



Universidade Federal de Goiás  
Instituto de Química  
Programa de Pós-Graduação em Química

LUCAS SANTOS MACHADO

**Novas abordagens para determinação de melatonina e  
metabólitos em leite materno e aplicação da  
metabolômica para fins de diferenciação de cultivares de  
alface**

Goiânia

2024

Processo: 23070.043063/2024-16  
Documento: 4819581



**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  Outro\*: \_\_\_\_\_

\*No caso de mestrado/monografia profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estado de caso ou revisão bibliográfica ou outros formatos.

**2. Nome completo do autor**

Lucas Santos Machado

**3. Título do trabalho**

Novas abordagens para determinação de melatonina e metabolitos em leite materno e aplicação da metabolômica para fins de diferenciação de cultivares de alfafa

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

Concorda com a liberação total do documento  SIM  NÃO\*

[\*] 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 de 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 de dissertação/tese em livro.

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



Documento assinado eletronicamente por Andrea Rodrigues Chaves, Professora do Magistério Superior, em 12/09/2024, às 15:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.563, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Lucas Santos Machado, Discente, em 13/09/2024, às 10:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.563, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufg.br/sei/orientador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_documento=0](https://sei.ufg.br/sei/orientador_externo.php?acao=documento_conferir&id_documento=0) informando o código verificador 4819581 e o código CRC 8DD9BDC8.

LUCAS SANTOS MACHADO

**Novas abordagens para determinação de melatonina e metabólitos em leite materno e aplicação da metabolômica para fins de diferenciação de cultivares de alface**

Tese a ser 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 Doutor em Química.

Área de concentração: Química

Orientadora: Dra. Andréa Rodrigues Chaves

Co-Orientadora: Dra. Jussara Valente Roque

Goiânia

2024

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

Machado, Lucas Santos

Novas abordagens para determinação de melatonina e metabólitos em leite materno e aplicação da metabolômica para fins de diferenciação de cultivares de alface [manuscrito] / Lucas Santos Machado. - 2024. CXIX, 119 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Andréa Rodrigues Chaves; co-orientadora Dra. Jussara Valente Roque.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química (IQ), Programa de Pós-Graduação em Química, Goiânia, 2024.

Bibliografia.

Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. extração sortiva em ponteira de micropipeta. 2. polímero de impressão molecular. 3. técnicas de ionização ambiente. 4. quimiometria. 5. química analítica verde.. I. Chaves, Andréa Rodrigues, orient. II. Título.

CDU 54



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE QUÍMICA

ATA DE DEFESA DE TESE

Ata Nº 187-A da sessão de Defesa de Tese de Lucas Santos Machado que confere o título de Doutor em Química, na área de concentração em Química.

Aos onze dias do mês de setembro de dois mil e vinte e quatro, a partir das 08h:00m, por Videoconferência, realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese intitulada "*Novas abordagens para determinação de melatonina e metabólitos em leite materno e aplicação da metabolômica para fins de diferenciação de cultivares de alface*". Os trabalhos foram instalados pela Orientadora, Professora Doutora **Andréa Rodrigues Chaves** (IQ – UFG) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professora Doutora **Carla Beatriz Grespan Bottoli** (IQ – Unicamp), Professor Doutor **Bruno José Gonçalves da Silva** (IQ – Universidade Federal do Paraná), Professor Doutor **Anízio Márcio de Faria** (UFU – Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal), Professora Doutora **Lívia Flório Sgobbi** (IQ – UFG), Coorientadora Doutora **Jussara Valente Roque**. Durante a arguição, os membros da banca não fizeram sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Tese, tendo sido o candidato **aprovado** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo Professora Doutora **Andréa 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 onze dias do mês de setembro de dois mil e vinte e quatro.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Bruno José Gonçalves da Silva**, Usuário Externo, em 27/09/2024, às 16:03, 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 **Jussara Valente Roque**, Usuário Externo, em 30/09/2024, às 06:58, 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 30/09/2024, às 10:02, 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**, Professora do Magistério Superior, em 01/10/2024, às 14:34, 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 **Livia Florio Sgobbi, Professor do Magistério Superior**, em 02/10/2024, às 09:20, 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 **Carla Bottoli registrado(a) civilmente como Carla Beatriz Grespan Bottoli, Usuário Externo**, em 06/10/2024, às 22:20, 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](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **4860956** e o código CRC **4DE0F90C**.

Referência: Processo nº 23070.043063/2024-16

SEI nº 4860956

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer primeiramente aos meus pais, Marcelo e Custodia, e a minha irmã Isadora, por todo apoio nessa trajetória. Sei dos esforços que todos vocês fizeram para que eu chegasse aonde estou e sou extremamente grato a isso.

A minha esposa Lorrany, por todo apoio, carinho, compreensão e conselhos que me deu, apesar de nem sempre os seguir sei que você quer o meu melhor. Chegar em casa e te vê faz aqueles dias que estavam péssimos, ser bem mais fáceis.

A todos meus familiares, não irei citá-los pois a família é grande e a chance de esquecer alguém é maior ainda, muito obrigado pelo carinho de cada um de vocês.

A minha orientadora, Andrea Rodrigues Chaves, por todos esses anos de ensinamento, me acompanhando desde o mestrado. Sei que grande parte do profissional que me tornei teve influência sua, com seus conselhos, conversas e até mesmo paciência porque sei que as vezes sou meio cabeça dura.

A minha co-orientadora, Jussara Valente Roque, que topou esse desafio de me coorientar e me ensinar um pouco de quimiometria e estatística, o que infelizmente não é uma tarefa fácil.

A professora Dra. Flaviana Vely Mendonca Vieira, pela parceria e colaboração, e as suas alunas Jessica e Flavia com que tive mais contato na realização desse trabalho.

Ao professor Dr. Flavio Flávio Olímpio Sanches Neto, pela parceria e colaboração para determinar qual o polímero apresentou melhor interação com a melatonina.

A Naiara Raica Lopes de Oliveira, que me acompanho nas análises de HPLC-MS realizadas na faculdade de farmácia da UFG.

A toda a equipe do LaCEM, por todos esses anos de convívio e ensinamentos, daqui levaria amigos que sei que estarão presentes em diferentes momentos da minha vida.

A todos os meus amigos, pelo apoio nessa trajetória e por todas as vezes em que fomos tomar uma gelada, pois meus experimentos estavam dando errado, o que infelizmente não foram poucas as vezes.

À Capes e CNPq, pelo apoio financeiro e ao programa de pós-graduação em Química do IQ-UFG.

# Sumário

LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE TABELAS .....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS, CÓDIGOS, SIGLAS E UNIDADE DE MEDIDA .....	xiii
RESUMO .....	xv
ABSTRACT.....	xvi
INTRODUÇÃO .....	1
<b>CAPÍTULO 1: Síntese de um novo MIP e desenvolvimento do método DPX-MIP/LC-MS para determinação de melatonina e seus metabólitos em leite materno .....</b>	<b>4</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>5</b>
1.1. Extração sortiva em ponteira descartável (DPX) .....	5
1.2. Polímero de Impressão Molecular (MIP) .....	8
1.3. Melatonina .....	10
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>14</b>
2.1. Objetivos específicos .....	14
<b>3. METODOLOGIA .....</b>	<b>14</b>
3.1. Materiais, reagentes e padrões .....	14
3.2. Coleta do leite materno .....	14
3.3. Síntese MIP .....	15
3.4. Caracterização físico-química dos MIPs .....	16
3.5. Condições Cromatográficas .....	17
3.6. Estudo Computacional .....	17
3.7. Cálculo do fator de impressão molecular .....	18
3.8. Cálculo da capacidade de adsorção e efeito cinético do MIP .....	19
3.9. Otimização dos parâmetros de extração DPX-MIP para melatonina e seus metabólitos em leite materno .....	20
3.9.1. Otimizações univariadas .....	20
3.9.2. Otimização multivariada .....	20
3.10. Parâmetros analíticos .....	21
3.11. Comparação entre os resultados obtidos para o teste imunoenzimático (ELISA) e o DPX-MIP/LC-MS .....	22
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>23</b>
4.1. Caracterização dos MIPs .....	23
4.2. Análise cromatográfica .....	28
4.3. Seleção dos MIPs para extração de melatonina e seus metabólitos .....	30
4.4. Análise topológica da interação entre a melatonina e o 1-vinilimidazol .....	32

4.5.	Caracterização do NIP e teste de seletividade para a melatonina e seus metabólitos.....	34
4.6.	Fator de impressão molecular .....	36
4.7.	Efeito cinético do MIP .....	37
4.8.	Adsorção do MIP.....	40
4.9.	Otimização nas condições de extração DPX de melatonina e seus metabólitos em leite materno.....	43
4.9.1.	Otimizações univariadas.....	43
4.9.2.	Otimização multivariada.....	47
4.10.	Parâmetros analíticos.....	50
4.11.	Métrica Verde .....	55
4.12.	Análise das amostras de leite materno .....	56
5.	CONCLUSÃO .....	58
	<b>CAPÍTULO 2: Avaliação do perfil metabólico de cultivares de alface por PSI-MS e aplicação para diferenciação segundo o tipo de cultivo e espécie .....</b>	<b>60</b>
1.	INTRODUÇÃO .....	61
1.1.	<i>Paper-spray ionization</i> (PSI) .....	62
1.2.	Metabolômica e alface .....	64
1.3.	Métodos quimiométricos.....	66
2.	OBJETIVO .....	67
2.1.	Objetivo específicos .....	67
3.	METODOLOGIA .....	68
3.1.	Materiais, reagentes e padrões.....	68
3.2.	Obtenção das amostras de alface .....	68
3.3.	Extração das amostras de alface.....	68
3.4.	Condições do espectrômetro de massas.....	69
3.5.	Análises quimiométricas.....	69
3.6.	Identificação dos metabólitos.....	70
4.1.	Comparação entre ESI-MS e PSI-MS .....	71
4.2.	Comparação das amostras cultivadas em solo e por hidroponia por PSI-MS .....	72
4.3.	Comparação das amostras de alface de acordo com sua variedade (Americana, Crespa e Mimosa) .....	73
4.4.	Diferenciação quimiométrica e identificação dos compostos.....	74
4.5.	Métrica Verde .....	85
5.	CONCLUSÃO .....	87
	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS DA TESE .....</b>	<b>88</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>89</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ponteiras utilizadas para extração DPX.....	5
<b>Figura 2.</b> Representação das etapas envolvidas no processo de extração DPX....	6
<b>Figura 3.</b> Esquema representando o mecanismo de síntese e reconhecimento de MIPs.....	8
<b>Figura 4.</b> Números de publicações envolvendo MIP e DPX entre 2010 e 2024. ..	10
<b>Figura 5.</b> Representação estrutural da N-acetil-5-metoxitriptamina (melatonina). ..	11
<b>Figura 6.</b> Representação estrutural do N-acetil-N-formil-5-metoxiquinuramina (AFMK) e o N-acetil-5-metoxiquinuramina (AMK) .....	11
<b>Figura 7.</b> Esquema representando a síntese do MIP .....	16
<b>Figura 8.</b> Representação da estrutura química dos monômeros funcionais 1-Vn, 4-Vp, AM, HEMA e do agente reticulante EGDMA.....	24
<b>Figura 9.</b> Espectros FTIR para os MIPs sintetizados utilizando 4-Vp, 1-Vn, AM e HEMA como monômeros funcionais.....	25
<b>Figura 10.</b> Curvas de análise termogravimétricas dos MIPs 1-Vn, HEMA, AM e 4-Vp .....	26
<b>Figura 11.</b> Micrografias com amplitude de 1000x para os MIPs empregando os monômeros. A) 1-Vn; b) 4-Vp; c) AM; d) HEMA.....	27
<b>Figura 12.</b> Área para a melatonina e seus metabólitos na concentração de 500 ng mL, utilizando diferentes modificadores de fase móvel (5 mM formiato de amônio, 0,1% de ácido fórmico e 5 mM acetato de sódio).....	29
<b>Figura 13.</b> Cromatogramas de MRM para a melatonina e seus metabólitos (AFMK e AMK) com seus respectivos tempos de retenção .....	29
<b>Figura 14.</b> Gráfico de barras para a recuperação relativa de melatonina e seus metabólitos (AFMK e AMK) para os MIPs AM, 1-Vn, 4-Vp e HEMA.....	31
<b>Figura 15.</b> Gráfico de barras indicando a área de resíduo do <i>template</i> (melatonina) após etapa de limpeza para os MIPs sintetizados empregando os monômeros: AM, 1-Vn, 4-Vp e HEMA.....	32
<b>Figura 16.</b> Conformação do complexo formado entre a melatonina e o 1-vinilimidazol .....	33
<b>Figura 17.</b> Resultados de caracterização do NIP e MIP de 1-Vn; a) Espectros FTIR do MIP e NIP; b) Termogramas NIP e MIP; c) Micrografias MIP e NIP com amplitude de 1000x.....	35
<b>Figura 18.</b> Gráfico de barras indicando os valores de recuperação relativa para a extração DPX de melatonina e seus metabólitos em leite materno empregando MIP ou NIP como fase extratora. ....	36
<b>Figura 19.</b> Gráfico da capacidade de adsorção (Q) de melatonina em função do tempo (min) para o MIP e o NIP .....	38
<b>Figura 20.</b> Gráfico para os modelos cinéticos do MIP e NIP.a) gráfico da função de pseudo 1º ordem; b) gráfico da função de pseudo 2º ordem.....	39
<b>Figura 21.</b> Gráfico da capacidade de adsorção do MIP e NIP (Q) em função da concentração de melatonina em mg.mL <sup>-1</sup> . ....	40
<b>Figura 22.</b> Gráfico de adsorção ajustado de acordo com o modelo de Freundlich para a) MIP e o b) NIP. ....	41
<b>Figura 23.</b> Gráfico de adsorção ajustado de acordo com o modelo de Langmuir para a) MIP e o b) NIP. ....	42
<b>Figura 24.</b> Gráfico de barras indicando os valores de recuperação relativa para a otimização do preparo prévio do leite para extração DPX, para os parâmetros sem preparo	

prévio (spp), diluído em água (proporção 1:1), centrifugado a 10000 rpm (10 min) e diluído 1:1 em metanol. Além, dos valores de p do teste ANOVA. ....	44
<b>Figura 25.</b> Gráfico de barras das recuperações relativas para as extrações DPX de melatonina em leite materno utilizando diferentes granulometria de MIPs ( inferior à 0,15 mm (< 0,15 mm), 0,15 mm, 0,3 mm e sem peneirar (SP)). ....	45
<b>Figura 26.</b> Gráfico de barras dos valores de recuperação relativa para extração DPX de melatonina em leite materno. a) quanto a realização ou não da etapa de condicionamento; b) quanto a realização ou não da etapa de limpeza. ....	46
<b>Figura 27.</b> Gráfico de barras das recuperações relativas para a extração DPX de melatonina em leite materno utilizando diferentes solventes de eluição, metanol, acetonitrila, etanol, acetona, acetato de etila e clorofórmio. ....	47
<b>Figura 28.</b> Gráfico do perfil de desejabilidade para as variáveis ciclo de adsorção, ciclo de dessorção, volume de solvente, tempo de equilíbrio e pH. ....	48
<b>Figura 29.</b> Gráfico de superfície do planejamento CCD, em que foi avaliado o número de ciclos de adsorção, tempo de equilíbrio (s) e o pH da amostra, para extração DPX de melatonina e seus metabólitos ....	49
<b>Figura 30.</b> Esquema representando o processo de extração DPX-MIP para a melatonina e seus metabólitos, após as otimizações. ....	50
<b>Figura 31.</b> Curva analítica para a) melatonina, b) AFMK e c) AMK. ....	51
<b>Figura 32.</b> Curvas para avaliação do efeito matriz para a) melatonina, b) AFMK e c) AMK. ....	52
<b>Figura 33.</b> Comparação entre as metodologias de extração para determinação da melatonina e metabólitos em leite materno utilizando o AGREEprep, a) DPX-MIP do autor e b) SPE de Karunanithi e colaboradores ....	56
<b>Figura 34.</b> Gráfico boxplot, para as concentrações de melatonina e seus metabólitos nas amostras de leite materno. ....	57
<b>Figura 35.</b> Gráfico boxplot, comparando a concentração de melatonina para as análises realizadas por ELISA e a por DPX-MIP/LC-MS (do autor). ....	58
<b>Figura 36.</b> Representação esquemática da técnica de PSI-MS operando em modo positivo ou negativo, gerando íons $[M+H]^+$ ou $[M-H]^-$ . ....	62
<b>Figura 37.</b> Gráfico de pizza, presentando o número de publicações referentes a estudos envolvendo metabólômica, metabolômica e PSI, e PSI. ....	64
<b>Figura 38.</b> Média dos espectros de todas as amostras de alface obtidas no modo positivo e negativo de ionização; ....	72
<b>Figura 39.</b> Média dos espectros de massas obtido para as amostras cultivadas em solo e por hidroponia (Hidro) no modo de ionização, a) positivo e b) negativo. ....	73
<b>Figura 40.</b> Média dos espectros de massas obtidos para as amostras de alface de acordo com sua variedade (Crespa (Cre), Americana (Ame) e Mimosa (Mim)), no modo de ionização a) positivo e b) negativo ....	74
<b>Figura 41.</b> Gráfico de <i>loadings</i> obtidos pelo modelo PARAFAC, para as análises PSI-MS das amostras de alface no modo positivo de ionização, em que a) representa a separação da alface americana frente as demais; b) a separação da alface crespa em relação as outras; c) a separação da alface mimosa em comparação as outras; d) representa a separação entre hidropônica e solo dentro da variedade de alface americana; e) a separação entre o modo de cultivo dentro da variedade crespa; e f) a separação entre o modo de cultivo dentro da variedade mimosa. ....	75
<b>Figura 42.</b> Gráfico de <i>loadings</i> obtidos pelo modelo PARAFAC, para as análises PSI-MS das amostras de alface no modo negativo de ionização, em que a) representa a separação das amostras de alface conforme o cultivo; e b) a separação das amostras de alface conforme a sua variedade ....	76

<b>Figura 43.</b> a) Superfície de resposta dos espectros de massas ao longo do tempo de aquisição das amostras para ionização no modo positivo; b) a e) perfil de <i>loading</i> dos 4 componentes identificados no PARAFAC, para o tempo de aquisição em função da <i>m/z</i> , para as aquisições no modo positivo. ....	77
<b>Figura 44.</b> Superfície de resposta dos espectros de massas ao longo do tempo de aquisição das amostras para ionização no modo negativo; b) a c) perfil de <i>loading</i> dos 2 componentes identificados no PARAFAC, para o tempo de aquisição em função da <i>m/z</i> , para as aquisições no modo negativo. ....	78
<b>Figura 45.</b> Classificação das amostras pelo método PLS-DA com as variáveis selecionadas pelo OPSDA para a predição das amostras de acordo com o seu método de cultivo (hidropônica e solo), para o modo de ionização a) positivo e b) negativo .....	79
<b>Figura 46.</b> Classificação das amostras pelo método PLS-DA com as variáveis selecionadas pelo OPSDA para a predição das amostras de acordo com a sua variedade, para os modos de ionização positivo ((a) a (c)) e para os modos de ionizações negativos ((d) a (f)) .....	80
<b>Figura 47.</b> Diagrama de Venn para o número de variáveis selecionadas para a classificação das amostras de alface de acordo com o seu método de cultivo para os modos de ionização a) positivo e b) negativo .....	81
<b>Figura 48.</b> Diagrama de Venn para o número de variáveis selecionadas para a classificação das amostras de alface de acordo com a sua variedade para os modos de ionização a) positivo e b) negativo .....	81
<b>Figura 49.</b> Pontuações VIP das 20 variáveis que foram mais importantes para a classificação das amostras, a) separação de acordo com seu método de cultivo, no modo positivo; b) separação de acordo com seu método de cultivo, no modo negativo; c) separação de acordo com sua variedade, modo positivo; e d) separação de acordo com a variedade, modo negativo .....	82
<b>Figura 50.</b> Comparação entre as metodologias empregadas em estudos metabolômicos aplicando o AGREE, a) PSI-MS do autor e b) LC-MS de Garcia e colaboradores .....	87

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Estudos relacionados à concentração de melatonina no leite materno e suas respectivas influências. ....	12
<b>Tabela 2.</b> Condições de SRM para as análises de melatonina e seus metabólitos .....	17
<b>Tabela 3.</b> Parâmetros, variáveis e níveis utilizados no planejamento fatorial $2^{5-1}$ . 21	
<b>Tabela 4.</b> Área superficial, volume e diâmetro de poros para os MIPs 1-Vn, HEMA, AM e 4-Vp.....	27
<b>Tabela 5.</b> Energia de interação ( $\Delta E$ ) entre os monômeros funcionais (1-Vn, HEMA, AM e 4-Vp) e o <i>template</i> (melatonina). ....	30
<b>Tabela 6.</b> Valores de densidade eletrônica total ( $\rho(r)$ ), densidade eletrônica Laplaciana ( $\nabla^2\rho(r)$ ), densidade de energia eletrônica ( $H(r)$ ) e a densidade de energia potencial eletrônica ( $V(r)$ ), para as principais interações envolvidas no complexo formado entre a melatonina e 1-Vn e a intensidade dessas interações. ....	34
<b>Tabela 7.</b> Área superficial, volume e diâmetro de poros para o NIP e o MIP.....	36
<b>Tabela 8.</b> Valores de coeficiente de distribuição ( $K_d$ ) e fator de remoção (%R) para o MIP e NIP, e o valor do fator de impressão (FI). ....	37
<b>Tabela 9.</b> Parâmetros obtidos nos ajustes pelos modelos de Freundlich e de Langmuir.....	43
<b>Tabela 10.</b> Valores de recuperação (REC) (%), desvio padrão relativo (DPR) (%), para as análises realizadas em níveis baixo ( $10 \text{ pg.mL}^{-1}$ ), médio ( $50 \text{ pg.mL}^{-1}$ ) e alto ( $100 \text{ pg.mL}^{-1}$ ) em 3 dias distintos, além dos valores de limite de quantificação (LOQ) e de detecção (LOD), para a melatonina, o AFMK e o AMK. ....	53
<b>Tabela 11.</b> Comparação entre diferentes metodologias para determinação de melatonina (Mel.) e metabólitos. ....	54
<b>Tabela 12.</b> Número de amostras de alface utilizadas no estudo, conforme seu modo de cultivo e variedade .....	68
<b>Tabela 13.</b> Notação dos metabólitos que influenciaram na separação das amostras de alface de acordo com seu método de cultivo e variedade, para o modo de ionização positivo e negativo. ....	83

## LISTA DE ABREVIATURAS, CÓDIGOS, SIGLAS E UNIDADE DE MEDIDA

%R	Remoção percentual
$\Delta E$	Energia de interação
$\nabla^2\rho(r)$	Densidade eletrônica Laplaciana
$\sum E_{\text{monômero}}$	Soma da energia total dos monômeros
$\mu\text{L}$	Microlitros
1/n	Constante de heterogeneidade da superfície
1-Vn	1-vinilimidazol
4-Vp	4-Vinilpiridina
Å	Angstrom
AFMK	N-acetil-N-formil-5-metoxiquinuramina
AIBN	Azobisisobutironitrila
AIMS	<i>Ambient Ionization Mass Spectrometry</i>
AM	Ácido metacrílico
AMK	N-acetil-5-metoxiquinuramina
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência de Vigilância Sanitária
BET	Brunauer-Emmett-Teller
BJH	Barrett-Joyner-Halenda
CCD	<i>Central composite design</i>
cm	Centímetros
Comp	Componente
Da	Dalton
DESI	<i>Desorption Electrospray Ionization</i>
DPR	Desvio padrão relativo
DPX	<i>Disposable Pipette Extraction</i>
DSPE	<i>Dispersive Solid Phase Extraction</i>
EC	Energia de Colisão
$E_{\text{complexo}}$	Energia total do complexo formado entre o monômero e template
EGDMA	Dimetacrilato de etilenoglicol
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ESI+	Eletrospray no modo positivo
$E_{\text{template}}$	Energia total do template
FI	Fator de impressão
FTIR	Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier
g	Gramas
GNPS	<i>Global Natural Products Social Molecular Networking</i>
h	Horas
H(r)	Densidade de energia eletrônica
HCD	<i>Higher-energy Collisional Dissociation</i>
HEMA	2-hidroxietil metacrilato
HMDB	<i>Human Metabolome Database</i>
K1	Constante de pseudo 1ª ordem
K2	Constante da pseudo 2ª ordem
Kd	Coeficiente de distribuição
Kf	Constante da capacidade de adsorção de Freundlich
kJ	Quilojoule
KI	Constante de Langmuir
L	Litro

LC-MS	<i>Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry</i>
LD	Limite de detecção
LLE	<i>Liquid – Liquid Extraction</i>
LQ	Limite de quantificação
LV	<i>Latent Variable</i>
<i>m/z</i>	Razão entre a massa e a carga
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mg	Miligramas
min	Minutos
MIP	<i>Molecularly Imprinted Polymer</i>
mL	Mililitros
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
NIP	<i>Non-Imprinted Polymer</i>
nm	Nanômetros
°C	Grau Celsius
OPSDA	<i>Ordered Predictor Selection for Discrimination Analysis</i>
PARAFC	<i>Parallel Factor Analysis</i>
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PD	Potencial de Desagregação
PE	Potencial de Entrada
pg	Picograma
PI	Padrão interno
PLS-DA	<i>Partial Least Squares Discriminant Analysis</i>
PSCC	Potencial de Saída da Célula de Colisão
PSI	<i>Paper Spray Ionization</i>
PSI	<i>Paper-Spray Ionization</i>
psi	<i>Pound-Force per Square Inch</i>
Q	Capacidade de adsorção
Q <sub>e</sub>	Capacidade de adsorção no equilíbrio
Q <sub>max</sub>	Capacidade máxima de adsorção
Q <sub>t</sub>	Capacidade de adsorção em determinado tempo
r <sup>2</sup>	Coeficiente de determinação
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
REC	Recuperação
rpm	Rotações por minutos
s	Segundos
SP	Sem peneirar
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i>
spp	Sem preparo prévio
SRM	<i>Selected Reaction Monitoring</i>
t	Tempo
TG	Termogravimetria
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
UTIN	Unidade de Terapia Intensiva Neonatal
UV	Ultravioleta
V	Voltagem
V(r)	Densidade de energia potencial eletrônica
VIP	<i>Variable Importance on Projection</i>
ρ(r)	Densidade eletrônica total

## RESUMO

Na química analítica há uma busca constante por metodologias que demandam menor custo e tempo de análise, mas que ao mesmo tempo apresente precisão e exatidão. Nesse sentido diversas metodologias e tecnologias vêm sendo avaliadas, dentre essas abordagens pode-se destacar as que empregam técnicas miniaturizadas de preparo da amostra e as que empregam fontes de ionização ambiente para espectrometria de massa. Sendo assim, essa tese está dividida em 2 capítulos apresentando as potencialidades das técnicas modernas de preparo de amostras para análise por cromatografia líquida e de análises por espectrometria de massas ambiente. O primeiro capítulo retrata o uso da extração sortiva em ponteira de micropipeta empregando fase sorvente baseada em polímeros molecularmente impressos (DPX-MIP) para determinação de melatonina e seus metabólitos (AFMK e AMK) em leite materno por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS). Neste estudo, diferentes MIPs foram sintetizados e avaliados frente a maior seletividade para análise de melatonina e metabólitos. Os resultados obtidos experimentalmente foram confrontados com dados de simulação molecular, sendo os parâmetros físico-químicos obtidos teoricamente em concordância com os dados experimentais. A aplicação da DPX-MIP juntamente com a LC-MS, permitiu desenvolver um método para determinação da melatonina e seus metabólitos (AFMK e AMK) em leite materno, com valores de recuperação entre 87-111% e precisão variando de 2-13%, a análise das amostras dos pacientes indicaram valores em conformidade com os reportados na literatura. O segundo capítulo aborda a aplicação da técnica *paper spray ionization* para espectrometria de massas (PSI-MS) para fins de estudo em metabolômica de cultivares de alface e a potencial diferenciação de acordo com seu método de cultivo e variedade. A PSI-MS é uma técnica de ionização ambiente da espectrometria de massas, que utiliza um papel cromatográfico, como substrato para o processo de ionização da amostra, nesse estudo foi possível diferenciar amostras de alface de acordo com sua variedade e método de cultivo, aplicando ferramentas quimiométricas (PARAFAC, PCA, PLS-DA e OPSDA), pelas quais foram determinados 36 metabólitos responsáveis por essa separação, sendo que os que mais influenciaram foram a colina, a manose e o ácido cítrico. Ferramentas métricas como o AGREEprep e AGREE foram aplicadas para avaliar se as metodologias desenvolvidas estão de acordo com os princípios da química verde, onde se observou que de fato a DPX-MIP e o PSI-MS, são metodologias mais sustentáveis apresentando resultados analíticos adequados com menor tempo de análise e gerando baixo volume de resíduos químicos.

**Palavras chaves:** extração sortiva em ponteira de micropipeta; polímero de impressão molecular; técnicas de ionização ambiente; quimiometria; química analítica verde.

## ABSTRACT

In analytical chemistry, there is a constant search for methodologies that require less cost and analysis time, but at the same time offer precision and accuracy. In this sense, various methodologies and technologies have been evaluated, among which we can highlight those that employ miniaturized sample preparation techniques and those that use ambient ionization sources for mass spectrometry. This thesis is divided into two chapters presenting the potential of modern sample preparation techniques for liquid chromatography analysis and ambient mass spectrometry analysis. The first chapter describes the use of disposable pipette extraction, utilizing a sorbent phase based on molecularly imprinted polymers (DPX-MIP), for the determination of melatonin and its metabolites (AFMK and AMK) in breast milk by liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS). Different MIPs were synthesized and evaluated for their selectivity in analyzing melatonin and its metabolites, experimentally obtained results were compared with molecular simulation data, showing consistency between the theoretical physicochemical parameters and the experimental data. The application of DPX-MIP in conjunction with LC-MS enabled the development of a method for determining melatonin and its metabolites in breast milk, with recovery values ranging from 87-111% and precision between 2-13%, analysis of patient samples produced values consistent with those reported in the literature. The second chapter explores the application of the paper spray ionization mass spectrometry (PSI-MS) technique to study the metabolomics of lettuce cultivars and the potential differentiation according to their cultivation method and variety. PSI-MS, an ambient ionization technique, uses chromatographic paper as a substrate for the sample ionization process. In this study, lettuce samples were successfully differentiated according to variety and cultivation method through the application of chemometric tools (PARAFAC, PCA, PLS-DA, and OPSDA), identifying 36 metabolites responsible for this differentiation, with choline, mannose, and citric acid being the most influential. Additionally, green chemistry metrics, such as AGREEprep and AGREE, were applied to assess the sustainability of the developed methodologies. The results confirmed that DPX-MIP and PSI-MS are more sustainable, offering appropriate analytical performance with shorter analysis times and generating low volumes of chemical waste.

**Keywords:** Disposable pipette extraction, molecularly imprinted polymer, ambient mass spectrometry, paper spray ionization, chemometrics, green analytical chemistry

## INTRODUÇÃO

Nos últimos anos há uma demanda crescente pelo desenvolvimento de metodologias analíticas que sejam mais rápidas e que impactem menos o meio ambiente. Nesse sentido, tem se buscado desenvolver métodos que sejam miniaturizados, automatizados e que demandem o mínimo preparo da amostra, diminuindo assim o tempo de análise e o consumo de solvente e de amostra. Demandas essas que se encontram dentro dos princípios da química verde. (KANNAIAH et al., 2021)

A expressão química verde surgiu no início dos anos 90 tendo como objetivo diminuir o uso ou a geração de substâncias perigosas nas diferentes áreas da química, além de lidar com efeitos ambientais e antrópicos associados a geração de resíduos e risco à exposição, a qual é regida por 12 princípios apresentados a seguir (KORANY et al., 2017):

- 1) Evitar a formação de resíduos;
- 2) Economia atômica;
- 3) Realizar sínteses menos perigosas;
- 4) Utilizar produtos químicos mais seguros;
- 5) Utilizar solventes mais seguros;
- 6) Aumentar a eficiência energética;
- 7) Utilizar matérias primas renováveis;
- 8) Evitar o uso de derivatização;
- 9) Utilizar reagentes catalíticos;
- 10) Utilizar e produzir materiais facilmente degradáveis;
- 11) Análise em tempo real para prevenção da poluição;
- 12) Química inerentemente mais segura para prevenção de acidentes;

Entretanto, em uma análise química nem sempre fatores ambientais são levados em consideração para a escolha do método analítico. Uma vez que a eficiência de um método analítico é medida de acordo com suas respostas de precisão, exatidão, sensibilidade, limite de detecção e/ou quantificação e robustez. Sendo assim, é necessário o desenvolvimento de métodos que sejam capazes de atender esses requisitos, mas que ao mesmo tempo leva em consideração as propostas da química verde. (GAŁUSZKA; MIGASZEWSKI; NAMIEŚNIK, 2013)

Nesse sentido, diferentes métodos vêm sendo desenvolvidos com o intuito de atender as demandas analíticas e que também venham a mitigar os danos ambientais.

Dentre as diferentes propostas que vêm sendo estudadas, pode-se destacar aquelas que envolvem a etapa de preparo de amostra, uma vez que essa é considerada a etapa mais crítica em uma análise química (CÂMARA et al., 2022). Entre as técnicas utilizadas para o preparo da amostra pode-se destacar a extração sortiva em ponteira descartável (DPX, *disposable pipette extraction*), uma técnica de extração miniaturizada na qual uma fase extratora encontra-se retida no interior de uma ponteira de micropipeta, apresentando como vantagens demandar um pequeno volume de amostra e solvente, reduzido tempo de extração (em torno de 5 min), possibilitar automação, dentre outras (OLIVEIRA; LANÇAS, 2021). Entretanto, os dispositivos comercialmente disponíveis para essa técnica ainda são onerosos se comparados aos tradicionais de extração em fase sólida (SPE, *solid phase extraction*), além disso, o número de fases extradoras comercialmente disponíveis ainda é baixo, fazendo com que novos materiais com maior seletividade venham a ser testados, como por exemplo, os polímeros molecularmente impressos (MIP, *molecularly imprinted polymer*) (GOMES et al., 2022).

Nesta vertente do uso de técnicas verdes pode-se destacar aqueles que buscam reduzir a necessidade de uma etapa de separação por cromatografia líquida, que apresenta alto custo instrumental e elevado gasto de solventes. Um método alternativo que vem sendo aplicado, envolve o uso de fontes ambientes na espectrometria de massas (MS, *mass spectrometry*). Dentre as fontes ambientes já analiticamente consolidadas, destaca-se a *paper spray ionization* (PSI), uma técnica de ionização ambiente, ou seja, que emprega condições ambientes de pressão e temperatura para favorecer a ionização das espécies em estudo. Essa técnica faz uso de um papel cromatográfico triangular, em geral equilátero com 1 cm de arestas como substrato para depósito da amostra e realização do processo de ionização (MCBRIDE et al., 2019). Desta forma, o emprego dessa técnica demanda pouco volume de amostra (menos que 20 $\mu$ L), apresentando tempo de análise relativamente baixo (inferior a 3 minutos), além disso, para determinadas análises, faz-se possível retirar a etapa de preparo da amostra (ESPY et al., 2012). A PSI-MS vem sendo empregada em diferentes áreas de estudo desde análises clínicas (FERNANDES et al., 2019), forenses (TAVARES et al., 2018), ambientais (DOWLING et al., 2020), até alimentícias (RAMALHO et al., 2022), dentre outras.

Assim, essa tese será dividida em 2 capítulos, os quais trazem abordagens novas e mais sustentáveis para diferentes finalidades analíticas. No primeiro capítulo será apresentado o desenvolvimento do método DPX-MIP/LC-MS para a determinação de melatonina e seus metabólitos em leite materno (capítulo 1). O segundo capítulo, versará

sobre a aplicação do método PSI-MS com potencial diferenciação do perfil metabólico de diferentes cultivares de alface (capítulo 2).

Desta forma, a presente tese traz o desenvolvimento de metodologias modernas que possam ser adequadamente empregadas para as finalidades em estudo e que agreguem, além de eficiente resposta analítica, coerências aos princípios da química verde.

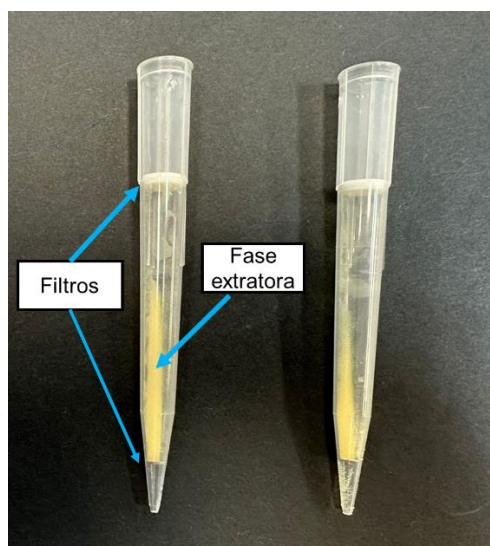
**CAPÍTULO 1:** Síntese de um novo MIP e desenvolvimento do método DPX-MIP/LC-MS para determinação de melatonina e seus metabólitos em leite materno

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Extração sortiva em ponteira descartável (DPX)

A DPX é uma técnica de extração miniaturizada baseada na extração em fase sólida (SPE, Solid Phase Extraction), sendo desenvolvida em 2003 pelo Dr. Willian Brewer (University of South Carolina, USA) (BREWER, 2003), no qual a fase extratora encontra-se dispersa entre dois filtros no interior de uma ponteira de micropipeta de 1 a 5 mL, conforme representado na Figura 1. (OLIVEIRA; LANÇAS, 2023)

Figura 1. Ponteiras utilizadas para extração DPX.



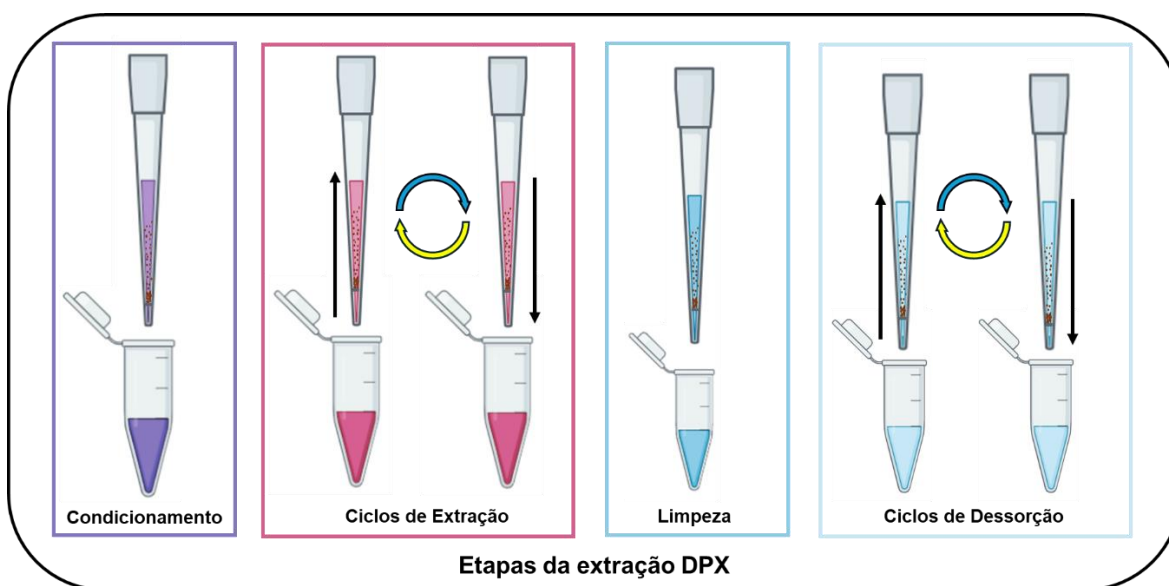
Fonte: Próprio autor

Por se tratar de uma técnica baseada na SPE, o processo de extração ocorrerá por diferentes mecanismos de interação entre a fase extratora (sorvente) e o analito (MACHADO et al., 2021), sendo influenciada pelo tempo de interação entre amostra e sorvente (TAVARES et al., 2021).

A extração por DPX é realizada em etapas, conforme ilustrado na Figura 2. Inicialmente, é realizada o condicionamento da fase extratora com o solvente adequado, entretanto, essa não é uma etapa obrigatória e irá variar conforme a fase extratora a ser utilizada. Após essa etapa, a amostra líquida é aspirada para o interior da ponteira, passando pelos espaços vazios do sorvente. A aspiração conjunta com ar promove a mistura da amostra com o sorvente, e a mistura resultante é deixada em repouso por um período determinado. Em seguida, a amostra é dispensada, permitindo a remoção dos

compostos interferentes e a retenção do analito pela fase extratora. Uma etapa de limpeza pode ser realizada para retirada de alguns interferentes. Na etapa de dessorção, um solvente apropriado é aspirado para o interior da ponteira, juntamente com ar, fazendo com que o analito retido na fase extratora seja transferido para o solvente de extração. O solvente contendo o analito é dispensado em um frasco e está pronto para análise. (CARASEK; MORÉS; HUELSMANN, 2022)

**Figura 2.** Representação das etapas envolvidas no processo de extração DPX



Fonte: Próprio autor

A eficiência da extração por DPX, depende de vários fatores, incluindo o número de ciclos de dessorção/adsorção, tempo de equilíbrio, solvente de eluição, volume de amostra e solvente, efeito de *salting-out*, pH da amostra e a seleção da fase extratora. Sendo que a influência desses fatores na eficiência do processo de extração irá depender das características do analito e da fase extratora. (GARCIA et al., 2021)

- O número de ciclos de dessorção/adsorção almejam uma melhor eficiência de extração, normalmente são realizados de 3 a 7 ciclos. Os ciclos de adsorção podem ser realizados particionando parte da amostra ou a partir da aspiração do volume total da amostra com várias etapas de aspiração da mesma amostra. Os ciclos de dessorção devem ser realizados com o menor volume de solvente

possível e utilizando a mesma alíquota. (CARASEK; MORÉS; HUELSMANN, 2022)

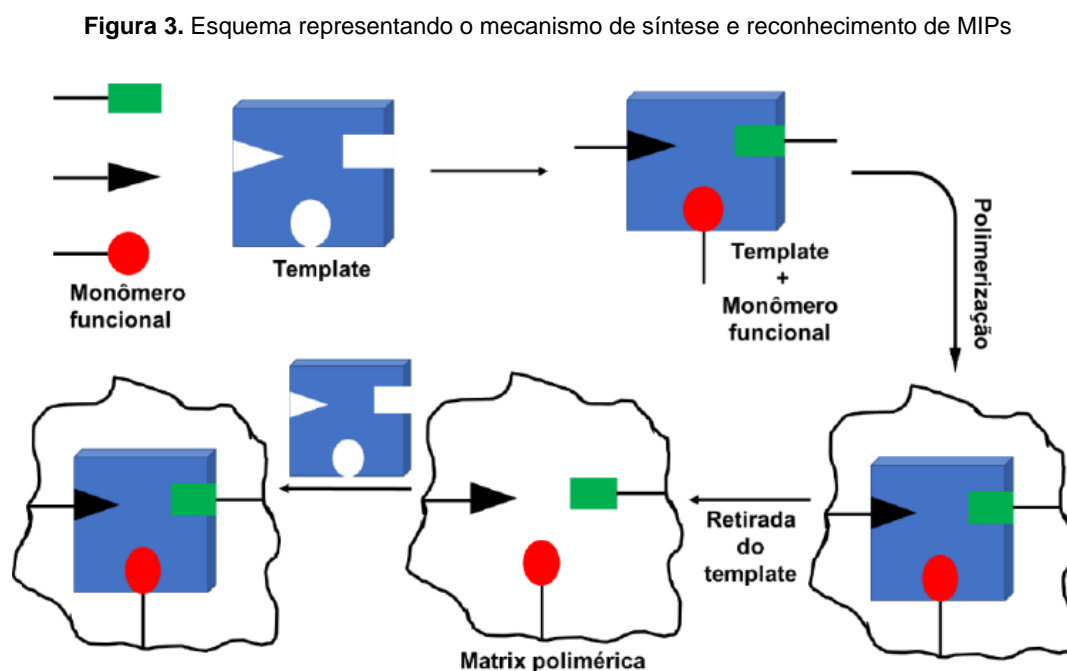
- O tempo de equilíbrio, necessário em uma extração DPX é relativamente baixo, devido a mistura dinâmica que ocorre durante o processo de aspiração, sendo de poucos segundos (OLIVEIRA; LANÇAS, 2023). Juntamente com o número de ciclos, esta etapa será determinada no tempo necessário para realizar a extração. Consequentemente, quanto menor for esse tempo, mais rápida será a extração. (MACHADO et al., 2021)
- O solvente de eluição será responsável pela remoção dos analitos do sorvente. Deve apresentar seletividade adequada para interagir com os analitos, evitando o efeito *carryover* e garantindo melhor recuperação. (CARASEK; MORÉS; HUELSMANN, 2022)
- O volume de amostra e solvente é um fator extremamente importante para o enriquecimento da amostra. Deve-se levar em consideração a quantidade de amostra disponível e a proporção amostra/solvente que permitirá maior concentração do analito e menor consumo de solvente orgânico (HUELSMANN et al., 2020). O volume de amostra e solvente aspirado não deve ultrapassar o limite da ponta para permitir a aspiração do ar, garantindo melhor dispersão entre eles e o sorvente, o que influenciará no tempo de equilíbrio e na eficiência da extração.
- O efeito *salting-out* está diretamente ligado à força iônica da amostra. Ao aumentar a força iônica de uma amostra com a adição de sal, podem ocorrer alterações na solubilidade dos analitos, favorecendo sua migração em direção ao sorvente. Este efeito é comumente observado em compostos polares e moderadamente polares. Porém, deve-se ter cautela ao avaliar este efeito, pois a adição excessiva de sal pode mascarar o número de sítios disponíveis para interação, impactando diretamente na recuperação dos analitos. (CORAZZA et al., 2017)
- O pH da amostra influenciará diretamente no processo de extração dependendo do pKa dos analitos e das características do sorvente utilizado. A extração de compostos orgânicos normalmente é favorecida em sua forma molecular, favorecendo a interação de seus grupos funcionais com o sorvente (CARASEK; MORÉS; HUELSMANN, 2022). Porém, quando o sorvente é favorável para interações iônicas, os analitos devem estar em sua forma ionizada para melhor interação. Portanto, o pH da amostra desempenha um papel essencial durante o processo de extração. (PINTO; DE SOUZA; QUEIROZ, 2017)

- A seleção do sorvente deve considerar tanto as características físico-químicas do material quanto sua capacidade de interagir com os analitos, garantindo altos valores de recuperação e eliminação de interferentes.

A extração DPX, apresenta algumas vantagens quando comparada a SPE tradicional, uma vez que demanda menor consumo de solvente, tempo de extração e massa de sorvente, além de maior possibilidade de automação (SILVA et al., 2022). Entretanto, essa técnica apresenta algumas desvantagens relacionadas ao número de fases extratoras disponíveis comercialmente, o que acaba limitando a sua aplicação (TAN; LEE, 2021a). Conseqüentemente, diferentes estudos têm sido realizados no desenvolvimento de novas fases extratoras, na qual pode-se destacar o uso dos polímeros molecularmente impressos (MIPs).

## 1.2. Polímero de Impressão Molecular (MIP)

Os polímeros molecularmente impressos ou de impressão molecular (MIPs) são materiais sintéticos que apresentam sítios de reconhecimento seletivo para a molécula alvo em preferência a outros compostos (NAWAZ et al., 2021). De maneira geral, os MIPs apresentam funcionamento similar ao sistema “chave-fechadura”, conforme apresentado na Figura 3.



Fonte: Próprio autor

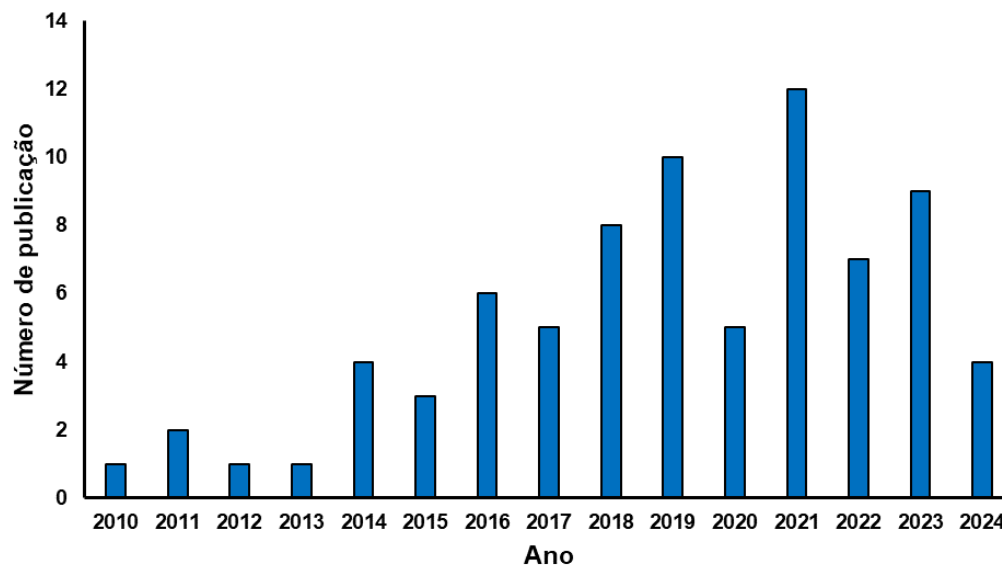
A síntese do MIP é considerada um processo simples que envolve: monômero funcional, molécula alvo (*template*), reagente de entrecruzamento (*cross-linking*) e o agente de iniciação. O processo de síntese ocorre inicialmente através da formação de um agregado polimerizável contendo o monômero funcional e a molécula *template*. Em seguida, o agregado monômero-template é polimerizado na presença do reagente de entrecruzamento e do agente de iniciação sobre a presença de irradiação UV, calor ou outras condições. Após esse processo, o *template* é removido da matriz polimérica, que passa a apresentar sítios seletivos de interação. (ZHAO et al., 2023)

A presença ou não dos sítios seletivos, dependerá da interação monômero-*template* que será responsável por garantir a seletividade do material sintetizado às moléculas alvo. Para avaliar a presença de sítios seletivos no MIP, é necessário comparar a interação do MIP com a molécula alvo em relação a interação do polímero molecularmente não impresso (NIP, *non-imprinted polymer*) com a molécula alvo. O NIP segue a mesma metodologia de síntese do MIP, mas sem a presença do *template*. Uma alternativa, para avaliar essa interação também envolve o uso de cálculos teóricos que permitem avaliar o grau em que essas interações ocorrem com medidas de parâmetros físico-químicos (termodinâmica e cinética). (MARTINS et al., 2023)

Os MIPs podem ser sintetizados por diferentes metodologias, sendo que as mais utilizadas são: polimerização em massa, precipitação, suspensão, emulsão e sol-gel (ARABI et al., 2021). Dentre elas, a polimerização em massa é aquela considerada a mais simples, além de demandar baixo consumo de solvente porogênico. No entanto, os materiais obtidos por essa metodologia apresenta baixa homogeneidade, o que resulta em materiais com taxa de transferência de massa lenta, tempo de equilíbrio longo e uma quantidade reduzida de grupos seletivos para interação com a molécula alvo (HE et al., 2021). Para reduzir essa problemática é necessário realizar a moagem e o peneiramento do polímero após o procedimento sintético para garantir maior homogeneidade. Apesar disso, os MIPs sintetizados por essa metodologia apresentam bons valores de capacidade de adsorção e fator de impressão, o que permite sua aplicação como fase sorvente em técnicas de preparo de amostra como a DPX (MURDAYA et al., 2022).

Apesar das vantagens relacionadas ao uso do MIP como fase extratora para a DPX, ainda a poucos estudos que relacionam o uso dessa fase para DPX, conforme pode ser observado na Figura 4.

**Figura 4.** Números de publicações envolvendo MIP e DPX entre 2010 e 2024.



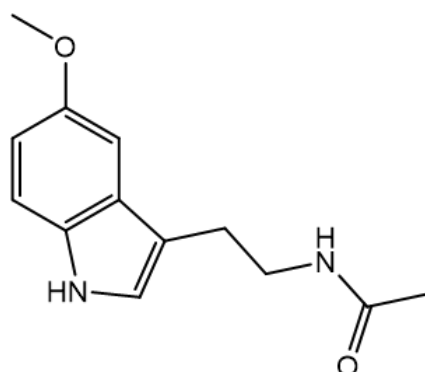
Fonte: Web of Science (pesquisa realizada no de 26 de julho de 2024, com as palavras-chave: molecularly imprinted polymer; pipette extraction)

Por se tratar de um material com alta seletividade para um composto ou classe de compostos (DING et al., 2020), os MIPs podem ser facilmente adaptados a uma molécula de interesse com tamanho e grupos diferentes, permitindo um processo de extração seletivo o que garante as técnicas de extração que utilizam essa fase extratora, bons valores de recuperação (superior a 80%), precisão e exatidão (SUN et al., 2021). Sendo assim, o MIP apresenta-se como um bom candidato para uso como fase sorvente para compostos em baixa concentração em matrizes complexas, tal como a melatonina em amostras de leite.

### 1.3. Melatonina

A melatonina ou N-acetil-5-metoxitriptamina (Figura 5) é o principal hormônio sintetizado pela glândula pineal em animais vertebrados (ZHANG et al., 2024). Descoberta em 1958, por Lerner e colaboradores (LERNER et al., 1958), que tinham como objetivo utilizar o material excretado pela glândula pineal no tratamento de doenças de pele (GUNATA; PARLAKPINAR; ACET, 2020).

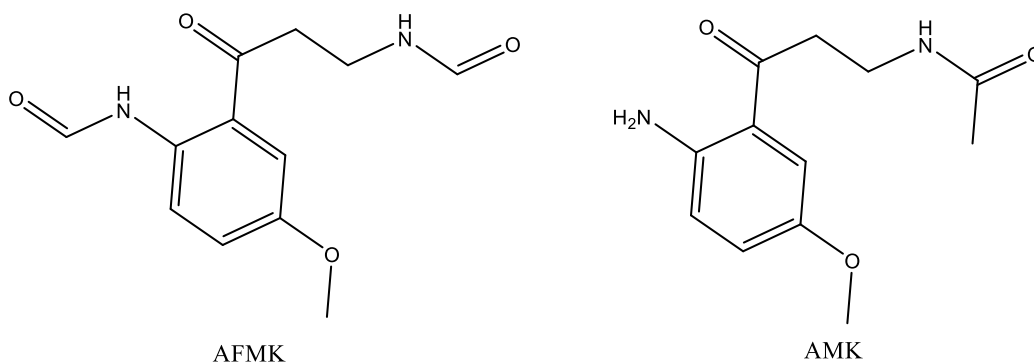
**Figura 5.** Representação estrutural da N-acetil-5-metoxitriptamina (melatonina).



Fonte: próprio autor

Esse hormônio é uma indolamina derivada do triptofano e metabolizada enzimaticamente ou não enzimaticamente para todas as células. Dentre os metabólitos da melatonina, podemos destacar o N-acetil-N-formil-5-metoxiquinuramina (AFMK) e o N-acetil-5-metoxiquinuramina (AMK), Figura 6, que apresentam propriedades antioxidantes. O AFMK é produzido por vários mecanismos enzimáticos (indoleamina 2,3-dioxigenase, mieloperoxidase), pseudoenzimáticos (oxoferril hemoglobina, hemina), fotocatalíticos ou de radicais livres. A desformilação do AFMK por arilamina formamidase ou hemoperoxidases formará o AMK. (HARDELAND; PANDI-PERUMAL; CARDINALI, 2006; MAJIDINIA et al., 2018)

**Figura 6.** Representação estrutural do N-acetil-N-formil-5-metoxiquinuramina (AFMK) e o N-acetil-5-metoxiquinuramina (AMK)



Fonte: próprio autor

Dentre as diversas ações da melatonina já comprovadas, destaca-se a imunomodulatória (CHANG et al., 2022), anti-inflamatória (JOSEPH et al., 2024), antitumoral (RODRÍGUEZ-SANTANA et al., 2023), antioxidante (HOHOR et al., 2023) e cronobiológica (QIAN et al., 2022).

Dessas ações a melhor explicada é a cronobilógica, na qual a melatonina atua diretamente no ciclo circadiano (NOURAZARAN et al., 2023). Em humanos, a alta concentração de melatonina está fortemente relacionada ao aumento da sonolência e na diminuição da temperatura corporal, que propicia as condições adequadas para o sono (DIJK; CAJOCHEN, 1997). A concentração de melatonina chega a ser de 3 a 10 vezes superiores durante a noite, sendo que sua secreção normalmente se inicia entre às 21:00h e 22:00h, atingindo seu nível máximo de concentração entre às 3:00h e 4:00h, começando a diminuir entre às 7:00h e 10:00h da manhã (KAREL et al., 2024). Entretanto, esse hábito de secreção é observado em animais noturnos e diurnos, indicando que a melatonina não está diretamente ligada ao sono, mas sim a percepção de noite e dia (ZHDANOVA, 2005).

Após a secreção, a melatonina é distribuída por vários tecidos corporais não sendo estocada (REITER, 1991). Devido a sua anfipolaridade, é possível encontrá-la em qualquer célula, compartimento ou fluido corporal (HARDELAND; PANDI-PERUMAL; CARDINALI, 2006; MUÑOZ-JURADO; ESCRIBANO, 2024) sendo encontrados relatos de sua presença em líquido cefalorraquidiano, na saliva, no humor aquoso, no leite humano, dentre outros (DE ALMEIDA et al., 2011).

Dada a diversidade de vias metabólicas que a melatonina pode estar envolvida é de suma importância a avaliação deste hormônio em fluidos biológicos, tal como leite materno. A compreensão do papel da melatonina em diferentes vias metabólicas ainda é escassa sendo cada vez mais necessário o estudo e a determinação deste hormônio nos mais diversos compartimentos biológicos, tal como leite materno. Diferentes estudos clínicos que relacionam concentrações de melatonina no leite materno têm sido relatados na literatura, conforme apresentado na Tabela 1.

**Tabela 1.** Estudos relacionados à concentração de melatonina no leite materno e suas respectivas influências.

<b>Conclusões do estudo</b>	<b>Referência</b>
A concentração de melatonina no leite materno influencia no número de cólicas e no sono do recém-nascido.	(ENGLER et al., 2012)
A concentração de melatonina no leite varia conforme o período do dia, a qual apresenta números mais elevados à noite.	(HÄUSLER et al., 2024)
O humor da lactante influencia na concentração de melatonina presente no leite.	(KIMATA, 2007)

Continua na próxima página

Continuação da tabela 1

Conclusões do estudo	Referência
A melatonina presente no leite materno pode influenciar no desenvolvimento cardiovascular do recém-nascido	(GOMBERT; CODOÑER-FRANCH, 2021)
A concentração de melatonina varia conforme a fase de lactação sendo que nas primeiras fases a concentração de melatonina é maior	(QIN et al., 2019)
A concentração de melatonina no leite colostro influência em sua propriedade antibacteriana.	(HONORIO-FRANÇA et al., 2013)

Fonte: próprio autor

A concentração de melatonina no leite materno irá variar de acordo com o período do dia avaliado, com esses valores alternando entre 5 e 86 pg mL<sup>-1</sup> (CHRUSTEK et al., 2022; ENGLER et al., 2012; ITALIANER et al., 2020).

Os testes mais utilizados para determinação de melatonina em amostras biológicas tem sido o radioimunoensaio e o ensaio imunoenzimático (ELISA, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Esses testes são baseados na reação antígeno-anticorpo e apresentam baixo limite de detecção, além de serem considerados de simples operação. Entretanto, esses testes permitem a quantificação de apenas um analito, podendo ocorrer uma grande variação nos valores detectados a depender dos kits utilizados, além disso, a relatos de que compostos similares a melatonina são capazes de interagir com esses kits, fornecendo informações incorretas quanto a sua concentração. (KENNAWAY, 2019, 2020)

Uma alternativa para a utilização desses kits envolve o uso da cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS, *Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry*), uma técnica de análise que apresenta baixo limite quantificação, reprodutibilidade e repetibilidade. Entretanto, devido à complexidade dessa amostra, o leite materno, e a baixa concentração desse analito é necessário que haja um preparo prévio dessa amostra antes de sua inserção no sistema analítico. Logo, o uso da DPX-MIP se mostra uma alternativa viável para essa análise, por se tratar de uma técnica simples e de fácil operação, que demanda pouco tempo para extração juntamente com baixo consumo de solvente e de amostras, apresentando alta seletividade.

Dessa maneira, este trabalho propõe desenvolver um método de quantificação de melatonina e seus metabólitos em leite materno por LC-MS utilizando MIP como fase extratora para extração por DPX.

## **2. OBJETIVOS**

O presente estudo tem por objetivo sintetizar um novo MIP e empregá-lo como fase sorvente na técnica de preparo de amostras DPX, para determinação LC-MS de melatonina e metabólitos em amostras de leite materno.

### **2.1. Objetivos específicos**

- Síntese e caracterização do MIP
- Otimização das condições cromatográficas
- Otimização dos parâmetros de extração da DPX para extração de melatonina e metabólitos em leite materno.
- Validação do método DPX-MIP-LC-MS para determinação da melatonina e seus metabólitos
- Aplicação da metodologia desenvolvida em amostras de leites coletadas de pacientes.

## **3. METODOLOGIA**

### **3.1. Materiais, reagentes e padrões**

Na realização desse estudo foram empregados os seguintes solventes, reagentes e padrões: tolueno (99,9 %), metanol (99,9 %), acetonitrila (99,9 %), acetona (99,9 %), acetato de etila (99,9 %) e etanol (99,9 %) da marca Tedia. Água ultrapurificada do equipamento MS2000 WFI da Geaka apresentando resistividade de 18,2 MΩ. Clorofórmio, 1-vinilimidazol (1-Vn) (99 %), 4-vinilpiridina (4-Vp) (95 %), ácido metacrílico (AM) (99 %), 2-hidroxietil metacrilato (HEMA) (99 %), dimetacrilato de etilenoglicol (EGDMA) (98 %), azobisisobutironitrila (AIBN) (0,2 M em tolueno) e melatonina (99,9 %) da Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA). AFMK (95 %) e AMK (95 %) foram adquiridos da empresa Santa Cruz Biotechnology.(Dallas, USA) Lã de vidro da marca Dinâmica (São Paulo, SP- Brasil).

### **3.2. Coleta do leite materno**

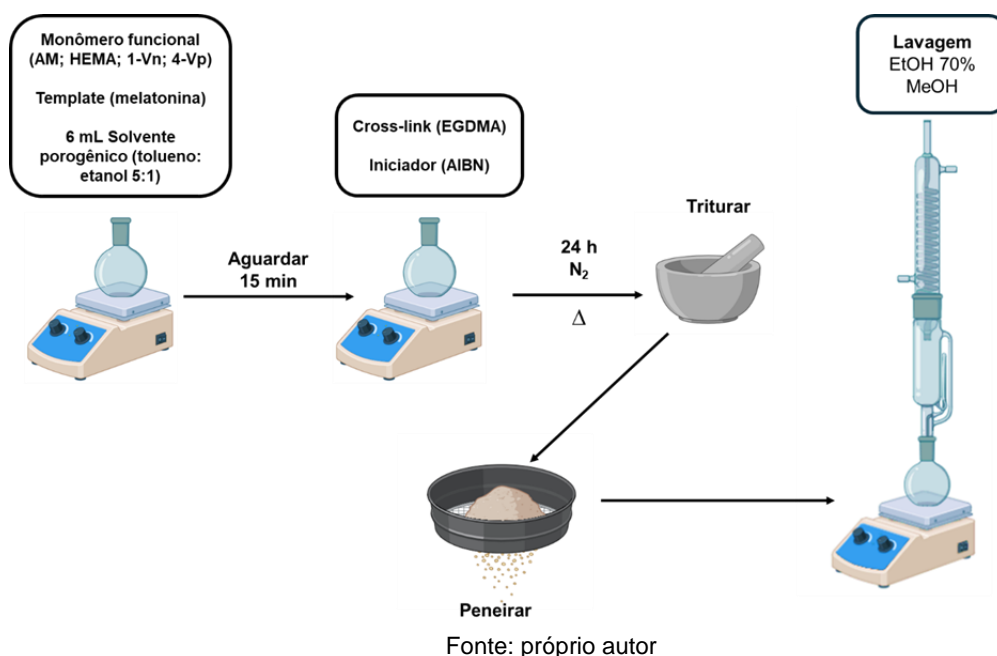
O leite materno foi doado pela Faculdade de Enfermagem da Universidade Federal de Goiás através de uma colaboração com a Profa. Dra. Flaviana Vely Mendonça Vieira. As amostras de leite foram coletadas segundo protocolos estabelecidos pelo Comitê de

Ética em pesquisa em Humanos da UFG (nº 40822620.0.0000.5078) e mantidas congeladas (-70°C) e protegidas da luz até o momento da análise. Foram coletadas 59 amostras em maternidades públicas da cidade de Goiânia, Goiás, e no domicílio das participantes. Com os seguintes critérios de inclusão: residir na cidade do estudo; idade igual ou maior que 18 anos; ser passível de contato por telefone; estar no período pós-parto imediato; estar amamentando. Como critérios de exclusão foram adotados os seguintes parâmetros: neonatos com malformações congênitas, internação materna em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) e neonatal em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN); mulheres com doenças crônicas: hipertensão, diabetes mellitus, distúrbios da tireoide, hepatites, asma, doença renal crônica e doenças cardiovasculares; mulheres em uso de medicamentos para auxílio do sono; mulheres com quadro de infecções agudas.

### 3.3. Síntese MIP

A síntese do MIP foi realizada por polimerização por massas, adaptada do estudo de Schwarz e colaboradores (SCHWARZ et al., 2016), no qual foi empregado 1 mmol de *template* (melatonina), 4 mmol de monômero funcional, 15 mmol do agente reticulante (EGDMA, dimetacrilato de etilenoglicol), 51 mg de AIBN (azobisisobutironitrila) e 6 mL de solvente porogênico (tolueno: etanol 5:1 v/v). Foram sintetizados diferentes MIPs a fim de otimizar o monômero funcional para melhor interação com a melatonina e seus metabólitos sendo assim foram produzidos MIPs a base de AM (ácido metacrílico), 4Vp (4-vinilpiridina), 1-Vn (1-vinilimidazol) e HEMA (2-hidroxietil metacrilato). Para tanto, inicialmente se misturou o *template* com o monômero funcional na presença do solvente porogênico, a mistura foi deixada em repouso por 15 min, para a formação do complexo monômero/*template*. Em seguida, foi adicionado o *cross-link* e o agente de iniciação, a reação ocorreu em atmosfera de N<sub>2</sub> a 60°C por um período de 24h, conforme apresentado na Figura 7. Após esse período o polímero foi seco, triturado e peneirado, sendo lavado com solução composta por etanol 70% e metanol (50:50%, v/v), para remoção dos resíduos de síntese e *template*, da matriz polimérica. Na sequência, o polímero foi seco em estufa a 50°C por 24 horas. O NIP foi sintetizado utilizando a mesma metodologia, mas sem o emprego do *template* na síntese. O NIP foi sintetizado apenas para o monômero funcional, que apresentou melhor recuperação para extração DPX de melatonina em leite materno.

Figura 7. Esquema representando a síntese do MIP



### 3.4. Caracterização físico-química dos MIPs

Todos os polímeros sintetizados foram caracterizados por Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), o equipamento utilizado foi o Spectrum Frontier da Perkin Elmer com resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$  na faixa de número de onda de  $4000$  a  $400\text{ cm}^{-1}$ . A estrutura morfológica dos MIPs foi avaliada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), as imagens de alta resolução foram geradas por um Microscópio Eletrônico de Varredura, Jeol, JSM – 6610, Thermoscientific NSS Spectral Imaging. A estabilidade térmica dos sólidos foi avaliada por termogravimetria (TG), o equipamento empregado foi o STA 449 F3 da Netzsch, utilizando-se aproximadamente  $7,5\text{ mg}$  de amostra, em atmosfera de gás nitrogênio, e fluxo de  $50\text{ mL min}^{-1}$ , cadinho de alumina ( $85\text{ }\mu\text{L}$ ) com a razão de aquecimento de  $263\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$  e faixa de aquecimento de  $25$  a  $1000\text{ }^\circ\text{C}$ . A porosidade dos MIPs foi avaliada por adsorção e dessorção de nitrogênio, usando o aparelho de adsorção física Micromeritics, ASAP 2020 Plus Version 1.03, para cálculo da área superficial específica foi utilizado a equação de BET (Brunauer-Emmett-Teller) (HOWARTH et al., 2017) e o volume total de poros, o diâmetro médio dos poros e a distribuição de tamanho de poros foram determinados pelo método BJH (Barrett-Joyner-Halenda) (TEIXEIRA; COUTINHO; GOMES, 2001).

### 3.5. Condições Cromatográficas

As determinações cromatográficas foram realizadas em um sistema HPLC ExionLCTM (Sciex) acoplado ao espectrômetro de massas triplo quadrupolo (MS/MS) QTRAP® 4500 (Sciex), localizado na Faculdade de Farmácia da UFG. A coluna cromatográfica empregada foi uma Luna C8(2) 100A (150 mm x 4,6 mm, 5 µm, Phenomenex), com uma pré-coluna C8 (4 mm x 3mm, Phenomenex). A corrida cromatográfica foi realizada no modo isocrático com 60% A (água 5mM de formiato de amônio) e 40% B (acetonitrila); vazão de 0,8 mL min<sup>-1</sup>; volume de injeção 20 µL; temperatura da coluna 40 °C; tempo de corrida 6 min. Os espectros de massas foram adquiridos com ionização por *electrospray* no modo positivo (ESI+); o nitrogênio foi utilizado como gás de cortina (10 psi), de nebulização (45 psi), auxiliar (40 psi) e gás de colisão (alto ou 12 a.u); a voltagem do *spray* foi 5500 V; temperatura da fonte 650 °C; as análises foram realizadas no modo SRM (*Selected Reaction Monitoring*), no qual o fragmento de maior intensidade foi selecionado como íon de quantificação e o segundo mais intenso como íon de confirmação, conforme apresentado na Tabela 2.

**Tabela 2.** Condições de SRM para as análises de melatonina e seus metabólitos

Analito	[M+H] <sup>+</sup>	Tipo	m/z	PD (V)	EC (V)	PE (V)	PSCC (V)
Melatonina	233,1	Quantificação	174,1	46	19	10	12
		Confirmação	130,1	46	61	10	14
AFMK	265,2	Quantificação	114,0	61	17	10	6
		Confirmação	237,1	61	12	10	10
AMK	237,1	Quantificação	114,1	46	17	10	8
		Confirmação	136,0	46	26	10	6

PD = Potencial de Desagregação; EC = Energia de Colisão; PE = Potencial de Entrada; PSCC = Potencial de Saida da Célula de Colisão

Fonte: Próprio autor

### 3.6. Estudo Computacional

Para avaliar o monômero que apresenta melhor interação com a melatonina, foi realizado um estudo computacional em parceria com o Prof. Dr. Flávio Olímpio Sanches Neto do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás do Campus de Valparaíso de Goiás.

Na primeira etapa, cálculos de estrutura eletrônica usando a funcional híbrido B3LYP (LEE; YANG; PARR, 1988) combinado com o conjunto de base de Pople 6-31G(d,p) (HEHRE; DITCHFIELD; POPLE, 1972) foram realizados para otimizar todas as espécies selecionadas neste estudo, isto é, o *template* (melatonina) e os monômeros funcionais (1-Vn, 4-Vp, AM e HEMA). Em seguida, o software Packmol (MARTÍNEZ et al., 2009) foi empregado para fornecer as configurações iniciais dos complexos de pré-polimerização melatonina/monômero. Posteriormente, todos os complexos foram otimizados com o mesmo nível de cálculo descrito anteriormente.

Os pontos estacionários foram caracterizados por cálculos analíticos de frequência harmônica. A ausência de frequências imaginárias garante que as estruturas otimizadas são mínimos locais. A energia de interação ( $\Delta E$ ) entre o monômero e o *template* foi calculada incluindo a contribuição da energia vibracional do ponto zero e o erro de superposição do conjunto de base, conforme a equação 1. (BOYS; BERNARDI, 1970; FELLER, 1992)

$$\Delta E = E_{COMPLEXO} - [E_{TEMPLATE} + \sum E_{MONOMERO}] \quad \text{Equação 1}$$

Onde  $E_{complexo}$  é a energia total do complexo formado entre o monômero e *template*,  $E_{template}$  é a energia total do *template* e  $\sum E_{monômero}$  é a soma da energia total dos monômeros funcionais. Todos os cálculos de química quântica foram realizados com o pacote de software Gaussian 16. (FRISCH et al., 2016)

### 3.7. Cálculo do fator de impressão molecular

O fator de impressão molecular foi calculado para o MIP que apresentou a melhor eficiência para extração da melatonina e seus metabólitos em ensaios experimentais prévios. Para isso, 20 mg de MIP ou 20 mg de NIP, foi submetido ao processo de extração DPX de 1 mL de uma solução padrão de melatonina e seus metabólitos ( $10 \text{ ng mL}^{-1}$ ) em água. O processo de extração foi realizado da seguinte maneira: foi aspirado 1 mL da solução com 2 ciclos de adsorção, após essa etapa a solução foi colocada em um *vial* e levada para análise LC-MS, para determinar o residual de melatonina e seus metabólitos presentes na solução.

O coeficiente de distribuição (Kd), a remoção percentual (%R) e o fator de impressão (FI), foram calculados com base nas equações abaixo:

$$kd = \frac{(Ci - Cf) * V (mL)}{Ci * \text{massa de MIP ou NIP} (mg)} \quad \text{Equação 2}$$

$$\%R = \frac{(Ci - Cf) * 100}{Ci} \quad \text{Equação 3}$$

$$FI = \frac{\%R \text{ MIP}}{\%R \text{ NIP}} \quad \text{Equação 4}$$

Em que Ci representa a concentração inicial do analito, Cf a concentração final do analito e V o volume de amostra utilizada.

### 3.8. Cálculo da capacidade de adsorção e efeito cinético do MIP

Foi realizado o cálculo da capacidade de adsorção e do efeito cinético para o MIP com melhor eficiência para extração DPX da melatonina e seus metabólitos.

A análise da capacidade de adsorção foi realizada utilizando 10 mg do MIP peneirado o qual foi colocado em um tubo Falcon de 15 mL e em seguida foi adicionado 10 mL de solução padrão de melatonina (em água) com a concentração variando de 0,2 a 5 g L<sup>-1</sup>. As soluções foram agitadas a temperatura ambiente por 24 h, e a concentração final de melatonina foi determinada por LC-UV. Nesse caso foi aplicada as mesmas condições cromatográficas descritas na seção 3.5, mas sem o empregado do espectrômetro de massas. O comprimento de onda utilizado foi de 240 nm. A capacidade de adsorção do polímero foi calculada com base na equação 2. (MARTINS et al., 2020)

$$Q = ((Ce - C0) * V) / W \quad \text{Equação 5}$$

Em que Q representa a capacidade de adsorção, Ce a concentração restante na solução, C0 a concentração inicial, V o volume de solução padrão avaliada e W a massa de polímero utilizada.

A análise do efeito cinético foi realizada utilizando 10 mg do MIP ou NIP peneirado o qual foi colocado em um béquer de 25 mL. Em seguida foi adicionado 10 mL de solução padrão de melatonina 0,2 mg mL<sup>-1</sup>. As soluções foram colocadas sob agitação e os seguintes tempos foram avaliados: 1, 5, 10, 30, 60, 120 e 180 min. As análises foram realizadas por LC-UV conforme já descrito para a capacidade de adsorção e a equação 5 também foi utilizada para determinar a capacidade de adsorção.

### **3.9. Otimização dos parâmetros de extração DPX-MIP para melatonina e seus metabólitos em leite materno**

Nesta etapa, ponteiros de micropipeta de 1 mL foram vedadas utilizando lã de vidro previamente limpas e secas e adicionadas 20 mg dos MIP sintetizados e peneirados na faixa de granulometria de 0,15 mm. Para a extração DPX de melatonina e seus metabólitos em leite materno, as principais variáveis foram avaliadas e otimizadas de maneira uni e multivariada, conforme descrito a seguir.

#### **3.9.1. Otimizações univariadas**

As otimizações univariáveis foram realizadas utilizando 1 mL de leite materno de pacientes fora dos critérios de inclusão do estudo, enriquecido com solução padrão de melatonina para a concentração de 10 ng mL<sup>-1</sup>. Inicialmente 1 mL de acetonitrila foi utilizada como solvente de eluição sendo o processo de extração realizado com 2 ciclos de aspiração da amostra e dessorção do analito, com 10 s de tempo de equilíbrio. Primeiramente foi otimizado a necessidade de se realizar um tratamento prévio do leite anterior a extração DPX (leite sem tratamento, diluído 1:1 com água, centrifugado 10000 rpm e diluído 1:1 com metanol). Os MIPs sintetizados foram submetidos à extração DPX dos analitos para avaliar a eficiência de extração deles. As etapas envolvidas no processo de extração DPX, condicionamento (1 mL de acetonitrila) e lavagem (2 ciclos de aspiração de 1 mL de água), foram otimizadas a fim de se obter maior eficiência de extração. A granulometria dos MIPs após o processo de trituração foi otimizada (diâmetro 0,3 mm, 0,15 mm, menor que 0,15 mm e sem peneirar). Diferentes solventes de dessorção foram testados para uma melhor recuperação dos analitos (acetonitrila, metanol, etanol, acetona, acetato de etila e clorofórmio).

#### **3.9.2. Otimização multivariada**

A otimização multivariável foi realizada utilizando um planejamento fatorial fracionário 2<sup>5-1</sup> com 3 pontos centrais, empregando o software Statistica versão 7. As variáveis foram codificadas da seguinte maneira: 1= tempo de equilíbrio, 2= pH da amostra, 3= ciclo de adsorção, 4= ciclo de dessorção e 5= volume de solvente. Sendo que, o número ciclo está relacionado ao processo de aspirar e dispersar a mesma alíquota. Os níveis de cada uma das variáveis estão presentes na Tabela 3.

**Tabela 3.** Parâmetros, variáveis e níveis utilizados no planejamento fatorial 2<sup>5-1</sup>.

Parâmetros	Variáveis	Nível baixo	Ponto central	Nível alto
1	Tempo de equilíbrio	10 s	35 s	60 s
2	pH da amostra	4	7	10
3	Ciclo de adsorção	2	6	10
4	Ciclo de dessorção	2	6	10
5	Volume de solvente	300 µL	600 µL	900 µL

Fonte: próprio autor

Para a realização do planejamento fatorial foi eluído pelas ponteiras 1 mL de leite materno enriquecido com melatonina e seus metabólitos a uma concentração de 100 pg mL<sup>-1</sup> e diluído em 1 mL de água e a acetonitrila foi utilizada como solvente de dessorção. Após a etapa de extração o solvente foi evaporado e os analitos foram ressuspensos em 500 µL da fase móvel e posteriormente encaminhados para análise LC-MS.

### 3.10. Parâmetros analíticos

Para comprovar a eficiência do método proposto para determinação da melatonina e seus metabólitos por DPX-MIP/LC-MS, algumas figuras de mérito foram avaliadas seguindo a normativa estabelecida pela Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) em resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017 (BRASIL, 2017). No qual foram avaliados os seguintes parâmetros: linearidade, efeito matriz, exatidão, precisão, limite de detecção e quantificação.

A linearidade do método foi avaliada através da extração de 1 mL de leite materno enriquecido com padrão interno (PI) (melatonina-d4) a uma concentração de 50 pg mL<sup>-1</sup> e com os padrões de melatonina e seus metabólitos na concentração de 10, 15, 20, 40, 60, 80, 100 pg mL<sup>-1</sup>. Cada ponto da curva foi avaliado em quintuplicata, em que os valores médios de cada ponto e seus respectivos desvios padrões foram levadas em consideração para construção da curva analítica.

Para determinar o efeito matriz foi construída uma curva de calibração para a melatonina e seus metabólitos utilizando 100 pg mL<sup>-1</sup> de PI com a concentração dos analitos variando de 10 a 100 pg mL<sup>-1</sup>. Essa curva foi comparada com a curva obtida para extração da melatonina e seus metabólitos em leite materno. O coeficiente angular de ambas as

curvas foi comparado entre si utilizando um *test t*, para determinar se há diferença estatística entre eles e se há ou não influência da matriz na resposta.

Para calcular a exatidão do método foram utilizados 3 níveis de concentração baixo, médio e alto, com 5 replicadas para cada nível avaliado. Para a melatonina foram avaliadas as seguintes concentrações 10, 50 e 100 pg mL<sup>-1</sup>. Para os metabólitos AFMK e AMK as concentrações avaliadas foram 15, 50, 100 pg mL<sup>-1</sup>. A exatidão é representada com base na recuperação (REC), conforme expresso na equação 6.

$$REC = \frac{\text{Concentração experimental}}{\text{Concentração teórica}} * 100 \quad \text{Equação 6}$$

Para o cálculo da precisão foram avaliados os mesmos níveis de concentração que os utilizados para o cálculo da exatidão, com 5 replicadas para cada nível. As análises foram realizadas no mesmo dia em 3 dias diferentes, para determinar a precisão intra e interdias do método. A precisão do método é expressa com base no desvio padrão relativo (DPR), conforme expresso na equação 7.

$$DPR = \frac{\text{Desvio padrão}}{\text{Concentração média determinada}} * 100 \quad \text{Equação 7}$$

O limite de detecção (LD) foi determinado levando em consideração a curva analítica, para seu cálculo foi utilizada a equação 8.

$$LD = \frac{3,3 * (\text{desvio padrão residual da linha de regressão})}{\text{inclinação}} \quad \text{Equação 8}$$

O limite de quantificação (LQ) foi determinado levando em consideração a inclinação da curva analítica, para seu cálculo foi utilizada a equação 9.

$$LQ = \frac{10 * (\text{desvio padrão residual da linha de regressão})}{\text{inclinação}} \quad \text{Equação 9}$$

### **3.11. Comparação entre os resultados obtidos para o teste imunoenzimático (ELISA) e o DPX-MIP/LC-MS**

As amostras coletadas em parceria com a Faculdade de Enfermagem da UFG, foram analisadas pelo método DPX-MIP/LC-MS e por ELISA para determinação da

melatonina. As análises de ELISA foram realizadas conforme metodologia reportado por Oliveira (OLIVEIRA, 2024). Para essas análises foi utilizado um Kit ELISA de análise direta para saliva da marca TECAN de referência RE54041. Na qual, 5 mL de leite foi centrifugado a 3500 g durante 35 min a 4°C, 0,1 mL do sobrenadante foi coletado e adicionado a placa do ELISA, em seguida é adicionado 0,1 mL do padrão e do calibrante, e 0,05 mL da solução antissoro essa mistura é incubada por 20h a 8 °C, após esse período a placa é lavada 4 vezes com 0,25 mL de tampão fosfato e é adicionada 0,1 mL de biotina a placa é incubada por 2 h a 25 °C, a placa é novamente lavada 4 vezes com 0,25 mL de tampão fosfato e 0,1 mL da enzima conjugada é adicionada a placa é incubada por 1 h a 25 °C, sendo novamente lavada 4 vezes com 0,25 mL de tampão fosfato. Em seguida é adicionada 0,1 mL de substrato 5,5'-tetrametil-benzidina, a solução é incubada por 15 min a 25 °C. Em seguida é adicionada 0,1 mL de 5,5'-tetrametil-benzidina em 1 M de ácido de sulfúrico, após 15 min as placas são levadas para a leitora e a leitura é realizada a 450 nm.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

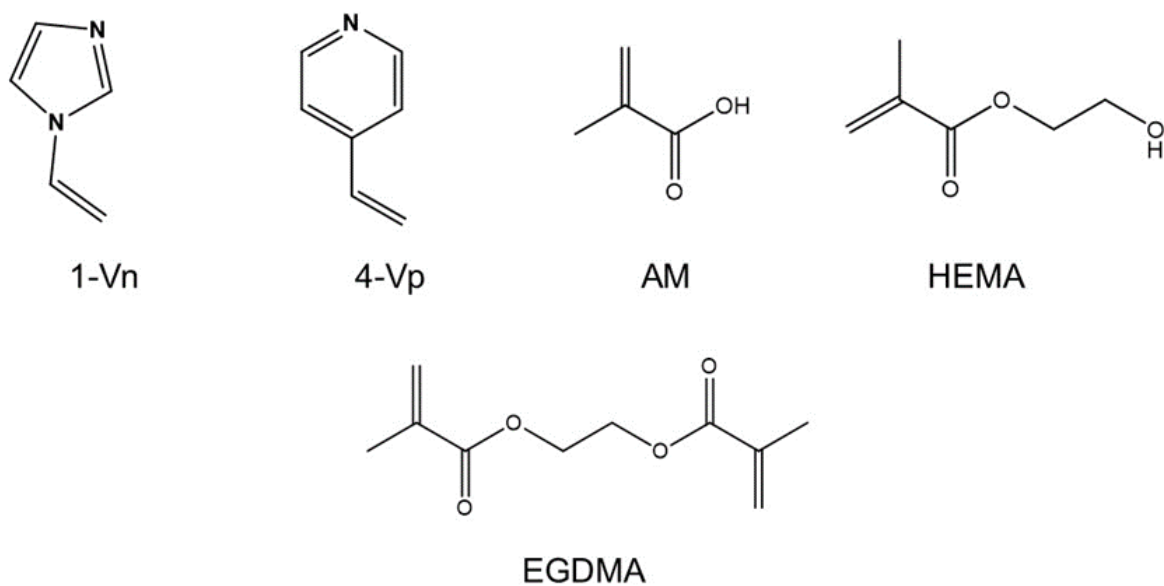
### 4.1. Caracterização dos MIPs

No presente estudo os monômeros: 4-Vp, 1-Vn, AM e HEMA foram avaliados para a síntese de um polímero de impressão molecular para melatonina. Os MIPs sintetizados foram submetidos a análise por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). A Figura 9, apresenta os espectros de FTIR, para cada um dos MIPs sintetizados empregando os monômeros 4-Vp, 1-Vn, AM e HEMA. Como todos os polímeros aqui sintetizados utilizam EGDMA (Figura 8) como agente reticulante foi possível observar bandas características dessa molécula em cada um dos MIPs sintetizados, dentre elas pode-se destacar os alongamentos característicos de grupos éteres em 1740  $\text{cm}^{-1}$ , 1261  $\text{cm}^{-1}$  e 1162  $\text{cm}^{-1}$ , que estão relacionados a carbonila (C=O), a ligação (C–O) e a absorção (C–O–C) respectivamente, observa-se também bandas relacionadas aos estiramentos (C–H) em 2957  $\text{cm}^{-1}$  e 2991  $\text{cm}^{-1}$ . (FOGUEL et al., 2017)

O MIP sintetizado utilizando 4-Vp como monômero funcional (Figura 8), apresentou bandas em torno de 1600  $\text{cm}^{-1}$  e 1557  $\text{cm}^{-1}$  que estão relacionadas as vibrações do estiramento C=N (XU et al., 2011). No MIP de 1-Vn (Figura 8) foi possível observar uma banda em 664  $\text{cm}^{-1}$  que está associada a vibração de flexão do C=N dos grupos vinílicos, típicos da molécula de 1-vinilimidazol (CHEN et al., 2010). O MIP obtido com o uso de AM como monômero funcional (Figura 8) exibiu bandas em 3500  $\text{cm}^{-1}$  característico de

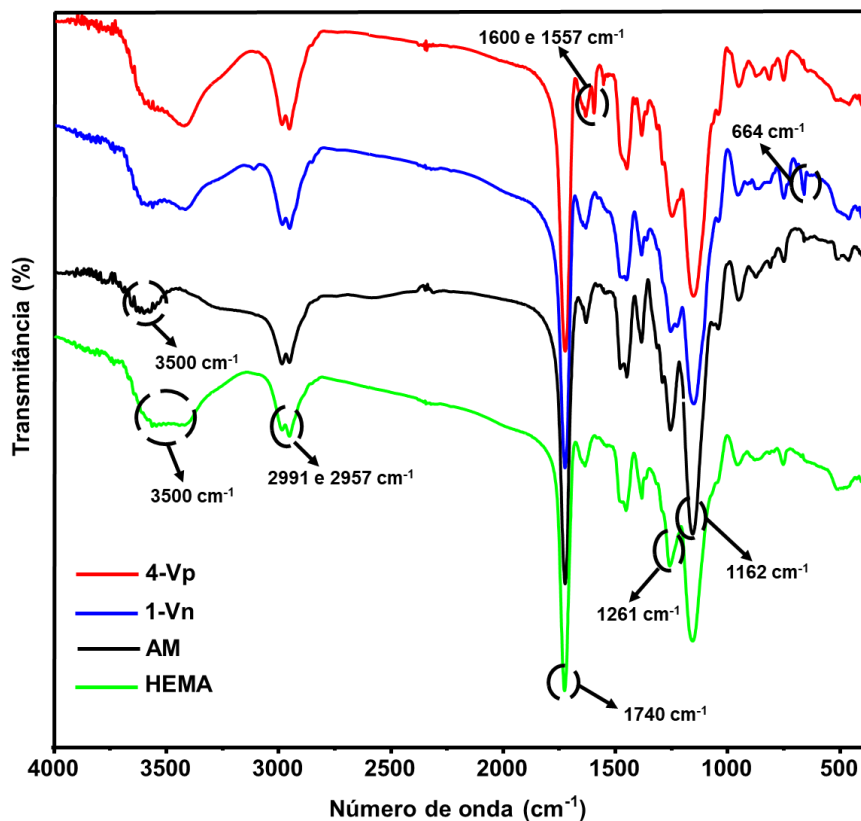
estiramento (O–H), bem como banda em  $1734\text{ cm}^{-1}$  típico do estiramento (C=O) (WONG et al., 2016). No MIP de HEMA (Figura 8) nota-se a presença de banda em  $3500\text{ cm}^{-1}$  característico de estiramento (O–H), as demais bandas típicas desse monômero  $1740\text{ cm}^{-1}$ ,  $1262\text{ cm}^{-1}$  e  $1171\text{ cm}^{-1}$  também são bandas características do EGDMA uma vez que ambas as moléculas apresentam função éster (MEYDAN et al., 2021).

**Figura 8.** Representação da estrutura química dos monômeros funcionais 1-Vn, 4-Vp, AM, HEMA e do agente reticulante EGDMA



Fonte: Próprio autor

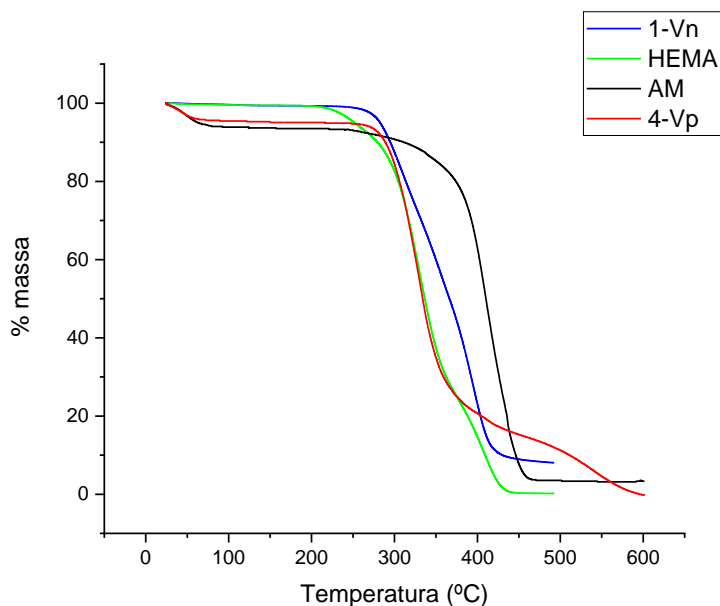
**Figura 9.** Espectros FTIR para os MIPs sintetizados utilizando 4-Vp, 1-Vn, AM e HEMA como monômeros funcionais.



Fonte: Próprio autor

Para avaliar a estabilidade térmica dos MIPs, foram realizadas análises termogravimétricas. A Figura 10, exibe as curvas de análises termogravimétricas para os MIPs obtidos com os monômeros 1-Vn, HEMA, AM e 4-Vp. O MIP 1-Vn e HEMA encontram-se na forma anidra no estado sólido, sendo observado um perfil térmico de decomposição de apenas uma etapa, com estabilidade térmica de 260 °C e 210 °C, respectivamente. Já os polímeros AM e 4-Vp, apresentaram duas etapas de perda de massa, sendo atribuídas a desidratação térmica e decomposição destes materiais. Com relação a estabilidade térmica desses polímeros, constatou-se que ela se mantinha até 280 °C e 250 °C respectivamente, para suas formas anidras.

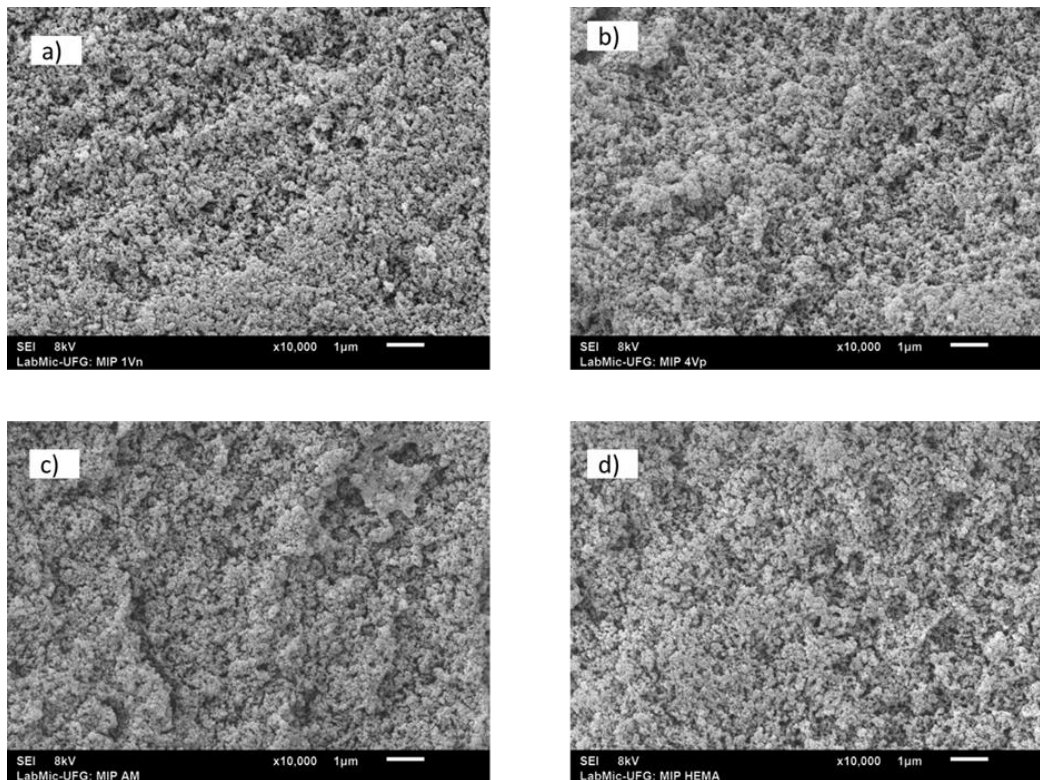
**Figura 10.** Curvas termogravimétricas dos MIPs 1-Vn, HEMA, AM e 4-Vp



Fonte: Próprio autor

A morfologia dos MIPs sintetizados foram avaliadas por MEV. A Figura 11, apresenta as micrografias relacionadas aos MIPs empregando os monômeros 1-Vn, 4-Vp, AM e HEMA a uma magnitude de 10000x. Segundo a Figura 11, não é possível observar diferenças visuais entre os polímeros avaliados, uma vez que os materiais foram sintetizados utilizando o mesmo procedimento sintético, variando apenas o monômero funcional empregado. Adicionalmente, é possível notar que todos os polímeros apresentaram canais, no qual a amostra irá eluir, proporcionando maior superfície de contato e conseqüentemente maior interação entre os analitos e a fase extratora (DE MIDDELEER; DUBRUEL; DE SAEGER, 2016).

**Figura 11.** Micrografias com amplitude de 1000x para os MIPs empregando os monômeros. A) 1-Vn; b) 4-Vp; c) AM; d) HEMA



Fonte: Próprio autor

A porosidade dos polímeros foi avaliada por adsorção e dessorção de nitrogênio. A Tabela 4, apresenta os valores de área superficial, volume de poros médio e diâmetro dos poros, para os MIPs 1-Vn, 4-Vp, AM e HEMA. Nota-se que mesmo com os polímeros tendo sido sintetizados utilizando a mesma metodologia sintética há variações entre os valores de área superficial, volume e diâmetro de poros, que estão relacionadas com as interações entre o monômero funcional e os demais componentes sintéticos.

**Tabela 4.** Área superficial, volume e diâmetro de poros para os MIPs 1-Vn, HEMA, AM e 4-Vp.

Amostra	Área superficial ( $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ )	Volume de poros ( $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$ )	Diâmetro dos poros ( $\text{Å}$ )
1-Vn	230,43	0,94	163,19
HEMA	236,40	0,90	151,97
AM	153,25	0,63	165,30
4-Vp	260,86	0,76	116,91

Fonte: Próprio autor

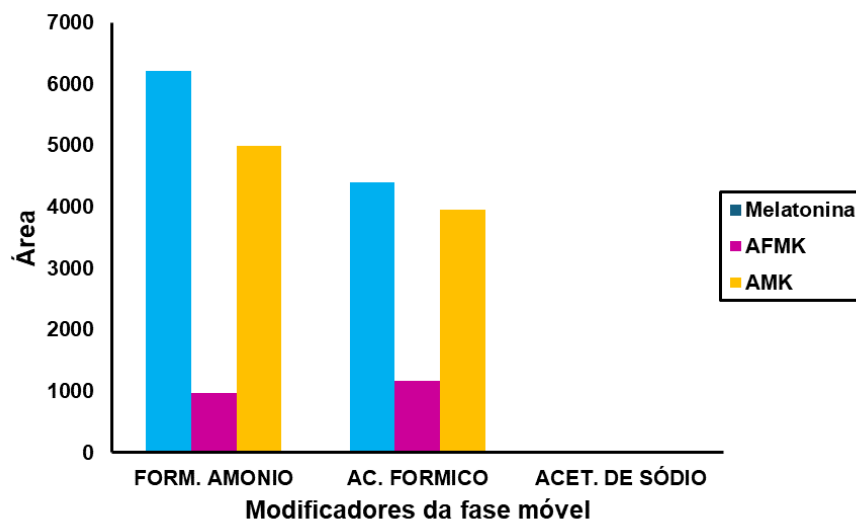
Julgando os valores de área superficial dos MIPs sintetizados pode-se afirmar que o MIP de 4-Vp, possivelmente é aquele que resultaria em maior interação com os compostos de interesse (melatonina e metabólitos), uma vez que a área superficial está diretamente ligada a superfície de contato disponível para interação e conseqüentemente influenciará a capacidade de extração do material (MASINI; SVEC, 2017). Entretanto, não se pode afirmar que o valor de área superficial será fator preponderante para definir se um material será mais eficiente ou não durante um processo de extração, uma vez que não estamos levando em consideração as interações intermoleculares entre o analito e a fase extratora e o número de sítios de interação disponíveis na superfície do MIP. Além disso, todos os MIPs sintetizados apresentam diâmetro de poros típicos de materiais mesoporosos (2 – 50 nm) (CIESLA; SCHÜTH, 1999) com diâmetro de poro entre 11,6 e 16,5 nm, propriedade que possibilita o acesso das moléculas alvos aos sítios de reconhecimentos presentes no interior dos poros, indicando que ambos os materiais podem interagir de maneira eficiente com a melatonina e seus metabólitos (MEGAHED et al., 2022; SAAD et al., 2021). Vale ressaltar também, que a técnica de adsorção/dessorção de nitrogênio é eficiente para medida de micro e meso poros, não fornecendo informações sobre os macros poros, os quais contribuem significativamente para a eficiência de extração e uso dos MIPs em sistemas de extração miniaturizados (HE et al., 2021).

#### **4.2. Análise cromatográfica**

A literatura aponta que a concentração de melatonina e seus metabólitos em leite materno pode variar entre 5 pg mL<sup>-1</sup> a 86 pg mL<sup>-1</sup>, dependendo, entre outros fatores, do período avaliado (ENGLER et al., 2012; QIN et al., 2019). Conseqüentemente, é necessário a utilização de equipamentos que venham a ter alto poder de detecção e sensibilidade analítica como o caso do LC-MS.

O formiato de amônio foi utilizado como modificador da fase móvel por promover melhor ionização dos analitos, se comparado a outros modificadores como o ácido fórmico e o acetato de sódio, conforme pode ser observado na Figura 12. O formiato de amônio aumentou o número de eletrólitos presentes na fase móvel o que contribui para o aumento do sinal analítico. Além disso, a presença do formiato de amônio na fase móvel aumenta a condutividade do meio e pode reduzir o tamanho inicial da gota durante a formação do *spray*, favorecendo a formação do *elektrospray* e conseqüentemente a ionização dos analitos (ZHAO; SUN; LI, 2008).

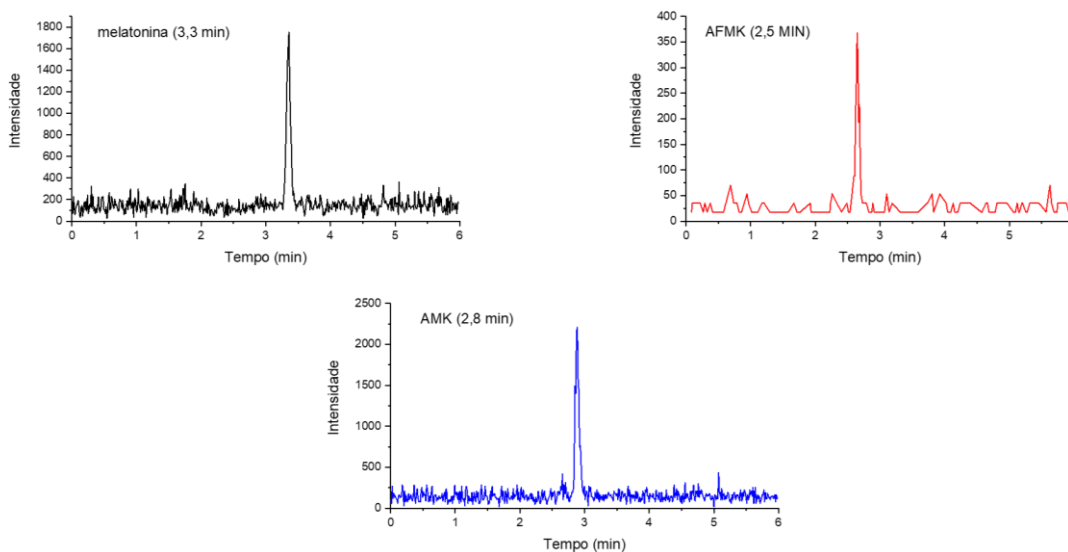
**Figura 12.** Área para a melatonina e seus metabólitos na concentração de 500 ng mL, utilizando diferentes modificadores de fase móvel (5 mM formiato de amônio, 0,1% de ácido fórmico e 5 mM acetato de sódio).



Fonte: Próprio autor

Para avaliar se o método cromatográfico proposto estava adequado para a determinação dos analitos em estudo foi usada uma solução padrão de melatonina e os metabólitos (AFMK e AMK) na concentração de 10 pg mL<sup>-1</sup>, conforme apresentado na Figura 13, indicando que é possível realizar a determinação desses analitos dentro do intervalo de concentração desejado.

**Figura 13.** Cromatogramas de MRM para a melatonina e seus metabólitos (AFMK e AMK) com seus respectivos tempos de retenção



Fonte: Próprio autor

### 4.3. Seleção dos MIPs para extração de melatonina e seus metabólitos

Conforme já reportado anteriormente no tópico 4.1, não é possível afirmar que uma fase extratora apresentará melhor eficiência de extração sem levar em consideração as interações intermoleculares envolvidas nesse processo. Sendo assim, foi realizado um estudo teórico para calcular a energia de interação ( $\Delta E$ ) entre o monômero funcional e o *template* (melatonina), conforme apresentado na Tabela 5.

**Tabela 5.** Energia de interação ( $\Delta E$ ) entre os monômeros funcionais (1-Vn, HEMA, AM e 4-Vp) e o *template* (melatonina).

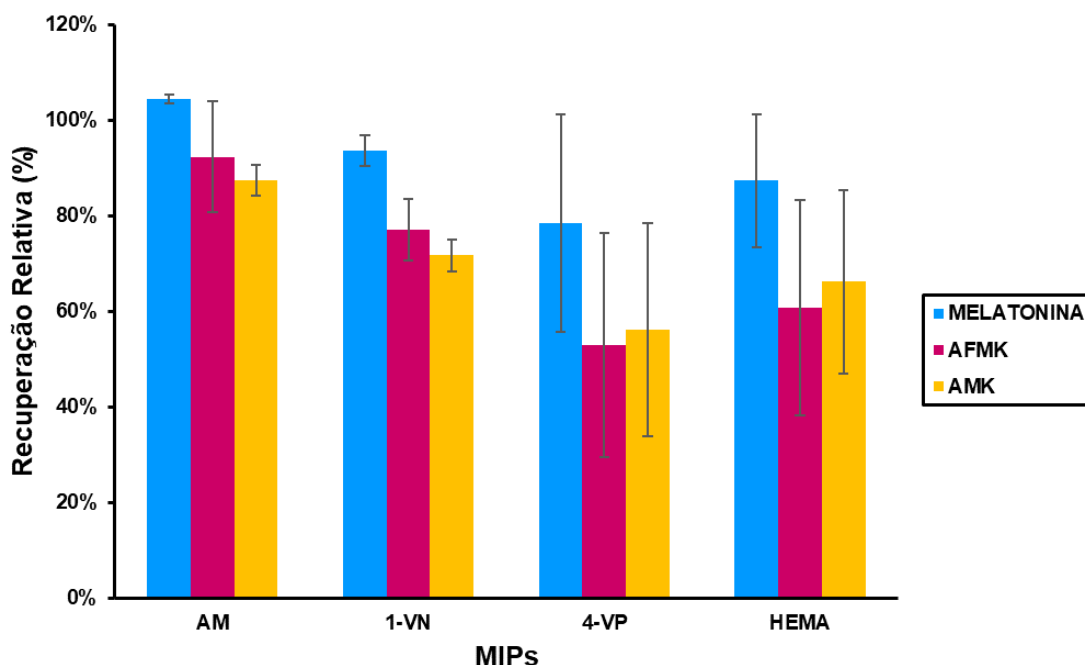
Monômero funcional	$\Delta E_{\text{monômero-template}}$ (KJ.mol <sup>-1</sup> )
1-Vn	- 126,49
HEMA	- 218,24
AM	- 180,87
4-Vp	- 130,75

Fonte: próprio autor

Conforme a literatura, quanto menor a energia de interação ( $\Delta E$ ) do sistema monômero – *template*, maior será a interação e mais estável será o complexo monômero – *template*, resultando em uma maior interação com a molécula alvo (XIE et al., 2020). Conseqüentemente, o MIP utilizando HEMA como monômero funcional apresentou valores de energia de interação que sugerem que será aquele que irá interagir de forma mais eficiente com as moléculas alvos.

Para corroborar com estes dados, foram realizadas extrações DPX de um padrão de melatonina e seus metabólitos em água a uma concentração de 10 ng mL<sup>-1</sup>, no qual foi utilizado 20 mg de MIP como fase extratora e 1 mL de acetonitrila como solvente de dessorção, para posterior análise por LC-MS. Este processo foi realizado para cada MIP sintetizado. A Figura 14, apresenta o gráfico de barras para a recuperação relativa de melatonina e seus metabólitos em função dos MIPs (1-Vn, HEMA, AM e 4-Vp). Nota-se que não há diferença significativa para a recuperação relativa de melatonina e seus metabólitos (AFMK e AMK) em função dos MIPs avaliados, para confirmar foi realizado uma análise de variância (ANOVA) com nível de confiança de 95%, que apresentou valor  $p=0,194$  indicando que realmente não há diferença significativa entre eles.

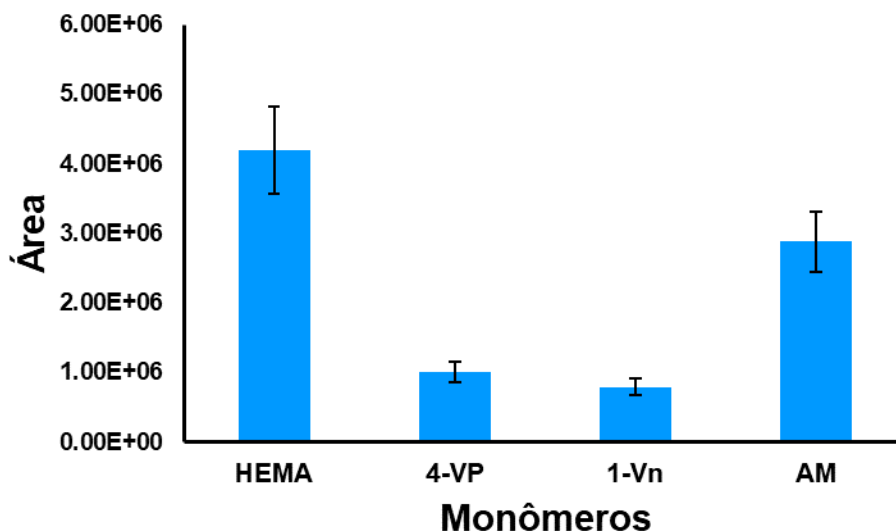
**Figura 14.** Gráfico de barras para a recuperação relativa de melatonina e seus metabólitos (AFMK e AMK) para os MIPs AM, 1-Vn, 4-Vp e HEMA



Fonte: Próprio autor

As ponteiros contendo o MIP, foram previamente submetidas a extração de apenas solvente (acetonitrila), para avaliar a presença ou não de resíduos do *template* (melatonina) nos MIPs utilizados para a extração DPX, o que poderia interferir na etapa de quantificação. Ou seja, avaliar a eficiência da etapa de limpeza empregada após a síntese. Conforme pode ser observado na Figura 15 todos os polímeros avaliados apresentavam resíduos do *template*. No entanto, o HEMA apresentou maior valor de área referente a melatonina quando comparado aos demais, o que pode ser atribuído a sua maior energia de interação entre o monômero e o *template* (Tabela 5), o que conseqüentemente dificulta a retirada do mesmo. Com relação ao MIP 1-Vn (valor de energia de interação mais baixa), foi observado menor valor de área (Figura 15), o que indica que a retirada do *template* da matriz polimérica é facilitada. A presença de resíduos do *template* pode afetar diretamente a precisão do método analítico, além de diminuir o número de sítios seletivos reduzindo a capacidade adsorviva do material (BAGHERI et al., 2019). Dessa maneira, o MIP 1-Vn foi selecionado para extração DPX de melatonina e seus metabólitos nos ensaios seguintes, uma vez que apresenta eficiência de extração similar aos demais, aliado a maior facilidade para remoção do *template*, diminuindo o gasto de solvente e o tempo envolvido no processo.

**Figura 15.** Gráfico de barras indicando a área de resíduo do *template* (melatonina) após etapa de limpeza para os MIPs sintetizados empregando os monômeros: AM, 1-Vn, 4-Vp e HEMA.



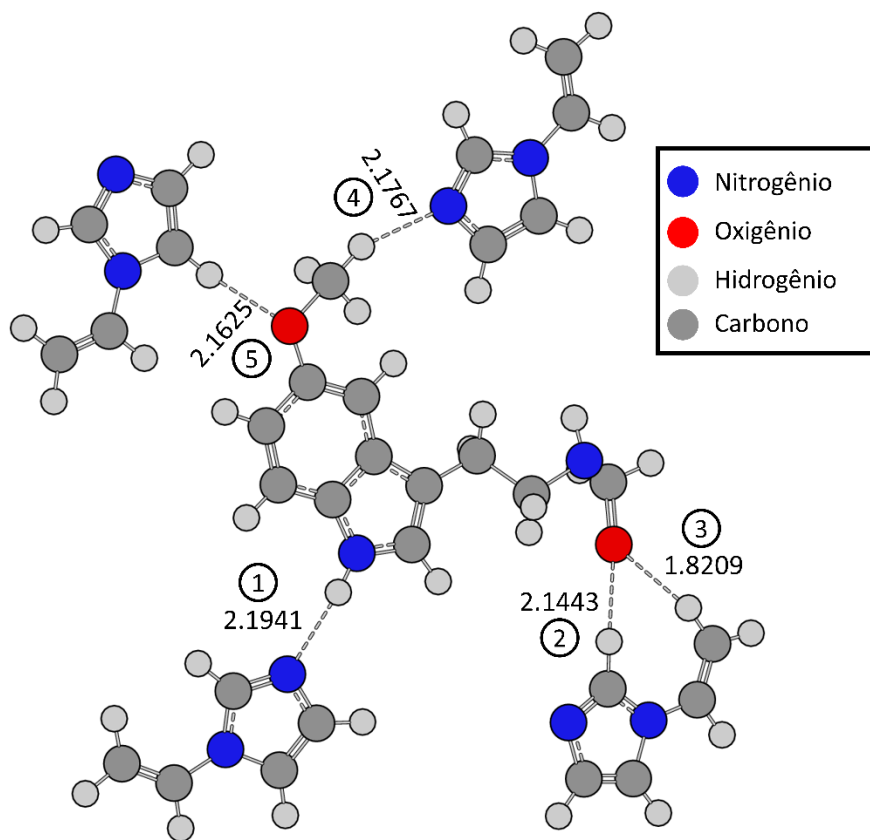
HEMA: 2-hidroxietil metacrilato; 4-Vp: 4-vinilpiridina; 1-Vn: 1-vinilimidazol; e AM: ácido metacrílico

Fonte: próprio autor

#### 4.4. Análise topológica da interação entre a melatonina e o 1-vinilimidazol

A análise topológica é utilizada para investigar a natureza da ligação complexa que ocorre entre o *template* – monômero funcional, demonstrando o tipo de interação que irá influenciar para a estabilidade dessa ligação. Nesse sentido, foi realizada uma análise topológica para determinar as interações envolvidas para a formação do complexo entre a melatonina (*template*) e o 1-vinilimidazol, uma vez que esse foi o monômero selecionado para a extração DPX da melatonina e seus metabólitos. Como pode ser observado na Figura 16, as interações que irão influenciar na estabilidade do complexo serão as do tipo ligação de hidrogênio com o comprimento de ligação variando entre 1,8209 e 2,1941 Å.

**Figura 16.** Conformação do complexo formado entre a melatonina e o 1-vinilimidazol



Fonte: Próprio autor

A análise topológica também irá fornecer informações quanto a densidade eletrônica total ( $\rho(r)$ ), a densidade eletrônica Laplaciana ( $\nabla^2\rho(r)$ ), a densidade de energia eletrônica ( $H(r)$ ) e a densidade de energia potencial eletrônica ( $V(r)$ ), como pode ser observado na Tabela 6. A Tabela 6, apresenta os valores de  $\rho(r)$ ,  $\nabla^2\rho(r)$ ,  $H(r)$  e  $V(r)$ , para as interações que mais influenciam na estabilidade do complexo melatonina e 1-Vn, representadas na Figura 16. Conforme afirmado por Koch (KOCH; POPELIER, 1995) e Lipkowski (LIPKOWSKI et al., 2004), as interações de hidrogênio devem apresentar densidade eletrônica total ( $\rho(r)$ ) entre 0,002 e 0,035 a.u e densidade eletrônica Laplaciana  $\nabla^2\rho(r)$  entre 0,024 e 0,139 a.u, indicando que as principais interações presentes para o complexo melatonina e 1-Vn são do tipo ligação de hidrogênio, uma vez que os valores de  $\rho(r)$  variam de 0,010 a 0,015 e os de  $\nabla^2\rho(r)$  estão entre 0,033 e 0,045.

As ligações de hidrogênio podem ser caracterizadas com base em sua densidade eletrônica, conforme afirmado por Rozas e colaboradores (ROZAS; ALKORTA; ELGUERO, 2000). De acordo com os autores quando os valores de  $\nabla^2\rho(r)$  são maiores que 0 e  $H(r)$  é maior que zero, as ligações de hidrogênio são formadas por forças de interação

eletrostáticas fracas, quando o  $\nabla^2\rho(r)$  é maior que 0 e  $H(r)$  é menor que zero, as ligações de hidrogênio apresentam forças moderadas, já quando  $\nabla^2\rho(r)$  é menor que 0 e  $H(r)$  é menor que zero a força dessas interações será considerada forte e típica de ligação covalente. Para o complexo formado entre a melatonina e o 1-Vn irá prevalecer ligações de hidrogênio formadas por interações fracas e moderadas, facilitando assim a retirada do *template* da matriz polimérica. (XIE et al., 2020; ZHANG; FAN; ZHAO, 2018)

**Tabela 6.** Valores de densidade eletrônica total ( $\rho(r)$ ), densidade eletrônica Laplaciana ( $\nabla^2\rho(r)$ ), densidade de energia eletrônica ( $H(r)$ ) e a densidade de energia potencial eletrônica ( $V(r)$ ), para as principais interações envolvidas no complexo formado entre a melatonina e 1-Vn e a intensidade dessas interações.

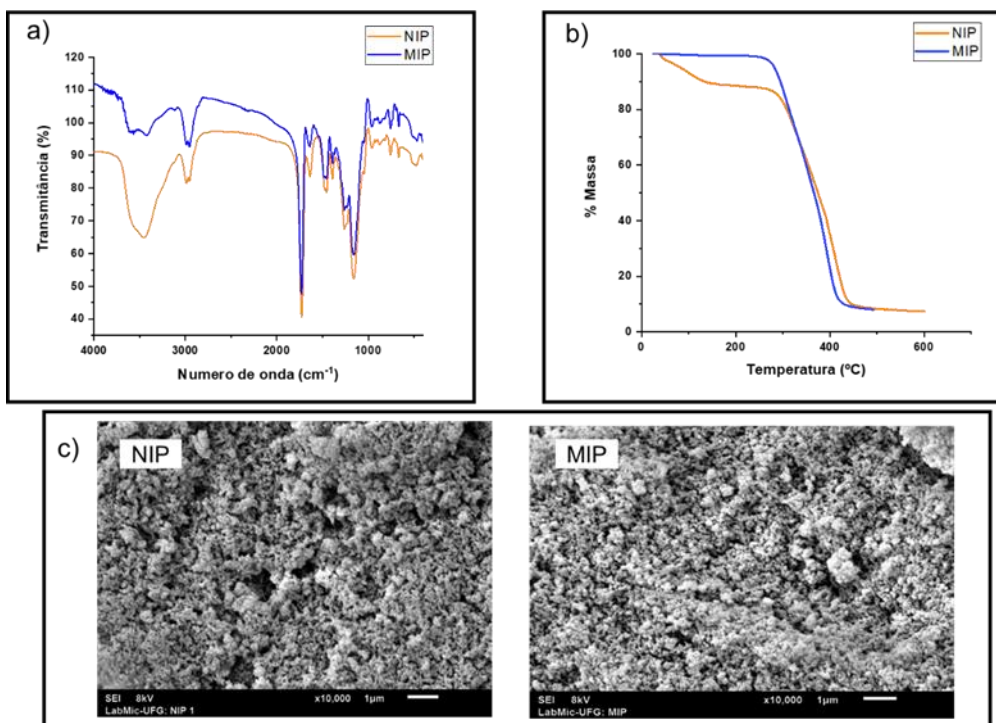
Interação	$\rho(r)$ a.u.	$\nabla^2\rho(r)$ a.u.	$H(r)$	$V(r)$	Intensidade da ligação
1	0.0097751	0.0327130	0.0009767	-0.0062247	Fracas
2	0.0152838	0.0448228	-1.6172E-06	-0.0112089	Moderadas
3	0.0135616	0.0417312	0.0002315	-0.0099697	Fracas
4	0.0108031	0.0292609	0.0005246	-0.0062658	Fracas
5	0.0103135	0.0330628	0.0004610	-0.0073435	Fracas

Fonte: Próprio autor

#### 4.5. Caracterização do NIP e teste de seletividade para a melatonina e seus metabólitos.

O NIP obtido através da síntese empregando 1-Vn como monômero funcional, mas sem adição do *template* foi caracterizado pelas mesmas técnicas empregadas para caracterização dos MIPs, já reportadas no tópico 4.1. A Figura 17, apresenta os espectros de FTIR, as curvas de análise termogravimétricas e as micrografias do NIP e MIP de 1-Vn. Na Figura 17a), é possível observar que ambos os polímeros são similares apresentando bandas características para o EGDMA (cross-link) e o 1-Vn (monômero), conforme já reportadas no tópico 4.1. Na Figura 17b), nota-se que o NIP apresentou duas etapas de perda de massa, sendo atribuídas a desidratação térmica e decomposição deste material, já o MIP foi decomposto em apenas uma etapa, ambos os materiais apresentaram estabilidade térmica até 310 °C. A Figura 17c), apresenta as micrografias para o NIP e o MIP, na qual não é possível observar diferenças visuais significativas entre elas. Essas similaridades existentes entre o NIP e MIP se dá pelo fato de ambos os materiais terem sido sintetizados utilizando os mesma metodologia sintética variando apenas a presença ou não do *template*.

**Figura 17.** Resultados de caracterização do NIP e MIP de 1-Vn; a) Espectros FTIR do MIP e NIP; b) Termogramas NIP e MIP; c) Micrografias MIP e NIP com amplitude de 1000x



Fonte: Próprio autor

A porosidade do NIP foi comparada ao MIP pela análise de adsorção e dessorção de nitrogênio. A Tabela 7, apresenta os valores de área superficial, volume de poros médio e diâmetro dos poros, para o NIP e MIP. Observe que há diferenças entre esses valores para o NIP e MIP, uma vez que a presença e retirada do *template* no procedimento para obtenção desses materiais pode influenciar diretamente na porosidade e na área superficial do material, além disso o maior valor de área superficial do MIP indica que houve a formação de cavidades seletivas a melatonina e seus metabólitos (FOGUEL et al., 2017).

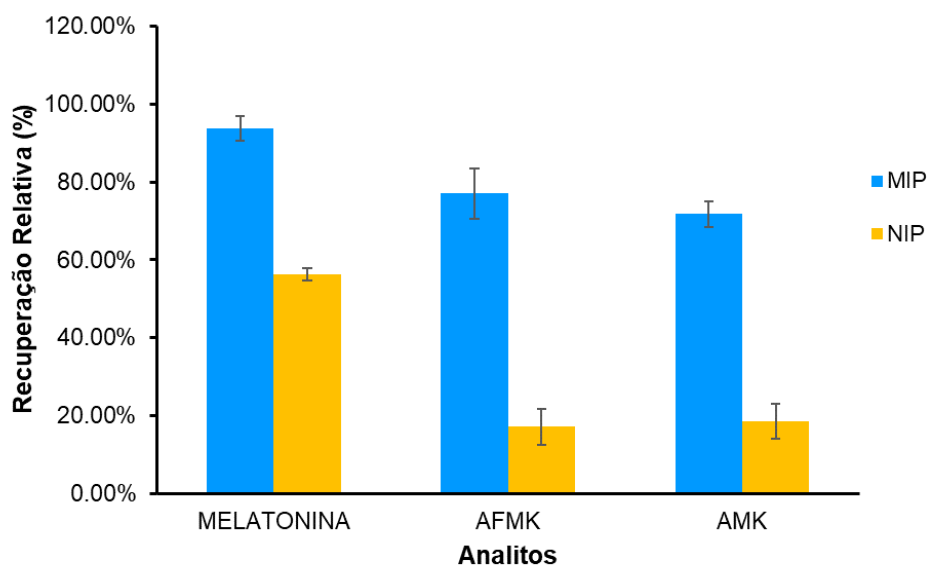
Para avaliar a seletividade do MIP frente ao NIP, foi realizada uma extração DPX de leite materno enriquecido a uma concentração de  $10 \text{ ng mL}^{-1}$  de melatonina e seus metabólicos (AFMK e AMK). A Figura 18, apresenta o gráfico de barras das recuperações relativas obtidas para melatonina e seus metabólitos após o processo de extração DPX. Nele é possível observar que o MIP apresenta valores de recuperação relativa superior quando comparado ao NIP, indicando a presença de sítios seletivos para essas moléculas conforme já repostado na literatura (PEŠIĆ et al., 2020).

**Tabela 7.** Área superficial, volume e diâmetro de poros para o NIP e o MIP

Amostra	Área superficial (m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )	Volume de poros (cm <sup>3</sup> g <sup>-1</sup> )	Diâmetro dos poros (Å)
NIP	180,69	0,88	195,69
MIP	230,43	0,94	163,19

Fonte: Próprio autor

**Figura 18.** Gráfico de barras indicando os valores de recuperação relativa para a extração DPX de melatonina e seus metabólitos em leite materno empregando MIP ou NIP como fase extratora.



Fonte: Próprio autor

#### 4.6. Fator de impressão molecular

Para determinar a seletividade do MIP para a extração da melatonina e seus metabólitos, foram calculados o coeficiente de distribuição ( $K_d$ ) (equação 2), a remoção percentual (%R) (equação 3) e o fator de impressão (FI) (equação 4), como observado na Tabela 8. Nela é possível observar que os valores de  $K_d$  variou para o MIP e o NIP, entre 0,036 e 0,047 (L g<sup>-1</sup>), e entre 0,009 e 0,028 (L g<sup>-1</sup>), respectivamente. Além disso, o percentual de remoção (%R) para o MIP variou de 71,75 a 93,66%, enquanto para o NIP essa variação foi de 11,78 a 56,27%. Valores mais alto de  $K_d$  e %R para o MIP indicam a presença de sítios seletivos para a melatonina e seus metabólitos. Adicionalmente, fator de impressão superior a 1 aponta que a capacidade de adsorção do MIP foi superior a encontrada para o NIP, devido as cavidades seletivas presentes no MIP.

De acordo com Pakade e colaboradores (PAKADE; MOLEFE; TAVENGWA, 2017), maiores valores de Kd para o MIP se comparado ao NIP e fator de impressão superior a 1,5, indicam que o MIP apresenta maior seletividade e afinidade para a molécula alvo. Além disso, valores inferiores a 1,5 para o FI e valores de Kd do MIP menor que o do NIP, é o um indício de uma baixa densidade de sítios de impressão, o que pode ser gerado por uma remoção incompleta do *template*, ou devido a expulsão do *template* durante o processo de formação do polímero pelo rearranjo molecular, resultando assim em sítios de adsorção heterogêneos.

**Tabela 8.** Valores de coeficiente de distribuição (Kd) e fator de remoção (%R) para o MIP e NIP, e o valor do fator de impressão (FI).

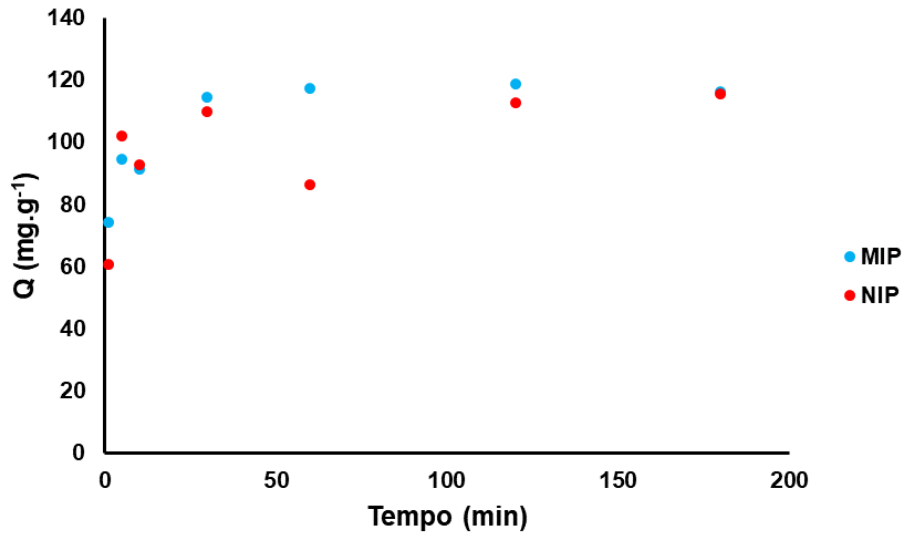
Analito	NIP		MIP		FI
	Kd (L g <sup>-1</sup> )	%R	Kd (L g <sup>-1</sup> )	%R	
melatonina	0,028	56,27	0,047	93,66	1,66
AFMK	0,006	11,78	0,039	77,08	6,54
AMK	0,009	18,66	0,036	71,75	3,84

Fonte: Próprio autor

#### 4.7. Efeito cinético do MIP

O efeito cinético do MIP, foi avaliado utilizando apenas a melatonina, devido a quantidade de padrão disponível e ao alto custo dos demais padrões (AFMK e AMK). Para o estudo cinético foram preparadas 10 mL de soluções padrões de melatonina (0,2 mg.mL<sup>-1</sup>) a elas foram adicionadas 10 mg de MIP ou NIP, essas soluções foram colocadas em agitação por 1, 5, 10, 30, 60, 120 e 180 min. A capacidade de adsorção (Q) desses materiais com o tempo foram calculadas com base na equação 5 e estão representadas na Figura 19. Nota-se que tanto o MIP quanto o NIP atingiram o equilíbrio com 30 min de agitação, sendo que não houve diferença quanto a capacidade de adsorção (Q) para o MIP e o NIP nessa concentração avaliada.

**Figura 19.** Gráfico da capacidade de adsorção (Q) de melatonina em função do tempo (min) para o MIP e o NIP



Fonte: Próprio autor

Para explorar os dados cinéticos obtidos para o MIP e NIP, foram realizados modelos cinéticos de pseudo 1<sup>o</sup> ordem (equação 10) e pseudo 2<sup>a</sup> ordem (equação 11). (MARTINS et al., 2020)

$$\ln(Q_e - Q_t) = \ln Q_e - K_1 * t \quad \text{Equação 10}$$

$$\frac{t}{Q_t} = \frac{1}{k_2 * Q_e^2} + \frac{t}{Q_e} \quad \text{Equação 11}$$

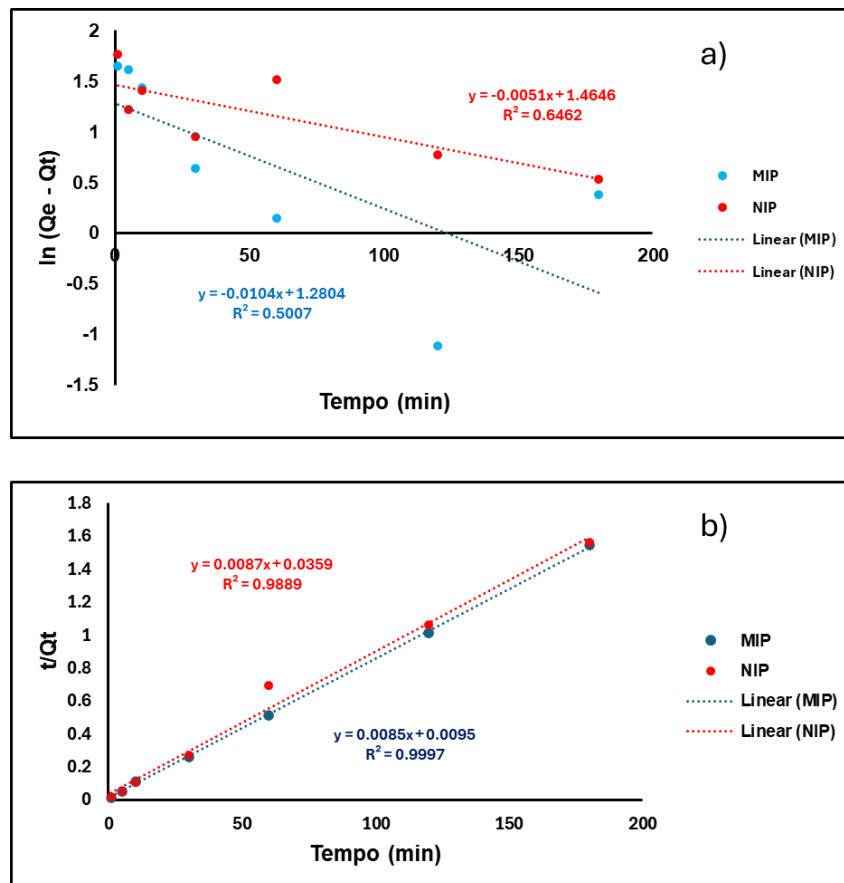
Em que  $Q_e$  é igual a capacidade de adsorção no equilíbrio,  $Q_t$  é a capacidade de adsorção em determinado tempo,  $t$  é igual ao tempo,  $K_1$  é a constante de pseudo 1<sup>a</sup> ordem e  $K_2$  é a constante da pseudo 2<sup>a</sup> ordem. Para calcular a taxa de pseudo 1<sup>o</sup> ordem foi construído um gráfico de  $\ln(Q_e - Q_t)$  em função de  $t$ , já para calcular a taxa de pseudo 2<sup>o</sup> ordem foi construído um gráfico de  $t/Q_t$  em função de  $t$ , como pode ser observado na Figura 20.

A Figura 20a, representa o gráfico da função de pseudo 1<sup>o</sup> ordem para o MIP e o NIP, nele é possível observar que a equação linear para o MIP e o NIP apresentou coeficiente de determinação ( $r^2$ ) inferior a 0,65, indicando que esses dados não se comportam linearmente. Mesmo assim foram realizados cálculos para determinar os valores da capacidade de adsorção no equilíbrio ( $Q_e$ ) e a constante de primeira ordem ( $K_1$ ) para o MIP e o NIP, no qual foi obtido os seguintes valores 19,07 mg g<sup>-1</sup>, 0,024 min<sup>-1</sup> e 29,15

mg g<sup>-1</sup>, 0,012 min<sup>-1</sup>, respectivamente. Esses valores de Qe encontra-se muito distante do valor experimental, conforme pode ser observado na Figura 19 em que o Qe está próximo de 119 mg g<sup>-1</sup>, indicando que a cinética de adsorção do MIP e NIP não é explicado por um modelo de pseudo 1º ordem.

A Figura 20b, apresenta o gráfico da função de pseudo 2º ordem para o MIP e o NIP, nota-se que equação linear para o MIP e o NIP apresentou coeficiente de determinação (r<sup>2</sup>) próxima a 0,99, indicando que esses dados apresentam comportamento linear. Foram realizados cálculos para determinar os valores de capacidade de adsorção no equilíbrio e a constante de segunda ordem para o MIP e o NIP, no qual obtive os seguintes valores de Qe 117,65 e 114,94 mg g<sup>-1</sup> e K2 igual a 0,007 e 0,002 g mg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>, respectivamente. Nota-se que os valores de Qe encontrados para a equação de pseudo 2º ordem está próximo do observado na Figura 19, Qe igual a 119 mg g<sup>-1</sup>, indicando que a cinética de adsorção do MIP e NIP se comportar com base no modelo de pseudo 2º ordem.

**Figura 20.** Gráfico para os modelos cinéticos do MIP e NIP. a) gráfico da função de pseudo 1º ordem; b) gráfico da função de pseudo 2º ordem.

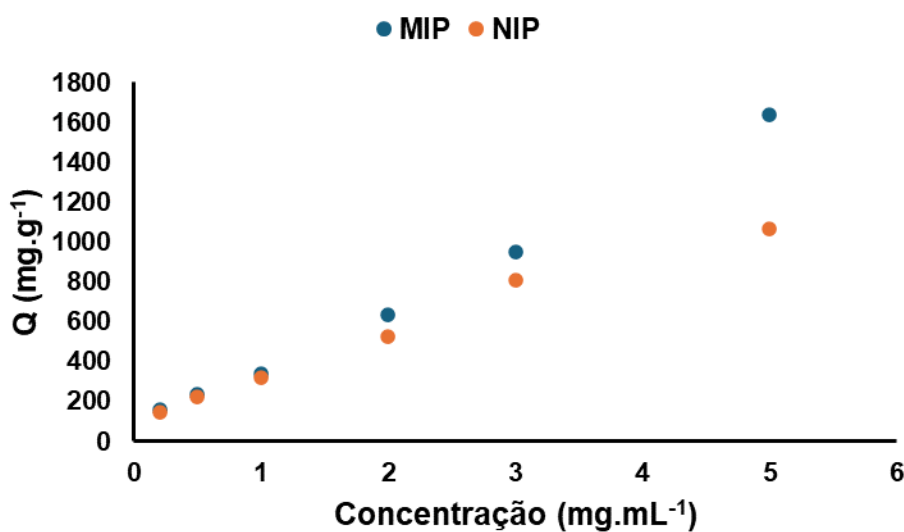


Fonte: Próprio autor

#### 4.8. Adsorção do MIP

A capacidade de adsorção do MIP em função da concentração da molécula alvo, foi novamente realizada utilizando apenas a melatonina, pela mesma justificativas apresentadas no tópico 4.7. Para esse estudo foram preparadas 10 mL de solução padrão de melatonina em água na qual sua concentração variou de 0,2 a 5 mg mL<sup>-1</sup>, a ela foi adicionada 10 mg do MIP ou NIP, essa mistura foi colocada em agitação por 24 h. A capacidade de adsorção desses materiais em função da concentração foi calculada utilizando a equação 5 e estão representados na Figura 21. Na qual é possível observar que o MIP apresentou maior capacidade de adsorção se comparado ao NIP à medida que a concentração de melatonina aumentava, indicando assim a presença de cavidades seletivas no MIP para a melatonina.

**Figura 21.** Gráfico da capacidade de adsorção do MIP e NIP (Q) em função da concentração de melatonina em mg.mL<sup>-1</sup>.



Fonte: Próprio autor

Alguns modelos teóricos de adsorção foram aplicados a esses dados, para ajuste experimentais, como o caso das isotermas de Freundlich (Figura 22) e as isotermas de Langmuir (Figura 23). Estes ajustes permitiram a determinação de parâmetros relacionados ao equilíbrio de adsorção, a quantidade máxima de adsorção de melatonina para o MIP e o NIP e a identificação de processos físico-químicos relacionados a adsorção, conforme representado na Tabela 9.

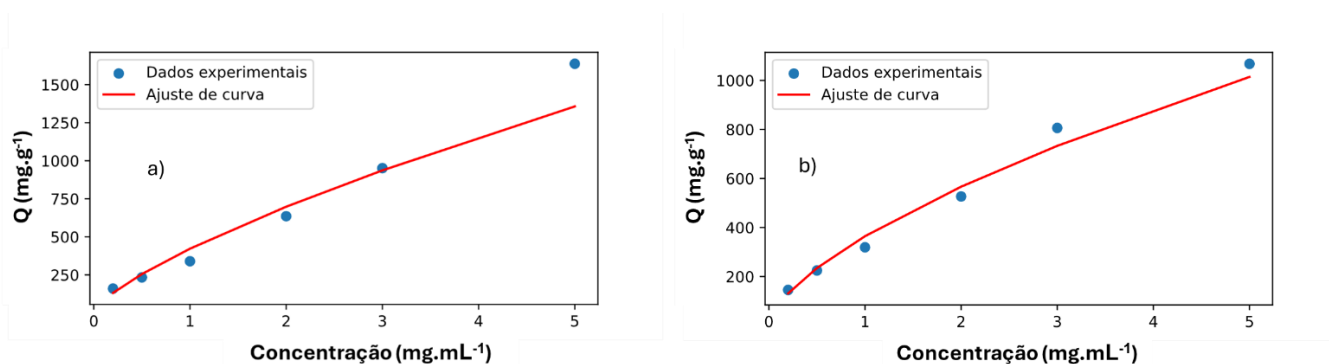
O modelo de Freundlich se relaciona a adsorção multicamadas em um sólido heterogêneo, ele é descrito com base na equação 12.

$$\ln Q_e = \ln K_f + \frac{1}{n} * C_e \quad \text{Equação 12}$$

Em que  $Q_e$  é a capacidade de adsorção no equilíbrio ( $\text{mg.g}^{-1}$ ),  $C_e$  é a concentração de melatonina no equilíbrio ( $\text{mg mL}^{-1}$ ),  $1/n$  constante de heterogeneidade da superfície e  $K_f$  a constante da capacidade de adsorção de Freundlich ( $(\text{mg g}^{-1}) (\text{mL mg}^{-1})^{1/n}$ ).

A Figura 22, apresenta o gráfico de adsorção do MIP e NIP, ajustado de acordo com o modelo de Freundlich. Com base na equação do modelo ajustado é possível obter os valores referentes ao  $K_f$  e ao  $n$ , conforme apresentado na tabela 9. O valor de  $n$  irá indicar o grau de não linearidade entre a concentração da solução e a de adsorção, quando  $n = 1$  a adsorção é linear,  $n < 1$  adsorção é um processo químico e  $n > 1$  a adsorção é um processo físico (POURFARZIB et al., 2015). De acordo com a Tabela 9, o MIP apresentou  $n = 1,37$  enquanto o do NIP foi 1,57, indicando uma presença maior de sítios seletivos no MIP se comparado ao NIP, por apresentar valor de  $n$  menor (GARCINUÑO et al., 2023).

**Figura 22.** Gráfico de adsorção ajustado de acordo com o modelo de Freundlich para a) MIP e o b) NIP.



Fonte: Próprio autor

O modelo de Langmuir está relacionado a adsorção monocamada em uma superfície uniforme com um número limitado de sítios de adsorção. De acordo com esse modelo caso um sítio esteja em uso nenhuma sorção adicional pode acontecer naquele sítio, além disso, ela é baseada na suposição de que o adsorvente é uma estrutura homogênea onde os todos os sítios de adsorção são idênticos e energeticamente equivalentes. Esse modelo é descrito com base na equação 13. (POURFARZIB et al., 2015)

$$\frac{C_e}{Q_e} = \left( \frac{1}{Q_{max} * K_L} \right) + \left( \frac{C_e}{Q_{max}} \right) \quad \text{Equação 13}$$

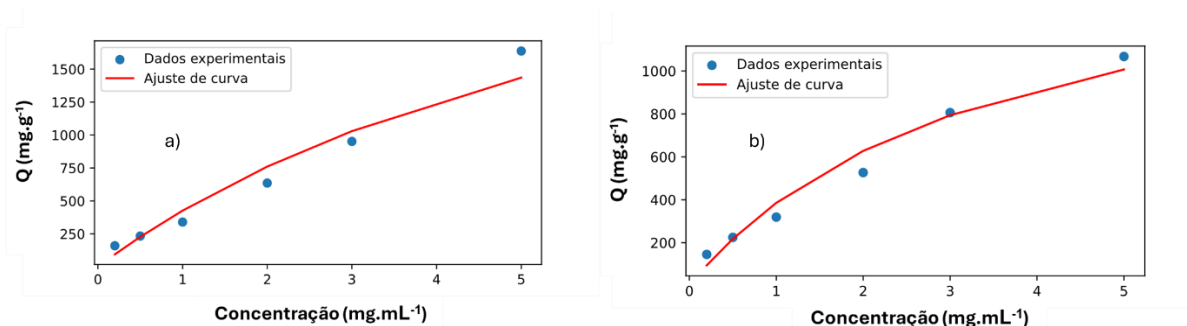
Em que  $Q_e$  é a capacidade de adsorção no equilíbrio ( $\text{mg g}^{-1}$ ),  $C_e$  é a concentração de melatonina no equilíbrio ( $\text{mg mL}^{-1}$ ),  $Q_{max}$  é a capacidade máxima de adsorção ( $\text{mg g}^{-1}$ ) e  $K_L$  é a constante de Langmuir ( $\text{mL mg}^{-1}$ ).

A Figura 23, apresenta o gráfico de adsorção do MIP e NIP, ajustado de acordo com o modelo de Langmuir. Com base na equação do modelo ajustado de Langmuir é possível determinar o valor de  $Q_{max}$  e o de  $K_L$ , presente na Tabela 9. O MIP apresentou  $Q_{max}$  de  $3514,79 \text{ mg g}^{-1}$  enquanto o  $Q_{max}$  do NIP foi de  $1686,04 \text{ mg g}^{-1}$ , indicando que o MIP apresenta maior capacidade adsorptiva se comparado ao NIP, devido a presença de sítios seletivos a melatonina nesse polímero (CHENG et al., 2022). Um outro parâmetro que pode ser obtido utilizando o modelo de Lagmuir é o RL que descreve a natureza do processo de adsorção, obtido pela equação 14.

$$RL = \frac{1}{1+(K_L * C_0)} \quad \text{Equação 14}$$

Em que  $K_L$  é a constante de Langmuir ( $\text{mL.mg}^{-1}$ ) e  $C_0$  a concentração inicial do analito ( $\text{mg.mL}^{-1}$ ). Quando  $RL = 0$  o processo de adsorção é irreversível, quando  $0 < RL < 1$  o processo de adsorção é favorável,  $RL = 1$  o processo de adsorção é linear e quando  $RL > 1$  o processo de adsorção é desfavorável. Sendo assim, foi calculado o RL para o MIP e o NIP, no qual foi obtido os seguintes valores 0,97 e 0,94 respectivamente, indicando que o processo de adsorção é favorável para o MIP e o NIP. (GARCINUÑO et al., 2023)

**Figura 23.** Gráfico de adsorção ajustado de acordo com o modelo de Langmuir para a) MIP e o b) NIP.



Fonte: Próprio autor

**Tabela 9.** Parâmetros obtidos nos ajustes pelos modelos de Freundlich e de Langmuir

Polímero	Modelo de Freundlich			Modelo de Langmuir		
	R <sup>2</sup>	Kf ((mg g <sup>-1</sup> ) (mL mg <sup>-1</sup> ) <sup>1/n</sup> )	n	R <sup>2</sup>	Qmax (mg g <sup>-1</sup> )	KL (mL mg <sup>-1</sup> )
MIP	0,9423	422,03	1,37	0,9528	3515,79	0,14
NIP	0,9813	364,58	1,57	0,9675	1686,04	0,30

Fonte: Próprio autor

De acordo com Nergiz e colaboradores (NERGIZ; ZENGER; PEŞINT, 2024), o modelo de adsorção com maior coeficiente de determinação ( $r^2$ ) indicará o que melhor representa os seus dados experimentais, sendo que MIPs ajustados com o modelo de Langmuir apresenta processo de adsorção de monocamada em uma superfície homogênea. Conseqüentemente, o MIP de 1-Vn reportado nessa tese, apresenta seu processo de adsorção mais bem descrito pelo modelo de Langmuir ( $r^2 = 0,9528$ ), sendo assim, o processo de adsorção desse material ocorre em uma monocamada de superfície homogênea, na qual um sítio de interação só pode interagir com um único composto.

#### **4.9. Otimização nas condições de extração DPX de melatonina e seus metabólitos em leite materno**

O procedimento para extração DPX de melatonina e seus metabólicos foi otimizada de maneira univariada e multivariada, devido a variações quanto ao número de níveis avaliados. As otimizações univariadas foram realizadas empregando apenas a melatonina, devido à baixa quantidade de padrão disponível de AFMK e AMK, além do alto custo para sua obtenção, para a otimização multivariada foi empregada a melatonina e seus metabólitos (AFMK e AMK) devido à baixa concentração avaliada ( $100 \text{ pg mL}^{-1}$ ) e por se tratar da última etapa da otimização

##### **4.9.1. Otimizações univariadas**

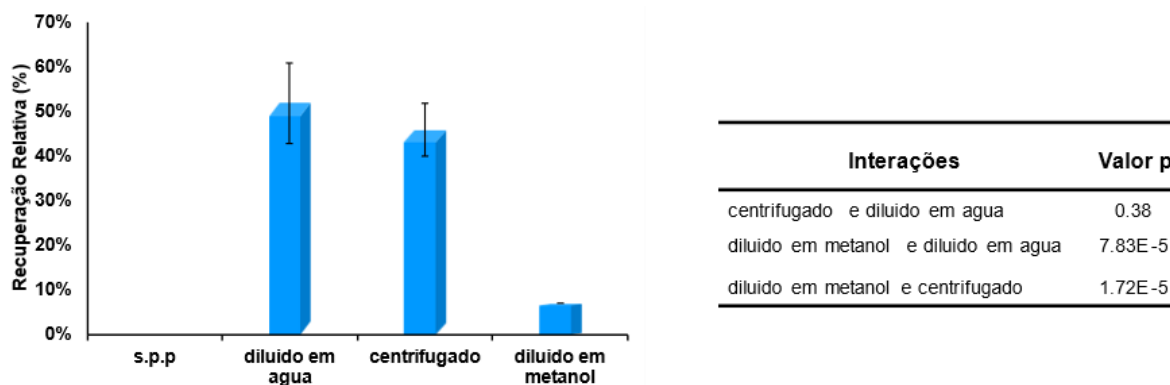
As otimizações univariadas foram realizadas empregando 1 mL de leite materno enriquecido a concentração de  $10 \text{ ng mL}^{-1}$  de melatonina e empregando acetonitrila como solvente de dessorção.

Conforme reportado por diferentes autores, análises de matrizes complexas podem exigir algum preparo prévio da amostra antes da etapa de extração, uma vez que a

quantidade de interferentes presentes nessas matrizes pode influenciar negativamente na resposta analítica, além de ocasionar possíveis danos ao sistema de extração como por exemplo, entupimento da ponteira durante o processo de extração. (SOARES et al., 2018; SUWANVECHO; KRČMOVÁ; ŠVEC, 2023)

Sendo assim, foi realizada uma otimização quanto a necessidade de realização de um preparo prévio do leite anterior ao processo de extração DPX, no qual foram avaliados os seguintes parâmetros: sem preparo prévio, diluído em água (proporção 1:1), centrifugado a 10000 rpm (10 min) e diluído 1:1 em metanol. Conforme pode ser observado na Figura 24, não foi possível obter resposta para extração DPX sem o preparo prévio do leite, devido ao entupimento da ponteira durante o processo de extração. Adicionalmente, é possível notar valores de recuperação relativa superiores para a diluição do leite em água 1:1 e para a centrifugação a 10000 rpm (10 min), não havendo diferença significativa entre elas, apresentando valor de p maior que 0,05, sendo assim optou-se por diluir o leite com água por demandar menos tempo e utilizar um solvente não tóxico.

**Figura 24.** Gráfico de barras indicando os valores de recuperação relativa para a otimização do preparo prévio do leite para extração DPX, para os parâmetros sem preparo prévio (spp), diluído em água (proporção 1:1), centrifugado a 10000 rpm (10 min) e diluído 1:1 em metanol. Além, dos valores de p do teste ANOVA.

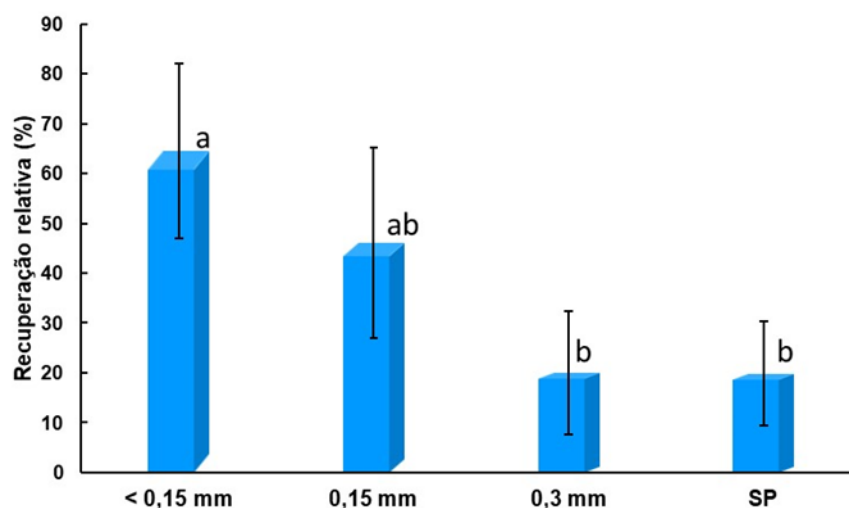


Fonte: Próprio autor

Os MIPs sintetizados por polimerização em massas, como os sintetizados nesse estudo, necessitam passar por uma etapa de moagem e peneiramento após a sua síntese, para garantir maior homogeneidade desses materiais (MURDAYA et al., 2022). Conseqüentemente, foi realizado um estudo para determinar a granulometria do MIP ideal para a realização da extração DPX, no qual foram avaliados os seguintes parâmetros: diâmetro 0,3 mm, 0,15 mm, inferior à 0,15 mm e sem peneirar. De acordo com a Figura 25, é possível observar que o MIP com granulometria inferior à 0,15 mm apresentou maior recuperação relativa o que o demonstra ser ideal para o processo de extração DPX.

Entretanto, devido à baixa granulometria (inferior à 0,15 mm) desse material houve perda de fase extratora durante o processo de extração, tornando inviável a utilização de MIPs com granulometria inferior à 0,15 mm. Sendo assim, foi escolhido o MIP com granulometria de 0,15 mm como sendo ideal para a extração DPX, uma vez que seus valores de recuperação relativa não diferem significativamente do inferior à 0,15 mm que apresentou melhor resultado.

**Figura 25.** Gráfico de barras das recuperações relativas para as extrações DPX de melatonina em leite materno utilizando diferentes granulometria de MIPs ( inferior à 0,15 mm (< 0,15 mm), 0,15 mm, 0,3 mm e sem peneirar (SP)).



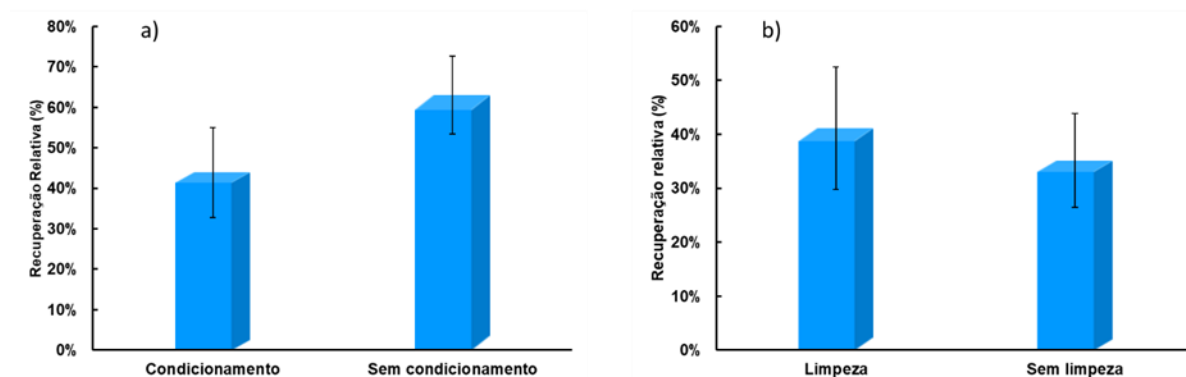
\* Letras iguais significam que não há diferença entre eles, quando a letra for diferente há diferença significativa.

Fonte: Próprio autor

Na extração DPX a etapa de condicionamento e de limpeza não é obrigatória e irá depender da fase extratora utilizada e da complexidade da amostra avaliada (PINTO; QUEIROZ, 2015; SUWANVECHO; KRČMOVÁ; ŠVEC, 2023). Nesse sentido, a necessidade de realização das etapas de condicionamento e limpeza também foram otimizadas. A Figura 26, apresenta os valores de recuperação relativa para a extração DPX de melatonina em leite materno quanto a realização ou não das etapas de condicionamento e limpeza. Observa-se na Figura 26a), que não há diferença significativa nas recuperações relativas quanto a realização ou não da etapa de condicionamento (valor  $p = 0,09$ ), sendo assim optou-se por não realizar essa etapa, diminuindo o tempo de extração e o volume de solvente gasto. Note-se na Figura 26b), que também não houve diferença significativa nas recuperações relativas entre a realização ou não da etapa de limpeza (valor  $p = 0,51$ ), nesse caso optou-se pela realização da etapa de limpeza devido à complexidade da amostra (leite

materno), evitando a presença de contaminantes na análise por LC que possam vir a diminuir a vida útil e causar possíveis danos a coluna cromatográfica.

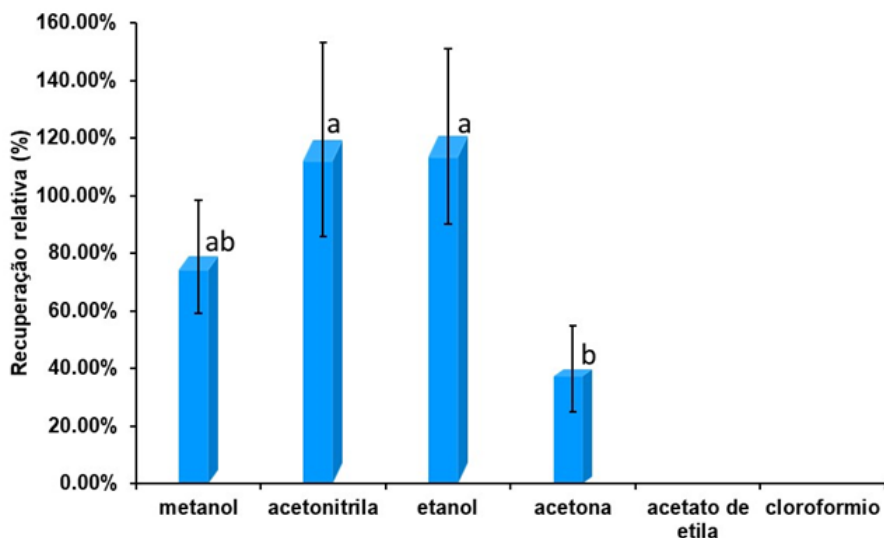
**Figura 26.** Gráfico de barras dos valores de recuperação relativa para extração DPX de melatonina em leite materno. a) quanto a realização ou não da etapa de condicionamento; b) quanto a realização ou não da etapa de limpeza.



Fonte: Próprio autor

Os solventes utilizados para a eluição dos analitos foram otimizadas. A Figura 27, apresenta o gráfico de barras das recuperações relativas para a extração DPX de melatonina em leite materno utilizando diferentes solventes (metanol, acetonitrila, etanol, acetona, acetato de etila e clorofórmio) para eluição do analito, ao final do processo de extração os solventes foram evaporados e a amostra foi ressuspensa em 500  $\mu$ L da fase móvel. Observe-se que os valores de recuperação relativa foram maiores quando realizadas extrações utilizando acetonitrila e etanol como solvente de eluição, não havendo diferença significativa entre eles, sendo assim optou-se por utilizar acetonitrila como solvente de eluição, por estar presente na fase móvel, além de ter menor custo (R\$ 144,00 1 L) (MERCK, 2024a) se comparado ao etanol (R\$ 760,00 1 L) (MERCK, 2024b). Além disso, o acetato de etila e o clorofórmio (solventes apolares) não interagiram com a melatonina há ponto de conseguir eluí-la, obtendo valores de recuperação relativa igual a 0. De acordo com a literatura, a melatonina irá eluir mais facilmente em solventes com características polares se comparado a solventes com características apolares (DIL et al., 2021; ESEN; OSMAN; DEMIR, 2021).

**Figura 27.** Gráfico de barras das recuperações relativas para a extração DPX de melatonina em leite materno utilizando diferentes solventes de eluição, metanol, acetonitrila, etanol, acetona, acetato de etila e clorofórmio.



\* Letras iguais significa que não há diferença entre eles, quando a letra for diferente há diferença significativa.

Fonte: Próprio autor

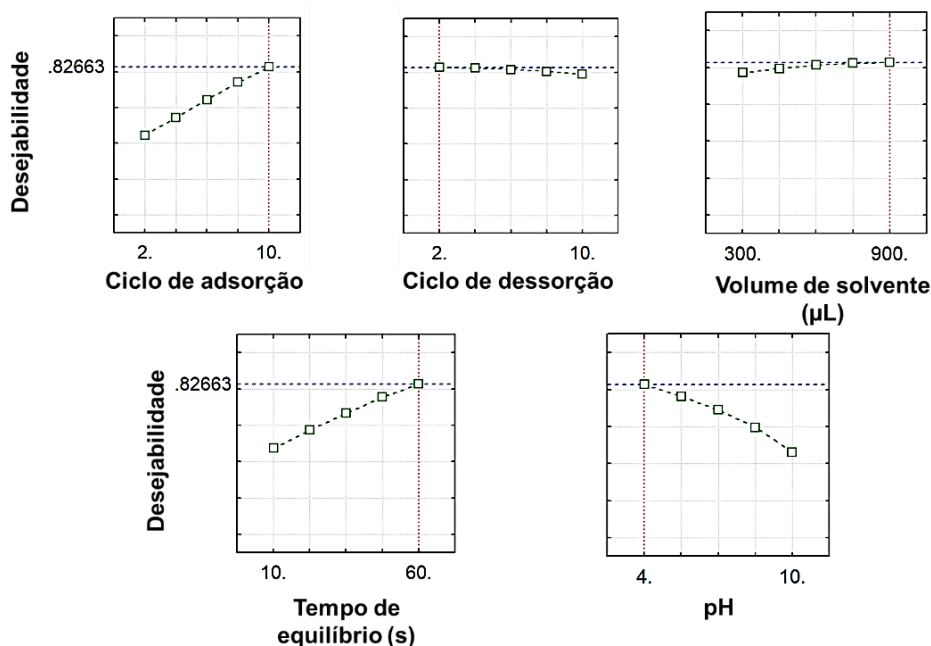
#### 4.9.2. Otimização multivariada

A otimização multivariada foi realizada utilizando um planejamento fatorial fracionário  $2^{5-1}$ , que tem como característica demandar menor quantidade de experimentos se comparado ao planejamento fatorial completo (exemplo:  $2^5$ ). Entretanto, nesse planejamento ocorre perda de informações quanto a algumas interações, para esse caso há perda nas interações de 3º grau (exemplo: interação entre tempo de equilíbrio, volume de solvente e pH da amostra).

No planejamento fatorial  $2^{5-1}$ , foi avaliada a área obtida no cromatograma para a melatonina e seus metabólitos (AFMK e AMK), conforme as variáveis apresentadas na Tabela 3. Para identificar as variáveis que influenciaram de maneira significativa nas respostas foi construído um gráfico de perfis de desejabilidade (que levará em consideração as respostas obtidas para todos os analitos avaliados), como pode ser observado na Figura 28. Nele é possível observar que o número de ciclos de adsorção, o pH da amostra e o tempo de equilíbrio foram as variáveis que influenciaram de maneira significativa na resposta, por apresentar maior variação na desejabilidade. No caso do volume de solvente de dessorção e o número de ciclos de dessorção não houve variação significativa para a desejabilidade, sendo assim, os níveis avaliados para essas variáveis não interferiram de maneira significativa nas áreas do cromatograma referente a melatonina e seus metabólitos, logo é ideal que o número de ciclos e do volume de solvente de dessorção

seja o menor dentro dos avaliados, no caso 2 ciclos de dessorção e 300  $\mu\text{L}$  de solvente de dessorção, por diminuir o tempo de análise e o solvente gasto.

**Figura 28.** Gráfico do perfil de desejabilidade para as variáveis ciclo de adsorção, ciclo de dessorção, volume de solvente, tempo de equilíbrio e pH.



Fonte: Próprio autor

Para construir uma superfície de resposta para as variáveis que interferiram de maneira significativa na extração DPX da melatonina e os metabólitos, foi realizado um planejamento composto central (CCD, *central composite design*) com variável  $2^3$ ,  $\alpha \pm 1,68$  e 5 pontos centrais, para as variáveis ciclo de adsorção (7, 8, 9, 10, 11), tempo de equilíbrio (30, 40, 50, 60 e 70 s) e pH da amostra (3, 4, 5, 6, 7), como pode ser observado na Figura 29.

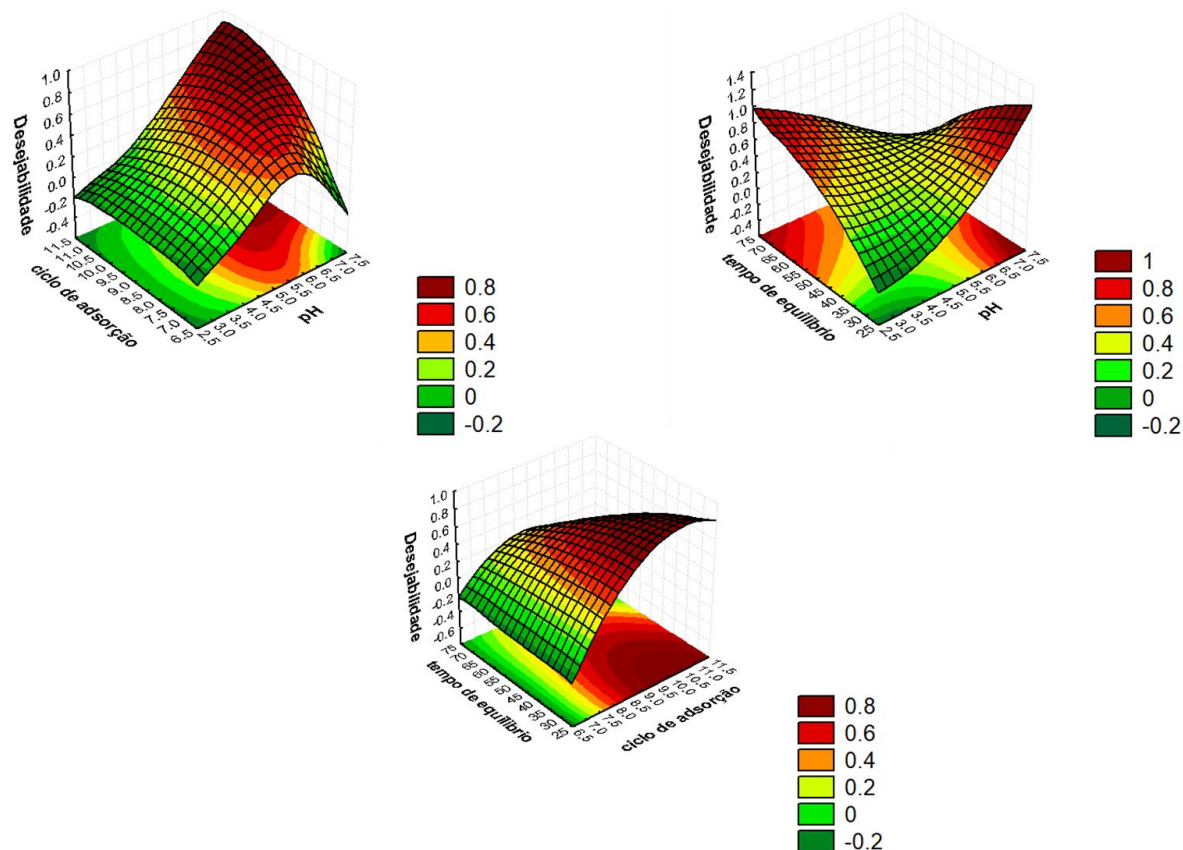
A realização de vários ciclos de adsorção irá contribuir para a adsorção da amostra na fase extratora, aumentando a transferência de massa, sendo assim a realização de vários ciclos tendem a contribuir para uma melhor recuperação (TAN; LEE, 2021b). Como pode ser observado na Figura 29, a melhor desejabilidade para a extração DPX da melatonina e seus metabólitos foi obtida quando realizados 11 ciclos de adsorção, indo ao encontro com o esperado para essa técnica de extração.

O tempo de equilíbrio também contribuirá para uma melhora na eficiência da extração, uma vez que a extração por DPX é uma técnica que envolve o processo de partição, ou seja, leva em consideração o equilíbrio entre a fase extratora e as moléculas

alvos, apesar de ser uma técnica que não demanda um tempo de equilíbrio elevado devido a mistura dinâmica entre o sorvente e a amostra ou o solvente de dessorção, normalmente é necessário um pequeno intervalo de tempo para que esse equilíbrio seja atingido (OLIVEIRA; LANÇAS, 2023). A Figura 29 mostra que o equilíbrio foi obtido quando o tempo de equilíbrio foi de 30 s, sendo esse considerado ideal para a extração da melatonina, AFMK e AMK.

A influência do pH da amostra, na resposta analítica irá depender da fase extratora e dos analitos. Para o MIP com monômero funcional de 1-Vn ( $pK_a = 6,07$ ), a melhor resposta foi obtida quando o pH da amostra estava em 7, como a interação entre o 1-Vn e a melatonina ( $pK_a = 15,8$ ) se dá por ligação de hidrogênio como demonstrado na seção 4.4., é recomendado que o monômero funcional e os analitos estejam em sua forma molecular, logo, quando a extração foi realizada em pH ácido, houve uma diminuição na resposta analítica para a melatonina e seus metabólitos.

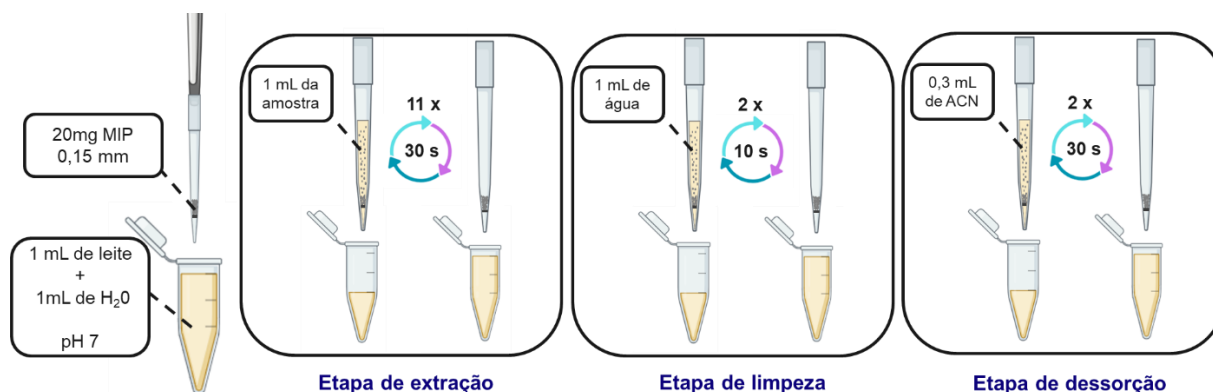
**Figura 29.** Gráfico de superfície do planejamento CCD, em que foi avaliado o número de ciclos de adsorção, tempo de equilíbrio (s) e o pH da amostra, para extração DPX de melatonina e seus metabólitos



Fonte: Próprio autor

Conseqüentemente, a melhor condição para a extração DPX-MIP para a melatonina e os metabólitos em leite materno, será aquela realizada com a amostra diluída em água, com pH ajustado para 7, utilizando 11 ciclos de adsorção, realizando a etapa de limpeza com 2 ciclos de água, e utilizando 2 ciclos de dessorção com 300 µL de acetonitrila, como pode ser observado na figura 30.

**Figura 30.** Esquema representando o processo de extração DPX-MIP para a melatonina e seus metabólitos, após as otimizações.



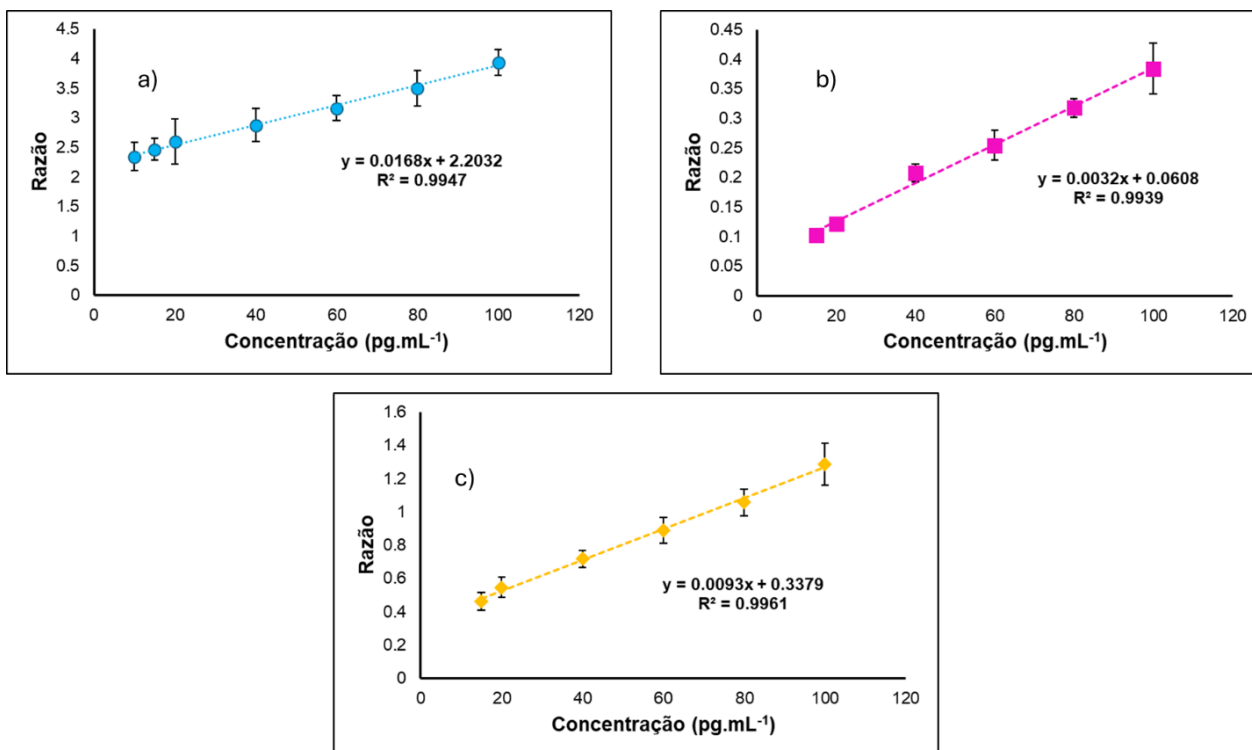
Fonte: Próprio autor

#### 4.10. Parâmetros analíticos

Como descrito na seção 3.10, ao método já otimizado foi adicionado o padrão interno (melatonina-d4), para corrigir variações que possam vir a interferir no método analítico. Para definir se a metodologia de análise DPX-MIP/LC-MS é eficiente para a determinação da melatonina e seus metabólitos em leite materno, foram avaliadas algumas figuras mérito, como a linearidade, efeito matriz, exatidão, precisão, limite de detecção e quantificação. Todas as figuras de méritos avaliadas seguiram a RDC nº 166, de 24 de julho de 2017 (BRASIL, 2017), estabelecida pela ANVISA.

Para avaliar a linearidade do método dentro da faixa de trabalho escolhida de 10 a 100 pg mL<sup>-1</sup> para a melatonina e de 15 a 100 pg mL<sup>-1</sup> para o AFMK e o AMK, no qual foram avaliadas as seguintes concentrações em leite materno 10, 15, 20, 40, 60, 80 e 100 pg mL<sup>-1</sup>, com a concentração do PI fixa em 100 pg mL<sup>-1</sup>, cada ponto foi analisado em quintuplicada. A Figura 31, apresenta a curva analítica obtida para a melatonina e seus metabólitos (AFMK e AMK). Como pode ser observado, ambas curvas apresentaram coeficiente de determinação superior a 0,99 e coeficiente angular diferente de 0, estando de acordo com as exigências da ANVISA.

**Figura 31.** Curva analítica para a) melatonina, b) AFMK e c) AMK.

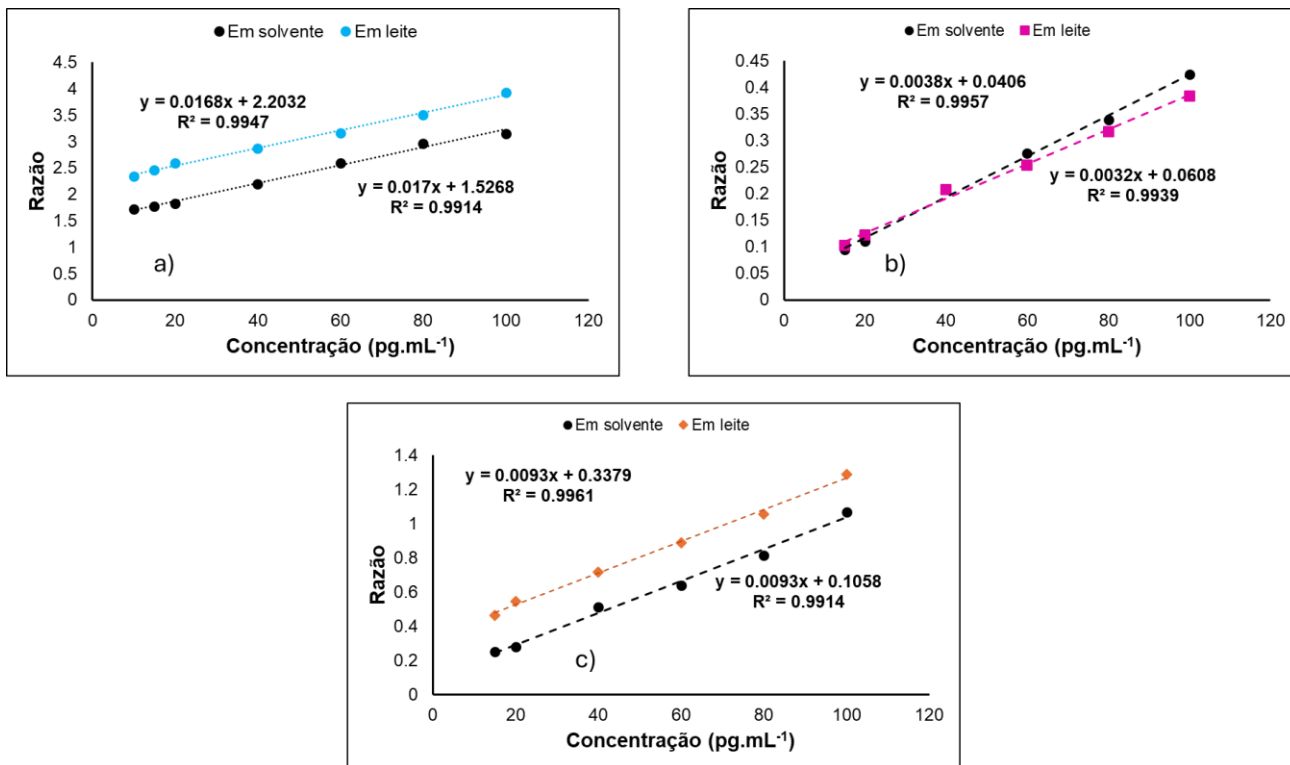


Fonte: Próprio autor

Para avaliar o efeito matriz foi construída uma curva empregando apenas os padrões de melatonina e os metabólitos, a qual foi comparada com uma curva obtida através da extração DPX-MIP de leite materno enriquecido com melatonina e seus metabólitos. A faixa de trabalho avaliada foi a mesma da empregada no teste de linearidade para a melatonina, AFMK e AMK, com cada um dos pontos sendo avaliados em quintuplicada. A comparação entre essas curvas está representada na Figura 32. Note que a curva referente a melatonina em solvente e em leite (Figura 32a) são paralelas indicando que não há efeito matriz. Para comprovar essa afirmativa foi realizado um test-t com intervalo de confiança de 95 % para as inclinações, no qual foi obtido um valor p de 0,794 indicando que não há diferença significativa entre elas, logo não há efeito matriz. Para as curvas referentes ao AFMK (Figura 32b), é possível perceber que elas se cruzam indicando que pode haver a influência da matriz na resposta analítica. Para comprovar essa afirmativa novamente foi realizado um test-t com intervalo de confiança de 95%, no qual foi obtido um valor p de 0,056, como o valor p é superior a 0,050, é possível afirmar que a matriz não irá influenciar de maneira significativa na resposta. Já as curvas referentes ao AMK (Figura 32 c) são paralelas, o que é um indício de que não há efeito matriz, com a realização do test-t

com intervalo de confiança de 95%, obteve-se um valor p de 0,166, indicando que não há efeito matriz.

**Figura 32.** Curvas para avaliação do efeito matriz para a) melatonina, b) AFMK e c) AMK



Fonte: Próprio autor

A precisão e a exatidão do método foram avaliadas utilizando leite materno enriquecido na concentração de 10, 50 e 100 pg mL<sup>-1</sup> para a melatonina e de 15, 50 e 100 pg mL<sup>-1</sup> para o AFMK e AMK. A exatidão do método será medida com base na recuperação (REC) conforme a equação 6. A precisão do método será avaliada através da análise das concentrações nos níveis baixos, médio e alto, em três dias distintos, sendo representada pelo desvio padrão relativo (DPR) conforme a equação 7. A Tabela 10, apresenta os valores de recuperação (REC) e desvio padrão relativo (DPR), para a melatonina e seus metabólitos, para os níveis baixos, médio e alto, para as análises realizadas em 3 dias distintos. Nela é possível observar que a REC e o DPR da melatonina variaram de 87,0 a 109,1 % e de 6,5 a 13,0 %, respectivamente. A REC e o DPR para o AFMK variaram de 89,8 a 101,5% e de 2,9 a 13,2 %, respectivamente, já os valores de REC e DPR para o AMK variou de 92,5 a 111,2 % e de 2,8 a 14,0 %, respectivamente. Os valores de REC e DPR, encontrados para a melatonina e seus metabólitos (AFMK e AMK) estão dentro dos estabelecidos pela RDC nº 166, de 24 de julho de 2017, que estabelece que a REC do

método pode variar de 80 a 120% e deve apresentar DPR de no máximo 15%, demonstrando que o método proposto para a determinação da melatonina e seus metabólitos apresenta precisão e exatidão adequados.

**Tabela 10.** Valores de recuperação (REC) (%), desvio padrão relativo (DPR) (%), para as análises realizadas em níveis baixo (10 pg mL<sup>-1</sup>), médio (50 pg mL<sup>-1</sup>) e alto (100 pg mL<sup>-1</sup>) em 3 dias distintos, além dos valores de limite de quantificação (LOQ) e de detecção (LOD), para a melatonina, o AFMK e o AMK.

Analito	Conc. (pg.mL <sup>-1</sup> )	Análise intradias		Análise interdias		LQ (pg mL <sup>-1</sup> )	LD (pg mL <sup>-1</sup> )
		REC (%)	DPR (%)	REC (%)	DPR (%)		
Melatonina	10	109,0	6,6	93,7	10,8		
	50	107,8	9,8	100,6	6,5	10	3,8
	100	87,0	13,0	95,0	6,1		
AFMK	15	95,3	9,9	95,6	13,7		
	50	89,8	6,5	101,5	3,6	15	0,5
	100	90,1	6,0	97,8	2,9		
AMK	15	111,2	13,2	91,7	7,8		
	50	92,5	2,8	92,8	14,0	15	2,6
	100	95,2	5,0	95,4	3,2		

Fonte: Próprio autor

Como descrito na seção 3.10, os valores de limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ), foram determinados com base na curva analítica, conforme apresentado pela equação 8 e 9, respectivamente. A Tabela 10, apresenta os limites de detecção para a melatonina e seus metabólitos (AFMK e AMK) de 3,8 , 0,5 e 2,6 pg mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Já o limite de quantificação calculado para a melatonina foi de 11,4 pg mL<sup>-1</sup>, e seus metabólitos AFMK e AMK apresentaram limites de 1,5 e 7,9 pg mL<sup>-1</sup>. Entretanto, definiu-se como limite de quantificação o valor mínimo de concentração em que os analitos apresentam precisão, exatidão e relação sinal/ruído superior a 10, sendo assim foi definido que o LQ para a melatonina é 10 pg mL<sup>-1</sup> e para os metabólitos AFMK e AMK é 15 pg mL<sup>-1</sup>.

Sendo assim, o método DPX-MIP/LC-MS para determinação de melatonina e seus metabólitos em leite materno, se coloca como uma alternativa interessante para essas análises, apresentando valores de linearidade, precisão e exatidão dentro do exigido, com uma faixa de trabalho que permite a detecção desse analitos em leite materno. Além disso,

a metodologia de extração aqui aplicada, demanda pouco volume de amostra (1 mL), baixo tempo de extração (7 min) e apresenta baixo consumo de solvente orgânico (300 µL). Para avaliar a eficiência desse método frente a outros reportados na literatura para determinação da melatonina e seus metabólitos, foi construída a Tabela 11.

**Tabela 11.** Comparação entre diferentes metodologias para determinação de melatonina (Mel.) e metabólitos.

Analito	Matriz	Preparo da amostra	Tempo		LQ (ng mL <sup>-1</sup> )	Referência
			de análise (min)	Rec. (%)		
Mel.	Planta, urina e plasma	DSPE-MIP	50	91 – 105	0,156	(DIL et al., 2021)
Mel.	planta	SPE-MIP	244	90,7 – 103	79	(ESEN; OSMAN; DEMIR, 2021)
Mel.	Leite	SPE	40	90 – 94,58	0,01	(KARUNANITHI et al., 2014)
Mel.	Leite	Precipitação	45	101,7	0,001	(JIN et al., 2021)
Mel.; AFMK; AMK	Fluido folicular	LLE	27	80 – 108	0,01	(COELHO et al., 2013)
Mel.	Água e urina	SPE	142	94 – 104,6	0,008	(MAGLIOCCO et al., 2021)
Mel.	Soro	LLE	38	90 – 110	0,026	(LOVRIĆ et al., 2024)
Mel.; AFMK; AMK	Leite	DPX-MIP	13	87- 109,1	0,01	Este trabalho

SPE: *Solid Phase Extraction*; DSPE: *Dispersive Solid Phase Extraction*; LLE: *Liquid – Liquid Extraction*

Fonte; Próprio autor

A Tabela 11, apresenta diferentes metodologias desenvolvidas para determinação de melatonina em diferentes matrizes. Como pode ser observado os valores de recuperação e de limite de detecção, são similares ao encontrado pelo autor, indicando a aplicabilidade da metodologia DPX-MIP/LC-MS para a análise da melatonina e seus metabólitos. Além disso, a metodologia empregando DPX-MIP apresentou menor tempo de

análise se comparada as demais metodologias apresentadas na Tabela 11, tendo alta frequência analítica, o que garante alta aplicabilidade dessa metodologia para determinação da melatonina e metabólitos em análises de rotinas.

#### **4.11. Métrica Verde**

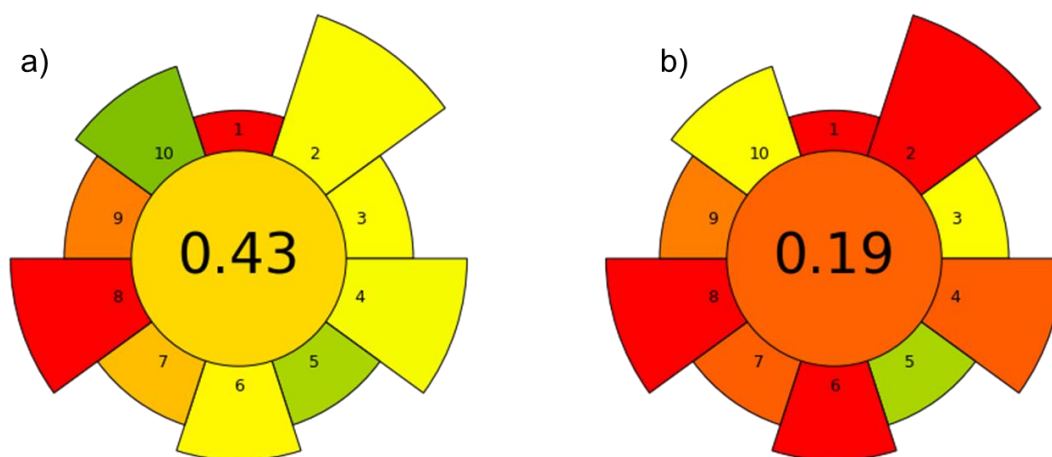
A técnica DPX-MIP/LC-MS se mostra eficiente para a determinação de melatonina e seus metabólitos em leite materno. Entretanto, é necessário demonstrar que o método aqui proposto é menos agressivos ao ambiente se comprado com os tradicionalmente utilizado, nesse sentido é necessário a utilização de ferramentas para determinar o impacto dessa técnica no meio ambiente. Dentre as diferentes ferramentas existentes pode-se destacar a AGREEprep (WOJNOWSKI et al., 2022) focada para medir o impacto ambiental das técnicas de preparo de amostras como a DPX.

O AGREEprep é um software utilizado para determinar o quão verde é a técnica de preparo de amostra utilizada em um método. Para realizar essa medição ela utiliza algumas métricas que leva em consideração: 1 Onde é realizado o preparo da amostra e a análise; 2 o volume de reagentes tóxicos; 3 a possibilidade de reutilização; 4 o volume de resíduo gerado; 5 a quantidade de amostra necessário; 6 o tempo para realização do preparo da amostra; 7 o número de etapas envolvidas na etapa de preparo de amostra e se ela é automatizada; 8 o consumo energético da análise; 9 o instrumento utilizado para a análise; 10; o número distintos de perigo de natureza química. Com base nessas métricas é definida uma pontuação de 0 a 1, em que quanto mais próximo de 1 mais verde é a técnica de preparo de amostra empregada. (WOJNOWSKI et al., 2022)

Nesse sentido o AGREEprep foi aplicado para determinar se a utilização do DPX-MIP para determinação da melatonina e seus metabólitos reportada nessa tese é mais sustentável se comparado a uma técnica de preparo de amostras mais convencional como a SPE. Para tanto, foi utilizado o trabalho de Karunanithi e colaboradores (KARUNANITHI et al., 2014) em que os autores realizaram um estudo para determinar melatonina em leite bovino e humano, para isso eles utilizaram 1 mL de leite o qual foi extraído por SPE utilizando 15 mL de diclometano como solvente de eluição, esse solvente é evaporado e a solução ressuspendidos em metanol, a análise foi realizada em um LC-MS com vazão de  $0,3 \text{ mL min}^{-1}$ , com água e metanol como fase móvel, o tempo total da análise considerando a etapa de preparo de amostra é de 40 min. A Figura 33, apresenta um comparativo entre a metodologia DPX-MIP/LC-MS apresentada nesta tese com a SPE/LC-MS do estudo de Karunanithi e colaboradores. Como pode ser observado a metodologia DPX-MIP/LC-MS

apresentou uma pontuação de 0,43 enquanto a proposta por Karunanithi teve uma de 0,19, sendo assim, a técnica DPX-MIP é considerada mais verde por apresentar pontuação mais próxima de 1. Conseqüentemente, a utilização da DPX-MIP/LC-MS se mostra uma escolha viável para determinação de melatonina e seus metabólitos, tendo menor impacto ambiental se comparada a uma análise tradicional de SPE.

**Figura 33.** Comparação entre as metodologias de extração para determinação da melatonina e metabólitos em leite materno utilizando o AGREEprep, a) DPX-MIP do autor e b) SPE de Karunanithi e colaboradores



Fonte: Próprio autor

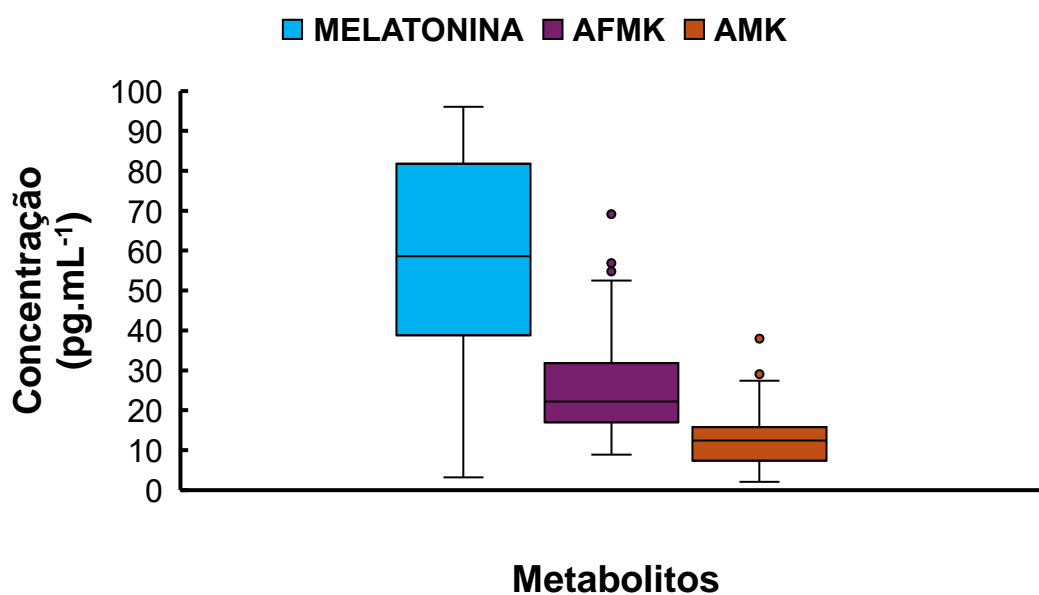
#### 4.12. Análise das amostras de leite materno

Para comprovar a eficiência do método DPX-MIP/LC-MS foi realizada a análise de 62 amostras de leite materno de pacientes de maternidades públicas da cidade de Goiânia, Goiás. As amostras de leite se encontravam congeladas e protegidas da luz, sendo assim elas foram descongeladas a temperatura ambiente sem que houvesse contato com a luz, o que pode influenciar na concentração da melatonina e seus metabólitos, uma vez que a melatonina é um composto fotossensível. Para demonstrar de maneira mais clara as variações entre as concentrações de melatonina e metabólitos nas amostras foi construído um gráfico do tipo *boxplot*, conforme apresentado na Figura 34. Assim, é possível observar que a maioria das amostras avaliadas apresentaram concentração entre 38 e 82  $\text{pg mL}^{-1}$  para a melatonina. A concentração para a maioria das amostras de AFMK estava entre 16 e 32  $\text{pg mL}^{-1}$ , além disso é possível identificar a presença de 3 amostras consideradas *outliers*. Já a concentração de AMK para a maioria dessas amostras se encontrava entre 7

e  $16 \text{ pg mL}^{-1}$ , entretanto esses valores estão abaixo do LOQ do método ( $15 \text{ pg mL}^{-1}$ ), sendo assim só é possível afirmar que o AMK está presente nas amostras avaliadas não sendo possível quantificá-lo.

De acordo com Oliveira e colaboradores (OLIVEIRA et al., 2024), a concentração de melatonina no leite materno maduro pode variar de  $3,2$  a  $78 \text{ pg mL}^{-1}$ . Molad e colaboradores (MOLAD et al., 2019), indica que a concentração da melatonina no leite pode variar de  $5 \text{ pg mL}^{-1}$  a  $86 \text{ pg mL}^{-1}$ . Valores esses que corroboram com o encontrado por este estudo, no qual a maioria das amostras avaliadas apresentaram concentração de melatonina entre  $38$  e  $82 \text{ pg mL}^{-1}$ . No entanto, até o presente momento não foi encontrado estudos que determinam a concentração de AFMK e AMK no leite materno.

**Figura 34.** Gráfico boxplot, para as concentrações de melatonina e seus metabólitos nas amostras de leite materno.

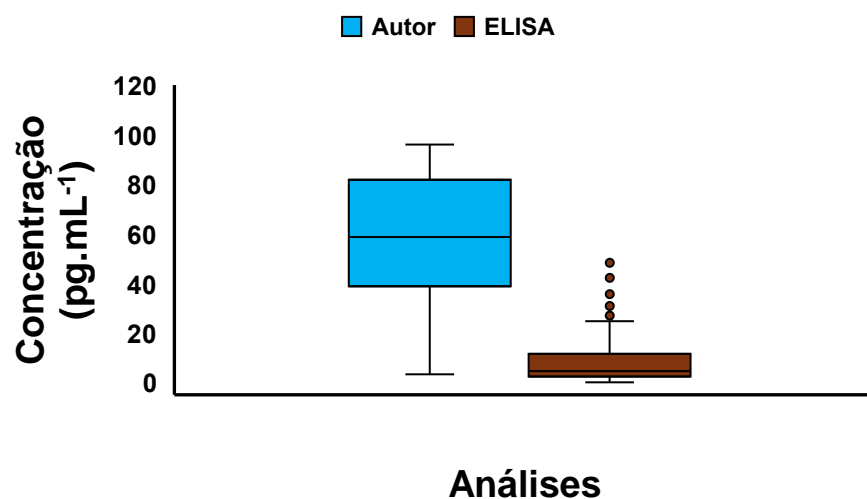


Fonte: Próprio autor

As amostras avaliadas neste estudo também foram analisadas por ELISA para determinação da melatonina, conforme reportado por Oliveira (OLIVEIRA, 2024). A Figura 35 apresenta um gráfico boxplot comparando os resultados obtidos pelo ELISA em relação ao reportado nesta tese, para a concentração da melatonina. Como pode ser observado, a maioria das amostras avaliadas pelo ELISA apresentam concentração de melatonina entre  $2,3$  e  $11,5 \text{ pg mL}^{-1}$  com 6 amostras *outliers*, enquanto na análise utilizando a técnica DPX-MIP/LC-MS a maioria das amostras avaliadas apresentaram concentração de melatonina entre  $38$  e  $82 \text{ pg mL}^{-1}$ , sem amostras *outliers*. A diferença entre os valores obtidos entre o

ELISA e a DPX-MIP/LC-MS, se deve muito as características do ELISA aplicado nesta análise, onde a melatonina biotinilada (peso molecular  $476 \text{ g mol}^{-1}$ ) é utilizada como marcador para a melatonina (peso molecular  $232 \text{ g mol}^{-1}$ ) o que impacta na cinética da ligação e na especificidade do método, devido à diferença de peso molecular entre o marcador e a molécula de interesse (KENNAWAY, 2019). Além disso, o Kit é de análise direta para amostras de saliva, entretanto esse Kit foi utilizado na análise de leite materno, uma matriz que apresenta uma maior quantidade de compostos endógenos se comparado a saliva, o que irá influenciar diretamente na leitura obtida, entretanto é necessário ressaltar que não há nenhum Kit de ELISA que seja específico para a determinação de melatonina em leite. Adicionalmente, há relatos na literatura que indicam que a concentração da melatonina em uma mesma matriz pode variar mais de 3 ordens de grandeza a depender do Kit utilizado, indicando que há uma grande variação a depender do fabricante (KENNAWAY, 2019, 2020). Sendo assim, a utilização da técnica DPX-MIP/LC-MS se mostra uma alternativa viável para a determinação da melatonina, além de permitir a detecção dos demais metabólitos (AFMK e AMK) em uma mesma análise, o que não é possível pelo ELISA.

**Figura 35.** Gráfico boxplot, comparando a concentração de melatonina para as análises realizadas por ELISA e a por DPX-MIP/LC-MS (do autor).



Fonte: Próprio autor

## 5. CONCLUSÃO

Neste capítulo pode-se concluir, que a metodologia empregando DPX-MIP/LC-MS é eficiente para a extração e determinação da melatonina e seus metabólitos em leite

materno, se mostrando uma alternativa viável frente a outras técnicas reportadas na literatura. Os MIPs sintetizados no desenvolvimento dessa metodologia não apresentaram diferenças claras quando avaliados por MEV, entretanto, quando analisados por FTIR, termogravimetria e adsorção e dessorção de nitrogênio é possível observar variações nessas análises de acordo com o monômero funcional empregado. A análise computacional indicou que o MIP com HEMA é aquele com maior interação com a melatonina, contudo, ao avaliar os MIPs frente a extração DPX da melatonina e seus metabólitos o polímero com menor interação com a melatonina 1-Vn apresentou maior facilidade para a remoção do *template*, sendo escolhido como o MIP ideal para a extração DPX da melatonina, AFMK e AMK. O estudo topológico indicou que o MIP de 1-Vn irá interagir com a melatonina através de ligações de hidrogênio com característica fraca e moderada. Estudos comparativos entre o MIP e NIP indicaram que o MIP sintetizado é seletivo para a extração da melatonina e seus metabólitos. As otimizações univariável e multivariada para o DPX-MIP indicou que a maior eficiência de extração DPX-MIP é aquela realizada com amostra diluída em água (1:1), com pH ajustado para 7, utilizando 11 ciclos de adsorção, realizando a etapa de limpeza com 2 ciclos de água e utilizando 2 ciclos de dessorção com 300 µL de acetonitrila. Os parâmetros analíticos avaliados para a metodologia DPX-MIP/LC-MS, demonstraram que ela apresenta resposta linear com coeficiente de determinação acima de 0,99, a matriz não irá interferir na resposta analítica e que o método apresenta recuperação e desvio relativo dentro dos estabelecidos da ANVISA. A comparação entre o método DPX-MIP/LC-MS frente a outros reportados na literatura, demonstrou sua alta aplicabilidade, apresentando tempo de análise mais curto e valores de recuperação e LOQ próximos ao de outros trabalhos reportados. Além disso, a técnica DPX-MIP/LC-MS é considerada mais verde se comparada as outras análises utilizando uma extração convencional como a SPE, conforme valores métricos sugeridos pelo AGREEprep. A análise das amostras das pacientes dos hospitais da região metropolitana de Goiânia, permitiu determinar e identificar a presença da melatonina e seus metabólitos nessas amostras, com a concentração de melatonina estando dentro da faixa esperada. A comparação entre os resultados obtidos para a determinação da melatonina por ELISA e pela DPX-MIP/LC-MS apresentou valores discrepantes, mas que podem ser explicados, pela falta de um preparo de amostra mais elaborado e pelo marcador utilizado no ELISA, além de não existir um kit ELISA específico para determinação de melatonina em leite.

**CAPÍTULO 2:** Avaliação do perfil metabólico de cultivares de alface por PSI-MS e aplicação para diferenciação segundo o tipo de cultivo e espécie

## 1. INTRODUÇÃO

A espectrometria de massas (MS, *mass spectrometry*) é uma técnica de ampla aplicação capaz de detectar, determinar e caracterizar átomos e moléculas de composição e tamanho distintos, com alta sensibilidade e seletividade (ALBERICI et al., 2010). De maneira geral, a análise por espectrometria de massa (MS) envolve a geração ou transferência de íons em uma fonte de ionização, seguida pela separação dos íons de acordo com suas diferentes razões massa/carga ( $m/z$ ) em um analisador de massas, seguido pela detecção dos íons.

Na espectrometria de massas, a ionização dos compostos em estudo é obrigatória, sendo assim a fonte de ionização tem papel fundamental na sua aplicação (SHI et al., 2022). As primeiras fontes de ionização desenvolvidas necessitavam que as moléculas estivessem em sua forma gasosa e operavam em alto vácuo, o que limitava seu uso a moléculas com baixo peso molecular, voláteis e termicamente estáveis (SHELLEY et al., 2018). Desde então, diferentes fontes foram desenvolvidas, como os casos das fontes de ionização em pressão atmosférica tais como, a ionização por *eletrospray* (ESI, *electrospray ionization*) e as fontes de ionização ambiente (AIMS, *ambient ionization mass spectrometry*) (ALLOCHIO FILHO et al., 2023).

O ESI é uma fonte a pressão atmosférica, essa fonte foi responsável por revolucionar a área da espectrometria de massas, permitindo a análise de compostos em solução, com características polar e de massa até 200.000 Da. No ESI a amostra em solução é inserida em um capilar, com uma alta voltagem aplicada em sua ponta, formando assim um *spray* em formato cônico conhecido como cone de Taylor, quando o limite de Rayleigh é atingido, a solução é pulverizada para formar gotículas finas com analitos na solução ionizada. Nessa técnica de ionização normalmente são analisadas compostos protonados ou desprotonados,  $(M+H)^+$  ou  $(M-H)^-$ . Entretanto, outros íons podem ser formados a depender dos contra-íons presentes na solução e da voltagem aplicada no capilar, sendo que no modo positivo de ionização será realizada a leitura dos íons com carga positiva e no negativo os com carga negativa. Por permitir a ionização de compostos presentes em solução, essa fonte de ionização é extremamente popular para acoplamentos envolvendo LC-MS. (HU; YAO, 2022; MORAES; LAGO, 2003; TYCOVA et al., 2021)

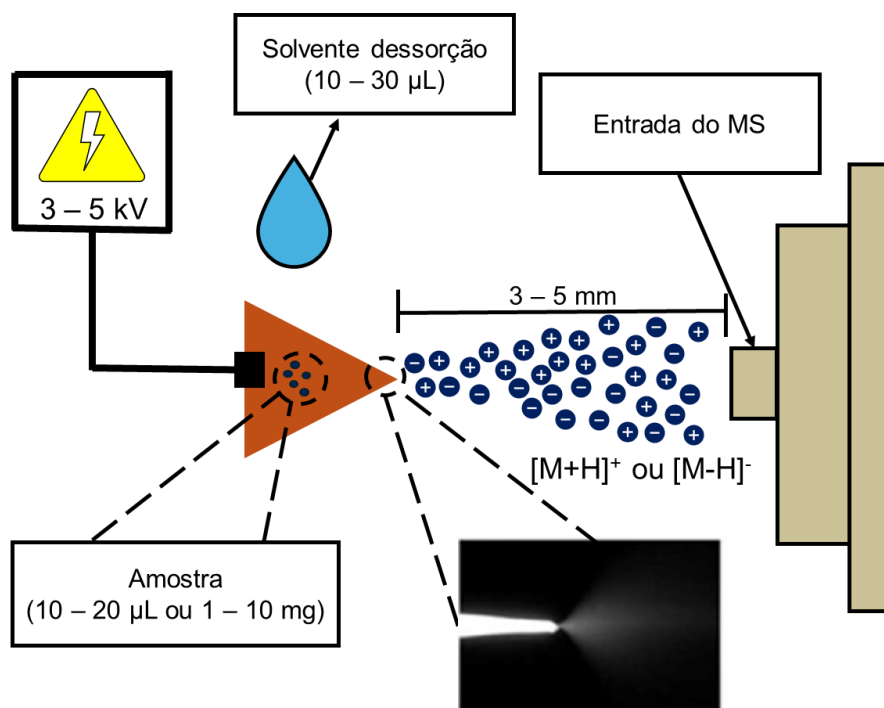
As AIMS foram introduzidas inicialmente no ano de 2004, graças ao trabalho de Cooks e colaboradores (TAKÁTS et al., 2004) no desenvolvimento da fonte de ionização por *eletrospray* de dessorção (DESI, *desorption electrospray ionization*). Desde então, diferentes fontes de AIMS vêm sendo desenvolvidas, uma vez que elas são caracterizadas

por permitir a análise direta das amostras em condições ambientais com pouco ou nenhum pré-tratamento (LI et al., 2023). Dentre as mais de 80 fontes de ionização ambiente desenvolvidas, o *paper-spray ionization* (PSI) está entre as mais utilizadas por ser considerado uma técnica simples, de baixo custo e com alta versatilidade (BORONAT ENA; COWAN; ABBATE, 2023).

### 1.1. *Paper-spray ionization* (PSI)

O PSI foi introduzido pelo grupo Cooks e Ouyang, no ano de 2010 (WANG et al., 2010) e desde então vem sendo aplicado em diversas áreas (RANKIN-TURNER; HEANEY, 2021). Na análise de PSI, a amostra deve ser depositada em um substrato, geralmente é um papel em formato triangular, conectado a uma fonte de alta tensão e posicionado na entrada do espectrômetro de massas. Um solvente de dessorção é gotejado sobre esse papel e aplicada uma alta tensão, gotículas carregadas são formadas e através de uma diferença de potencial são encaminhadas para o interior do espectrômetro de massa, como pode ser observado na Figura 36. (CHAVES et al., 2022)

**Figura 36.** Representação esquemática da técnica de PSI-MS operando em modo positivo ou negativo, gerando íons  $[M+H]^+$  ou  $[M-H]^-$ .



Fonte: próprio autor

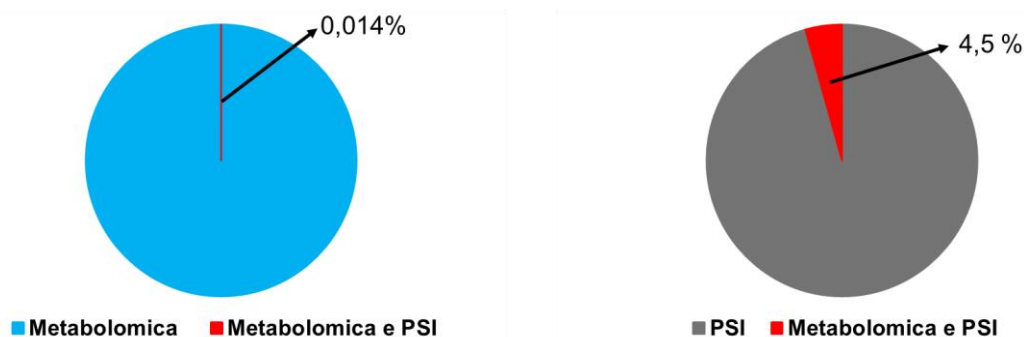
Como já mencionado anteriormente, na espectrometria de massas a formação dos íons é de extrema importância. Nesse sentido, a geração do *spray* para o PSI-MS se dá pelo alto potencial aplicado no papel, gerando um elevado número de cargas em sua superfície, graças ao campo elétrico formado entre a entrada do espectrômetro de massas e o papel. Conseqüentemente, as forças de Coulomb auxiliam na quebra das interações entre o analito e as fibras do papel úmido, formando gotículas carregadas que serão dessolvatadas, resultando em íons que serão conduzidos para o interior do espectrômetro de massas. (ALLOCHIO FILHO et al., 2023)

Normalmente em uma análise de PSI-MS é empregado um potencial de 3 a 5KV, sendo possível analisar amostras sólidas ou líquidas utilizando de 10 a 20  $\mu$ L ou de 1 a 10 mg da amostra, o papel utilizado nessa técnica deve estar localizado entre 3 e 5 mm da entrada do espectrômetro de massas e o solvente de dessorção empregado deve ser adequado para a extração dos analitos da superfície do papel e para a formação do *spray*, sendo aplicado de 10 a 20  $\mu$ L. Adicionalmente, em uma análise de PSI não é necessário o uso do gás de secagem como ocorre para as fontes de ionização a pressão ambiente. (CHEN et al., 2017).

Os papéis empregado na técnica de PSI-MS, deve apresentar características triangulares, com o ângulo em suas extremidades podendo variar de 30 a 45°. O papel mais utilizado nas análises por PSI-MS é o papel cromatográfico, devido as suas propriedades químicas e físicas mais favoráveis, além de gerar sinais com maior relação sinal ruído (KLAMPFL; HIMMELSBACH, 2015). Entretanto, outros papéis podem vir a ser empregados nessas análises a depender do analito (FREY; HEISS; BADU-TAWIAH, 2022). Além disso, é possível realizar modificações na superfície do papel o que irá permitir a análise de uma variedade de compostos (HUANG et al., 2021; RAMALHO et al., 2022).

A versatilidade, o baixo consumo de solvente e amostra, ligado a alta sensibilidade e há não obrigatoriedade da realização da etapa de preparo de amostras, fez com que diversos estudos sejam realizados empregando essa técnica de ionização (FEDICK et al., 2020; FREITAS et al., 2022; LIMA et al., 2023; WANG et al., 2020). Entretanto, ainda há um número limitado de estudos envolvendo a utilização do PSI-MS aplicado a estudos metabolômicos, como pode ser observado na Figura 37.

**Figura 37.** Gráfico de pizza, representando o número de publicações referentes a estudos envolvendo metabolômica, metabolômica e PSI, e PSI.



Fonte: Scopus (pesquisa realizada no de 08 de agosto de 2024, com as palavras-chave: *metabolomics*; *metabolomics and paper spray ionization*; e *paper spray ionization*)

## 1.2. Metabolômica e alface

A metabolômica é uma ciência multidisciplinar responsável por estudar os metabólitos orgânicos de baixo peso molecular de ocorrência natural dentro de um organismo (BUNDY; DAVEY; VIANT, 2009; WINDER et al., 2022). Abordagens metabolômicas são comumente aplicadas para avaliar o perfil químico de uma parte ou o todo de um ser vivo, demonstrando a influência de fatores internos e externos no metabolismo do organismo (WU et al., 2022).

Por se tratar de uma ciência multidisciplinar, a metabolômica está envolvida em estudos voltados para a saúde e doenças humanas (ALVES et al., 2021), para a nutrição (KUMAR et al., 2024), a ciência ambiental (YU et al., 2024), a biologia sintética (YU et al., 2024) e a ciência vegetal e agrícola (LIMA et al., 2023; WANG et al., 2024). Quando voltada para análises alimentares, estudos metabolômicos são capazes de compreender como fatores genéticos, ambientais e de manejo influenciam em sua produção e na síntese de muitos metabólitos, além de proporcionar informações quanto ao conteúdo nutricional, sabor, cor, aromas e características específicas da planta (LIU et al., 2022).

Nesse sentido, há relatos de estudos voltados para diferentes tipos de alimentos como tomate (TANG et al., 2020), kobucha (YANG et al., 2022), alho (MI et al., 2021), arroz (VO et al., 2021), feijão (HERNÁNDEZ-GUERRERO et al., 2021), dentre outros. Uma outra matriz alimentar já explorada é a alface (*Lactuca sativa L.*), uma vez que ela é uma das hortaliças mais consumidas e cultivadas no mundo (MEDINA-LOZANO; BERTOLÍN; DÍAZ, 2021). Apesar do seu baixo valor nutricional uma vez que 95% da sua composição é água, ela é considerada uma das que mais contribui para o valor nutricional total da dieta, devido

ao seu alto consumo (OTIFY et al., 2023). Além disso, a alface apresenta em sua composição fitoquímicos antioxidantes como vitamina C, tocoferóis, carotenoides e polifenóis, que têm a capacidade de diminuir a formação de espécies reativas de oxigênio e, assim, reduzir os danos aos componentes celulares (ZHOU et al., 2021).

Há diferentes variedades de alface disponíveis, com variações em sua cor, forma e tamanho, com diferenças nutricionais e metabolômicas entre elas (YANG et al., 2018). Sendo que as variedades Americana, Crespa e Mimosa são amplamente documentadas como fonte rica em polifenóis e compostos antioxidante. Adicionalmente, também ocorre variações quanto ao seu cultivo o que afeta a disponibilidade de nutrientes para a planta. Dentre os tipos de cultivo os mais populares estão: em solo e o hidropônico (WANG et al., 2023).

O cultivo realizado em solo é a mais tradicional, entretanto o acesso da planta aos nutrientes é dificultado, dependendo da atividade microbiana e da mineralização desses nutrientes. No sistema hidropônico o crescimento e o desenvolvimento da planta ocorrem em um ambiente controlado, regulando diferentes fatores como o meio de cultivo, a duração da luz e a nutrição das plantas. A diferença proporcionada entre esses dois tipos de cultivo, pode gerar diferentes respostas no desenvolvimento e na qualidade nutricional dessas hortaliças. (HAMEED et al., 2022; TAMURA et al., 2018)

Sendo assim, a análise do perfil químico das variedades de alface em conjunto com influência do sistema cultivo pode produzir informações essenciais para distinção entre amostras de alface, potencialmente vinculando essas diferenças ao valor nutricional da hortaliça (COLLADO-GONZÁLEZ et al., 2022; MEDINA-LOZANO; BERTOLÍN; DÍAZ, 2021).

Para realização dessas análises diferentes técnicas analíticas podem ser aplicadas, mas a LC-MS está entre mais utilizada, por permitir a separação e a identificação de diferentes compostos com exatidão e precisão, além de apresentar alta sensibilidade (KASPY et al., 2022). Apesar das vantagens relacionadas ao uso do LC-MS para a metabolômica, ele também apresenta algumas desvantagens relacionadas ao alto tempo de análise, consumo excessivo de solvente e ao alto custo da coluna cromatográfica (MACIEL et al., 2021). Uma alternativa a LC-MS para esses estudos, inclui a injeção direta da amostra no espectrômetro de massa, aplicando diferentes técnicas de ionização como o ESI e o PSI.

Embora o ESI seja normalmente utilizado como uma fonte em acoplamentos com o LC, ele também pode funcionar de forma independente. No entanto, essa técnica de

ionização pode ser propensa a problemas potenciais relacionados à supressão de íons causada por outros eletrólitos na amostra, o que pode afetar a intensidade do sinal do analito e potencialmente influenciar a identificação do composto, além disso é necessário que haja um preparo rigoroso da amostra para prevenir possíveis entupimento na fonte de ionização (STEWART, 1999; TYCOVA et al., 2021).

Conseqüentemente, o PSI-MS se apresenta como uma ferramenta viável para o estudo metabolômico de alface. Entretanto, devido a quantidade de informações fornecidos por essa análise é inviável o tratamento manual desses dados. Sendo necessária a realização de abordagens quimiométricas que fornecem ferramentas para o processamento de dados de maneira mais precisa, como normalização e dimensionamento, que atenuam variações sistemáticas e aumentam a comparabilidade da amostra, possibilitando a separação e classificação de amostras com base em seus perfis metabolômicos (KALOGIOURI et al., 2024; QIN et al., 2024). Dentre as diferentes ferramentas quimiométricas que pode ser aplicada no tratamento desses dados, pode-se destacar o método de análise dos fatores paralelos (PARAFC, *parallel factor analysis*), a análise de componentes principais (PCA, *principal component analysis*), a análise discriminante por quadrados mínimos parciais (PLS-DA, *partial least squares discriminant analysis*) e a seleção dos preditores ordenados para análise de discriminação (OPSDA, *ordered predictor selection for discrimination analysis*).

### 1.3. Métodos quimiométricos

O PARAFAC é um método de análise usado no tratamento de dados de ordem superior, ou seja, os dados gerados respondem em mais de 2 vetores, um exemplo de dado de ordem superior são os dados gerados por LC-MS em que a resposta gerada vai depender da amostra, do tempo, e da razão massa/carga ( $m/z$ ). Nesse método esses vetores devem obrigatoriamente apresentar comportamento trilinear, podendo ser organizados em um arranjo tridimensional. Esse método normalmente é aplicado para decomposição de dados em componentes independentes e é particularmente eficaz para analisar conjuntos de dados com estrutura tridimensional, como os gerados em análises metabolômicas. (RUBIO; SARABIA; ORTIZ, 2015; SENA; TREVISAN; POPPI, 2005).

A PCA é o método de análise multivariada mais comum e utilizado no mundo, ela possibilita a redução do número de variáveis de um conjunto, transformando-o em um novo conjunto de variáveis denominados de componentes principais. Os componentes principais

formados são independentes entre si e não se correlacionam, normalmente as informações relevantes dos dados estarão contidas nas duas primeiras componentes principais, denominadas PC1 e PC2. (FERREIRA, 2022; SABIN; FERRÃO; FURTADO, 2004)

A PLS-DA é um método de análise supervisionado de redução de dimensionalidade, muito utilizada no tratamento de dados envolvendo metabolômica. Esse método possibilita a redução de dimensionalidade, podendo ser adaptado para seleção de característica e para classificação. Na PLS-DA os conjuntos de variáveis obtidas após o seu tratamento, são denominados de variável latente (LV, *latent variable*). A variável latente mostrará a covariância entre o seu eixo x e o y. Adicionalmente, a PLS-DA permite a análise onde o número de características é muito maior que o de amostras disponíveis, permitindo adicionar pesos que possibilitam a melhor orientação da seleção de características e do ajuste do modelo. (RUIZ-PEREZ et al., 2020)

A OPSDA é um método para seleção de variáveis para um método de classificação, possibilitando sua integração com outros métodos como o PLS-DA. Esse método irá colher informações para determinar quais as melhores variáveis para construção de um modelo. Essas variáveis são classificadas em ordem decrescente, permitindo assim identificar o peso dessas variáveis no modelo de classificação, o que contribui significativamente para a interpretação de dados na metabolômica. (ROQUE et al., 2019)

A aplicação conjunta desses métodos permite o tratamento de dados com um número elevado de variáveis, como aqueles obtidos por MS, permitindo identificar e classificar metabólitos. Sendo assim, a aplicação conjunta de métodos quimiométricos, juntamente com a técnica de PSI-MS, pode possibilitar a identificação e classificação de amostras de alface de acordo com a sua variedade e modo de cultivo.

## **2. OBJETIVO**

Determinar o perfil metabolômico de diferentes cultivares de alface empregando a técnica PSI-MS e verificar, empregando ferramentas quimiométricas, a possibilidade de diferenciação das mesmas de acordo com sua variedade e modo de cultivo.

### **2.1. Objetivo específicos**

- Comparar a técnica de PSI-MS com o ESI-MS para obtenção de perfil metabolômico de cultivares de alface;
- Avaliar o uso de ferramentas quimiométricas para tratamento de dados de análise metabolômica por PSI-MS;

- Avaliar a diferenciação de cultivares de alface de acordo com sua variedade e modo de cultivo;
- Identificar os metabólitos responsáveis pela diferenciação das amostras

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Materiais, reagentes e padrões

Na realização desse trabalho foi empregado metanol de grau HPLC da J. T. Baker, papel cromatográfico Whatman #1 (poros de 11  $\mu\text{m}$ ) foi adquirido da Whatman International e água ultrapurificada do equipamento MS2000 WFI da Gehaka.

#### 3.2. Obtenção das amostras de alface

As amostras de alface foram adquiridas em mercados da região de Goiânia, Goiás. No total foram avaliadas 43 amostras de alface, separadas conforme o modo de cultivo (solo e hidropônico) e sua variedade (Americana, Crespa e Mimosa), como pode ser observado na Tabela 12. As amostras foram cuidadosamente armazenadas em temperatura controlada (8°C) para posterior análise.

**Tabela 12.** Número de amostras de alface utilizadas no estudo, conforme seu modo de cultivo e variedade

Modo de cultivo	Variedades		
	Americana	Crespa	Mimosa
Solo	12	7	4
Hidropônica	4	8	8

Fonte: Próprio autor

#### 3.3. Extração das amostras de alface

Para a obtenção dos extratos, 300 mg da folha de alface foram adicionadas em um tubo falcon de 15 mL, sendo macerada com o auxílio de um bastão de vidro. Em seguida, foi adicionado 10 mL de uma mistura metanol/água na proporção 80:20 (v/v), seguido de sonização por 30 min à temperatura ambiente. O extrato foi centrifugado a 10000 rpm por 10 min. Por fim, o sobrenadante foi coletado para posterior análise PSI-MS e por ESI-MS.

### 3.4. Condições do espectrômetro de massas

Um espectrômetro de massa híbrido Q Exactive Quadrupole-Orbitrap (Thermo Scientific, San Jose, EUA) foi usado para as análises ESI-MS e PSI-MS. As análises ESI-MS foram obtidas usando uma solução de amostra contendo 500 µL de extrato de alface e 500 µL de solução de metanol/água (80:20 v/v). O ESI-MS foi realizado nos modos de ionização positiva e negativa. Os parâmetros ESI-MS empregados foram: temperatura capilar: 275 °C; voltagem capilar: 20 V, voltagem do spray: 4,5 kV, voltagem da *tube lens*: 50 V, gás nebulizador: N<sub>2</sub>; temperatura da fonte: 50 °C; Vazão de injeção: 2 µL min<sup>-1</sup>; resolução: 140000 com três microvarreduras; e energia de colisão para MS/MS (HCD, *higher-energy collisional dissociation*) variando de 20 a 30 mu (unidade do fabricante).

Na análise PSI-MS, 20 µL do extrato foram gotejados na superfície de um papel triangular (1 cm de cada lado). A ponta do papel foi posicionada a 4 mm da entrada do espectrômetro de massa. Um volume de 10 µL de metanol/água (80:20 v/v) foi usado como solvente de dessorção imediatamente após a aplicação da solução de extrato de alface no papel. O experimento foi realizado em triplicata e os espectros de massa foram coletados por 1 minuto (tempo do início até a queda do sinal). Todas as análises foram realizadas em modos de ionização positiva e negativa, com a temperatura capilar mantida em 275 °C, voltagem da *tube lens* de 50 V, resolução em 140000 com três microvarreduras e energia de colisão para MS/MS(HCD) variando de 20 a 30 mu. Os espectros de massas de ESI e PSI-MS foram processados usando o pacote de software Xcalibur Analysis (versão 2.0, Service Release 2, Thermo Electron Corporation) e exportados como .raw para realizar as análises quimiométricas.

### 3.5. Análises quimiométricas

As análises quimiométricas foram realizadas em parceria com a Dra. Jussara Valente Roque, do Instituto de Química da UFG e co-orientadora nesta tese. Os arquivos .raw obtidos pelas análises de PSI-MS e ESI-MS foram convertidos para o formato .cdf e posteriormente importados para o MATLAB R2020a (Math Works, Natick, MA, EUA) para posterior análise quimiométrica.

A PARAFAC foi empregada para explorar os perfis metabólicos e facilitar a interpretação dos dados. Os dados de PSI-MS foram organizados em um tensor tridimensional, onde as três dimensões representavam as amostras de alface, o tempo de aquisição e os espectros de massa. O tensor originalmente incluía os espectros de massa de 43 amostras de alface, com 54 tempos de aquisição e 499345 variáveis no modo de

ionização positivo e 372679 variáveis no modo de ionização negativo (com  $m/z$  variando de 100 a 1000). Para reduzir a dimensionalidade do eixo  $m/z$ , a PCA foi aplicada nos já dados normalizados, no qual se obteve cinco componentes principais que foram responsáveis por mais de 99% da variância em ambos os modos de ionização. Essa redução de dimensionalidade facilitou a análise PARAFAC com restrições de não negatividade aplicadas aos modos de aquisição da amostra e no tempo, para garantir resultados significativos e interpretáveis.

A PLS-DA foi aplicada para modelar a separação entre os métodos de cultivo e as variedades de alface, em conjuntos de dados para os modos de ionização positiva (Xpos) e negativa (Xneg). Os conjuntos de dados foram analisados com duas variáveis dependentes: o Y1 com 2 categorias de classificação (solo e hridroponico) e o Y2 como 3 categorias de classificação (Americana, Crespa e Mimonsa). Essa abordagem resultou na construção de quatro modelos distintos, 2 para os modos de ionização (positivo e negativo), um modelo distinguindo entre os diferentes métodos de cultivo e outro para as variedades de alface. Para garantir a robustez dos modelos e evitar *overfitting* (dados super ajustado, que só descrevem um modelo específico), foi empregada validação cruzada aleatória, com o conjunto de dados dividido em conjuntos de treinamento e teste, usando 10% das amostras para validação em cada interação

A OPSDA foi utilizada para melhorar a classificação e encontrar as variáveis mais importantes relacionadas à diferenciação no modo de cultivo e nas variedades de alface. Nesse estudo a importância da variável de projeção (VIP, *variable importance on projection*) foi usado como um vetor informativo. As variáveis originais (colunas da matriz X) foram diferenciadas de acordo com os valores absolutos correspondentes obtidos pelas pontuações VIP. Em seguida, as variáveis diferenciadas foram classificadas em ordem decrescente e uma estratégia de incremento de janela (10-5) foi aplicada até que o melhor conjunto de variáveis fosse encontrado. Os modelos de classificação foram avaliados usando sensibilidade, especificidade e erro de classificação (WARTHA et al., 2022). As pontuações VIP foram usadas para classificar as variáveis mais importantes para distinguir entre diferentes métodos de cultivo e variedades de alface.

### **3.6. Identificação dos metabólitos**

Os íons que foram mais importantes para a separação das amostras de alface de acordo com seu modo de cultivo e variedade foram submetidas às plataformas livres: Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS) (WANG et al., 2016), Human

Metabolome Database (HMDB) (WISHART et al., 2022) e MassBank Europe para identificação e elucidação estrutural.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

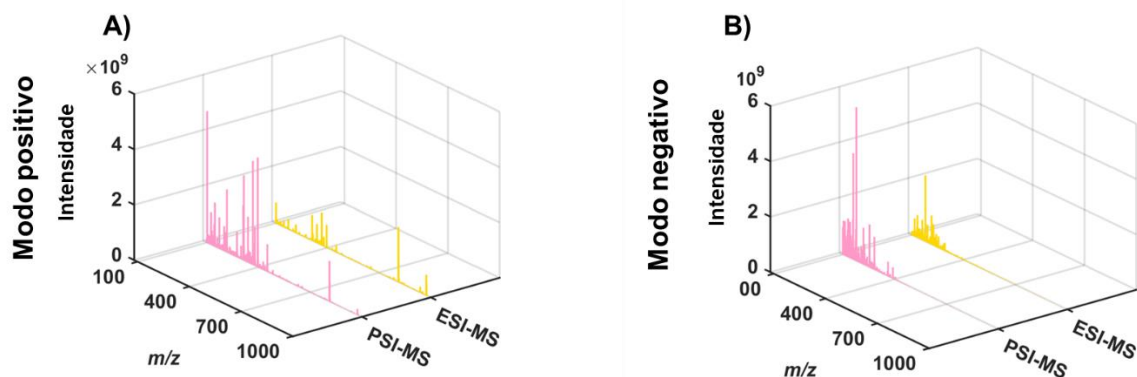
### 4.1. Comparação entre ESI-MS e PSI-MS

Para realizar o comparativo entre as análises de ESI-MS e PSI-MS, foram analisadas um total de 6 amostras, cada uma pertencendo a um dos grupos avaliados, ou seja, 1 amostra de hidropônica, 1 de solo e assim sucessivamente. A Figura 38, apresenta a média de todos os espectros obtidos para as amostras de alface no modo positivo (a) e negativo (b), para a faixa de  $m/z$  de 100 a 1000. Como pode ser observado a média dos espectros para o PSI-MS apresentou maior intensidade se comparado ao ESI-MS, tanto no modo positivo quanto no negativo, o que demonstra a maior sensibilidade do PSI-MS frente ao ESI-MS, o que irá contribuir para a detecção e a caracterização dos metabólitos presentes na alface. Indicando assim, a potencialidade do uso da técnica de PSI-MS para análises que demandam alta sensibilidade e caracterização química detalhada.

Na literatura há diferentes trabalhos reportando tanto o uso do PSI-MS quanto do ESI-MS, em estudos voltados para metabolômica (BERNARDO et al., 2024; CHAMBERLAIN; HATCH; GARRETT, 2021). Duarte e colaboradores (DUARTE et al., 2022), reportaram que o uso de PSI-MS se comparado ao ESI-MS, proporciona maiores intensidade de sinal, como o observado em nosso trabalho. Essa maior sensibilidade do PSI, pode ser atribuída a utilização do papel cromatográfico nessa técnica de ionização. A presença dos canais presentes nesse substrato permite a absorção e o transporte do solvente por capilaridade, facilitando a ressolubilização da amostra o que contribui significativamente para a sensibilidade do PSI-MS (SMITH et al., 2022).

Consequentemente, a técnica de PSI-MS foi selecionada para as demais análises, se mostrando uma técnica eficiente para a obtenção de perfis químicos de extratos de alface, além de apresentar um baixo consumo de solvente e um rápido processo de ionização (FREITAS et al., 2022).

**Figura 38.** Média dos espectros de todas as amostras de alface obtidas no modo positivo e negativo de ionização;



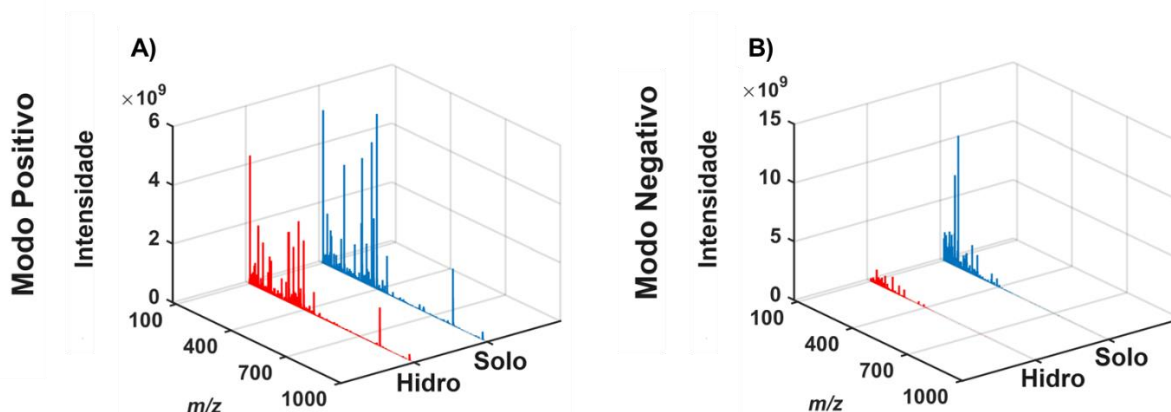
Fonte: Próprio autor

#### 4.2. Comparação das amostras cultivadas em solo e por hidroponia por PSI-MS

Para avaliar o perfil das amostras de alface de acordo com seu cultivo (solo e hidropônico), foram realizadas análises PSI-MS no modo de ionização positivo e negativo para todas as amostras disponíveis. A Figura 39, apresenta a média dos espectros de massas para todas as amostras de alface no modo de ionização positivo (a) e negativo (b). No qual é possível observar, que no modo de ionização positivo (Figura 39a) ambas as amostras apresentaram um perfil de  $m/z$  semelhante, com as amostras cultivada em solo apresentando maior intensidade no sinal se comparada as hidropônicas. Para as leituras realizadas no modo negativo (Figura 39b), já é possível notar uma mudança no perfil químico, entre as amostras avaliadas. Adicionalmente, as amostras cultivadas em solo apresentaram íon de maior intensidade no espectro de massa se comparado com a hidropônica, característica presente também nos espectros obtidos no modo positivo.

As variações observadas, tanto no modo de ionização positivo quanto no negativo, para as amostras de alface de acordo com seu cultivo são justificadas pela mudança na sua condição de desenvolvimento, o que favorece a produção de alguns metabólitos frente a outros (HAMEED et al., 2022). Plantas cultivadas em solo, tendem a sofrer mais influência do meio se comparadas as hidropônicas que normalmente estão em ambiente controlado, o que influencia na produção de alguns compostos como açúcares, aminoácidos, compostos fenólicos, proteínas, amidos e outros (VERDOLIVA et al., 2021). Adicionalmente, a técnica de PSI-MS, permitiu visualizar variações nos espectros de massas das amostras de alface de acordo com o seu cultivo, indicando a eficiência dessa técnica para essas análises.

**Figura 39.** Média dos espectros de massas obtido para as amostras cultivadas em solo e por hidroponia (Hidro) no modo de ionização, a) positivo e b) negativo

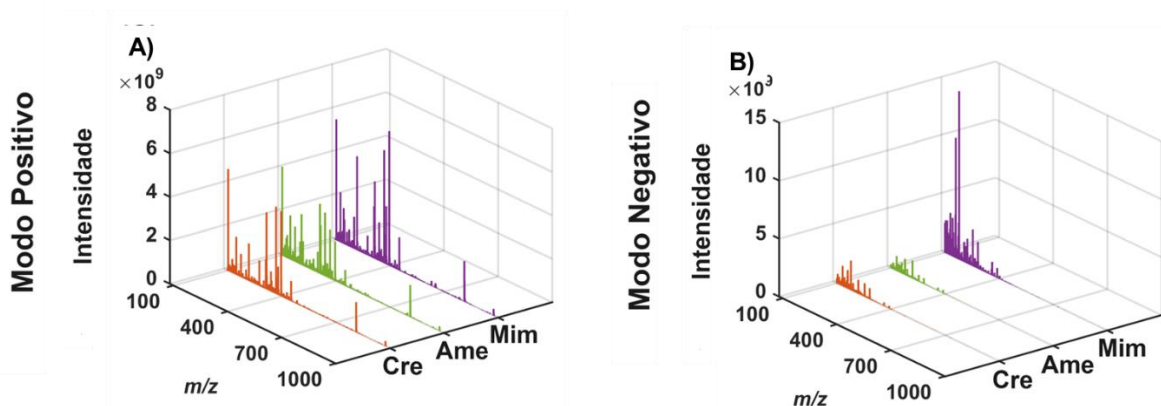


Fonte: Próprio autor

#### 4.3. Comparação das amostras de alface de acordo com sua variedade (Americana, Crespa e Mimosa)

A comparação das amostras de alface de acordo com a sua variedade, foi realizada utilizando a média dos espectros obtidos para cada uma das variedades avaliadas (Americana, Crespa e Mimosa). A Figura 40, apresenta a média dos espectros para as amostras de alface de acordo com a sua variedade (Americana, Crespa e Mimosa) no modo de ionização positivo (a) e negativo (b). Como pode ser observado na Figura 40a, não há diferenças perceptíveis no perfil de íons nos espectros de massas obtidos no modo de ionização positivo, para as variedades Americana, Crespa e Mimosa. Entretanto, é possível notar uma variação na intensidade do espectro de acordo com a variedade avaliada. Para os espectros obtidos no modo negativo (Figura 40b), é nítida a diferença entre a alface da variedade Mimosa, se comparada as demais. Yang e colaboradores (YANG et al., 2018) identificaram que diferentes variedades de alface apresentam estratégias metabólicas distintas o que pode evidenciar uma quantidade maior de metabólitos, o que contribui com os resultados aqui apresentados.

**Figura 40.** Média dos espectros de massas obtidos para as amostras de alface de acordo com sua variedade (Crespa (Cre), Americana (Ame) e Mimosa (Mim)), no modo de ionização a) positivo e b) negativo



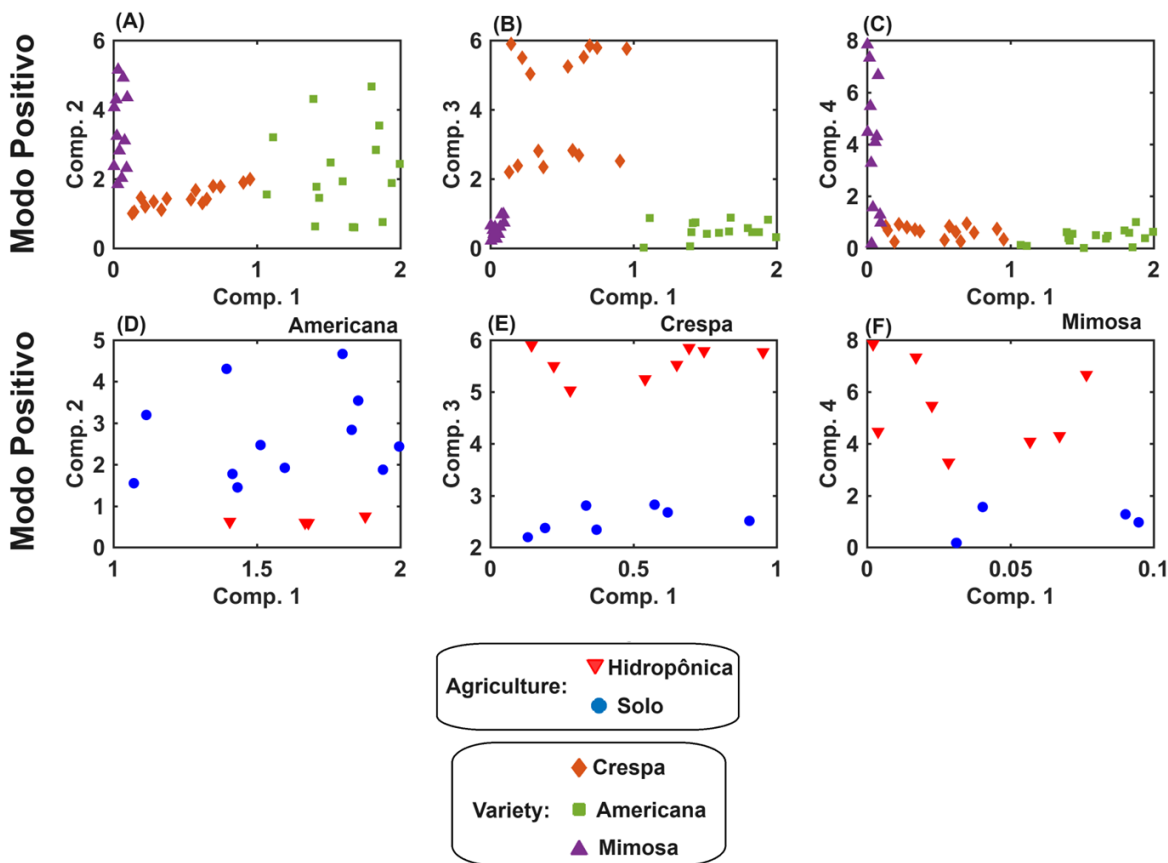
Fonte: próprio autor

#### 4.4. Diferenciação quimiométrica e identificação dos compostos

Mesmo com a análise de PSI-MS fornecendo informações que possibilitam diferenciar as cultivares de alface de acordo com seu modo de cultivo e variedade, esta abordagem por si só não oferece uma análise completa de quais metabólitos são responsáveis por essa diferenciação. Para obter uma compreensão abrangente das diferenças metabólicas entre as amostras de alface avaliadas, é essencial aplicar ferramentas quimiométricas em busca das variáveis responsáveis pela diferenciação.

A análise PARAFAC foi conduzida em um tensor T construído para cada modo de ionização. O modelo PARAFAC para o modo de ionização positivo convergiu após 42 interações, alcançando uma consistência central de 93% com quatro componentes. A Figura 41 apresenta o gráfico de *loadings* para as amostras de alface no modo positivo de ionização. Como apresentado nas Figuras 41a a 41c, o modelo conseguiu separar as amostras de acordo com as variedades avaliadas (Crespa, Americana e Mimosa) no modo de ionização positivo, o que indica perfis metabólitos distintos entre essas variedades, demonstrando a capacidade do modelo PARAFAC para identificar diferenças na composição metabólica. As Figuras 41d a 41f, indica a separação do modo de cultivo (solo e hidropônico), dentro de cada uma das variedades, Americana (Figura 41d), Crespa (Figura 41e) e Mimosa (Figura 41f) no modo de ionização positivo. Como pode ser observado o modelo conseguiu separar as amostras de acordo com seu modo de cultivo dentro de cada uma das variedades avaliadas, indicando a presença de diferenças metabólicas de acordo com a prática de cultivo.

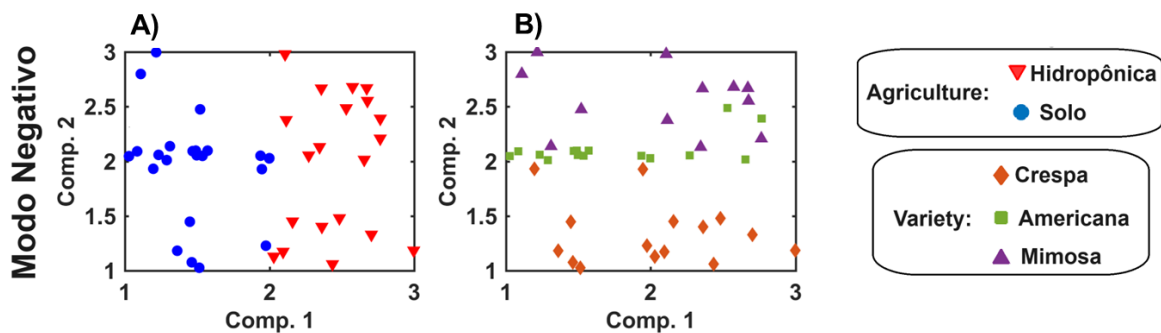
**Figura 41.** Gráfico de *loadings* obtidos pelo modelo PARAFAC, para as análises PSI-MS das amostras de alface no modo positivo de ionização, em que a) representa a separação da alface americana frente as demais; b) a separação da alface crespa em relação as outras; c) a separação da alface mimosa em comparação as outras; d) representa a separação entre hidropônica e solo dentro da variedade de alface americana; e) a separação entre o modo de cultivo dentro da variedade crespa; e f) a separação entre o modo de cultivo dentro da variedade mimosa.



Fonte: Próprio autor

O modelo Parafac para o modo de ionização negativo conseguiu convergir após 16 interações, alcançando uma consistência central de 99% com dois componentes. A Figura 42 apresenta os gráficos de *loadings* gerado pelo PARAFAC para as amostras de alface analisadas por PSI-MS, no modo negativo de ionização. Conforme apresentado na Figura 42a, o modelo conseguiu separar as amostras de acordo com o método de cultivo, formando grupos distintos ao longo da componente 1, indicando a influência do método de cultivo nos metabólitos dessas plantas. Na Figura 42b, as variedades de alface foram separadas ao longo do eixo do componente 2, indicando que há diferenças metabólicas para as amostras de alface de acordo com sua variedade.

**Figura 42.** Gráfico de *loadings* obtidos pelo modelo PARAFAC, para as análises PSI-MS das amostras de alface no modo negativo de ionização, em que a) representa a separação das amostras de alface conforme o cultivo; e b) a separação das amostras de alface conforme a sua variedade



Fonte: Próprio autor

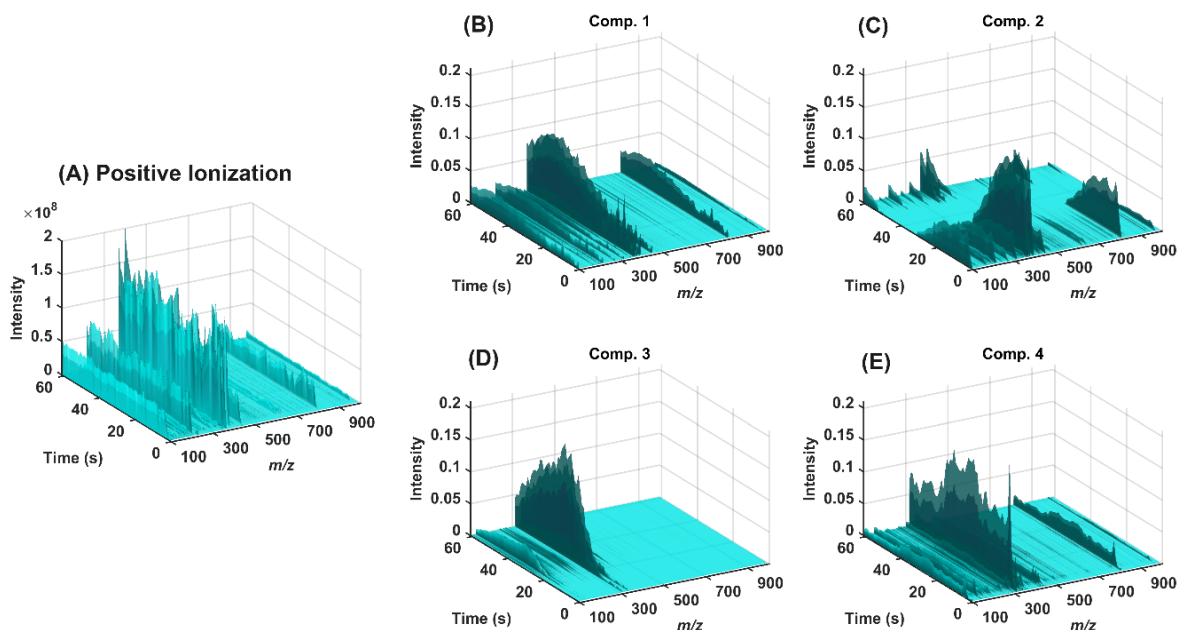
As separações claras obtidas tanto nas análises PSI-MS no modo positivo quanto no negativo (Figura 41 e 42, respectivamente) enfatizam o impacto significativo das condições de cultivo e das variedades na composição metabólica da alface, fornecendo informações valiosas para otimizar as práticas de cultivo e melhorar a qualidade da colheita.

Para obter os gráficos de *loading* apresentados na Figura 41 e 42, foi realizada uma análise PCA para decompor o modo *m/z*, reduzindo a dimensionalidade dos dados. Os componentes obtidos da análise PARAFAC foram então, reconstruídos usando as pontuações do PCA, permitindo mapear esses componentes de volta às variáveis *m/z* originais (Figura 43 e 44). Essa abordagem permite a interpretação dos dados decompostos no contexto de toda a faixa *m/z*, preservando as informações espectrais originais. Os perfis de componentes fornecem informações mais profundas sobre as fontes subjacentes de variação nos dados. Ao analisar esses perfis, podemos identificar metabólitos específicos que contribuem significativamente para os espectros de massa e entender seu comportamento.

A Figura 43, apresenta a superfície de resposta dos espectros de massas ao longo do tempo de aquisição das amostras e o perfil de *loading* dos quatro componentes identificados no PARAFAC para o modo de ionização positivo. Conforme pode ser observado na Figura 43, é possível observar variações na *m/z* no decorrer da análise de PSI-MS, essa característica se deve ao fato do papel cromatográfico utilizado nessa técnica de ionização apresentar canais que permitem a absorção e o transporte do solvente de eluição por capilaridade, fazendo com que ocorra um processo de separação no decorrer do papel cromatográfico. Além disso, o papel cromatográfico, apresenta característica polar uma vez que é constituído de celulose, conseqüentemente se espera que no decorrer da

análise de PSI-MS os compostos identificados no início da aquisição venham a ter características mais apolares enquanto os do final tenha característica mais polaras por ter maior interação com o papel cromatográfico. (REN et al., 2013; SALENTIJJN; PERMENTIER; VERPOORTE, 2014)

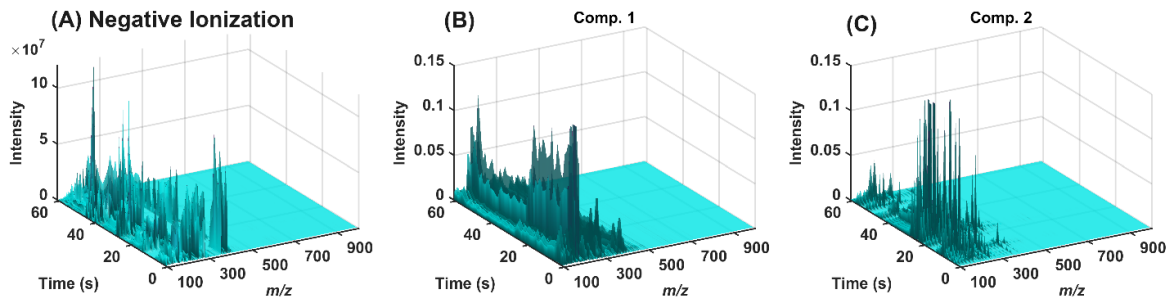
**Figura 43.** a) Superfície de resposta dos espectros de massas ao longo do tempo de aquisição das amostras para ionização no modo positivo; b) a e) perfil de *loading* dos 4 componentes identificados no PARAFAC, para o tempo de aquisição em função da *m/z*, para as aquisições no modo positivo.



Fonte: próprio autor

A Figura 44 apresenta a superfície de resposta dos espectros de massas ao longo do tempo de aquisição das amostras e o perfil de *loading* dos dois componentes identificados no PARAFAC para o modo de ionização negativo. Nela é possível notar que há variações na *m/z* de acordo com as variações no tempo de aquisição, assim como observado na Figura 44. O que reforça as afirmativas citadas no parágrafo anterior, de que essa diferença é gerada pelo processo de separação que ocorre no papel cromatográfico durante a análise de PSI-MS.

**Figura 44.** Superfície de resposta dos espectros de massas ao longo do tempo de aquisição das amostras para ionização no modo negativo; b) a c) perfil de *loading* dos 2 componentes identificados no PARAFAC, para o tempo de aquisição em função da *m/z*, para as aquisições no modo negativo.



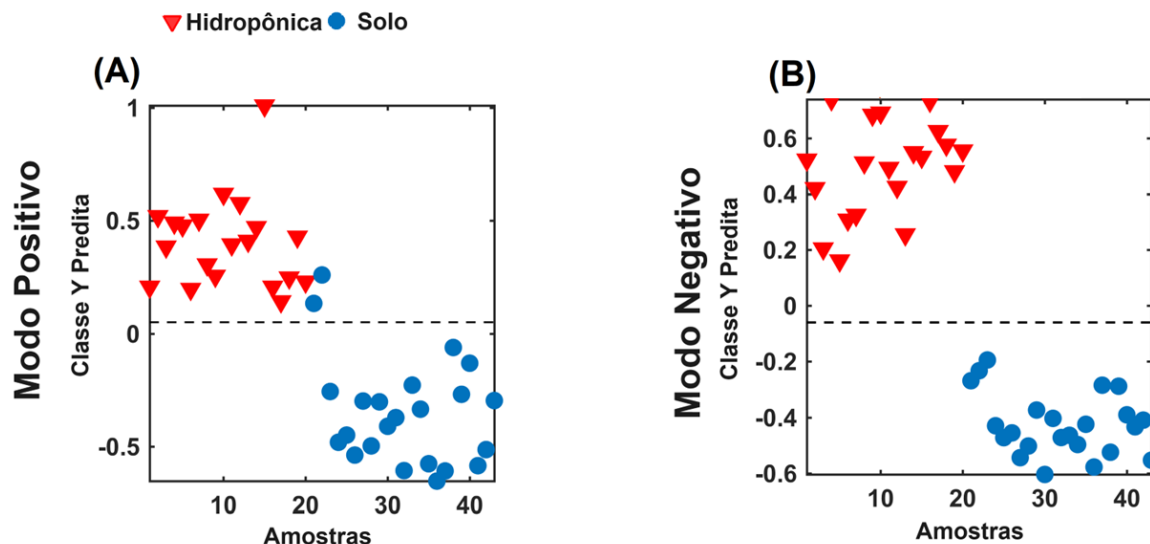
Fonte: Próprio autor

Os resultados da análise PARAFAC forneceram uma compreensão fundamental da estrutura multidimensional dos dados e ajudaram a identificar padrões iniciais relacionados aos métodos de cultivo e as variedades de alface. Com base nessas descobertas, PLS-DA e OPSDA foram aplicados para refinar a classificação e aprimorar a diferenciação entre os métodos de cultivo e as variedades de alface.

A Figura 45 apresenta os resultados para a classificação das amostras pelo método PLS-DA com as variáveis selecionadas pelo OPSDA para a predição das amostras de acordo com o seu método de cultivo (hidropônica e solo), para o modo de ionização positivo e negativo. A separação das amostras entre hidropônica e solo no modo positivo de ionização (Figura 45a) apresentou um *threshold* de 0,049 e uma precisão de 95,35% com dois falsos positivos (duas amostras cultivadas em solo, foram classificadas como hidropônicas). A sensibilidade, é definida como a proporção de amostras hidropônicas classificadas corretamente, foi de 100%, pois todas as 20 amostras hidropônicas foram classificadas corretamente. A especificidade para a classe baseada no solo, representando a proporção de amostras baseadas no solo classificadas corretamente, foi calculada com base nas 21 amostras baseadas no solo corretamente identificadas de 23, resultando em uma especificidade de aproximadamente 91,3%.

A classificação das amostras de acordo com seu cultivo, para o modo de ionização negativo (Figura 45b) apresentou um *threshold* de - 0,059 e uma precisão de 100%, com nenhuma classificação incorreta. A sensibilidade foi de 100%, pois todas as 20 amostras hidropônicas foram identificadas corretamente. Da mesma forma, a especificidade também foi de 100%, com todas as 23 amostras baseadas no solo classificadas com precisão.

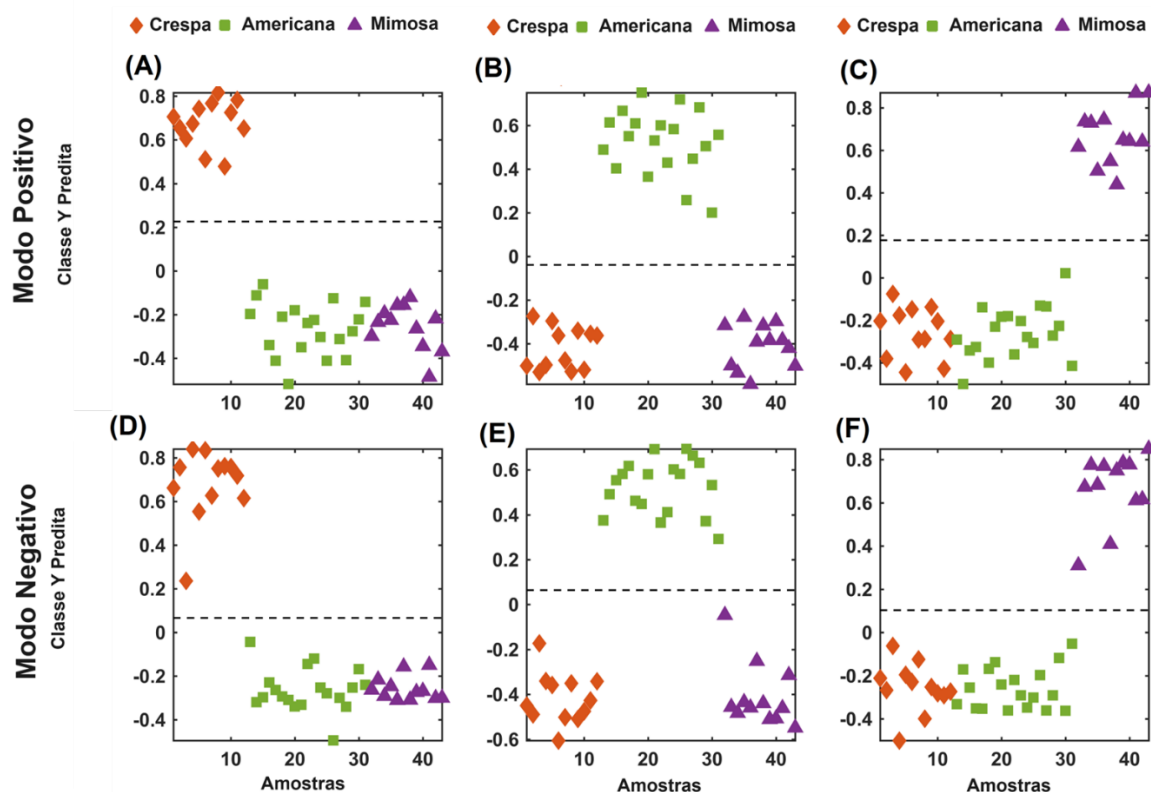
**Figura 45.** Classificação das amostras pelo método PLS-DA com as variáveis selecionadas pelo OPSDA para a predição das amostras de acordo com o seu método de cultivo (hidropônica e solo), para o modo de ionização a) positivo e b) negativo



Fonte: Próprio autor

A classificação das amostras de acordo com suas variedades (Crespa, Americana e Mimosa), podem ser visualizadas na Figura 46. Nela é possível observar que a avaliação PLS-DA atingiu uma precisão de 100% para todas as classificações ali apresentadas, conseguindo distinguir com sucesso as variedades Crespa, Americana e Mimosa para ambos os modos de ionização. A sensibilidade para cada classificação de variedade foi de 100%, e a especificidade também foi de 100%, demonstrando a versatilidade da ferramenta quimiométrica na diferenciação dos perfis de íons de amostras complexas.

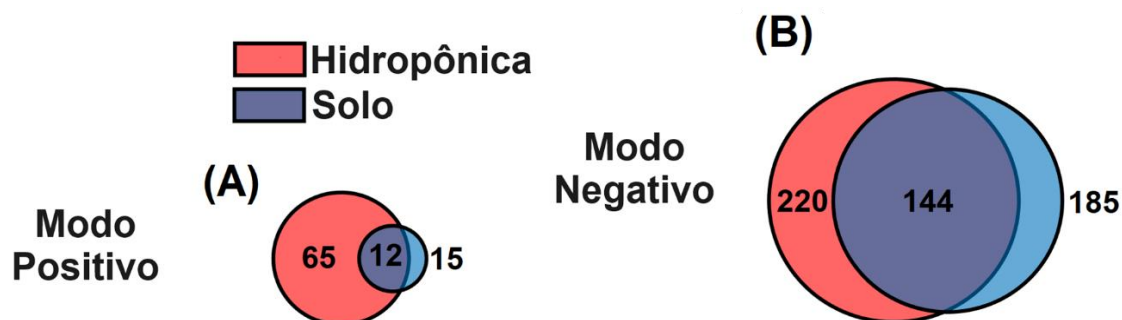
**Figura 46.** Classificação das amostras pelo método PLS-DA com as variáveis selecionadas pelo OPSDA para a predição das amostras de acordo com a sua variedade, para os modos de ionização positivo ((a) a (c)) e para os modos de ionizações negativos ((d) a (f))



Fonte: Próprio autor

Um diagrama de Venn foi construído para ilustrar a quantidade de variáveis selecionadas pelo OPSDA da avaliação PLS-DA, para a separação das amostras de alfaca de acordo com o método de cultivo para o modo positivo e negativo, conforme apresentado na Figura 47. A Figura 47a descreve o número de variáveis selecionadas para avaliar os métodos de cultivo no modo de ionização positivo, na qual 65 variáveis foram importantes para a classificação como hidropônica e 15 para em solo, com 12 variáveis comuns a ela. Já a Figura 47b descreve as variáveis selecionadas no modo negativo de ionização, em que 220 foram selecionadas para a classificação como hidropônica e 185 como solo, com 144 variáveis sendo comum a elas.

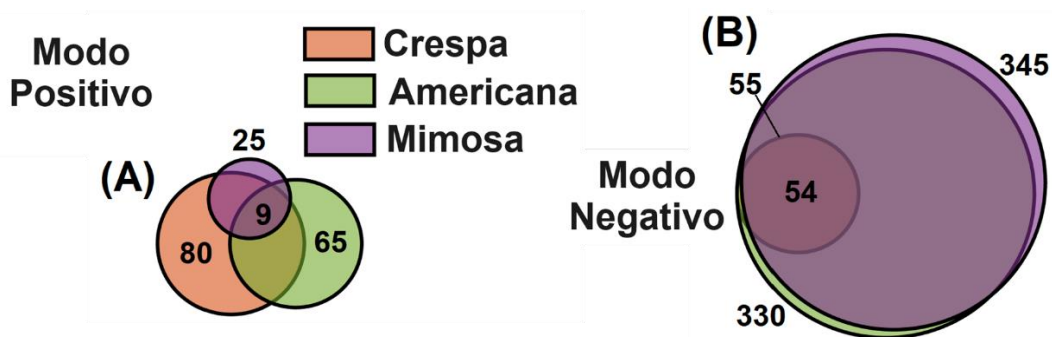
**Figura 47.** Diagrama de Venn para o número de variáveis selecionadas para a classificação das amostras de alface de acordo com o seu método de cultivo para os modos de ionização a) positivo e b) negativo



Fonte: Próprio autor

Um diagrama de Venn também foi construído para a quantidade de variáveis selecionadas para a separação das amostras de alface de acordo com sua variedade, como ilustrado na Figura 48. A Figura 48a, apresenta o número de variáveis selecionadas para avaliação da variedade, no modo de ionização positiva, na qual 80 variáveis foram selecionadas para a alface Crespa, 65 para a Americana e 25 para a Mimosa, com 9 variáveis sendo comum a todas elas. A Figura 48b, já demonstra o número de variáveis selecionadas para o modo negativo de ionização, na qual 54 variáveis foram selecionadas para a alface Crespa, 330 para a Americana e 345 para a Mimosa, com 55 variáveis compartilhadas entre todas as variedades de alface.

**Figura 48.** Diagrama de Venn para o número de variáveis selecionadas para a classificação das amostras de alface de acordo com a sua variedade para os modos de ionização a) positivo e b) negativo

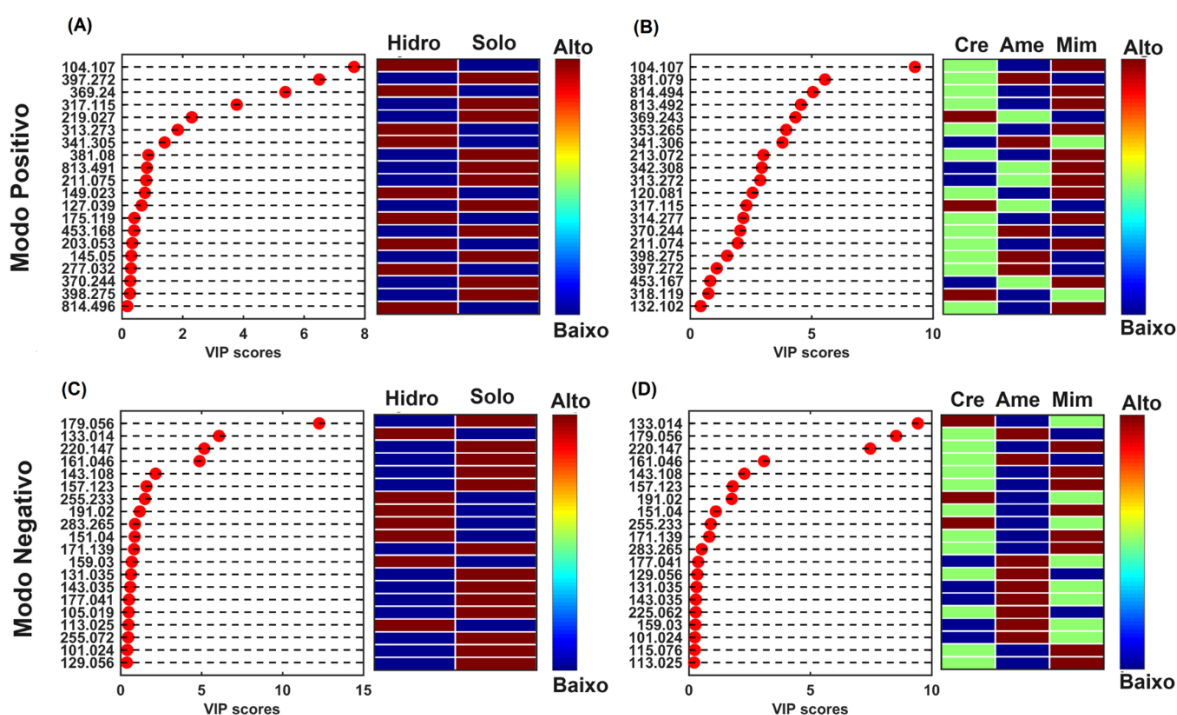


Fonte: Próprio autor

Para ilustrar os íons que influenciaram na distinção das amostras de alface de acordo com seu método de cultivo (solo e hidroponia) e variedades (Americana, Crespa e Mimosa), um vetor informativo do OPSDA, com as suas respectivas pontuações VIP. A

Figura 49 apresenta as pontuações VIP das 20 variáveis que foram mais importantes para a classificação das amostras de acordo com seu modo de cultivo e variedade, para o modo positivo e negativo de ionização. As Figuras 49a e 49b exibem as pontuações VIP para métodos de cultivo em modos de ionização positiva e negativa, respectivamente. As Figuras 48c e 48d mostram as pontuações VIP para variedades de alface em modos de ionização positiva e negativa, respectivamente.

**Figura 49.** Pontuações VIP das 20 variáveis que foram mais importantes para a classificação das amostras, a) separação de acordo com seu método de cultivo, no modo positivo; b) separação de acordo com seu método de cultivo, no modo negativo; c) separação de acordo com sua variedade, modo positivo; e d) separação de acordo com a variedade, modo negativo



Fonte: Próprio autor

Os íons apresentados na Figura 49 foram elucidados com o auxílio das plataformas mencionadas anteriormente e foi possível identificar 36 compostos, apresentados na Tabela 13. Como pode ser observado, todos os compostos da Tabela 13 apresentam erro de massa inferior a 5 ppm, o limite permitido para as análises utilizando analisadores do tipo Orbitrap.

**Tabela 13.** Notação dos metabólitos que influenciaram na separação das amostras de alface de acordo com seu método de cultivo e variedade, para o modo de ionização positivo e negativo.

<b>Composto</b>	<b><i>m/z</i> observada</b>	<b>Erro de massa (ppm)</b>	<b>Aduto</b>	<b>Classe do Composto</b>
Ácido succínico	101,02416	2,97	[M-H] <sup>-</sup>	Ácido graxo
Colina	104,10736	-1,63	[M+H] <sup>+</sup>	Aminoácido
Ácido d-glicérico	105,01910	-2,19	[M-H] <sup>-</sup>	Açúcar
Prolina	116,07092	-1,98	[M+H] <sup>+</sup>	Aminoácido
Valina	118,08657	2,71	[M+H] <sup>+</sup>	Aminoácido
Floroglucinol	127,03911	-3,15	[M+H] <sup>+</sup>	Composto fenólico
Ácido 3-metil-2-oxovalérico	129,05566	3,87	[M-H] <sup>-</sup>	Aminoácido
Ácido glutárico	131,03490	3,59	[M-H] <sup>-</sup>	Ácido graxo
Isoleucina	132,10207	1,29	[M+H] <sup>+</sup>	Aminoácido
Ácido málico	133,01402	2,48	[M-H] <sup>-</sup>	Ácido carboxílico
Ácido octanóico	143,10767	3,28	[M-H] <sup>-</sup>	Ácido graxo
Levoglusano	145,05050	2,90	[M+H- H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	-
Lisina	147,11288	0,54	[M+H] <sup>+</sup>	Aminoácido
Anidrido ftálico	149,02343	0,74	[M+H] <sup>+</sup>	-
Vanilina	151,03979	1,85	[M-H] <sup>-</sup>	Composto fenolico
Ácido pelargônico	157,12322	2,35	[M-H] <sup>-</sup>	Ácido graxo
Ácido oxoadípico	159,02976	2,64	[M-H] <sup>-</sup>	Ácido graxo
Levoglusano	163,06017	0,43	[M+H] <sup>+</sup>	-
Fenilalanina	166,08641	0,96	[M+H] <sup>+</sup>	Aminoácido
Ácido decanoico	171,13894	2,57	[M-H] <sup>-</sup>	Ácido graxo
Arginina	175,11911	0,91	[M+H] <sup>+</sup>	Aminoácido
Gulonolactona	177,04019	1,58	[M-H] <sup>-</sup>	-
Manose	179,05597	-0,78	[M-H] <sup>-</sup>	Açúcar
Ácido cítrico	191,01956	-0,89	[M-H] <sup>-</sup>	Ácido carboxílico

Continuação da tabela 13 na próxima página

Continuação da tabela 13

Composto	<i>m/z</i> observada	Erro de massa (ppm)	Aduto	Classe do Composto
Triptofano	205,09732	0,83	[M+H] <sup>+</sup>	Aminoácido
Monopalmitina	331,28433	0,15	[M+H] <sup>+</sup>	Ácido graxo
Erucamida	338,34192	0,53	[M+H] <sup>+</sup>	-
Ácido clorogênico	353,08792	3,45	[M-H] <sup>-</sup>	Composto fenólico
Monoestearina	359,31545	0,36	[M+H] <sup>+</sup>	Ácido graxo
Sacarose	381,07949	0,31	[M+K] <sup>+</sup>	Açúcar
Ácido chicórico	473,07248	1,01	[M-H] <sup>-</sup>	Composto fenólico

Fonte: Próprio autor

Levando em consideração os resultados apresentados na Figura 48 e na Tabela 13. Os íons correspondentes à colina (*m/z* 104,107) e *m/z* 397,272 foram os que influenciaram de maneira mais significativa para a diferenciação entre os métodos de cultivo para o modo de ionização positivo. Adicionalmente, para o modo negativo (Figura 46b) o açúcar manose (*m/z* 179,056) e o ácido málico (*m/z* 133,014), foram os que mais contribuíram para a separação do modo de cultivo. Para a classificação das amostras de alface de acordo com sua variedade, os íons que mais interferiram foram a colina (*m/z* 104,107) e a sacarose (*m/z* 381,079), para o modo de ionização positivo. Complementarmente, para o modo de ionização negativo (Figura 46d) o ácido málico (*m/z* 133,014) e a manose (*m/z* 179,056) foram os que mais contribuíram para a separação das amostras de acordo com sua variedade.

Avaliando os metabólitos que foram importantes para a separação entre o método de cultivo e as variedades de alface, tanto no modo positivo quanto no negativo, é possível observar que a colina, a manose e o ácido málico foram importantes para ambas as separações.

- A colina (*m/z* 104,107) é um aminoácido essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas. Ela pode ser oxidada para produzir glicina betaína, um

osmólito que se acumula nas plantas para mitigar vários estresses abióticos. Além disso, um aumento na concentração de colina pode estar associado a respostas à seca, sal e estresse oxidativo. Conseqüentemente, variações na concentração de colina podem indicar diferenças em ambientes de cultivo e variações entre variedades dependendo de sua resistência ao estresse. (GAO; MAO; ULLAH, 2020)

- A Manose ( $m/z$  179,056) é um açúcar simples derivado do manitol e, como alguns metabólitos primários, desempenha um papel central no crescimento das plantas, substituição celular, alocação de recursos e diferenciação. Além disso, há relatos de sua concentração variando em resposta à seca e a diferentes ambientes nutricionais, com a manose exercendo uma função osmoprotetora. (GENT, 2014)

- O ácido málico ( $m/z$  133,014) é o ácido orgânico predominante na alface. Como metabólito primário, ele desempenha um papel crucial na fisiologia da planta ao inibir microrganismos por meio de mecanismos associados ao pH, à proporção de formas de ácido orgânico relacionadas, ao comprimento da cadeia, à fisiologia celular e ao metabolismo. Além disso, estudos indicam que o conteúdo de ácido málico pode variar dependendo de fatores como exposição à luz, disponibilidade de água e a variedade da alface. (GENT, 2012)

Como reportado na literatura tanto a colina, como a manose e o ácido málico, são metabólitos presentes na alface que sofrem influência, quanto a variedade dessa hortaliça e ao seu método de cultivo. Conseqüentemente, a análise das variáveis, identificadas por meio do uso combinado da PLS-DA e OPSDA, forneceu informações importantes sobre as vias metabólicas que diferenciam variedades de alface e métodos de cultivo. Esta análise abrangente não apenas confirma a eficiência do método de PSI-MS associado a análise metabolômica, mas também ressalta o potencial dos metabólitos identificados para servir como biomarcadores para o controle de qualidade e práticas agrícolas para a produção da alface. As descobertas contribuem para uma compreensão mais profunda das distinções metabólicas associadas a diferenças no método de cultivo e na variedade da alface, abrindo caminho para pesquisas futuras envolvendo o uso do PSI-MS em análises metabolômicas.

#### **4.5. Métrica Verde**

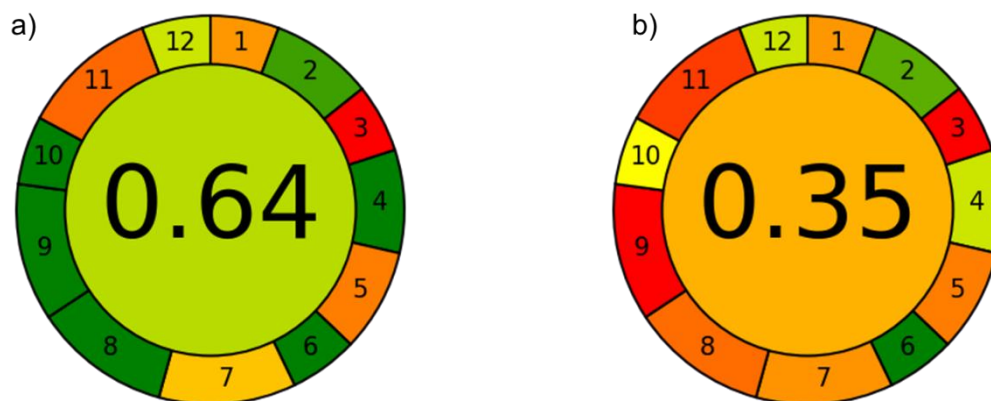
O PSI-MS demonstrou eficácia na diferenciação do perfil metabólico de amostras de alface com base no cultivo e na espécie. No entanto, é crucial mostrar que o método proposto é menos agressivo ao meio ambiente em comparação com os métodos

tradicionais. Para isso, é necessário utilizar ferramentas específicas que avaliem o impacto ambiental dessas técnicas. Entre as diversas ferramentas disponíveis, destaca-se o AGREE (PENA-PEREIRA; WOJNOWSKI; TOBISZEWSKI, 2020), projetado para medir o impacto de técnicas analíticas em geral.

O AGREE é um software voltado para determinar o quão verde é uma técnica analítica, diferente do AGREEprep esse software não é voltado para uma etapa da análise como o preparo da amostra, podendo ser aplicado em diferentes casos. O AGREE levava em consideração para sua medida alguns parâmetros como: 1 o preparo da amostra; 2 a quantidade de amostra necessária para análise; 3 como é a realizada a análise; 4 o número de etapas envolvidas no preparo da amostra; 5 se o método é automático e miniaturizado; 6 se é necessário derivatização; 7 a quantidade de resíduos analíticos; 8 o número de analitos avaliados e de amostras analisadas por hora; 9 o consumo de energia; 10 os reagentes utilizados são de fontes renováveis; 11 o método envolve o uso de reagentes tóxicos; 12 quais os riscos para o operador. Ao final a metodologia é pontuada de 0 a 1 e quanto mais próxima de 1 mais verde é seu método.(PENA-PEREIRA; WOJNOWSKI; TOBISZEWSKI, 2020)

Sendo assim o AGREE foi aplicado para determinar se a análise metabolômica aplicando PSI-MS é mais verde se comparada a uma metodologia clássica envolvendo LC-MS. Com esse intuito foi realizado um comparativo entre a metodologia PSI-MS desenvolvida nessa tese com a reportada por Garcia e colaboradores (GARCIA et al., 2016). Garcia desenvolveu um método para determinar metabólitos de amostras de alface americana, os extratos de alface foram preparados utilizando 0,3 g de amostra em 10 mL de metanol:água (80:20), após essa etapa ele é centrifugado por 15 min, evaporado e ressuspendidos em metanol, a análise é realizada em um LC-MS com vazão de 0,4 mL.min<sup>-1</sup>, como fase móvel foi utilizado água e acetonitrila, com tempo de análise cromatográfica de 22 min. A Figura 50, apresenta o comparativo entre as metodologias utilizando o AGREE. Como pode ser observado o método desenvolvido nessa tese foi pontuado em 0,64 já o método utilizado por Garcia apresentou pontuação de 0,35. Consequentemente, o método desenvolvido nesta tese, PSI-MS, para fins de estudo metabolômico é considerado mais verde se comparado a outro usando LC-MS, apresentando pontuação de acordo com o AGREE mais próxima de 1.

**Figura 50.** Comparação entre as metodologias empregadas em estudos metabolômicos aplicando o AGREE, a) PSI-MS do autor e b) LC-MS de Garcia e colaboradores



Fonte: Próprio autor

## 5. CONCLUSÃO

Neste capítulo pode-se concluir, que o PSI-MS é uma técnica eficiente para realização de estudo metabolômicos, conseguindo classificar amostras de alface de acordo com o seu método de cultivo e variedade. O PSI-MS demonstrou sensibilidade superior e intensidade de sinal maior em comparação ao ESI-MS, destacando sua eficácia na detecção e caracterização dos constituintes químicos de amostras de alface. A análise dos espectros de massas permitiu identificar diferenças entre as amostras de alface de acordo com sua variedade (America, Crespa e Mimosa) e método de cultivo, com PSI-MS mostrando ser uma ferramenta valiosa para análise de perfis metabolômicos detalhados devido à sua alta sensibilidade e requisitos mínimos de preparo de amostra. A análise quimiométrica usando PARAFAC e PLS-DA facilitou a diferenciação de variedades de alface e métodos de cultivo, ressaltando o impacto na composição metabólica da alface. Foi possível identificar 36 metabólitos que influenciam na separação das amostras de acordo com a sua variedade e método de cultivo, sendo que a colina, a manose e o ácido málico, foram identificados como cruciais para a diferenciação entre métodos de cultivo e variedades de alface. Sendo assim, o PSI-MS, combinado com ferramentas quimiométricas, provou ser uma abordagem poderosa para estudos metabolômicos, possibilitando a sua aplicação na pesquisa agrícola e de ciência alimentar, fornecendo um método robusto e eficiente para análise metabolômica com potenciais aplicações na otimização de práticas de cultivo e melhoria da qualidade da colheita. Adicionalmente, a

aplicação do PSI-MS se mostrou uma técnica mais verde se comparada a LC-MS se apresentando como uma alternativa de menor impacto ambiental para estudos metabolômicos.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS DA TESE**

Os métodos desenvolvidos nessa tese utilizando PSI-MS e DPX-MIP se mostram mais verdes se comparados aos métodos tradicionais de análise LC-MS e SPE. Além disso, conforme reportado no capítulo 1 o método DPX-MIP/LC-MS apresentou menor tempo de análise e valores de recuperação, precisão e exatidão próximo aos reportados na literatura, se mostrando uma metodologia eficiente para a determinação da melatonina e seus metabólitos (AFMK e AMK). Adicionalmente, a aplicação do PSI-MS para o estudo metabolômico voltado para a diferenciação das amostras de alface conforme a sua variedade e método de cultivo (capítulo 2), possibilitou a separação dessas amostras aplicando uma técnica simples, que demanda pouco tempo de análise e um baixo consumo de solvente, sendo que em alguns casos para sua realização não é necessário a realização da etapa de preparo da amostra, etapa crítica em uma análise química. Sendo assim, as metodologias reportadas nesta tese foram eficazes tanto para a quantificação da melatonina e seus metabólitos em leite materno, quanto para o estudo de diferenciação metabolômica de amostra de alface de acordo com o cultivo e variedade, se apresentando como ferramentas viáveis para análises quantitativas e de perfil metabolômico, demandando um menor tempo de análise, baixo consumo de solvente, além de apresentar menor custo se comparada as técnicas tradicionais.

## REFERÊNCIAS

ALBERICI, R. M. et al. Ambient mass spectrometry: bringing MS into the “real world”. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, n. 1, p. 265–294, 3 set. 2010.

ALLOCHIO FILHO, J. F. et al. Aplicação da espectrometria de massas com ionização por paper spray e técnicas relacionadas na análise direta de matrizes biológicas para detecção de drogas - uma revisão. **Química Nova**, 2023.

ALVES, M. V. S. et al. Multivariate classification techniques and mass spectrometry as a tool in the screening of patients with fibromyalgia. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 22625, 19 nov. 2021.

ARABI, M. et al. Molecular Imprinting: Green Perspectives and Strategies. **Advanced Materials**, v. 33, n. 30, 18 jul. 2021.

BAGHERI, A. R. et al. Dummy molecularly imprinted polymers based on a green synthesis strategy for magnetic solid-phase extraction of acrylamide in food samples. **Talanta**, v. 195, p. 390–400, abr. 2019.

BERNARDO, R. A. et al. Exploring salivary lipid profile changes in COVID-19 patients: Insights from mass spectrometry analysis. **Talanta**, v. 269, p. 125522, mar. 2024.

BORONAT ENA, M. DEL M.; COWAN, D. A.; ABBATE, V. Ambient ionization mass spectrometry applied to new psychoactive substance analysis. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 42, n. 1, p. 3–34, 26 jan. 2023.

BOYS, S. F.; BERNARDI, F. The calculation of small molecular interactions by the differences of separate total energies. Some procedures with reduced errors. **Molecular Physics**, v. 19, n. 4, p. 553–566, 23 out. 1970.

BRASIL. **Resolução da diretoria colegiada - RDC 166, de 24 de julho de 2017 da Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA)**. Disponível em: <<https://www20.anvisa.gov.br/coifa/pdf/rdc166.pdf>>. Acesso em: 21 abr. 2020.

BREWER, W. E. **Disposable pipette extraction**. United States Patent, , 2003. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/US6566145B2/en>>

BUNDY, J. G.; DAVEY, M. P.; VIANT, M. R. Environmental metabolomics: a critical review and future perspectives. **Metabolomics**, v. 5, n. 1, p. 3–21, 28 mar. 2009.

CÂMARA, J. S. et al. Green Extraction Techniques as Advanced Sample Preparation Approaches in Biological, Food, and Environmental Matrices: A Review. **Molecules**, v. 27, n. 9, p. 2953, 6 maio 2022.

CARASEK, E.; MORÉS, L.; HUELSMANN, R. D. Disposable pipette extraction: A critical review of concepts, applications, and directions. **Analytica Chimica Acta**, v. 1192, p. 339383, fev. 2022.

CHAMBERLAIN, C. A.; HATCH, M.; GARRETT, T. J. Extracellular Vesicle Analysis by Paper Spray Ionization Mass Spectrometry. **Metabolites**, v. 11, n. 5, p. 308, 11 maio 2021.

CHANG, Y.-S. et al. Topical Melatonin Exerts Immunomodulatory Effect and Improves Dermatitis Severity in a Mouse Model of Atopic Dermatitis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, p. 1373, 25 jan. 2022.

CHAVES, A. et al. Ambient Ionization Mass Spectrometry: applications and new trends for environmental matrices analysis. **Brazilian Journal of Analytical Chemistry**, 7 abr. 2022.

CHEN, R. et al. Recent applications of ambient ionization mass spectrometry in environmental analysis. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v. 15, p. 1–11, jul. 2017.

CHEN, Z. et al. Fabrication of poly(1-vinylimidazole)/mordenite grafting membrane with high pervaporation performance for the dehydration of acetic acid. **Journal of Membrane Science**, v. 349, n. 1–2, p. 175–182, 1 mar. 2010.

CHENG, Y. et al. Efficient and selective extraction of chlorogenic acid in juice samples using magnetic molecularly imprinted polymers. **Microchemical Journal**, v. 183, p. 108110, dez. 2022.

CHRUSTEK, A. et al. Effect of pasteurization on melatonin concentration in human breast milk. **Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej**, v. 76, n. 1, p. 220–227, 1 jan. 2022.

CIESLA, U.; SCHÜTH, F. Ordered mesoporous materials. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 27, n. 2–3, p. 131–149, fev. 1999.

COELHO, M. B. et al. Assessing melatonin and its oxidative metabolites amounts in biological fluid and culture medium by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS). **Analytical Methods**, v. 5, n. 24, p. 6911–6918, 2013.

COLLADO-GONZÁLEZ, J. et al. Unraveling the nutritional and bioactive constituents in baby-leaf lettuce for challenging climate conditions. **Food Chemistry**, v. 384, p. 132506, ago. 2022.

CORAZZA, G. et al. A hybrid material as a sorbent phase for the disposable pipette extraction technique enhances efficiency in the determination of phenolic endocrine-disrupting compounds. **Journal of Chromatography A**, v. 1513, p. 42–50, 1 set. 2017.

DE ALMEIDA, E. A. et al. Measurement of melatonin in body fluids: Standards, protocols and procedures. **Child's Nervous System**, v. 27, n. 6, p. 879–891, 21 jun. 2011.

DE MIDDELEER, G.; DUBRUEL, P.; DE SAEGER, S. Characterization of MIP and MIP functionalized surfaces: Current state-of-the-art. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 76, p. 71–85, fev. 2016.

DIJK, D.-J.; CAJOCHEN, C. Melatonin and the Circadian Regulation of Sleep Initiation, Consolidation, Structure, and the Sleep EEG. **Journal of Biological Rhythms**, v. 12, n. 6, p. 627–635, 29 dez. 1997.

DIL, E. A. et al. Nano-sized FeO@SiO-molecular imprinted polymer as a sorbent for dispersive solid-phase microextraction of melatonin in the methanolic extract of , biological, and water samples. **Talanta**, v. 221, p. 121620, jan. 2021.

DING, S. et al. Integrating ionic liquids with molecular imprinting technology for biorecognition and biosensing: A review. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 149, n. October 2019, p. 111830, 2020.

DOWLING, S. et al. Direct soil analysis by paper spray mass spectrometry: Detection of drugs and chemical warfare agent hydrolysis products. **Forensic Chemistry**, v. 17, p. 100206, mar. 2020.

DUARTE, L. C. et al. 3D printed microfluidic mixer for real-time monitoring of organic reactions by direct infusion mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 1190, p. 339252, jan. 2022.

ENGLER, A. C. et al. Breastfeeding may improve nocturnal sleep and reduce infantile colic: Potential role of breast milk melatonin. **European Journal of Pediatrics**, v. 171, n. 4, p. 729–732, 2012.

ESEN, E.; OSMAN, B.; DEMIR, M. N. Molecularly imprinted solid-phase extraction sorbent for selective determination of melatonin. **Microchemical Journal**, v. 170, p. 106666, nov. 2021.

ESPY, R. D. et al. Spray mechanism in paper spray ionization. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 325–327, p. 167–171, jul. 2012.

FEDICK, P. W. et al. Identification and Confirmation of Fentanyl on Paper using Portable Surface Enhanced Raman Spectroscopy and Paper Spray Ionization Mass Spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 31, n. 3, p. 735–741, 4 mar. 2020.

FELLER, D. Application of systematic sequences of wave functions to the water dimer. **The Journal of Chemical Physics**, v. 96, n. 8, p. 6104–6114, 15 abr. 1992.

FERNANDES, A. et al. Graphene Oxides Coated Paper as a Substrate to Paper Spray Ionization Mass Spectrometry for Creatinine Determination in Urine Samples. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2019.

FERREIRA, M. QUIMIOMETRIA III – REVISITANDO A ANÁLISE EXPLORATÓRIA DOS DADOS MULTIVARIADOS. **Química Nova**, 2022.

FOGUEL, M. V. et al. Synthesis and evaluation of a molecularly imprinted polymer for selective adsorption and quantification of Acid Green 16 textile dye in water samples. **Talanta**, v. 170, n. January, p. 244–251, 2017.

FREITAS, C. et al. Assessing organophosphorus and carbamate pesticides in maize samples using MIP extraction and PSI-MS analyzes. **Journal of Food Science and Technology**, v. 59, n. 6, p. 2510–2515, 4 jun. 2022.

FREY, B. S.; HEISS, D. R.; BADU-TAWIAH, A. K. Embossed Paper Platform for Whole Blood Collection, Room Temperature Storage, and Direct Analysis by Pinhole Paper Spray Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 94, n. 10, p. 4417–4425, 15 mar. 2022.

FRISCH, M. J. EA et al. **Gaussian 16**. Gaussian, Inc. Wallingford, CT, , 2016.

GALUSZKA, A.; MIGASZEWSKI, Z.; NAMIEŚNIK, J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 50, p. 78–84, out. 2013.

GAO, H.; MAO, H.; ULLAH, I. Analysis of Metabolomic Changes in Lettuce Leaves under Low Nitrogen and Phosphorus Deficiencies Stresses. **Agriculture**, v. 10, n. 9, p. 406, 16 set. 2020.

GARCIA, C. J. et al. Untargeted metabolomics approach using UPLC-ESI-QTOF-MS to explore the metabolome of fresh-cut iceberg lettuce. **Metabolomics**, v. 12, n. 8, p. 138, 29 ago. 2016.

GARCIA, K. O. et al. A green procedure using disposable pipette extraction to determine polycyclic aromatic sulfur heterocycles in water samples and solid petrochemical residues. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 32, n. 2, p. 277–286, 1 fev. 2021.

GARCINUÑO, R. M. et al. Assessment of Molecularly Imprinted Polymers as Selective Solid-Phase Extraction Sorbents for the Detection of Cloxacillin in Drinking and River Water. **Polymers**, v. 15, n. 21, p. 4314, 3 nov. 2023.

GENT, M. P. N. Rate of change of composition of lettuce in response to nitrogen depletion or re-supply. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 15, p. 3007–3015, 10 dez. 2012.

GENT, M. P. N. Effect of Daily Light Integral on Composition of Hydroponic Lettuce. **HortScience**, v. 49, n. 2, p. 173–179, fev. 2014.

GOMBERT, M.; CODOÑER-FRANCH, P. Melatonin in Early Nutrition: Long-Term Effects on Cardiovascular System. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 13, p. 6809, 24 jun. 2021.

GOMES, I. C. et al. Molecularly imprinted polymer as sorbent phase for disposable pipette extraction: A potential approach for creatinine analysis in human urine samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 211, p. 114625, mar. 2022.

GUNATA, M.; PARLAKPINAR, H.; ACET, H. A. Melatonin: A review of its potential functions and effects on neurological diseases. **Revue Neurologique**, v. 176, n. 3, p. 148–165, 2020.

HAMEED, M. K. et al. Differential Metabolic Responses of Lettuce Grown in Soil, Substrate and Hydroponic Cultivation Systems under  $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$  Application. **Metabolites**, v. 12, n. 5, p. 444, 16 maio 2022.

HARDELAND, R.; PANDI-PERUMAL, S. R.; CARDINALI, D. P. Melatonin. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 38, n. 3, p. 313–316, 2006.

HÄUSLER, S. et al. Melatonin in Human Breast Milk and Its Potential Role in Circadian Entrainment: A Nod towards Chrononutrition? **Nutrients**, v. 16, n. 10, p. 1422, 8 maio 2024.

HE, S. et al. Advances of molecularly imprinted polymers (MIP) and the application in drug delivery. **European Polymer Journal**, v. 143, p. 110179, jan. 2021.

HEHRE, W. J.; DITCHFIELD, R.; POPLER, J. A. Self—Consistent Molecular Orbital Methods. XII. Further Extensions of Gaussian—Type Basis Sets for Use in Molecular Orbital Studies of Organic Molecules. **The Journal of Chemical Physics**, v. 56, n. 5, p. 2257–2261, mar. 1972.

HERNÁNDEZ-GUERRERO, C. J. et al. Bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) under the spotlight of NMR metabolomics. **Food Research International**, v. 150, p. 110805, dez. 2021.

HOHOR, S. et al. Impaired Melatonin Secretion, Oxidative Stress and Metabolic Syndrome in Night Shift Work. **Antioxidants**, v. 12, n. 4, p. 959, 19 abr. 2023.

HONORIO-FRANÇA, A. C. et al. Human colostrum melatonin exhibits a day-night variation and modulates the activity of colostrum phagocytes. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 11, n. 3, p. 153–162, 31 jul. 2013.

HOWARTH, A. J. et al. Best Practices for the Synthesis, Activation, and Characterization of Metal–Organic Frameworks. **Chemistry of Materials**, v. 29, n. 1, p. 26–39, 10 jan. 2017.

HU, B.; YAO, Z.-P. Electrospray ionization mass spectrometry with wooden tips: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 1209, p. 339136, maio 2022.

HUANG, S. et al. Rapid Distinction and Semiquantitative Analysis of THC and CBD by Silver-Impregnated Paper Spray Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 93, n. 8, p. 3794–3802, 2 mar. 2021.

HUELSMANN, R. et al. Exploring Polypyrrole as Extraction Phase for Disposable Pipette Extraction Method for Multiclass Organic Micro-Pollutant Determination in River and Tap Water Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2020.

ITALIANER, M. F. et al. Circadian Variation in Human Milk Composition, a Systematic Review. **Nutrients**, v. 12, n. 8, p. 2328, 4 ago. 2020.

JIN, W. et al. High-throughput quantitation of trace level melatonin in human milk by on-line enrichment liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 1176, p. 338764, set. 2021.

JOSEPH, T. T. et al. Melatonin: the placental antioxidant and anti-inflammatory. **Frontiers in Immunology**, v. 15, 1 fev. 2024.

KALOGIOURI, N. P. et al. A volatilomics analytical protocol employing solid phase microextraction coupled to GC × GC-MS analysis and combined with multivariate chemometrics for the detection of pomegranate juice adulteration. **Talanta**, v. 266, p. 125027, jan. 2024.

KANNAIAH, K. P. et al. Environmental impact of greenness assessment tools in liquid chromatography – A review. **Microchemical Journal**, v. 170, p. 106685, nov. 2021.

KAREL, P. et al. The dark side of apnea: altered 24-hour melatonin secretion in obstructive sleep apnea (OSAS) is disease severity dependent. **Sleep and Breathing**, 27 maio 2024.

KARUNANITHI, D. et al. Quantitative determination of melatonin in milk by LC-MS/MS. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 4, p. 805–812, 2014.

KASPY, M. S. et al. Metabolomic profile of combined healthy lifestyle behaviours in humans: A systematic review. **PROTEOMICS**, v. 22, n. 18, 19 set. 2022.

KENNAWAY, D. J. A critical review of melatonin assays: Past and present. **Journal of Pineal Research**, v. 67, n. 1, 12 ago. 2019.

KENNAWAY, D. J. Measuring melatonin by immunoassay. **Journal of Pineal Research**, v. 69, n. 1, 27 ago. 2020.

KIMATA, H. Laughter elevates the levels of breast-milk melatonin. **Journal of Psychosomatic Research**, v. 62, n. 6, p. 699–702, 2007.

KLAMPFL, C. W.; HIMMELSBACH, M. Direct ionization methods in mass spectrometry: An overview. **Analytica Chimica Acta**, v. 890, p. 44–59, ago. 2015.

KOCH, U.; POPELIER, P. L. A. Characterization of C-H-O Hydrogen Bonds on the Basis of the Charge Density. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 99, n. 24, p. 9747–9754, 1 jun. 1995.

KORANY, M. A. et al. Green chemistry: Analytical and chromatography. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 40, n. 16, p. 839–852, 2 out. 2017.

KUMAR, V. et al. Bioactive metabolites identification of the foxnut and broken millet-based nutritional bar using HR-MS. **Food Chemistry: Molecular Sciences**, v. 9, p. 100214, dez. 2024.

LEE, C.; YANG, W.; PARR, R. G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. **Physical Review B**, v. 37, n. 2, p. 785–789, 15 jan. 1988.

LERNER, A. B. et al. ISOLATION OF MELATONIN, THE PINEAL GLAND FACTOR THAT LIGHTENS MELANOCYTES 1. **Journal of the American Chemical Society**, v. 80, n. 10, p. 2587–2587, maio 1958.

LI, J. et al. Routine analysis of pesticides in foodstuffs: Emerging ambient ionization mass spectrometry as an alternative strategy to be on your radar. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 63, n. 25, p. 7341–7356, 3 out. 2023.

LIMA, N. M. et al. Assessing the Effectiveness of Chemical Marker Extraction from Amazonian Plant Cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) by PSI-HRMS/MS and LC-HRMS/MS. **Metabolites**, v. 13, n. 3, p. 367, 1 mar. 2023.

LIPKOWSKI, P. et al. Properties of the C–H···H Dihydrogen Bond: An ab Initio and Topological Analysis. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 108, n. 49, p. 10865–10872, 1 dez. 2004.

LIU, Z. et al. Mass Spectrometry-Based Nontargeted and Targeted Analytical Approaches in Fingerprinting and Metabolomics of Food and Agricultural Research. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 70, n. 36, p. 11138–11153, 14 set. 2022.

LOVRIĆ, M. et al. Validation of a simple bioanalytical method for the determination of melatonin concentration in human serum using high-performance liquid chromatography with a fluorescent detector. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, p. 1–7, 7 maio 2024.

MACHADO, L. S. et al. Polypyrrole monolithic extraction phase: From conventional to miniaturized sample preparation techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 1651, p. 462260, ago. 2021.

MACIEL, L. Í. L. et al. Combining the Katritzky Reaction and Paper Spray Ionization Mass Spectrometry for Enhanced Detection of Amino Acid Neurotransmitters in Mouse Brain Sections. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 32, n. 10, p. 2513–2518, 6 out. 2021.

MAGLIOCCO, G. et al. Simultaneous determination of melatonin and 6-hydroxymelatonin in human overnight urine by LC-MS/MS. **Journal of Chromatography B**, v. 1181, p. 122938, set. 2021.

MAJIDINIA, M. et al. The multiple functions of melatonin in regenerative medicine. **Ageing Research Reviews**, v. 45, p. 33–52, ago. 2018.

MARTÍNEZ, L. et al. PACKMOL: A package for building initial configurations for molecular dynamics simulations. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30, n. 13, p. 2157–2164, out. 2009.

MARTINS, R. O. et al. Molecularly imprinted polymer as solid phase extraction phase for condensed tannin determination from Brazilian natural sources. **Journal of Chromatography A**, v. 1620, p. 460977, jun. 2020.

MARTINS, R. O. et al. Greener molecularly imprinted polymers: Strategies and applications in separation and mass spectrometry methods. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 168, p. 117285, nov. 2023.

MASINI, J. C.; SVEC, F. Porous monoliths for on-line sample preparation: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 964, p. 24–44, abr. 2017.

MCBRIDE, E. M. et al. Paper spray ionization: Applications and perspectives. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 118, p. 722–730, set. 2019.

MEDINA-LOZANO, I.; BERTOLÍN, J. R.; DÍAZ, A. Nutritional value of commercial and traditional lettuce (*Lactuca sativa* L.) and wild relatives: Vitamin C and anthocyanin content. **Food Chemistry**, v. 359, p. 129864, out. 2021.

MEGAHED, S. H. et al. Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction Strategy for Quinic Acid. **Polymers**, v. 14, n. 16, p. 3339, 16 ago. 2022.

MERCK. **Valor acetónitrila.**

MERCK. **Valor etanol.**

MEYDAN, Í. et al. Selective Extraction and Determination of Citrinin in Rye Samples by a Molecularly Imprinted Polymer (MIP) Using Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer Precipitation Polymerization (RAFTPP) with High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) Dete. **Analytical Letters**, v. 54, n. 10, p. 1697–1708, 2021.

MI, S. et al. Geographical discrimination and authentication of Chinese garlic based on multi-element, volatile and metabolomics profiling combined with chemometrics. **Food Control**, v. 130, p. 108328, dez. 2021.

MOLAD, M. et al. Melatonin Stability in Human Milk. **Breastfeeding Medicine**, v. 14, n. 9, p. 680–682, 1 nov. 2019.

MORAES, M. C. B.; LAGO, C. L. DO. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray” aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 556–563, ago. 2003.

MUÑOZ-JURADO, A.; ESCRIBANO, B. M. Presence of melatonin in foods of daily consumption: The benefit of this hormone for health. **Food Chemistry**, v. 458, p. 140172, nov. 2024.

MURDAYA, N. et al. A Review: Using Multiple Templates for Molecular Imprinted Polymer: Is It Good? **Polymers**, v. 14, n. 20, p. 4441, 20 out. 2022.

NAWAZ, N. et al. Molecularly imprinted polymers-based DNA biosensors. **Analytical Biochemistry**, v. 630, p. 114328, out. 2021.

NERGIZ, M.; ZENGER, O.; PEŞINT, G. B. L-proline determination by molecularly imprinted nanoparticles: A potential nanoscale tool for the diagnosis of metabolic disorders. **Journal of Chromatography A**, v. 1730, p. 465106, ago. 2024.

NOURAZARAN, M. et al. The structural and functional consequences of melatonin and serotonin on human  $\alpha$ B-crystallin and their dual role in the eye lens transparency. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1871, n. 5, p. 140928, set. 2023.

OLIVEIRA, F. S. **Concentração de melatonina no leite humano, qualidade do sono e saúde mental materna: estudo transversal**. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, 2024.

OLIVEIRA, F. S. et al. Melatonin in Human Milk: A Scoping Review. **Biological Research For Nursing**, 23 jul. 2024.

OLIVEIRA, T. C.; LANÇAS, F. M. Determination of selected herbicides employed in sugarcane crops by disposable pipette tip (DPX) extraction followed by LC-MS/MS and GC-MS/MS. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 44, n. 17–20, p. 872–879, 14 dez. 2021.

OLIVEIRA, T. C.; LANÇAS, F. M. Determination of selected herbicides in sugarcane-derived foods by graphene-oxide based disposable pipette extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1687, p. 463690, jan. 2023.

OTIFY, A. M. et al. A comprehensive analytical framework integrating liquid chromatography-tandem mass spectrometry metabolomics with chemometrics for metabolite profiling of lettuce varieties and discovery of antibacterial agents. **Food Research International**, v. 172, p. 113178, out. 2023.

PAKADE, V. E.; MOLEFE, E. D.; TAVENGWA, N. T. Quantitative determination of trace concentrations of quercetin from prickly pear skin complex sample extracts by application of molecularly imprinted polymers. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 5, n. 1, p. 1186–1195, fev. 2017.

PENA-PEREIRA, F.; WOJNOWSKI, W.; TOBISZEWSKI, M. AGREE—Analytical GREENness Metric Approach and Software. **Analytical Chemistry**, v. 92, n. 14, p. 10076–10082, 21 jul. 2020.

PEŠIĆ, M. P. et al. A novel method of molecular imprinting applied to the template cholesterol. **Talanta**, v. 217, p. 121075, set. 2020.

PINTO, M. A. L.; QUEIROZ, M. E. C. Extração em ponteiras descartáveis: fundamentos teóricos e aplicações. **Scientia Chromatographica**, v. 7, n. 2, p. 101–108, 2015.

PINTO, M. AP. L.; DE SOUZA, I. D.; QUEIROZ, M. E. C. 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, maio 2017.

POURFARZIB, M. et al. Molecularly imprinted nanoparticles prepared by miniemulsion polymerization as a sorbent for selective extraction and purification of

efavirenz from human serum and urine. **Journal of Chromatography B**, v. 974, p. 1–8, jan. 2015.

QIAN, J. et al. Unanticipated daytime melatonin secretion on a simulated night shift schedule generates a distinctive 24-h melatonin rhythm with antiphasic daytime and nighttime peaks. **Journal of Pineal Research**, v. 72, n. 3, 10 abr. 2022.

QIN, Y. et al. Variations in melatonin levels in preterm and term human breast milk during the first month after delivery. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–5, 2019.

QIN, Z. et al. Analytical opportunities and challenges for data handling with chemometrics strategies from LC-MS based food metabolomics. **Trends in Food Science & Technology**, v. 143, p. 104298, jan. 2024.

RAMALHO, R. R. F. et al. Fumonisin B1 analysis in maize by Molecularly Imprinted Polymer Paper Spray Ionization Mass Spectrometry (MIP-PSI-MS). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 107, n. August 2021, p. 104362, 2022.

RANKIN-TURNER, S.; HEANEY, L. M. Applications of ambient ionization mass spectrometry in 2020: An annual review. **Analytical Science Advances**, v. 2, n. 3–4, p. 193–212, 6 abr. 2021.

REITER, R. J. Pineal Melatonin: Cell Biology of Its Synthesis and of Its Physiological Interactions\*. **Endocrine Reviews**, v. 12, n. 2, p. 151–180, maio 1991.

REN, Y. et al. Analysis of Biological Samples Using Paper Spray Mass Spectrometry: An Investigation of Impacts by the Substrates, Solvents and Elution Methods. **Chromatographia**, v. 76, n. 19–20, p. 1339–1346, 5 out. 2013.

RODRÍGUEZ-SANTANA, C. et al. Role of Melatonin in Cancer: Effect on Clock Genes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 3, p. 1919, 18 jan. 2023.

ROQUE, J. V. et al. Comprehensive new approaches for variable selection using ordered predictors selection. **Analytica Chimica Acta**, v. 1075, p. 57–70, out. 2019.

ROZAS, I.; ALKORTA, I.; ELGUERO, J. Behavior of Ylides Containing N, O, and C Atoms as Hydrogen Bond Acceptors. **Journal of the American Chemical Society**, v. 122, n. 45, p. 11154–11161, 1 nov. 2000.

RUBIO, L.; SARABIA, L. A.; ORTIZ, M. C. Standard addition method based on four-way PARAFAC decomposition to solve the matrix interferences in the determination of carbamate pesticides in lettuce using excitation–emission fluorescence data. **Talanta**, v. 138, p. 86–99, jun. 2015.

RUIZ-PEREZ, D. et al. So you think you can PLS-DA? **BMC Bioinformatics**, v. 21, n. S1, p. 2, 9 dez. 2020.

SAAD, E. M. et al. Molecularly imprinted polymers for selective extraction of rosmarinic acid from *Rosmarinus officinalis* L. **Food Chemistry**, v. 335, p. 127644, jan. 2021.

SABIN, J. G.; FERRÃO, M. F.; FURTADO, J. C. Análise multivariada aplicada na identificação de fármacos antidepressivos. Parte II: Análise por componentes principais (PCA) e o método de classificação SIMCA. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 3, p. 387–396, set. 2004.

SALENTIJN, G. IJ.; PERMENTIER, H. P.; VERPOORTE, E. 3D-Printed Paper Spray Ionization Cartridge with Fast Wetting and Continuous Solvent Supply Features. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 23, p. 11657–11665, 2 dez. 2014.

SCHWARZ, L. J. et al. Sequential molecularly imprinted solid-phase extraction methods for the analysis of resveratrol and other polyphenols. **Journal of Chromatography A**, v. 1438, p. 22–30, 2016.

SENA, M. M.; TREVISAN, M. G.; POPPI, R. J. PARAFAC: uma ferramenta quimiométrica para tratamento de dados multidimensionais. Aplicações na determinação direta de fármacos em plasma humano por espectrofluorimetria. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 910–920, out. 2005.

SHELLEY, J. T. et al. Ambient desorption/ionization mass spectrometry: evolution from rapid qualitative screening to accurate quantification tool. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, n. 17, p. 4061–4076, 21 jul. 2018.

SHI, L. et al. Ambient Ionization Mass Spectrometry: Application and Prospective. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, p. 1–50, 7 out. 2022.

SILVA, W. R. et al. A Molecularly Imprinted Polymer-Disposable Pipette Tip Extraction-Capillary Electrophoresis (MISPE-DPX-CE) Method for the Preconcentration and Determination of Scopolamine in Synthetic Urine Samples. **Chemosensors**, v. 10, n. 10, p. 387, 23 set. 2022.

SMITH, B. L. et al. Ambient ion focusing for paper spray ionisation. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 471, p. 116737, jan. 2022.

SOARES, F. Q. et al. Disposable pipette extraction phase based on styrene–divinylbenzene/permanganiline composite, applied for dexamethasone determination in synovial fluid by HPLC with UV detector. **Acta Chromatographica**, p. 1–5, 2018.

STEWART, I. I. Electrospray mass spectrometry: a tool for elemental speciation. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 54, n. 12, p. 1649–1695, nov. 1999.

SUN, H. et al. Recent advances in micro- and nanomaterial-based adsorbents for pipette-tip solid-phase extraction. **Microchimica Acta**, v. 188, n. 6, p. 189, 15 jun. 2021.

SUWANVECHO, C.; KRČMOVÁ, L. K.; ŠVEC, F. Effective, convenient, and green sample preparation for the determination of retinol and retinol acetate in human serum using pipette tip microextraction. **Talanta**, v. 262, p. 124689, set. 2023.

TAKÁTS, Z. et al. Mass Spectrometry Sampling Under Ambient Conditions with Desorption Electrospray Ionization. **Science**, v. 306, n. 5695, p. 471–473, 15 out. 2004.

TAMURA, Y. et al. Metabolomic Evaluation of the Quality of Leaf Lettuce Grown in Practical Plant Factory to Capture Metabolite Signature. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, 27 jun. 2018.

TAN, S. C.; LEE, H. K. Fully automated graphitic carbon nitride-based disposable pipette extraction-gas chromatography-mass spectrometric analysis of six polychlorinated biphenyls in environmental waters. **Journal of Chromatography A**, v. 1637, p. 461824, jan. 2021a.

TAN, S. C.; LEE, H. K. Fully automated graphitic carbon nitride-based disposable pipette extraction-gas chromatography-mass spectrometric analysis of six polychlorinated biphenyls in environmental waters. **Journal of Chromatography A**, v. 1637, p. 461824, jan. 2021b.

TANG, H. et al. Proteomics and metabolomics analysis of tomato fruit at different maturity stages and under salt treatment. **Food Chemistry**, v. 311, p. 126009, maio 2020.

TAVARES, L. et al. Novel Method for the Extraction of Cocaine from Oral Fluid by Means of Disposable Pipette Modified with Restricted Access Material. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2021.

TAVARES, L. S. et al. Paper Spray Tandem Mass Spectrometry Based on Molecularly Imprinted Polymer Substrate for Cocaine Analysis in Oral Fluid. **Journal of The American Society for Mass Spectrometry**, v. 29, n. 3, p. 566–572, 1 mar. 2018.

TEIXEIRA, V. G.; COUTINHO, F. M. B.; GOMES, A. S. Principais métodos de caracterização da porosidade de resinas à base de divinilbenzeno. **Química Nova**, v. 24, n. 6, dez. 2001.

TYCOVA, A. et al. Electrospray: More than just an ionization source. **ELECTROPHORESIS**, v. 42, n. 1–2, p. 103–121, 6 jan. 2021.

VERDOLIVA, S. G. et al. Controlled comparisons between soil and hydroponic systems reveal increased water use efficiency and higher lycopene and  $\beta$ -carotene contents in hydroponically grown tomatoes. **Scientia Horticulturae**, v. 279, p. 109896, mar. 2021.

VO, K. T. X. et al. Proteomics and Metabolomics Studies on the Biotic Stress Responses of Rice: an Update. **Rice**, v. 14, n. 1, p. 30, 15 dez. 2021.

WANG, H. et al. Paper Spray for Direct Analysis of Complex Mixtures Using Mass Spectrometry. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 49, n. 5, p. 877–880, 25 jan. 2010.

WANG, L. et al. Performance analysis of two typical greenhouse lettuce production systems: commercial hydroponic production and traditional soil cultivation. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, 4 jul. 2023.

WANG, M. et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature Biotechnology**, v. 34, n. 8, p. 828–837, 9 ago. 2016.

WANG, Q. et al. Fast and Sensitive Detection of Oligosaccharides Using Desalting Paper Spray Mass Spectrometry (DPS-MS). **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 31, n. 10, p. 2226–2235, 7 out. 2020.

WANG, W. et al. Insights into the microbial assembly and metabolites associated with ginger (*Zingiber officinale* L. Roscoe) microbial niches and agricultural environments. **Science of The Total Environment**, v. 947, p. 174395, out. 2024.

WARTHA, C. A. et al. Classification of sugarcane genotypes susceptible and resistant to the initial attack of sugarcane borer *Diatraea saccharalis* using epicuticular wax composition. **Phytochemistry**, v. 199, p. 113175, jul. 2022.

WINDER, C. L. et al. Providing metabolomics education and training: pedagogy and considerations. **Metabolomics**, v. 18, n. 12, p. 106, 13 dez. 2022.

WISHART, D. S. et al. HMDB 5.0: the Human Metabolome Database for 2022. **Nucleic Acids Research**, v. 50, n. D1, p. D622–D631, 7 jan. 2022.

WOJNOWSKI, W. et al. AGREEprep – Analytical greenness metric for sample preparation. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 149, p. 116553, abr. 2022.

WONG, A. et al. Study on the cross-linked molecularly imprinted poly(methacrylic acid) and poly(acrylic acid) towards selective adsorption of diuron. **Reactive and Functional Polymers**, v. 100, p. 26–36, 2016.

WU, W. et al. Emerging applications of metabolomics in food science and future trends. **Food Chemistry: X**, v. 16, p. 100500, dez. 2022.

XIE, L. et al. Theoretical Insight into the Interaction between Chloramphenicol and Functional Monomer (Methacrylic Acid) in Molecularly Imprinted Polymers. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 11, p. 4139, 10 jun. 2020.

XU, W. et al. Preparation and evaluation of a novel surface-imprinted polymer for selective adsorption of dibenzothiophene. **Microchimica Acta**, v. 175, n. 1–2, p. 167–175, 2011.

YANG, J. et al. Microbial and Chemical Profiles of Commercial Kombucha Products. **Nutrients**, v. 14, n. 3, p. 670, 5 fev. 2022.

YANG, X. et al. A novel integrated non-targeted metabolomic analysis reveals significant metabolite variations between different lettuce (*Lactuca sativa*. L) varieties. **Horticulture Research**, v. 5, n. 1, p. 33, 25 dez. 2018.

YU, J. et al. Temporal dynamics of stress response in *Halomonas elongata* to NaCl shock: physiological, metabolomic, and transcriptomic insights. **Microbial Cell Factories**, v. 23, n. 1, p. 88, 23 mar. 2024.

ZHANG, B.; FAN, X.; ZHAO, D. Computer-Aided Design of Molecularly Imprinted Polymers for Simultaneous Detection of Clenbuterol and Its Metabolites. **Polymers**, v. 11, n. 1, p. 17, 23 dez. 2018.

ZHANG, J. et al. Melatonin: Unveiling the functions and implications in ocular health. **Pharmacological Research**, v. 205, p. 107253, jul. 2024.

ZHAO, G. et al. Recent Advances in Molecularly Imprinted Polymers for Antibiotic Analysis. **Molecules**, v. 28, n. 1, p. 335, 1 jan. 2023.

ZHAO, Y.; SUN, Y.; LI, C. Simultaneous determination of ginkgo flavonoids and terpenoids in plasma: Ammonium formate in LC mobile phase enhancing electrospray ionization efficiency and capacity. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 19, n. 3, p. 445–449, 1 mar. 2008.

ZHDANOVA, I. V. Melatonin as a hypnotic: Pro. **Sleep Medicine Reviews**, v. 9, n. 1, p. 51–65, fev. 2005.

ZHOU, W. et al. Metabolomics analysis reveals potential mechanisms of phenolic accumulation in lettuce (*Lactuca sativa* L.) induced by low nitrogen supply. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 158, p. 446–453, jan. 2021.