área cerca de 20% maior que a do NIP, mostrando maior seletividade. Resultados compatíveis a esse, foram obtidos no estudo de Martins e colaboradores (2020), que utilizaram o mesmo polímero na extração de catequina pela técnica de SPE *offline*, e a área obtida para o NIP foi cerca apenas 20% da área total obtida para o MIP. Esse resultado já era esperado, visto que o NIP não tem locais de reconhecimento seletivos para que haja interações entre o sorvente e o composto alvo (CHAVES; QUEIROZ, 2013).

4.5.2. Repetibilidade das colunas e fator de pré-concentração

A Repetibilidade é o grau de concordância entre os resultados das análises em triplicatas feitas nas mesmas condições (analista, método, equipamento e outros), nas concentrações: baixa, média e alta do analito em curtos espaços de tempo, e é calculado com base na porcentagem do coeficiente de variação (conforme descrito na seção 3.9). Já o fator de pré concentração é a capacidade que a fase tem que enriquecer o analito de interesse na amostra, para melhora do sinal analítico, e foi calculado neste trabalho pela comparação das áreas das mesmas soluções injetadas no sistema contendo a coluna com fase MIP e no sistema com o tubo peek sem fase extratora. As medidas foram feitas utilizando solução padrão de catequina a $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, e os resultados estão apresentada na Tabela 5.

Tabela 5 – Repetibilidade para as colunas MIP nas concentrações baixa, média e alta expressas em % CV, e fator de pré-concentração para a solução de catequina na solução de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Parâmetro	Concentração		
	$30,0 \mu\text{g mL}^{-1}$	$50,0 \mu\text{g mL}^{-1}$	$100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$
Repetibilidade (CV %)	3,2	7,3	2,6
Fator de pré-concentração (%)	NA*	151,4	NA*

*NA- não avaliado

Os resultados da precisão obtidos para as três colunas MIP avaliadas e representados pelo coeficiente de variação mostraram que, nos três níveis de concentração os valores obtidos foram menores ou iguais a 7,3%, ou seja, se mostraram satisfatórios uma vez que apresentaram baixas variações ficando abaixo de 15%, valor aceito para o nível de concentração de acordo com as agências regulatórias sobre métodos analíticos (BRASIL, 2017). Já o valor de 151,4% para o fator de pré-concentração mostrou que a coluna extratora MIP reteve o analito com eficiência, o que permite obter

uma melhor performance no método de extração para amostras reais, especialmente aquelas em baixas concentrações.

4.5.3. Capacidade de reuso das colunas

Para comprovar a eficiência da extração *online* é necessário saber a capacidade de reuso das colunas. Neste trabalho, foram realizadas cerca de 40 injeções com a solução padrão de catequina $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, e obtido um desvio padrão relativo de 3,83% em termos de variação de área obtida nos cromatogramas. Esse valor, inferior a 20%, indica que a coluna MIP pode ser utilizada 40 vezes sem que haja perda na eficiência da extração do analito. O resultado obtido nessa pesquisa era esperado, uma vez que Martins e colaboradores (2020) fizeram um estudo da capacidade de adsorção para o mesmo MIP sintetizado neste trabalho, e notaram que 50 mg do polímero apresenta saturação com $3000 \mu\text{g mL}^{-1}$ da solução padrão de catequina, apresentando boa capacidade adsorptiva o que aumenta o grau de reutilização para concentrações inferiores.

4.5.4. Efeito de memória (*carryover*)

O efeito de memória está relacionado com a presença de resíduos do analito no sorvente após o procedimento de extração, e pode prejudicar a recuperação do composto em análises posteriores, indicando um falso resultado. Nesse trabalho, o efeito de memória foi avaliado pela comparação dos cromatogramas de injeção da amostra de solução padrão de catequina a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, com a análise sequencial de uma amostra branco, neste caso somente metanol. Os resultados estão apresentados na Figura 26.

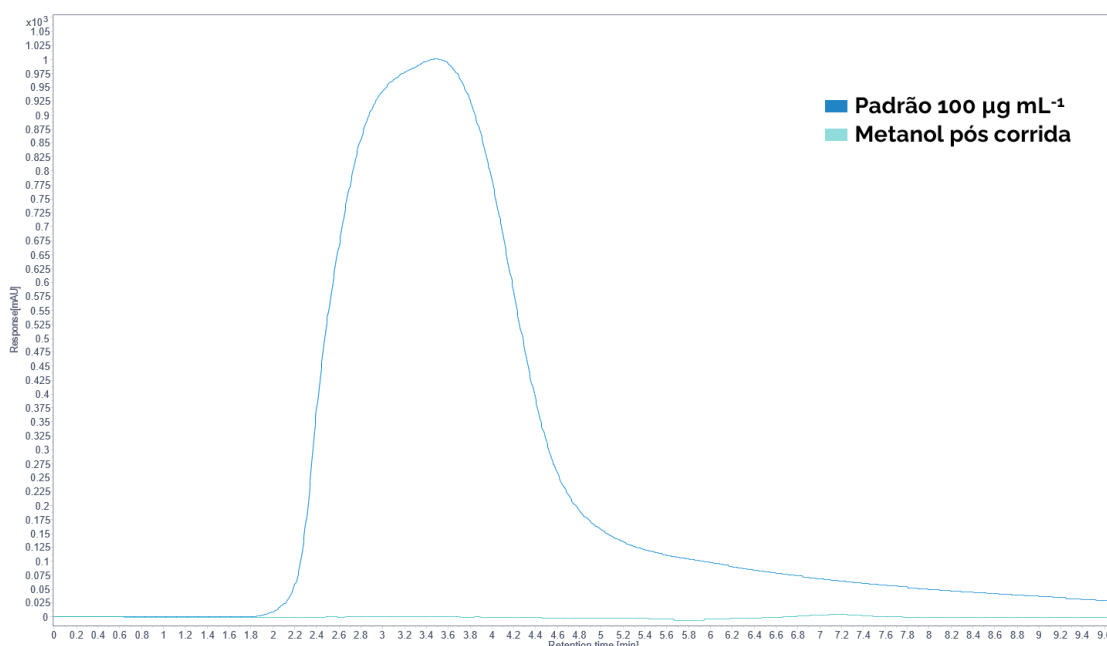


Figura 26 – Cromatogramas obtidos para a solução padrão de catequina a 100 µg mL⁻¹ em comparação com o branco de metanol pós corrida. Condições cromatográficas: fluxo de fase móvel: 20 µL min⁻¹; água:ácido fórmico (0,1%) A; acetonitrila:ácido fórmico (0,1%) B, $\lambda = 280$; tempo de corrida: 10 min.; Modo isocrático de 85% de A, e 15% de B; volume de injeção: 40 µL.

Como apresentado na Figura 26, o cromatograma do solvente não apresentou picos no mesmo tempo de retenção que a molécula de catequina, indicando que a fase extratora não apresenta efeito de memória para o analito que possa prejudicar as demais extrações. Essa informação é coerente com o resultado obtido para a capacidade de reuso das colunas, visto que um total de 40 injeções foram feitas havendo variações relativamente pequenas entre as áreas obtidas.

4.6. Análise em amostras reais de extrato de jaboticaba

As amostras de jaboticaba coletadas na Fazenda Jaboticabal e processadas (condições descritas na seção 3.3), foram submetidas ao sistema de extração *online* desenvolvido e otimizado neste trabalho, nas colunas MIP e NIP para comparar a eficiência de extração entre as colunas.

A fins de fazer a confirmação do pico nos dos tempos de retenção da catequina e da matriz analisada, um padrão de catequina em água:acetonitrila (85:15) na concentração de 1 µg mL⁻¹ foi preparado e injetado juntamente com amostras. A seguir, são apresentados os cromatogramas das análises das soluções extrato pós enriquecimento nas colunas MIP e NIP, seguido da separação em coluna analítica (Figura 27).

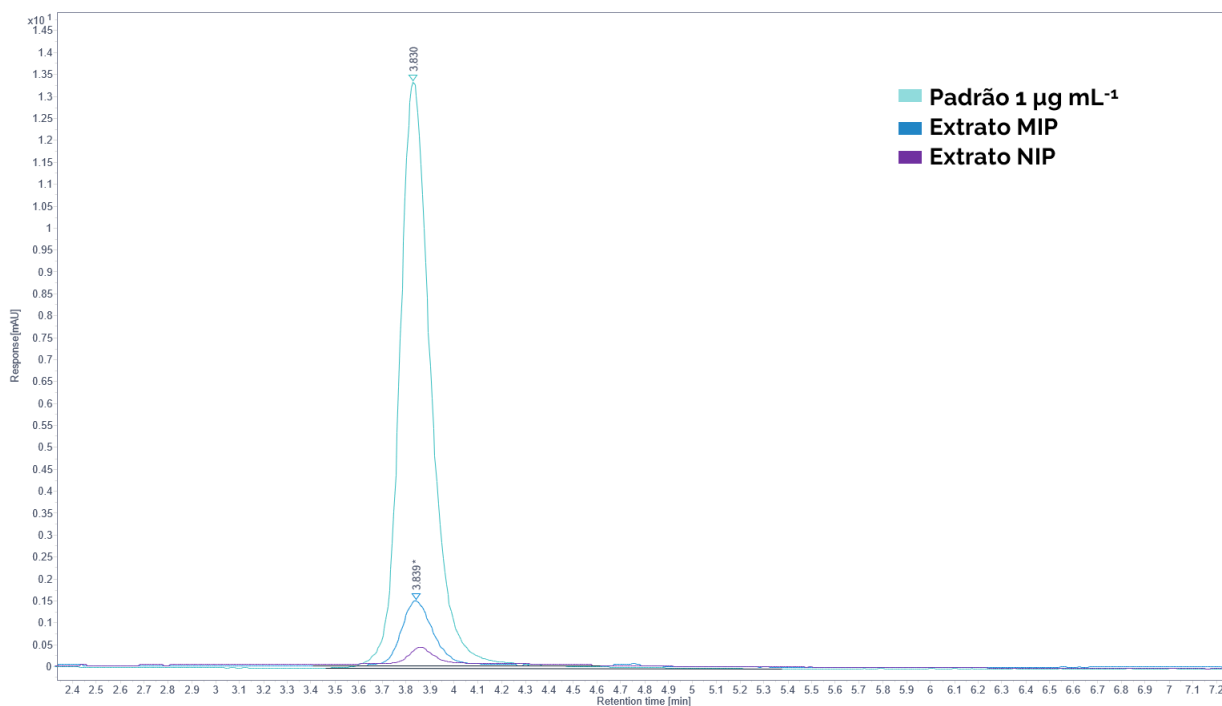


Figura 27 – Cromatogramas obtidos para a solução padrão de catequina a $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ em comparação com os extratos de jaboticaba submetidos a extração pela coluna MIP e pela coluna NIP. Condições cromatográficas: fluxo de fase móvel: $300 \mu\text{L min}^{-1}$; água:ácido fórmico (0,1%) A; acetonitrila:ácido fórmico (0,1%) B, $\lambda = 280$; tempo de corrida: 20 min.; Modo isocrático de 85% de A, e 15% de B; volume de injeção: $10 \mu\text{L}$.

Na Figura 27 é possível observar que o padrão de catequina saiu em aproximadamente 3,8 min, e que os extratos reais extraídos em ambas as colunas também apresentaram mesmo tempo de retenção. Entretanto como mostram os cromatogramas, a partir da coluna MIP, foi possível fazer a concentração da catequina, além de eliminar os interferentes presentes na matriz, sendo estes imperceptíveis nos cromatogramas. O NIP, apesar de eliminar os interferentes não apresentou uma pré-concentração com a mesma eficiência para o analito de interesse, o que é coerente com os resultados obtidos para a seletividade do material. Esses resultados são compatíveis com o estudo de Martins e colaboradores (2020) para as análises dos extratos de umbu, anjico e jaboticaba, em que notaram que apesar do NIP ter uma interação com o analito essa não é tão pronunciada quanto para o MIP, por conta da ausência de sítios seletivos no polímero.

A análise por espectrometria de massas foi realizada afim de verificar e confirmar a identidade da molécula de catequina extraídas nas amostras de casca de jaboticaba. Para tanto, foi utilizado o modo de ionização negativo e foi monitorada massa carga (m/z) de 289,07 tanto para a

solução padrão quanto para as amostras extraídas com o MIP. Os espectros obtidos estão dispostos nas Figuras 28 a 30.

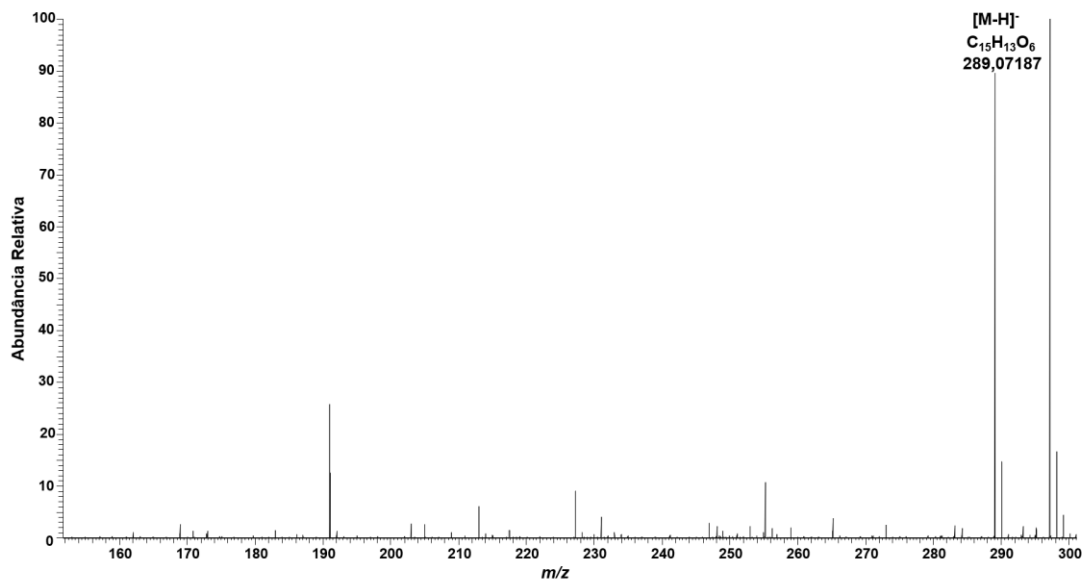


Figura 28 – Espectro de massas ESI (-) Orbitrap-MS do padrão de catequina (1 µg mL⁻¹) de m/z 289,07181. Erro: 0,168 ppm.

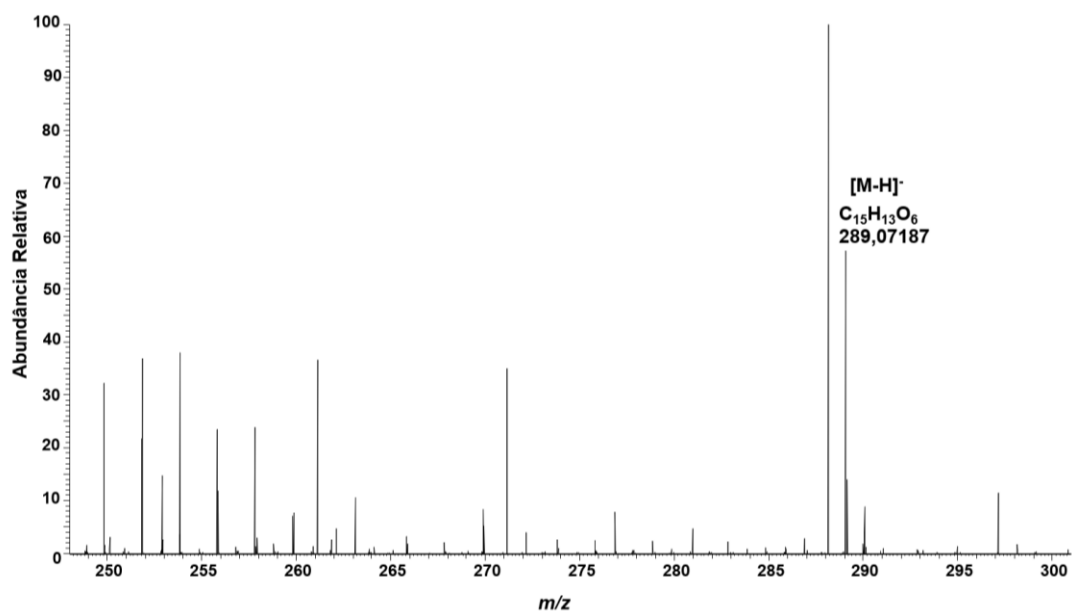


Figura 29 – Espectro de massas ESI (-) Orbitrap-MS da matriz de jabuticaba extraída com a coluna MIP para a catequina de m/z 289,07181.

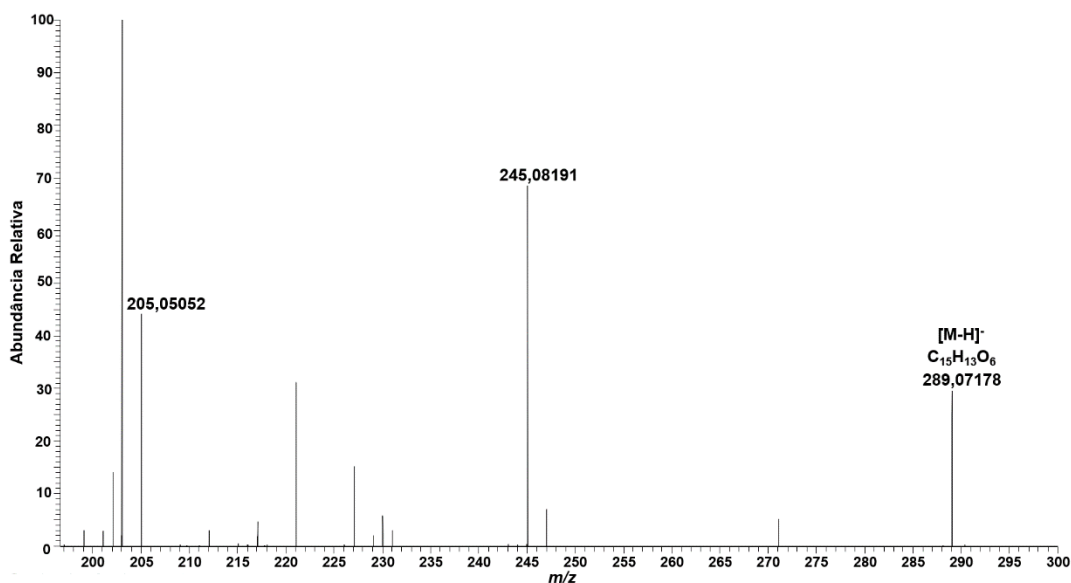


Figura 30 – Espectro de massas ESI (-) Orbitrap-MS/MS da matriz de jaboticaba extraída com a coluna MIP para a catequina de m/z 289,07181. Os íons assinalados correspondem a m/z 205,05052(perda do C₄H₄O₂) e m/z 245,08191 (perda do CO₂).

Como pode ser observado nos espectros acima, o pico de m/z 289,0781, característico da molécula de catequina encontrado no padrão a 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, aparece no extrato da casca da jaboticaba em menor abundância relativa, já o espectro de fragmentação do composto apresenta dois picos característicos do composto, os íons m/z 205 (indicando a perda do C₄H₄O₂), e m/z 245 (indicando a perda do CO₂). Dessa forma, é possível confirmar que o composto ocorrente no mesmo tempo de retenção do padrão na Figura 25, é também a catequina. Martins e colaboradores (2021), encontraram mesmos valores de razão massa/carga nos espectros obtidos para os extratos de açai, referente ao epímero da catequina.

Esse resultado, indica que a fase MIP é altamente seletiva para o tanino condensado investigado, tornando o método de extração *online* desenvolvido neste trabalho eficiente, além de simples, rápido e econômico quando comparado a outros métodos convencionais. Ademais, ele pode ser também investigado para extração de taninos em outros frutos nativos do Brasil que são ricos nesses fenólicos, como o umbu (*Spondias tuberosa*), e guapeva (*Pouteria caimito*) e até o açai (*Euterpe oleracea* Mart).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A investigação de compostos bioativos, como os fenólicos, em frutos nativos do Brasil avança ano após ano, especialmente pelo fato do país ser extremamente rico no que tange a flora de cada bioma. Para o estudo desses compostos, a cromatografia líquida é muito utilizada pela eficiência que essa técnica oferece, na separação de compostos presentes em matrizes complexas.

Contudo, a complexidade da matriz influencia diretamente na performance do método, pois interferentes podem co-eluir com os analitos de interesse. Assim, algumas técnicas de preparo de amostra vêm sendo desenvolvidas para análise de compostos fenólicos, visando promover a extração desses compostos e fazer um *clean-up* da amostra eliminando os interferentes. Com a necessidade de reduzir o consumo de solventes, diminuir a quantidade de amostra necessária, e erros analíticos provenientes do alto manuseamento das amostras, técnicas de extração automatizadas vêm sendo empregadas cada vez mais.

Nesta pesquisa o objetivo foi desenvolver, otimizar, e avaliar um sistema de preparo de amostra automatizado para taninos condensados, utilizando polímeros molecularmente impressos como sorvente extrator em coluna capilar. Para tal finalidade, polímeros molecularmente impressos (MIP) foram sintetizados empregando a molécula de catequina como template e empregados em sistema online de préconcentração e limpeza de amostras. O MIP e o polímero não impresso foram submetidos às análises de caracterização e os dados obtidos mostraram coerência com a literatura, no que se refere a possibilidade de aplicação desses materiais como fase extratora. Quando avaliada a aplicabilidade da coluna preenchida com o MIP, nota-se que esta apresentou bons resultados, para a extração da catequina, principalmente quando comparada ao polímero não impresso.

Os resultados da etapa de otimização da extração online, indicaram que o fluxo de fase móvel de $20 \mu\text{L min}^{-1}$ e volume de injeção de $40 \mu\text{L}$ foram os que apresentaram os melhores resultados em termo de fator de assimetria e resolução de pico, além de manter a eficiência de extração diminuindo a geração de resíduos orgânicos. Já as figuras de mérito avaliadas, mostraram maior seletividade no polímero impresso em relação ao polímero não impresso para a catequina, coeficientes de variação de 2,6 a 7,3% entre as extrações indicando ótima repetibilidade das colunas e fator de pré concentração da fase MIP de 151,4% superior em relação a ausência da fase extratora. Em relação a capacidade de reuso das colunas, um valor de desvio padrão relativo de 3,83% foi encontrado, indicando que as colunas podem ser utilizadas mais de 40 vezes sem perder a eficiência de extração, o que é coerente com o resultado obtido para o efeito de memória, em que o cromatograma

do solvente não apresentou picos no mesmo tempo de retenção para a catequina.

Referente aos resultados de caracterização do extrato de jabuticaba observa-se relevância, quanto a escolha dessa matriz, pois apresenta um teor significativo de procianidinas, bastante investigadas na área medicinal e farmacológica. Além disso, as análises cromatográficas para as amostras reais mostraram eficiência da coluna MIP para extração da catequina e *cleanup* da amostra, eliminando os interferentes e concentrando o analito.

Dessa forma, com o sistema desenvolvido e avaliado nesse estudo foram encontrados resultados compatíveis às metodologias que utilizam técnicas de extração e purificação de amostras convencionais e *offline*, como a SPE, diferenciando-se, por apresentar um menor consumo de reagentes, materiais de preparo, e, menor complexidade no tratamento da amostra. Por fim, conclui-se que esta pesquisa pode vir a ser um piloto para outras investigações em relação aos compostos fenólicos utilizando o sistema de extração desenvolvido nesse trabalho, em vista a discutir a grande margem de propriedades biológicas que esses compostos apresentam.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6 REFERÊNCIAS

- ABDOLLAH, A. N.; AZRILAWANI, A.; OMAR, T. F. T. Synthesis and Characterization of Molecular Imprinted Polymer for the Determination of Carbonate Ion. **Biointerface Research In Applied Chemistry**. v. 11, n. 21, p. 10620 - 10627, 2021.
- ABDOUSS, M.; AZODI-DEILAMI, S.; ASADI, E.; SHARIATINIA, Z. Synthesis of molecularly imprinted polymer as a sorbent for solid phase extraction of citalopram from human serum and urine. *Journal Mater Science: Mater Medicinal*. n. 23, p. 1543–1552, 2012.
- ANDRADE, M. A.; LANÇAS, F. M. Determination of Ochratoxin A in wine by packed in-tube solid phase microextraction followed by high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, n.1493, p. 41–48, 2017.
- ARABI, M. OSTOVAN, A.; GHAEDI, M.; PURKAIT, M. K. Novel strategy for synthesis of magnetic dummy molecularly imprinted nanoparticles based on functionalized silica as an efficient sorbent for the determination of acrylamide in potato chips: Optimization by experimental design methodology. **Talanta**, v. 154, p. 526–532, 2016.
- BATISTA, Â. G.; SOARES, E. S.; MENDONÇA, M. C. P.; da SILVA, J. K.; DIONÍSIO, A. P.; SARTORI, C. R. Jaboticaba berry peel intake prevents insulin-resistance-induced tau phosphorylation in mice. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 61, n. 10, p. 1–10, 2017.
- BELBRUNO, J. J. Molecularly Imprinted Polymers, **Chem. Rev**, v. 119, p. 94-119, 2019.
- BENI, A.; LAJTHA, K.; KOZMA, J.; FEKETE, I.; Application of a Stir Bar Sorptive Extraction sample preparation method with HPLC for soil fungal biomass determination in soils from a detrital manipulation study. **Journal of Microbiological Methods**, v. 136 p. 1–5, 2017.
- BERNARDO, R. A.; SILVA, L. C.; QUEIROZ, M. E. C.; VAZ, B. G.; CHAVES, A. R. Lab-made solid phase microextraction phases for off line extraction and direct mass spectrometry analysis : Evaluating the extraction parameters. **Journal of Chromatography A**, v. 1603, p. 23–32, 2019.
- BITZER, Z. T., GLISAN, S. L., DORENKOTT, M. R., GOODRICH, K. M., YE, L., O'KEEFE, S. F., LAMBERT, J. D., & NEILSON, A. P. Cocoa procyanidins with different degrees of polymerization possess distinct activities in models of colonic inflammation. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 26 n. 8, p. 827–831, 2015.
- BRASIL.Ministério da Saúde. **Resolução da diretoria colegiada - RDC nº 166, de 24 de julho de 2017**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, 2019.
- BOUVAREL, T.; DELAUNAY, N.; PICHON, V. Selective extraction of cocaine from biological samples with a miniaturized monolithic molecularly imprinted polymer and on-line analysis in nano-liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 1096, p. 89-99, 2021.
- CANEVAROLO JÚNIOR, S. V. **Técnicas de caracterização de polímeros**. 3ª ed. São Paulo : Artliber, 3ª ed, 2017.

CHAVES, A. R.; QUEIROZ, M. E. C. In-tube solid-phase microextraction with molecularly imprinted polymer to determine interferon alpha 2a in plasma sample by high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, n. 1318, p. 43-48, 2013.

CRUZ, J. C.; SOUZA, I. D. de.; GRECCO, C. F.; FIGUEIREDO, E. C.; QUEIROZ, M. E. C. Recent advances in column switching high-performance liquid chromatography for bioanalysis. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 21 n.100431, 2021.

de SÁ, L. Z. C. M.; CASTRO, P. F. S.; LINO, F. M. A.; BERNARDES, M. J. C.; VIEGAS, J. C. J.; DINIS, T. C. P. Antioxidant potential and vasodilatory activity of fermented beverages of jaboticaba berry (*Myrciaria jaboticaba*). **Journal of Functional Foods**, v. 8, p. 169–179, 2014.

DINALI, L. A. F.; OLIVEIRA, H. L. de.; TEIXEIRA, L. S.; BORGES, W. DE. S.; BORGES, K. B. Mesoporous molecularly imprinted polymer core@shell hybrid silica nanoparticles as adsorbent in microextraction by packed sorbent for multiresidue determination of pesticides in apple juice. **Food Chemistry**, v. 345 n. 128745, 2021.

FARIA, G. S.; BORGES, F. B.; SILVA, A. C. da.; COSTA, L. L.; REIS, A. D. R. Caracterização química da casca de jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) liofilizada e sua aplicação em leite fermentado potencialmente simbiótico. **Jornal de Ciências Biomédicas e Saúde**, v. 2, n. 1, p. 90–97, 2016.

FERNANDES, L. L.; SILVA, B. B. Alimento funcional: propriedades da jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*). **Revista FAROL**, v. 6, p. 49–60, 2018.

FIDELIS, M.; CARMO, M. A. V. DO.; AZEVEDO, L.; CRUZ, T. M.; MARQUES, M. B.; MYODA, T.; SANT'ANA, A. S.; FURTADO, M. M.; WEN, M.; ZHANG, L.; ROSSO, N. D.; GENOVESE, M. I.; SHAHIDI, F.; GRANATO, D.; Response surface optimization of phenolic compounds from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora* [Mart.] O.Berg) seeds: Antioxidant, antimicrobial, antihyperglycemic, antihypertensive and cytotoxic assessments, **Food and Chemical Toxicology**, v. 142, 2020.

GUO, L.; DENG, Q.; FANG, G.; GAO, W.; SHUO, W. Preparation and evaluation of molecularly imprinted ionic liquids polymer as sorbent for on-line solid-phase extraction of chlorsulfuron in environmental water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 6271– 6277, 2011.

HE, S.; ZHANG, L.; BAI, S.; YANG, H.; CUI, Z.; ZHANG, X.; LI, Y. Advances of molecularly imprinted polymers (MIP) and the application in drug delivery. **European Polymer Journal**, v. 143, 2021.

INADA, K. O. P.; LEITE, I. B.; MARTINS, A. B. N.; FIALHO, E.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; PERRONE, D.; MONTEIRO, M. Jaboticaba berry: A comprehensive review on its polyphenol composition, health effects, metabolism, and the development of food products. **Food Research International**, v. 147, n. 110518, p. 1-39, 2021.

JORDAN-SINISTERRA, M.; LANÇAS, F. M. Microextraction by packed sorbent of selected pesticides in coffee samples employing ionic liquids supported on graphene nanosheets as

extraction phase. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 2021.

KHESINA, B. Z.; IARTSEV, S. D.; REVELSKY, A. D.; BURYAK, A. K. Microextraction by packed sorbent optimized by statistical design of experiment as an approach to increase the sensitivity and selectivity of HPLC-UV determination of parabens in cosmetics. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 195 n.113843, p. 1-8.

KHOLOVÁ, A.; LHOTSKÁ, I.; ERBEN, J.; CHVOJKA, J.; SVEC, F.; SOLICH, P.; ŠATÍNSKÝ, D. Comparison study of nanofibers, composite nano/microfiber materials, molecularly imprinted polymers, and core-shell sorbents used for on-line extraction-liquid chromatography of ochratoxins in Tokaj wines. **Microchemical Journal**, n. 170 v. 106680, 2021.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia Líquida Moderna: HPLC / CLAE. 2ª ed.** Campinas: Átomo, 2016.

LEITE-LEGATTI, A. V.; BATISTA, Â. G.; DRAGANO, N. R. V.; MARQUES, A. C.; MALTA, L. G.; RICCIO, M. F.; EBERLIN, M. N.; MACHADO, A. R. T.; de CARVALHO-SILVA, L. B.; RUIZ, A. L. T. G.; de CARVALHO, J. E.; PASTORE, G. M.; MARÓSTICA, M. R. Jaboticaba peel: Antioxidant compounds, antiproliferative and antimutagenic activities. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 596–603, 2012.

LHOTSKÁ, I.; GAJDOŠOVÁ, B.; SOLICH, P.; ŠATÍNSKÝ, D. Molecularly imprinted vs. reversed-phase extraction for the determination of zearalenone: a method development and critical comparison of sample clean-up efficiency achieved in an on-line coupled SPE chromatography system. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, p. 3265–3273, 2018.

LI, P.; WANG, T.; LEI, F.; PENG, X.; WANG, H.; QIN, L.; JIANG, J. Preparation and evaluation of paclitaxel-imprinted polymers with arosin-based crosslinker as the stationary phase in high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, n. 1502, p. 30–37, 2017.

LIANG, G.; ZHAI, H.; HUANG, L.; TAN, X.; QING, Z.; YU, X.; LIN, H. Synthesis of carbon quantum dots-doped dummy molecularly imprinted polymer monolithic column for selective enrichment and analysis of aflatoxin B₁ in peanut. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 149, p. 258–264, 2018.

LIMA, R. de C. L.; KATO, L.; KONGSTAD, K. T.; STAERK, D. Brazilian insulin plant as a bifunctional food: Dual high-resolution PTP1B and α -glucosidase inhibition profiling combined with HPLC-HRMS-SPE-NMR for identification of antidiabetic compounds in *Myrcia rubella* Cambess. **Journal of Functional Foods**, v. 45, p. 444–451, 2018.

LIU, Q.; WAN, J.; CAO, X. Synthesis of core-shell molecularly imprinted polymers (MIP) for spiramycin I and their application in MIP chromatography. **Process Biochemistry**, n. 70, p. 168–178, 2018.

LOBO, A. C. M.; VELASQUE, L. F. L. Revisão de literatura sobre os efeitos terapêuticos do açaí e sua importância na alimentação. **Biosaúde**, v. 18, n. 2, p. 97–106, 2016.

MACHADO, G. H. A.; MARQUES, T. R. M.; CARVALHO, T. C. L. de.; DUARTE, A. C.; OLIVEIRA, F. C.; GONÇALVES, M. C. G.; PICOLI, R. H.; CORRÊA, A. D.; Antibacterial activity and in vivo wound healing potential of phenolic extracts from jaboticaba skin. **Chemical Biological Drug Design**, n. 92, p.1333–1343, 2018.

MACHADO, L. S.; SOARES, F. Q.; MARTINS, R. O.; BERNARDO, R. A.; CARDOSO, A. T.; RUGGIERO, M. A.; RABELO, D. SOUZA, P. S.; CHAVES, A. R. Polypyrrole monolithic extraction phase: From conventional to miniaturized sample preparation techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 1651 n. 462260, p. 1-10, 2021.

MACIEL, E. V. S.; MEDINA, D. A. V.; BORSATTO, J. V. B; LANÇAS, F. M. Towards a universal automated and miniaturized sample preparation approach. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 21 n. 100427, p. 1-17, 2021.

MACIEL, E. V. S.; TOFFOLI, A. L. de.; LANÇAS, F. M. Current status and future trends on automated multidimensional separation techniques employing sorbent-based extraction columns. **Journal Separation Science**, v. 42, p. 258-272, 2018.

MACIEL, E. V. S.; TOFFOLI, A. L. de.; NETO SOBIESKI, E.; NAZÁRIO, C. E. D.; LANÇAS, F. M. New materials in sample preparation: Recent advances and future trends. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 119, n. 115633, 2019.

MARCHIONI, C.; VIEIRA, T. M.; CROTTI, A. E; M.; CRIPPA, J. A.; QUEIROZ, M. E. C. In-tube solid-phase microextraction with a dummy molecularly imprinted monolithic capillary coupled to ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry to determine cannabinoids in plasma samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 1099, p. 145-154, 2020.

MARTINS, G. R.; GUEDES, D.; PAULA, U. L. M. DE.; M. DO. S. P. DE.; LUTTERBACH, M. T. S.; REZNIK, L. Y.; SÉRVULO, E. F. C.; ALVIANO, C. S.; SILVA, A. J. R. DA.; ALVIANO, D. S. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) Seed Extracts from Different Varieties: A Source of Proanthocyanidins and Eco-Friendly Corrosion Inhibition Activity. **Molecules**, v. 26, n. 3433, p. 1-13, 2021.

MARTINS, R. O.; GOMES, I. C.; TELLES, A. D. M.; KATO, L.; SOUZA, P. S. S.; CHAVES, A. R. Molecularly imprinted polymer as solid phase extraction phase for condensed tannin determination from Brazilian natural sources. **Journal of Chromatography A**, v. 1620, p. 460977, 2020.

MCKITTERICK, N.; BICAK, T. C.; SWITNICKA-PLAK, M. A.; CORMACK, P. A. G.; REUBSAET, L.; HALVORSEN, T. G. On-line duplex molecularly imprinted solid-phase extraction for analysis of low-abundant biomarkers in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, **Journal of Chromatography A**, v. 1655 n. 462490, 2021.

MIDDELEER, G. de.; DUBRUEL, P.; SAEGER, S. de.; Characterization of MIP and MIP functionalized surfaces: current state-of-the-art. **Trends Analytical Chemistry**, n. 76, p. 71–85, 2016.

MORAES, G. de. I.; SILVA, L. M. R. da.; SANTOS-NETO, A. J. dos.; FLORENZANO, F. H.;

FIGUEIREDO, E. C. A new restricted access molecularly imprinted polymer capped with albumin for direct extraction of drugs from biological matrices: the case of chlorpromazine in human plasma. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 405, p. 7687-7696, 2013.

MOURA, M. H. C.; CUNHA, M. G.; ALEZANDRO, M. R.; GENOVESE, M. I. Phenolic-rich jaboticaba (*Plinia jaboticaba* (Vell.) Berg) extracts prevent high-fat-sucrose diet-induced obesity in C57BL/6 mice. **Food Research International**, v.107, p. 48–60, 2018.

NAZARIO, C. E. D.; LANÇAS, F. M. Suportes cromatográficos e fases estacionárias para cromatografia líquida: preparo, evolução e tendências. **Scientia Chromatographica**, v. 5, n. 2, p. 111–135, 2013.

OLIVEIRA, A. R. de.; PEREIRA, C. A. Inhibition of alpha-amylase by “insulin plant” (*Myrcia sphaerocarpa* DC) extracts: An alternative for the treatment of diabetes mellitus? **Journal of Applied Pharmaceutical Science**. v. 5, n. 5, p. 89–93, 2015.

PALACIOS, C. E.; NAGAI, A.; TORRES, P.; RODRIGUES, J. A.; SALTINO, A.; Contents of tannins of cultivars of sorghum cultivated in Brazil, as determined by four quantification methods. **Food Chemistry**, v. 337, n. 127970, p. 1-6, 2021.

PAVIA, D.; LAMPMAN, G.; KRIZ, G.; VYVYAN, J. **Introdução à espectroscopia**. Cengage Learning, 2^a ed, 2015.

PINTO, M. A. L.; SOUZA, I. D. de.; QUEIROZ, M. E. C. Q. Determination of drugs in plasma samples by disposable pipette extraction with C18-BSA phase and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 139, p. 116–124, 2017.

QUATRIN, A.; PAULETTO, R.; MAURER, L. H.; MINUZZI, N.; NICHELLE, S. M.; CARVALHO, M. R.; MAROSTICA JUNIOR.; RODRIGUES, E.; BOCHI, V. C.; EMANUELLI, T. Characterization and quantification of tannins, flavonols, anthocyanins and matrix-bound polyphenols from jaboticaba fruit peel: A comparison between *Myrciaria trunciflora* and *M. jaboticaba*. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 78, p. 59-74, 2019.

QUEIROZ, M. E. C.; ACQUARO JUNIOR, V. R. Cromatografia Líquida no modo Column Switching para Bioanálises. **Scientia Chromatographica**, v. 9, n. 2, p. 73-82.

REIS, A. F.; SCHMIELE, M. Características e potencialidades dos frutos do Cerrado na indústria de alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 22, p. 1–12, 2019.

RODRIGUES S.; FERNANDES, F. A. N.; BRITO, E. S. DE.; SOUSA, A. D.; NARAIN, N. Ultrasound extraction of phenolics and anthocyanins from jaboticaba peel. **Industrial Crops and Products**, n. 69, p. 400-407, 2015.

ROWLEY IV, T. J.; BITNER, B. F.; RAY, J. D.; LATHEN, D. R.; SMITHSON, A. T.; DALLON, B. W.; PLOWMAN, C. J. P.; BIKMAN, B. T.; HANSEN, J. M.; DORENKOTT, M. R.; GOODRICH, K. M.; YE, L. O'KEEFE, S. F.; NEILSON, A. P.; TESSEM J. S.; Monomeric cocoa catechins enhance β -cell function by increasing mitochondrial respiration. **Journal of Nutritional**

Biochemistry, v. 49, p. 30-41, 2017.

SANTOS NETO, A. J. dos. Problemas com o formato dos picos em cromatografia líquida Parte 1. **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 3, 2009.

SANTOS, H.; MARTINS, R. O.; SOARES, D. A.; CHAVES, A. R. C. Molecularly imprinted polymers for miniaturized sample preparation techniques: Strategies for chromatographic and mass spectrometry methods. *Analytical Methods*, v. 12, n. 7, p. 894–911, 2020.

SILVA, K. K. M. S.; BORALLI, V. B.; WISNIEWSKI, V.; FIGUEIREDO, E. C. On-Line Restricted Access Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors Directly from Untreated Human Plasma Samples Followed by HPLC-UV Analysis. **Journal of Analytical Toxicology**, p. 1–8, 2015.

SILVEIRA, J. L.; DIB, S. R.; FARIA, A. M. New support for High Performance Liquid Chromatography Based on Silica Coated with Alumina Particles. **Analytical Sciences**, v. 30, 2014.

SOUZA, I. D.; MELO, L. P.; JARDIM, I. C. S. F.; MONTEIRO, J. C. S.; NAKANO, A. M. S.; QUEIROZ, M. E. C. Selective molecularly imprinted polymer combined with restricted access material for in-tube SPME/UHPLC-MS/MS of parabens in breast milk samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 932, p. 49-59, 2016.

TAVARES, L. S.; BERNARDO, R. A.; OLIVEIRA, A. E. DE.; VAZ, B. G.; CHAVES, A. R. Novel Method for the Extraction of Cocaine from Oral Fluid by Means of Disposable Pipette Modified with Restricted Access Material. **J. Braz. Chem. Soc**, v. 0 n. 0, p. 1-10.

TEIXEIRA, R. A.; DINALI, L. A. F.; de OLIVEIRA, H. L.; da SILVA, A. T. M.; BORGES, K. B. Efficient and selective extraction of azamethiphos and chlorpyrifos residues from mineral water and grape samples using magnetic mesoporous molecularly imprinted polymer. **Food Chemistry**, v. 361, n. 130116, 2021.

TOMAK, E. D.; ARICAN, F.; GONULTAS, O.; PARMAK, E. D. S. Influence of tannin containing coatings on weathering resistance of wood: Water based transparent and opaque coatings. **Polymer Degradation and Stability**, v. 151, p. 152–159, 2018.

TOMAS-BARBERÁN, F. A.; GONZÁLEZ-SARRÍAS, A.; GARCÍA-VILLALBA, R.; NÚÑEZ-SÁNCHEZ, M. A.; SELMA, M. V.; GARCÍA-CONESA, M. T. Urolithins, the rescue of “old” metabolites to understand a “new” concept: Metabotypes as a nexus among phenolic metabolism, microbiota dysbiosis, and host health status. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 61, n.1, 2017.

TORRES-NARANJO, M.; SUÁREZ, A.; GILARDONI.; CARTUCHE, L.; FLORES, P.; MOROCHO, V. Chemical constituents of *Muehlenbeckia tamnifolia* (Kunth) Meisn (Polygonaceae) and Its in Vitro α -amilase and α -glucosidase inhibitory activities. *Molecules*, v. 21, n. 11, 2016.

TROVATI, G.; SANCHES, E. A.; NETO, S. C.; MASCARENHAS, Y. P.; CHIERICE, G. O. Characterization of Polyurethane Resins by FTIR, TGA, and XRD. **Journal of Applied Polymer**

Science, v. 115, p. 263–268, 2010.

VASCONCELOS, I.; SILVA, P. H. R da.; DIAS, D. R. D.; MARQUES, M. B. de F.; MUSSEL, W. da N.; PEDROSA, T. A.; SILVA, M. E. S. R. e.; FREITAS, R. F. de. S. Synthesis and characterization of a molecularly imprinted polymer (MIP) for solid-phase extraction of the antidiabetic gliclazide from human plasma. **Materials Science & Engineering C**. v. 116, n. 111191, p. 1–13, 2020.

WANG, W. H.; TYAN, Y. C.; CHEN, Z. S.; LIN, C. G.; YANG, M. H.; YUAN, S. S. Evaluation of the antioxidant activity and antiproliferative effect of the jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) seed extracts in oral carcinoma cells. **BioMed Research International**, v. 1, p. 1–7, 2014.

WANG, X.; HUANG, P.; MA, X.; DU, X.; LU, X. Enhanced in-out-tube solid-phase microextraction by molecularly imprinted polymers-coated capillary followed by HPLC for Endocrine Disrupting Chemicals analysis. **Talanta**, v. 194, p. 7–13, 2019.

WU, J.; LI, Y.; LI, W.; GONG, Z.; HUANG, X. Preparation of a novel monolith-based adsorbent for solid-phase microextraction of sulfonamides in complex samples prior to HPLCMS/MS analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 1118, p. 9-17, 2020.

XING, Y.; LEI, G.; WU, Q.; JIANG, Y.; HUANG, M. Procyanidin B2 protects against diet-induced obesity and nonalcoholic fatty liver disease via the modulation of the gut microbiota in rabbits. **World J Gastroenterol**, v. 25, n. 8, p. 955-966, 2019.

YANG, H.; TUO, X.; WANG, L.; TUNDIS, R.; PORTILLO, M. P.; SIMAL-GANDARA, J.; YU, Y.; ZOU, L.; XIAO, J.; DENG, J. Bioactive procyanidins from dietary sources: The relationship between bioactivity and polymerization degree. **Trends in Food Science & Technology**, n. 111, p. 114-127, 2021.

ZHAO, S.; ZHANG, L. YANG, C.; LI, Z.; RONG, S. Procyanidins and Alzheimer's Disease. **Molecular Neurobiology**, n. 56, p. 5556–5567, 2019.

ZHENG, C.; HUANG, Y-P.; LIU, Z-S. Recent developments and applications of molecularly imprinted monolithic column for HPLC and CEC. **Journal Separation Science**, n. 34, 2013.