

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“PERFIL QUÍMICO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE
METABÓLITOS NA POLPA DO AÇAÍ (*Euterpe oleracea*
Mart.) POR RMN”**

Thayana da Conceição Alves*

Tese apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de DOUTOR(A) EM
CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA
ORGÂNICA.

Orientador(a): Antonio Gilberto Ferreira

*** bolsista CNPQ**

**São Carlos - SP
2018**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

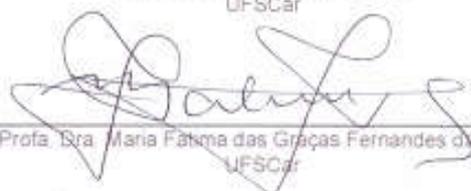
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Thayana da Conceição Alves, realizada em 06/07/2018.



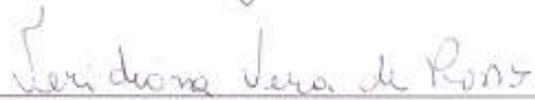
Prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira
UFSCar



Prof. Dr. Renato Lajanim Carneiro
UFSCar



Profa. Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva
UFSCar



Profa. Dra. Veridiana Vera de Rosso
UNIFESP



Prof. Dr. Luiz Alberto Colnago
EMBRAPA

DEDICATÓRIA

*Mãe, Pai, Neném e Vovó Tita, pilares da minha vida,
esse humilde trabalho é dedicado a vocês. Amo-vos!*

AGRADECIMENTOS

Ao meu Senhor e meu Deus, pois tudo o que tenho e sou é graças a Ele.

As meus pais Joenice e Jorge, irmãos Nathalia e Luís Felipe, avó Leonice e demais familiares pelo apoio, amor, carinho, suporte e constante incentivo em todas as jornadas da minha vida.

Ao meu namorado Ray pelo imenso amor, carinho e compreensão e, a sua família pelo incentivo.

Ao Prof. Antonio Gilberto Ferreira, pela oportunidade, pelos ensinamentos, pela orientação deste trabalho e pelos conselhos de vida.

As pesquisadoras da Embrapa Amazônia Oriental, Dra. Maria do Socorro, Dra. Rafaella Mattietto, Dra. Ana Vânia Carvalho pelo fornecimento das amostras de açaí e pelas análises físico-químicas.

Ao Prof. Renato Lajarim do DQ-UFSCar pela colaboração deste trabalho e ensinamentos transmitidos.

A Profa. Dra. Susanne Rath e o doutorando Rafael do Laboratório de Bioanalítica Paracelsus da Unicamp pelo auxílio nas análises com o extrator acelerado por solvente ASE™ 350.

A Dra. Lorena Mara Alexandre e Silva da Embrapa Tropical pelas extrações com DIONEX ASE™ 350.

A Profa. Quézia Cass do Laboratório Separare/UFSCar pelas análises no EM, em especial a doutoranda Amanda Aquino Jordano pela sincera e enorme amizade, além das colaborações com a cromatografia e com os experimentos de espectrometria de massas.

Ao Prof. Tiago Venâncio pelas conversas, colaborações, discussões e ensinamentos transmitidos.

Aos meus amigos do RMN da UFSCar pelas trocas de conhecimentos e momentos de descontração: Sérgio, Tatieleh, Lyege, Clayton, Rafael, Maiara, Elenilson, Lorena, Sheraz, Valéria, Darlene, Tatiana e aos técnicos Luciana e Paulo.

Aos professores do DQ da UFSCar pelos ensinamentos transmitidos e as meninas da secretaria, Ariane, Cristina e Luciani pelo atendimento atencioso.

A Poliana, Eliane, Waléria, Edione, Amanda e Hocelayne desejo que conservemos sempre a nossa amizade.

As amigas da dança do ventre, em especial, Angel, Ana Luiza, Elisa e Tatiane; e aos amigos do treinamento funcional, em especial, Franciele, Camila e Marina pelas descontrações, incentivos, risos e companheirismo.

A amiga Amanda Costa e sua querida família, Donizete, Eliete, Richar e Dudinha que me acolheram e me adotaram como uma verdadeira filha na cidade de São Carlos.

Aos professores do DQ da UFMT pelo incentivo em seguir a carreira acadêmica e pelos ensinamentos ao longo da graduação e do mestrado.

Aos meus amigos de Cuiabá-MT pelo incentivo à distância.

À FAUSB (Várzea Grande – MT) por disponibilizar a infraestrutura da biblioteca e ao Sr. Rezende (Bibliotecário) pela gentileza e simpatia.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro.

EPÍGRAFE

“A *Sabedoria* é resplandecente e sempre viçosa. Ela é facilmente contemplada por aqueles que a amam, e é encontrada por aqueles que a procuram. Ela até se antecipa, dando-se a conhecer aos que a desejam. Quem por ela madruga não se cansará, pois a encontrará sentada à sua porta. E quem ficar acordado por causa dela, em breve há de viver despreocupado. Pois ela mesma sai à procura dos que a merecem, cheia de bondade, aparece-lhes nas estradas e vai ao seu encontro em todos os seus projetos”.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

¹³ C	Isótopo de carbono treze
¹ H	Isótopo de hidrogênio
³¹ P	Isótopo de fósforo
AOAC	<i>American of Analytical Chemistry</i>
AQ	Tempo de aquisição (do inglês, <i>Acquisition Time</i>)
ASE™	Extração acelerada por solvente (do inglês, <i>Accelerated Solvent Extraction</i>)
AT	Ácidos graxos totais
ATMA	<i>Automatic Tuning MAtching</i>
B ₀	Campo magnético estático
<i>bucket table</i>	Fragmento selecionável dos espectros de RMN de ¹ H para análise quimiométricas no AMIX®
CG	Cromatografia Gasosa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COSY	<i>COrrrelation SpectroscopY</i>
CPATU	Embrapa Amazônia Oriental - Belém (PA)
d	Dupleto
D ou ² H	Deutério ou Isótopo do átomo de hidrogênio 2
d1	Tempo de espera entre cada aquisição
d8	Tempo de mistura
dd	Dupleto de dupleto
DEVISA	Departamento de Vigilância Sanitária de Belém (PA)
DOSY	<i>Diffusion Ordered SpectroscopY</i>
DP	Desvio padrão
dt	Duplo tripleto
E	Entressafra do açaí
F1	Eixo vertical no espectro bidimensional
F2	Eixo horizontal no espectro bidimensional
GPC	glicerofosforilcolina
GPG	glicerofosfoglicerol
GPI	glicerofosfoinositol
HR-MAS	<i>High-Resolution - Magic Angle Spinning</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
<i>J</i>	Constante de acoplamento entre spins nucleares (em Hz)
JRES	<i>Homonuclear J-resolved Spectroscopy</i>
LB	Fator de multiplicação exponencial (do inglês, <i>Line Broadening</i>)
LC-NMR	Cromatografia líquida acoplada à ressonância magnética nuclear
m	Multiplete
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento
MeOH-d ₄	Metanol deuterado
MS	Espectroscopia de massa (do inglês, <i>Mass Spectroscopy</i>)

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

NS	Número de promediações (do inglês, <i>Number of Scans</i>)
p1	Tempo de duração do pulso de 90°
PC	Componentes Principais
PCA	Análise de Componentes Principais (do inglês, <i>Principal Component Analysis</i>)
PIQ	Padrões de Identidade e Qualidade Mínima para Polpas de Frutos
PI9	Atenuação da potência utilizada para saturação do sinal do HDO
PLE	Extração com líquido pressurizado (do inglês, <i>Pressurized liquid Extraction</i>)
<i>plot</i>	ponto referente a amostra do modelo da PCA
PMG	Programa de Melhoramento Genético do Açaizeiro
ppm	Parte por milhão
RG	Ganho do receptor
RMN 1D	Ressonância Magnética Nuclear unidimensional
RMN 2D	Ressonância Magnética Nuclear bidimensional
RMN ou NMR	Ressonância Magnética Nuclear
s	Simpleto
S	Safra do açaí
SAGRI	Secretaria de Agricultura do Pará
SI	Número de pontos no processamento (do inglês, <i>data Size</i>)
SPE	Extração por fase sólida (do inglês, <i>Solid Phase Extraction</i>)
SST	Sólidos Solúveis Totais
SW	Janela espectral (do inglês, <i>Spectral Window</i>)
t	Tripleto
T0	Tempo zero de exposição
T12	Tempo de exposição por doze horas
T6	Tempo de exposição por seis horas
TD	Número de pontos digitalizados na aquisição (do inglês, <i>Time Domain</i>)
TGI	Triacilgliceróis insaturados
TGS	Triacilgliceróis saturados
<i>time slice</i>	“fatiamento por tempo” - modo de operação do LC-NMR
TMSP-d4	Sal de 2,2,3,3-D4-trimetilsililpropionato de sódio
TOCSY	<i>Total Correlation Spectroscopy</i>
UV	Ultravioleta
δ	deslocamentos químicos em ppm

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 – Atividades biológicas dos frutos do açaí (<i>Euterpe oleracea</i>).....	5
TABELA 1.2 – Compostos químicos descritos nos frutos do açaí (<i>Euterpe oleraceae</i>).	6
TABELA 2.1 – Amostras das polpas do açaí de genótipos do Programa de Melhoramento Genético (PMG) da Embrapa Amazônia Oriental – Belém (PA).....	37
TABELA 2.2 – Amostras de polpas do açaí comerciais obtidas na cidade de Belém – PA...38	
TABELA 2.3 – Polpas do açaí selecionadas para estudo por RMN 1D e 2D.	40
TABELA 2.4 – Parâmetros de aquisição e processamento dos espectros de RMN de ¹ H usados para obtenção de <i>fingerprint</i> das polpas do açaí liofilizadas.	41
TABELA 2.5 – Parâmetros de aquisição e processamento utilizados nos espectros de RMN 2D usados para identificação dos compostos orgânicos presentes nas polpas do açaí liofilizadas.....	42
TABELA 2.6 - Compostos orgânicos identificados nas polpas do açaí liofilizado comercial e genótipo.....	46
TABELA 2.7 - Deslocamento químico dos sinais de RMN de ¹ H dos compostos lipídicos majoritários das polpas do açaí.....	58
TABELA 2.8 - Amostra utilizadas no estudo de degradação da polpa do açaí.....	80
TABELA 2.9 - Atribuições de sinal para espectro de RMN de ¹ H da polpa de açaí comercial CPDA submetida à exposição solar e temperatura.	82
TABELA 3.1 – Valores das médias e desvio padrão dos parâmetros físico-químicos para as amostras de polpas do açaí comerciais e de genótipos.	102
TABELA 3.2 – Teores de antocianinas totais, monoméricas e compostos fenólicos totais em amostras de polpas do açaí genótipos e comerciais.	103
TABELA 3.3 – Valores de pH, acidez, sólidos solúveis totais, teor de antocianinas totais, monoméricas e fenólicos totais das polpas do açaí utilizadas no estudo de degradação. ...	122
TABELA 4.1 – Extrações realizadas com a polpa do açaí comercial com ASE 350.	125
TABELA 4.2 – Parâmetros de aquisição e processamento do espectro de RMN de ¹³ C usado para identificação dos compostos orgânicos presentes nos extratos da polpa do açaí liofilizada.....	125
TABELA 4.3 – Parâmetros de aquisição e processamento utilizados no experimento de DOSY.	126
TABELA 4.4 – Extratos obtidos com a polpa do açaí comercial pelo extrator ASE 350.	127
TABELA 4.5 – Extrações realizadas com a polpa do açaí comercial pelo extrator ASE 350 na Embrapa Agroindústria Tropical (repetição sem terra diatomácea).....	132
TABELA 4.6 – Atribuição dos deslocamentos químicos de RMN de ¹ H dos trigliceróis do extrato hexânico da polpa do açaí por ASE.	139
TABELA 4.7 – Metodologia utilizada para a determinação dos ácidos graxos por RMN de ¹ H na polpa do açaí de acordo com BARISON et al., 2010.	143
TABELA 4.8 – Teor de ácidos graxos da polpa do açaí extraída com hexano por ASE 350 e outros valores encontrados na literatura.	144

TABELA 4.9 – Metodologia de extração do óleo da polpa de açaí.....	144
TABELA 5.1 – Variáveis e níveis do planejamento fatorial realizado para desenvolvimento das condições cromatográficas do extrato do açaí por LC-UV.....	152
TABELA 5.2 – Experimentos do planejamento fatorial para desenvolvimento com as variáveis codificadas nos níveis alto (1) e baixo (-1).....	152
TABELA 5.3. Parâmetros de aquisição e processamento dos espectros de RMN de ¹ H.....	154
TABELA 5.4– Parâmetros de aquisição e processamento dos espectros de RMN 2D.	155
TABELA 5.5 - Variáveis e níveis do novo planejamento fatorial 2 ² realizado para o desenvolvimento das condições cromatográficas do extrato metanólico da polpa do açaí por LC-UV.....	158
TABELA 5.6 – Níveis e respostas do novo planejamento fatorial 2 ² realizado para o desenvolvimento das condições cromatográficas do extrato metanólico da polpa do açaí por LC-UV.....	158
TABELA 5.7 – Tabela de ANOVA para o número de bandas cromatográficas do novo planejamento 2 ² (modelo recalculado).	159
TABELA 5.9 – Dados de RMN para o composto majoritário da banda T3 (0,2 mg em 130 µl de MeOH- <i>d</i> ₄ em um 600 MHz com <i>cryoprobe</i> a 298 K).....	172
TABELA 5.10 – Dados de RMN para o composto majoritário da banda cromatográfica T5 (0,6 mg em 130 µL de MeOH- <i>d</i> ₄ em um 600 MHz com <i>cryoprobe</i> a 298 K).....	182
TABELA 5.11– Dados de RMN para o composto majoritário da banda cromatográfica T6 (0,5 mg em 130 µL de MeOH- <i>d</i> ₄ em um 600 MHz com <i>cryoprobe</i> a 298 K).....	192

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 - Palmeira de <i>Euterpe oleracea</i> (A), cacho do açaí-roxo (B) e fruto do açaí roxo (C). Fotos: própria autora obtida na Embrapa Amazônia Oriental – Belém-PA.	2
FIGURA 1.2 – Retirada dos cachos do açaí pelo colhedor com escada (A), cacho do açaí colhido e depositado sobre lona (B). Fotos: própria autora em Embrapa Amazônia Oriental – Belém-PA.	4
FIGURA 1.3 – Processo de imersão dos frutos em água quente (A), fruto do açaí após imersão (B), frutos dentro da despoldadeira (C) e suco do açaí/ vinho do açaí (D).	4
FIGURA 1.4 – Antocianinas e flavonoides majoritários relatados no açaí.	9
FIGURA 1.5 – Lignananas e outros compostos relatados no açaí (<i>Euterpe oleracea</i>).	10
FIGURA 1.6 – Modo de consumo e produtos comercializados do açaí. Fotos: A e B: própria autora em Mercado Ver-o-Peso, Belém (PA). C-E: http://guaravita.com.br/produtos/guaraviton ; https://frooty.com.br/produtos-acai/	11
FIGURA 1.7 – Publicações incluindo o termo “Food” e “NMR” no título, palavras-chave e resumo da base de dados Scielo.	16
FIGURA 1.8 – Esquema geral da metodologia realizada para o estudo de metaboloma por RMN em alimentos. Exemplo em RMN de alta resolução em polpas do açaí.	17
FIGURA 1.9 – Esquema geral com os modos de operação da hifenção LC-UV-NMR.	19
FIGURA 1.10 – Representação das etapas envolvidas no planejamento fatorial em um estudo. Fonte: PEREIRA FILHO, 2015.	23
FIGURA 1.11 – Representação dos gráficos de superfície de resposta (à esquerda) e de contorno (à direita) de um determinado estudo. Fonte: ZHAO et al., 2012.	24
FIGURA 1.12 – Representação do tratamento quimiométrico por PCA em dados de RMN de ¹ H das polpas do açaí.	25
FIGURA 1.13 – Espectros de RMN de ¹ H das polpas do açaí com diferentes fatores que influenciam nas análises quimiométricas.	27
FIGURA 1.14 – Equipamentos para extração com líquido pressurizado (PLE) da FMS e Dionex™. Fonte: DIONEX, 2018 e FMS, 2018.	28
FIGURA 2.1 - Protocolo de preparo dos frutos do açaí na Embrapa Amazônia Oriental (CPATU) em Belém – PA. Fotos: própria autora em Embrapa Amazônia Oriental.	34
FIGURA 2.2 - Protocolo de extração da polpa dos frutos de açaí na Embrapa Amazônia Oriental (Belém – PA).	35
FIGURA 2.3 - Regiões do espectro de RMN de ¹ H de uma amostra de açaí utilizada nas análises de quimiometria. (a) exclusão da região sem sinal da amostra (b) do sinal do solvente MeOH-d ₄ (c) pré-saturação do sinal do HDO do solvente (faixa na cor cinza).	44
FIGURA 2.4 - Espectros de RMN de ¹ H da polpa do açaí liofilizada comercial (azul) e genótipo (verde). MeOH-d ₄ em um 400 MHz.	45
FIGURA 2.5 - Compostos identificados nos extratos metanólicos das polpas do açaí comercial e de genótipo por RMN 1D e 2D.	48
FIGURA 2.6 - Mapa de contorno COSY de uma polpa comercial de açaí com ampliações. MeOH-d ₄ em um 400 MHz. A) região de 0,50 a 3,5; B) 3,0 a 6,0 e C) 5,4 a 8,40. Compostos:	

1, leu; 2, ser; 3, glu; 4, val; 7, α -gli; 8, β -gli; 9, fru; 18, GABA; 10, AG; 11, AGI; 12, glicerídeo; 13, metilas; 14, acilas; 30, Ác. *p*-hfa.50

FIGURA 2.7 - Mapa de contorno HSQC de uma polpa comercial do açaí com atribuições de alguns compostos identificados. MeOH- d_4 em um 400 MHz. Compostos: 2, ser; 3, val; 7, α -gli; 8, β -gli; 9, fru; 10, AG; 11, AGI; 12, glicerídeo; 13, metilas; 14, grupos acilas.51

FIGURA 2.8 - Espectro de RMN de ^1H de uma amostra de polpa do açaí liofilizada comercial com atribuições dos compostos caracterizados por RMN 1D e 2D. MeOH- d_4 em um 400 MHz.52

FIGURA 2.9 - Espectros de RMN de ^1H de extratos metanólicos das polpas do açaí liofilizadas comerciais e de genótipos. MeOD- d_4 (0,02% TMSP- d_4) em um 400 MHz.....55

FIGURA 2.10 - Gráfico de escores da PC1 x PC4 (47,31% variância explicada) para os espectros de RMN de ^1H das polpas do açaí de genótipos da CPATU e comerciais de Belém (PA).55

FIGURA 2.11 - Gráfico de pesos (PC1 x PC4) para os espectros de RMN de ^1H das polpas do açaí. Polpas de genótipos da CPATU e comerciais de Belém (PA).56

FIGURA 2.12 - Espectro de RMN de ^1H de polpas do açaí com a representação dos intervalos variáveis (sub-linha azul) selecionados para a formação das *bucket table* geradas pelo programa AmixTM.58

FIGURA 2.13 - Gráfico de escores e pesos da PC5 x PC6 (4,03% variância total) para os espectros de RMN de ^1H das polpas do açaí dos genótipos e comerciais.59

FIGURA 2.14 - Gráfico de escores e pesos da PC1 x PC2 para os espectros de RMN de ^1H das polpas do açaí dos genótipos ("G") e comerciais ("C") do açaí avaliadas pelo perfil lipídico.60

FIGURA 2.15 - Espectro de RMN de ^1H de polpas do açaí com a região para o estudo de hidrogênios aromáticos e nitrogenados para a formação das *bucket table* com 0,04 ppm. Exclusão das regiões sem sinal da amostra (retângulo azul). MeOH- d_4 em um 400 MHz.61

FIGURA 2.16 - Gráfico de escores e pesos da PC2 x PC4 (33,16% variância explicada) para os espectros de RMN de ^1H das polpas do açaí dos genótipos ("G") e comerciais ("C").62

FIGURA 2.17 - Gráfico de escores e pesos da PC3 x PC4 (17,37% variância total) para os espectros de RMN de ^1H das polpas do açaí dos genótipos ("G") e comerciais ("C").63

FIGURA 2.18 - Espectros de RMN de ^1H de extratos metanólicos da polpa de genótipos do açaí liofilizada. MeOD- d_4 (0,02% TMSP- d_4) em um equipamento 400 MHz.65

FIGURA 2.19 - Gráfico de escores para os espectros de RMN de ^1H das polpas do açaí dos genótipos do açaí. a) PC1 x PC2 (57,57% variância total) e b) PC1 x PC4 (49,71% variância total).66

FIGURA 2.20 - Gráfico de pesos para os espectros de RMN de ^1H das polpas dos genótipos do açaí por RMN de ^1H . a) PC1 x PC2 e b) PC1 x PC4.66

FIGURA 2.21 - Região dos espectros de RMN de ^1H da polpa do açaí de genótipos que apresentaram distinção nas análises quimiométricas. MeOH- d_4 em um 400 MHz.....67

FIGURA 2.22 – Informações mensais de algumas condições meteorológicas da cidade de Belém (PA) para o ano de 2017. Fonte: Instituto Nacional de Meteorologia - INMET (normal climatológica 61-90). E: entressafra do açaí; S: safra do açaí.....69

FIGURA 2.23 - Gráfico de escores da PC5 x PC6 (6,83% variância total) para os espectros de RMN de ^1H das polpas do açaí dos genótipos da CPATU.....70

FIGURA 2.24 - Gráfico de pesos da PC5 x PC6 para os espectros de RMN de ¹ H das polpas do açaí dos genótipos do açaí da CPATU (Belém – PA).....	71
FIGURA 2.25 - Espectros de RMN de ¹ H de extratos metanólicos das polpas do açaí comerciais liofilizadas. MeOD-d ₄ (0,02% TMSP-d ₄) em um equipamento 400 MHz.....	72
FIGURA 2.26 - Gráfico de escores da PC3 x PC4 (1,56% variância total) para os espectros de RMN de ¹ H das polpas do açaí liofilizada comerciais (“C”) por RMN de ¹ H. Polpas congeladas obtidas na entressafra de 2017 (preto), entressafra de 2016 (verde), entressafra de 2015 (laranja), safra de 2016 (azul), safra de 2015 (vermelho), safra de 2014 (roxo).....	73
FIGURA 2.27 - Gráfico de pesos da PC3 x PC4 das amostras da polpa de açaí liofilizada comerciais (“C”) por RMN de ¹ H.....	74
FIGURA 2.28 - Gráfico de escores da PC3 x PC4 (0,87% da variância total) das amostras da polpa de açaí liofilizada comerciais por RMN de ¹ H. Pontos de venda (grupo 1): CA25 safras (preto), CA25 entressafras (azul), CADC safras (verde), CADC entressafras (vermelho), CAF safras (laranja), CAF entressafras (roxo), CAI safras (marrom) e CAI entressafras (azul claro).	76
FIGURA 2.29 - Gráfico de escores da PC3 x PC4 (11,48% da variância total) das amostras da polpa de açaí liofilizada comerciais (“C”) por RMN de ¹ H. Pontos de venda (grupo 2): CAL safras (preto), CAL entressafras (azul), CANM safras (verde), CANM entressafras (vermelho), CAP safras (laranja), CAP entressafra (roxo), CAU safras (marrom) e CAU entressafras (azul claro).	77
FIGURA 2.30 - Gráfico de escores da PC3 x PC4 (2,09% da variância total) das amostras da polpa de açaí liofilizada comerciais por RMN de ¹ H. Pontos de venda (grupo 3): CBA safras (preto), CBA entressafras (azul), CFA safras (verde), CFA entressafras (vermelho), CPA safras (laranja), CPA entressafras (roxo), CPDA safra (marrom) e CPDA entressafras (azul claro).	77
FIGURA 2.31 - Gráfico de escores e pesos da PC1 x PC3 (85,33% variância total) das amostras de polpas dos comerciais do açaí e amostras expostas por 6 e 12 horas.....	80
FIGURA 2.32 - Espectros de RMN de ¹ H dos extratos metanólicos da polpa de açaí liofilizado nos tempos de exposição T0, T6 e T12. MeOH-d ₄ com 0.02% TMSP-d ₄ em um 400 MHz. 82	
FIGURA 2.33 - Espectro de RMN de ¹ H com atribuições dos sinais mais intensos. Polpa de açaí liofilizado em MeOH-d ₄ com 0.02% TMSP-d ₄ em um 400 MHz. AG: ácido graxo; EtOH: etanol; Col: colina; GPC: glicerofosforilcolina; Fru: frutose; Gli: glicose; AF: ácido acético; p-HFA: ácido hidroxifenilacético.	83
FIGURA 2.34 - Espectros de RMN de ¹ H na região de 0,7 - 3,0 ppm das polpas de açaí liofilizado. MeOH-d ₄ com 0.02% TMSP-d ₄ em um 400 MHz a 300 K. Tempos de exposição: T0 (abaixo), T6 (intermediário) e T12 (acima).....	84
FIGURA 2.35 - Espectros de RMN de ¹ H da região entre 3.0 – 5.5 ppm das polpas de açaí liofilizado. MeOH-d ₄ com 0.02% TMSP-d ₄ em um 400 MHz a 300 K. Tempos de exposição: T0 (abaixo), T6 (intermediário) e T12 (acima).....	85
FIGURA 2.36 - Espectros de RMN de ¹ H da região entre 5.5 a 11.0 ppm para polpas de açaí liofilizado. MeOH-d ₄ com 0.02% TMSP-d ₄ em um 400 MHz a 300 K. Tempos de exposição: T0 (abaixo), T6 (intermediário) e T12 (acima).....	86
FIGURA 2.37 - Variação de alguns metabolitos na polpa do açaí comercial CPOA exposta por 0, 6 e 12 horas na região de 0,7 a 3,0 ppm espectro de RMN de ¹ H.....	87
FIGURA 2.38 - Os estereoisomêros do 2,3-butanodiol.....	88
FIGURA 2.39 - Via bioquímica da fermentação butanodioica a partir do piruvato.....	89

FIGURA 2.40 - Variação dos metabolitos glicose e 2,3-butanodiol na polpa do açaí comercial CPOA exposta por 0, 6 e 12 horas.	90
FIGURA 2.41 - Variação dos compostos etanol e ácido acético na polpa do açaí comercial CPOA exposta por 0, 6 e 12 horas.	90
FIGURA 2.42 - Variação dos compostos colina e glicerofosforilcolina na polpa do açaí comercial CPOA exposta por 0, 6 e 12 horas. GPC: glicerofosforilcolina.....	91
FIGURA 2.43 - Espectro de RMN de ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ da polpa do açaí com zero horas de exposição (T0) com atribuições dos compostos identificados.	91
FIGURA 2.44 – Mapa de contornos $^1\text{H} - ^{31}\text{P}$ HMBC da polpa do açaí zero horas de exposição (T0) com as correlações identificadas na estrutura. Sequência de pulso <i>hmbcgpndgf</i> com 128 varreduras. MeOH- d_4 em um 400 MHz.	92
FIGURA 2.45 - Esquema geral da via metabólica da colina.	93
FIGURA 2.46 - Espectros de RMN de ^{31}P das polpas do açaí no tempo 0 (abaixo) e tempo 12 horas (acima). GPC: glicerofosfocolina.....	93
FIGURA 3.1 - Gráfico de escores (à esquerda) e pesos (à direita) da PC1 x PC2 das amostras comerciais e de genótipos do açaí da CPATU (Belém – PA). Estudo com dados autoescalados.	112
FIGURA 3.2 – Gráfico de escores (à esquerda) e pesos (à direita) da PC1 x PC2 das amostras comerciais e de genótipos do açaí da CPATU (Belém – PA). Estudo com dados não escalados.	114
FIGURA 3.3 – Gráfico de escores (à esquerda) e pesos (à direita) da PC1 x PC2 das amostras de genótipos do açaí da CPATU (Belém – PA). “G” codificação de amostras de genótipos. Estudo com dados não autoescalados.	115
FIGURA 3.4 – Gráfico de escores (à esquerda) e pesos (à direita) da PC1 x PC2 (71,02 % variância total) das amostras de genótipos do açaí da CPATU. “G” codificação de amostras de genótipos. Estudo com dados autoescalados.	116
FIGURA 3.5 – Gráfico de escores (à esquerda) e pesos (à direita) da PC3 x PC4 (18,36% variância total) das amostras de genótipos do açaí da CPATU. Estudo com dados escalados.	117
FIGURA 3.6 – Gráfico de escores (à esquerda) e pesos (à direita) da PC1 x PC2 das amostras comerciais de Belém (PA). Estudo com dados não escalados.....	118
FIGURA 3.7 – Gráfico de escores (à esquerda) e pesos (à direita) da PC1 x PC2 (72,66% variância explicada) das amostras comerciais de Belém (PA). “C” codificação de amostras comerciais. Estudo com dados autoescalados.	119
FIGURA 3.8 – Forma estrutural de antocianinas em diferentes valores de pH	120
FIGURA 3.9 - Gráfico de escores do estudo com as polpas expostas por 6 e 12 horas à temperatura e luz. a) PC1 x PC2 (dados não escalados); b) PC1 X PC2 (autoescalados). 121	121
FIGURA 4.1 - (a) Equipamento de extração ASE TM 350; (b, c) cartuchos de acondicionamento de amostra e (d) frascos coletores do extrato.....	124
FIGURA 4.2 - Extratos da polpa do açaí liofilizada comercial obtidos pelo sistema ASE 350. Extrato hexânico (a); extrato metanólico desengordurado com hexano (b); extrato metanólico puro (c) e extrato aquoso puro (d).....	127
FIGURA 4.3 - Espectro de RMN de ^1H do extrato hexano (extrato a) da polpa do açaí comercial por ASE 350. CDCl_3 em um equipamento 400 MHz.	128

FIGURA 4.4 - Espectro de RMN de ^1H do extrato metanólico desengordurado com hexano (extrato b) da polpa do açaí comercial por ASE 350. $\text{MeOH-}d_4$ em um equipamento 400 MHz.	129
FIGURA 4.5 – Comparação entre (a) extratos hexânico em CDCl_3 e (b) metanólico desengordurado com hexano em $\text{MeOH-}d_4$, da polpa do açaí comercial extraída com ASE 350 com terra diatomácea em um equipamento 400 MHz.	129
FIGURA 4.6 - Espectro de RMN de ^1H do extrato metanólico puro da polpa do açaí liofilizada (extrato c) por ASE 350. $\text{MeOH-}d_4$ em um equipamento 400 MHz.	130
FIGURA 4.7 - Espectro de RMN de ^1H do extrato aquoso puro da polpa do açaí liofilizada (extrato d) por ASE 350. a) extrato liofilizado e b) extrato com 10% de D_2O	131
FIGURA 4.8 - Extratos da polpa do açaí liofilizada comercial obtidos pelo sistema ASE 350 na Embrapa Agroindústria Tropical. Extrato hexânico (1.1); extrato metanólico desengordurado com hexano (1.2); extrato metanólico puro (2) e extrato aquoso puro (3).	133
FIGURA 4.9 - Espectro de RMN de ^1H do extrato hexano (extrato 1.1) da polpa do açaí comercial por ASE 350 obtido na Embrapa Agroindústria Tropical. CDCl_3 em um 400 MHz.	133
FIGURA 4.10 - Extrato metanólico desengordurado com hexano (extração 1.2) da polpa do açaí liofilizada por ASE com ampliação da região aromática e de carboidratos. $\text{MeOH-}d_4$ em um 400 MHz.	134
FIGURA 4.11 - Espectro de RMN de ^1H do extrato metanólico (extração 2) da polpa do açaí liofilizada por ASE 350. $\text{MeOH-}d_4$ em um 400 MHz.	135
FIGURA 4.12 - Espectros de RMN de ^1H dos extratos metanólicos da polpa do açaí liofilizada. a) Extração convencional (60 mg polpa do açaí em 1 mL de $\text{MeOH-}d_4$) e b) Extração por ASE 350. Os espectros a e b não estão na mesma escala.	135
FIGURA 4.13 - Espectro de RMN de ^1H do extrato aquoso puro (extração 3) da polpa do açaí comercial liofilizada por extrator por ASE 350. D_2O em um 400 MHz.	136
FIGURA 4.14 - Espectros de RMN de ^1H dos extratos aquosos da polpa do açaí liofilizada. a) Extração por ASE 350 e b) Extração convencional. D_2O em um 400 MHz.	137
FIGURA 4.15 - Espectro de RMN de ^1H do extrato hexânico da polpa do açaí por ASE com atribuições dos sinais referentes a unidade glicerol e das cadeias de ácidos graxos. $\text{CHCl}_3\text{-}d_4$ em um 400 MHz.	138
FIGURA 4.16 - Espectro de RMN de ^{13}C do extrato hexânico da polpa do açaí por ASE com atribuições. CDCl_3 em um equipamento 400 MHz.	139
FIGURA 4.17 – Mapa de contorno COSY $^1\text{H-}^1\text{H}$ do extrato hexano da polpa do açaí por ASE 350 com atribuições. CDCl_3 em um 400 MHz.	140
FIGURA 4.18 – Mapa de contorno HSQC do extrato hexano da polpa do açaí por ASE 350 com atribuições. CDCl_3 em um 400 MHz.	140
FIGURA 4.19 – Mapa de contorno HMBC do extrato hexano da polpa do açaí por ASE 350 com atribuições dos trigliceróis. CDCl_3 em um 400 MHz. *Sinais referentes aos triglicerídeos.	141
FIGURA 4.20 - Espectro de DOSY para o extrato hexânico da polpa do açaí liofilizada por ASE 350. CDCl_3 em um 400 MHz a 298 K.	142
FIGURA 4.21 - Espectro de RMN de ^1H do extrato hexânico da polpa do açaí por ASE com atribuições dos sinais utilizados para a quantificação relativa dos ácidos graxos. $\text{CHCl}_3\text{-}d_4$ em um 400 MHz.	143

FIGURA 4.22 - Espectro de RMN de ^1H do extrato metanólico da polpa do açaí por ASE 350 com atribuições dos sinais dos compostos identificados. $\text{MeOH-}d_4$ em um 400 MHz. *AG: esteres de ácidos graxos saturados e insaturados.	146
FIGURA 4.23 - Espectro de RMN de ^1H do extrato aquoso puro da polpa do açaí liofilizada por ASE 350 com atribuições dos compostos identificados. D_2O em um equipamento 400 MHz.	147
FIGURA 5.1–Equipamento de LC-DAD-SPE/NMR do Laboratório de RMN da UFSCar. ...	154
FIGURA 5.2 – Cromatograma do extrato metanólico da polpa do açaí. Eluente A (H_2O) e eluente B (ACN). Eluição com gradiente exploratório de 5 a 100% de B durante 60 minutos a 35°C com $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ com coluna 2 (Kromasil C18 250 mm).	157
FIGURA 5.3 - Gráfico de contorno para a otimização das variáveis 1 (Coluna cromatográfica) e 2 (Modificador orgânico).	160
FIGURA 5.4 – Cromatograma do extrato metanólico da polpa do açaí.	161
FIGURA 5.5 – Cromatograma do extrato metanólico da polpa do açaí liofilizado desengordurado com hexano obtido por ASE TM 350 com as condições cromatográficas otimizadas.	163
FIGURA 5.6 - Representação das modalidades de <i>trapping</i> em cartucho SPE. Figura adaptada (Thomasi, tese de doutorado, 2014).	164
FIGURA 5.7 - <i>Trapping</i> por LC-SPE com modo <i>time slice</i> utilizando período e intervalo de tempo variáveis. Extrato metanólico da polpa do açaí obtido por ASE TM 350. Eluente A (H_2O + 0,025% TFA) e eluente B (ACN + 0,025% TFA). Eluição gradiente 7,5-54% de B durante 60 minutos a 35°C com $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ em coluna Eclipse C18. λ 341 (linha em preto) e 205 nm (linha em rosa).	165
FIGURA 5.8 - Ampliação das regiões do cromatograma com <i>trapping</i> do extrato metanólico da polpa do açaí por LC-SPE pelo modo <i>time slice</i> . λ 341 (linha em preto) e 205 nm (linha em rosa).	166
FIGURA 5.9 – Espectros de RMN de ^1H para as frações T10 a T17 coletadas dos cartuchos SPE por <i>time slice</i> . Sequência de pulso <i>noesypr1d</i> (denominação Bruker). 64 varreduras. $\text{MeOH-}d_4$ em um 600 MHz com <i>cryoprobe</i>	167
FIGURA 5.10 – Espectros de RMN de ^1H para as frações T1 a T9 coletadas dos cartuchos SPE por <i>time slice</i> . Sequência de pulso <i>noesypr1d</i> (denominação Bruker). $\text{MeOH-}d_4$ em um 600 MHz com <i>cryoprobe</i>	168
FIGURA 5.11 – Espectros de massa no modo negativo da banda T3 (acima), e MS^2 do íon m/z 153.0197 (abaixo) com a fragmentação para o íon observado.	169
FIGURA 5.12 – Espectro de RMN de ^1H da banda cromatográfica T3 ($t_r = 4,51\text{ min}$). Isolamento por LC-SPE com <i>trapping</i> por <i>time-slice</i> . 30 injeções com $15\ \mu\text{L}$ do extrato metanólico da polpa do açaí. Sequência de pulso <i>noesypr1D</i> . 8 varreduras. $\text{MeOH-}d_4$ em um 600 MHz com <i>cryoprobe</i>	170
FIGURA 5.13 – Mapas de contorno COSY da banda T3. Isolamento por LC-SPE do extrato metanólico da polpa do açaí com 16 varreduras. $\text{MeOH-}d_4$ em um 600 MHz com <i>cryoprobe</i>	171
FIGURA 5.14 – Mapas de contorno HSQC da banda T3 isolada por LC-SPE do extrato metanólico da polpa do açaí com 32 varreduras. $\text{MeOH-}d_4$ em um 600 MHz com <i>cryoprobe</i>	171
FIGURA 5.15 – Fórmula estrutural do ácido protocatecuíco identificado na banda T3.	172

FIGURA 5.16 – Espectros de massa (MS/MS) no modo negativo da banda cromatográfica T5 (acima) e fragmentos do íon m/z 553.2046 (abaixo).....	173
FIGURA 5.17 – Espectro de RMN de ^1H da banda cromatográfica T5 (tr = 7,44 min). Isolamento por LC-SPE com <i>trapping</i> por <i>time-slice</i> . 30 injeções de 15 μL do extrato metanólico da polpa do açaí. Sequência de pulso <i>noesypr1D</i> com 8 varreduras. $\text{MeOH-}d_4$ em um 600 MHz com <i>cryoprobe</i>	175
FIGURA 5.18 – Espectro de RMN de ^1H da banda cromatográfica T5 (tr = 7,44 min). Isolamento por LC-SPE com <i>trapping</i> por <i>time-slice</i> . 30 injeções de 15 μL do extrato metanólico da polpa do açaí. Sequência de pulso <i>noesypr1D</i> com 8 varreduras. $\text{MeOH-}d_4$ em um 600 MHz com <i>cryoprobe</i>	176
FIGURA 5.19 – Mapa de contorno COSY da banda cromatográfica T5 com as correlações verificadas na estrutura. Sequência de pulso <i>cosygpprqf</i> com 8 varreduras. $\text{MeOH-}d_4$ em um 600 MHz com <i>cryoprobe</i>	178
FIGURA 5.20 – Mapa de contorno HSQC da banda cromatográfica T6 com as correlações $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ (J_1) atribuídas na estrutura. Sequência de pulso <i>hsqcetgp</i> com 16 varreduras. $\text{MeOH-}d_4$ em um 600 MHz com <i>cryoprobe</i>	179
FIGURA 5.21 – Mapa de contorno HMBC da banda cromatográfica T5 com as correlações verificadas na estrutura. Sequência de pulso <i>hmbcgplpndqf</i> com 128 varreduras. $\text{MeOH-}d_4$ em um 600 MHz com <i>cryoprobe</i>	181
FIGURA 5.22 – Fórmula estrutural da álcool-9-O- β -D-glicopiranosídeo-(+)-7S8R-7',8'-dihidroxi-dehidroconiferílico identificada na banda T5.	182
FIGURA 5.23 – Espectros de massa no modo negativo para a banda T6 (acima) e fragmentos do íon molecular m/z 447.1003 (abaixo).	184
FIGURA 5.24 - Espectro de RMN de ^1H da banda cromatográfica T6 (tr = 13,02 min). Isolamento por LC-SPE com <i>trapping</i> por <i>time-slice</i> . 30 injeções de 15 μL do extrato metanólico da polpa do açaí. Sequência de pulso <i>noesypr1D</i> com 8 varreduras. $\text{MeOH-}d_4$ em um 600 MHz com <i>cryoprobe</i>	186
FIGURA 5.25 – Espectro de RMN de ^1H da banda cromatográfica T6 (tr = 13,02 min). Isolamento por LC-SPE com <i>trapping</i> por <i>time-slice</i> . 30 injeções de 15 μL do extrato metanólico da polpa do açaí. Sequência de pulso <i>noesypr1D</i> com 8 varreduras. $\text{MeOH-}d_4$ em um 600 MHz com <i>cryoprobe</i>	187
FIGURA 5.26 – Mapa de contorno COSY da banda cromatográfica T6 com as correlações verificadas para a estrutura. Sequência de pulso <i>cosygpprqf</i> com 8 varreduras. $\text{MeOH-}d_4$ em um 600 MHz com <i>cryoprobe</i>	188
FIGURA 5.27 – Mapa de contorno HSQC da banda cromatográfica T6 com as atribuições verificadas para a estrutura. Sequência de pulso <i>hsqcetgp</i> com 16 varreduras. $\text{MeOH-}d_4$ em um 600 MHz com <i>cryoprobe</i>	189
FIGURA 5.28 – Mapa de contorno HMBC da banda cromatográfica T6 com as correlações verificadas para a estrutura. Sequência de pulso <i>hmbcgplpndqf</i> com 128 varreduras. $\text{MeOH-}d_4$ em um 600 MHz com <i>cryoprobe</i>	190
FIGURA 5.29 – Fragmentação para os íons observados da banda T6 por MS2 no modo negativo.	191
FIGURA 5.30 – Fórmula estrutural da homoorientina (luteolin-6-C-glicosídeo) identificada na banda T6.	192

RESUMO

PERFIL QUÍMICO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE METABÓLITOS NA POLPA DO AÇAÍ (*Euterpe oleracea* Mart.) POR RMN. O açaí é um alimento amplamente consumido em toda a Região Norte do Brasil e têm conquistado consumidores em outras regiões do país e no exterior. Com a crescente procura pela polpa, medidas de controle de qualidade se tornam necessárias para o auxílio da sua comercialização, mas existem alguns problemas como a rápida degradação da polpa, contaminação microbiológica e, nenhum conhecimento sobre o comportamento dos compostos orgânicos presentes na polpa dos frutos com diversas origens, cultivo, sazonalidade, transporte, processamento. No presente trabalho analisou-se a influência da sazonalidade, condições de cultivo, variações genótípicas da polpa do açaí de Belém - PA por RMN de ^1H aliada a métodos quimiométricos e, a caracterização estrutural dos constituintes químicos em baixa concentração por LC-DAD-SPE/NMR. A realização deste trabalho foi em 4 etapas: I) Identificação do maior número de compostos orgânicos através da RMN 1D e 2D, sem a necessidade de isolamento; II) Obtenção do perfil químico por RMN de ^1H aliado a tratamentos quimiométricos das polpas dos frutos de 31 genótipos cultivados em condições de controle agrônômico (Embrapa Amazônia Oriental) e também de amostras comerciais (Belém-PA); III) Verificação da correlação entre o perfil químico por RMN de ^1H e os dados físico-químicos medidos nas mesmas amostras; e IV) Identificação dos compostos orgânicos presente nos extratos da polpa do açaí comercial obtidos com o ASETM (extração acelerada por solvente), sendo os majoritários por RMN 1D e 2D e, os minoritários utilizando LC-DAD-SPE/NMR com *time-slice* como modo de trapeamento. Foram verificadas tendências na distribuição das amostras das polpas do açaí de acordo com o tipo de cultivo (controle agrônômico x sem controle), a sazonalidade (safra x entressafra), melhoramento genético e o modo de armazenamento realizado pelos comerciantes de Belém e quais os compostos responsáveis por essas observações. Foi verificada a grande variabilidade nos dados físico-químicos das polpas avaliadas e, dessa forma não houve correlação com os dados espectrais por RMN de ^1H . O uso do ASE forneceu melhores extratos quando comparados a extratos obtidos por método de extração convencional e, da fração metanólica da polpa de açaí foram isolados alguns compostos aromáticos por LC-DAD-SPE que tiveram suas estruturas identificadas com base na análise dos experimentos de RMN 1D e 2D, UV e EM. Esse trabalho mostrou o potencial da técnica de RMN de alta resolução na obtenção de informações químicas das polpas do açaí liofilizadas. Os métodos tradicionais de análises (físico-químicos) não se mostraram viáveis pois não forneceram boa compreensão sobre as variações das polpas do açaí. O extrator acelerado por solvente foi uma boa alternativa para realização de *clean-up* e extração de compostos orgânicos presentes no açaí e o modo *time-slice* mostrou-se eficiente para o isolamento de compostos em pequena concentração presente no extrato metanólico da polpa do açaí.

ABSTRACT

FINGERPRINT PROFILE AND STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF THE METABOLITES IN AÇAÍ BERRY PULP (*Euterpe oleracea* MART.) BY NMR. Acai is a widely consumed fruit in the North Region of Brazil and has gained consumers in other regions of the country and abroad. With the increasing acai pulp demand, quality control measures become necessary to improve its trading; however, there are some problems, such as the fast degradation of the pulp, microbiological contamination and no knowledge on the behavior of the organic compounds present in the pulp of fruits of different origins, growing, seasonality, transport and processing. This study describes the influence of seasonality, growing conditions and genotypic variations on the acai pulp from Belém - PA by ^1H NMR combined with chemometric methods, and structural characterization of the chemical constituents by LC-DAD-SPE/NMR. This work was performed in 4 stages: I) Identification of the greatest number of organic compounds by 1D and 2D NMR, without the need for isolation; II) Attainment of the chemical profile by ^1H NMR combined with the chemometric treatment of the pulp of the fruits of 31 genotypes cultivated under agronomic control (Embrapa Amazônia Oriental) and also of commercial samples (Belém-PA); III) Verification of the correlation between the ^1H NMR chemical profile and the physical-chemical data measured in the same samples; and IV) Identification of the organic compounds present in the commercial acai pulp extracts obtained with an ASETM (accelerated solvent extractor), being the major compounds obtained by 1D and 2D NMR, and the minor ones by LC-DAD-SPE/NMR with time-slice as trapping mode. Tendencies in the distribution of the acai pulp samples were observed according to the type of growing (agronomic control x without control), seasonality (harvest season x inter-harvest season), genetic improvement, and the storage system used by the retailers from Belém, and the compounds responsible for such tendencies were identified. The great variability in the physical-chemical data of the evaluated pulps was verified and, thus, there was no correlation with the ^1H NMR spectral data. The ASE provided the best extracts when compared to extracts obtained with the conventional method. Some aromatic compounds were isolated from the acai pulp methanolic extract by LC-DAD-SPE, and their structures were determined based on the analysis of 1D and 2D NMR, UV and MS experiments. This study showed the potential of the high-resolution NMR technique to obtain chemical information from the lyophilized acai pulp. The traditional analysis methods (physical-chemical ones) were not viable, since they did not provide good comprehension of the variations of the acai pulps. The ASE extractor was a good alternative to perform the clean-up and extraction of the organic compounds present in acai and the time-slice mode proved efficient in the isolation of compounds at low concentration present in the acai pulp methanolic extract.

SUMÁRIO

<i>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS</i>	v
<i>LISTA DE TABELAS</i>	vii
<i>LISTA DE FIGURAS</i>	ix
<i>RESUMO</i>	xvi
<i>ABSTRACT</i>	xvii
<i>CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO</i>	<i>1</i>
1.1. A matriz Açaí (<i>Euterpe oleracea</i>)	2
1.1.1. Aspectos botânicos.....	2
1.1.2. Cultivo, colheita e processamento dos frutos do açaí.....	3
1.1.3. Características nutricionais e atividades farmacológicas.....	5
1.1.4. Constituintes fitoquímicos	6
1.1.5. Importância econômica.....	10
1.1.6. Dificuldades na comercialização.....	12
1.2. A Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	14
1.2.1. RMN aplicada as análises de alimentos	15
1.2.2. A hifenação LC-DAD-SPE/NMR	18
1.3. A Quimiometria aplicada à RMN	21
1.3.1. A quimiometria	22
a) Planejamento fatorial	23
b) Análises por Componentes Principais (PCA).....	24
1.3.2. Pré-processamentos.....	26
1.4. Extração com Líquido pressurizado (PLE)	27

1.4.1.	Histórico e princípios da técnica	28
1.4.2.	Aplicações e seu uso em alimentos	29
2.	OBJETIVO GERAL	32
2.1.	Objetivos específicos.....	32
 <i>CAPÍTULO II: FINGERPRINT POR RMN DE ¹H E ANÁLISES QUIMIOMÉTRICAS DAS POLPAS DO AÇAÍ</i>		 33
3.	PARTE EXPERIMENTAL	34
3.1.	Origem e preparo das polpas do açaí	34
a)	Genótipos da EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL – Belém (PA).....	34
b)	Polpas comercializadas em Belém (PA).....	35
3.2.	Preparo das amostras do açaí liofilizadas	39
a)	<i>Fingerprint profile</i> por RMN	39
b)	Caracterização dos compostos	40
3.3.	Aquisição dos experimentos de RMN.....	41
a)	<i>Fingerprint profile</i> por RMN	41
b)	Caracterização dos compostos	42
c)	Estudo da degradação (amostras expostas à temperatura e luz)	43
3.4.	Caracterização dos compostos	43
3.5.	Análises quimiométricas.....	43
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	45
4.1.	Caracterização dos compostos majoritários por RMN 1D e 2D	45
4.2.	Detalhes sobre a obtenção das polpas do açaí.....	53
a)	Genótipos da Embrapa Amazônia Oriental	53
b)	Polpas congeladas comerciais	53
4.3.	Análises quimiométricas dos dados de RMN de ¹ H	53

4.3.1. Análise do tipo de cultivo	54
i) Estudos com todos os sinais de RMN de ¹ H	54
ii) Estudos quimiométricos com os sinais de hidrogênios lipídicos do espectro de RMN de ¹ H.....	57
iii) Estudos quimiométricos dos sinais de hidrogênios na região de aromáticos do espectro de RMN de ¹ H	61
4.3.2. Análise das amostras de genótipos da Embrapa Amazônia Oriental (Belém – PA).....	64
a) Avaliação dos frutos do Programa de Melhoramento Genético do açaizeiro (PMG)	65
b) Avaliação da Sazonalidade: Entressafra (período de chuva) x Safra (período de seca)	68
4.3.3. Análise das polpas do açaí comercializadas em Belém - PA	72
a) Avaliação da Sazonalidade: Entressafra x Safra.....	72
b) Avaliação dos pontos de venda de polpa do açaí (Belém – PA).....	76
4.4. Estudo da degradação	79
4.4.1. Análise quimiométricas	79
4.4.2. Análise dos espectros de RMN de ¹ H.....	81

CAPÍTULO III: ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DAS POLPAS DO AÇAÍ E TRATAMENTO QUIMIOMÉTRICO 95

5. PARTE EXPERIMENTAL	96
5.1. Preparo das polpas do açaí – Genótipos e Comerciais.....	96
5.2. Análises físico-químicas das polpas do açaí	96
5.3. Análises quimiométricas.....	98
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	99
6.1. Análises físico-químicas	99

6.1.1.	pH, acidez titulável (AT) e sólidos solúveis totais (SST)	99
6.1.2.	Composição centesimal	105
6.1.3.	Composição fenólica	109
6.2.	Análises quimiométricas	112
6.2.1.	Estudo com todas as polpas do açaí (comerciais e genótipos)	112
6.2.1.1.	Condições de cultivo	112
6.2.1.2.	Sazonalidade (safra x entressafra)	113
6.2.2.	Estudo das polpas do açaí – Genótipos da CPATU	114
6.2.3.	Estudo das polpas do açaí comerciais – Belém (PA)	117
6.2.4.	Estudo da degradação da polpa	121

CAPITULO IV: USO DO ASETM NA OBTENÇÃO DE EXTRATOS DA POLPA DO AÇAÍ COMERCIAL E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS POR RMN 1D E 2D *123*

7.	PARTE EXPERIMENTAL	124
7.1.	O extrator acelerado por solvente (ASE TM)	124
7.2.	Amostra	124
7.3.	Obtenção dos extratos	124
7.4.	Aquisição dos experimentos de RMN.....	125
7.5.	Identificação dos compostos	126
8.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	127
8.1.	Obtenção dos extratos	127
8.2.	Obtenção das medidas por RMN de ¹ H	128
8.2.1.	Cartucho de extração 1 – <i>Clean up</i>	128
8.2.2.	Cartucho de extração 2 e 3.....	130
8.3.	Obtenção dos extratos realizadas na Embrapa Agroindústria Tropical (Fortaleza – CE).....	132

8.3.1.	Cartucho de extração 1 – <i>Clean up</i>	133
8.3.2.	Cartucho de extração 2 – Extração com MeOH.....	134
8.3.3.	Cartucho de extração 3 – Extração com H ₂ O	136
8.4.	Identificação dos compostos por RMN 1D e 2D	137
8.4.1.	Extrato hexano.....	137
a)	Compostos identificados.....	137
b)	Quantificação relativa dos ácidos graxos por RMN de ¹ H	142
8.4.2.	Extratos metanolico puro e metanolico (<i>clean-up</i> hexano)	145
8.4.3.	Extrato aquoso puro.....	146

CAPÍTULO V: USO DO LC-DAD-SPE/NMR NO MODO DE OPERAÇÃO TIME-SLICE PARA O ISOLAMENTO DE COMPOSTOS MINORITÁRIOS DA POLPA DO AÇAÍ 149

9.	PARTE EXPERIMENTAL	150
9.1.	Materiais diversos	150
9.2.	Preparo da amostra	150
9.3.	Desenvolvimento das condições cromatográficas/planejamento fatorial	150
9.4.	Equipamentos	153
9.4.1.	LC-UV-SPE.....	153
9.4.2.	Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	154
9.4.3.	Espectrometria de massa (MS).....	155
10.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	157

10.1.	Desenvolvimento das condições cromatográficas	157
b)	Etapa 2 - Otimização das condições cromatográficas	162
10.2.	Análises por LC-UV-SPE/NMR	163
10.3.	Identificação dos compostos isolados por LC-SPE.....	169
10.3.1.	Banda cromatográfica T3	169
10.3.2.	Banda cromatográfica T5	172
10.3.3.	Banda cromatográfica T6	184
CONCLUSÕES.....		193
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		195
APÊNDICES.....		207

Capítulo I: INTRODUÇÃO

1.1. A matriz Açaí (*Euterpe oleracea*)

1.1.1. Aspectos botânicos

Euterpe oleracea Mart. é uma palmeira da família *Arecaceae* composta por aproximadamente 200 gêneros e 2600 espécies, com ampla distribuição em áreas tropicais e subtropicais (JONES, 1995 *apud* OLIVEIRA, 2007) (Figura 1.1a).

Os açaizeiros são altos e delgados, alcançando de 15 a 30 metros de altura, possuem ráquis com dezenas de ráquias onde se encontram os frutos do tipo baga (Figura 1.1b). Seus frutos e o palmito são muito apreciados e muito utilizados na alimentação humana.

Os frutos são redondos com 1 a 2 cm de diâmetro e peso médio de 1,5 gramas, apresentam uma camada externa fibrosa e rígida, com parte comestível de apenas 5 a 15% do fruto e crescem na forma de cachos (Figura 1.1c) (OLIVEIRA, CARVALHO & NASCIMENTO et al., 2000; NASCIMENTO et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2007).

Seus frutos são popularmente conhecidos como açaí, mas dependendo da localidade recebem outras denominações como açaí-de-touceira, açaí-do-Pará, açaí-verdadeiro, entre outros (Figura 1.1b). A palavra açaí tem origem indígena tupi (yá-çaí) que remete a fruto que chora ou deita água (OLIVEIRA, CARVALHO & NASCIMENTO, 2000; NASCIMENTO, 2008).



FIGURA 1.1 - Palmeira de *Euterpe oleracea* (A), cacho do açaí-roxo (B) e fruto do açaí roxo (C). Fotos: própria autora obtida na Embrapa Amazônia Oriental – Belém-PA.

São descritas algumas variedades ou eco tipos de açaí como açaí-roxo, açaí-branco, açaí-boi, açaí-açu, açaí-chumbinho, açaí-espada, açaí-sangue-de-boi e, são diferenciados de acordo com suas características morfológicas (OLIVEIRA, 2007; NASCIMENTO, 2008).

A palmeira é nativa da Amazônia brasileira, mas também é encontrada em países da América do Sul (Guiana, Guiana Francesa, Suriname, Venezuela, Colômbia, Equador) e na América Central (Panamá). No Brasil, grandes populações naturais são localizadas no estuário do Rio Amazonas, onde o Estado do Pará é destaque na produção e comercialização dos frutos (NOGUEIRA et al., 2005; OLIVEIRA, 2007; IBGE, 2016).

1.1.2. Cultivo, colheita e processamento dos frutos do açaí

O açaizeiro nativo é encontrado em solos alagados (várzea e igapó) e foi adaptado para cultivo em terra firme com boa distribuição pluviométrica. Na região amazônica brasileira, tanto a floração quanto a frutificação ocorrem o ano todo. No estado do Pará, entre os meses de julho a dezembro (período de seca/verão) é quando ocorre a maior frequência na produção média dos frutos (70-80%), época denominada safra do açaí. Já no período de chuvas (janeiro a junho), entressafra do açaí, concentra-se a floração (NOGUEIRA et al., 2005; NASCIMENTO, 2008; OLIVEIRA, 2007; OLIVEIRA et al., 2014; OLIVEIRA, CARVALHO & NASCIMENTO, 2000).

Os frutos do açaí roxo possuem maior frutificação que as demais variedades e possui grande apreciação pelos consumidores (OLIVEIRA, 2007; NOGUEIRA et al., 2005; NASCIMENTO, 2008). Na safra, o açaí apresenta coloração vermelho-arroxeadada e é considerado de melhor qualidade sensorial. Já na entressafra, os frutos são colhidos com diferentes estágios de maturação, possuem coloração roxo-azulada e apresenta menor qualidade sensorial (NOGUEIRA et al., 2005; OLIVEIRA, 2007).

A colheita ocorre de maneira rústica, difícil e trabalhosa, pois é realizada através da escalada na palmeira por trabalhadores habilitados (colhedor) com uso de peconha (corda de folhas verdes do açaizeiro com as pontas amarradas e colocadas em volta do tronco e dos pés do colhedor). Atualmente, em alguns locais de cultivo já utilizam escada e podão (Figura 1.2a). Após a subida, é realizado o corte dos cachos

carregados de açaí na sua base, então são depositados no solo sob lona ou toalha de plástico (Figura 1.2b) (NOGUEIRA, 2005).



FIGURA 1.2 – Retirada dos cachos do açaí pelo colhedor com escada (A), cacho do açaí colhido e depositado sobre lona (B). Fotos: própria autora em Embrapa Amazônia Oriental – Belém-PA.

Após a colheita, os frutos passam por etapas de debulha, acondicionamento, armazenamento, transporte e processamento (conhecido como beneficiamento) que é iniciado com a etapa de imersão dos frutos em água quente (15 - 20 minutos), seguido de despulpamento em equipamento específico (despulpadeira), filtrado e então obtida a polpa do açaí, também chamado de suco, vinho ou bebida do açaí (Figura 1.3) (NOGUEIRA et al., 1995; NOGUEIRA, 2005; OLIVEIRA, 2007; OLIVEIRA et al., 2015).

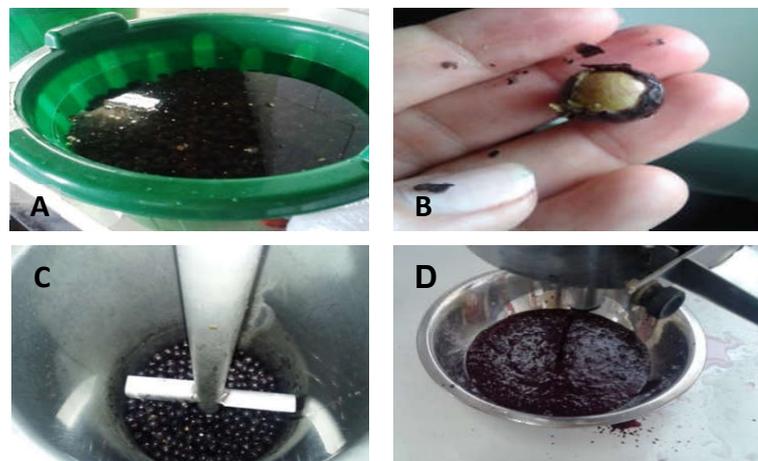


FIGURA 1.3 – Processo de imersão dos frutos em água quente (A), fruto do açaí após imersão (B), frutos dentro da despulpadeira (C) e suco do açaí/ vinho do açaí (D). Fotos: própria autora obtida na Embrapa Amazônia Oriental – Belém-PA.

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (MAPA), o vinho do açaí é classificado de acordo com a adição ou não de água no processamento, sendo chamado de polpa de açaí (sem adição de água), açaí do tipo grosso ou especial (teor de sólidos totais superiores a 14%), açaí do tipo médio ou

regular (teor de sólidos totais entre 11-14%) e açaí do tipo fino (teor de sólidos totais entre 8-11%) (BRASIL, 2000).

1.1.3. Características nutricionais e atividades farmacológicas

O açaí é considerado um alimento completo, pois é rico em lipídeos, fibras e proteínas. Contém carboidratos, minerais (ferro, cálcio, magnésio, potássio, níquel, manganês, cobre, boro e cromo), vitaminas (A, B1, B2, B3, B5, C, E e K) e diversos compostos antioxidantes como antocianinas, polifenóis e outros flavonoides (GORDON et al., 2012; DEL POZO-INSFRAN et al., 2004; SCHAUSS, et al., 2006a).

O açaí faz parte da dieta alimentar da comunidade amazônica, sendo consumida diariamente na forma de suco puro (polpa de açaí) com farinha de tapioca ou farinha de mandioca com pescados e carnes, com ou sem açúcar (NOGUEIRA et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2007). Seu consumo diário pode contribuir com o crescimento e bom funcionamento das funções metabólicas do corpo humano, devido aos seus nutrientes.

Além do seu consumo alimentício, as raízes do açaizeiro são utilizadas na medicina popular para a prevenção de febre, gripe, dores, infecções parasitárias e como vermífugo, anticoagulante, adstringente e antidiarreico (SCHAUSS, 2006a; NOGUEIRA et al., 1995; MATHEUS et al., 2006). Na literatura são encontrados estudos de atividades farmacológicas e toxicológicas com extratos da polpa do açaí, principalmente sobre seus efeitos antioxidante e anti-inflamatório (Tabela 1.1).

TABELA 1.1 – Atividades biológicas dos frutos do açaí (*Euterpe oleracea*).

ATIVIDADE AVALIADA	TIPO DE ESTUDO	REFERÊNCIAS
Antioxidante	<i>in vivo e in vitro</i>	GORDON et al., 2012; SCHAUSS et al., 2006a; PACHECO-PALENCIA et al., 2008a ;CHIN et al., 2008; KANG et al., 2012; KANG et al., 2011
Anti-inflamatória	<i>in vivo e in vitro</i>	SCHAUSS et al., 2006b; KANG et al., 2011; MOURA et al., 2011; FAVACHO et al., 2011
Cito protetora	<i>in vitro</i>	CHIN et al., 2008; MOURA et al., 2011
Cardioprotetora / anti-hipertensivo	<i>in vivo</i>	de SOUZA et al., 2010; COSTA et al., 2012; de SOUZA et al., 2012
Anti-carcinogênicas	<i>in vivo e in vitro</i>	FRAGOSO et al., 2012; SILVA et al., 2014; PACHECO-PALENCIA et al., 2008b; DEL POZO-INSFRAN et al., 2006
Antiproliferativo	<i>in vitro e in vivo</i>	RIBEIRO et al., 2010; HOGAN et al., 2010

1.1.4. Constituintes fitoquímicos

A espécie *Euterpe oleracea* tem sido extensivamente estudada há quase duas décadas objetivando conhecer o maior número dos constituintes químicos presentes em seus frutos. Já foram descritos dezenas de compostos, pertencentes às classes dos: ácidos graxos, carboidratos, aminoácidos, carotenoides, tocoferóis, antocianinas, proantocianidinas, flavonoides não-antociânicos, ácidos fenólicos, entre outros (Tabela 1.2).

TABELA 1.2 – Compostos químicos descritos nos frutos do açaí (*Euterpe oleraceae*).

COMPOSTOS*	CLASSE QUÍMICA	PARTE DO FRUTO	REFERÊNCIAS
palmítico, esteárico, araquídico, láurico, mirístico, butírico, caproico, caprílico, cáprico, tridecanoico, pentadecanoico, margarico, nonadecanoico, eicosanoico	Ácidos graxos saturados		
oleico, palmitoleico, vacênico, elaídico, tridecenoico, miristoleico, pentadecenoico, margaroleico, gadoleico, erúcico, nervônico	Ácidos graxos monoinsaturados	OP	NASCIMENTO et al., 2008; SCHAUSS et al., 2006a; RUFINO et al., 2011
linoleico, linolênico, gammalinolênico, eicosadienoico, eicosatrienoico, araquidônico, docosadienoico, homogamalinolênico, docosahexaenoico	Ácidos graxos poli-insaturados		
Ácido aspártico, ácido glutâmico, leucina, lisina, prolina, valina, alanina, fenilalanina, treonina, serina, glicina, metionina, isoleucina, tirosina, histidina, arginina, hidroxiprolina, cistina e triptofano	Aminoácidos	PA	SCHAUSS et al., 2006a; OLIVEIRA, 2007
Glicose, frutose, maltose	Carboidratos	PA	NOGUEIRA, 2005; OLIVEIRA, 2007; SCHAUSS et al., 2006a;
A, B1, B2, B3, B5, C, E e K	Vitaminas	PA	da COSTA et al., 2010; NOGUEIRA, 2005; SCHAUSS et al., 2006a

Continuação TABELA 1.2

homorientina, orientina, isoorientina, isovitexina, catequina, epicatequina, taxifolina-3-ramnosídeo, luteolin-8-glicosídeo, apigenin-6-glicosídeo, velutina, escoparin, quercetina-rutinosídeo, taxifolin deoxihexose, ihidrokaempferol 3-O-β-D-glicosídeo e seu isômero e dihidroxi-7',3',5'-trimethoxiflavona, crisoeriol, apigenin, (2R, 3R)-dihidrokaempferol	Flavonoides	PA; PAL	Del POZO-INSFRAN et al., 2004; GALLORI et al., 2004; SCHAUSS et al., 2006a; RIBEIRO et al., 2010; PACHECO-PALENCIA et al., 2008b; PACHECO-PALENCIA et al., 2009; LICHTENTHALER et al., 2005; CHIN et al., 2008.
Ácido protocatecuico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido vanílico, ácido siríngico, ácido ferúlico e catequina;	Ácidos fenólicos e flavonoide	OP	PACHECO-PALENCIA et al., 2008a
Ácido protocatecuico e epicatequina		S	RODRIGUES et al., 2006
Procianidina dímero, trímero, tetramero, pentamero, hexamero, heptamero, octamero, nonamero, decamero	Proantocianidinas	PA	Del POZO-INSFRAN et al., 2004; SCHAUSS et al., 2006a; LICHTENTHALER et al., 2005;
Procianidina dímero, trímero, tetramero e pentamero		S	RODRIGUES et al., 2006
Procianidina dímero, trímero		OP	PACHECO-PALENCIA et al., 2008a

* Compostos identificados com valor menor a 0,1% foram desconsiderados.; PA= polpa do açaí; PAL= polpa do açaí liofilizada; OP= óleo da polpa do açaí; S= sementes dos frutos

A polpa do açaí é composto majoritariamente por lipídios (até 52,9%), constituídos por ácidos graxos monoinsaturados (60%), saturados (27%) e poli-insaturados (13%) (NOGUEIRA, 2005; NASCIMENTO et al., 2008; SCHAUSS et al., 2006a; MENEZES et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2007; RUFINO et al., 2011; CARVALHO et al., 2016).

No entanto, diversos poli fenóis como flavonoides e antocianinas são encontrados nos frutos e são esses que conferem coloração roxo ao fruto do açaí (Del POZO-INSFRAN et al., 2004).

O teor de antocianinas totais apresenta valores entre 71 a 440 mg/kg de fruto (LICHTENTHALER et al., 2005; NOGUEIRA, 2005; KANG et al., 2012; OLIVEIRA, 2007) e essa grande variação está relacionada ao estágio de amadurecimento dos frutos na colheita (ROGEZ et al., 2011; GORDON et al., 2012), ao tipo de cultivo, sazonalidade (MALCHER & CARVALHO, 2011), processamento, pasteurização e armazenamento (MATTIETTO et al., 2009; LIMA et al., 2005).

No açaí, as antocianinas cianidina-3-O-rutinosídeo e cianidina-3-O-glicosídeo são relatadas como majoritárias (PACHECO-PALENCIA et al., 2007 e 2009; GALLORI et al., 2004; SCHAUSS et al., 2006a; LICHTENTHALER et al., 2005; Del POZO-INSFRAN et al., 2004) e os flavonoides encontrados em maior concentração são isoorientina, orientina e isovitexin (Figura 1.4) (GALLORI et al., 2004; Del POZO-INSFRAN et al., 2004; PACHECO-PALENCIA et al., 2009; SCHAUSS et al., 2006b).

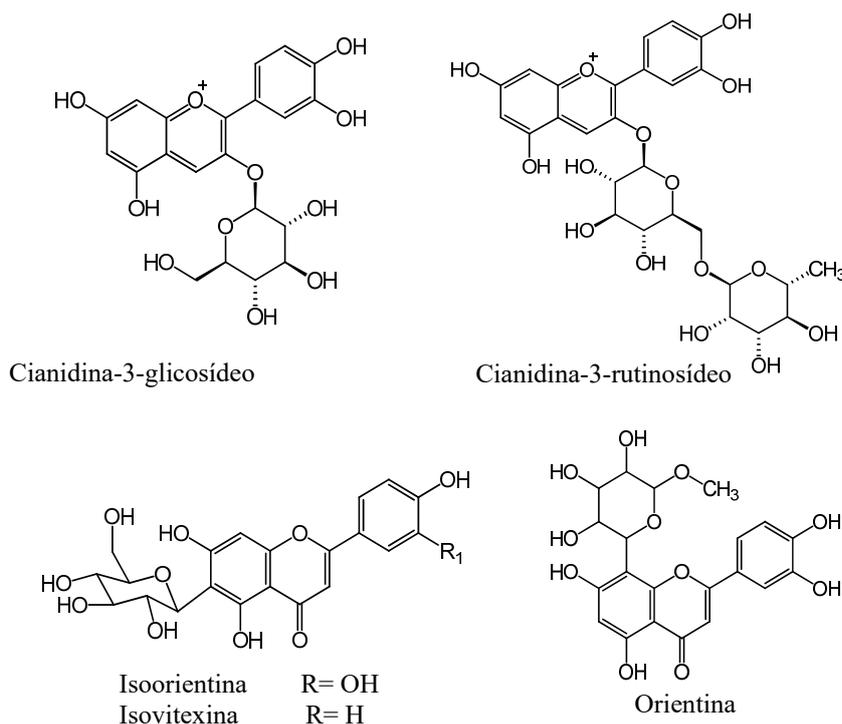


FIGURA 1.4 – Antocianinas e flavonoides majoritários relatados no açaí.

Em 2008, Chin e colaboradores relataram o isolamento de 9 lignanas do tipo ariltetrahidronaftaleno, dihidrobenzofurano, furofurano, 8-O-4'-neolignana e tetrahydrofurano, inéditas nas polpas do açaí, juntamente com outros 13 compostos conhecidos (CHIN et al., 2008). Em 2012, Mulabagal & Calderón relataram a identificação de 40 constituintes majoritários (polifenóis, ácidos graxos e antocianinas) presentes em extratos do açaí através de análises de *fingerprint* por LC/MS (cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas) (MULABAGAL & CALDERÓN, 2012)(Figura 1.5).

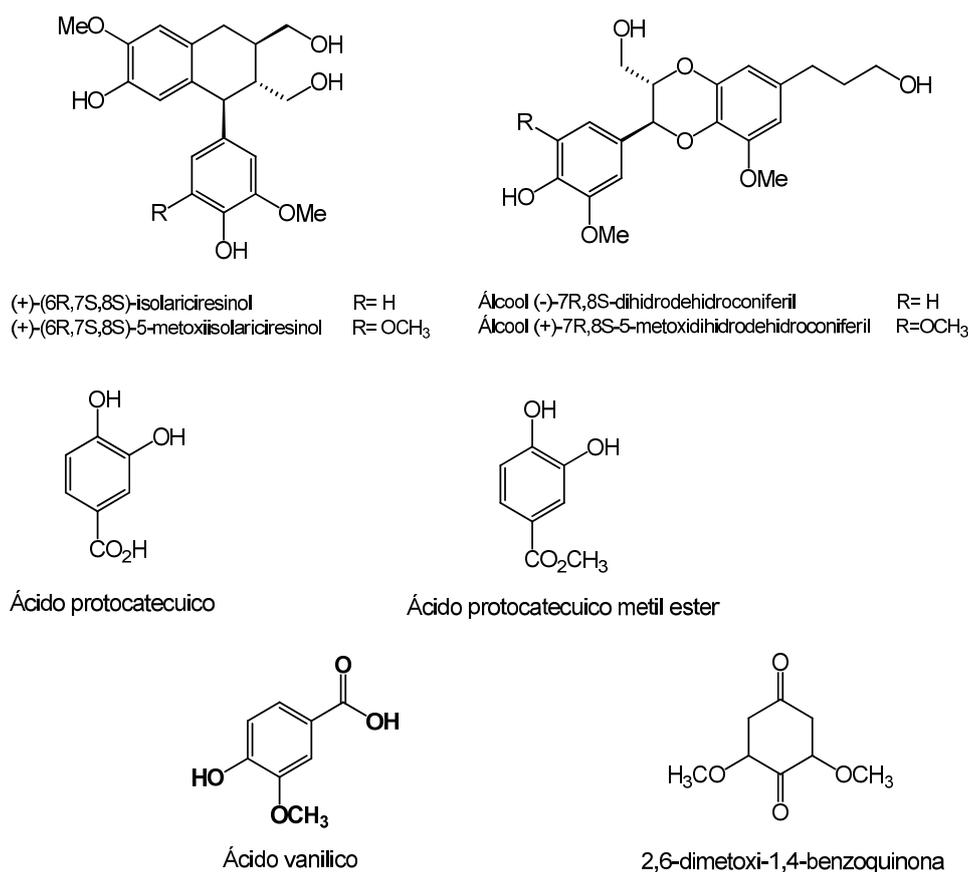


FIGURA 1.5 – Lignanas e outros compostos relacionados no açáí (*Euterpe oleracea*).

Em função da sua propriedade nutricional, importante para a saúde humana, e dos compostos químicos (principalmente fenólicos e lignanas) que possuem correlação com atividades farmacológicas e medicinais (Del POZO-INSFRAN et al., 2004; SCHAUSS et al., 2006b; RIBEIRO et al., 2010; CHIN et al., 2008; KANG et al., 2010 e 2011), o fruto do açáí possui propriedades nutraceuticas que podem auxiliar na prevenção e tratamento de doenças degenerativas (MENEZES et al., 2008; KANG et al., 2010; SCHAUSS et al., 2006a; Del POZO-INSFRAN et al., 2004).

1.1.5. Importância econômica

A polpa do açáí (vinho-do-açáí) é extensamente consumida pela população do Norte do Brasil como bebida pura (Figura 1.6a,b) e muito usada na produção industrial/artesanal de doces, bebidas, em mistura com xarope de guaraná e também pasteurizado (Figura 1.6c,d) (NOGUEIRA et al., 1995; 2005; OLIVEIRA, 2007 e 2015). Mas em outras regiões do Brasil, principalmente no Centro-Oeste e Sudeste, a polpa do açáí é consumida com frutas, granola e outros ingredientes doces

como leite condensado e chocolate. Muito diferente do consumo no Norte e Nordeste (Figura 1.6e).



FIGURA 1.6 – Modo de consumo e produtos comercializados do açaí. Fotos: A e B: própria autora em Mercado Ver-o-Peso, Belém (PA). C-E: <http://guaravita.com.br/produtos/guaraviton>; <https://frooty.com.br/produtos-acai/>.

Em 1995, Nogueira comentou que já havia o interesse de agricultores e empresários no plantio do açaizeiro em terra firme devido a perspectivas de mercado interno e externo, além das facilidades de manejo, transporte (rodoviário quando comparado ao modo de cultivo extrativista), aumento na produção e melhoria da qualidade dos frutos (NOGUEIRA et al., 1995; OLIVEIRA, 2007). E nas duas últimas décadas essa previsão vem se concretizando pois a comercialização da polpa processada e também do palmito têm ganhado destaque no mercado nacional e internacional (OLIVEIRA, 2007 e 2015; IBGE, 2016).

Os dados oficiais da produção dos frutos do açaí com procedência extrativista entre o final da década de 90 e meados de 2013 são muito variáveis, mas o domínio da produção foi no estado do Pará (OLIVEIRA et al., 2015). Em 2016, o açaí liderou o valor da produção na extração vegetal no Brasil, gerando 538,9 milhões de reais, seguidos da erva-mate (R\$ 398,8 milhões) e do pó de carnaúba (R\$ 187,5 milhões). A produção nacional dos frutos do açaí foi de 215.609 mil toneladas, sendo o Pará maior produtor nacional (61,2%) e com crescimento de 4,6% em relação a 2015 (IBGE, 2016).

Dados de 2005 indicaram que foram movimentados no mercado interno cerca de doze (12) mil toneladas/ano da polpa congelada de açaí e mais de um (1) mil toneladas na exportação para países da Europa e América do Norte, principalmente Estados Unidos e Japão (OLIVEIRA, 2007; NOGUEIRA, 2005; BRASIL, 2017). Já 10 anos depois, os dados mostram que foram exportadas aproximadamente oito (8) mil toneladas de açaí, rendendo R\$ 93 milhões (BRASIL, 2017).

A venda dos frutos do açaí é fonte de sobrevivência de milhares de famílias ribeirinhas do estuário Amazônico, mais de 12.000 produtores movimentam cerca de 4 bilhões de reais/ano só no estado do Pará (BRASIL, 2017; IBGE, 2016) que é o principal produtor de açaí, seguido do Amapá e Amazonas (OLIVEIRA, 2007). Na cidade de Belém (PA) foram arrecadados R\$ 1.120 milhão com a venda dos frutos do açaí em 2016 (IBGE, 2016). Por esses motivos, o açaí é reconhecido como uma expressão econômica brasileira, no qual o Pará é o maior produtor, exportador e consumidor (OLIVEIRA, 2007; MENEZES et al., 2008; IBGE, 2016).

Em Belém, o açaí é o segundo alimento mais consumido pela população seguido da farinha de mandioca. Seu consumo é tão significativo pelos nativos, que no período de safra do açaí (julho-dezembro) o consumo diário da população de Belém (200.000 litros) já ultrapassou os 360 mil litros de polpa (OLIVEIRA et al., 2002 e ROGEZ, 2000 *apud* OLIVEIRA et al., 2015).

O preço do açaí pode variar de acordo com o eco tipo, procedência e época do ano. Por exemplo, o preço da lata do açaí (aproximadamente 15 kg) na entressafra (baixa produção dos frutos) é 400% mais caro que na safra, causando problemas socioeconômicos para população ribeirinha dependente do açaí (OLIVEIRA, 2007; OLIVEIRA et al., 2015). Além da elevação dos preços ao consumidor local, o aumento do consumo no mercado interno e das exportações vem provocando a escassez do produto, esses fatores fortalecem o interesse e incentivo do Governo pelo plantio em larga escala e em terra firme.

1.1.6. Dificuldades na comercialização

A comercialização das polpas do açaí apresenta alguns problemas como a rápida degradação, contaminação microbiológica, adulteração, falta de controle em relação a origem dos frutos coletados, grau de maturação e cultivo.

Os frutos do açaí são altamente perecíveis devido a sua morfologia vegetal que possui ausência de casca protetora, tornando parte da polpa exposta ao ar assim que debulhada das ráquias (Figura 1.1b) e a sua composição química rica em polifenóis susceptíveis a degradação (NOGUEIRA, 2005; LIMA et al., 2005; PACHECO-PALENCIA et al., 2008a; PACHECO-PALENCIA et al., 2009). Os frutos *in natura* resistem poucas horas sob temperatura ambiente e no máximo 12 horas sob refrigeração. A degradação do açaí é acelerada pela temperatura e exposição à luz e

pode ser verificada através da alteração na coloração roxa para marrom e o aparecimento do sabor azedo (NOGUEIRA, 2005; SOUSA et al., 1999; Del POZO INSFRAN et al., 2004).

Sua alta perecibilidade está relacionada também com a elevada carga microbiana (bactérias, leveduras e fungos) presente no fruto. A contaminação microbiológica do açaí ocorre por uma junção de fatores como: reações enzimáticas, pH da polpa, cultivo, fatores ambientais e falta de cuidados na colheita/transporte/processamento que favorecem a proliferação de microrganismos, acelerando o processo de degradação e prejudica as características sensoriais e higiênico-sanitárias da polpa (NOGUEIRA, 2005; SOUSA et al., 1999; ALEXANDRE et al., 2004; CAYRES et al., 2017). No período da entressafra (janeiro a junho) a contaminação de bactérias é quase 100 vezes maior que na safra (julho a dezembro), já os bolores e leveduras apresentam níveis idênticos durante todo o ano e bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Coliformes totais* e *C. fecais* são encontradas nas polpas comercializadas (SOUSA et al., 1999). Atualmente, nas agroindústrias de polpa do açaí são realizados processos de branqueamento, congelamento e pasteurização afim de minimizar os problemas de contaminação microbiológica e obter produto seguro, com maior vida útil e que atenda as normas do MAPA (SOUSA et al., 1999; MATTIETTO et al., 2010; NOGUEIRA, 2005; BRASIL, 2000).

Com a baixa produção dos frutos do açaizeiro entre os meses de janeiro a junho (entressafra) e conseqüentemente aumento do preço da polpa do açaí, ocorrem sérios problemas de adulteração da polpa do açaí, principalmente no estado do Pará que é o maior produtor e exportador do açaí. Já alguns anos são relatados pontos comerciais que adicionam farinha de trigo, farinha de mandioca, farinha de tapioca, trigo, papel higiênico, jornal, acetona e liga neutra (expessante goma guar e carboximetilcelulose) às polpas do açaí para engrossar o produto diluído e vender como açaí do tipo médio (maior qualidade). Podem ser adicionados também corantes para mascarar a coloração (IGBE,2016; G1 PA, 2014a; G1 PA, 2015a)

Na cidade de Belém, ocorrem fiscalizações pelo Departamento de Vigilância Sanitária (Devisa) com aplicações de multas e fechamento de pontos comerciais que não obedecem aos requisitos higiênico-sanitários e boas práticas de processamento, a fim de evitar a contaminação por *Trypanosoma cruzi* (causador da Doença de Chagas) e infecções causadas por microrganismos patogênicos (BRASIL, 2012; G1 PA, 2016; G1 PA, 2011).

Batedores comerciais de açaí que seguem as normas são caracterizados com selo “Açaí Bom”. No entanto, em 2014 quase todos os 5 mil pontos de venda de açaí da capital paraense estavam com irregularidade, principalmente os localizados na periferia. Em março de 2018 a situação está ainda pior, pois os pontos de açaí com selo de qualidade diminuíram 16% em relação a 2017 restando apenas 159 estabelecimentos de 7 mil. Esse comportamento desperta o alerta a comunidade local (G1 PA, 2014b; BELÉM, 2017; G1 PA, 2015b; BRASIL DOU, 2012; ORM, 2015; ORM, 2018).

Todas essas dificuldades verificadas para a comercialização do açaí acarretam em problemas na busca de controle de qualidade (além das fitossanitárias) e rastreabilidade do produto processado, principalmente para o exportado, visto que o mercado internacional exige produtos com elevado controle de qualidade (OLIVEIRA, 2007; SEBRAE, 2015).

É possível que um maior conhecimento do comportamento dos compostos orgânicos presentes na matriz frente à diversas variedades, origens, tipos de cultivo, fatores climáticos, sazonalidade, tipos de processamento, armazenamento e transporte possa auxiliar na iniciativa de melhores propostas para o controle de qualidade e rastreabilidade da polpa do açaí nacional. No entanto, no melhor do nosso conhecimento não há estudos com essa abordagem.

1.2. A Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A Ressonância Magnética Nuclear é uma técnica espectroscópica muito poderosa, tradicionalmente aplicada na elucidação estrutural de pequenas moléculas (sintéticas e naturais) e, seu fenômeno é muito discutido em livros textos (RIBEIRO & SOUZA, 2007; CLARIDGE, 1999; GIL & GERALDES, 2002).

Os avanços tecnológicos têm promovido várias transformações na técnica desde seu surgimento na década de quarenta (40). O desenvolvimento de sondas HR-MAS (*High-Resolution - Magic Angle Spinning*); de técnicas com aplicação de supressão do solvente; de sequências de pulso para realização de experimentos uni e bidimensionais (1D e 2D); de ímãs supercondutores comerciais que permitem um campo magnético (B_0) forte como o de vinte e quatro (24) Tesla (1020 MHz na frequência do hidrogênio); de microssondas com 1 a 1,7 mm de diâmetro interno; o uso de sonda criogênicas que possibilitam um maior poder de detecção; o

acoplamento da RMN com técnicas cromatográficas e, a criação de rápidos trocadores de amostras para um processo automatizado são alguns exemplos (ALCANTARA et al., 2007; HASHI et al., 2015; MIAO et al., 2015; EXARCHOU et al., 2003; 2005; BRUKER, 2018).

Estes proporcionaram uma ampliação no campo de atuação da RMN como em estudos de quantificação (qNMR); de dinâmica molecular; de cinética de reações; para controle de qualidade e rastreabilidade de produtos alimentícios; em interações de macromoléculas com fármacos; em amostras sólidas e heterogêneas; na identificação de compostos com baixas concentrações, entre outros (ALCANTARA et al., 2007; BOFFO & FERREIRA, 2006; FILHO et al., 2015; HOLZGRABE et al., 2005; PAULI et al., 2012; HARRIS, 2007; BERTOCCHI & PACI, 2008; THOMASI et al., 2016; COLNAGO et al., 2011).

Apesar de técnicas quantitativas como a espectroscopia por ultravioleta (UV), o infravermelho (IV) e a espectrometria de massas (EM) apresentarem menor limite de detecção que a RMN, esta apresenta a vantagem de não ser destrutiva, fornecer alta repetibilidade, possuir fácil preparo da amostra e um baixo tempo de análise (RAMAKRISHNAN & LUTHRIA, 2017; SACCHI & PAOLILLO, 2007).

1.2.1. RMN aplicada as análises de alimentos

As análises qualitativas e quantitativas por RMN podem ser aplicadas em matrizes biológicas, ambientais, combustíveis, alimentos, produtos farmacêuticos e produtos naturais (MONTEIRO et al., 2009; BOFFO et al., 2009; FILHO et al., 2015; DE OLIVEIRA et al., 2014; SANTOS & COLNAGO, 2013; ALCANTARA et al., 2007). Mas, alguns fatores como à grande necessidade da indústria na busca por controle de qualidade, garantia e autenticidade dos produtos, no desenvolvimento de novos alimentos e a conscientização pública sobre segurança alimentar, promoveram um crescimento no uso da ressonância como uma ferramenta analítica em alimentos *in natura* e processados (SPYROS & DAIS, 2012; RAMAKRISHNAN & LUTHRIS, 2016; SACCHI & PAOLILLO, 2007).

As diferentes técnicas de RMN, tais como, alto campo (*high-field* NMR), SNIF-NMR (*Site-specific Natural Isotopic Fractionation by Nuclear Magnetic Resonance*), estado sólido, imagem (MRI, *Magnetic Resonance Imaging*), baixo campo (*low-field* NMR ou TD-NMR) e a relaxometria têm sido aplicadas na ciência de alimentos (BOFFO et al., 2006; BARISON et al., 2010; COLNAGO et al., 2011; BERTOCCHI & PACI, 2008; LIÃO et al., 2010; SACCHI & PAOLILLO, 2007). O avanço nas pesquisas dessa área pode ser verificado através do crescente número de artigos divulgados na literatura científica, principalmente nos últimos 15 anos (Figura 1.7).

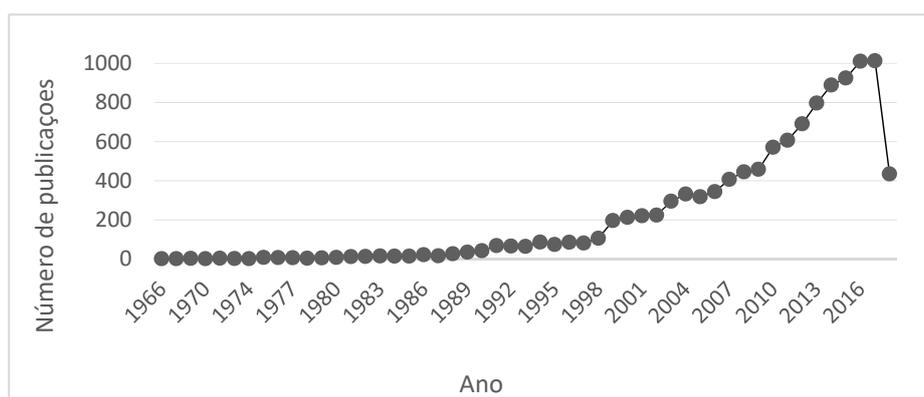


FIGURA 1.7 – Publicações incluindo o termo “*Food*” e “*NMR*” no título, palavras-chave e resumo da base de dados Scielo.

O crescimento no uso da RMN na área de metabolômica e perfil químico (*fingerprinting profile*) em amostras de alimentos foi auxiliado por fatores como: a maior acessibilidade aos espectrômetros por pesquisadores dos centros de pesquisas e indústrias; o desenvolvimento de *hardware* mais sofisticados e programas de fácil uso; o preparo de amostras mais simples, rápido e constituído de menos etapas; a obtenção de informações da composição química e quantitativa em uma única medida; uso de espectros de RMN 2D e banco de dados (comerciais e gratuitos) que ajudam na identificação/caracterização de metabólitos em misturas, além de ferramentas estatísticas multivariadas que possibilitam o tratamento dos dados químicos (SACCHI & PAOLILLO et al., 2007; RAMAKRISHNAN & LUTHRIS, 2016).

Nesse sentido, diversas matrizes simples e complexas como bebidas não alcoólicas (chás e suco de frutas), bebidas alcoólicas (cervejas, aguardente e vinhos), óleos e gorduras, frutos e vegetais, produtos de laticínios, carnes e derivados, vinagres, méis, café, dentre outros, são utilizadas na quantificação e caracterização por RMN.

Os estudos com amostras alimentícias são baseadas em diferentes problemas que podem envolver caracterização dos compostos, controle de qualidade (nutricional, sensorial e frescor), rastreabilidade (origem geográfica, origem botânica, espécie, tipo de processo tecnológico aplicado), autenticação, adulteração, diferenciação de variedades, condições de armazenamento, condições de plantio, condições climáticas e geográficas, condições agronômicas de cultivo e modificações genéticas (BOFFO et al., 2009; TAVARES & FERREIRA, 2006; RAMAKRISHNAN & LUTHRIS, 2016; BARRISON et al., 2010; LAMANNA et al., 2008; SHUMILINA et al., 2015; 2016; 2018; SPYROS & DAIS, 2012; SACCHI & PAOLILLO et al., 2007; KORTESNIEMI et al., 2015).

A metodologia utilizada no estudo de metabolômica em alimentos é composta das seguintes etapas: problema a ser estudado; coleta amostral de alimentos (animal ou vegetal); o preparo da amostra (extração ou análise direta) seguindo um protocolo estabelecido; a otimização e aquisição dos experimentos a serem realizados; a identificação/caracterização dos metabólitos; realização do tratamento estatístico e, finalmente a análise dos resultados (Figura 1.8).

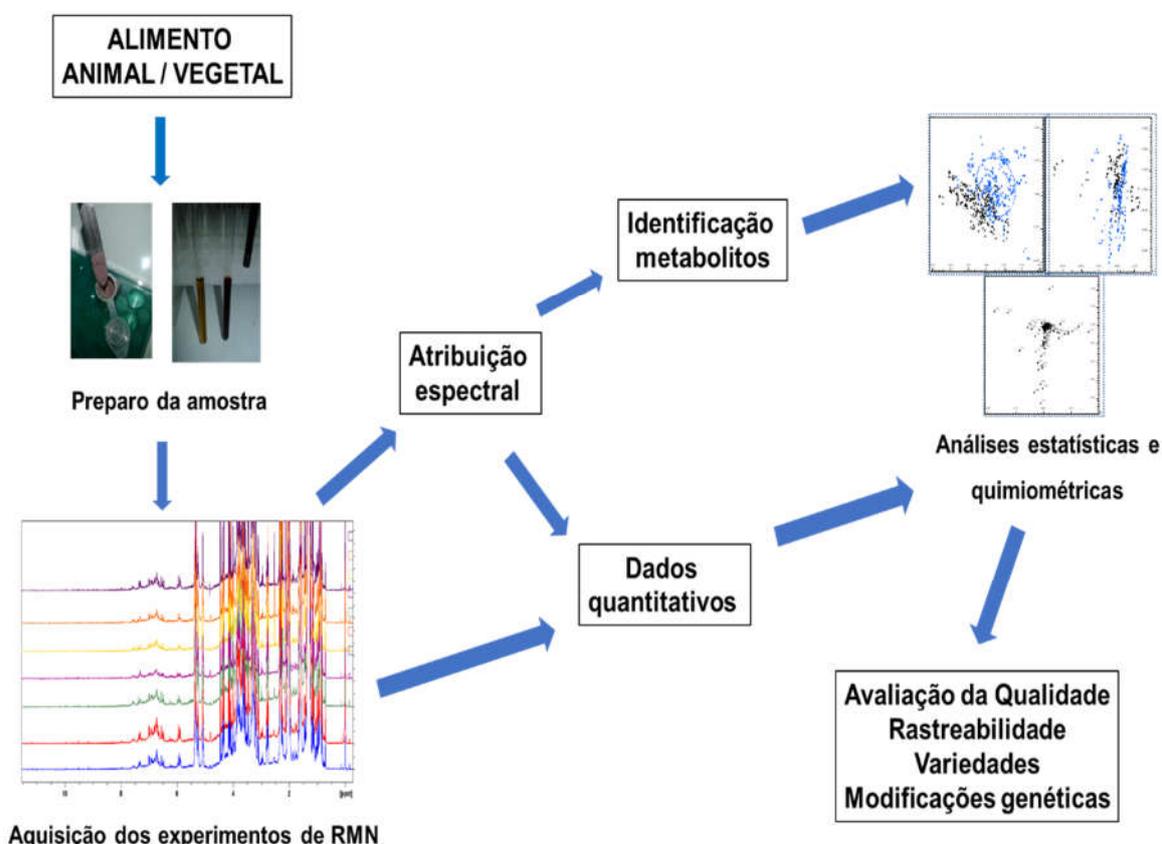


FIGURA 1.8 – Esquema geral da metodologia realizada para o estudo de metaboloma por RMN em alimentos. Exemplo em RMN de alta resolução em polpas do açaí.

Cada etapa da metodologia possui a sua particularidade e todas são importantes para a formação do trabalho como um todo. Como demandam tempo são necessários conhecimentos específicos e planejamento para que ao final, o trabalho forneça a integridade das amostras, robustez, uma correta análise das informações e, garanta a qualidade e confiabilidade dos dados gerados. A amostragem deve ser representativa, o armazenamento deve ser realizado corretamente de maneira a cessar as reações enzimáticas, o preparo da amostra deve ser otimizado a fim de obter as melhores condições de extração e preservação da amostra preparada (ANDRADE et al., 2008; SKOOG et al., 2006; ALEXANDRE SILVA, 2016), o equipamento deve apresentar repetibilidade, robustez e estabilidade (SACCHI & PAOLILLO et al., 2007), assim como alguns cuidados devem ser tomados na realização dos tratamentos estatísticos (BEEBE, PELL & SEASHOLTZ, 1998; BRERETON, 2003).

No Brasil, a RMN como ferramenta analítica aplicada em amostras de alimentos é ainda uma técnica explorada por poucos laboratórios de pesquisa, apesar de contribuir amplamente com a área (BARISON et al., 2010; DE OLIVEIRA et al., 2014; LIÃO et al., 2010; BOFFO et al., 2012; COLNAGO et al., 2011; ALVES FILHO et al., 2016; FREITAS et al., 2018).

1.2.2. A hifenação LC-DAD-SPE/NMR

Matrizes complexas como alimentos e extratos de produtos naturais contêm muitos compostos de diferentes classes químicas. Dessa forma, para realizar a identificação/caracterização dos metabólitos presentes nas amostras são necessárias etapas de extração, separação, purificação e isolamento.

Com o crescimento da instrumentação nas pesquisas, muitas análises da composição química de alimentos são realizadas através de técnicas cromatográficas como: líquida (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*) e gasosa (GC, *Gas Chromatography*) e, a extração por fase sólida (SPE, *Solid Phase Extraction*) acopladas aos detectores de espectrometria de massas (MS, *Mass Spectroscopy*) e de RMN, como nas técnicas hifenadas de LC-SPE-NMR, LC-MS, GC-MS, GC-SPE-MS e LC-SPE-NMR/MS.

O desenvolvimento da técnica hifenada LC-NMR (cromatografia líquida acoplada à ressonância magnética nuclear) iniciada no final dos anos 70 (WATANABE

& NIKI, 1978; BAYER & KELLER, 1979) e a melhoria acelerada da eletrônica (*hardwares* e *softwares*) promoveram um imenso progresso no seu uso como uma importante ferramenta de isolamento e elucidação estrutural de compostos desconhecidos e, em pequena concentração em matrizes complexas.

A técnica LC-NMR possui vários modos de operação, que são escolhidos e desenvolvidos de acordo com o interesse da abordagem e considerando as características de cada amostra. São descritos o fluxo por meio contínuo (*on-flow* LC-NMR), com paradas na corrida cromatográfica (*stopped-flow* LC-NMR), com coletor de amostras (*loop storage mode* LC-NMR) e, com armazenamento em cartuchos de fase estacionária (SPE) que sem dúvida alguma é o mais utilizado (Figura 1.9).

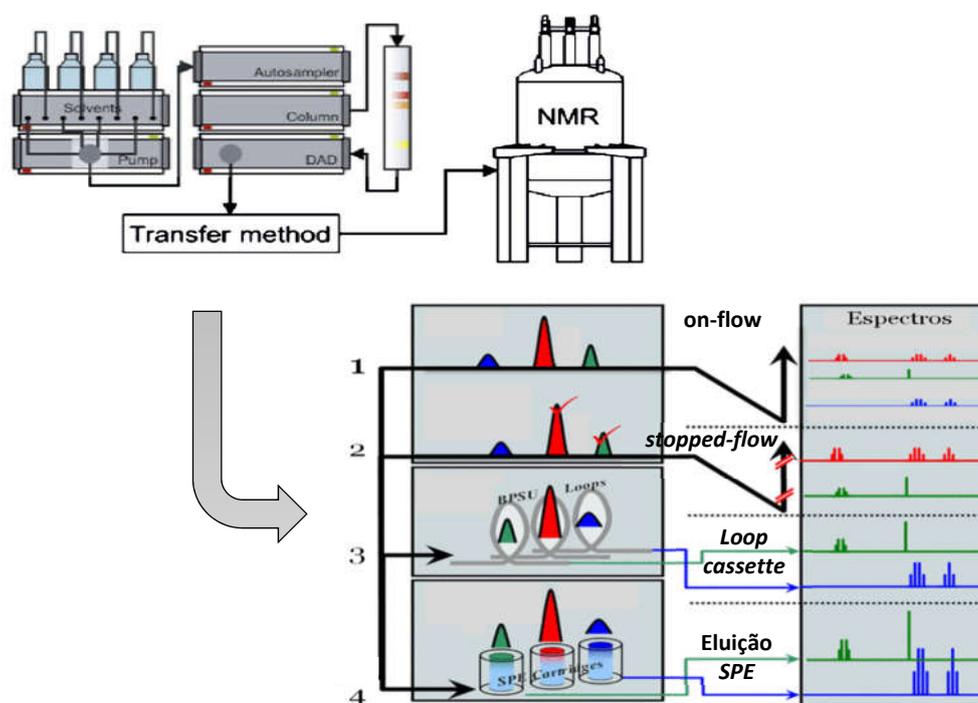


FIGURA 1.9 – Esquema geral com os modos de operação da hifenação LC-UV-NMR. Fonte: Figura adaptada de STURM & SEGER, 2012 e BRUKER, 2018.

O modo de operação por fluxo contínuo se baseia na utilização do espectrômetro de RMN de maneira semelhante ao detector UV em um cromatógrafo, pois a aquisição do experimento de ressonância (detecção) é realizada sem a interrupção da vazão da fase móvel cromatográfica. Esse método pode ser utilizado para uma rápida triagem em misturas complexas, mas apenas para compostos majoritários (BAYER & KELLER, 1979; ELIPE, 2003; EXARCHOU et al., 2005; GODEJOHANN & PREISS, 1997). No entanto, como as frações são analisadas pelo

RMN em uma mistura de solventes e com concentração vindos da cromatografia são geradas algumas desvantagens como baixa sensibilidade na detecção e problemas com mudança dos solventes (BAYER & KELLER, 1979).

Já o modo *stopped-flow* consiste na interrupção da vazão quando a fração de interesse chega na cela de detecção do RMN, após a obtenção de espectros 1D e 2D o fluxo é liberado e, então repete o mesmo processo a cada fração seguinte (BAYER & KELLER, 1979; ELIPE, 2003; TODE et al., 2009). No entanto, a realização de diversas paradas gera desvantagens pois, diminui a eficiência da separação cromatográfica e, compostos muito concentrados podem causar efeito de memória na cela de detecção do RMN (BAYER & KELLER, 1979; EXARCHOU et al., 2005). Esses dois primeiros modos de operação são pouco usados pois apresentam uma grande desvantagem devido ao seu custo elevado pois são usados solventes deuterados na fase móvel da separação cromatográfica (BAYER & KELLER, 1979).

No modo de operação com coletor de amostras (*loop storage*) ocorre o armazenamento das frações de interesse em capilares para que posteriormente sejam realizados os experimentos de RMN. Uma limitação é que os analitos devam ser quimicamente estáveis no solvente durante o tempo de armazenamento no capilar e, período de aquisição dos experimentos de RMN 1D e 2D. Mas como esse é um fator de difícil controle, não é um método muito utilizado e pouco recomendado no estudo de matrizes desconhecidas (ELIPE, 2003; TSENG et al., 2000).

Na quarta modalidade de operação, com a retenção dos analitos em cartuchos do tipo SPE, o cromatógrafo realiza a separação dos constituintes químicos geralmente focando nos compostos de baixa concentração e, as frações de interesse são enviadas para uma unidade com cartuchos individuais de fase estacionária sólida. Essa técnica hifenada denominada LC-UV-SPE, concentra os analitos presente nas bandas cromatográficas através de diversas injeções (*trapping*) que promovem uma concentração do analito para posteriormente serem analisados no equipamento de RMN. Utilizando esse procedimento ocorre um expressivo aumento na concentração do soluto e, conseqüentemente na detecção, com um fator de 2 a 4 vezes quando comparado a técnica LC-NMR (EXAUCHOU et al., 2003; EXARCHOU et al., 2005).

O limite de detecção é uma grande limitação da técnica de LC-NMR. No entanto, o acoplamento com a espectrometria de massas (LC-NMR/MS) e o uso de acessórios, como cartuchos de SPE e sondas criogênicas, são alguns dos progressos que proporcionam um aumento significativo na sensibilidade das medidas de RMN

permitindo a detecção de compostos em mistura na faixa de ppm (EXARCHOU et al., 2005; SILVA et al., 2013; SPRAUL et al., 2003; THOMASI et al., 2014).

A técnica de LC-NMR têm mostrado grande eficiência na separação e identificação de constituintes não alvo (*non-target compounds*) e com baixa concentração, principalmente em amostras complexas como fármacos, produtos naturais, amostras ambientais e em polímeros (EXARCHOU et al., 2005; THOMASI et al., 2014; CARDOZA et al., 2003; THOMASI et al., 2016; HILLER et al., 2013; SCHOLOTTERBECK & CECCARELLI, 2009; LOMMEN et al., 2000).

Em alimentos foram encontrados trabalhos com o isolamento e a identificação de sete (7) flavonoides (rutina, hiperina, isoquercitrina, reinoutrina, avicularina, quercitrina e floridzina) no extrato bruto de cascas de maçã por LC-NMR-MS (LOMMEN et al., 2000); nove (9) flavonoides glicosilados em tomates geneticamente modificados utilizando as técnicas de LC/NMR e LC/MS (LE GALL et al., 2003); cinco (5) flavonoides (taxifolin, aromadendrina, eriodictiolina, naringenina e apigenina), o ácido rosmarinico e o monoterpene carvacrol em extrato de orégano grego (*Origanum vulgare*) por LC-UV-SPE-NMR-MS (EXARCHOU et al., 2003); vinte e cinco (25) compostos majoritários do azeite de oliva extra virgem por LC-DAD-SPE-NMR/MS (PÉREZ-TRUJILLO et al., 2010) e, compostos bioativos por LC-SPE-NMR/MS em um estudo com dezenove (19) tipos de algas marinhas comestíveis (LIU et al., 2016).

1.3. A Quimiometria aplicada à RMN

Amostras de alimentos normalmente são misturas complexas de diferentes compostos orgânicos, de diferentes classes químicas e possuem diversas variáveis. Para a polpa do açaí não é diferente pois, além de conter um grande número de compostos de diferentes classes orgânicas, ainda é susceptível a vários fatores que afetam a sua composição como, sazonalidade, clima, condições de cultivo, grau de maturação dos frutos, condições de transporte, tipos de processamento, entre muitos outros (NEVES et al., 2015; MALCHER & CARVALHO, 2011; MATHEUS et al., 2006; MENEZES et al., 2008; SOUSA et al., 2006).

A técnica de RMN de ^1H pode ser empregada para analisar as variações dos constituintes presentes no açaí pois, em uma única análise é possível obter informações qualitativas e quantitativas dos compostos orgânicos.

O conjunto de dados espectrais gerados são muito similares e com elevado número de informações e, dessa forma realizar a análise dos mesmos por comparação visual é impraticável. Portanto, é necessária a utilização de métodos que possibilitem um diagnóstico abrangente das informações químicas. Os métodos quimiométricos tornam possível a verificação das modificações na concentração e variação da composição química das amostras, permitindo avaliar similaridades e/ou diferenças entre as mesmas (BRERETON, 2003; BEEBE, PELL & SEASHOLTZ, 1998; DEFERNEZ & COLQUHOUN, 2003).

O uso das ferramentas quimiométricas têm grande aplicação em diversas áreas da química, sendo utilizada por diferentes técnicas como infravermelho, voltametria, cromatografia gasosa, cromatografia líquida, Raman, entre outras. As pesquisas por RMN de ^1H em amostras de alimentos são muito significativas e apresentam crescentes aplicações, principalmente nos últimos dez (10) anos (RAMAKRISHNAN & LUTHRIA, 2017; SACCHI & PAOLILLO, 2007; TODASCA et al., 2011). Alguns dos trabalhos mais recentes utilizaram essas ferramentas para verificações de mudanças nos metabólitos em função da sazonalidade da erva-mate (FREITAS et al., 2018), na detecção da qualidade e condições de estocagem de salmão da Noruega com armazenamento por um (1) a vinte e um (21) dias em temperatura de 0 e 4°C (SHUMILINA, DYKYY & DIKIY, 2018) e, estudos para a determinação da origem geográfica de méis provenientes do Sul da África, Eslováquia e Zâmbia (OLAWODE et al., 2018), entre muitas outras aplicações.

1.3.1. A quimiometria

Na década de 70, iniciaram os estudos e as aplicações de métodos matemáticos e estatísticos para processamentos e interpretação de dados químicos no Brasil. Em 1980, aconteceu o primeiro curso de quimiometria no Instituto de Química da Unicamp, ministrado pelo Prof. Bruce Kowalski (um dos pioneiros da área) dando início a pesquisa e divulgação nacional desta nova área da ciência, denominada Quimiometria (DE BARROS NETO et al., 2006).

A Quimiometria é uma área da ciência que desenvolve e aplica métodos matemáticos e estatísticos em dados de origem química permitindo planejar, extrair e fornecer importantes informações de um determinado problema em estudo. Ela é dividida em quatro vertentes (MANLY, 2005; PEREIRA FILHO, 2015): I) Emprego de

planejamento fatorial para otimização e estudo das condições experimentais ideais de um determinado problema; II) Análise exploratória dos dados químicos com a utilização de PCA (*Principal Component Analysis*) e HCA (*Hierarchical Cluster Analysis*); III) Calibração multivariada com a utilização da PCR (*Principal Component Regression*) e PLS (*Partial Least Squares*); e, IV) Proposição de modelos de classificação, como KNN (*k-Nearest Neighbor*), SIMCA (*Soft Independent Modelling of Class Analogy*) e PLS-DA (*PLS for Discriminant Analysis*).

Neste trabalho foram realizados estudos de planejamento fatorial para otimização das condições experimentais das análises de HPLC-DAD e, análises exploratórias nos dados de RMN de ^1H e nas medidas da composição físico-químicas das polpas do açaí por PCA.

a) Planejamento fatorial

O método de planejamento fatorial, também conhecido como planejamento experimental, é utilizado para planejar e realizar experimentos de forma objetiva e organizada em um estudo que possui muitas variáveis. Com o uso do planejamento fatorial é possível observar interações entre as variáveis, prever a resposta do sistema em estudo em uma condição que não foi testada na prática, identificar o número de experimentos a ser realizado, além de gerar menos resíduos químicos, economia de tempo e recursos financeiros (PEREIRA FILHO, 2015; SILVA et al., 2008b).

A identificação das variáveis que possuem maior importância (ou efeito sobre o estudo) é realizada de acordo com o número de variáveis e, pode ser dividida em planejamento fatorial completo, quando envolve de 2 a 4 variáveis e, planejamento fatorial fracionado quando envolve de 5 a mais variáveis (Figura 1.10).

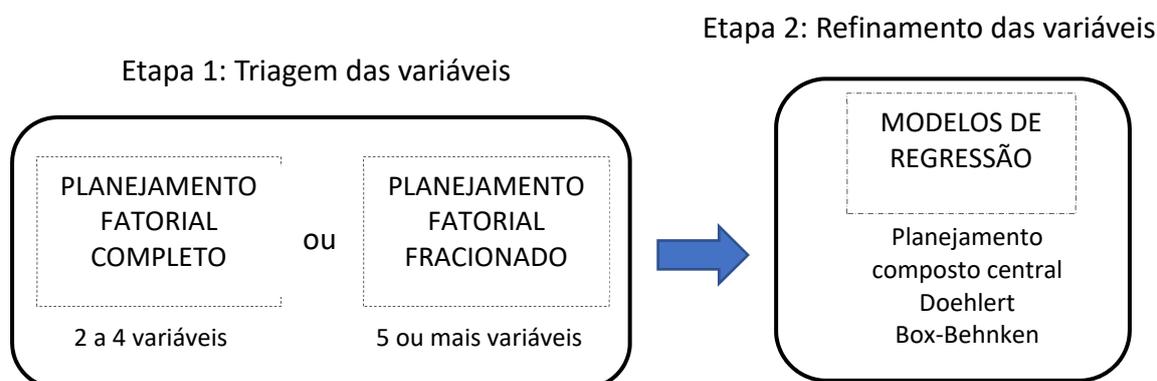


FIGURA 1.10 – Representação das etapas envolvidas no planejamento fatorial em um estudo. Fonte: PEREIRA FILHO, 2015.

Após a primeira etapa de triagem, é necessário realizar o ajuste fino das variáveis mais significativas para então, construir modelos que correlacionem as variáveis com as respostas obtidas no estudo (Figura 1.10). Este refinamento pode ser feito através de modelos de regressão que geram respostas gráficas como a superfície de resposta e o gráfico de contorno (Figura 1.11) que possibilitam a visualização dos pontos experimentais testados com as respectivas respostas e a identificação da região de máximo sinal analítico (PEREIRA FILHO, 2015; BEZERRA et al., 2008).

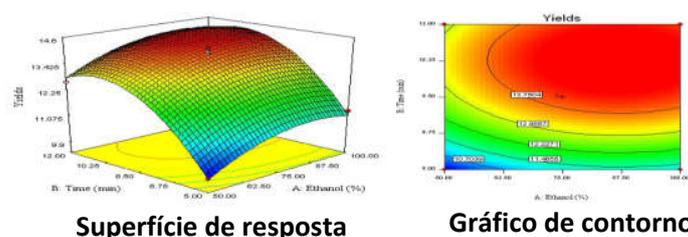


FIGURA 1.11 – Representação dos gráficos de superfície de resposta (à esquerda) e de contorno (à direita) de um determinado estudo. Fonte: ZHAO et al., 2012

O planejamento fatorial é amplamente utilizado para otimização de processos em métodos analíticos como eletroforese capilar, espectrometria de emissão óptica por plasma acoplado indutivamente (ICP OES), espectrometria de emissão óptica com detector espectrometria por massa (ICP-MS), voltametria, HPLC, GC, Raman e entre outros, com aplicações em análises farmacêuticas, alimentos, ambientais e fluidos biológicos (CASS & CASSIANO, 2015; BEZERRA et al., 2008; COLOMBO et al., 2013; LEME et al., 2014; TARLEY et al., 2009).

b) Análises por Componentes Principais (PCA)

Dentre as vertentes da quimiometria, a análise exploratória dos dados por meio da Análises por Componentes Principais (PCA) é a mais utilizada no tratamento dos dados de RMN de ^1H (*fingerprint profiling*) pois, possibilita agrupar amostras que possuam características comuns e separa-las de outras que por ventura tenham perfil diferente, auxiliando na verificação de amostras que não apresentam o mesmo padrão espectral das demais (*outliers*) (SPYROS & DAIS, 2012; MANUAL AMIX, 2009; MORGANO et al., 1999; RAMAKRISHNAN & LUTHRIA, 2017).

A PCA é uma ferramenta quimiométrica que utiliza algoritmos matemáticos que reduz a dimensionalidade dos dados, tornando uma matriz complexa em dados mais simples o que facilita a interpretação dos resultados e destaca as informações mais relevantes. A matriz de dados da análise exploratória é formada pela relação entre as amostras (linhas) e as variáveis (colunas), no qual em dados espectrais por RMN de ^1H , as amostras são os espectros e as variáveis são os deslocamentos químicos (Figura 1.12) (BEEBE, PELL & SEASHOLTZ, 1998; BRERETON, 2003; MANUAL AMIX, 2009).

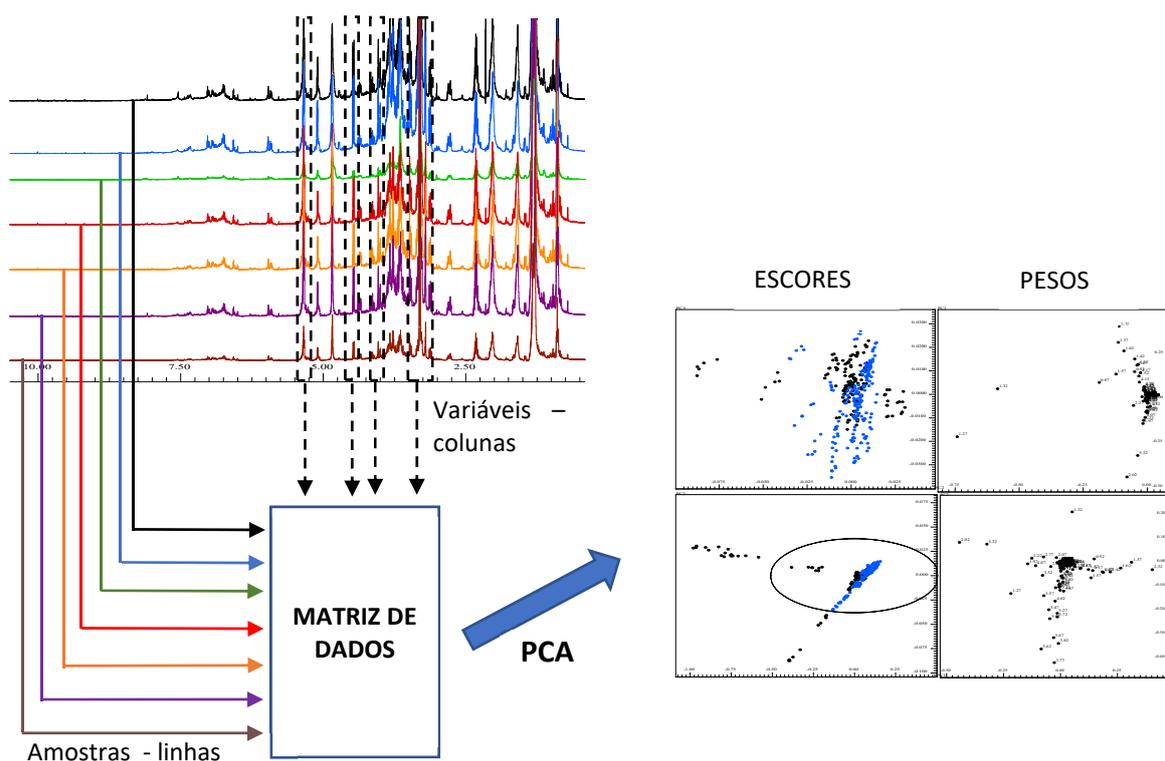


FIGURA 1.12 – Representação do tratamento quimiométrico por PCA em dados de RMN de ^1H das polpas do açaí.

Os gráficos de PCA são expressos por um conjunto de vetores ortogonais entre si denominados componentes principais (PCs) que, a partir de combinação linear reduzem a dimensionalidade dos dados originais. São construídos em ordem decrescente de variância explicada (informações dos dados originais) e, dessa forma as informações mais relevantes se apresentam nas primeiras PCs e diminuem sucessivamente nas posteriores. No entanto, isso não significa necessariamente que por conter uma menor variância explicada dos dados, as PCs maiores sejam irrelevantes ou desprezíveis. Essa afirmação somente é possível após avaliação dos resultados fornecidas por estas PCs e, isso é inerente a cada estudo e matriz em questão.

A matriz PCA é decomposta em escores (*scores*) e pesos (*loading*). Os escores mostram a localização das amostras no espaço multidimensional, no qual quanto maior a semelhança, maior será a proximidade das mesmas no modelo. Já os pesos mostram quais são as variáveis que carregam mais informações em cada PC.

Para que um estudo quimiométrico seja bem-sucedido, alguns tratamentos matemáticos podem ser realizados com o objetivo de diminuir e até retirar fontes de variação do conjunto de dados, otimizando as respostas e evitando resultados equivocados. Estas são realizadas na etapa denominada pré-processamento dos dados (BEEBE, PELL & SEASHOLTZ, 1998; BRERETON, 2003).

1.3.2. Pré-processamentos

Os pré-processamentos aplicados em amostras obtidas por medidas de RMN de ^1H são: a correção de linha de base, o ajuste da fase e referenciado (Figura 1.13). Se não executados corretamente acarretam em problemas com a intensidade dos sinais, com diferenças causada por oscilações entre as amostras e, variações nos deslocamentos químicos. Estes fatores influenciam nas respostas observadas nas análises quimiométricas (BRERETON, 2003; BARISON, 2005).

Já os pré-processamentos - quimiométricos são aqueles aplicados nas variáveis. Os mais comuns são a centralização dos dados na média e autoescalamento. O primeiro é recomendado quando existe flutuação na linha de base espectral, pois diminui a influência dos ruídos espectrais e variáveis de baixa concentração; se baseia na subtração de cada variável da coluna pelo vetor média da mesma gerando a soma de seus valores igual a zero, nesse tratamento o centroide do grupo fica localizado na origem do sistema. Já o segundo, ao escalonar os dados, o conjunto de dados é ajustado de modo a igualar a variância de cada variável (BRERETON, 2003; BEEBE, PELL & SEASHOLTZ, 1998).

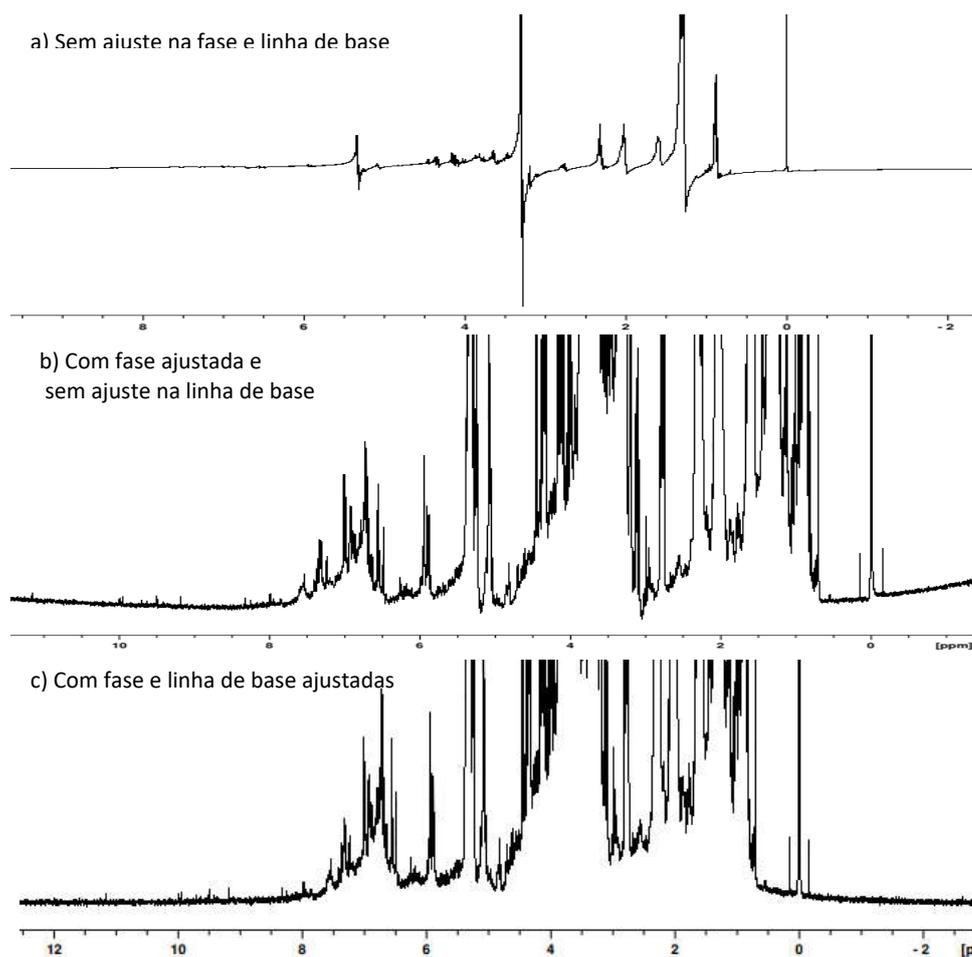


FIGURA 1.13 – Espectros de RMN de ^1H das polpas do açai com diferentes fatores que influenciam nas análises quimiométricas.

1.4. Extração com líquido pressurizado (PLE)

A técnica de extração com líquidos pressurizados (PLE, *Pressurized Liquid Extraction*) também chamada extração acelerada por solvente (ASE[®] DIONEX[™], *Accelerated Solvent Extractor*) e extração com solventes pressurizados (PSE, *Pressurized Solvent Extraction*) consiste na extração de analitos utilizando solventes orgânicos com alta pressão e elevadas temperaturas em amostras homogêneas dentro de uma cela de extração (DIONEX, 2018; STICHER, 2008; MUSTAFA & TURNER, 2011). Na Figura 1.14, são mostrados alguns equipamentos comerciais de PLE, um da FMS (*Fluid Management Systems*) e dois da Dionex[™].



FIGURA 1.14 – Equipamentos para extração com líquido pressurizado (PLE) da FMS e Dionex™. Fonte: DIONEX, 2018 e FMS, 2018.

1.4.1. Histórico e princípios da técnica

As primeiras publicações surgiram em meados da década de 90 e, a partir de então seu uso têm crescido nos centros de pesquisas e em indústrias devido as vantagens como fácil uso, grande eficiência, maior rapidez, o uso de menor quantidade de amostra e menor consumo de solvente quando comparado a técnicas convencionais de extração (LEHOTAY & LEE, 1997; BENTHIN et al., 1999; MUSTAFA & TURNER, 2011; STICHER, 2008; SCHANTZ, NICHANTZ & WISE, 1997).

Os equipamentos comerciais apresentam opções de *clean up* e extração de analitos em amostras sólidas e semissólidas, utilizando de 1 a 200 g de amostra com celas de extração com capacidade de 5 a 250 mL, pressão entre 0 a 2500 psi e, temperatura variando de 25 °C até 200 °C (DIONEX, 2018; FMS, 2018; THERMO SCIENTIFIC, 2013).

Existem dois modos de extração por PLE, o estático e o dinâmico. No modo estático, a cela de extração é preenchida com solvente e aquecida para gerar pressão dentro dela. Após um período determinado pelo usuário, o extrato é direcionado ao frasco coletor, a cela é lavada com solvente puro e posteriormente o sistema é purgado com nitrogênio gasoso (N₂) para evitar quaisquer perdas na extração, garantindo que todo o extrato seja obtido. Este processo pode ser realizado de uma a várias vezes (ciclos) na mesma cela de extração. Já no segundo modo de extração, o solvente é percolado continuamente pela cela sob alta pressão e com vazão constantes, durante o tempo escolhido pelo usuário (MUSTAFA & TURNER, 2011; STICHER, 2008).

1.4.2. Aplicações e seu uso em alimentos

A extração com líquido pressurizado é muito utilizada em laboratórios de pesquisa e indústrias para a extração de pesticidas em amostras ambientais e de alimentos e, seu uso foi impulsionado principalmente devido a demanda dos últimos anos por controle de qualidade e segurança alimentar.

Em amostras de alimentos, a técnica PLE é aplicada para extração de lipídios, dioxinas, pesticidas, herbicidas, antibióticos e, têm despertado o interesse para compostos nutricionais e bioativos (SUN et al., 2012; STICHER, 2008; THERMO SCIENTIFIC, 2013). Um trabalho recente aplicou a técnica de PLE para obter as melhores condições de extração de compostos fenólicos na casca do abacate, e, após a obtenção do extrato com 200 °C e solvente orgânico etanol/água (1:1) foram identificados e quantificados quarenta e cinco (45) compostos fenólicos por HPLC-DAD-ESI-TOF-MS (FIGUEROA et al., 2018).

Na literatura são encontradas publicações com polímeros, em amostras criminais, farmacêuticas, clínicas, entre outras. A sua aplicação em produtos naturais têm crescido, principalmente no estudo de plantas medicinais para a extração de constituintes fenólicos, lignanas, carotenoides, isoflavonas, óleos e lipídios, dentre outras classes de compostos bioativos (STICHER, 2008; MUSTAFA & TURNER, 2011; BENTHIN, DANZ & HAMBURGER, 1999).

1.5. Justificativa

O levantamento bibliográfico realizado neste trabalho evidencia o valor nutricional e grande potencial farmacológico da polpa do açaí (*Euterpe oleracea*), a sua importância para a economia brasileira e, a necessidade de ferramentas que auxiliem para o controle de qualidade e rastreabilidade das polpas comercializadas no mercado interno e externo, visto que adulterações são constantemente realizados na cidade de Belém (PA).

A extração com líquido pressurizado, análises de *fingerprint profile* por RMN de ¹H, estudos utilizando a quimiometria e, a hifenação por LC-DAD-SPE/NMR para separação e identificação de compostos em baixa concentração são técnicas modernas com ampla aplicação e, uma interessante estratégia para o estudo de matrizes complexas como é o caso de amostras de alimentos.

Vale ressaltar que não foram encontrados estudos na literatura que aplicaram as técnicas de extração com líquido pressurizado e perfil químico por RMN de ^1H no estudo da sazonalidade, condições de cultivo e melhoramento genético em polpas do açaí. A aplicação do LC-DAD-SPE/NMR em polpas do açaí foi realizado (durante o período deste doutorado) em parceria com o Prof. Dr. Sérgio Scherrer Thomasi. O referido trabalho está em processo de submissão com o título “Chemical constituents of Açaí berry pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) by LC-DAD-BPSU/NMR and LC-DAD-SPE/NMR”. Dessa forma, esse trabalho apresenta uma abordagem inédita e muito pode contribuir com as pesquisas da matriz açaí.

OBJETIVOS

2. OBJETIVO GERAL

Verificar a influência da sazonalidade, condições de cultivo, variações genóticas das polpas comerciais e em cultivo controlado de polpas do açaí por RMN de ^1H e isolamento de metabólitos através da LC-DAD-SPE/NMR.

2.1. Objetivos específicos

I. Realizar a identificação dos compostos orgânicos presentes nas polpas de açaí liofilizadas de genótipos da Embrapa Amazônia Oriental e das comerciais encontradas no comércio local da cidade de Belém-PA através da RMN 1D e 2D.

II. Obtenção de *fingerprint* por RMN de ^1H para polpas de açaí liofilizadas dos genótipos cultivados (Embrapa Amazônia Oriental) e comerciais (comércio da cidade de Belém-PA) e análise de tendências da sazonalidade, condições de cultivo, variações genóticas utilizando a quimiometria.

III. Realizar correlações dos dados espectrais por RMN de ^1H com análises físico-químicas (pH, acidez titulável, °Brix, umidade, sólidos totais, lipídios, proteínas, cinzas, antocianinas e compostos fenólicos) realizadas no Laboratório de Agroindústria da Embrapa Amazônia Oriental, das polpas do açaí utilizando a quimiometria.

IV. Identificar os compostos orgânicos presente na fração metanólica da polpa do açaí obtido com o extrator acelerado por solvente (DIONEX ASE™ 350), utilizando o sistema hifenado LC-DAD-SPE/NMR no modo *off-line* com modo de operação *time-slice*.

A fim de auxiliar a apresentação dos resultados, esse trabalho foi apresentado na forma de capítulos que envolvem os objetivos específicos citados acima.

*Capítulo II: Fingerprint por RMN de
¹H e análises quimiométricas das
polpas do açaí liofilizadas*

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Origem e preparo das polpas do açaí

a) Genótipos da EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL – Belém (PA)

Foram colhidos cachos do açaí em maturação completa de vinte e nove (29) genótipos selecionados no Programa de Melhoramento Genético do Açaizeiro da Embrapa Amazônia Oriental (CPATU), um (1) genótipo da mistura da Unidade de Observação de uma cultivar em fase de finalização e um (1) genótipo da cultivar BRS-Pará, totalizando 31 genótipos. A coleta dos frutos do açaí foi realizada nos mesmos dias da colheita dos cachos, durante os anos de 2014 a 2016.

Os cachos colhidos foram embalados em lona de plástico (Figura 1.2; Capítulo 1) e encaminhados ao Laboratório de Fitomelhoramento da CPATU para realização dos processos de debulha, pesagem, identificação, armazenamento dos frutos em sacos plásticos identificados (Figura 2.1) e então encaminhados ao Laboratório de Agroindústria (CPATU).



FIGURA 0.1 - Protocolo de preparo dos frutos do açaí na Embrapa Amazônia Oriental (CPATU) em Belém – PA. Fotos: própria autora em Embrapa Amazônia Oriental.

No Laboratório de Agroindústria, cerca de dois (2) kg de frutos do açaí após limpeza, sanitização (imersão em solução de hipoclorito de sódio) e imersão em água morna foram processados mecanicamente em despulpador (Metvisa) com adição de 1 (um) litro de água (proveniente do abastecimento urbano) filtrada. As polpas do açaí *in natura* foram acondicionadas em potes plásticos de polietileno de

alta densidade e imediatamente congeladas a -18 °C em câmara fria. Algumas imagens do processo podem ser visualizadas na Figura 1.3 (Capítulo 1) e o esquema do protocolo de extração na Figura 2.2.

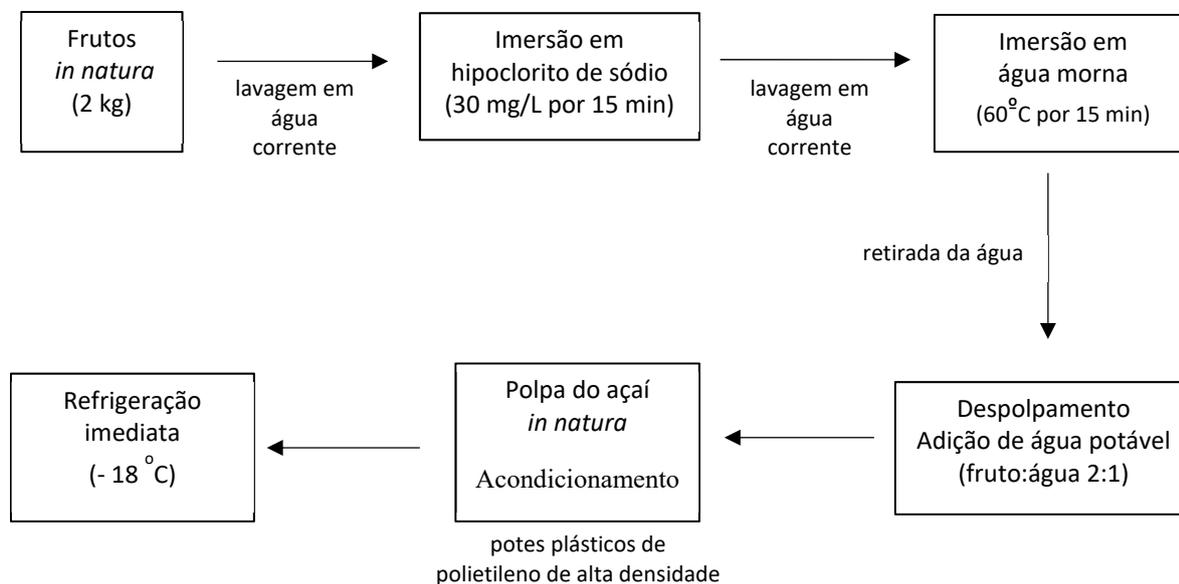


FIGURA 0.2 - Protocolo de extração da polpa dos frutos de açaí na Embrapa Amazônia Oriental (Belém – PA).

b) Polpas comercializadas em Belém (PA)

As polpas do açaí comerciais foram adquiridas em dez (10) pontos de venda (batedores de açaí) do município de Belém do Pará. Os estabelecimentos acompanhados na coleta foram os mesmos durante três (3) anos de coleta das polpas, com exceção de dois (2) locais que fecharam no período da entressafra de 2016 (CAP e CADC) e foram substituídos por outros pontos de venda denominados CANM e CPOA (Tabela 2.2). As polpas do açaí comerciais e de genótipos possuem a classificação 'açaí do tipo médio' ou 'Tipo B', com teor de sólidos totais entre 11 a 14% m.m. de acordo com a legislação vigente (BRASIL, 2000).

As polpas congeladas de genótipo e comerciais foram liofilizadas (LIOTOP modelo L101) durante 48 horas, armazenadas em três (3) tubos tipo *Eppendorf*[®] de 2 mL com proteção da luz, em temperatura ambiente e então, transportadas em temperatura ambiente via transporte aéreo para o Laboratório de RMN da UFSCar - São Carlos/SP e permaneceram acondicionadas em um refrigerador a -20 °C.

As amostras das polpas do açaí foram codificadas, de maneira que amostras provenientes dos genótipos cultivados na Embrapa Amazônia Oriental possuem inicial com a letra G e as amostras obtidas no comércio de Belém (PA) possuem inicial com a letra C. As informações do período da coleta (safra ou entressafra) e ano também estão no código.

Os dados das polpas do açaí liofilizadas de genótipos e comerciais estudadas neste trabalho são apresentados nas Tabelas 2.1 e 2.2.

TABELA 0.1 – Amostras das polpas do açaí de genótipos do Programa de Melhoramento Genético (PMG) da Embrapa Amazônia Oriental – Belém (PA).

CÓDIGO AMOSTRAS	GENÓTIPOS					
	SAFRA 2014 (07 -12/2014)	ENTRESSAFRA 2015 (01 - 06/2015)	SAFRA 2015 (07 -12/2015)	SAFRA 2015 2ª COLETA	ENTRESSAFRA 2016 (01 - 06/2016)	SAFRA 2016 (07-12/2016)
G1	G1 – S14	-	G1 – S15	-	-	-
G2	G2 – S14	-	-	-	-	-
G3	G3– S14	-	G3– S15	G3– S15	-	-
G4	G4– S14	-	G4– S15	-	-	-
G5	G5– S14	-	-	-	-	-
G6	G6– S14	-	G6– S15	G6– S15	G6– E15	-
G7	G7– S14	-	G7– S15	G7– S15	-	-
G8	G8– S14	-	-	-	-	-
G9	G9– S14	G9– E15	G9– S15	-	-	-
G10	G10– S14	-	-	-	-	-
G11	G11– S14	-	G11– S15	-	G11– E15	-
G12	G12– S14	-	-	-	-	-
G13	-	G13– E15	-	-	-	G13-S16
G14	-	G14– E15	G14– S15	-	-	-
G15	-	G15– E15	-	-	-	-
G16	-	G16– E15	G16– S15	G16– S15	-	-
G17	-	-	G17– S15	-	-	-
G18	-	-	G18– S15	G18– S15	-	-
G19	-	-	G19– S15	-	-	-
G20	-	-	G20– S15	G20– S15	-	-
G21	-	-	G21– S15	G21– S15	-	-
G22	-	-	G22– S15	-	-	-
G23	-	-	G23– S15	G23– S15	-	-
G24	-	-	G24– S15	-	-	-
G26	-	-	G26– S15	-	-	-
G27	-	-	G27– S15	-	-	-
G28	-	-	G28– S15	-	-	-
G29	-	-	G29– S15	-	-	-
G30	-	-	G30/G31– S15	-	-	-
QUANTIDADE	12	5	23	8	2	1

- Não houve coleta dos frutos

TABELA 0.2 – Amostras de polpas do açaí comerciais obtidas na cidade de Belém – PA.

COMERCIAIS							
PONTOS DE VENDA	CÓDIGO AMOSTRA	SAFRA 2014 (07 -12/2014)	ENTRESSAFRA 2015 (01 - 06/2015)	SAFRA 2015 (07 -12/2015)	ENTRESSAFRA 2016 (01 - 06/2016)	SAFRA 2016 (07 - 12/2016)	ENTRESSAFRA 2017 (01-06/2017)
1	CAP	CAP-S14	CAP-E15	CAP-S15	#	#	#
2	CPA	CPA-S14	CPA-E15	CPA-S15	CPA-E16	CPA-S16	CPA-E17
3	CAU	CAU-S14	CAU-E15	CAU-S15	CAU-E16	CAU-S16	CAU-E17
4	CBA	CBA-S14	CBA-E15	CBA-S15	CBA-E16	CBA-S16	CBA-E17
5	CAF	CAF-S14	CAF-E15	CAF-S15	CAF-E16	CAF-S16	CAF-E17
6	CADC	CAC-S14	CADC-E15	CADC-S15	#	#	#
7	CA25	CA25-S14	CA25-E15	CA25-S15	CA25-E16	CA25-S16	CA25-E17
8	CFA	CFA-S14	CFA-E15	CFA-S15	CFA-E16	CFA-S16	CFA-E17
9	CAI	CAI-S14	CAI-E15	CAI-S15	CAL-E16	CAL-S16	CAI-E17
10	CAL	CAL-S14	CAL-E15	CAL-S15	CAI-E16	CAI-S16	CAL-E17
11	CANM*	-	-	-	CANM-E16	CANM-S16	CANM-E17
12	CPOA*	-	-	-	CPOA-E16	CPOA-S16	CPOA-E17
QUANTIDADE		10	10	10	10	10	10

* Ponto de venda acompanhado a partir da entressafra 2016;

- Polpa congelada não obtida;

Ponto de venda fechado

c) Estudo da degradação (amostras expostas à temperatura ambiente e luz)

Quinhentos (500) gramas de polpa de açaí congelada obtida no comércio local da cidade de Belém no ponto de venda CPOA no período da entressafra de 2016 (jan-jun) foram levados para o Laboratório de Agroindústria localizado da CPATU dentro de uma (1) hora entre a coleta e o transporte. A polpa de açaí foi dividida em três (3) recipientes, a primeira parte foi liofilizada assim que chegou ao laboratório e armazenada em refrigerador a -18°C . A segunda e terceira partes ficaram expostas em condições ambientes sob temperatura ($26,3^{\circ}\text{C}$, em média) e luminosidade local por 6 e 12 horas respectivamente e, então foram liofilizadas e armazenadas em refrigerador a -18°C . As três (3) amostras liofilizadas foram encaminhadas ao Laboratório de Ressonância Magnética da UFSCar – São Carlos.

3.2. Preparo das amostras do açaí liofilizadas

a) *Fingerprint profile* por RMN (amostras comerciais e de genótipos do açaí)

A fim de obter um extrato com a maior representatividade dos compostos orgânicos presentes na polpa do açaí, foram realizados diversos experimentos para o desenvolvimento do protocolo de preparo das amostras. Foram avaliados vários parâmetros como massa da amostra; volume de solvente; tipo de solvente deuterado; tempo de extração; temperatura durante a extração; concentração da referência interna; uso de tampão; tempo de sonicação (banho de ultrassom); tempo de centrifugação; filtragem; extração em agitação contínua; estabilidade da amostra preparada e análise da repetibilidade do preparo da amostra e do equipamento de RMN. Ao finalizar os vários experimentos, obtiveram-se as melhores condições para o protocolo do preparo das amostras de polpas do açaí para obtenção de *fingerprint* por RMN de ^1H . As amostras foram preparadas em quintuplicata utilizando 60 mg da polpa do açaí liofilizada em 1000 μL de metanol deuterado ($\text{MeOH-}d_4$) contendo 0,02% de 2,2,3,3- D_4 -trimetilsililpropionato de sódio ($\text{TMSP-}d_4$). A solução foi agitada em *vortex* (Biomixer QL-901) por dez (10) segundos e armazenadas sob refrigeração a 17°C durante 24 horas (em repouso e ao abrigo da luz). Após esse período, os frascos

tipo *Eppendorff* (2 mL) foram agitados por 5 (cinco) minutos em banho de ultrassom (Unique UltraCleaner750) seguido de centrifugação (Eppendorf MiniSpin Plus) por dez (10) minutos com 10.000 rpm. 600 µL da parte sobrenadante foram transferidos para tudo de RMN (Bruker™ 178 mm, Ø 5 mm) submetidos às análises de RMN. O metanol (D, 99,8%) foi adquirido da Aldrich™, Acros™ e Deutero™ e o 2,2,3,3-D₄-trimetilsililpropionato de sódio (TMSP-*d*₄) da Cambridge Isotope Laboratories (Lote I-18625, USA) usado como referência interna.

b) Caracterização dos compostos (amostras comerciais e dos genótipos do açaí)

As amostras de polpas do açaí comerciais (Belém – PA) e de genótipos (Embrapa Amazônia Oriental) foram selecionadas para estudo por RMN 1D e 2D com base na comparação do perfil obtido por RMN de ¹H (Item 4) e medidas físico-químicas (descritos no Capítulo 3). As que apresentaram maiores variações estão descritas na Tabela 2.3.

TABELA 0.3 – Polpas do açaí selecionadas para estudo por RMN 1D e 2D.

ORIGEM	TIPO	CÓDIGO DAS AMOSTRAS
EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL (Belém – PA)	Genótipo	G4
	Genótipo	G6
	Genótipo	G9
Comércio local (Belém – PA)	Comercial	CA25
	Comercial	CPA
	Comercial	CFA
	Comercial	CAU
	Comercial	CAF
	Comercial	CPOA

Para a realização dos experimentos de RMN 1D e 2D foram pesados 60 mg da polpa do açaí liofilizada em 1000 µL de metanol deuterado (MeOH-*d*₄) contendo 0,02% de 2,2,3,3-D₄-trimetilsililpropionato de sódio (TMSP-*d*₄). A solução foi agitada em *vortex* por 10 segundos e 5 minutos em banho de ultrassom seguido de centrifugação por 10 minutos (13.000 rpm). 600 µL da parte sobrenadante foram transferidos para tudo de RMN com 5 mm de diâmetro e submetidos às análises de RMN.

3.3. Aquisição dos experimentos de RMN

a) *Fingerprint profile* por RMN (amostras comerciais e dos genótipos do açaí)

Todos os experimentos de RMN de ^1H foram realizados em um espectrômetro Bruker AVANCE III 9,4 Tesla (400 MHz para frequência do hidrogênio e 100 MHz para ^{13}C) com sonda de detecção inversa de 5 mm equipada com gradiente de campo no eixo z, ATMA[®] (*Automatic Tuning MAtching*) e amostrador automático *SampleXpress*[®], localizado no Laboratório de RMN do Departamento de Química da UFSCar, São Carlos – SP. As sequências de pulso zgpr, zgcpr, noesypr1D e noesygpr1D (denominação Bruker) e seus parâmetros foram avaliados para a obtenção dos espectros de RMN de ^1H do extrato metanólico das polpas do açaí. Os melhores resultados são descritos na Tabela 2.4.

TABELA 0.4 – Parâmetros de aquisição e processamento dos espectros de RMN de ^1H usados para obtenção de *fingerprint* das polpas do açaí liofilizadas.

PARÂMETROS	RMN DE ^1H
Sequência de pulso (denominação Bruker)	noesygpr1D*
Tempo de aquisição (AQ)	3,98 s
Tempo de espera entre cada aquisição (d1)	4 s
Número de promediações (ns)	64
Largura do pulso (p1)	8.80 μs (90°)
Tempo de mistura (d8)	10 ms
Atenuação da potência para saturação do sinal do HDO (PI9)	55 dB
Ganho do receptor (RG)	101
Janela espectral (SW)	20 ppm
Número de pontos digitalizados TD (F1)	65.536
Número de pontos usados no processamento (SI)	65.536
Fator de multiplicação exponencial (LB)	0,3 Hz
Temperatura	300 K

* Sequência de pulso com pré-saturação do sinal da água do solvente (HOD).

A calibração da temperatura da sonda do equipamento foi realizada com amostra padrão de metanol- d_4 99.8% e a verificação das condições do espectrômetro de RMN foram realizadas antes de cada conjunto de análises. O processamento dos dados de RMN de ^1H foi executado automaticamente em cada espectro realizando o ajuste da fase, linha de base e calibração pelo sinal da referência interna em 0,0 ppm pelo programa TopSpin 3.1 (Bruker *BioSpin* GmbH, Alemanha).

b) Caracterização dos compostos (amostras comerciais e de genótipos do açaí)

Para os experimentos de identificação dos compostos orgânicos presentes nas polpas do açaí liofilizadas do estudo de degradação, alguns parâmetros de aquisição dos espectros de RMN de ^1H foram ajustados para cada amostra como janela espectral, largura do pulso de 90° , número de varredura e ganho do receptor. Os experimentos 2D COSY foram realizados no modo de aquisição QF; os 2D ^1H - ^{13}C HSQC foram realizados no modo *echo-antiecho phase-selective* e os 2D ^1H - ^{13}C HMBC foram realizados com modo QF de aquisição. Outros parâmetros de aquisição e processamento utilizados nos experimentos bidimensionais podem ser verificados na Tabela 2.5.

TABELA 0.5 – Parâmetros de aquisição e processamento utilizados nos espectros de RMN 2D usados para identificação dos compostos orgânicos presentes nas polpas do açaí liofilizadas.

PARÂMETROS	COSY	TOCSY	HSQC [#]	HMBC [^]
Sequência de pulso (denominação Bruker)	cosygpprpf	mlevphpr	hsqcetgpprsisp2.2	hmbcgpplpndqf
AQ	0,22 (F2) 0,14 (F1)	0,34 (F2) 0,02 (F1)	0,22 (F2) 0,14 (F1)	0,22 (F2) 0,0035 (F1)
d1	1,0 s	1,0 s	1,0 s	1,0 s
ns	16	8	32	128
p1	cal. $^1\text{H}^*$	cal. $^1\text{H}^*$	cal. $^1\text{H}^*$	cal. $^1\text{H}^*$
PL9	45.77 dB	45.77dB	45.77 dB	45.77 dB
RG	2050	2050	2050	2050
SW (F2)	15 ppm	15 ppm	15 ppm	15 ppm
SW (F1)	15 ppm	15 ppm	238 ppm	238 ppm
TD (F2)	4098	4098	4098	4098
TD (F1)	256	256	256	256
SI (F2)	1024	1024	4098	4098
SI (F1)	1024	1024	1024	1024

* Valor calibrado no experimento de RMN de ^1H para cada amostra. #Constante de acoplamento ^1H - ^{13}C de 145 Hz; ^ Constante de acoplamento ^1H - ^{13}C foi 145 Hz e Constante de acoplamento ^1H - ^{13}C (J^2 - J^3) de 8 Hz.

O processamento dos dados de RMN de ^1H e os 2D foi executado em cada espectro realizando o ajuste da linha de base (para os de ^1H), ajuste da fase, calibração do espectro pelo sinal da referência interna em 0,0 ppm e aplicado *lb (line broadening)* de 0.3 Hz em F1 e 1.0 Hz em F2 através do programa *TopSpin* da BrukerTM.

c) Estudo da degradação (amostras expostas à temperatura e luz)

Os experimentos 1D foram realizados da mesma forma que no item a). O experimento 2D ^1H - ^1H JRES no modo de aquisição QF foi obtido com a sequência de pulso jresgpprqf (denominação Bruker) e teve as seguintes configurações: número de promediações de 4; pulso de 90 de 8.76 μs ; pontos de dados de 8 K em F2 e 40 em F1; potência de pré-saturação PL9= 50.20 dB; largura espectral de 15 (F2) e 0.19 (F1) ppm; tempo de espera (*delay*) de 2 s e tempo de mistura (*mixing time*) de 0,01 s e *dummy scan* de 16 s. Os demais experimentos de RMN 2D foram realizados da mesma forma que no item b). Os espectros foram processados com o programa TopSpin 3.1 (Bruker *BioSpin* GmbH, Alemanha).

3.4. Caracterização dos compostos

Para a identificação dos compostos orgânicos presentes nas polpas do açaí foram utilizados: os experimentos de RMN de ^1H , os experimentos bidimensionais de correlação homonuclear ^1H - ^1H (COSY e TOCSY) e heteronuclear ^1H - ^{13}C (HSQC e HMBC); os dados publicados para padrões de referência em bases de dados como HMDB (*Human Metabolome Database*), BMRB (*Biological Magnetic Resonance Data Bank*), YMDB (*Yeast Metabolome Data Base*), SDBS (*Spectral Database for Organic Compounds*) e NMR *Shift Data Base*; sugestões utilizando o programa AMIX[®] versão 3.9.14 da Bruker[®] disponibilizado pelo Laboratório de RMN da UFSCar - São Carlos e ampla comparação com a literatura (SCHAUSS, et al., 2006a; NASCIMENTO et al., 2008; MANTOVANI et al., 2003; SHUMILINA et al., 2015; TOMITA et al., 2017; GOTTLIEB et al., 1997; CARPINELLI et al., 1984; VAN DER REST et al., 2002; CARPINELLI et al., 1984; MERCHANT & GLONEK, 1990; BARISON et al., 2010).

3.5. Análises quimiométricas

As análises por componentes principais (PCA) foram desenvolvidas utilizando o programa Amix[®] 3.9.14 (Bruker BioSpin, GmbH) disponível no laboratório de RMN da UFSCar – São Carlos. Para a construção da matriz de dados, os espectros de RMN de ^1H foram subdivididos em intervalos formados com largura espectral fixa

(0,04 ppm, por exemplo) ou largura com tamanho variável. Esses intervalos geram uma única variável e são denominados *bucket*.

Os *buckets* foram integrados pela intensidade positiva e o pré-tratamento das variáveis foram realizados com os dados centrados na média ou escalonados. Para todas as análises foi utilizado 95% de intervalo de confiança. Foram selecionadas as regiões espectrais entre 0,67 e 11,5 ppm, com exclusão de supressão dos hidrogênios relativos ao HOD (δ 4,92 - 4,73), sinal do solvente MeOH- d_4 (δ 3,27 - 3,30) e regiões contendo apenas ruído (Figura 2.3).

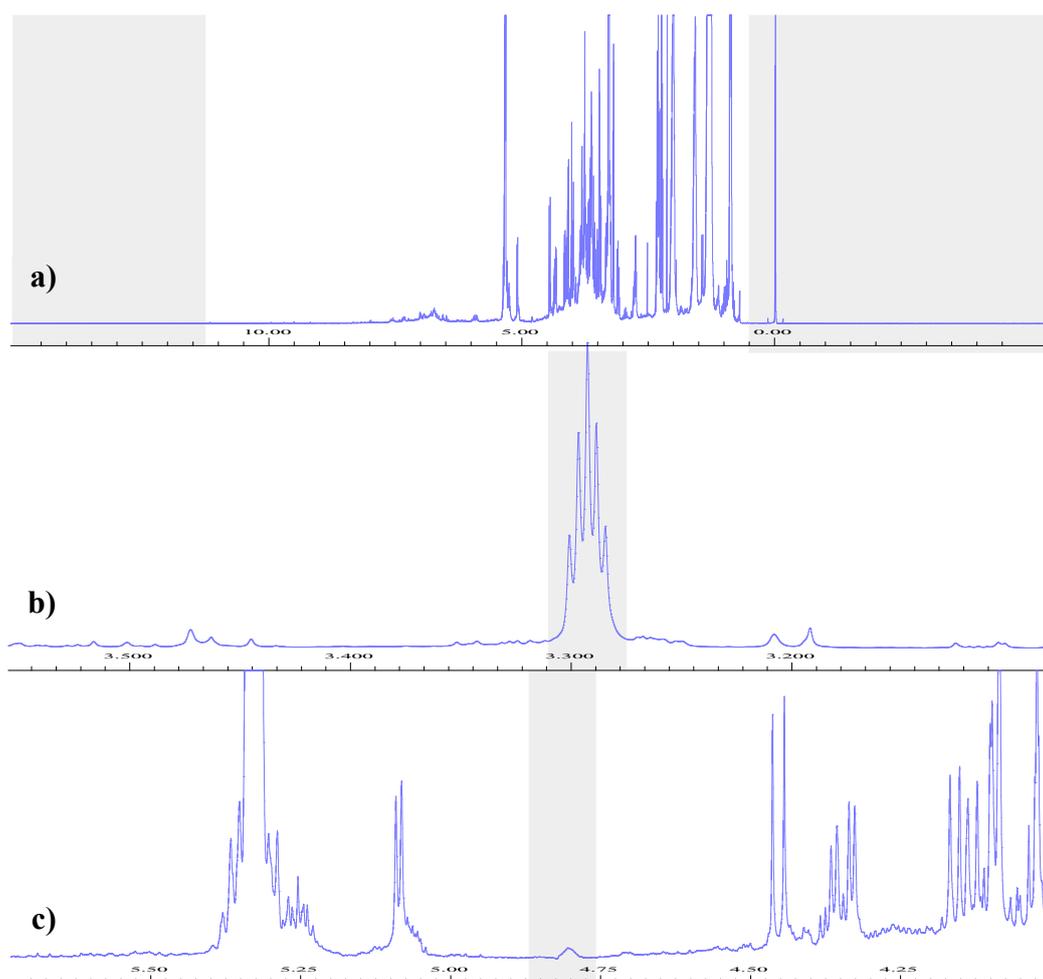


FIGURA 0.3 - Regiões do espectro de RMN de ¹H de uma amostra de açaí utilizada nas análises de quimiometria. (a) exclusão da região sem sinal da amostra (b) do sinal do solvente MeOH-*d*₄ (c) pré-saturação do sinal do HDO do solvente (faixa na cor cinza).

A análise multivariada dos dados de RMN de ¹H foi realizada através de Análise de Componentes Principais (PCA) criando o banco de dados com as *bucket tables* para os estudos com todas as amostras (comercial e genótipo) e, as matrizes isoladamente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Caracterização dos compostos majoritários por RMN 1D e 2D

Na Figura 2.4, pode-se verificar o espectro de RMN de ^1H para uma amostra da polpa do açaí liofilizada comercial e uma do genótipo (espectros na mesma escala e escolhidos aleatoriamente). É possível observar sinais de vários compostos presentes nas regiões espectrais de hidrogênios alifáticos (δ 0,0 - 3,0), carboidratos (δ 3,0 - 5,5) e aromáticos (δ 6,0 - 8,5), o que caracteriza a polpa do açaí como uma amostra complexa.

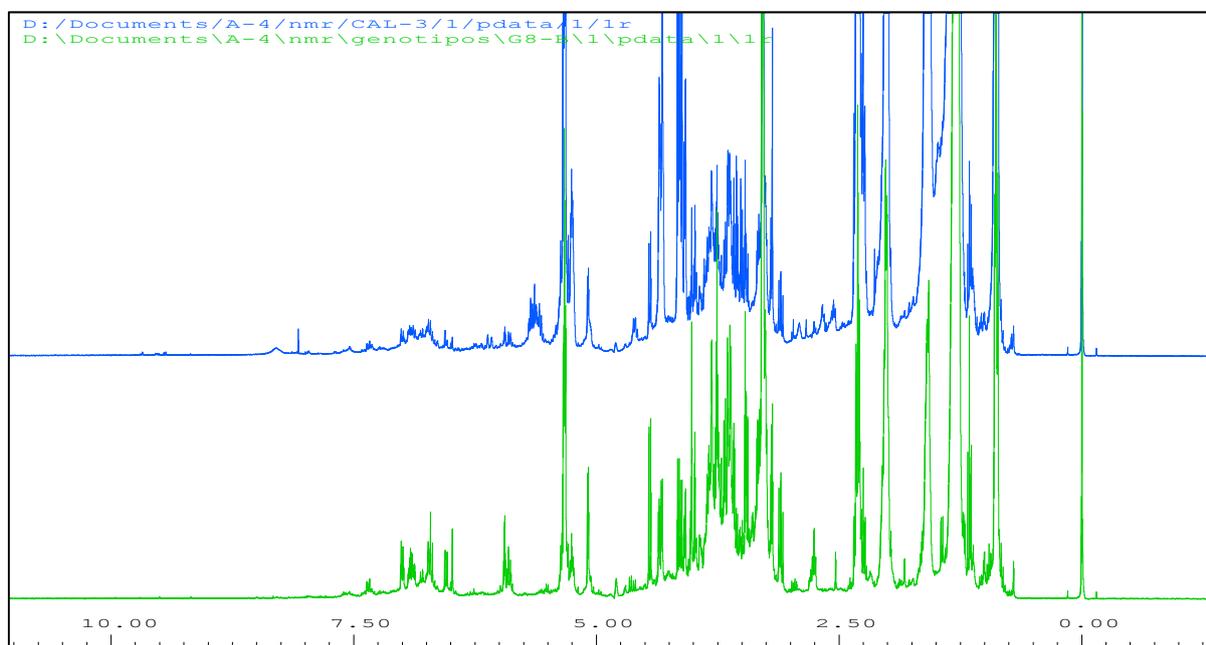


FIGURA 0.4 - Espectros de RMN de ^1H da polpa do açaí liofilizada comercial (azul) e genótipo (verde). $\text{MeOH-}d_4$ em um 400 MHz.

É possível verificar nos espectros de RMN de ^1H que os sinais na região de hidrogênios alifáticos estão mais intensos e, essa informação corrobora com a literatura, no qual são descritos uma grande quantidade de lipídios principalmente ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poucos poli-insaturados (GORDON et al., 2012; NASCIMENTO et al., 2008; SCHAUSS et al., 2006a).

Tendo em vista que a identificação de todos os compostos presentes do extrato do açaí é muito complexa devido a grande sobreposição de sinais e dificuldade na verificação das multiplicidades e/ou ausência das correlações $^1\text{H-}^1\text{H}$ e $^1\text{H-}^{13}\text{C}$, esse

trabalho abordou os compostos que estão em maior concentração ou apresentaram maior clareza espectral. Desta forma, foi possível identificar 30 compostos orgânicos presentes nas amostras de polpas do açaí liofilizado, os quais são detalhados na Tabela 2.6 e estão ilustrados na Figura 2.5.

TABELA 0.6 - Compostos orgânicos identificados nas polpas do açaí liofilizado comercial e genótipo.

n°	Composto	Hidrogênio	δ ¹ H em ppm (multiplicidade [#] , J em Hz)	COSY (δ ¹ H ppm)	HSQC (δ ¹³ C ppm)	HMBC (δ ¹³ C ppm)
Aminoácidos						
1	Leucina (Leu)	2	3,71 (m)	1,70	56,30	-
		5	0,98 (m)	1,70	24,5	42,1
2	Serina (Ser)	2	3,81*(m)	-	58,60	-
		3	3,96 (m)	-	-	-
3	Ácido glutâmico (Glu)	2	3,73* (m)	2,10	58,50	178,20
		3a	2,0* (m)	-	30,14	177,6; 36,7
		3b	2,10 (m)	2,33; 3,76	30,14	36,7
		4	2,33* (m)	2,10	36,75	30,14; 182,8
4	Valina (Val)	2	3,56	2,22	62,84	-
		3-CH ₃	0,96 (d, 7,0)	-	19,66	31,22
		4	1,04* (d, 7,0)	-	21,28	19,66
5	Alanina (Ala)	2	3,60 (q, 7,15)	1,44	53,5	-
		3	1,44 (d, 7,15)	3,58	-	53,5; 177,7
6	Fenilalanina (Phe)	2'	7,31	7,44	129,0	-
Carboidratos						
7	α -glicose (α -gli)	1	5,08 (d, 3,75)	3,34; 3,62; 3,70;	94,0	73,2; 70,8
		2	3,34 dd* (9,6; 3,75)	5,08	74,1	70,1
		3	3,62 (m)	5,08	71,80	75,0
		4	3,62 (m)	3,65; 3,70;	74,71	-
		5	3,65 (m)	3,62; 3,70;	74,71	-
8	β -glicose (β -gli)	1	4,45 (d, 7,80)	3,12	98,7	-
		2	3,12* dd (7,80, 9,20)	4,45; 3,34	76,6	74,0
9	Frutose (Fru)	1	3,58 (m)	-	66,2	-
		4	3,99 (m)	3,68	72,4	-
		5	4,02 (m)	3,68	-	72,4
		6a	3,68 (m)	3,84; 3,99; 4,02	65,0	72,4

Continuação TABELA 2.6

Compostos Lipossolúveis**							
10	Ésteres de ácidos graxos totais (AG)	F	0,88 (m)	1,28	16,3	-	
		G	1,28 (m)	0,88; 1,59; 2,01;	26,0; 32,4	27,8	
		D	1,59 (m)	1,27; 1,31; 2,32	27,8	30,7; 32,4; 172,0	
		B	2,30 (dt, 7,40)	1,59	36,8	27,8; 172,0	
		E	0,97 t (7,45)	-	16,3	-	
11	Ésteres de ácidos graxos insaturados (AGI)	C	2,01 (m)	1,28; 2,30; 5,35	30,7	30,7	
		A	2,76 (m)	5,35	25,2	128,0	
		H	5,35 (m)	2,76; 2,01	132,8	26,0	
		β	5,25 (m)	4,14; 4,34	68,8	61,2; 174,1	
12	Glicerídeo (-CHO-)	α	4,14dd (6,20;11,85)	5,25	61,61; 68,22	70,4; 172,7	
	Glicerídeo (-CH ₂ O-)		4,34 dd (4,40; 11,85)				
13	Demais acila grupos	-	1,01 m	1,95	21,8	40,6; 53,3	
14	(-CH ₃)	-	0,7 – 0,85 m	1,32; 1,65; 1,76	16,3	40,3; 49,8; 59,1	
	Demais gliceril grupos	-CH-O-CO- R	5,03 – 5,07				
	Demais acila grupo (α carbonila)	-OCO-CH ₂ - CH ₂ -	2,23 t (7,5)				
	Demais acila grupo	=CH-CH ₂ - CH=	2,79-2,82				
Ácidos orgânicos							
15	Ácido fórmico (AF)	2	8,52 (s)	-	-	-	
16	Ácido acético (Ace)	2	1,96 (s)	-	-	177,3	
17	Ácido ascórbico (Vit,C)	1'	3,84* (m)	4,71; 3,66; 3,69	-	73,3	
		2'	3,67 – 3,69 (m)	3,84	64,4	-	
18	Ácido aminobutírico (GABA)	γ- 2	1,87 (m)	2,35; 2,95	26,36	-	
		4	2,95 (t, 7,20)	1,87	42,30	-	
19	Ácido succínico (Suc)	2,3	2,53 (s)	-	33,60	33,60	

Continuação TABELA 2.6

Outros							
20	Metanol (MeOH)	1	3,33 (s)	-	-	-	
21	Graxa silicone	-	0,14 (s)	-	-	-	
22	Etanol (EtOH)	2	1,16 (t, 7,0)	3,65	19,80	-	
23	Acetona (Ac)	1,3	2,14 (s)	-	30,86	-	
24	Acetonitrila	2	2,07 (s)	-	-	-	
25	Colina (Col)	N-(CH ₃) ₃	3,19 (s)	-	54,81	71,4	
26	Glicerofosfocolina (GPC)	N-(CH ₃) ₃	3,20 (s)	-	54,70	69,4	
27	5-hidroxiacetilfurfural (5-HMF)	3	7,41 (m)	6,56	-	-	
28	2,3-butano-diol (meso) ^{***}	1	1,12 d (6,30)	3,54; 3,72	20,56	74,3	
29	(2R, 3R)-butano-2,3-diol ^{***}	1	1,10 d (6,20)	3,50; 3,73	20,65	-	
30	Ácido hidroxifenilacético	p-	3	6,80 (d; 8,5)	7,12	118,5	-
			2	7,12 (d; 8,5)	6,80	133,7	-
31	Uracila		5	5,57 (d, 8,0)	8,00	-	-
			6	7,98 (d, 8,0)	5,57	-	-

#s: simpleto; sl: simpleto largo; d: duplete; t: tripleto; q: quadruplete; dd: duplo duplete; dt: duplo tripleto; m: multiplete. * Sinal sobreposto; ** Compostos confirmados nas análises da Parte IV deste trabalho. *** Compostos confirmados nas análises do Item 4.4 deste trabalho.

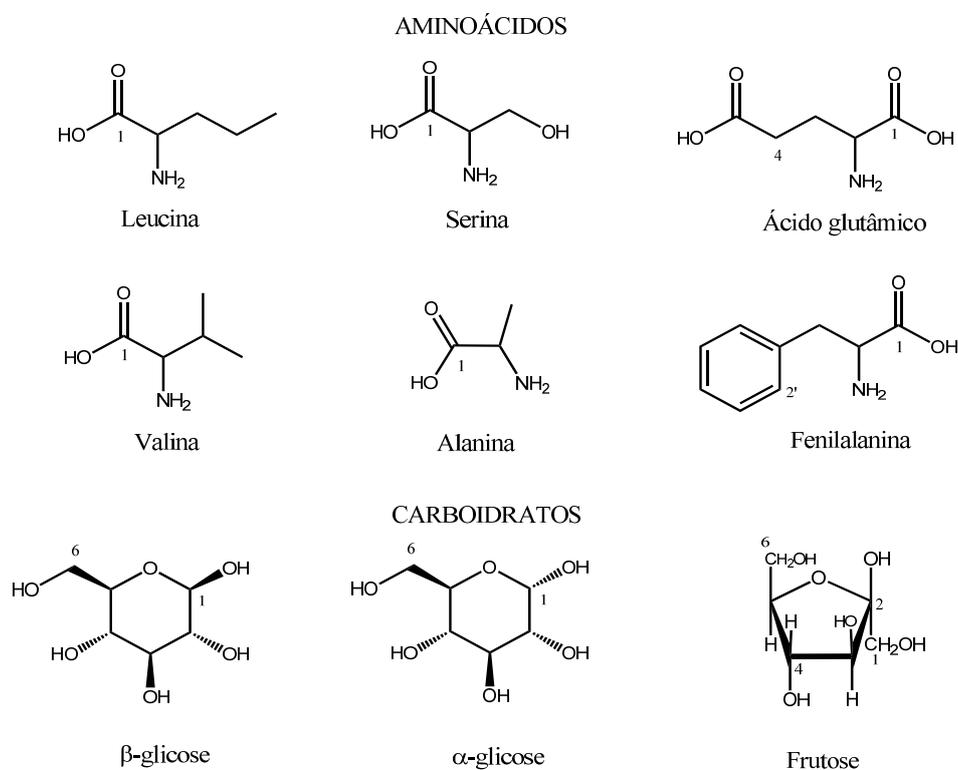
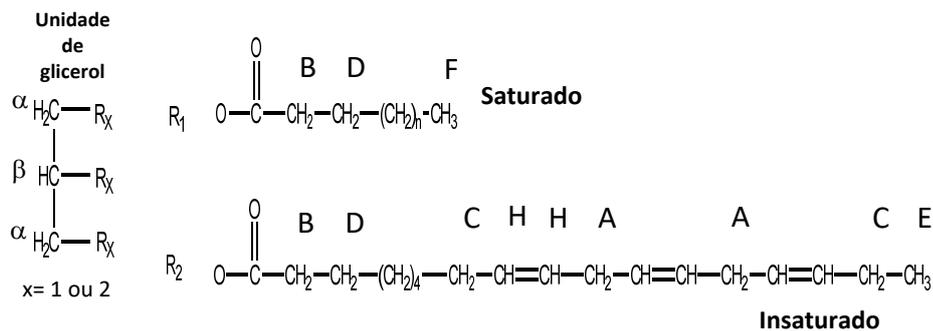
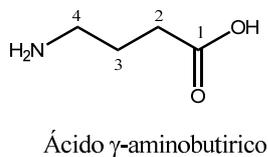
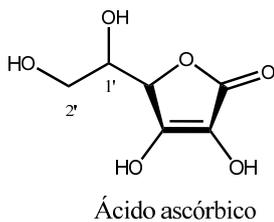


FIGURA 0.5 - Compostos identificados nos extratos metanólicos das polpas do açaí comercial e de genótipo por RMN 1D e 2D.

COMPOSTOS LIPÍDICOS



ÁCIDOS ORGÂNICOS



OUTROS COMPOSTOS

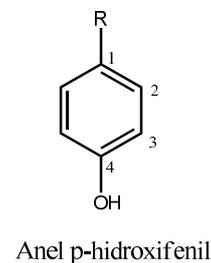
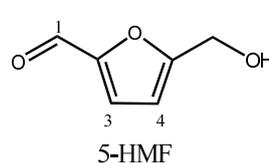
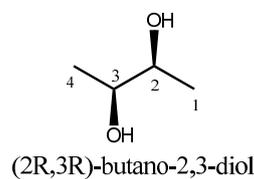
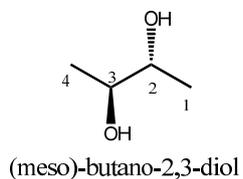
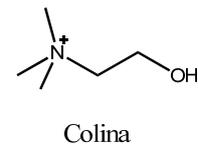
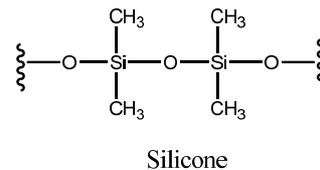
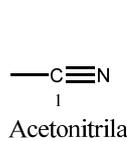
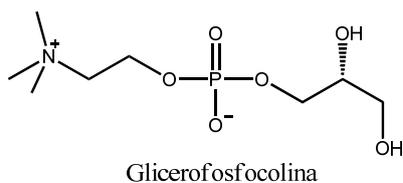


FIGURA 0.5 – Continuação compostos identificados nos extratos metanólicos das polpas do açaí comercial e de genótipo por RMN 1D e 2D.

Nas figuras 2.6 e 2.7, é possível verificar as ampliações de um espectro de RMN de COSY e o espectro de HSQC de uma amostra da polpa do açaí comercial (CAU). As correlações verificadas dos compostos estão indicadas com números referentes aos compostos.

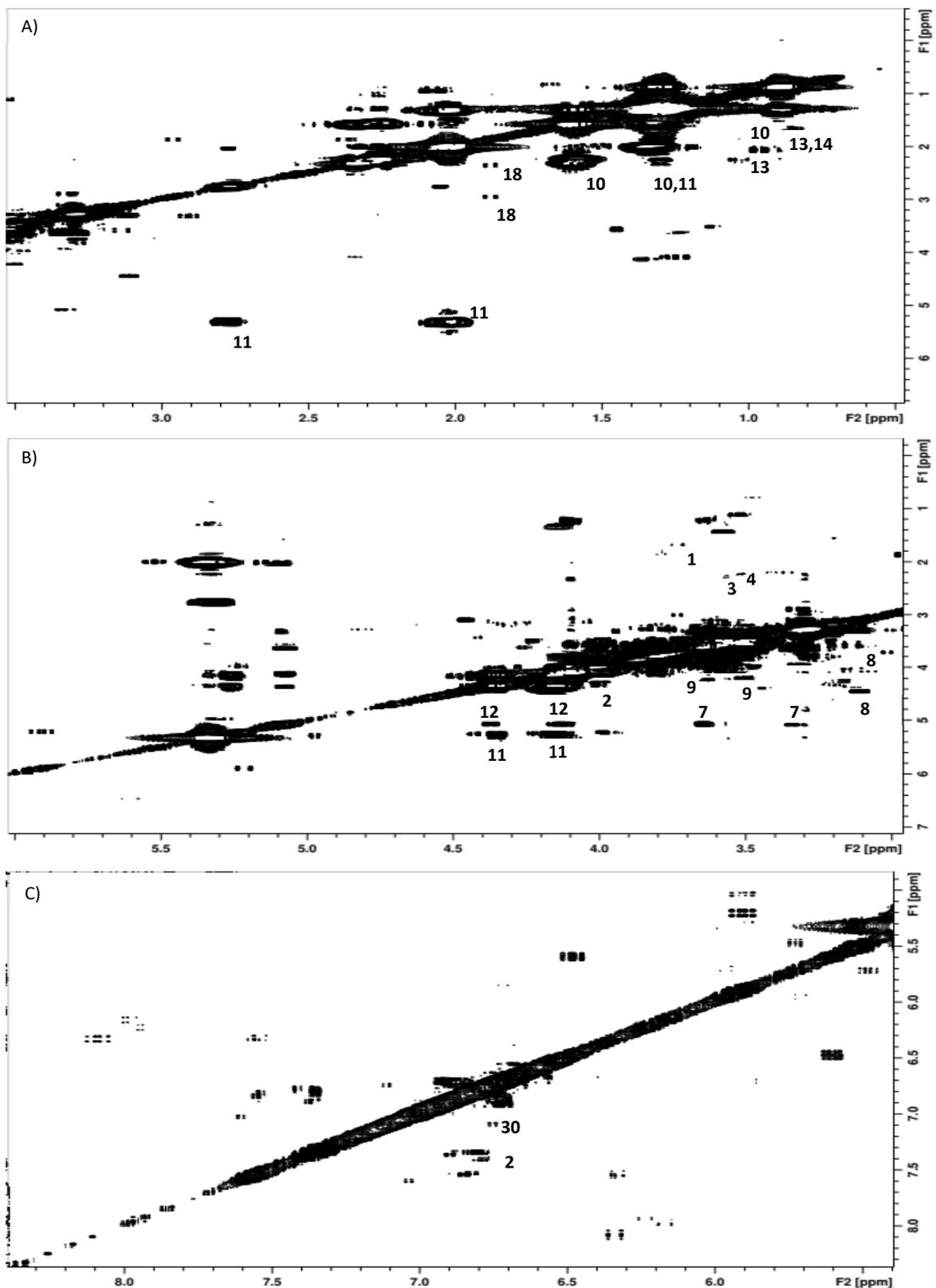


FIGURA 0.6 - Mapa de contorno COSY de uma polpa comercial de açai com ampliações. MeOH-d₄ em um 400 MHz. A) região de 0,50 a 3,5; B) 3,0 a 6,0 e C) 5,4 a 8,40. Compostos: 1, leu; 2, ser; 3, glu; 4, val; 7, α -gli; 8, β -gli; 9, fru; 18, GABA; 10, AG; 11, AGI; 12, glicerideo; 13, metilas; 14, acilas; 30, Ác. *p*-hfa.

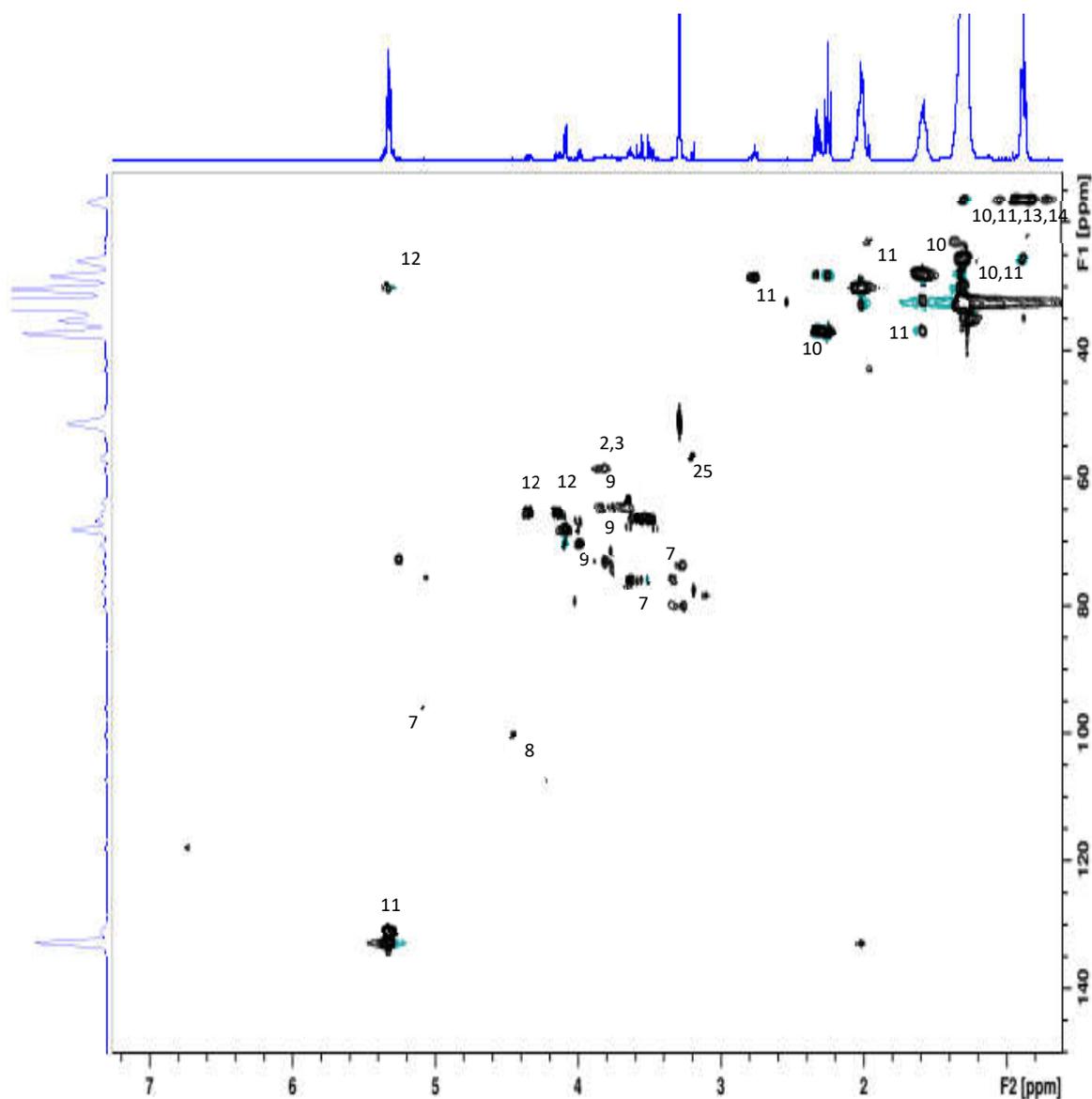


FIGURA 0.7 - Mapa de contorno HSQC de uma polpa comercial do açaí com atribuições de alguns compostos identificados. MeOH-d₄ em um 400 MHz. Compostos: 2, ser; 3, val; 7, α-gli; 8, β-gli; 9, fru; 10, AG; 11, AGI; 12, glicerídeo; 13, metilas; 14, grupos acilas.

Com as análises por RMN 1D e 2D foi possível verificar que a polpa do açaí possui grande quantidade de compostos lipídicos, seguido de carboidratos, aminoácidos e então compostos fenólicos.

Na Figura 2.8, pode-se verificar um espectro de RMN de ¹H com atribuições dos compostos identificados nas amostras de polpas do açaí.

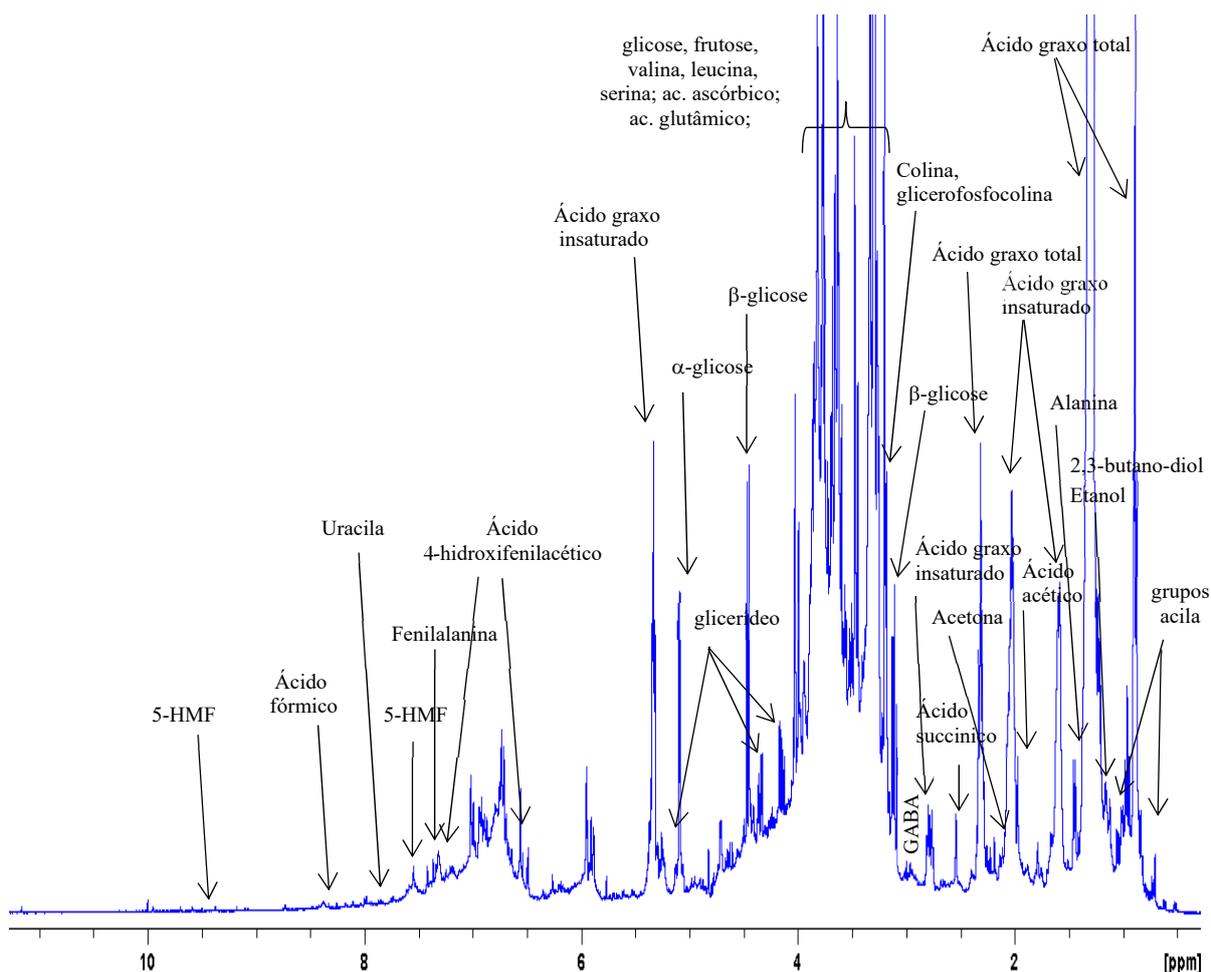


FIGURA 0.8 - Espectro de RMN de ^1H de uma amostra de polpa do açaí liofilizada comercial com atribuições dos compostos caracterizados por RMN 1D e 2D. MeOH-d_4 em um 400 MHz.

As amostras das polpas comerciais e de genótipos do açaí analisadas nesse estudo apresentaram perfis espectrais muito semelhantes, com variações em apenas alguns sinais e na intensidade dos mesmos. Isso mostrou previamente que, embora sejam de origens distintas a maioria dos compostos principais estão presentes em ambas as polpas.

Para algumas amostras comerciais foram verificadas a redução na intensidade de alguns compostos (etanol, glicose, glicerofosfocolina) e o aparecimento de sinais (δ 1,10 e 1,12) que estão relacionados com a degradação da polpa do açaí. Esses sinais foram caracterizados posteriormente no estudo do Tópico 4.4.2 deste trabalho.

Estes compostos orgânicos identificados no extrato metanólico das polpas do açaí serão utilizados no estudo quimiométrico das amostras comerciais e de genótipos descritos no Item 4.3 deste capítulo.

4.2. Detalhes sobre a obtenção das polpas do açaí

a) Genótipos da Embrapa Amazônia Oriental

Um aspecto relevante no desenvolvimento deste trabalho e que causou dificuldades, foi na obtenção da representatividade amostral para as polpas de genótipos do Programa de Melhoramento Genético nos diferentes períodos de coleta (Tabela 2.1).

Sabe-se que o processo de maturação dos frutos do açaizeiro envolve atividade biológica, então não podíamos prever com exatidão a colheita de todos os 31 genótipos nos períodos de coleta acompanhados neste trabalho. Esse processo sofre forte influência climática (fenômenos naturais), do manejo da cultura (roçagens, coroamento e adubação química e/ou orgânica), além de um fator externo ao nosso controle, como foi a ocorrência de furtos dos cachos na cultivar da CPATU (Embrapa Amazônia Oriental) que fica próximos a bairros residenciais da cidade de Belém (PA).

b) Polpas congeladas comerciais

No período da entressafra de 2016, dois pontos de venda (CADC e CAP) das polpas do açaí na cidade de Belém (PA) decretaram falência. Então, outros dois pontos de venda (CANM e CPOA) foram selecionados e acompanhados até o período final do trabalho, mantendo assim os 10 locais de venda da polpa pela vigência do trabalho.

4.3. Análises quimiométricas dos dados de RMN de ^1H

O estudo da análise multivariada dos dados RMN de ^1H foi realizado para correlacionar a concentração dos analitos (intensidade dos sinais) presentes nas amostras das polpas do açaí com a referente faixa espectral, e desta forma obter observações mais seguras.

Para as análises com todos os constituintes químicos (considerando os sinais presente na região de δ 0,67 a 11,5) das polpas comerciais e genótipos do açaí, as *bucket tables* foram montadas com tamanho variavel e geraram 160 variáveis. Da

mesma forma, para as análises considerando apenas os sinais típicos de lipídios (região de δ 0,70 e 5,34) e, os hidrogênios aromáticos e nitrogenados (região de δ 6,00 e 11,5) foram geradas 15 e 142 variáveis, respectivamente. Com as variáveis geradas foram testados diversos processamentos para as análises, no qual as informações serão descritas em cada item.

As variáveis são apresentadas pela faixa de deslocamento químico (ppm) do espectro de RMN de ^1H e, a partir da caracterização realizada com a análise dos experimentos 1D e 2D (Item 4.1), é possível identificar qual o composto orgânico está presente naquela variável. A Análise de Componentes Principais (PCA) foi aplicada em quatro (4) estudos a fim de avaliar tendências em relação ao tipo de cultivo (palmeiras com controle agrônômico x sem controle), melhoramento genético dos frutos do açaí (CPATU), sazonalidade (safra x entressafra) e perfil das amostras comerciais de Belém - PA.

4.3.1. Análise do tipo de cultivo – Genótipos (controle agrônômico) e comerciais (sem controle)

i) Estudos com todos os sinais de RMN de ^1H

Para se ter uma visão geral do comportamento das amostras de polpas do açaí de genótipos do Programa de Melhoramento Genético (PMG) da Embrapa Amazônia Oriental e das polpas comercializadas na cidade de Belém (PA), verificar tendências em relação ao tipo de cultivar e identificar as possíveis variáveis responsáveis pela distinção entre estes dois grupos, realizou-se uma análise exploratória dos dados espectrais de RMN de ^1H por PCA.

As análises foram realizadas com 555 espectros de RMN de ^1H referentes às quintuplicatas amostrais de 60 polpas do açaí comerciais e 51 polpas de genótipos da cultivar da CPATU em todos os períodos de coleta (3 anos) (Figura 2.10).

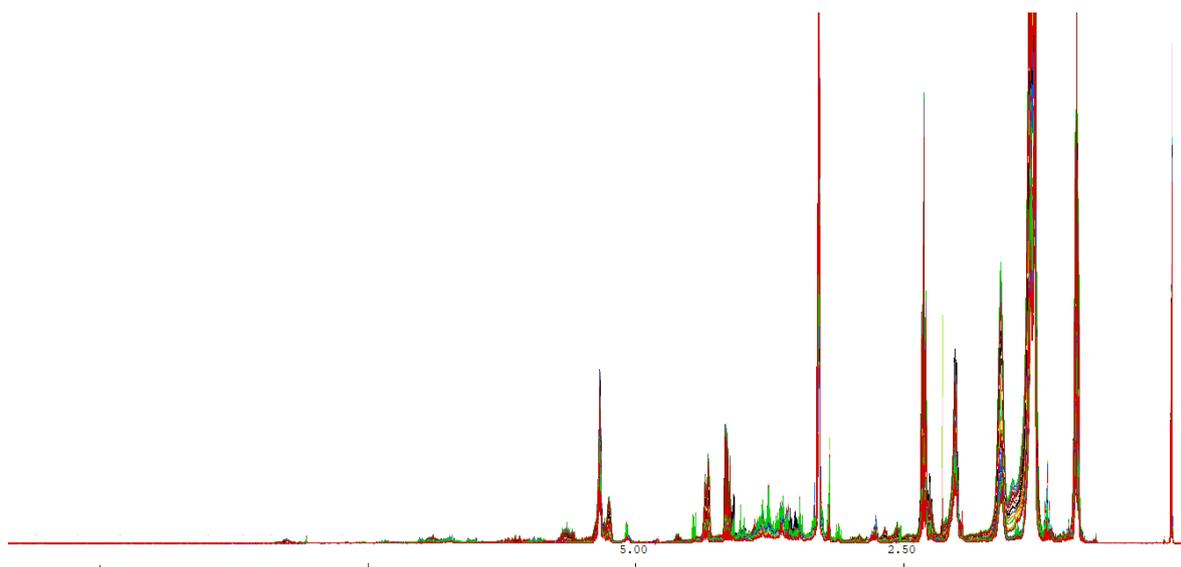


FIGURA 0.9 - Espectros de RMN de ^1H de extratos metanólicos das polpas do açai liofilizadas comerciais e de genótipos. MeOD-d_4 (0,02% TMSP-d_4) em um 400 MHz.

Neste estudo, a matriz de dados foi montada com *bucket tables* com tamanho variável com modo de integração por intensidades positivas e as variáveis geradas foram escalonadas.

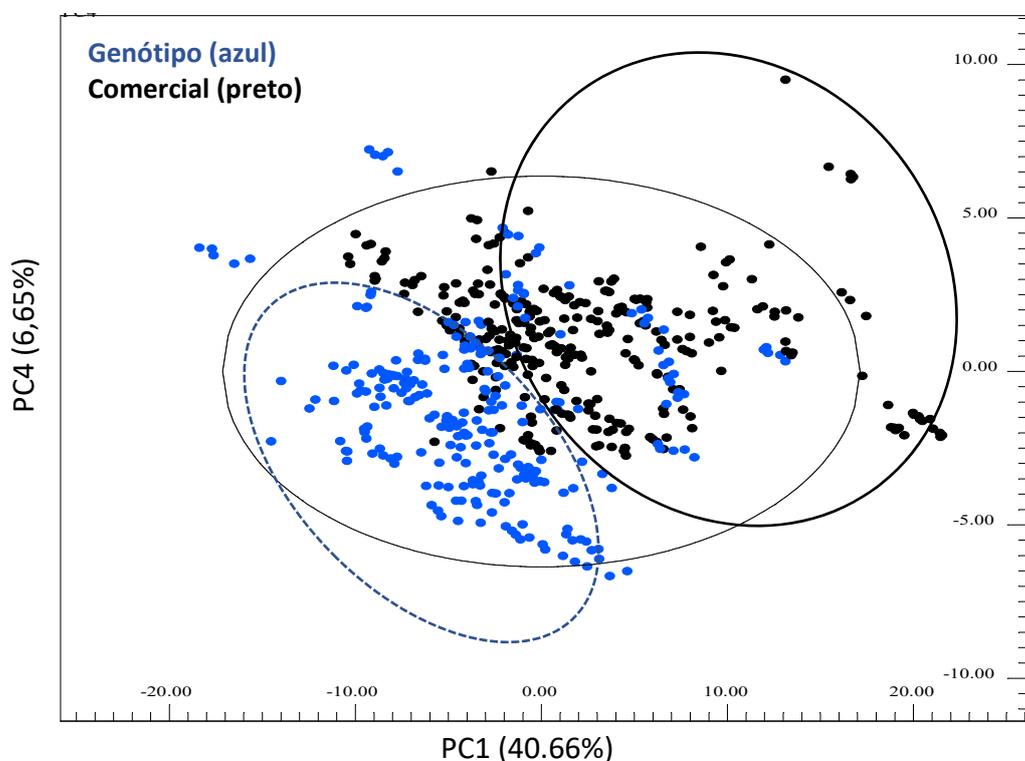


FIGURA 0.10 - Gráfico de escores da PC1 x PC4 para os espectros de RMN de ^1H das polpas do açai de genótipos da CPATU e comerciais de Belém (PA).

No gráfico de escores (Figura 2.10) pode-se verificar um grupo central constituído pelas amostras de genótipos (azul) e comerciais (preto), o que mostra a similaridade do perfil químico por RMN de ^1H destas polpas apesar do diferente tipo de cultivo agrônômico. No entanto, nos eixos da PC1 foi possível verificar uma tendência na separação das amostras sem controle agrônômico (eixo positivo; elipse preta) e das com controle (eixo negativo; elipse azul).

As polpas do açaí de genótipos (azul) da Embrapa Amazônia Oriental avaliadas neste trabalho apresentaram uma menor dispersão no modelo que as amostras comerciais (preto). Essa observação era esperada, pois os frutos do comércio de Belém - PA possivelmente sejam coletados em diferentes locais que podem apresentar solo distintos (baixa várzea, igapó e terra firme) e diferentes condições edafoclimáticas, estágio de maturação, procedimentos de colheita, pós-colheita, processamento, armazenamento, dentre outros fatores que afetam a composição química dos frutos do açaí. Provavelmente, as dispersões verificadas nas amostras dos genótipos estejam relacionadas ao fator genético da espécie *Euterpe oleracea* promovido pelos estudos do Programa de Melhoramento Genético da CPATU e/ou a sazonalidade (CARVALHO et al., 2017; MENEZES et al., 2008; NEVES et al., 2015; SOUSA et al., 2006; ALEXANDRE et al., 2004).

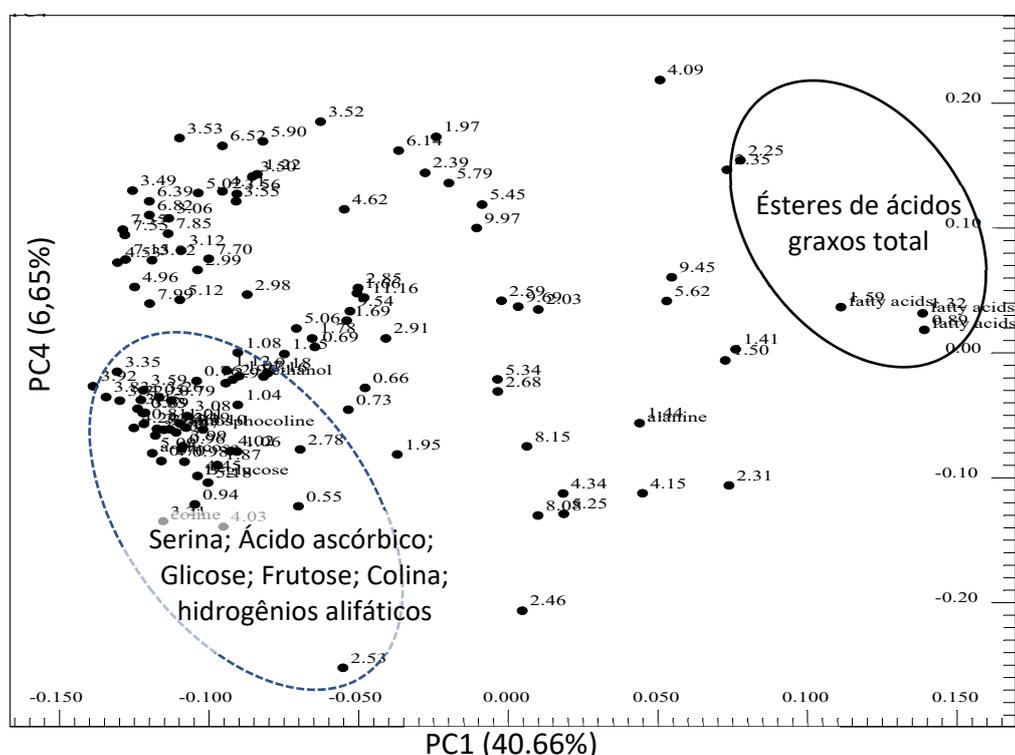


FIGURA 0.11 - Gráfico de pesos (PC1 x PC4) para os espectros de RMN de ^1H das polpas do açaí. Polpas de genótipos da CPATU e comerciais de Belém (PA).

Com o gráfico de pesos na forma de coordenadas (Figura 2.11) foi possível verificar quais foram as variáveis significativas no posicionamento das amostras verificadas no gráfico de escores. As variáveis associadas com as amostras comerciais (sem controle agrônomico) distribuídas na PC1 positiva são características de ésteres com cadeia saturada (δ 0,89; 1,32; 1,60; 2,26; 2,35) e glicerídeos (δ 4,14 e 4,34 e 5,25), no qual podemos sugerir que algumas amostras comerciais possuem maior concentração de triacilgliceróis com cadeias saturadas (TGS) que as amostras de genótipos. Já as variáveis da PC1 negativa que apresentaram sinais de serina, leucina, ácido glutâmico, glicose, frutose, ácido ascórbico, compostos lipídicos (grupos acila) e colina estão relacionados com amostras com controle agrônomico (genótipos).

Os compostos verificados nas polpas estudadas são produtos do metabolismo (primário e secundário) realizado pelas plantas (DEWICK, 2001) e, sabe-se que o tipo de cultivo e condições edafoclimáticas (chuva, temperatura, ventos, umidade relativa do ar, entre outros) interferem diretamente no crescimento, desenvolvimento, metabolismo e na produção dos mesmos (MONTEIRO, 2009; HOOGENBOOM, 2000; HOFFMANN & NACHTIGALL, 2003). Além disso, para o cultivo do açazeiro, boa luminosidade, solos com boa umidade, disponibilidade de nutrientes e baixa acidez propiciam o rápido desenvolvimento das palmeiras e melhor qualidade dos frutos do açáí (NOGUEIRA et al., 1995; OLIVEIRA, CARVALHO & NASCIMENTO, 2000; CARVALHO et al., 2010).

Desta forma, devido aos compostos orgânicos em maior concentração observados em algumas polpas sem controle agrônomico (comerciais), é possível sugerir que estes frutos sejam de palmeiras provenientes de áreas degradadas (igapó, mata, terra firme sem adubação e/ou irrigação) com solo pobre em nutrientes, já que na Embrapa Amazônia Oriental o cultivo das palmeiras do PMG é realizado com roçagem mecanizada, limpeza das plantas, coroamento, adubação química a cada 2 meses (N.P.K 10:28:20) e adubação orgânica a cada 6 meses (esterco bovino curtido), o que fornece um solo rico em nutrientes e que pode ter auxiliado a maior produção de aminoácidos, carboidratos e outros compostos que possuem bom valor nutricional.

ii) Estudos quimiométricos com os sinais de hidrogênios lipídicos do espectro de RMN de ^1H

Como a polpa do açaí é composta majoritariamente por lipídios como ácidos graxos saturados e insaturados (SCHAUSS et al., 2006a; OLIVEIRA, 2000; CARVALHO & NASCIMENTO, 2000; GORDON et al., 2012), realizou-se um estudo dos dados multivariados por PCA para verificar possíveis contribuições dos compostos lipídicos na distinção das amostras do açaí com diferentes tipos de cultivo.

As *bucket table* deste estudo foram montadas com tamanho variável considerando apenas os sinais de compostos lipídicos majoritários do espectro de RMN de ^1H (Figura 2.13) (BARISON et al., 2010 e COLZATO et al., 2008 e WYCOFF et al., 2015; ALONSO-SALCES et al., 2010). As faixas espectrais utilizadas e sua respectiva denominação são informadas na Tabela 2.7.

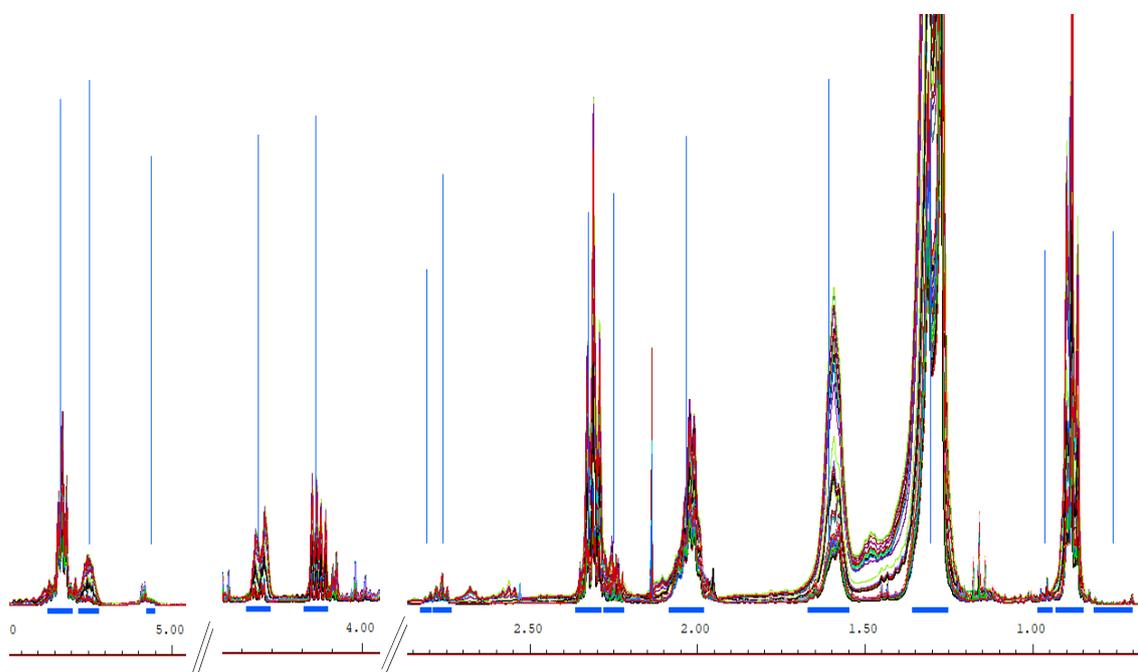


FIGURA 0.12 - Espectro de RMN de ^1H de polpas do açaí com a representação dos intervalos variáveis (sub-linha azul) selecionados para a formação das *bucket table* geradas pelo programa AmixTM.

TABELA 0.7 - Deslocamento químico dos sinais de RMN de ^1H dos compostos lipídicos majoritários das polpas do açaí.

δ (ppm)	Denominação
0,70-0,85	-CH ₃ metilas terminais de todos os ácidos graxos
0,86-0,91	-CH ₃ metilas terminais de todos os ácidos graxos
0,94-0,98	-CH ₃ (ω -3) metila do éster linolenato
1,27-1,32	-(CH ₂) _n - metilénicos de todos os ácidos graxos
1,57-1,62	-OCO-CH ₂ -CH ₂ - metilénicos β olefinicos
1,98-2,05	-CH ₂ -CH=CH- metilénicos α olefinicos
2,21-2,25	-OCO-CH ₂ -CH ₂ - metilénicos α carbonila
2,27-2,34	-OCO-CH ₂ -CH ₂ - metilénicos α carbonila

Continuação TABELA 2.7

δ (ppm)	Denominação	
2,74-2,78	=CH-CH ₂ -CH=	metilênicos entre olefinas dos ácidos graxos
2,79-2,82	=CH-CH ₂ -CH=	metilênicos entre olefinas dos ácidos graxos
4,12-4,16	-CH ₂ -O-CO-R	grupo gliceril do TG* (α carbonila)
4,32-4,36	-CH ₂ -O-CO-R	grupo gliceril do TG* (α carbonila)
5,03-5,07	-CH-O-CO-R	grupo gliceril (β carbonila)
5,23-5,27	-CH-O-CO-R	grupo gliceril (β carbonila)
5,32-5,34	-CH=CH-	metílicos de todos os ácidos graxos insaturados

*TG= triacilgliceróis

A matriz de dados foi composta por 555 espectros (300 comerciais + 250 genótipos) e as *bucket* foram integradas e as variáveis geradas escalonadas considerando 95% de nível de confiança

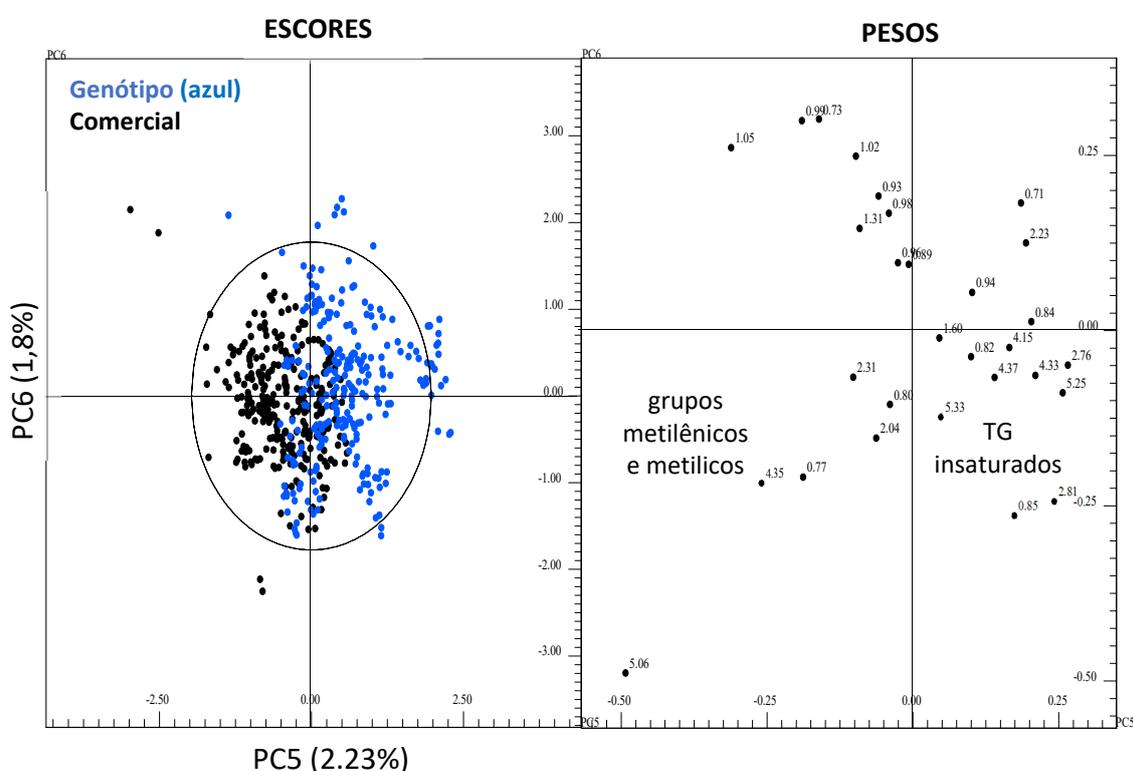


FIGURA 0.13 - Gráfico de escores e pesos da PC5 x PC6 (4,03% variância total) para os espectros de RMN de ¹H das polpas do açaí dos genótipos e comerciais.

Com o gráfico de escores da PC5 x PC6 (Figura 2.13) foi possível verificar uma tendência na distinção de algumas amostras de polpas comerciais (sem controle agrônomo) e de genótipos (com controle agrônomo da CPATU) quando avaliado o perfil lipídico por RMN de ¹H. As variáveis significativas na distribuição de algumas amostras de genótipos pelo eixo positivo da PC5 foram os sinais

característicos de triacilgliceróis com cadeias insaturadas (δ 0,85; 2,23; 2,76; 2,81; 4,15; 4,33; 5,23 e 5,33).

Já no estudo com as *buckets* sem escalonamento (Figura 2.14) foi possível verificar no gráfico de escores da PC1 x PC2, que alguns genótipos (G15-E15 e G20-S15) distribuídos nos quadrantes da PC1 e PC2 positiva destacaram-se dos demais da cultivar pois possuem maior concentração de ácido linolênico (ω -3), verificado no gráfico de pesos.

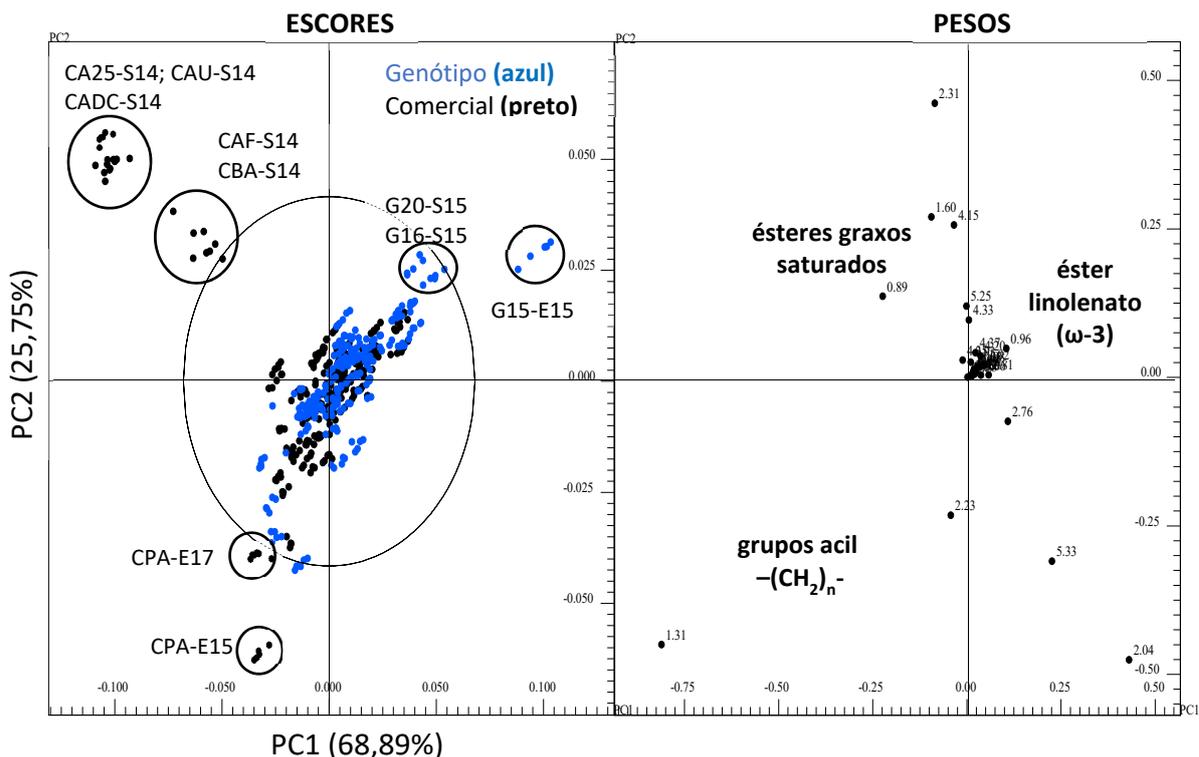


FIGURA 0.14 - Gráfico de escores e pesos da PC1 x PC2 para os espectros de RMN de ^1H das polpas do açaí dos genótipos (“G”) e comerciais (“C”) do açaí avaliadas pelo perfil lipídico.

Algumas amostras comercializadas na entressafra (CPA-E15 e CPA-E17) localizadas no eixo negativo da PC1, apresentaram as variáveis com deslocamento químico em 1,31 e 2,23 ppm como as responsáveis pela distinção. Esses sinais são característicos de hidrogênio do grupo acil (cadeias saturadas). Dois grupos com amostras comerciais obtidas na safra de 2014 (PC2 positiva) foram distintas devido a maior concentração de triacilgliceróis com cadeias saturadas devido as variáveis em δ 0,89; 1,60; 2,31 e 4,15.

Podemos sugerir com essas observações que as palmeiras do açaí que são cultivadas com controle agrônômico em terra firme na CPATU, por ter um solo com tratamento agrônômico e já serem palmeiras selecionadas do estudo de PMG,

provavelmente promovem a maior produção desse tipo de compostos, visto que os lipídios são majoritários no açaí (NOGUEIRA, 2005; OLIVEIRA, 2007; NASCIMENTO et al., 2008; SCHAUSS et al., 2006a; MENEZES et al., 2008).

Os ácidos graxos insaturados, principalmente ômega 3 (ácido linolênico) são importantes para a saúde humana e recomendados para a prevenção e auxílio no tratamento de doenças cardiovasculares, além de possuir atividade anti-inflamatória (ALISSA & FERNS, 2012 e JOHNSTON, 2010). No óleo do açaí, já foi confirmada sua atividade antioxidante *in vivo* (FAVACHO et al., 2011).

iii) Estudos quimiométricos dos sinais de hidrogênios na região de aromáticos do espectro de RMN de ^1H

Flavonoides e compostos fenólicos estão em torno de 5% nas polpas do açaí (matéria seca). Embora os compostos como antocianinas, flavonoides não antociânicos e ácidos fenólicos estejam relativamente em pequena concentração quando comparado aos lipídios, realizou-se um estudo dos dados multivariados por PCA para verificar possíveis contribuições dos sinais de compostos aromáticos na distinção de amostras do açaí com diferentes tipos de cultivo.

As *bucket table* deste estudo foram montadas com tamanho fixo de 0,04 ppm considerando apenas a faixa espectral que engloba a região com hidrogênios aromáticos e nitrogenados (5,92 – 11,5 ppm) desconsiderando regiões que não continham sinais da amostra (Figura 2.15).

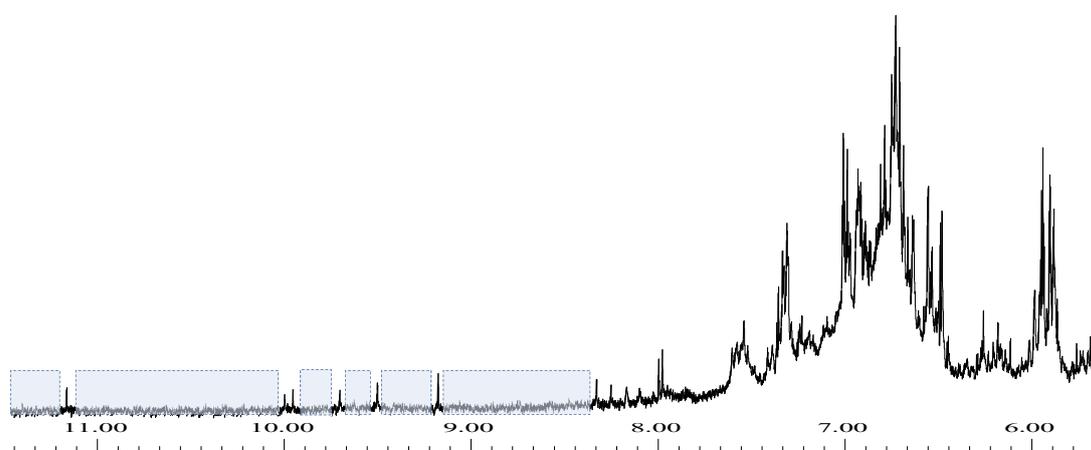


FIGURA 0.15 - Espectro de RMN de ^1H de polpas do açaí com a região para o estudo de hidrogênios aromáticos e nitrogenados para a formação das *bucket table* com 0,04 ppm. Exclusão das regiões sem sinal da amostra (retângulo azul). MeOH- d_4 em um 400 MHz.

A matriz de dados foi composta por 555 espectros (300 comerciais + 250 genótipos) e as 142 *bucket* foram integradas e as variáveis geradas não foram escalonadas, considerando 95% de nível de confiança.

Para a matriz açai, a grande maioria dos sinais presentes na região aromática não foram caracterizados devido a grande complexidade espectral que envolve a sobreposição dos sinais no espectro de RMN de ^1H e/ou a não verificação das correlações nos espectros de RMN 2D.

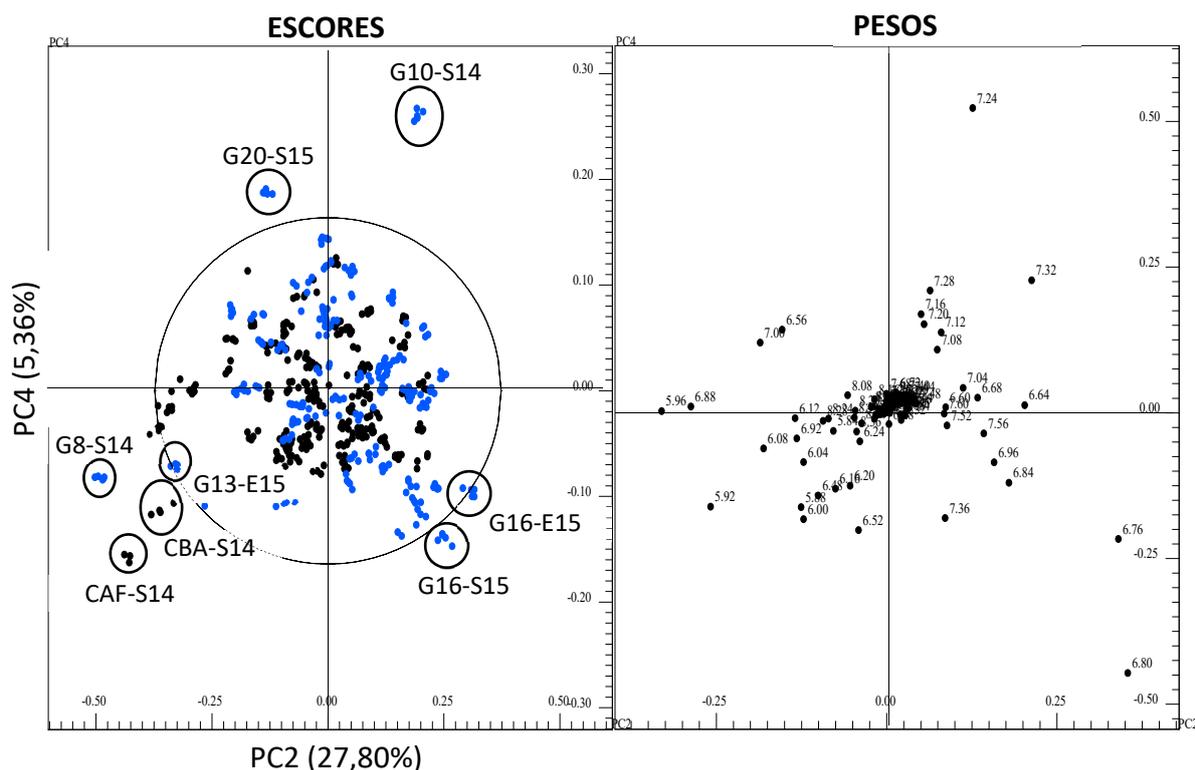


FIGURA 0.16 - Gráfico de escores e pesos da PC2 x PC4 (33,16% variância total) para os espectros de RMN de ^1H das polpas do açai dos genótipos (“G”) e comerciais (“C”).

Com as análises por PCA (Figura 2.16) verificou-se uma grande semelhança no perfil dos sinais de compostos aromáticos das polpas do açai comerciais e dos genótipos, não havendo distinção entre as amostras pelo tipo de cultivo, quando avaliada pela região aromática por RMN de ^1H . No entanto, no gráfico de escores (PC2 x PC4) foi possível verificar a distinção de algumas amostras comerciais (sem controle agrônômico) e de genótipos (com controle agrônômico da CPATU) das demais polpas do açai.

A variável responsável pela distinção do genótipo G10-S14, eixo positivo da PC2, foi principalmente o sinal em 7,24 ppm. Já os sinais que caracterizaram as

amostras do genótipo G16 na safra e entressafra de 2015, PC2 positiva e PC4 negativa, foram 6,76 e 6,80 ppm. O genótipo G20-S15 localizado no eixo positivo da PC4 apresentou os sinais 6,56 e 7,00 como os responsáveis por sua distinção das demais amostras. As polpas comerciais CAF e CBA ambas obtidas no comércio da cidade de Belém - PA no período da safra de 2014 (jul-dez) e dois (2) genótipos (G8-S14 e G13-E15) foram distintos principalmente pelo sinal em 5,92 ppm.

Já outro modelo com a terceira e quarta componentes (Figura 2.17) foi possível verificar que oito (8) das dez (10) polpas comerciais (sem controle agrônômico) obtidas no período da safra de 2014 apresentaram distinção das demais polpas, exceto as polpas dos pontos de venda CAI e CAL que não tiveram altas concentrações de compostos aromáticos nesse período.

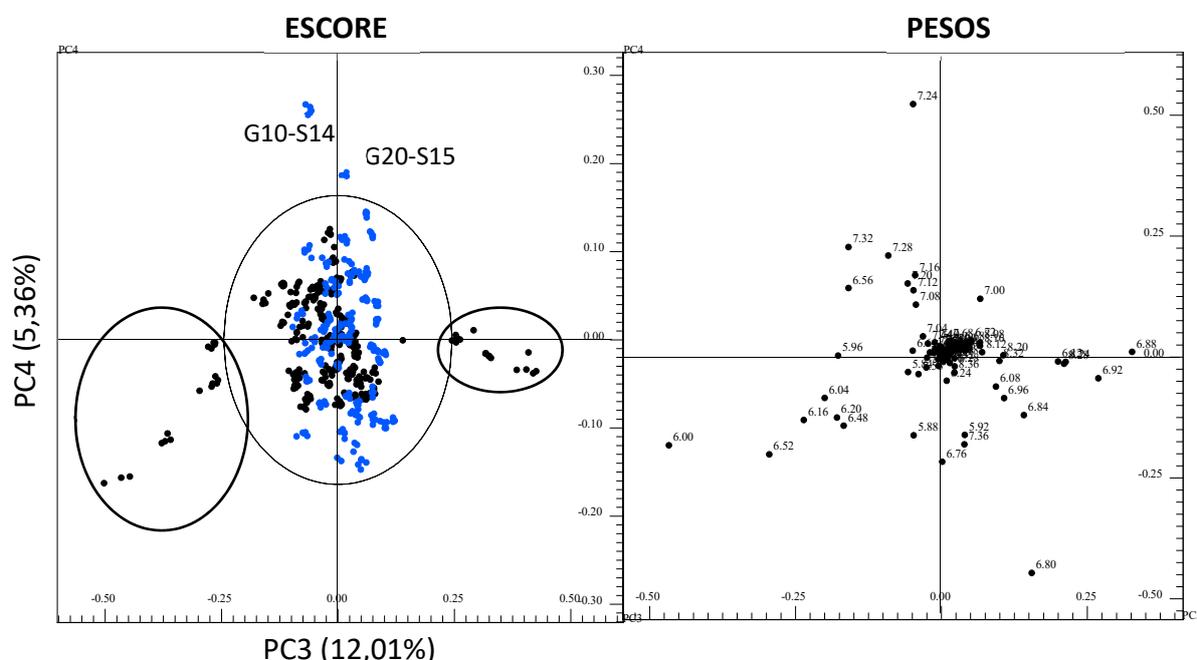


FIGURA 0.17 - Gráfico de escores e pesos da PC3 x PC4 (17,37% variância total) para os espectros de RMN de ^1H das polpas do açaí dos genótipos ("G") e comerciais ("C").

O gráfico de pesos (Figura 2.17) sugeriu altas concentrações de compostos relacionados com as variáveis em 6,12; 6,88; 6,92 e 8,28 ppm; para as amostras comerciais no eixo positivo da PC3 e, 6,00; 6,04; 6,16; 6,20; 6,48 e 6,52 ppm para amostras comerciais no eixo da PC3 negativa.

Os estudos quimiométricos realizados com a região de hidrogênios aromáticos mostraram que dentre os 31 genótipos do Programa de Melhoramento Genético desenvolvido na Embrapa Amazônia Oriental (Belém – PA), cinco (5) deles podem ser

considerados promissores para a continuação dos estudos, pois apresentaram destaque na concentração de compostos fenólicos. São eles: G8, G10, G13, G16 e G20. Foi possível verificar que as algumas polpas congeladas comercializadas na cidade de Belém - PA no período da safra de 2014 apresentaram maiores concentrações de compostos aromáticos que as demais amostras, isso pode estar relacionada à característica sazonal ou à quantidade de água adicionada na polpa comercial.

Tanto para amostras comerciais quanto para as de genótipos verificou-se que, de alguma forma os fatores edafoclimáticos no período da seca local (safra do açaí) devam influenciar a produção do maior teor de alguns compostos como flavonoides, antocianinas e outros compostos aromáticos, pois verificou-se que as amostras que se distinguiram das demais foram coletadas na safra.

4.3.2. Análise das amostras de genótipos da Embrapa Amazônia Oriental (Belém – PA)

Após obter uma compreensão geral das amostras de polpa do açaí comercial e de genótipos foram desenvolvidos estudos quimiométricos para cada matriz separadamente e com essa proposta buscou-se verificar características e variações mais detalhadas das matrizes e a influência dos compostos químicos.

Neste tópico, foram analisadas apenas as amostras provenientes dos frutos do cultivar da Embrapa Amazônia Oriental (Belém – PA) para estabelecer modelos relacionados com o melhoramento genético (item a) e sazonalidade da coleta dos frutos do açaizeiro (item b).

Os espectros de RMN de ^1H das polpas do açaí liofilizadas de genótipos que foram utilizadas nos tratamentos quimiométricos podem ser verificados na Figura 2.18.

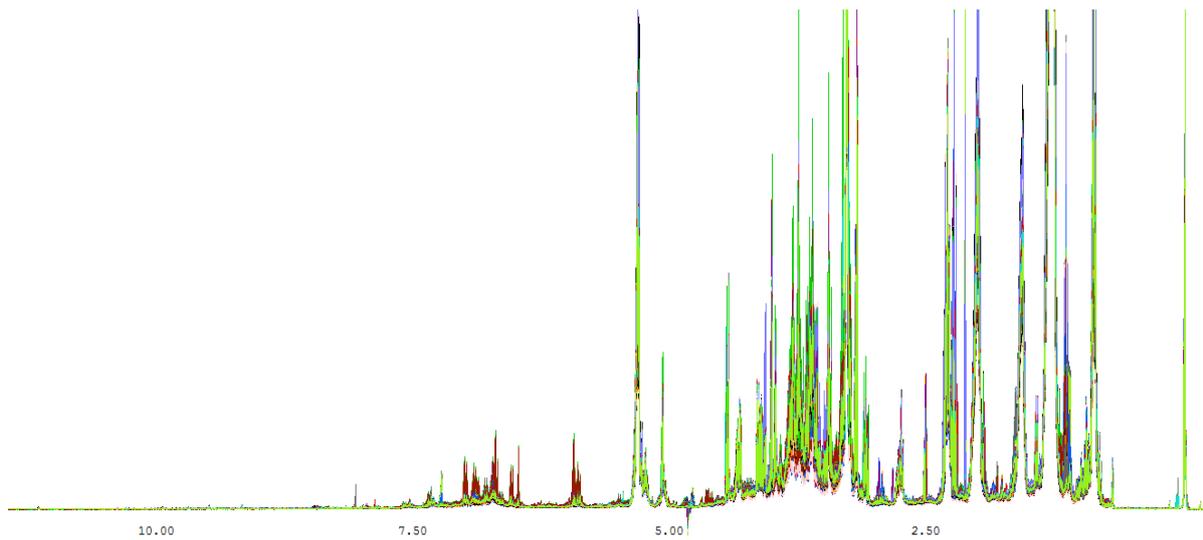


FIGURA 0.18 - Espectros de RMN de ^1H de extratos metanólicos da polpa de genótipos do açaí liofilizada. MeOD- d_4 (0,02% TMSP- d_4) em um equipamento 400 MHz.

a) Avaliação dos frutos do Programa de Melhoramento Genético do açaizeiro (PMG)

Neste estudo, a matriz de dados foi montada com 160 *bucket table* com tamanho variável, integradas pela intensidade positiva, as variáveis geradas foram escalonadas e utilizou-se 95% de nível de confiança. Foram utilizados 255 espectros referentes às replicatas de 51 amostras de polpa do açaí liofilizada.

A maioria das PCs analisadas mostrou que as polpas dos frutos dos 31 genótipos do PMG da Embrapa Amazônia Oriental ficaram localizadas em um grande grupo central, mostrando a grande similaridade no perfil químico nestas polpas, independente do período da coleta dos cachos e do fator genético dos frutos (Figura 2.20). No entanto, foi possível verificar que quatro (4) genótipos se distinguiram dos demais. Foram os genótipos: G15 e G14 (Figura 2.19a) ambos com frutos coletados na entressafra (período de chuvas) de 2015 e, G6, G8 e G14 (Figura 2.19b) com frutos coletados na safra (período de chuvas) de 2014.

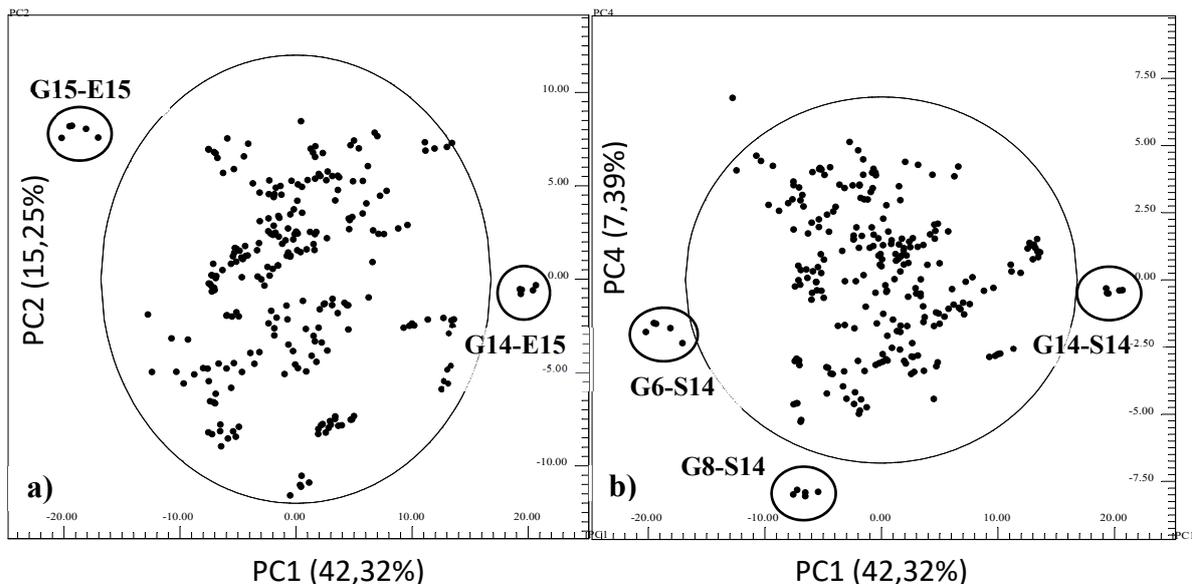


FIGURA 0.19 - Gráfico de escores para os espectros de RMN de ^1H das polpas do açaí dos genótipos do açaí. a) PC1 x PC2 (57,57% variância total) e b) PC1 x PC4 (49,71% variância total).

Foi possível notar também que há uma dispersão nos genótipos nos quatro quadrantes do gráfico de escores da PC1 x PC2 e da PC1 x PC4 (Figura 2.20), isso sugere que apesar das polpas apresentarem perfil químico similar, provavelmente a concentração dos compostos orgânicos presente nos frutos das palmeiras de açaí do Programa de Melhoramento Genético da Embrapa apresenta grandes variações entre os genótipos.

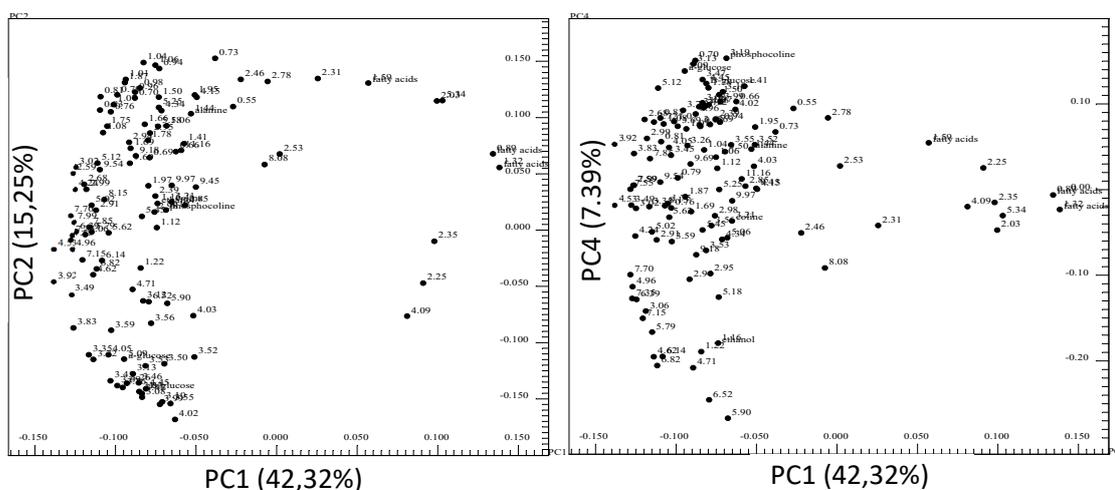


FIGURA 0.20 - Gráfico de pesos para os espectros de RMN de ^1H das polpas dos genótipos do açaí por RMN de ^1H . a) PC1 x PC2 e b) PC1 x PC4.

Com os gráficos de pesos da PC1 x PC2 (Figura 2.20) verificou-se que as variáveis responsáveis pela distinção do genótipo G14-E15, eixo positivo da PC1, foram 2,25; 2,35; 4,09, 1,32, 0,89 ppm. Os sinais em 0,77; 0,81; 0,83; 1,07 ppm caracterizaram as amostras do genótipo G15 localizada no eixo negativo da PC1. Como esses sinais são típicos de compostos lipídicos podemos sugerir que estes dois (2) genótipos (G14 e G15) no período da entressafra de 2015 produziram maior concentração de ácidos graxos. Os espectros de RMN de ^1H das amostras do genótipo G14 e G15 confirma essa observação (Figura 2.21).

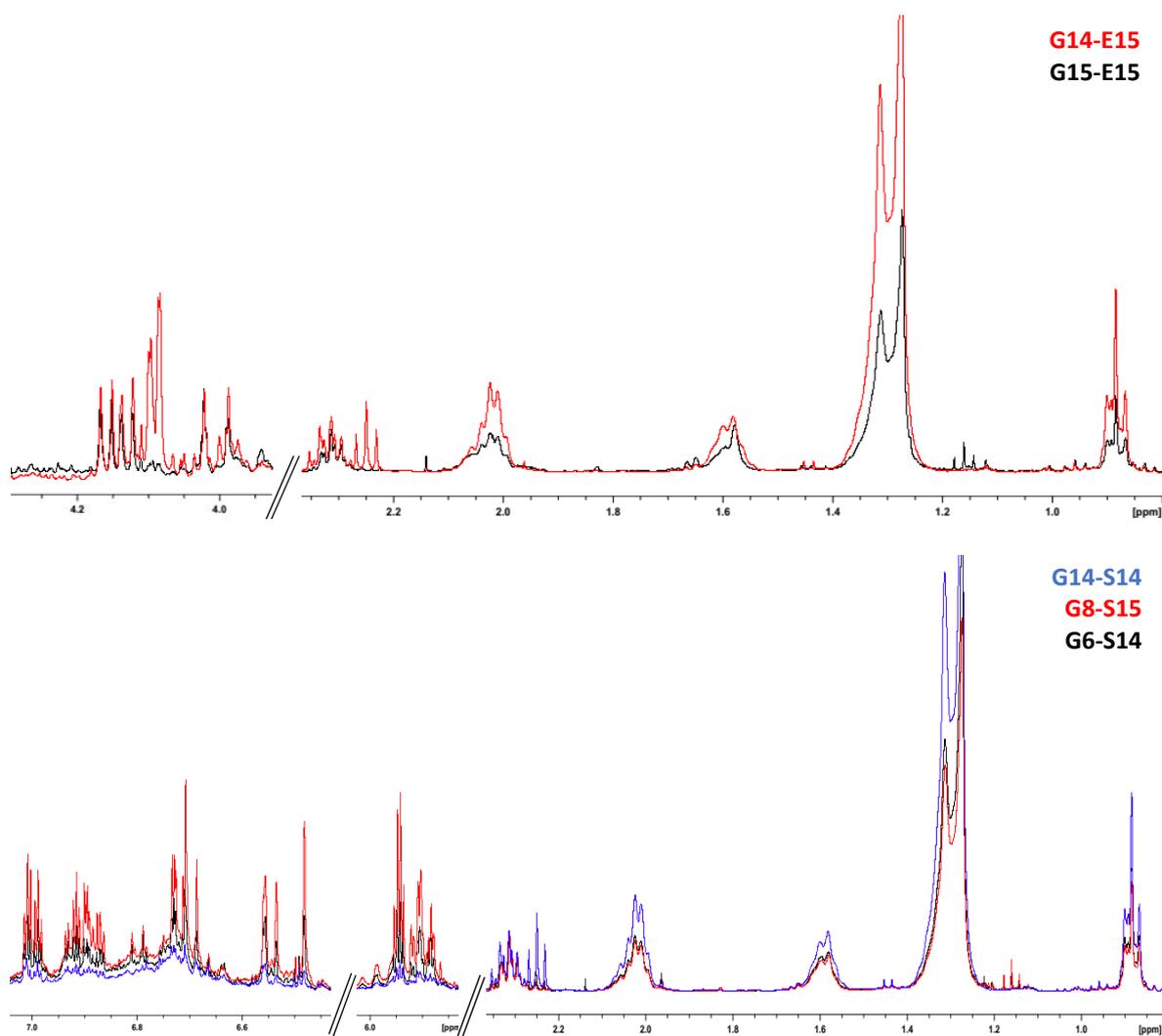


FIGURA 0.21 - Região dos espectros de RMN de ^1H da polpa do açai de genótipos que apresentaram distinção nas análises quimiométricas. MeOH- d_4 em um 400 MHz.

Com o gráfico de pesos da PC1 x PC4 (Figura 2.20) verificou-se quais foram as variáveis responsáveis pela distinção dos genótipos G6, G8 e G14, ambos da safra de 2014, dos demais da cultivar. O genótipo G6 apresentou maior teor de aminoácidos (serina, leucina, ácido glutâmico) e carboidratos (frutose e glicose). O

genótipo G8 apresentou frutos com maior teor de compostos fenólicos, pois apresentou as variáveis em 5,90 e 6,52 ppm (compostos não identificados e o G14 com maior teor de triacilgliceróis com cadeia insaturada).

Verificou-se que dos 31 genótipos estudados foi possível identificar mais dois (2) prováveis promissores para a continuação dos estudos de melhoramento genético, que foram G6 e G14. Os genótipos G8 e G15 que se destacaram nesse estudo, já haviam sido verificados anteriormente quando analisados no modelo com as amostras comerciais (Tópico 4.3.1), onde apresentaram maior concentração de hidrogênios aromáticos e ω -3, respectivamente. Os resultados obtidos nestes estudos quimiométricos fornecem importantes informações para os pesquisadores que trabalham com o Programa de Melhoramento Genético do Açaizeiro da Embrapa Amazônia Oriental (Belém – PA), que objetiva a distribuição de sementes de palmeiras que possam ser cultivadas em terra firme, com alta produtividade, bom rendimento da parte comestível e que apresentem frutos com boas concentrações de compostos bioativos (OLIVEIRA et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2007; NOGUEIRA et al., 2005).

b) Avaliação da Sazonalidade: Entressafra (período de chuva) x Safra (período de seca)

Como mencionado anteriormente, infelizmente a representatividade amostral das polpas de genótipos no período da entressafra foi prejudicada devido a fatores externos ao nosso controle, como os climáticos e episódios de furtos de cachos do açaí dentro da cultivar na Embrapa Amazônia Oriental (Tabela 2.1).

Durante o ciclo de cultivo, a planta reage diretamente às condições meteorológicas (chuva, temperatura do ar e radiação solar) que representam fatores exógenos, no qual seus efeitos afetam diretamente no crescimento, no desenvolvimento, nos processos metabólicos e na produtividade vegetal. Além destes, ainda pode ocorrer influência do fotoperíodo, da umidade do ar e do solo (HOOGENBOOM, 2000; PEREIRA et al., 2002 *apud* MONTEIRO, 2009). Na cidade de Belém-PA as condições meteorológicas são bem características durante o ano, sendo

que, no cultivo do açaí caracterizam os períodos de safras (estiagem e pequeno déficit hídrico) e entressafras (chuvoso) (Figura 2.22).

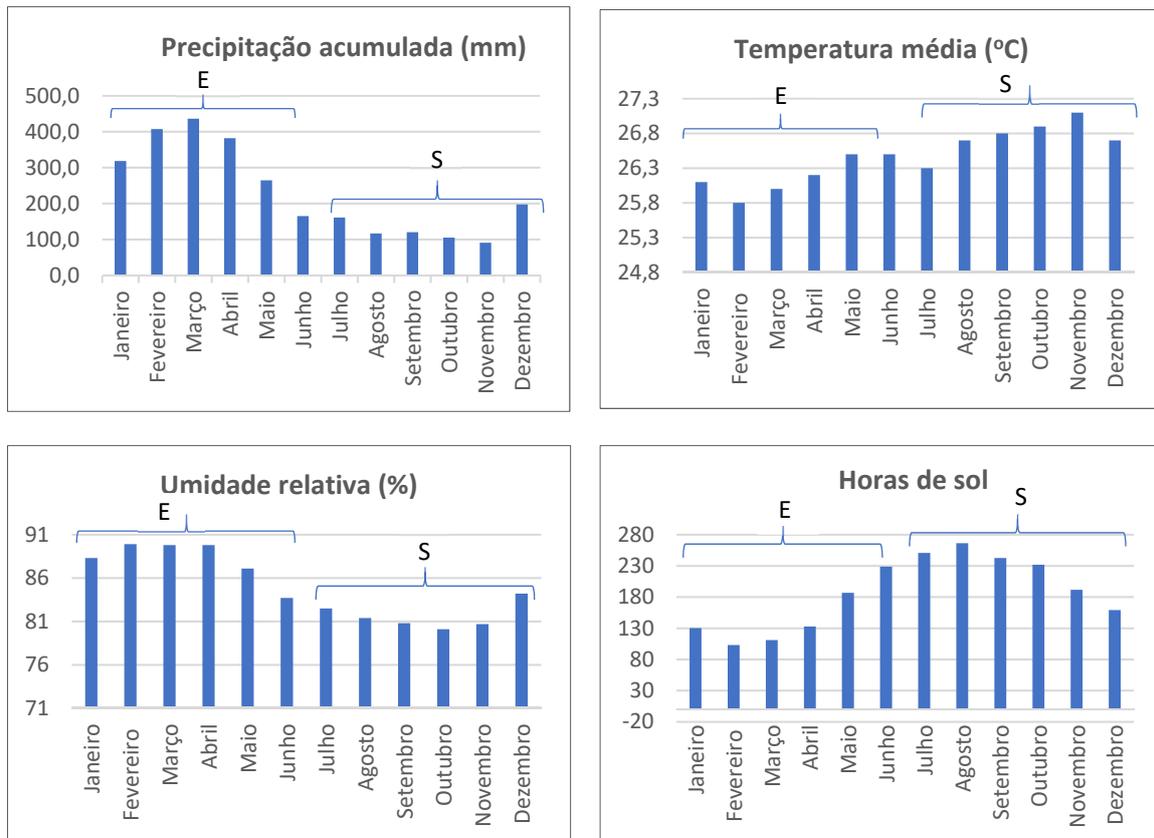


FIGURA 0.22 – Informações mensais de algumas condições meteorológicas da cidade de Belém (PA) para o ano de 2017. Fonte: Instituto Nacional de Meteorologia - INMET (normal climatológica 61-90). E: entressafra do açaí; S: safra do açaí.

De maneira geral, no último ano, o mês de março foi o que apresentou maior precipitação (436,3 mm) e novembro foi o mês mais seco (90,3 mm). A temperatura média variou cerca de 1,3 °C no decorrer do ano, com menores temperatura em fevereiro (25,8 °C) e 27,1 °C no mês mais quente (novembro).

No período de chuva local (jan-mai), a queda na frutificação do açaizeiro é um fenômeno descrito na literatura e conhecido pela população paraense, no qual a baixa na produção pode chegar a 30% (NOGUEIRA et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2015; OLIVEIRA, CARVALHO & NASCIMENTO, 2000).

Sabe-se que o açaizeiro apresenta bom desenvolvimento em locais com temperaturas na faixa de 28 °C, umidade relativa em torno de 80%, solo com alto teor de matéria orgânica e boa incidência de radiação solar. Sendo este último um fator que tem grande efeito na produção e na qualidade dos frutos do açaí (NOGUEIRA et al., 1995). No entanto, na cultivar da CPATU, apesar das práticas agrícolas realizadas

nas palmeiras (roçagem, adubação, irrigação, coroamento, entre outros) ainda foi verificada a significativa queda na produção dos frutos e o amadurecimento dos cachos do açai. Na vigência desse trabalho foram obtidos apenas sete (7) genótipos com quantidade de frutos necessária para a realização do processo de despulpamento e obtenção da polpa do açai.

A literatura indica que apesar da realização destas práticas agrícolas, estas dependem também de condições específicas como do clima e da umidade do solo para que sejam realizadas de maneira eficiente (PEREIRA et al., 2002 *apud* MONTEIRO, 2009), visto isso, podemos sugerir que o fenômeno observado esteja fortemente relacionado aos fatores meteorológicos e que possivelmente a disponibilidade hídrica, umidade do solo e a radiação solar tenham afetado mais significativamente na frutificação e amadurecimento dos frutos do açai nos períodos da estiagem (julho – novembro).

Desta forma, embora nem todos os 31 genótipos puderam ser submetidos as análises por RMN de ^1H , foram realizados estudos quimiométricos para verificar possíveis tendências em relação a sazonalidade dos frutos de genótipos do açai coletados no período de vigência do trabalho. Foram utilizados 35 espectros referentes às replicatas das amostras coletadas nas entressafras e 220 espectros referentes as replicatas das amostras coletadas nas safras. A matriz de dados foi montada com 160 *bucket table* com tamanho variável no modo de integração por intensidades positiva, as variáveis geradas foram escalonadas e utilizou-se 95% de nível de confiança.

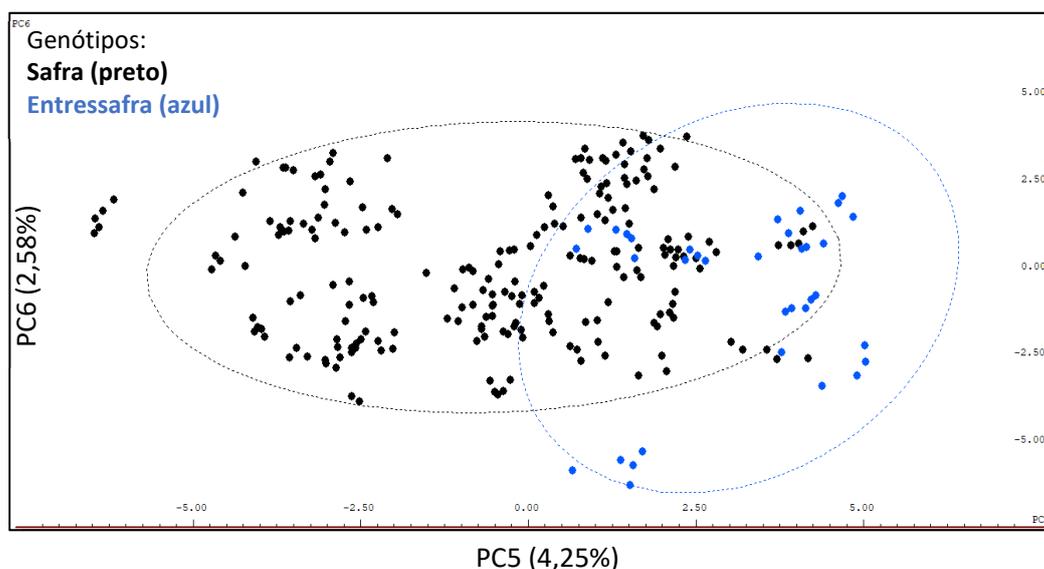


FIGURA 0.23 - Gráfico de escores da PC5 x PC6 (6,83% variância total) para os espectros de RMN de ^1H das polpas do açai dos genótipos da CPATU.

Com o gráfico de escores (Figura 2.23) pode-se verificar que não houve uma clara distinção entre as amostras coletadas nos períodos de seca (safra) e de chuvas (entressafra) na cidade de Belém – PA entre os anos de 2014 e 2016. Essa observação sugere que polpas do açaí possuem um perfil químico por RMN de ^1H muito semelhantes, independente da sazonalidade.

Os espectros para as amostras coletadas nas safras apresentaram grande distribuição por todo modelo, o que pode mostrar uma grande variabilidade na concentração dos compostos orgânicos dos frutos coletado nesse período. Mesmo com a pequena amostragem deste estudo, foi possível observar uma tendência na localização de frutos do açaí coletados nas entressafras distribuídas pelo eixo positivo da PC5.

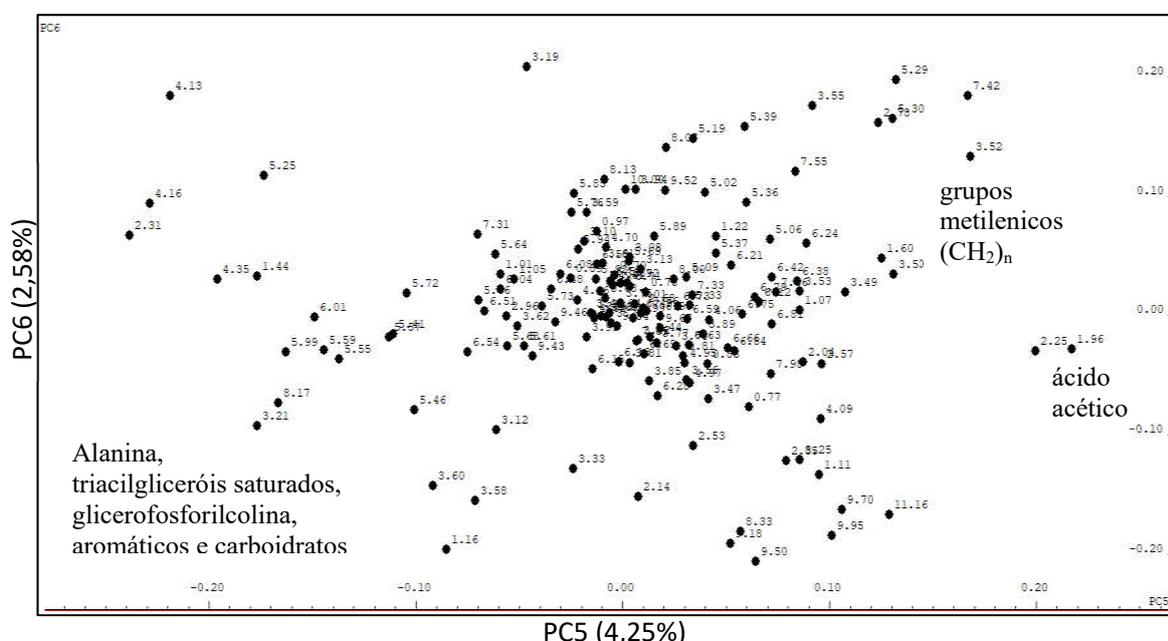


FIGURA 0.24 - Gráfico de pesos da PC5 x PC6 para os espectros de RMN de ^1H das polpas do açaí dos genótipos do açaí da CPATU (Belém – PA).

Com o gráfico de pesos da PC5 x PC6 (Figura 2.24) verificou-se que as variáveis significativas na tendência da distribuição das amostras da safra pelo eixo negativo da PC5 foram da alanina, ésteres de ácidos graxos, glicerídeos, glicerofosforilcolina, sinais na região compostos aromáticos (5,99 – 6,54; 7,31; 8,17 ppm) e de carboidratos (5,41 – 5,72 ppm), esses últimos não caracterizados devido a sobreposição e complexidade espectral. A variável responsável pela tendência das amostras da entressafra ao longo da PC5 positiva foi, principalmente o ácido acético

(δ 1,96), mas também sinais de compostos lipídicos (δ 2,25 e 1,60) e em δ 3,49-3,52 e δ 7,42.

O ácido acético é o produto da oxidação do etanol realizada por bactérias aeróbicas do gênero *Acetobacter* e *Gluconobacter*, normalmente presente em frutos (RIZZON, 2006; CONSTANTINO, 2008). Esta observação mostra que no período da entressafra ocorre um maior processo de fermentação nos frutos e, isso pode estar relacionado com a alta carga microbiana presentes nos frutos do açaí dessa época (SOUSA et al., 1999).

4.3.3. Análise das polpas do açaí comercializadas em Belém - PA

Para conhecer o comportamento das polpas de açaí comerciais, realizamos análises de PCAs das amostras obtidas em todos os períodos (safra 2014, entressafra 2015, safra 2015, entressafra 2016, safra 2016 e entressafra 2017) dos dez (10) pontos de venda (batedores do açaí) localizados na região metropolitana da cidade de Belém - PA.

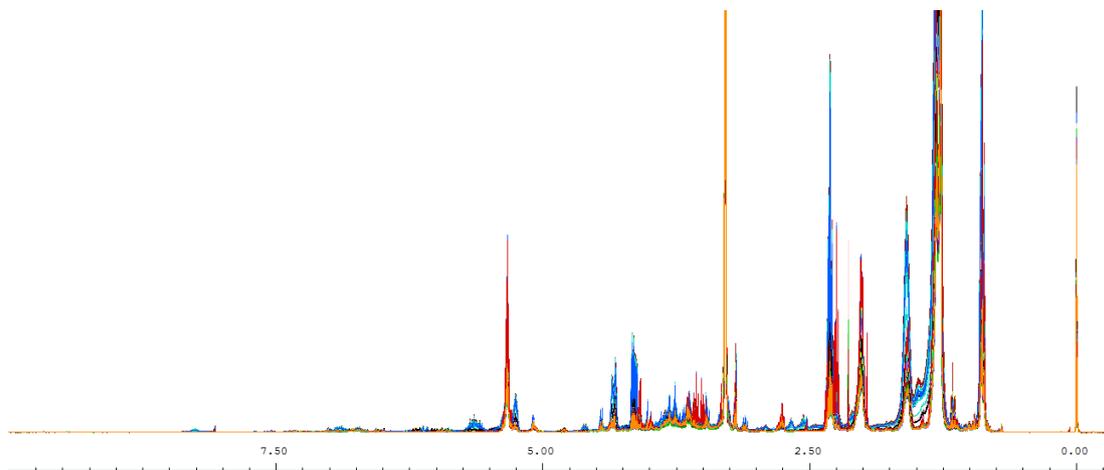


FIGURA 0.25 - Espectros de RMN de ^1H de extratos metanólicos das polpas do açaí comerciais liofilizadas. MeOD- d_4 (0,02% TMSP- d_4) em um equipamento 400 MHz.

a) Avaliação da Sazonalidade: Entressafra x Safra

Foram utilizados 300 espectros referentes às replicatas das 60 polpas do açaí congeladas comerciais obtidas entre a safra de 2014 e a entressafra de 2017 em 10 pontos de venda na cidade de Belém - PA. Nesse estudo, a matriz de dados de RMN foi montada com 160 *bucket table* de tamanho variável. Foi realizada a

integração por intensidade positiva, as variáveis geradas não foram autoescalonadas e utilizou-se 95% de nível de confiança.

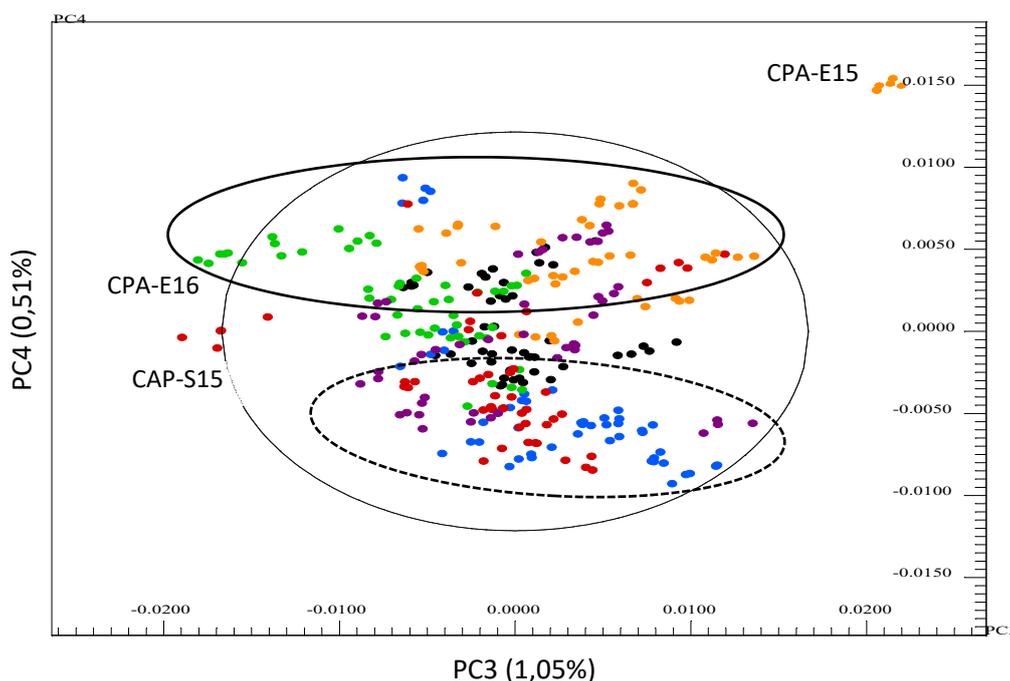


FIGURA 0.26 - Gráfico de escores da PC3 x PC4 (1,56% variância total) para os espectros de RMN de ^1H das polpas do açaí liofilizada comerciais ("C") por RMN de ^1H . Polpas congeladas obtidas na entressafra de 2017 (preto), entressafra de 2016 (verde), entressafra de 2015 (laranja), safra de 2016 (azul), safra de 2015 (vermelho), safra de 2014 (roxo).

Com o gráfico de escores da PC3 pela PC4 (Figura 2.26) pode-se verificar a grande similaridade do perfil químico das polpas comerciais pois a maioria delas estão agrupadas no centro do modelo. Essa observação é muito interessante, pois os frutos do açaí são obtidos pelos comerciantes nos mercados da cidade (Ver-o-Peso) e são comercializados sem nenhum controle agrônômico (solo pobre/rico em nutrientes; irrigação; diferentes cultivares), possivelmente com diferentes origens, graus de maturação, modo de transporte, etapas de higienização, processamento e armazenamento da polpa.

Apenas dois (2) pontos de venda de polpas do açaí em Belém - PA apresentaram amostras com distinção das demais. Foram eles, CPA com as amostras da entressafra de 2015 localizadas no eixo positivo da PC3 (CPA-E15) e da entressafra de 2016 no eixo negativo da PC3 (CPA-E16) e, o local CAP com as amostras da safra de 2015 no eixo negativo da PC3 (Figura 2.28).

Com a representatividade das amostras foi possível verificar tendências em relação ao efeito da sazonalidade das polpas do açaí congeladas comercializadas

na cidade de Belém – PA. As polpas obtidas nas safras de 2016 (azul), 2015 (vermelho) e 2014 (roxo) ficaram distribuídas pelo eixo negativo da PC4 e a grande parte das polpas obtidas nas entressafras de 2017 (preto), 2016 (verde) e 2015 (laranja) se localizou no eixo positivo da PC4.

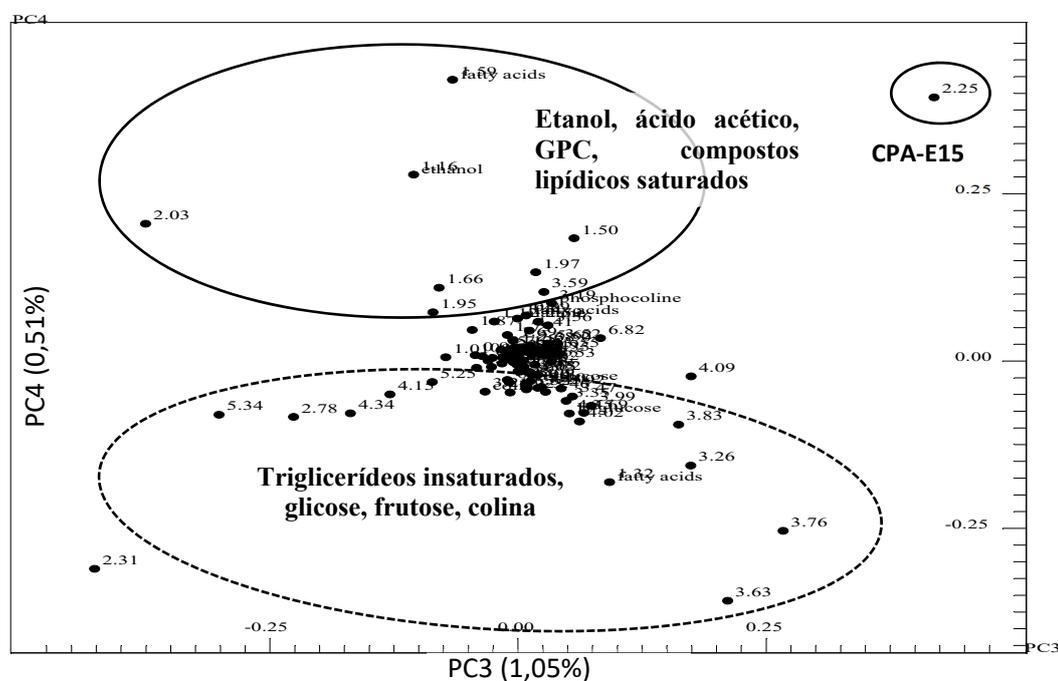


FIGURA 0.27 - Gráfico de pesos da PC3 x PC4 das amostras da polpa de açaí liofilizada comerciais ("C") por RMN de ¹H.

Com o gráfico de pesos da PC3 x PC4 (Figura 2.27) verificou-se que as variáveis significativas para a tendência da distinção das amostras dos dois (2) pontos de venda (CPA-E16 e CAP-S15) foram os sinais em 2,25 ppm para a polpa do local CPA na entressafra de 2015; 2,03 ppm para a polpa da entressafra de 2016 e sinais de ésteres de ácidos graxos insaturados para com a polpa da safra de 2015 do local CAP.

Foi possível verificar também que as variáveis significativas na tendência da distribuição das amostras das safras (eixo negativo da PC4) foram os sinais de ésteres de ácidos graxos insaturados, glicerídeos, carboidratos (glicose, frutose), colina e os compostos não caracterizados com deslocamento químico em 3,26 e 4,09 ppm. Essa observação para as amostras comerciais corrobora com as verificadas nas amostras da safra de genótipos (Tópico 4.3.1), pois as variáveis significativas foram da mesma classe de compostos (lipídios e carboidratos), com exceção dos compostos aromáticos que não foram significantes nas polpas comerciais. É provável que as

amostras comerciais possuam menor quantidade de compostos aromáticos por causa de fatores como a rápida degradação das antocianinas e compostos fenólicos, pela baixa qualidade do solo, processamento, armazenamento das polpas e, por isso os sinais dos compostos aromáticos não apresentam significativa importância nesse estudo de PCA (GORDON et al., 2012; LIMA et al., 2005; LICHTENTHÄLER et al., 2005; MALCHER & CARVALHO, 2011; MATTIETTO et al., 2009; ROGEZ et al., 2011)

Sabe-se que os lipídios e os açúcares são compostos que atribuem sabor (*flavor*) aos alimentos e é interessante verificar que a polpa do açaí no período da safra (jul-dez) é mais consumido e agrada mais o paladar do consumidor por ser considerado de melhor qualidade sensorial e também visual, pois apresenta coloração vermelho-arroxeadada em função das antocianinas.

Podemos sugerir também que, no período de estiagem (safra) onde ocorre naturalmente a maior produção e amadurecimento dos frutos do açaí, provavelmente é o período em que a palmeira produz nos frutos os seus compostos majoritários, principalmente os lipídios que são 40-60% da polpa seca (NOGUEIRA, 2005; OLIVEIRA, 2007; NASCIMENTO et al., 2008; SCHAUSS et al., 2006a; MENEZES et al., 2008).

Para as polpas obtidas na entressafra (eixo positivo da PC4), as variáveis significativas foram sinais de ésteres de ácidos graxos saturados, etanol, ácido acético, acetona, glicerofosfocolina, (2R, 3R)-butano-2,3-diol e de compostos lipídicos não identificados (1,50; 2,03; 2,25 ppm). Com as análises quimiométricas dos dados de RMN de ¹H das polpas comerciais obtidas na entressafra foi possível verificar que as mesmas sofrem processo de degradação devido aos compostos responsáveis por sua discriminação. Isso pode estar relacionado a alguns fatores como a alta carga microbiana presente nos frutos desta época (SOUSA et al., 1999); a dificuldade em encontrar cachos carregados com açaí pode ocasionar aumento no tempo de coleta e estes frutos coletados ficam submetidos a uma maior exposição ao ar e a luz solar que no período de safra (NOGUEIRA, 2005; SOUSA et al., 1999; Del POZO INSFRAN et al., 2004); tempo e condições no transporte de barcos e caminhões que levam frutos produzidos no Maranhão e no Amapá para os comerciantes de Belém neste período (NOGUEIRA, 2005) e tempo prolongado de amolecimento dos frutos nos batedores do açaí (OLIVEIRA et al., 2007).

Essas suposições concordam com a literatura específica e também com a cultura popular do consumidor nativo (Pará) que afirmam que o açaí no período das

chuvas é “ralo”, mais azedo, menos roxo e apresenta qualidade sensorial inferior ao açaí da safra (NOGUEIRA, 2005; OLIVEIRA, 2007; G1,2014a; G1, 2015a).

Para verificar quais são os processos fermentativos/degradação envolvidos nas amostras da entressafra, foi realizado um estudo com polpas do açaí expostas à temperatura e luz por 6 e 12 horas e que será discutido no Item 4.4 deste capítulo.

b) Avaliação dos pontos de venda de polpa do açaí (Belém – PA)

Realizamos um estudo com as amostras comerciais para verificar o comportamento das polpas congeladas vendidas no mesmo ponto de venda durante o tempo de monitoramento amostral de (3) três anos. Foram utilizados 300 espectros referentes as replicatas das 60 polpas do açaí congeladas obtidas entre a safra de 2014 e a entressafra de 2017 em 10 pontos de venda (batedores de açaí) na cidade de Belém – PA.

Para fins de melhor visualização, os espectros foram analisados a cada 8 grupos de amostras para evitar a repetição da cor dos *plots* nos gráficos de escores. A matriz de dados foi montada com 160 *bucket table* de tamanho variável foram integradas, sendo que as variáveis geradas não foram escalonadas e utilizou-se 95% de nível de confiança. Os gráficos de escores das amostras comerciais dos pontos de venda podem ser verificados nas Figuras 2.28 a 2.30.

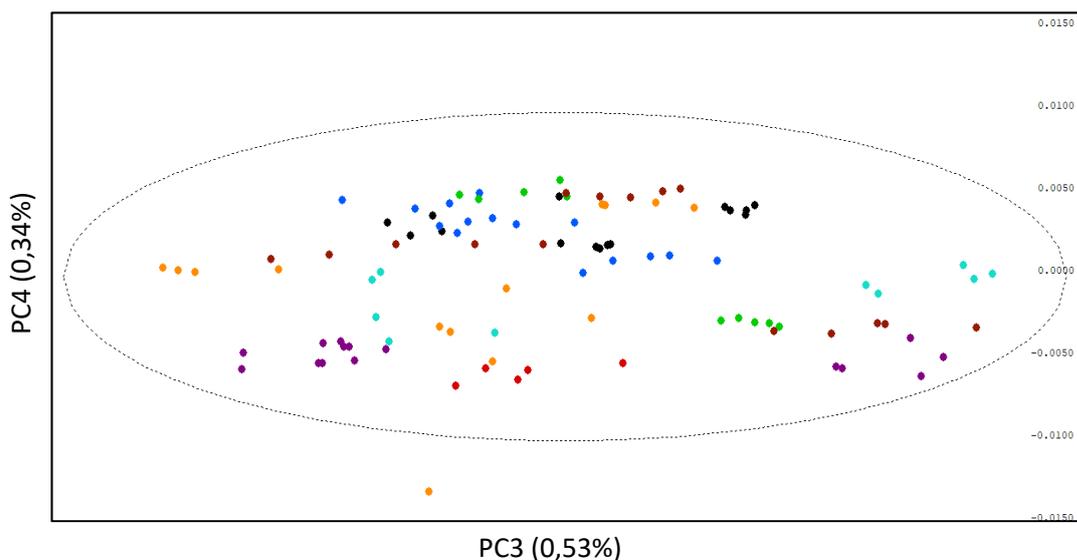


FIGURA 0.28 - Gráfico de escores da PC3 x PC4 (0,87% da variância total) das amostras da polpa de açaí liofilizada comerciais por RMN de ¹H. Pontos de venda (grupo 1): CA25 safras (preto), CA25 entressafras (azul), CADC safras (verde), CADC entressafras

(vermelho), CAF safras (laranja), CAF entressafras (roxo), CAI safras (marrom) e CAI entressafras (azul claro).

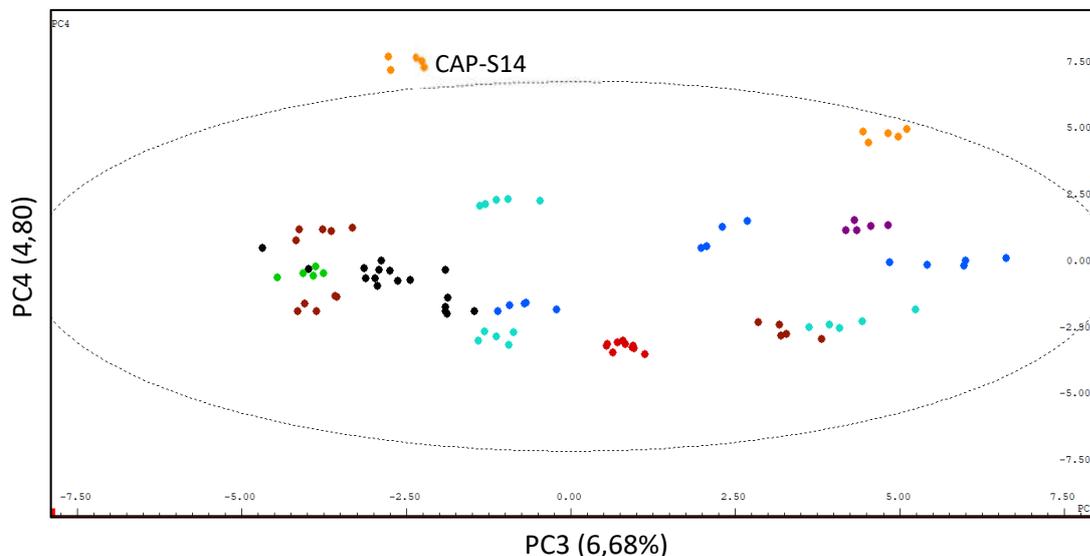


FIGURA 0.29 - Gráfico de escores da PC3 x PC4 (11,48% da variância total) das amostras da polpa de açaí liofilizada comerciais (“C”) por RMN de ^1H . Pontos de venda (grupo 2): CAL safras (preto), CAL entressafras (azul), CANM safras (verde), CANM entressafras (vermelho), CAP safras (laranja), CAP entressafrã (roxo), CAU safras (marrom) e CAU entressafras (azul claro).

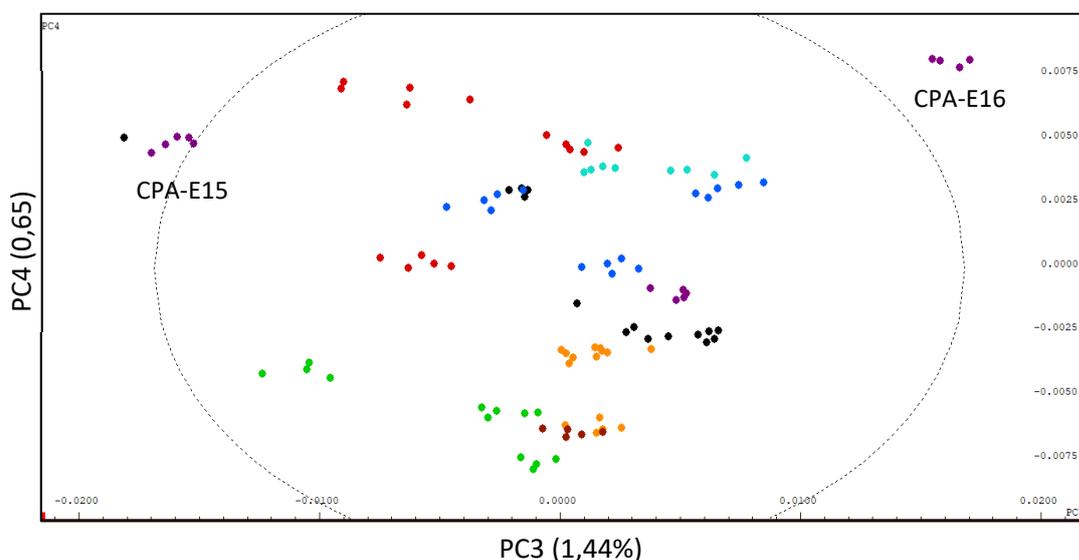


FIGURA 0.30 - Gráfico de escores da PC3 x PC4 (2,09% da variância total) das amostras da polpa de açaí liofilizada comerciais por RMN de ^1H . Pontos de venda (grupo 3): CBA safras (preto), CBA entressafras (azul), CFA safras (verde), CFA entressafras (vermelho), CPA safras (laranja), CPA entressafras (roxo), CPDA safrã (marrom) e CPDA entressafras (azul claro).

Os gráficos de escores (Figuras 2.28 – 2.30) com as amostras comerciais apresentaram similaridade no perfil por RMN de ^1H . Dos 10 pontos de venda do açaí, um (1) deles (CADC) não realiza a etapa de branqueamento e dois (2)

batedores (CAF e CA25) são locais com selo de controle de qualidade fornecido pela Secretaria de Agricultura do Pará (SAGRI), ou seja, tem a certificação oficial que todos os procedimentos recomendados no despulpamento dos frutos (lavagem, branqueamento e pasteurização) são realizados (DOE Belém, 2012).

Nos estudos por quimiometria foram verificados que as amostras dos locais citados acima (CA25, CADC e CAF), todos da safra de 2014, apresentaram similaridade no perfil químico quando avaliado juntamente com as amostras dos genótipos (Item 4.3.3) e como as polpas desses três locais não se distinguiram das demais amostras comerciais (Figuras 2.30 a 2.32), isso sugere que o perfil químico da polpa não foi alterado fortemente a ponto de se distanciar das amostras de um local que realiza ou não a etapa de branqueamento dos frutos do açaí.

É importante salientar que boas práticas de processamento são recomendadas para minimizar os problemas com contaminação microbiológica, diminuir o processo de degradação - que prejudica as características sensoriais e, garantir qualidade higiênico-sanitária nos alimentos (NOGUEIRA, 2005; MATTIETTO et al., 2010; SOUSA et al., 1999; BRASIL, 2000).

Os gráficos de escores (Figuras 2.30 a 2.32) indicam que algumas amostras obtidas em batedores do açaí da cidade de Belém em períodos e anos diferentes apresentaram-se muito próximas umas das outras. Esse comportamento ocorreu em quatro (4) pontos de venda, CA25 (amostras da safra de 2014 e entressafra de 2015) (Figuras 2.30), CAL (safra 2014 e entressafra de 2015) (Figuras 2.31), CAU (safra 2014 e entressafra 2016) (Figuras 2.31) e CBA (safra 2014 e entressafra 2015) (Figuras 2.32). Já os demais pontos de venda da polpa do açaí apresentaram polpas do açaí com distinção entre os períodos de safras e entressafras dos anos analisados (2014-2017).

Essas verificações indicam que a maioria dos comerciantes dos batedores de açaí (monitorados na cidade de Belém) compram os frutos do açaí nos mercados centrais com grande frequência e muito provavelmente não trabalham com estoques da polpa congelada. As verificações observadas para os três (3) locais que provavelmente armazenaram polpas congeladas na safra de 2014 (jul-dez) e a comercializaram na entressafra de 2015 (jan-jun) corroboram com as informações fornecidas pelos colaboradores que realizaram a compra das polpas, que afirmaram que esses locais são grandes comércio da cidade, principalmente CA25 e CAL.

É possível que um incentivo governamental aos comerciantes em relação a este ponto seja interessante para evitar problemas econômicos devido ao aumento dos preços, escassez do produto e auxiliar como medida de controle de qualidade da polpa do açaí. Pois se ela for pasteurizada e armazenada nos períodos de alta produção (safra), pode fornecer polpas no período da entressafra (baixa frutificação) com melhor qualidade sensorial que é mais aceitável pelo mercado consumidor, principalmente o externo (NOGUEIRA 2005; OLIVEIRA, 2007).

4.4. Amostras de polpas do açaí expostas à temperatura e luz ambiente (Estudo da degradação).

O efeito da exposição à temperatura e luz ambiente das polpas de açaí *in natura* foi avaliado. A polpa do açaí foi exposta em condições ambientes (temperatura e iluminação solar local) por seis (T6) e doze (T12) horas. Tempo zero (T0) é o tempo em que a amostra da polpa do açaí comercial chegou ao laboratório da Embrapa e logo foi liofilizada.

4.4.1. Análise quimiométricas

Com os resultados observados nas análises quimiométricas dos dados de RMN de ^1H para as amostras comerciais obtidas nas entressafras (período de chuvas), verificou-se que os sinais responsáveis por sua discriminação podem ser produtos de fermentação ou degradação da polpa. E dessa forma, realizamos um estudo com uma amostra comercial degradada a fim de verificar e entender quais são os processos envolvidos quando a polpa do açaí liofilizada fica exposta à temperatura e luz por 6 e 12 h.

Para o estudo quimiométrico foram utilizados 310 espectros de RMN de ^1H (Tabela 2.8). A matriz de dados foi montada com 160 *bucket table* de tamanho variável com modo de integração por intensidade positiva, as variáveis geradas não foram escalonadas e utilizou-se 95% de nível de confiança.

TABELA 0.8 - Amostras utilizadas no estudo de degradação da polpa do açaí.

Amostras comerciais de Belém - PA	Quantidade de amostras	Número de espectros de RMN de ¹ H
Safra 2014	10	50
Entressafra 2015	10	50
Safra 2015	10	50
Entressafra 2016	10	50
Safra 2016	10	50
Entressafra 2017	10	50
Exposição por 6h	1	5
Exposição por 12 h	1	5
Total	62	310

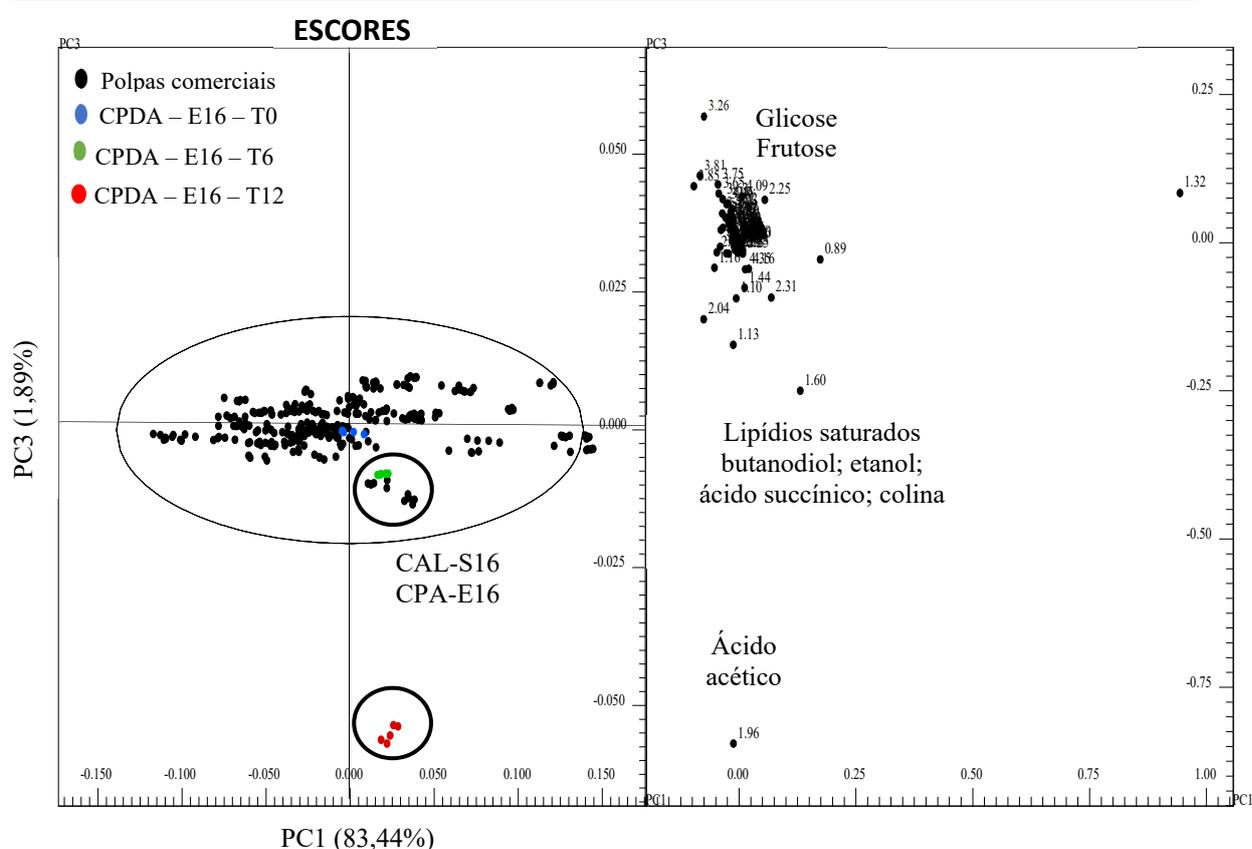


FIGURA 0.31 - Gráfico de escores e pesos da PC1 x PC3 (85,33% variância total) das amostras de polpas dos comerciais do açaí e amostras expostas por 6 e 12 horas.

Com o gráfico de escores da PC1 x PC3 (Figura 2.31) foi possível verificar uma tendência em relação às polpas do açaí expostas à temperatura e a iluminação ambientais. A amostra no tempo zero (T0) (sem exposição) se localizou no centro do modelo junto com a grande parte das polpas comerciais. No entanto, quando exposta a condições ambientes por seis horas (T6, cor verde), a polpa apresenta um afastamento da amostra original e o mesmo acontece com a polpa

exposta por doze (T12, cor vermelho), que se apresenta mais distante ainda de todas as demais amostras. Verifica-se então que o perfil químico dos compostos presentes na polpa do açaí sofre alteração no decorrer do tempo da exposição. Algumas polpas apresentaram proximidades com a amostra exposta por seis horas (T6), foram as amostras CAL-S16, CPA-E16 e CAL-E16.

No gráfico de pesos (Figura 2.31), foi possível verificar que a amostra exposta por doze (12) horas apresentou alta concentração de ácido acético mostrado pela variável com deslocamento químico em δ 1,96 e, o grupo de amostras com a polpa exposta por seis (6) horas apresentou variáveis relacionadas aos compostos 2,3-butanodiol, colina, etanol, ácido succínico e triacilglicerídeos saturados. No eixo oposto, pode-se verificar sinais de carboidratos como frutose e glicose.

O etanol, o ácido acético, 2,3-butanodiol e o ácido succínico podem ser produtos e subprodutos da fermentação de carboidratos por microrganismos aeróbios ou anaeróbios que ocorrem naturalmente em plantas e alimentos com exposição ao ar, elevadas temperaturas ou longo tempo de prateleira (HMDB; HAN et al., 2006; SHUMILINA et al., 2015, 2016). Isso sugere que as polpas CAL-S16; CPA-E16 e CAL-E16 que estão próximas da exposta por seis horas (CPOA-E17-T6) sofreram processos fermentativos levando à degradação.

A fim de entender como esses compostos identificados no gráfico de pesos, estão relacionados e quais são as reações que estão envolvidas na degradação da polpa realizamos a análise dos espectros de RMN de ^1H das polpas do ponto de venda CPDA no tempo zero (T0), tempo seis (T6) e tempo doze (T12) horas de exposição à temperatura e luz.

4.4.2. Análise dos espectros de RMN de ^1H

O perfil espectral das polpas do açaí comercial (CPOA-E16) nos três (3) tempos de exposição analisados (T0, T6 e T12) é similar. No entanto foram verificadas diferenças na intensidade da maioria dos sinais, mas também a ausência/surgimento em outros (Figura 2.32)

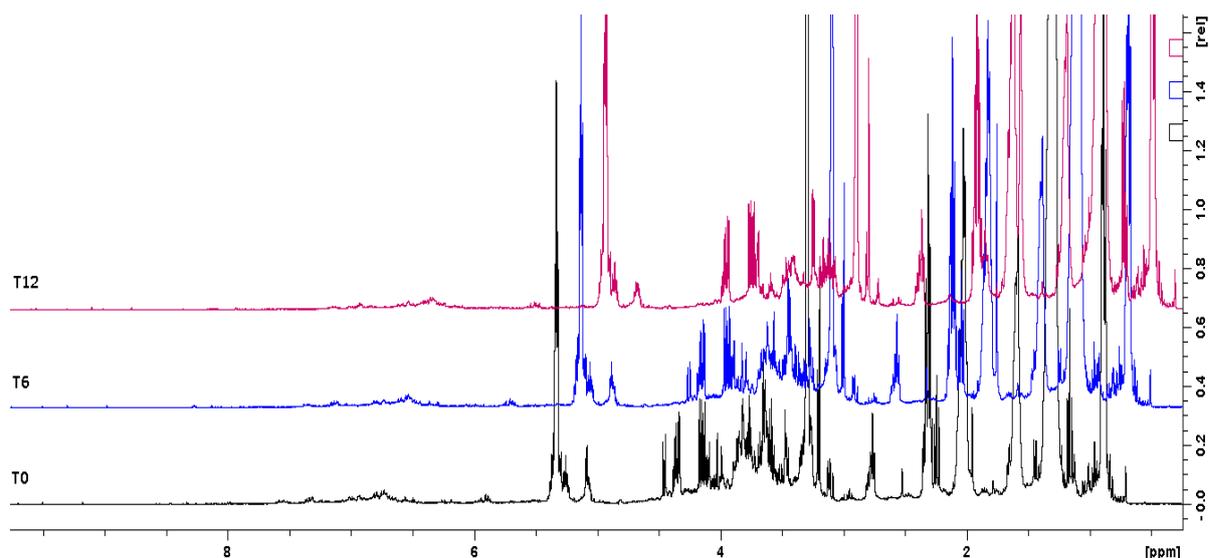


FIGURA 0.32 - Espectros de RMN de ^1H dos extratos metanólicos da polpa de açai liofilizado nos tempos de exposição T0, T6 e T12. MeOH-d4 com 0.02% TMS-d4 em um 400 MHz.

A atribuição dos metabólitos presentes na polpa foi realizada utilizando os dados publicados para padrões de referência nas bases de dados (HMDB, SDBS, YMDB), dados da literatura (FAN & LANE, 2008; CARPINELLI et al., 1984 e MERCHANT & GLONEK, 1990 e VAN DER REST, 2002; SHUMILINA et al., 2015; BEN-YOSEPH et al., 1993); e experimentos de RMN 1D (^1H , ^{13}C , ^{31}P) e 2D (COSY, JRES, HSQC e HMBC) realizados para esse fim. A maioria dos compostos majoritários é idêntica aos determinados nas amostras de *fingerprint profile* abordados anteriormente (Item 4.1; Tabela 2.6) e os identificados neste estudo de degradação podem ser verificados na Tabela 2.9.

TABELA 0.9 - Atribuições de sinal para espectro de RMN de ^1H da polpa de açai comercial CPDA submetida à exposição solar e temperatura.

Compostos	$^1\text{H}^*$ δ em ppm (J em Hz)	COSY (ppm)	HSQC (δ ^{13}C ppm)	HMBC (δ ^{13}C ppm)
2,3-butanodiol (2,3-But.1) meso	1,12 d (6,30)	3,54; 3,72	20,65	74,3
2,3-butanodiol (2,3-But.2)	1,10 d (6,20)	3,50; 3,73	20,65	-
Colina (Col)	3,19 s	-	54,81	71,4
Glicerofosocolina (GPC)	3,20 s	-	54,70	69,4
			* -0,57	#4,28; 3,99; 3,62; 3,65

Continuação Tabela 2.9

Hidrogênios metilênico composto desconhecido 1 (UNK1)	2,24 t (7,5)	1,60	37,20	180,2; 32,2; 28,3
Desconhecido 2 (UNK2)	2,15 s	-	-	-

Na Figura 2.33 pode-se verificar a atribuição dos sinais dos compostos identificados nas amostras nos tempos de exposição 0, 6 e 12 horas e a partir disso realizou-se a análise do perfil por RMN de ^1H das mesmas por regiões espectrais.

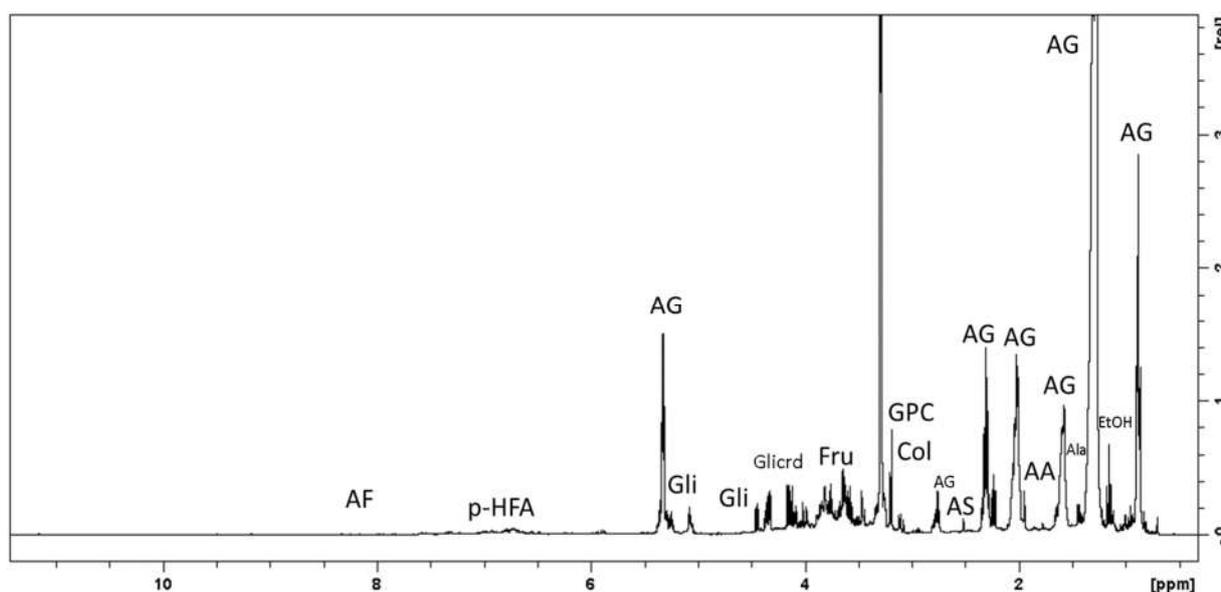


FIGURA 0.33 - Espectro de RMN de ^1H com atribuições dos sinais mais intensos. Polpa de açaí liofilizado em MeOH- d_4 com 0.02% TMSP- d_4 em um 400 MHz. AG: ácido graxo; EtOH: etanol; Col: colina; GPC: glicerofosforilcolina; Fru: frutose; Gli: glicose; AF: ácido acético; p-HFA: ácido hidroxifenilacético.

i) Região analisada com sinais entre 0.7 – 3.0 ppm

Esta região analisada apresentou sinais típicos de compostos alifáticos, aminoácidos, ácidos orgânicos e outros. Os sinais de ácidos graxos saturados, insaturados e de glicerídeos apresentaram grandes intensidades nos espectros. Foram ainda atribuídos nessa região, os sinais para os seguintes aminoácidos: ácido glutâmico (Glu), alanina (Ala), glutamina (Gln), ácido aspártico (Asp) e ácido γ -aminobutírico (GABA), ácido acético e succínico, e outros compostos como etanol, acetona e 2,3-butanodiol também foram detectados nessa região (Figura 2.34).

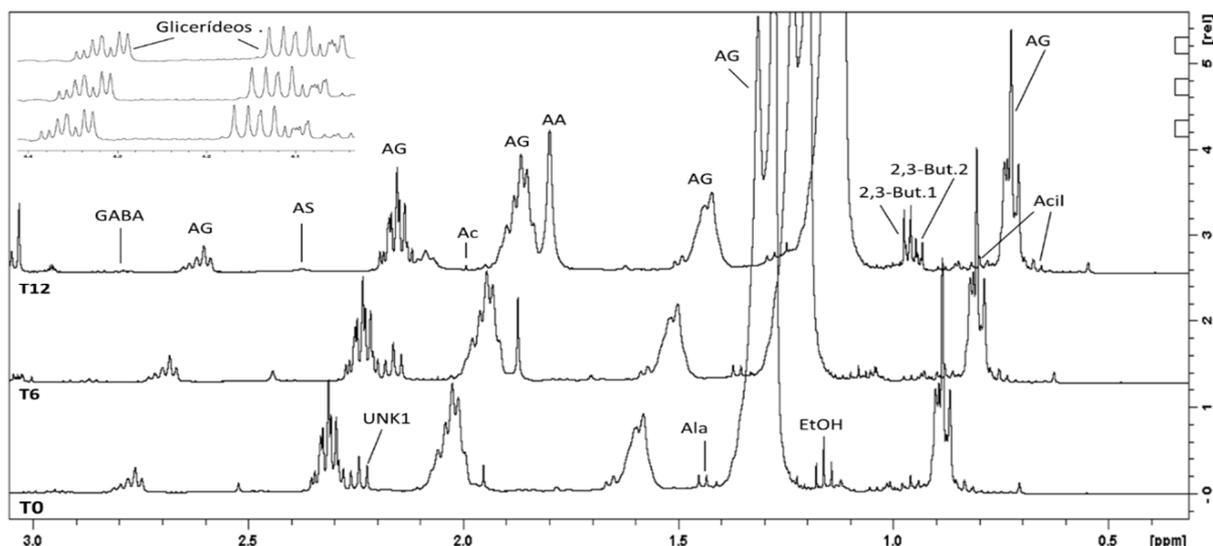


FIGURA 0.34 - Espectros de RMN de ^1H na região de 0,7 - 3,0 ppm das polpas de açaí liofilizado. MeOH-d₄ com 0.02% TMSP-d₄ em um 400 MHz a 300 K. Tempos de exposição: **T0** (abaixo), **T6** (intermediário) e **T12** (acima).

O efeito da exposição nas polpas de açaí por dois (2) diferentes períodos foi observado por espectroscopia de RMN de ^1H analisando a região de 0,7 a 3,0 ppm dos espectros obtidos, em especial, na polpa com 12h de exposição (T12) foram observadas a formação dos compostos 2,3-butanodiol referente ao composto meso (But2; δ 1,12) e da mistura racêmica (But1; δ 1,10 ppm), respectivamente; o aumento muito evidente na intensidade do ácido acético (AA; s, δ 1.95), o consumo total do etanol (EtOH; t, 1.17 ppm) e do ácido succínico (AS; s, δ 2.52) e a mudança na multiplicidade do composto desconhecido 1 (UNK1, t, δ 2.24).

Foi possível notar também que o sinal do composto GABA (t, δ 2.95) diminui sua intensidade no decorrer do tempo de exposição e o composto denominado desconhecido 2 aumenta de intensidade (UNK2, s, δ 1.15).

ii) Região analisada com sinais entre 3.0 – 5.5 ppm

Esta região apresentou sinais de compostos insaturados (ésteres de ácidos graxos e glicerídeos), aminoácidos, carboidratos e outros. Foram atribuídos nessa região, os hidrogênios ligados ao carbono- α dos seguintes aminoácidos: ácido glutâmico (Glu), glutamina (Gln), ácido aspártico (Asp), serina (Ser). Os carboidratos

glicose e frutose e os compostos colina (Col), glicerofosfocolina (GPC) e ácido ascórbico (Vit.C) foram detectados nessa região (Figura 2.35).

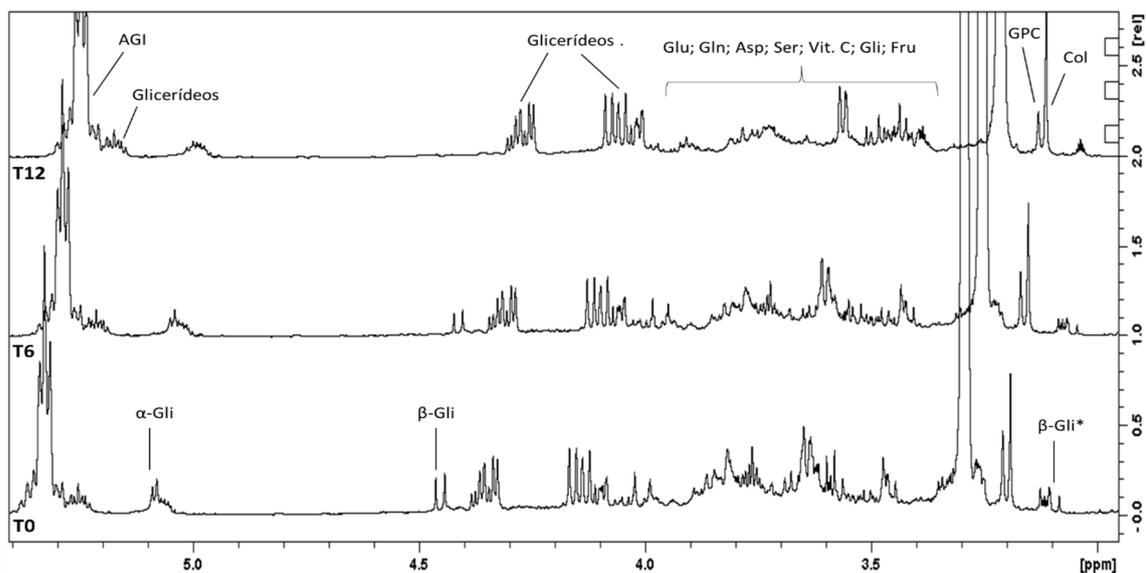


FIGURA 0.35 - Espectros de RMN de ^1H da região entre 3.0 – 5.5 ppm das polpas de açaí liofilizado. MeOH- d_4 com 0.02% TMSP- d_4 em um 400 MHz a 300 K. Tempos de exposição: T0 (abaixo), T6 (intermediário) e T12 (acima).

Foi possível verificar que na polpa com 12 horas de exposição (T12) houve o consumo total da glicose (Gli; δ 4.45 d; δ 5,08 d e δ 3.12 dd) e a diminuição na intensidade do glicerofosforilcolina (GPC; s, δ 3.20) (Figura 2.39). Foi possível notar também que os demais sinais presentes nessa região espectral não apresentaram variação ou a variação foi insignificante no decorrer do tempo de exposição.

iii) Região analisada com sinais entre 5.5 – 11.0 ppm

Esta região apresentou sinais típicos de compostos aromáticos e nitrogenados. Apenas alguns compostos como fenilalanina (Phe) e os ácidos fórmico (AF) e 4-hidroxifenilacético (Ac. p-HFA) foram caracterizados nessa região, devido a sobreposição dos sinais ou a não verificação das correlações nos espectros de RMN 2D.

Verificou-se a diminuição da intensidade na maioria dos sinais com o decorrer do tempo da exposição das polpas de açaí (Figura 2.36).

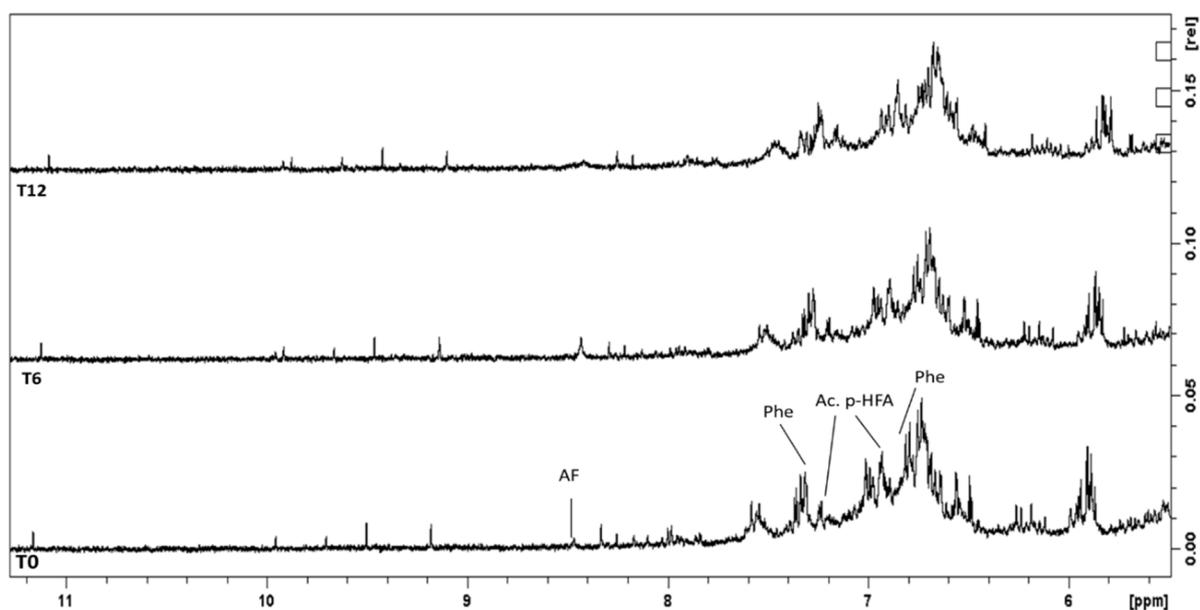


FIGURA 0.36 - Espectros de RMN de ¹H da região entre 5.5 a 11.0 ppm para polpas de açaí liofilizado. MeOH-d₄ com 0.02% TMSP-d₄ em um 400 MHz a 300 K. Tempos de exposição: T0 (abaixo), T6 (intermediário) e T12 (acima).

Para a obtenção de dados estatísticos de alguns metabolitos verificados nas análises dos perfis por RMN de ¹H (item b) e dos compostos que apresentaram maior significância nas análises quimiométricas (item a), as integrais relativas foram obtidas nos espectros de RMN de ¹H da polpa nos tempos 0, 6 e 12 horas de exposição à temperatura e luz. Com os valores foi realizada a análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey ($p < 0,05$) utilizando o programa R™.

Dessa forma, foi verificado que a concentração de cinco (5) compostos não identificados na região de 5,5 a 11 ppm diminuem significativamente com a exposição da polpa do açaí (Figura 2.37).

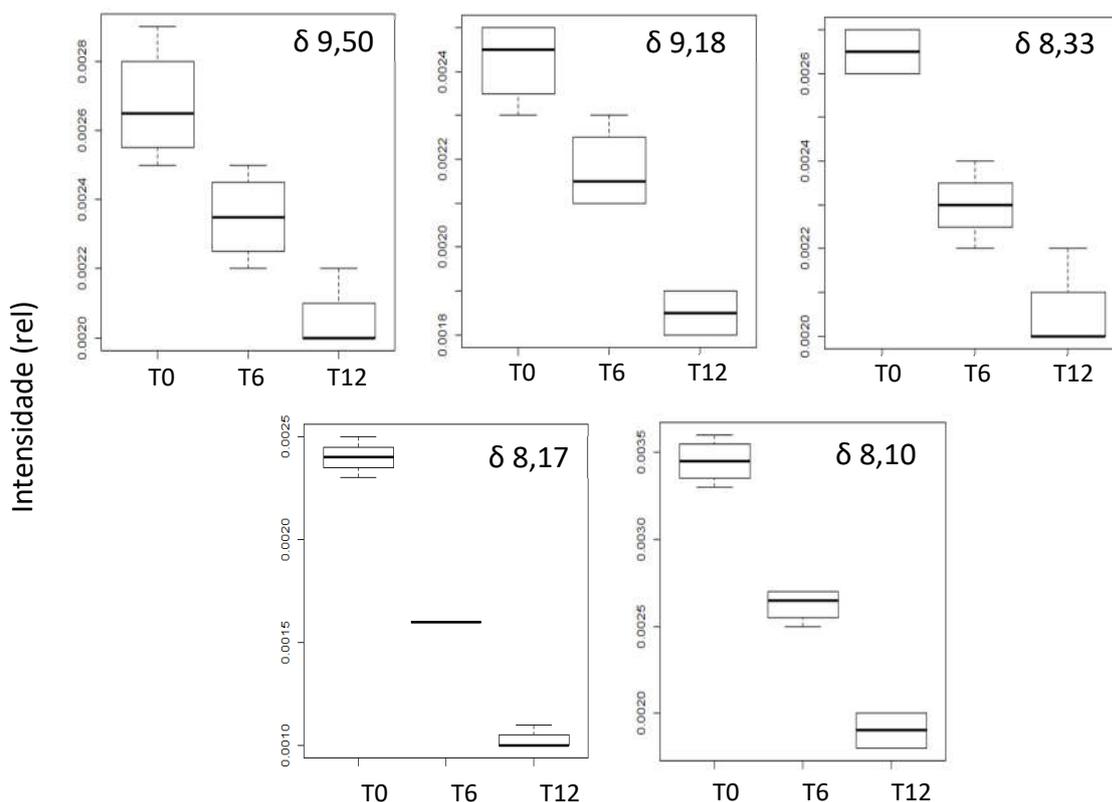


FIGURA 0.37 - Variação de alguns metabolitos na polpa do açaí comercial CPOA exposta por 0, 6 e 12 horas na região de 0,7 a 3,0 ppm espectro de RMN de ^1H .

Embora os compostos relativos à estes sinais não tenham sido atribuídos devido a falta da verificação de correlações nos experimentos de RMN 2D, possivelmente sejam nucleotídeos como adenosina, xipoxantina, inosina ou seus derivados (CHAUTON et al., 2015; SAVORANI et al., 2010; YE et al., 2012). Já foram descritos em alimentos como pasta de caranguejo (YE et al., 2012), cerveja, suco de uva (GIL et al., 2003), peixes (SAVORANI et al., 2010; SHUMILINA et al., 2015) e, alguns estão associados com a degradação em alimentos (SHUMILINA et al., 2015).

Foi possível visualizar que os compostos glicose com deslocamento químico em δ 4,46 e etanol em δ 1,16 estão sendo consumidos durante o tempo de exposição da polpa e, isso sugere que os mesmos não estão relacionados entre si por meio da fermentação alcoólica pois se fosse seria observado um comportamento inverso.

Vários processos fermentativos utilizam a glicose como um substrato, no entanto a produção do composto 2,3-butanodiol (δ 1,10 e 1,13) sugere que esses compostos estejam relacionados por meio da fermentação butanodioica.

O composto 2,3-butanodiol (2,3-BD) possui três (3) formas estereoisoméricas: (2S,3S)-2,3-BD, (2R,3R)-2,3-BD e meso-2,3-BD (Figura 2.38).

Esses compostos são subprodutos naturais de hexoses e pentoses produzidos por uma variedade de microrganismos como *Saccharomyces cerevisiae*, *Klebsiella spp*, *Bacillus spp*, *Lactococcus lactis*, *Enterobacter aerogenes*, *Aeromonas hydrophila*, *Serratia marcescens*, *Methanocaldococcus spp*, dentre outros, em um processo conhecido como fermentação butanodioica.

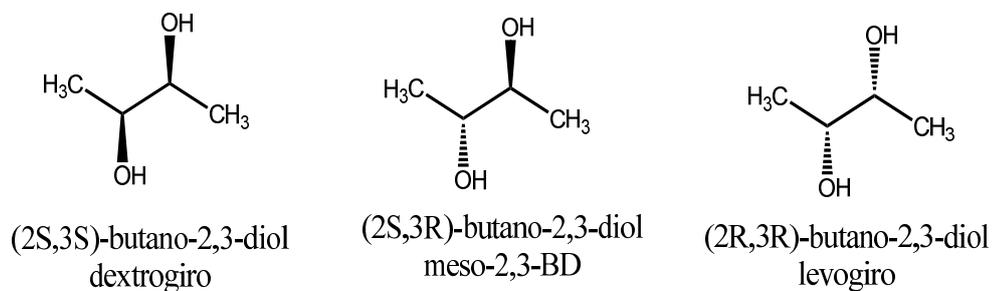


FIGURA 0.38 - Os estereoisomêros do 2,3-butanodiol.

Os estereoisômeros do 2,3-butanodiol são produzidos a partir da molécula precursora piruvato (via glicolítica) e, neste processo de fermentação natural envolve compostos intermediários como o acetolactato, acetoin e diacetil (KEGG; LIU et al., 2011; BIEBL et al., 1999; SHUMILINA et al., 2016 (Figura 2.39).

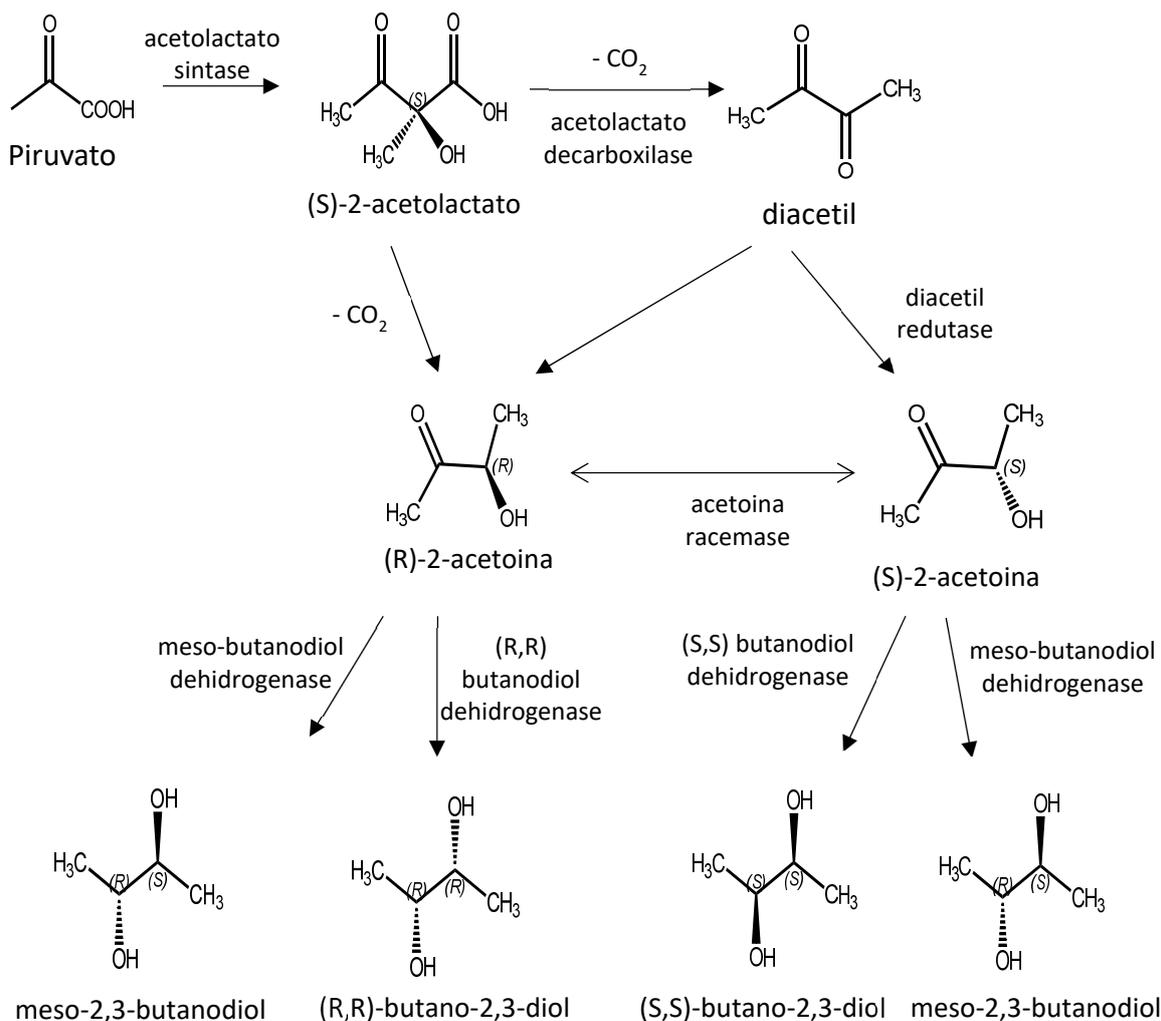


FIGURA 0.39 - Via bioquímica da fermentação butanodioica a partir do piruvato.

A estereoquímica dos metabolitos individuais pode ser desenvolvida pela estereoespecificidade da enzima individual que catalisa cada etapa.

Esse composto já foi encontrado em alguns alimentos como vinagres, cacau, carne, salmão fresco e foi verificado aumento na concentração com tempo de estocagem, temperatura e tipo de embalagem (CALIGIANI et al., 2007; ERCOLINI et al., 2011; SHUMILINA et al., 2016). Ele é característico em produtos de média acidez (BIEBL et al., 1999) e como o pH da polpa do açaí é em torno de 4,08 a 5,40 (CARVALHO et al., 2010; NASCIMENTO et al., 2008; SOUSA et al., 2006; NEVES et al., 2015) é muito provável que esse fenômeno ocorreu como um dos processos de degradação da polpa.

Em função da glicose atuar como um substrato, seu consumo total no decorrer do tempo de exposição da polpa do açaí foi associado a fermentação butanodioica (Figura 2.40).

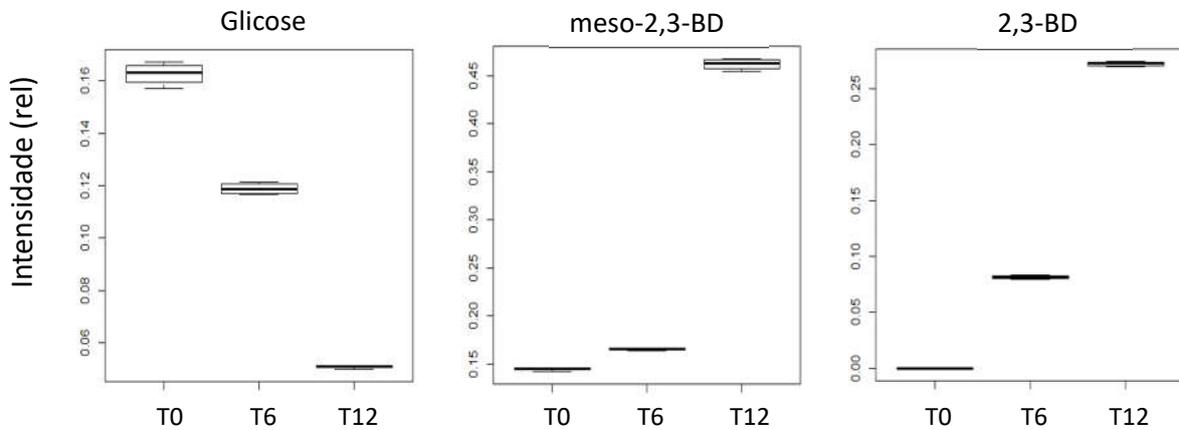


FIGURA 0.40 - Variação dos metabolitos glicose e 2,3-butanodiol na polpa do açaí comercial CPOA exposta por 0, 6 e 12 horas.

Como citado anteriormente, o ácido acético é produzido por bactérias do gênero *Acetobacter* e *Gluconobacter*, que normalmente estão presentes em frutos e vegetais pelo processo de fermentação acética ou oxidação do etanol (CONSTANTINO, 2008 e RIZZON, 2006). A fermentação é composta da formação do acetaldeído por oxidação do etanol e então convertido a ácido acético.

Como o composto etanol é consumido, é possível que ele atue como um substrato e o seu consumo no decorrer do tempo de exposição da polpa do açaí pode estar associado a esse tipo de fermentação (Figura 2.41).

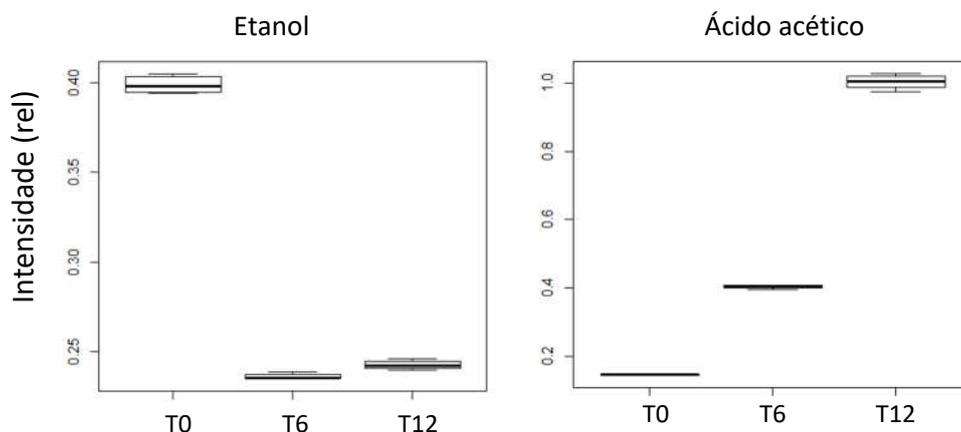


FIGURA 0.41 - Variação dos compostos etanol e ácido acético na polpa do açaí comercial CPOA exposta por 0, 6 e 12 horas.

Foi verificado também que ocorre uma inversão nas concentrações dos sinais em com deslocamento químico em 3,20 ppm (glicerofosforilcolina) e 3,19 ppm (colina), no qual o primeiro diminui e o segundo aumenta (Figura 2.42).

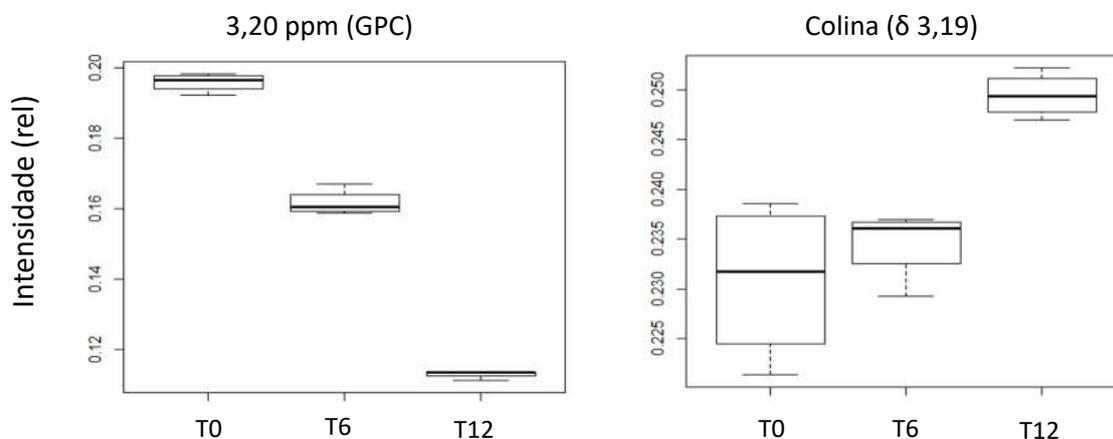


FIGURA 0.42 - Variação dos compostos colina e glicerofosforilcolina na polpa do açaí comercial CPOA exposta por 0, 6 e 12 horas. GPC: glicerofosforilcolina.

Existe dificuldade de resolução espectral por RMN de ^1H para identificação inequívoca entre os metabólitos glicerofosfocolina (GPC) e fosfocolina (PC), componentes das membranas plasmáticas, pois ambos os dois apresentam um singlete correspondente as metilas da amina em deslocamento químico idêntico (VILLA et al., 2013), então muitas vezes o uso do RMN de ^{31}P se faz necessário.

Para confirmar o metabólito com deslocamento químico em δ 3,20 e assim propor o mecanismo bioquímico que está relacionado com a formação da colina (Figura 2.48), obtivemos espectro de RMN de ^{31}P para as polpas do açaí no tempo zero (T0) e tempo doze (T12) horas de exposição (Figura 2.43).

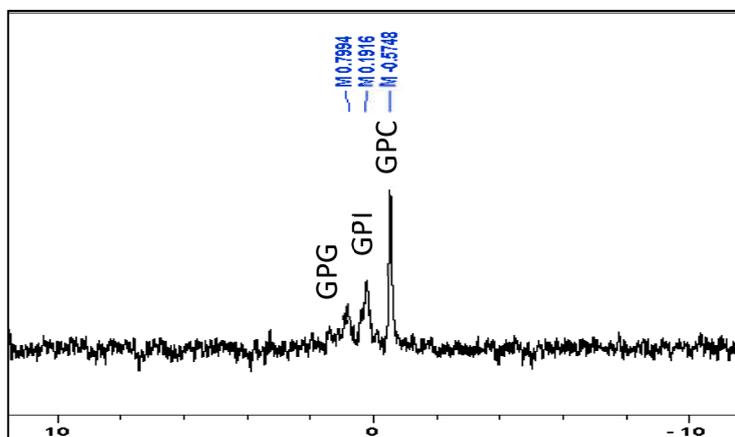


FIGURA 0.43 - Espectro de RMN de ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ da polpa do açaí com zero horas de exposição (T0) com atribuições dos compostos identificados.

O sinal com deslocamento químico em -0,57 ppm no espectro de RMN de ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ (Figura 2.43) e suas correlações no mapa de correlação HMBC (Figura 2.44) confirmaram a presença do composto glicerofosforilcolina (GPC) (CARPINELLI et al., 1984; DENNIS & PLUCKTHUN, 1984; REST et al., 2002; LOENING et al., 2005).

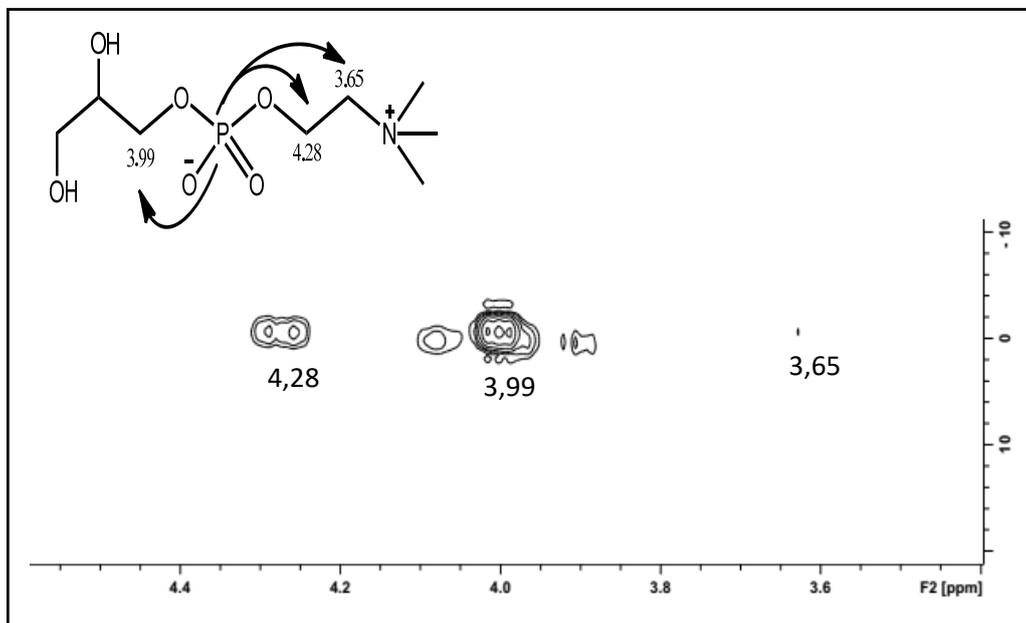


FIGURA 0.44 – Mapa de contornos $^1\text{H} - ^{31}\text{P}$ HMBC da polpa do açaí zero horas de exposição (T0) com as correlações identificadas na estrutura. Sequência de pulso *hmbcgpndgf* com 128 varreduras. MeOH-d_4 em um 400 MHz.

Os demais sinais observados são de outros glicerofosfodiésteres, provavelmente o glicerofosfoinositol (GPI; δ 0,1916) e o glicerofosfoglicerol (GPG; δ 0,7994) presente em menor concentração na polpa do açaí com zero horas de exposição (T0) (REST et al., 2002; MERCHANT & GLONEK, 1990).

Os fosfolipídios são componentes primários em todas as membranas celulares. O glicerofosforilcolina (GPC), um produto da completa deacilação da fosfatidilcolina, é precursor da colina que é uma amina responsável pela síntese dos fosfolipídios. Ambos são amplamente encontrados em alimentos (KEGG, 2017; ZEISEL et al., 2003; REST et al., 2002). A via metabólica para a inter conversão dos compostos individuais são mostrados na Figura 2.45.

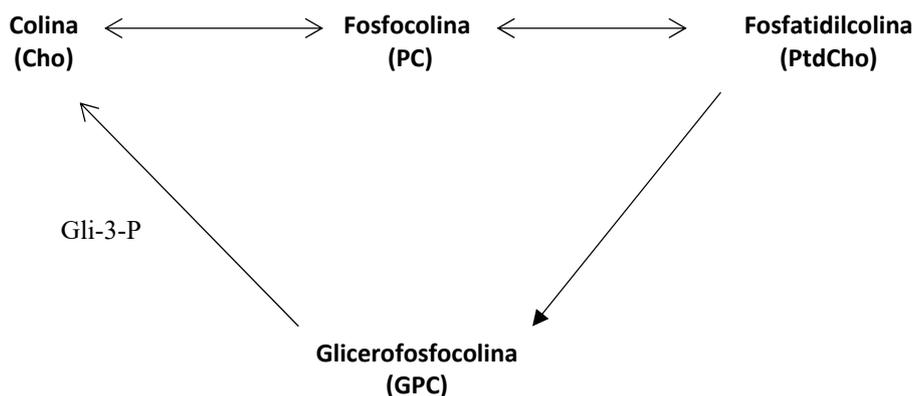


FIGURA 0.45 - Esquema geral da via metabólica da colina.

Na área de alimentos, os compostos colina, fosfocolina e glicerofosforilcolina já foram descritos como biomarcadores de degradação em amostras de peixes e queijos (LAMANNA et al., 2008 e LOCCI et al., 2011). É possível que esses compostos estejam relacionados com processo de oxidação lipídica (FERRARI, 1998).

Com os espectros de RMN de ^{31}P verificou-se a diminuição do composto GPC com o tempo de exposição da polpa de 0 para 12 horas (Figura 2.46).

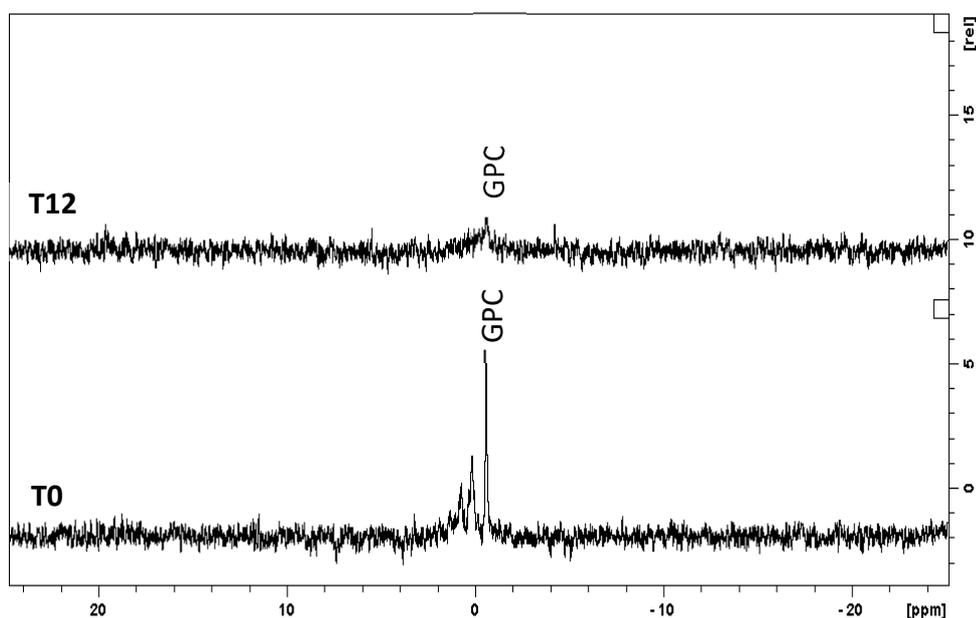


FIGURA 0.46 - Espectros de RMN de ^{31}P das polpas do açaí no tempo 0 (abaixo) e tempo 12 horas (acima). GPC: glicerofosfocolina.

Apesar de não se observar a formação do glicerol-3-fosfato (Gli-3-P) em torno de 4,4 ppm (REST et al., 2002; DENNIS & PLUCKTHUN, 1984), as demais verificações observadas nos espectros de RMN de ^1H e ^{31}P sugerem que, no decorrer

do tempo de exposição da polpa do açaí ocorrem alterações na concentração de metabolitos envolvidos no metabolismo dos fosfolipídios, a partir da conversão da GPC em colina. Sabe-se que processos de degradação em matrizes de alimentos envolvem atividades enzimáticas e mecanismos complexos que ainda estão em progresso (SECCO et al., 2012).

Com os resultados verificados é possível sugerir que o ácido acético, o 2,3-butanodiol e a glicofosforilcolina sejam possíveis marcadores de degradação da polpa do açaí *in natura*.

Capítulo III: Análises físico-químicas das polpas do açaí e tratamento quimiométrico dos dados

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1. Preparo das polpas do açaí – Genótipos e Comerciais

As 31 polpas de genótipos provenientes do Banco de Germoplasma de Açaizeiro da Embrapa Amazônia Oriental (CPATU) da cidade de Belém – PA e as polpas obtidas no comércio local da cidade de Belém - PA (10 pontos de venda) utilizadas para os ensaios de caracterização físico-química foram as mesmas descritas no Capítulo 2 deste trabalho (Tabela 2.1 e 2.2). As polpas possuem a classificação ‘açaí do tipo médio’ ou ‘Tipo B’, com teor de sólidos totais entre 11 a 14% m.m. (BRASIL, 2000).

Ambas as polpas (genótipos e comerciais) foram acondicionadas em tubos Falcon® de 5 mL (em triplicata), secas em equipamento de secagem rápida por centrifugação e vácuo (*SpeedVac*®) a fim de cessar a atividade enzimática e impedir o crescimento microbiano e, então mantidas sob refrigeração a –18 °C.

5.2. Análises físico-químicas das polpas do açaí

As análises de pH, sólidos solúveis totais, acidez titulável, determinação da composição centesimal e fenólica das polpas do açaí foram realizadas no Laboratório de Agroindústria localizado na Embrapa Amazônia Oriental (Belém- PA) e para cada parâmetro, os ensaios foram realizados em triplicata de acordo com as seguintes metodologias:

a) pH: medidas realizadas com pHmetro MS TECNOPON (modelo Luca 210) seguindo o método nº 981.12 da *American Oil Chemist Society*, (AOAC, 1997) .

b) Sólidos solúveis totais (°Brix): medidas realizadas com refratômetro digital REICHERT (modelo AR 200) seguindo o método nº 932.12 da AOAC (1997). As polpas do açaí foram diretamente gotejadas sobre o prisma do refratômetro. Valores expressos em °Brix (símbolo °Bx).

c) Acidez titulável total: medidas de titulação com auxílio de pHmetro, segundo o método nº 942.15 da AOAC (1997). Acidez expressa em ácido cítrico (g/100 g amostra).

d) Umidade: medidas realizadas seguindo o método gravimétrico nº 920.151 da AOAC (1997). Valores expressas em g/100 g amostra.

e) Cinzas totais: medidas realizadas seguindo o método gravimétrico nº 940.26 da AOAC (1997). Valores expressos em g/100 g amostra.

f) Fibras totais: medidas realizadas seguindo o método de detergência, segundo GOERING e VAN SOEST (1970). Valores expressos em g/100 g amostra.

g) Proteínas totais: medidas realizadas seguindo o método de Kjeldahl nº 920.152 da AOAC (1997). Valores expressos em g/100 g amostra.

h) Lipídios totais: extrações realizadas por solvente a quente em aparato *Soxhlet*, seguindo método AOAC (1997). Valores expressos em g/100 g amostra.

i) Teor de antocianinas totais e monoméricas: medidas realizadas pelo método de pH diferencial, conforme descrito por GIUSTI e WROLSTAD (2001). Os extratos aquosos filtrados foram apropriadamente diluídos em dois tampões: cloreto de potássio 0,025 M, pH 1 e acetato de sódio 0,4 M, pH 4,5. Foram feitas medidas de absorvância a 510 nm e 700 nm em um espectrofotômetro SHIMADZU UV-VIS (160-A) utilizando cubetas com um (1) cm de largura. O teor dos pigmentos foi calculado considerando a absorvância molar (ϵ) de 26,900 L.cm⁻¹.mol⁻¹ e peso molecular de 449,2 g.mol⁻¹ da cianidina-3-glicosídeo. Os valores são expressos como mg de cianidina-3-glicosídeo/100 g de polpa do açaí.

j) Compostos fenólicos totais: medidas realizadas pelo método proposto por Singleton & Rossi (1965), modificado por Georgé et al. (2005). As amostras foram extraídas com acetona/água (70:30), carbonato de sódio (7,5%) e o reagente de Folin-Ciocalteu. Uma curva padrão de ácido gálico foi elaborada com as concentrações de 20, 40, 60, 80 e 100 mg/litro. Foram feitas medidas de absorvância a 760 nm em um espectrofotômetro SHIMADZU UV-VIS (160-A) utilizando cubetas com um (1) cm de largura. O teor de fenólicos totais, expresso em mg de ácido gálico por 100 g de amostra, foi calculado de acordo com a equação:

$$\text{Fenólicos totais} = C \times (D_{\text{EB}}/m_a) \times 100$$

Onde: C = concentração de ácido gálico na solução de amostra (mg/l) referente ao Extrato Bruto (EB); D_{EB} = diluição da amostra referente ao Extrato Bruto (EB) em litros; m_a = massa da amostra utilizada na extração, expressa em gramas (g)

5.3. Análises quimiométricas

Para cada parâmetro analisado, os resultados das amostras foram expressos com média \pm desvio padrão (n=3). Os estudos de Análise de Componentes Principais (PCA) foram realizados com o programa MatLab® R2011a do Laboratório de Quimiometria Aplicada no Departamento de Química da UFSCar.

Foi analisado todo o conjunto de amostras das polpas do açaí (genótipos e comerciais) e, as matrizes isoladamente (apenas as comerciais e apenas as de genótipos) considerando as variáveis: composição físico-química (pH, AA, SS, proteínas, lipídios, umidade, fibras, cinzas) e composição fenólica (antocianinas totais, monoméricas e compostos fenólicos).

Não foram realizados pré-tratamentos nos dados e o autoescalonamento foi aplicado gerando o mesmo peso para todas as variáveis. Os estudos foram realizados a fim de verificar tendências em relação à sazonalidade (safra x entressafra), tipo de cultivo (palmeiras com controle agrônômico x sem controle) e melhoramento genético dos frutos do açaí desenvolvido na Embrapa Amazônia Oriental (CPATU) de Belém - PA.

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1. Análises físico-químicas

Nas Tabelas 3.1 e 3.2 podem ser verificados os resultados das medidas físico-químicas, análises centesimais, antocianinas e fenólicos para as polpas do açaí comerciais e de genótipos. A tabela completa pode ser verificada no APÊNDICES (Tópico Capítulo 3).

6.1.1. pH, acidez titulável (AT) e sólidos solúveis totais (SST)

As medidas de pH, AT e SST são amplamente utilizadas na verificação de conformidades em alimentos com objetivo de garantir a qualidade e evitar adulterações e fraudes nos produtos comercializados.

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) possui limites estabelecidos através dos Padrões de Identidade e Qualidade Mínima (PIQ) para Polpas de Frutos pela Instrução Normativa nº 01, de 7 de janeiro de 2000, com o objetivo de auxiliar no controle de qualidade de produtos comerciais (BRASIL, 2000).

pH:

As medidas de pH das polpas do açaí de genótipos provenientes da cultivar da Embrapa Amazônia Oriental e de dez (10) diferentes estabelecimentos comerciais de Belém (PA) obtidas em cinco períodos de coleta entre os anos de 2014 a 2017 apresentaram valores entre 4,46 e 5,56 (TABELA 3.1 e APÊNDICE Item 3). A faixa de pH encontrada nas polpas do açaí caracteriza-o como um fruto com baixa acidez.

A amostra de maior acidez (comercial CAU) foi obtida na safra do açaí (julho a dezembro) de 2014 e a menos ácida (comercial CAF) foi obtida na entressafra (janeiro a junho) de 2017.

Os valores de pH obtidos para as polpas comerciais e de genótipos estão de acordo com o limite determinado pelos PIQ do açaí que estabelece a faixa entre 4,0 – 6,20 (BRASIL, 2000) e com os encontrados na literatura (4,08 - 5,40) (CARVALHO et al., 2010; NEVES et al., 2015; NASCIMENTO et al., 2008; SOUSA et

al., 2006). Já em um estudo com polpas do açaí comerciais de Fortaleza – CE, duas (2) amostras apresentaram pH mais ácido, sendo 3,76 e 3,80 (SANTOS et al., 2008).

ACIDEZ TITULÁVEL (AT):

As medidas de AT para as polpas do açaí apresentaram valores entre 1,22 - 2,60 e 0,85 - 1,89 g de ácido cítrico/100 g de polpa para amostras comerciais de Belém-PA e de genótipos da Embrapa Amazônia Oriental, respectivamente (TABELA 3.1 e APÊNDICE Item 3).

Tanto as amostras com maior acidez titulável (genótipo G6 e comercial CAI) quanto as de menor acidez titulável (G22 e CPA) foram obtidas quanto nas safras (período de seca) como nas entressafras (período de chuvas) do açaí. Sendo entressafra/2016 (G6) e safra/2015 (CAI) para as amostras com maiores valores de AT e safra/2015 (G22) e entressafra/2016 (CPA) para as de menor AT.

Os valores de AT obtidos nesse trabalho estão próximos dos reportados por Neves e colaboradores, no qual foram encontradas amostras com 1,73 - 2,47 g de ácido cítrico /100 g em polpas do açaí de Roraima e, eles notaram que o teor de acidez aumenta com os dias de armazenamento da polpa (NEVES et al., 2015). Em amostras comerciais de Manaus – AM foram encontrados os valores de 1,8 g de ácido cítrico /100 g para polpas *in natura* e 2,7 g/100 g para polpas com fervura e pasteurizadas (SOUSA et al., 2006). Um estudo realizado com frutos em diferentes estágios de maturação mostrou que o valor de AT em polpas do açaí diminui com o amadurecimento dos frutos, no qual foram encontrados 2,8 g /100 g para frutos não maduros, 1,5 g/100 g para frutos intermediário e 1,2 g de ácido cítrico /100 g para frutos maduros (GORDON et al., 2012).

De acordo com os PIQ de Polpas de Frutos, o máximo de ácido cítrico permitido para polpas do açaí do tipo médio é 0,40 g/100 g de polpa (BRASIL, 2000). E neste contexto, alguns pesquisadores encontraram 0,19 e 0,31 g/100 g em polpas do açaí comercial do Pará (NASCIMENTO et al., 2008; ALEXANDRE et al., 2004) e valores entre 0,20 - 0,54 g de ácido cítrico /100 g em polpas comerciais de Fortaleza (SANTOS et al., 2008).

A variabilidade encontrada nas medidas de AT pode estar associada a fatores como grau de maturação do fruto, processo industrial, período de armazenamento, dentre outros (SOUSA et al., 2006; NEVES et al., 2015; CARVALHO et al., 2016).

SÓLIDOS SOLUVEIS TOTAIS (SST):

Análises de sólidos solúveis totais são amplamente utilizadas na indústria de alimentos para medir a quantidade de açúcares e ácidos orgânicos em sucos de frutas, polpas, vinhos, entre outros. Os resultados encontrados para as polpas do açaí de Belém (PA) apresentaram valores na faixa entre 2,38 – 36,4 e 3,06 – 37,1 °Brix para as amostras de genótipos e comerciais, respectivamente.

Os valores de SST entre 2,40 e 8,13 °Brix são comumente relatados na literatura (SANTOS et al., 2008; ALEXANDRE et al., 2004; NASCIMENTO et al., 2008; SOUSA et al., 2006; NEVES et al., 2015). No entanto, valores tão elevados como os encontrados neste trabalho estão sendo relatados pela primeira vez nas polpas do açaí (TABELA 3.1 e APÊNDICE Item 3)

Tanto as amostras com maior teor de SST (genótipo G6 e comercial CAI), quanto a com menor teor de sólidos solúveis totais (CAI) foram obtidas nas safras (período de seca) e entressafras (período de chuvas). Sendo entressafra/2016 (G6) e safra/2016 (CAI) para as amostras com maiores valores de SST e safra/2014 (CAI) para a de menor teor de SST.

Observando-se os níveis de pH, acidez titulável e sólidos solúveis totais encontrados para as amostras do comércio de Belém (PA) e as de genótipos cultivados na Embrapa Amazônia Oriental, foi possível caracterizar as polpas do açaí como levemente ácida e com quantidade de açúcares e/ou ácidos orgânicos variáveis. Foi possível observar também que a variação encontrada nestas medidas não está relacionada com a sazonalidade dos frutos do açaí, safra (período de seca local) ou entressafra (período de chuvas). Possivelmente a grande variabilidade encontrada nas medidas deste trabalho, assim como nos dados da literatura, pode estar relacionada a diversos fatores como o estágio de amadurecimento, diferentes condições edafoclimáticas, cultivo, colheita, pós-colheita, processamento, e especialmente a alta variabilidade genética da espécie (CARVALHO et al., 2016; MENEZES et al., 2008).

TABELA 3.1 – Valores das médias e desvio padrão dos parâmetros físico-químicos para as amostras de polpas do açaí comerciais e de genótipos.

CÓDIGO	PARÂMETROS #							
	pH	A. T. (g/100g ác.cítrico)	S.S.T (°Brix)	UMIDADE† (g/100g)	CINZAS† (g/100g)	FIBRAS† (g/100g)	PROTEÍNAS† (g/100g)	LÍPIDIOS† (g/100g)
SAFRA 2014								
G4	5,14±0,02	1,29±0,03	4,08±0,00	4,36±0,18	3,80±0,12	10,96±0,27	9,18±0,19	47,19±0,09
G6	5,25±0,02	1,39±0,06	5,10±0,00	2,82±0,16	3,70±0,12	11,40±0,19	8,43±0,09	44,80±0,33
G10	5,23±0,00	1,37±0,10	6,46±0,58	2,75±0,08	3,68±0,07	20,37± 0,15	15,67± 0,12	46,02±0,06
CAL	5,06±0,04	1,46±0,00	7,14±0,00	4,36±0,18	3,80±0,12	10,96±0,27	9,17±0,19	47,19±0,09
CAI	5,09±0,02	1,44±0,03	3,06±0,00	1,35±0,06	3,63±0,14	11,71±0,34	10,10±0,18	39,98±0,92
CAU	5,24±0,05	1,34±0,01	4,08±0,00	2,23±0,05	3,43±0,04	13,63±0,06	9,92±0,48	43,99±0,31
ENTRESSAFRA 2015								
G13	5,21±0,01	1,33±0,07	6,80±0,59	4,52±0,18	4,23±0,04	14,94±0,14	7,42±0,22	34,67±0,38
G16	5,46±0,01	1,54±0,07	4,14±0,01	6,74±0,14	4,44±0,02	24,12±0,38	10,55±0,06	20,51±0,11
G15	5,34±0,02	1,60±0,07	3,06±0,00	3,16±0,12	4,37±0,03	27,66±0,57	10,04±0,02	19,24±0,30
CAI	4,94±0,01	1,67±0,04	4,42±0,59	1,44±0,05	3,96±0,08	9,72±0,18	8,63±0,12	47,80±0,23
CFA	4,99±0,01	1,63±0,03	4,08±0,00	1,30±0,04	4,68±0,05	9,46±0,23	9,02±0,21	46,71±0,02
CAU	5,11±0,01	1,54±0,03	4,76±0,59	1,06±0,03	4,35±0,14	8,51±0,07	9,04±0,25	49,54±0,08
SAFRA 2015								
G1	5,04±0,01	1,40±0,00	7,48±0,58	3,20±0,15	3,16±0,00	21,42±0,59	16,44±0,60	42,42±0,24
G11	4,74±0,00	1,42±0,04	3,06±0,01	5,67±0,09	5,67±0,09	25,89±0,24	8,09±0,21	22,53±0,19
G17	5,05±0,00	1,43±0,00	5,10±0,00	1,49±0,15	3,06±0,01	20,15±0,39	19,69±0,27	47,72±0,01
CA25	4,74±0,01	1,53±0,00	6,80±0,59	2,89±0,12	3,88±0,02	21,12± 0,13	15,66 ±0,19	47,20±0,08
CAC	5,00±0,01	1,81±0,04	5,44±0,59	2,59±0,13	4,38±0,01	14,33± 0,09	19,12± 0,10	48,27±0,13
CAL	4,95±0,01	2,05±0,04	7,48±0,59	2,41±0,04	2,41±0,04	10,07±0,32	8,61±0,05	48,09±0,25
ENTRESSAFRA 2016								
G11	5,19±0,01	0,93±0,04	10,88±0,58	2,08±0,18	3,33±0,04	37,83±0,62	12,97±0,53	19,79±0,28
G6	5,05±0,00	1,89±0,01	36,40±1,21	2,71±0,04	3,91±0,10	18,68±0,05	18,07±0,56	45,29±0,54
CANM	5,02±0,0	1,85±0,01	32,90±1,21	3,95±0,04	3,78±0,01	21,40±0,05	13,02±0,10	40,37±0,22
CFA	5,04±0,01	1,57±0,03	15,64±0,58	2,50±0,13	4,54±0,01	19,25±0,56	17,08±0,02	43,61±0,10

Continuação TABELA 3.1

CAI	4,89±0,0	1,42±0,03	12,58±0,58	3,61±0,18	3,36±0,02	20,59±0,89	17,27±0,00	46,52±0,14
CPDA	5,22±0,00	1,76±0,01	30,8±3,20	2,98±0,08	4,35±0,04	17,87±0,18	18,52±0,19	48,35±0,10
CPDA6h	5,10±0,0	1,87±0,03	15,64±0,58	5,12±0,11	3,63±0,77	18,45±0,01	18,99±0,09	49,21±1,35
CPDA12h	4,91±0,0	1,86±0,03	11,22±0,0	5,47±0,07	3,77±0,54	19,35±0,16	17,42±0,27	49,05±0,05
SAFRA 2016								
G13	5,11±0,00	1,57±0,00	15,40±0,60	3,43±0,49	3,66±0,03	25,51±0,34	11,50±0,23	37,97±0,32
CA25	4,99±0,02	1,79±0,10	11,55±1,05	7,01±0,22	3,61±0,04	22,54±0,18	15,46±0,25	47,63±0,45
CAI	5,13±0,00	1,57±0,01	37,10±1,21	2,46±0,01	4,13±0,04	22,06±1,28	14,30±0,18	44,20±1,93
CPA	5,01±0,01	1,51±0,04	16,45±0,60	2,81±0,21	3,89±0,04	21,54±0,31	16,01±0,35	47,49±0,14
CBA	5,01±0,00	1,80±0,03	11,90±0,60	2,75±0,16	4,23±0,21	14,65±0,11	18,00±0,24	49,85±0,42
ENTRESSAFRA 2017								
CAI	5,12±0,01	1,85±0,03	26,31±1,17	2,34±0,10	3,16±0,01	17,71±0,56	18,30±0,35	51,16±0,19
CPA	5,01±0,02	1,97±0,07	24,25±1,17	3,22±0,12	2,98±0,02	18,17±0,76	11,22±0,09	40,56±1,32
CPDA	5,09±0,01	2,1±0,03	26,4±1,19	2,37±0,13	3,82±0,02	20,16±0,26	17,24±0,01	50,31±0,58
CAU	4,91±0,00	1,97±0,03	21,57±1,21	1,19±0,03	3,08±0,02	20,05±0,39	28,44±1,00	56,80±0,09

*E=entressafra; # Valores médios de três extrações ± desvio padrão; - Não determinado; †base seca

TABELA 3.2 – Teores de antocianinas totais, monoméricas e compostos fenólicos totais em amostras de polpas do açaí genótipos e comerciais.

PERÍODO ^A	CÓDIGO	PARAMÊTROS		
		ANTOCININAS TOTAIS (mg/100g)*	ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS (mg/100g)*	FENÓLICOS TOTAIS (mg/100g)**
SAFRA 2014	G4	410,98±1,29	336,74±8,56	2333,80±5,56
	G6	1572,82±149,71	1345,58±87,86	2939,86±63,13
	G10	632,37±24,08	527,35±30,56	1526,39±5,52
	CAL	1200,90±63,93	1159,33±8,08	2061,62±26,68
	CAI	1401,60±59,97	1283,01±51,97	1911,71±28,98

Continuação TABELA 3.2

E2015	G13	1516,81±6,07	1342,97±6,32	2677,55±8,21
	G16	229,91±12,30	157,03±8,25	1529,29±11,91
	G15	371,13±12,83	273,71±19,83	833,86±34,13
	CAI	867,62±18,37	807,18±23,17	1866,14±9,64
	CFA	729,25±17,80	581,55±11,76	1623,70±16,08
	CAU	617,61±1,99	483,96±19,78	1799,32±4,86
SAFRA 2015	G1	933,96±7,42	724,48±10,32	1700,01±3,26
	G11	300,91±8,30	198,06±6,79	1690,71±14,38
	G17	965,63±25,73	780,91±19,67	1703,56±72,18
	CA25	690,74±11,87	500,62±11,21	1479,67±46,72
	CAC	1101,91±9,74	924,33±11,30	1956,65±17,49
	CAL	898,31±34,66	749,04±31,24	2824,17±0,32
E2016	G11	322,1±1,39	227,2±2,51	1171±9,75
	G6	448,5±0,88	241±2,43	1516±2,60
	CANM	405,11±3,52	272,69±1,64	2613,67±3,87
	CFA	624,58±28,94	480,81±33,69	1636,93±8,11
	CAI	624,97±28,78	476,08±33,81	2029,37±19,76
	CAU	664,86±47,19	544,88±34,44	2149,36±0,95
	CPDA	276,61±5,04	164,74±0,96	1373,40±4,85
	CPDA6h	113,05±0,028	82,62±0,07	1305,37±41,22
CPDA12h	72,17±0,058	32,66±0,19	1178,23±20,55	
SAFRA 2016	G13	358,09±33,1	214,65±28,61	3197,97±6,40
	CA25	534,0±31,70	383,71±66,84	2261,78±1,71
	CAI	664,35±19,01	520,21±56,41	2550,14±32,93
	CPA	781,40±85,03	508,30±216,88	2728,44±2,32
	CBA	799,14±12,39	652,59±2,34	2913,32±5,23
E2017	CAI	902,96±0,25	716,74±0,42	3149,32±1,36
	CPA	425,77±0,44	296,46±1,27	2090,03±4,13
	CPDA	408,22±0,93	250,98±0,59	2064,24±3,46
	CAU	449±0,86	400,08±1,29	2262,05±6,05

^E= entressafra; *Expressas em cianidina 3-glicosídeo; média de três extrações ± desvio padrão (base seca);

**Expresso em ácido gálico equivalente; média de três repetições ± desvio padrão (base seca).

6.1.2. Composição centesimal

UMIDADE:

As polpas do açaí estudadas nesse trabalho apresentaram teores de umidade na faixa de 0,78 a 7,01 g/100 g. A polpa do açaí com menor teor (genótipo G24) foi coletada na safra (período de seca) de 2015 e a polpa com maior umidade (comercial CA25) foi obtida no comércio local de Belém (PA) na entressafra (período de chuva) de 2016 (TABELA 3.1 e APÊNDICE Item 3).

Como pode-se notar, a variação nos valores de umidade encontrada nas polpas não está relacionada com a sazonalidade dos frutos do *Euterpe oleracea*, possivelmente está associado ao processo de liofilização das polpas do açaí (CARVALHO et al., 2016).

Os teores de umidade encontrados nas polpas dos frutos cultivados na Embrapa Amazônia Oriental e das polpas do comércio de Belém-PA estão de acordo com os relatados na literatura para polpas liofilizadas, pois são descritos valores entre 3,4 e 4,92 g/ 100 g de polpa (SCHAUSS et al., 2006a; MENEZES et al., 2008). Já para polpas do açaí *in natura* (não liofilizadas) já foram encontrados valores de 85,7; 86,01 e 89,18 g/100 g de amostra (ALEXANDRE et al., 2004; NASCIMENTO et al., 2008; RUFINO et al., 2011).

CINZAS:

Os teores de cinzas para as amostras comerciais de Belém-PA foram na faixa de 2,41 - 4,89 g/100 g, no qual tanto as polpas com o menor (CPA) como o maior teor (CPA) foram obtidas na safra (período da seca) dos anos de 2015 e 2014, respectivamente. Para as amostras de genótipos foram encontrados teores de cinzas entre 1,92 – 5,67 g / 100 g, no qual a polpa com teor máximo (G11) e a com de menor teor (G20) foram obtidas em frutos coletados na safra de 2015. (TABELA 3.1 e APÊNDICE Item 3). Como pode-se notar, a variação nos teores de cinzas não está relacionada com a sazonalidade dos frutos de *Euterpe oleracea*, pois em um mesmo período (safra) foram encontrados valores muito distintos.

Algumas polpas avaliadas neste trabalho apresentaram valores acima dos citados na literatura, no qual são descritos teor de 0,41 g /100 g e na faixa entre 1,99 – 3,8 g/100 g polpa do açaí (NASCIMENTO et al., 2008; MENEZES et al., 2008;

SCHAUSS et al., 2006a; RUFINO et al., 2011; GORNON et al., 2012; CARVALHO et al., 2010).

FIBRAS TOTAIS:

Os teores de fibras totais para as amostras comerciais de Belém-PA variaram na faixa de 6,85 a 27,01 g / 100 g de polpa do açaí, no qual a amostra com a menor (CBA) e com a maior quantidade (CA25) foram provenientes de polpas congeladas obtidas durante a safra (período da seca) de 2014 e na entressafra (período de chuvas) de 2017, respectivamente. Já para as amostras de genótipos foram encontrados teores de fibras entre 5,4 – 37,83 g / 100 g, sendo o teor mínimo (G8) e máximo (G11) obtido na polpa dos frutos coletados no período da safra de 2014 e entressafra de 2016, respectivamente (TABELA 3.1 e APÊNDICE Item 3). De maneira geral, os frutos de açaí provenientes da cultivar da Embrapa Amazônia Oriental apresentaram maior teor de fibras que as amostras do comércio local da cidade de Belém no estado do Pará.

O conteúdo de fibras encontrado em algumas amostras deste estudo foi semelhante ao descrito na literatura, com 31,67 e 32,10 g/100 g em polpas do açaí do estado do Pará (ALEXANDRE et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2011).

As fibras são constituintes importantes na alimentação humana pois ajudam no funcionamento do sistema digestivo, a controlar a glicemia, reduz o colesterol total, reduz o peso corporal, proporciona o bom funcionamento intestinal prevenindo o câncer de cólon (BERNAUD & RODRIGUES, 2013).

O açaí é uma boa fonte de fibras e neste trabalho foi possível verificar que alguns genótipos como o G11 (37,83 g / 100 g), G16 (29,35 g / 100 g) e G13 (28,51 g / 100 g) se destacaram entre as demais palmeiras do cultivar da Embrapa Amazônia Oriental (TABELA 3.1).

PROTEÍNAS:

Os teores de proteínas para as amostras comerciais de Belém-PA apresentaram-se na faixa de 7,96 a 28,43 g/100 g, no qual a amostra com o menor (CPA) e o maior teor (CAU) foram provenientes de polpas congeladas obtidas no período da safra (período de seca) de 2014 e entressafra (período de chuvas) de 2017, respectivamente. Para as amostras de genótipo foram encontrados teores de proteínas entre 5,52 – 28,50 g/100 g, sendo o teor mínimo (G6) e o máximo (G13)

descritos em polpas dos frutos coletados nas safras (período de seca) de 2015 e 2016, respectivamente (TABELA 3.1 e APÊNDICE Item 3).

O PIQ para polpas do açaí estabelece o valor mínimo de proteínas de 6,00 g/100 g de matéria seca e, nesse contexto foi verificado que todas as amostras comerciais analisadas neste estudo se encontram dentro do padrão da legislação vigente (BRASIL, 2000).

Os valores de proteínas totais obtidos nas polpas do açaí comerciais e de genótipos estão coerentes com os descritos na literatura com 6,27 – 36 g/100 g de peso seco (CARVALHO et al., 2010; GORDON et al., 2012; RUFINO et al., 2011; SCHAUSS et al., 2006a; MENEZES et al., 2008; ALEXANDRE et al., 2004).

LIPÍDIOS:

As amostras comerciais de Belém-PA apresentaram teores de lipídios totais variando de 34,44 a 56,80 g/100 g de polpa, no qual a amostra com menor (CPA) e maior concentração lipídica (CAU) foram provenientes de polpas congeladas obtidas nos períodos da entressafra (período de chuvas) de 2016 e 2017, respectivamente. Para as amostras de genótipos do cultivar da Embrapa Amazônia Oriental foram encontrados de 14,16 a 63,08 g de lipídios / 100 g polpa, no qual a amostra com o teor mínimo (G16) e máximo (G20) foram obtidas em polpas dos frutos coletados no período da safra do açaí (período de chuvas) de 2015 (TABELA 3.1 e APÊNDICE Item 3).

Na literatura são descritas as concentrações de lipídios totais entre 20,82 e 48,24 g/100 g de matéria seca (RUFINO et al., 2011; SCHAUSS et al., 2006a; MENEZES et al., 2008; CARVALHO et al., 2010; ALEXANDRE et al., 2004). Em um estudo, foi verificado que os lipídios aumentam significativamente com grau de maturação dos frutos, no qual frutos não maduros e maduros possuem 7 e 48 g/100 g de matéria seca, respectivamente (GORDON et al., 2012).

Tanto nas amostras de polpas do açaí comerciais de Belém – PA como nas de genótipos do cultivar da Embrapa Amazônia Oriental foram encontrados teores de lipídios acima dos descritos na literatura. Isso foi verificado em vinte (20) amostras comerciais e em sete (7) de genótipos, algumas delas são: CAU (56,79%), CBA (53,20%), CAF (52,62%) ambos de entressafras e, G3 (54,54%), G20 (63,08%), G21 (52,32%), ambos da safra de 2015 (TABELA 3.1 e APÊNDICE Item 3).

Neste trabalho foram identificados e quantificados os compostos lipídicos da polpa do açaí (Capítulo 4; Item 8.4.1), que é majoritariamente composto de triacilgliceróis com cadeia de ésteres de ácidos graxos monoinsaturados de ácido oleico (18:1) e palmitoleico (16:1), seguido de ésteres de ácidos graxos saturados e uma pequena proporção os ácidos poli-insaturados como ácido linoleico (18:2) e linolênico (18:3). Dessa forma, polpas do açaí com altas concentrações lipídicas além de fornecem energia são um alimento indicado para a saúde (ALISSA & FERNS, 2012 e JOHNSTON, 2010; FAVACHO et al., 2011).

Os valores de lipídios totais encontrados nas amostras comerciais estudadas neste trabalho (34,44 - 56,80 g/100 g) estão dentro das normas determinadas pelo PIQ do açaí que limita entre 20,0 a 60,0 g em 100 g de matéria seca (BRASIL, 2000). Já alguns genótipos mostraram valores abaixo do limite, como G16 (safra 2015), G15 (entressafra 2015) e G11 (entressafra 2016) com 14,16%, 19,24% e 19,79% de lipídios, respectivamente. E apenas 1 (um) genótipo (G20 - safra 2015) ultrapassou o valor permitido com 63,08% de lipídios (BRASIL, 2000).

Alguns genótipos do Programa de Melhoramento Genético desenvolvido pela Embrapa Amazônia Oriental (Belém – PA) podem ser considerados promissores para a continuação dos estudos, pois apresentaram características físico-químicas que os destacaram das demais do cultivar. São eles: G11 (37,83% fibras), G13 (28,51% fibras e 37,83% proteína), G16 (29,35% fibras) e, G3 (54,54%), G20 (63,08%) e G21 (52,32%) com alto teor de lipídios.

Observando-se os valores da composição centesimal encontrados nas amostras comerciais e de genótipos, é possível confirmar que a polpa dos frutos do açaí é um alimento rico em fibras, proteínas e possui com alto valor energético devido a sua alta quantidade de lipídios.

As amostras comerciais apresentaram-se dentro dos níveis estabelecidos pelo PIQ do açaí nos parâmetros de pH, proteínas e lipídios (BRASIL, 2000). E, de acordo com essa observação, as polpas do açaí comercializadas em Belém-PA dos 10 pontos de venda acompanhados durante 3 anos (safra 2014 – entressafra 2017) estão em conformidade com padrões de qualidade nacional.

Os resultados obtidos mostraram que não foi possível verificar um comportamento sazonal (safra x entressafra) ou tipo de cultivo (controle agrônomico CPATU x sem controle) nas polpas do açaí com base nas medidas físico-químicas devido a grande variabilidade encontrada nos resultados.

Para as polpas dos genótipos, a variação observada nas medidas de sólidos solúveis (2,38 - 36,4 °Brix), fibras (5,4 - 37,83 g/100 g), cinzas (1,92 - 5,67 g/100 g) e lipídios (14,16 - 63,08 g/100 g) possivelmente está relacionada ao fator genético da espécie *Euterpe oleracea* promovido pelos estudos do Programa de Melhoramento Genético da CPATU (Belém-PA), pois as condições edafoclimáticas e de cultivo são os mesmos para as palmeiras do cultivar, assim como o estágio de maturação, procedimentos de colheita, pós-colheita e o processamento dos frutos. Já as amostras obtidas no comércio, estão sujeitas a todos esses fatores, além do tempo de armazenamento da polpa processada (MENEZES et al., 2008; ALEXANDRE et al., 2004; CARVALHO et al., 2016).

6.1.3. Composição fenólica

ANTOCIANINAS TOTAIS E MONOMÉRICAS:

As polpas do açaí liofilizadas apresentaram teores de antocianinas totais variando de 113,56 a 1572,82 mg/100 g para as amostras de genótipos e de 276,6 a 1401,6 mg de cianidina 3- glicosídeo /100 g para as amostras comerciais. As medidas de antocianinas monoméricas apresentaram valores entre 83,6 – 1346,17 mg/100 g para as amostras de genótipos do cultivar da CPATU e entre 164,74 – 1283,0 mg de cianidina 3-glicosídeo /100g para as amostras comerciais de Belém (PA) (TABELA 3.2 e APÊNDICE Item 3).

A determinação da concentração de antocianinas nas polpas do açaí tem sido amplamente realizada nas pesquisas, no qual podem ser encontrados valores de 13,93 a 748,39 mg de cianidina 3- glicosídeo/100 g de polpa (MOURA et al., 2011; SANTOS et al., 2008; KUSKOSKI et al., 2006; ROGEZ et al., 2011; RIBEIRO et al., 2010; ROJANO et al., 2011; BOBBIO et al., 2000; De ROSSO et al., 2008; LICHTENTHALER et al., 2005; MATTIETTO et al., 2010; CARVALHO et al., 2010; MALCHER e CARVALHO, 2011; GALLORI et al., 2004). E tanto nas amostras de polpas do açaí comerciais de Belém-PA, como nas de genótipos cultivados na Embrapa Amazônia Oriental foram encontrados teores de antocianinas muito acima dos descritos na literatura.

A grande diferença nas concentrações de antocianinas verificada nas amostras deste estudo, e até os descritos na literatura, é esperada pois essa classe de compostos sofre significativa influência de fatores externo como os agrônômicos,

climáticos, sazonais, grau de maturação, além da forma de processamento dos frutos (quantidade de água adicionada), pasteurização e condições de armazenamento (LICHTENTHALER et al., 2005; MALCHER & CARVALHO, 2011; MATTIETTO et al., 2009; GORDON et al., 2012; ROGEZ et al., 2011; LIMA et al., 2005).

Alguns genótipos do Programa de Melhoramento Genético desenvolvido pela Embrapa Amazônia Oriental (Belém – PA) apresentaram altos teores de antocianinas como o G6 (1572,82 mg/100g), G8 (1507,25 mg/100g) ambos da safra de 2014; G13 (1516,81 mg/100g) na entressafra de 2015 e as G23 (1341,04 mg/100g) e G31 (1413,39 mg de cianidina 3- glicosídeo /100g) da safra de 2015.

Metade dos pontos de venda de polpas do açaí da cidade de Belém (PA) apresentaram amostras com altos valores de antocianinas totais na safra (período de seca) de 2014, são eles: CAI (1401,6 mg/100g), CAL (1200,9 mg/100g), CFA (1135,7 mg/100g), CBA (1247,5 mg/100g), CAF (1027,9 mg/100g). E na safra do ano seguinte, dois (2) pontos de venda se destacaram, CAU (1053,46 mg/100g) e CAC (1101,92 mg/100 g). É possível que esses pontos de venda tomem algum cuidado para evitar a degradação das antocianinas, ou pode ser característica intrínseca dos frutos comercializados por esses comerciantes.

A polpa do açaí pode ser considerada uma boa fonte de antocianinas quando comparado a outras frutas vermelhas como morango, framboesa, camu-camu e acerola devido a alta concentração dessa classe de compostos (De ROSSO et al., 2008).

FENÓLICOS TOTAIS:

As polpas do açaí liofilizadas apresentaram teores de fenólicos totais variando de 613,93 a 3572,38 mg de ácido gálico/100g para as amostras de genótipos e de 1232,27 a 4676,14 mg de ácido gálico/100g para as amostras comerciais (TABELA 3.2 e APÊNDICE Item 3).

De acordo com a literatura, a concentração de fenólicos encontrados para as polpas do açaí varia de 31,2 a 424,9 mg de ácido gálico/100 g de peso seco (KANG et al., 2012; SCHAUSS et al., 2006b; GORDON et al., 2012; RIBEIRO et al., 2010). No entanto, em uma amostra de polpa do açaí colombiano foram encontrados 3.172,3 mg de ácido gálico /100 g (ROJANO et al., 2011). Os resultados verificados neste trabalho mostraram que as amostras de polpas do açaí comerciais de Belém-PA e as de genótipos cultivados na CPATU (Belém – PA) possuem concentração de

compostos fenólicos muito acima dos encontrados nas polpas do açaí nacional citadas na literatura.

Os compostos fenólicos majoritários da polpa do açaí e suas respectivas concentrações divergem bastante nos estudos. Gordon e colaboradores verificaram que a concentração de alguns compostos diminui com o grau de maturação dos frutos, foram encontrados: ácidos vanílico (6,97 mg/100g), *p*-hidroxibenzóico (1,90 mg/100g), siríngico (1,10 mg/100g) e alguns flavonoides como orientina (11,2 mg/100g), homorientina (3,06 mg/100g), vitexina (3,41 mg/100g), isovitexina (2,66 mg/100g) e luteolin (0,24 mg/100g de peso seco) em frutos maduros (GORDON et al., 2012). Já outros estudos encontraram maiores concentrações de ácido ferúlico (212 mg/L), epicatequin (129 mg/L), *p*-ácido hidroxibenzóico (80,5 mg/L), ácido protocatecuíco (64,4 mg/L polpa fresca do açaí) (Del POZO-INSFRAN et al., 2004) e menor concentração de orientina (5,31 mg/100 g) (PACHECO-PALENCIA et al., 2009).

Alguns genótipos do Programa de Melhoramento Genético da Embrapa Amazônia Oriental (Belém – PA) apresentaram destaque devido ao seu conteúdo de fenólicos totais como G7 (3572,38 mg/100g) e G17 (2966,55 mg/100g) da safra de 2015 (coleta 2); G6 (2939,86 mg/100g) da safra de 2014; G13 (2677,55 mg/100g) da entressafra de 2015; G30 (2886,4 mg/100g) e G9 (2641,62 mg/100g) da safra de 2015 e G13 (3197,97 mg de ácido gálico /100g) da safra de 2016 (TABELA 3.2 e APÊNDICE).

Todas as amostras comerciais da cidade de Belém-PA obtidas na safra (período de seca) de 2016 apresentaram concentrações elevadas de fenólicos totais, principalmente nos pontos de venda CAL (3665,28 mg/100g), CAF (3062,23 mg/100g) e CPDA (2955,34 mg/100g) obtidas na safra de 2016, algumas da safra de 2015 como CAI (3256,01 mg/100g) e CAU (3175,17 mg/100g) e a polpa CAF (2978,39 de ácido gálico mg/100g) obtida durante a safra de 2014 (TABELA 3.2).

A variação nos teores de fenólicos totais encontrada na maioria das amostras estudadas, e nas verificadas da literatura, é esperada porque pode estar relacionada ao grau de maturação, localização geográfica da produção, fatores edafoclimáticos e alta variabilidade genética do fruto (GORDON et al., 2012; ROJANO et al., 2011; LICHTENTHALER et al., 2005).

Estudos mostram que tanto o conteúdo de antocianinas como de fenólicos presentes nas polpas do açaí estão relacionados com elevadas atividades farmacológicas (anti-inflamatória, antioxidante, cito protetora) verificadas no fruto e

que tornam o açaí um alimento que auxilia na prevenção de doenças degenerativas (KANG et al., 2010; KANG et al., 2011; RIBEIRO et al., 2010; Del POZO-INSFRAN et al., 2004; Del POZO-INSFRAN et al., 2006). Dessa forma, as altas concentrações encontradas nas amostras de polpa do açaí de Belém (PA) podem ser um diferencial para os frutos dessa localidade e pode proporcionar um aumento no valor agregado da polpa comercializada nacional e internacionalmente.

6.2. Análises quimiométricas

6.2.1. Estudo com todas as polpas do açaí (comerciais e genótipos)

6.2.1.1. Condições de cultivo (com controle agrônômico x sem controle agrônômico)

Para as análises com todas as polpas comercializadas na cidade de Belém- PA (60 amostras) e dos genótipos (51 amostras) do açaí da Embrapa Amazônia Oriental (CPATU) foi gerada uma matriz com 111 linhas e 11 colunas. As colunas (variáveis) contém os resultados dos parâmetros analisados (pH, AA, SS, proteínas, lipídios, umidade, fibras, cinzas, antocianinas totais, monoméricas e compostos fenólicos) e as linhas são as amostras.

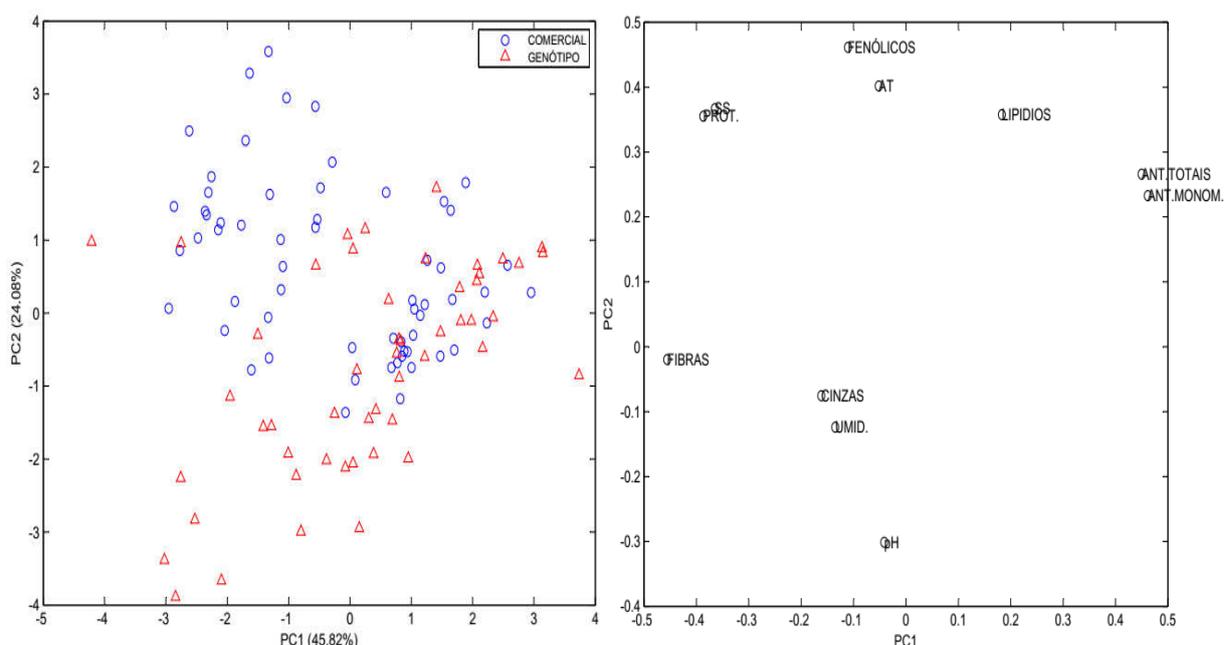


FIGURA 3.1 - Gráfico de escores (à esquerda) e pesos (à direita) da PC1 x PC2 (69,9% variância total) das amostras comerciais e de genótipos do açaí da CPATU (Belém – PA). Estudo com dados autoescalados.

Tanto nos estudos com os dados sem tratamento como nos dados autoescalados, não foi possível obter uma completa distinção entre amostras de açaí que são provenientes de área de cultivo com controle agrônômico (genótipos do CPATU) das sem controle agrônômico (comerciais). Mas foi possível verificar através do gráfico da PC1 X PC2 (Figura 3.1) que algumas amostras comerciais ficaram distribuídas no eixo positivo da PC1 e algumas de genótipos no eixo negativo da PC2. As variáveis responsáveis por essa distribuição verificadas no gráfico de pesos (Figura 3.1) foram principalmente o teor de fenólicos totais e a acidez titulável (AT) para polpas comerciais e, o pH para algumas amostras de genótipos, indicando que essas amostras possuem um maior valor nesses parâmetros.

Os genótipos que apresentaram valores de pH mais elevado foram G16-E15, G2- S14 e G15-E15, com 5,46, 5,35 e 5,34, respectivamente. As amostras comerciais CFA-E17 e CAF-E17 apresentaram 2,6% e 2,29% de acidez titulável total (AT) e, a amostra CA25-E17 apresentou 4676,14 g ácido gálico/100 g polpa.

Esta verificação corrobora com um estudo prévio realizados com seis (6) amostras, três (3) comerciais da cidade de Belém (PA) e três (3) de genótipos da CPATU. No qual Carvalho e colaboradores onde verificaram que duas (2) amostras comerciais apresentaram maior concentração de compostos fenólicos (ácidos vanílico, ferúlico e siringico) e maior acidez titulável total (AT) que os genótipos (CARVALHO et al., 2016).

6.2.1.2. Sazonalidade (safra x entressafra)

Para as análises com todas as polpas comerciais da cidade de Belém-PA (60 amostras) e dos genótipos (51 amostras) do açaí da CPATU foi gerada uma matriz com 111 linhas (amostras) e 11 colunas (variáveis).

Tanto nos estudos quimiométricos com os dados sem tratamento como com os dados autoescalados, não foram verificados uma completa distinção entre amostras coletadas em períodos da safra do açaí (jul-dez; seca local) das coletadas na entressafra do açaí (jan-jun; período chuvoso).

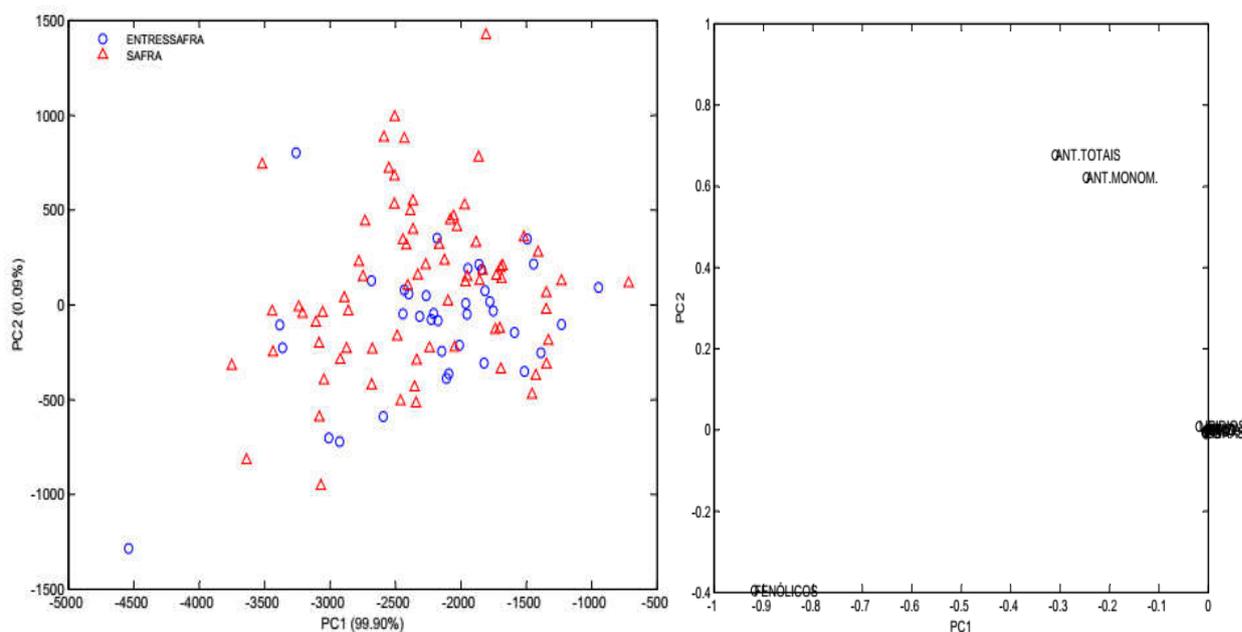


FIGURA 3.2 – Gráfico de escores (à esquerda) e pesos (à direita) da PC1 x PC2 (99,9% variância total) das amostras comerciais e de genótipos do açai da CPATU (Belém – PA). Estudo com dados não escalados.

No gráfico de escores da PC1 X PC2 (Figura 3.2) verificou-se que as amostras coletadas nas safras (▲) estão amplamente distribuídas por todo o modelo. No entanto, foi possível observar que há algumas polpas (comerciais e de genótipos) obtidas nos períodos de safra do açai que ficaram distribuídas no eixo positivo da PC2.

As variáveis responsáveis (Figura 3.2) por essa distribuição foram os conteúdos de antocianinas totais e antocianinas monoméricas, indicando que essas amostras possuem uma maior concentração dessa classe de compostos que as demais amostras coletadas tanto em períodos de safra como na entressafra do açai. As polpas do açai (comerciais e de genótipos) distribuídas no eixo negativo da PC2 apresentaram elevada concentração de compostos fenólicos totais.

6.2.2. Estudo das polpas do açai – Genótipos da CPATU (Belém – PA)

Para as análises com as polpas dos genótipos do Programa de Melhoramento Genético do Açaizeiro da Embrapa Amazônia Oriental (CPATU) foi gerada uma matriz com 51 linhas e 11 colunas.

Os estudos com as variáveis autoescaladas e os sem tratamento mostraram que não há distinção entre genótipos coletados nos períodos de safra (jul-dez) dos coletados na entressafra do açaí (jan-jun), quando avaliados os parâmetros físico-químicos e a composição fenólica das polpas. No entanto, foi possível identificar que alguns genótipos se distinguem dos demais.

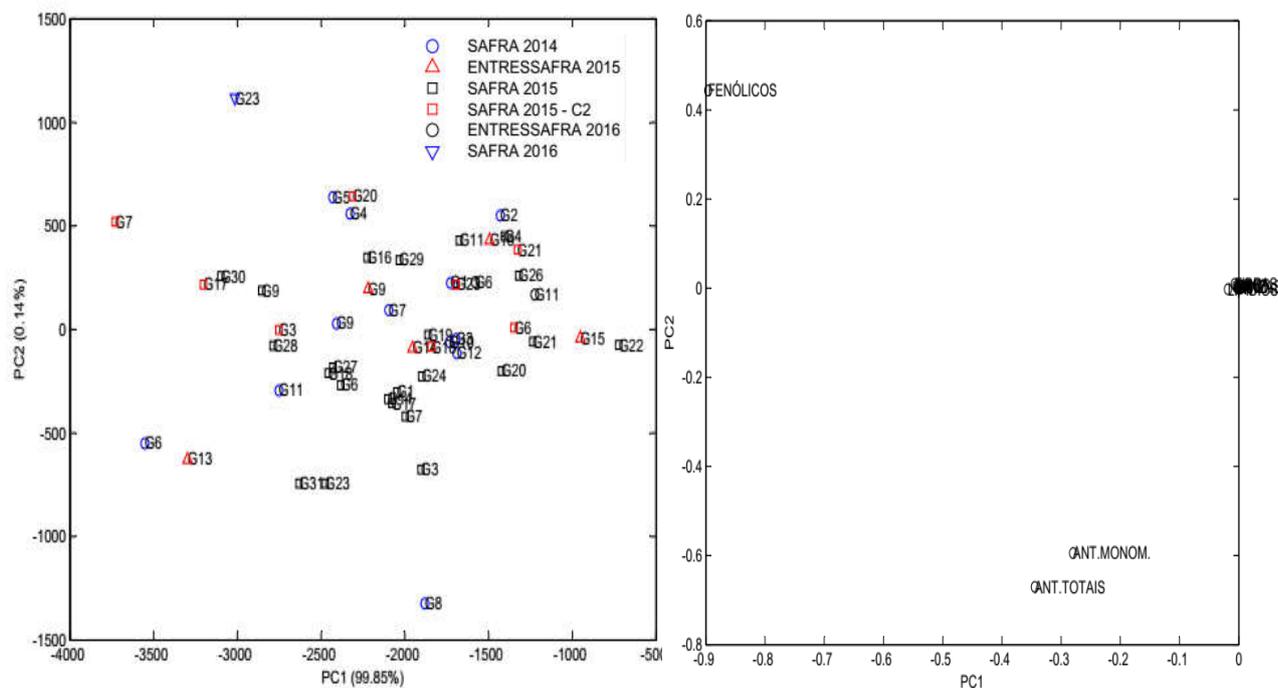


FIGURA 3.3 – Gráfico de escores (à esquerda) e pesos (à direita) da PC1 x PC2 (99,9% variância total) das amostras de genótipos do açaí da CPATU (Belém – PA). Estudo com dados não autoescalados.

No gráfico da PC1 X PC2 (Figura 3.3) verificou-se que alguns genótipos distribuídos no eixo negativo da PC2 apresentaram maior teor de antocianinas totais e monoméricas que os demais, sendo elas: G6 e G8 (safra 2014), G3, G23, G31 (safra 2015) e G13 (entressafra de 2015). Os valores encontrados nessas polpas foram de 1110,76 a 1572,82 mg/ 100 g (expresso em cianidina-3-glicosídeo) e podem ser verificados no Apêndice (Item 3; Tabela 2).

Os genótipos G7 coletado na safra de 2015 (2ª coleta) e G23 (safra de 2016) apresentaram alto teor de fenólicos totais distinguindo-se das demais no eixo positivo da PC2. Os valores obtidos para as amostras G7 e G23 foram 3572,38 e 3197,97 mg de ácido gálico em 100 g de polpa seca, respectivamente (Apêndice; Item 3; Tabela 2).

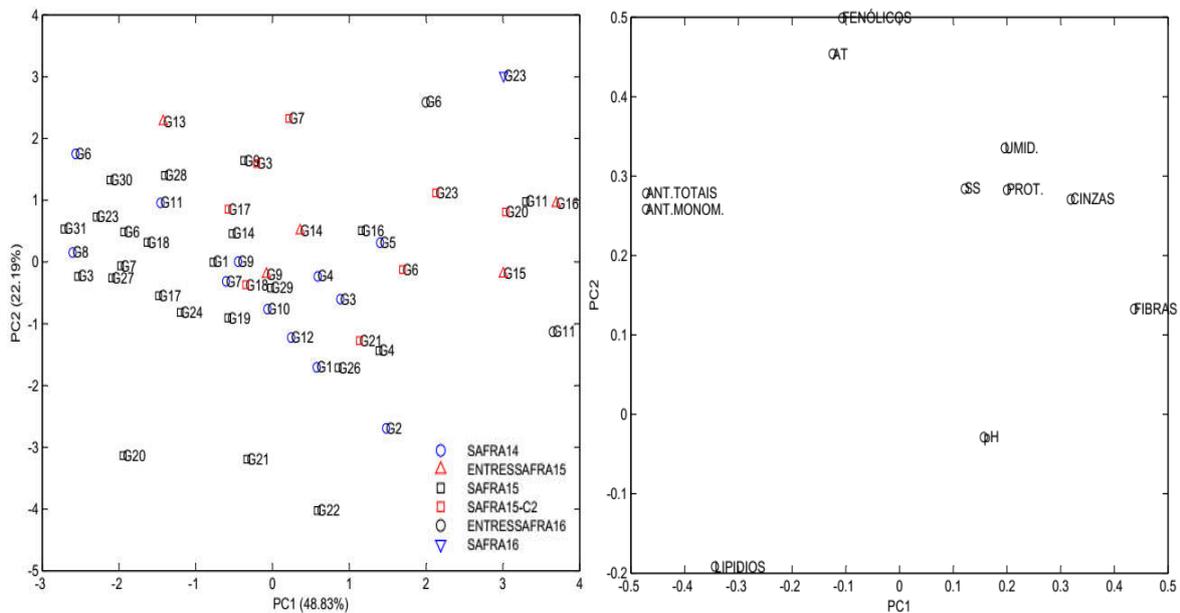


FIGURA 3.4 – Gráfico de escores (à esquerda) e pesos (à direita) da PC1 x PC2 (71,02 % variância total) das amostras de genótipos do açai da CPATU. Estudo com dados autoescalados.

No gráfico da PC1 X PC2 (Figura 3.4) verificou-se que os genótipos G20 e G21 (ambos da safra 2015) distribuídos no eixo negativo da PC1 e da PC2, apresentaram maior teor de lipídios que os demais genótipos. Os valores encontrados para estes foram 63,08% e 52,32% de lipídios totais, respectivamente (Apêndice; Item 3; Tabela 1).

Os genótipos G16 (coletado na entressafra de 2015) e G11 (coletado na safra de 2015) se destacaram por apresentarem maiores teores de fibras que os demais, com valores de 24,12 e 25,89 g/100g de polpa seca, respectivamente (Apêndice; Item 3; Tabela 1).

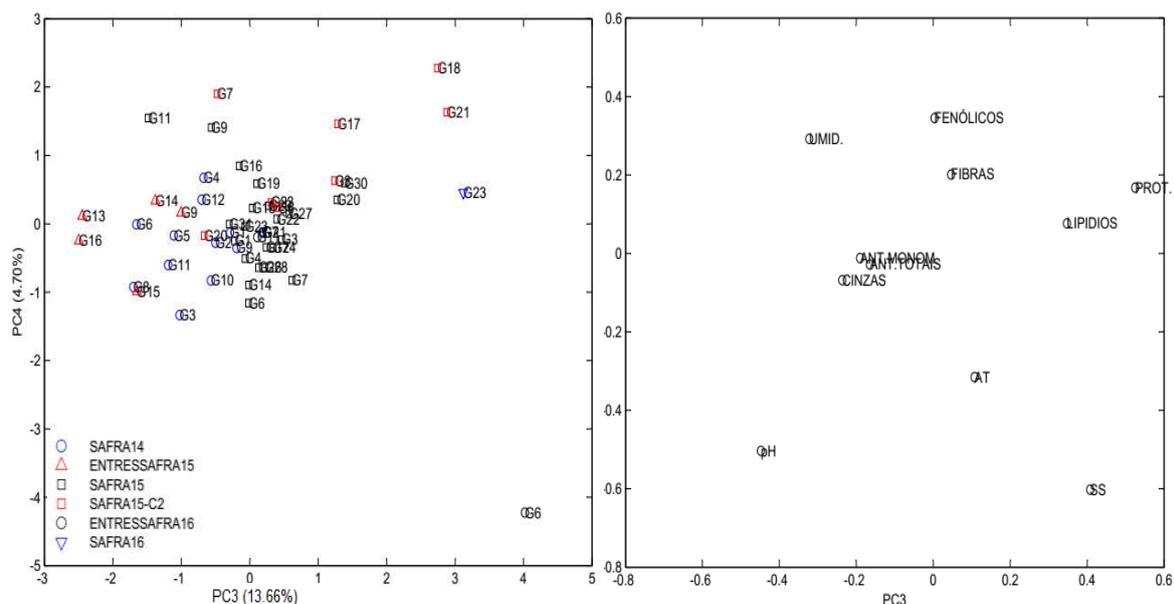


FIGURA 3.5 – Gráfico de escores (à esquerda) e pesos (à direita) da PC3 x PC4 (18,36% variância total) das amostras de genótipos do açaí da CPATU. Estudo com dados escalados.

No gráfico da PC3 X PC4 (Figura 3.5) verificou-se que o genótipo G6 coletado na entressafra de 2016, se distinguiu das demais amostras devido ao seu elevado teor de sólidos solúveis totais (SS). Para essa amostra foram encontrados 36,4 °Brix, valor muito acima dos citados na literatura (SANTOS et al., 2008; ALEXANDRE et al., 2004; NASCIMENTO et al., 2008; SOUSA et al., 2006; NEVES et al., 2015) (Apêndice; Item 3; Tabela 1).

Alguns genótipos coletados nos períodos da safra do açaí, distribuídos no eixo positivo da PC4, apresentam maior concentração de proteínas, lipídios e fibras. Estes foram: G17, G18, G21 (safra 2015) e G23 (safra 2016).

6.2.3. Estudo das polpas do açaí comerciais – Belém (PA)

Para as análises com as polpas comercializadas na cidade de Belém-PA foi gerada uma matriz com 60 linhas e 11 colunas. Os estudos com as variáveis autoescaladas e os sem tratamento mostraram que não há distinção entre as polpas congeladas comercializadas nos períodos de safra (jul-dez) para os comercializados na entressafra do açaí (jan-jun), quando avaliados os parâmetros físico-químicos e a composição fenólica.

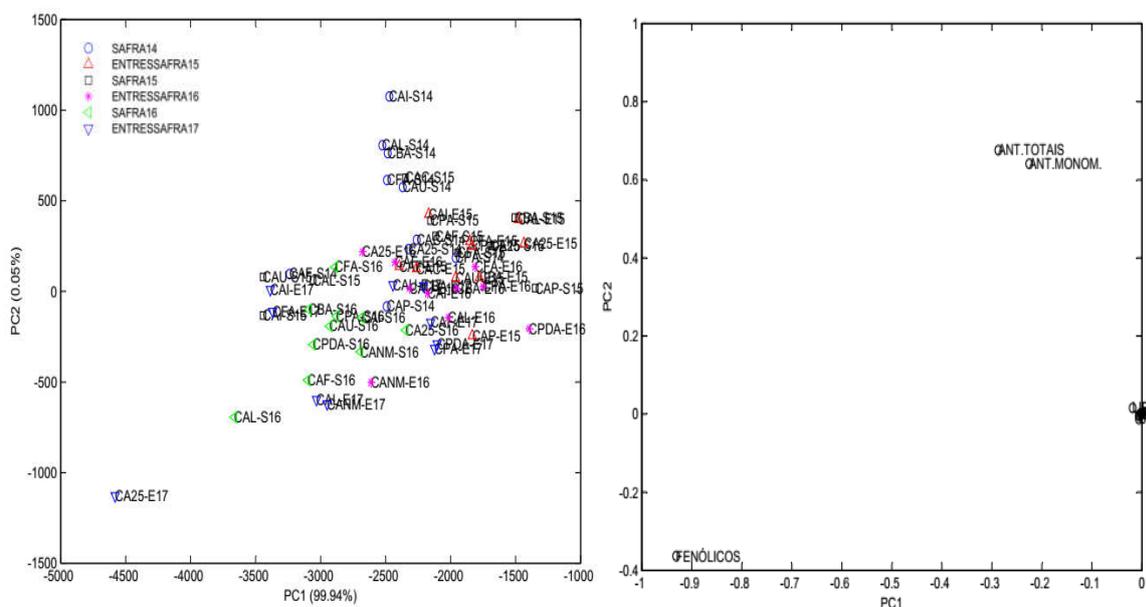


FIGURA 3.6 – Gráfico de escores (à esquerda) e pesos (à direita) da PC1 x PC2 (99,9% variância total) das amostras comerciais de Belém (PA). Estudo com dados não escalados.

No gráfico da PC1 X PC2 (Figura 3.6) é possível verificar a grande semelhança entre as polpas comercializadas na cidade de Belém-PA tanto da safra como na entressafra do açaí.

No entanto, algumas amostras comerciais distribuídas no eixo positivo da PC2 apresentaram elevadas concentrações de antocianinas totais e monoméricas que as demais amostras. As principais foram as polpas comercializadas nos locais: CAI, CAL, CFA, CBA e CAU, ambas obtidas no período da safra de 2014 e, CAC da safra 2015. Os valores encontrados nessas polpas foram em torno de 1053,46 a 1401,6 mg/ 100 g (expresso em cianidina-3-glicosídeo) (Apêndice; Item 3; Tabela 2).

As polpas de açaí comercializadas no ponto de venda CA25 (entressafra de 2017) e CAL (safra 2016) apresentaram elevados teores de fenólicos totais, distinguindo-se das demais no eixo negativo da PC2. Os valores obtidos para as mesmas foram 4676,14 e 3665,29 mg de ácido gálico em 100 g de polpa seca, respectivamente (Apêndice; Item 3; Tabela 2).

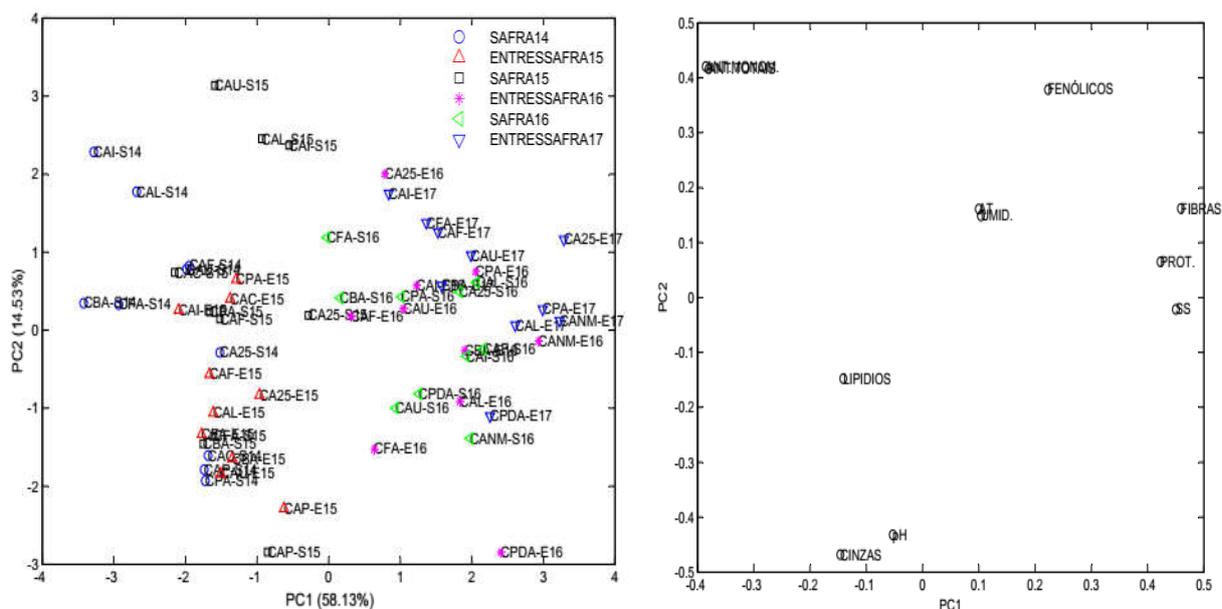


FIGURA 3.7 – Gráfico de escores (à esquerda) e pesos (à direita) da PC1 x PC2 (72,66% variância explicada) das amostras comerciais de Belém (PA). “C” codificação de amostras comerciais. Estudo com dados autoescalados.

No gráfico da PC1 X PC2 (Figura 3.7) verificou-se que polpas do açaí comercializadas nos 10 pontos de venda nas safras dos anos de 2014 e 2015 e, da entressafra de 2015 ficaram distribuídas no eixo negativo da PC1. As variáveis verificadas foram antocianinas totais, antocianinas monoméricas e lipídios, mostrando que as polpas comercializadas apresentaram maior concentração destes compostos. Dentre elas, as polpas dos locais CAU-S15, CAL-S15, CAI-S15, CAI-S14, CFA-S14 e CAL-S14, localizadas no eixo positivo da PC2 e negativo da PC1, possuem maior teor de antocianinas totais e monoméricas que as demais (Apêndice; Item 3; Tabela 1).

No eixo positivo da PC1 foram encontradas as amostras de polpas comercializadas nas entressafras de 2016 e 2017 e, na safra de 2016. No gráfico de pesos verificou-se que as variáveis significativas foram as medidas de fibras, proteínas, sólidos solúveis (SS) e fenólicos.

De maneira geral, devido à grande variabilidade nos dados físico-químicos e de composição fenólica encontrada nas polpas do açaí comerciais e de genótipos deste trabalho não foi possível verificar uma clara distinção entre polpas de açaí com frutos coletados em diferentes períodos (safra x entressafra) e com diferentes tipos de cultivo (com controle x sem controle agrônômico) utilizando ferramentas quimiométricas.

Foi possível verificar que das onze (11) variáveis analisadas, apenas as medidas de antocianinas totais e monoméricas apresentaram correlação entre si.

Essa relação é esperada visto que ambas são medidas da mesma classe de metabólitos, mas com mudança estrutural das antocianinas em função de diferentes valores de pH (GIUSTI e WROLSTAD, 2001; LEE et al., 2005) (Figura 3.8).

Na análise espectrofotométrica pelo método do pH diferencial, utilizada para a quantificação das antocianinas da polpa do açaí, são realizadas medidas de absorvância nos valores de pH 1,0 e pH 4,5. No qual no primeiro é encontrado o teor de antocianinas totais (coloração intensa) e, através da diferença com o valor encontrado no segundo (pH 4,5; incolor) é determinada a concentração de antocianinas monoméricas (GIUSTI e WROLSTAD, 2001; LEE et al., 2005).

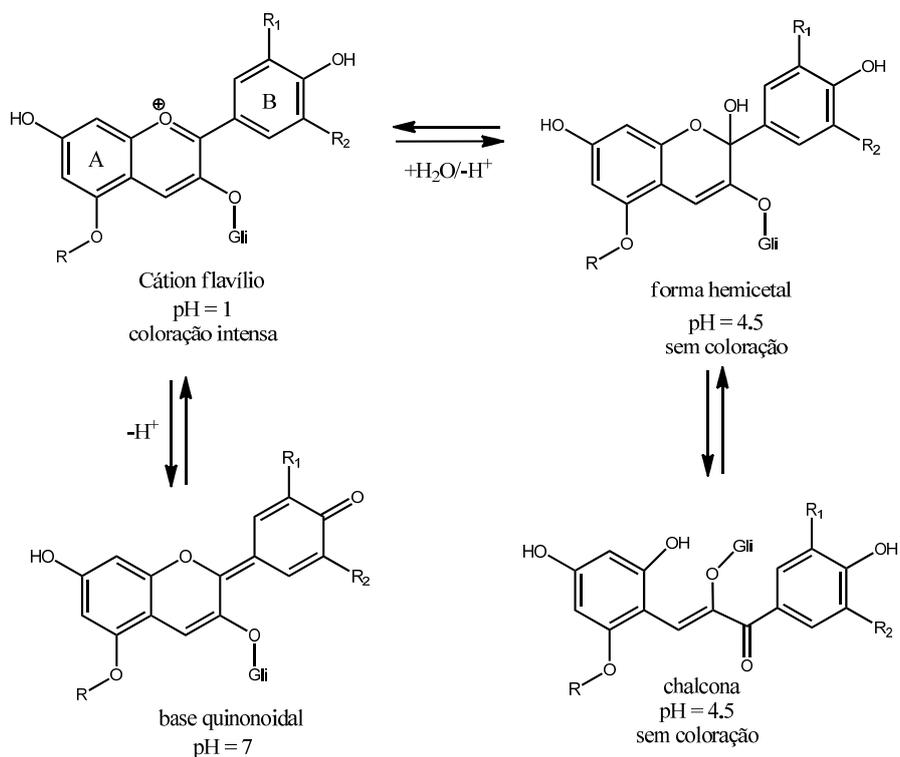


FIGURA 3.8 – Forma estrutural de antocianinas em diferentes valores de pH

A cianidina-3-O-glicosídeo e cianidina-3-O-rutinosídeo são majoritárias nas polpas do açaí, mas também são encontradas peonidina-3-glicosídeo, pelargonidina-3-glicosídeo, entre outras (LICHTENTHALER et al., 2005; SCHAUSS et al., 2006a; De ROSSO et al., 2008; PACHECO-PALENCIA et al., 2009). Neste trabalho alguns genótipos apresentaram maior concentração de lipídios (G20, G21), antocianinas totais e monoméricas (G3; G6; G8; G23; G31), fenólicos totais (G7 e G23), fibras (G11 e G16), sólidos solúveis (G6).

Algumas polpas comerciais com elevados teores de fenólicos totais (CA25; CAL), antocianinas totais e monoméricas (CAI; CAL; CFA; CBA; CAU; CAC)

também foram identificados e, de maneira geral as polpas que apresentaram elevadas concentrações de antocianinas e/ou fenólicos totais foram obtidas em períodos da safra do açaí.

Como discutido anteriormente, a variabilidade encontrada nos resultados das análises para as polpas do açaí pode estar relacionada com o fator genético da espécie, condições edafoclimáticas, de cultivo, grau de maturação dos frutos, localização geográfica da produção, tipo de colheita e processamento dos frutos, entre outros (GORDON et al., 2012; ROJANO et al., 2011; LICHTENTHALER et al., 2005; MENEZES et al., 2008; ALEXANDRE et al., 2004; CARVALHO et al., 2016).

6.2.4. Amostras de polpas do açaí expostas à temperatura e luz (Estudo da degradação)

Duas (2) polpas do açaí expostas à temperatura e luz local (Belém – PA) por seis horas (CPDA 6h) e doze horas (CPDA 12h) foram analisadas quanto à sua composição físico-química e, com seus resultados foram realizados estudos quimiométricos com uma matriz de 113 linhas e 11 colunas.

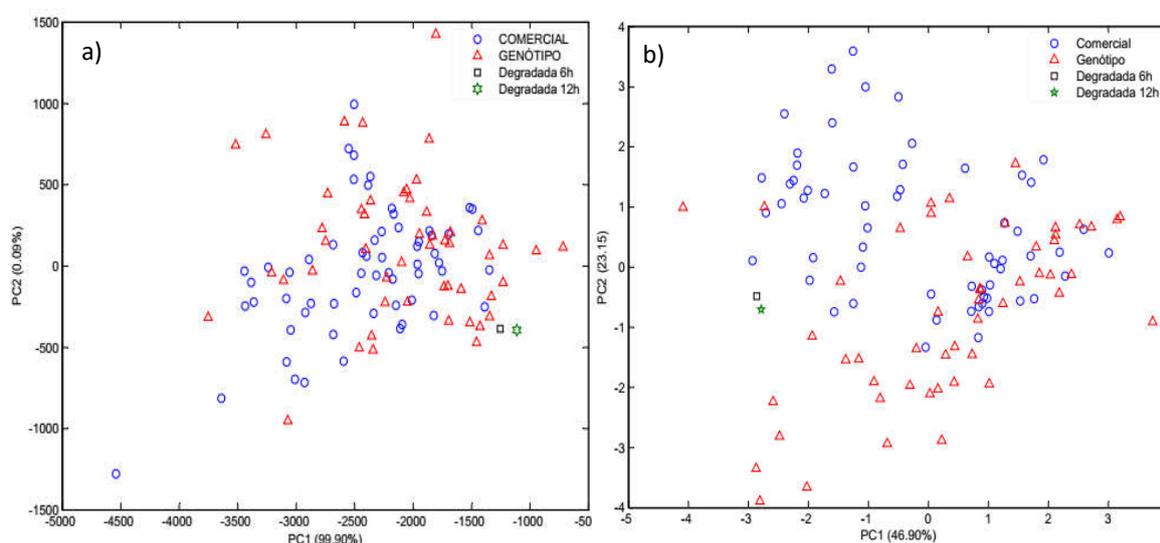


FIGURA 3.9 - Gráfico de escores do estudo com as polpas expostas por 6 e 12 horas à temperatura e luz. a) PC1 x PC2 (dados não escalados); b) PC1 X PC2 (autoescalados).

Com os gráficos de escores (Figura 3.9) verificou-se que as polpas CPDA 6h (□) e CPDA 12h (☆) apresentaram composição físico-química muito semelhante as demais polpas comerciais e de genótipos, ou seja, não foi verificada nenhuma distinção entre as polpas do açaí expostas à temperatura e luz local das que

não tiveram nenhuma exposição, quando avaliados os seus parâmetros físico-químicos e a sua composição fenólica.

No entanto, os resultados dos parâmetros físico-químicos obtidos para as polpas expostas mostraram que o pH, sólidos solúveis totais (SST), teores de antocianinas e fenólicos diminuíram com o tempo de exposição. Assim como verificou-se que o teor de umidade e acidez titulável (AT) aumentaram (Tabela 3.3).

TABELA 3.3 – Valores de pH, acidez, sólidos solúveis totais, teor de antocianinas totais, monoméricas e fenólicos totais das polpas do açaí utilizadas no estudo de degradação.

Código	pH	PARÂMETROS					
		A. T. (g/100g ác.cítrico)	S.S.T (°Brix)	Umidade (g/100g)	Antoc.T (mg/100g)	Antoc. M (mg/100g)	Fenólicos (mg/100g)
CPDA0h	5,22±0,0	1,76±0,0	30,8±3,20	2,98±0,08	276,61±5,04	164,74±0,96	1373,40±4,85
CPDA6h	5,10±0,0	1,87±0,0	15,64±0,58	5,12±0,11	113,05±0,02	82,62±0,07	1305,37±41,2
CPDA12	4,91±0,0	1,86±0,0	11,22±0,0	5,47±0,07	72,17±0,05	32,66±0,19	1178,23±20,5

A.T= acidez titulável; Antoc= antocianinas.

Esses resultados corroboram com as verificações obtidas através das análises por RMN de ¹H (discutido anteriormente no Capítulo 2, Tópico 4.4), onde foi observado que a polpa do açaí expostas sofre degradação através de processos de fermentação acética e butanodioica.

O aumento da acidez da polpa do açaí possivelmente está relacionado com o aumento na concentração do ácido acético causado pela fermentação acética. Assim como a diminuição do teor de sólidos solúveis totais pode estar relacionada com o consumo dos carboidratos pela reação de fermentação butanodioica. A diminuição da concentração de antocianinas e fenólicos totais nas polpas do açaí com o tempo de exposição está relacionada com processos de degradação dos mesmos que são susceptíveis a fatores como pH, temperatura, luz, enzimas, entre outros (LICHTENTHALER et al., 2005; LIMA et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2007).

*Capítulo IV: Uso do ASE™ na obtenção
de extratos da polpa do açaí comercial
e identificação dos compostos
majoritários por RMN 1D e 2D*

7. PARTE EXPERIMENTAL

7.1. O extrator acelerado por solvente (ASE™)

As extrações foram realizadas em um Dionex™ ASE™ (*Accelerated Solvent Extractor*) modelo 350 da Thermo Scientific™ (Figura 4.1) localizado no Laboratório de Bioanalítica Paracelsus na Unicamp sob coordenação da Profa. Dra. Susanne Rath.

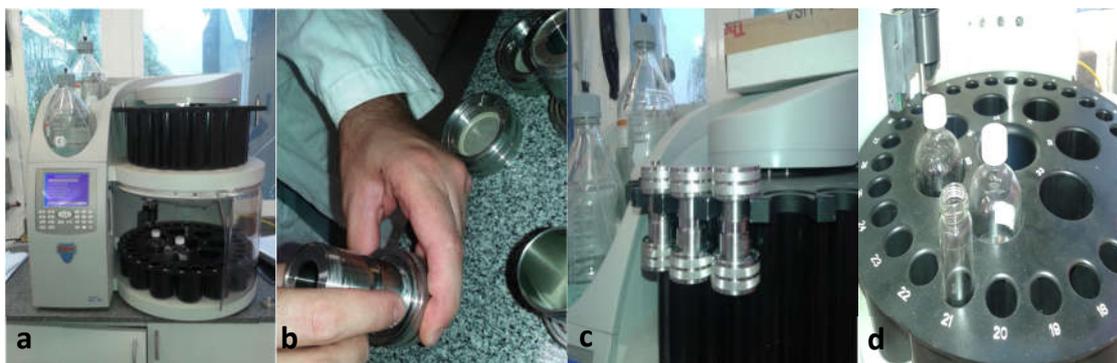


FIGURA 4.1 - (a) Equipamento de extração ASE™ 350; (b, c) cartuchos de acondicionamento de amostra e (d) frascos coletores do extrato.

Esse sistema de extração utiliza solventes de alto grau de pureza (HPLC) com temperaturas e pressão variáveis. O cartucho contendo a amostra fica em contato com o solvente por um tempo determinado pelo usuário e após o ciclo, o solvente extrator é acondicionado em frascos de vidro. Todo o processo de extração é automático.

7.2. Amostra

Uma amostra de polpa do açaí liofilizada (ponto de venda denominado CAI) obtida no comércio local de Belém no período da safra de 2014 foi utilizada para as análises de extrações por ASE 350.

7.3. Obtenção dos extratos

Foram realizadas três análises em cartuchos de extração distintos. Os cartuchos foram preenchidos com cerca de 5 g da polpa do açaí liofilizada. Foram realizados 3 ciclos com 1 minuto de contato amostra/solvente, temperatura de trabalho foi de 100° C com 1000 *psi* de pressão, purga com N₂ (Tabela 4.1).

TABELA 4.1 – Extrações realizadas com a polpa do açaí comercial com ASE 350.

Cartucho de extração 1 (Clean up)	Cartucho de extração 2	Cartucho de extração 3
Hexano (extrato a)	Metanol (extrato c)	Água (extrato d)
Metanol (extrato b)		

7.4. Aquisição dos experimentos de RMN

Para identificação dos compostos orgânicos presente nos extratos, os espectros de RMN de ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC, HMBC e DOSY (*Diffusion Ordered Spectroscopy*) foram adquiridos em um equipamento Bruker modelo AVANCE III de 9,4 Tesla (400 MHz para frequência do hidrogênio e 100 MHz para ^{13}C) com sonda de detecção inversa (PABBI) de 5 mm equipada com gradiente de campo no eixo z, ATMA® (*Automatic Tuning MAtching*) e SampleXpress®.

Os parâmetros utilizados na aquisição e processamento dos espectros de RMN de ^1H e 2Ds dos extratos da polpa do açaí liofilizada comercial foram os mesmos descritos no Capítulo 2. Já os parâmetros para os experimentos de RMN de ^{13}C e de coeficiente de difusão realizado pela técnica DOSY são apresentados nas Tabelas 4.2 e 4.3.

TABELA 4.2 – Parâmetros de aquisição e processamento do espectro de RMN de ^{13}C usado para identificação dos compostos orgânicos presentes nos extratos da polpa do açaí liofilizada.

PARÂMETROS	RMN DE ^{13}C
Sequência de pulso (denominação Bruker)	zgpg30
Tempo de aquisição (AQ)	0,68 s
Tempo de espera entre cada promediação (d1)	0,2 s
Número de aquisições (ns)	2048
Largura do pulso (p1)	14 μs (90°)
Ganho do receptor (RG)	2050
Janela espectral (SW)	238 ppm
Número de pontos digitalizados TD (F1)	32768
Número de pontos usados no processamento (SI)	32768
Multiplicação exponencial (LB)	3,0 Hz
Temperatura	300 K

O processamento dos dados de RMN de ^1H foi realizado com o programa *TopSpin*TM onde foram ajustados a fase, linha de base e a calibração espectral pelo sinal do solvente deuterado através do programa *TopSpin*TM.

O experimento de coeficiente de difusão obtido através da técnica DOSY (*Diffusion Ordered Spectroscopy*) foi realizado alterando-se o tempo de aplicação do gradiente de campo (*little delta*) e mantendo-se *default* os parâmetros de tempo de difusão (Δ ou *big delta*) e potência do gradiente de campo (*g* ou *pl9*). A intensidade do gradiente de campo aumentou linearmente de 5% a 95%. Os espectros gerados foram processados no programa *TopSpin*TM e os resultados obtidos com o *Dynamics*TM.

TABELA 4.3 – Parâmetros de aquisição e processamento utilizados no experimento de DOSY.

PARÂMETROS	Difusão (DOSY 2D)	
	F2	F1
Sequência de pulso (denominação Bruker)	ledbpgp2s	
Largura do pulso (p1)	8,79 (90°)	
Largura do pulso (p2)	17,46 (180°)	
Tempo de espera entre cada promediação (d1)	3,0 s	
Tempo de difusão, Δ (D20)	0,06 s	
Atenuação da potência do gradiente de campo (P19)	50 dB	
Número de aquisições (ns)	8	
<i>Dummy Scan</i> (DS)	4	
Ganho do receptor (RG)	25.4	
Número de pontos digitalizados (TD)	65536	16
Janela espectral (SW)	9.9967 ppm	20.0254 ppm
Tempo de aquisição (AQ)	8.1920500 s	0.0009984 s
Número de pontos usados no processamento (SI)	65536	16
Multiplicação exponencial (LB)	1,0 Hz	0,3 Hz
Temperatura	298 K	

7.5. Identificação dos compostos

Para a identificação dos compostos orgânicos presentes nos extratos da polpa do açaí comercial obtidos pelo extrator ASETM 350, a metodologia utilizada foi a mesma descrita no Capítulo 2 (Item 3.4) deste trabalho.

8. RESULTADOS E DISCUSSÕES

8.1. Obtenção dos extratos

Na realização dos primeiros experimentos ocorreu entupimento nos cartuchos, o que impediu a obtenção dos extratos. Dessa forma, foi adicionado aproximadamente 5 g de terra diatomácea para preenchimento e para evitar entupimentos nos cartuchos de extração.

Os extratos obtidos (Tabela 4.4) foram secos em temperatura ambiente com um evaporador rotativo no Laboratório de Produtos Naturais do DQ/ UFSCar. Os extratos secos denominados extratos a – d foram solubilizados em solventes deuterados e analisados por RMN. O extrato hexânico apresentou-se na forma de óleo de cor amarela e os demais extratos apresentaram coloração roxo escuro (Figura 4.2).

TABELA 4.4 – Extratos obtidos com a polpa do açaí comercial pelo extrator ASE 350.

Cartucho de extração 1 (Clean up)	Cartucho de extração 2	Cartucho de extração 3
Extrato hexânico (extrato a)	Extrato metanólico puro (extrato c)	Extrato aquoso puro (extrato d)
Extrato metanólico desengordurado com hexano (extrato b)		

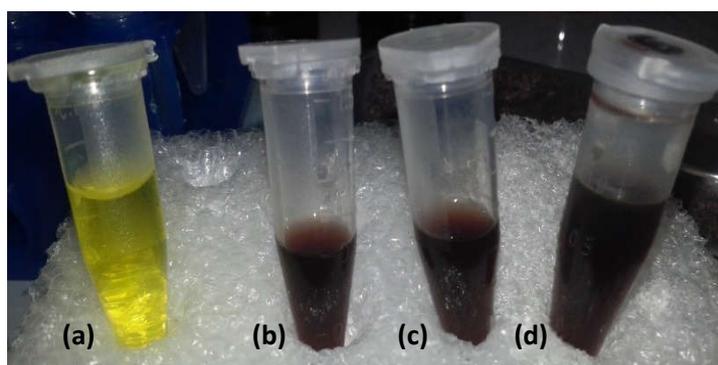


FIGURA 4.2 - Extratos da polpa do açaí liofilizada comercial obtidos pelo sistema ASE 350. Extrato hexânico (a); extrato metanólico desengordurado com hexano (b); extrato metanólico puro (c) e extrato aquoso puro (d).

8.2. Obtenção das medidas por RMN de ^1H

Com os espectros de RMN de ^1H foi possível avaliar a eficiência da extração por ASE 350 da polpa do açaí comercial liofilizada em diferentes solventes.

8.2.1. Cartucho de extração 1 – *Clean up*

Para o extrato hexânico (**extrato a**), como esperado, verificou-se que o solvente teve grande interação com os compostos apolares presentes na polpa do açaí roxo (SCHAUSS et al., 2006b; NASCIMENTO et al., 2008; CARVALHO et al., 2011; WYCOFF et al., 2015), apresentando-se na forma de um óleo amarelo (Figura 4.2) e com um espectro por RMN de ^1H sem grande complexidade com sinais basicamente de compostos lipídicos saturados e insaturados (Figura 4.3).

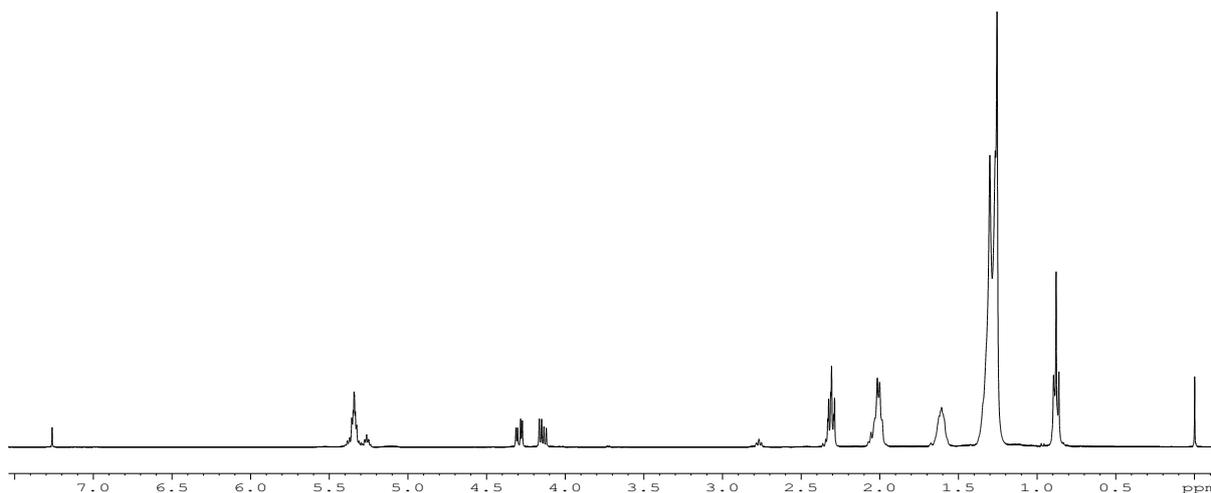


FIGURA 4.3 - Espectro de RMN de ^1H do extrato hexânico (extrato a) da polpa do açaí comercial por ASE 350. CDCl_3 em um equipamento 400 MHz.

Já para o extrato metanólico desengordurado com hexano (extrato b) verificou-se um perfil espectral complexo, contendo sinais com diferentes intensidades por todo o espectro (0.8 – 7.5 ppm), mas com menor quantidade de lipídios (Figura 4.4).

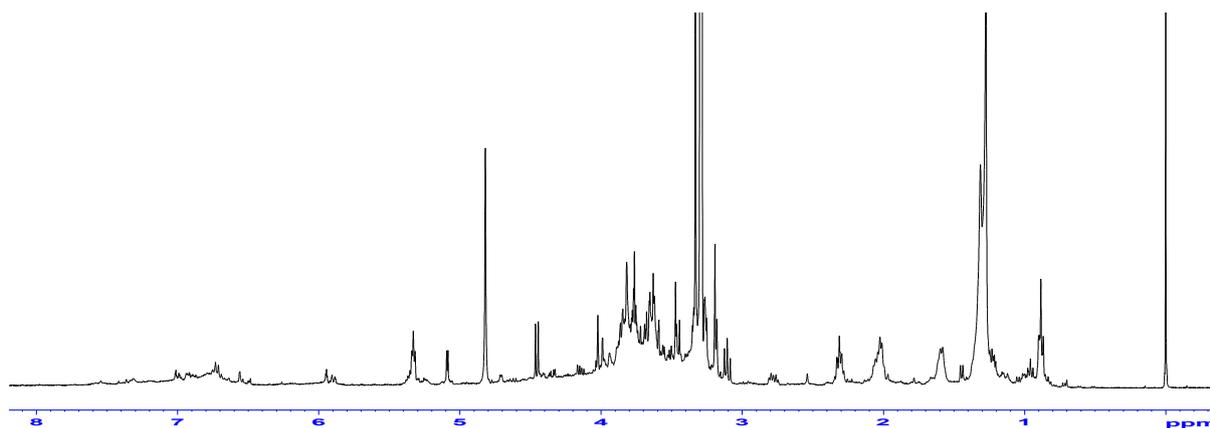


FIGURA 4.4 - Espectro de RMN de ^1H do extrato metanólico desengordurado com hexano (extrato b) da polpa do açai comercial por ASE 350. MeOH-d_4 em um equipamento 400 MHz.

O extrato metanólico apresentou-se rico em compostos polares e com baixo teor de compostos de baixa polaridade, foi possível verificar sinais que antes estavam com sobreposição na região de 0,5 – 3,0 e 4,0 – 4,5 ppm.

Com estes espectros foi possível verificar que o teste de *clean up* para a amostra da polpa do açai liofilizada com o extrator ASE 350 foi muito eficiente, pois sinais dos compostos lipídicos verificados no extrato hexânico (extrato a) foram bastante minimizados no perfil espectral do extrato metanólico (extrato b) (Figura 4.5).

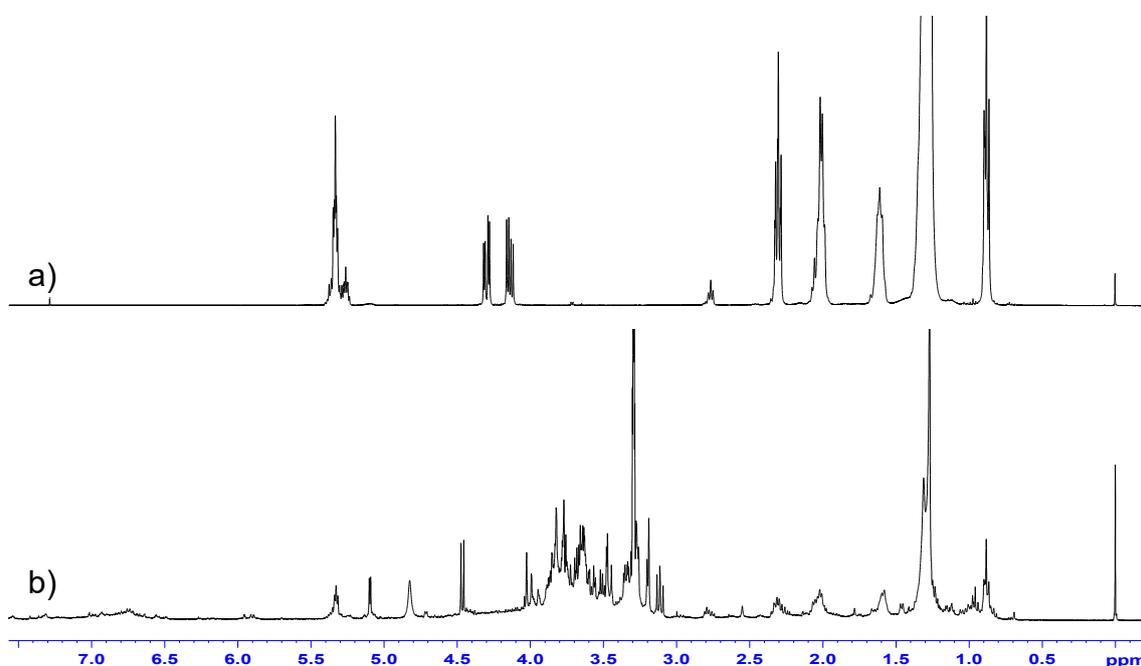


FIGURA 4.5 – Comparação entre (a) extratos hexânico em CDCl_3 e (b) metanólico desengordurado com hexano em MeOH-d_4 , da polpa do açai comercial extraída com ASE 350 com terra diatomácea em um equipamento 400 MHz.

Isso mostra que o uso do ASE 350 é muito viável para esse tipo de purificação em amostras de alimentos e produtos naturais, pois além das vantagens da técnica como baixo tempo de extração, baixo consumo de solvente e baixo risco de contaminação do extrato, ainda não há desperdício da amostra pois a mesma fica acondicionada no mesmo cartucho de extração além do tempo de contato amostra/solvente(s) ser muito curto.

8.2.2. Cartucho de extração 2 e 3

Na obtenção dos espectros de RMN de ^1H para o extrato metanólico puro (extrato c), aquoso puro (extrato d) e até para o extrato metanólico desengordurado com hexano (extrato b) houve grande dificuldade na etapa de homogeneização do campo magnético. No entanto, apesar disso, os espectros foram adquiridos e são discutidos a seguir.

Para o extrato metanólico puro (extrato c) da polpa do açaí pôde-se verificar diversos sinais por todo o espectro (Figura 4.6). No qual o metanol com as condições de trabalho no ASE 350 teve interação com compostos de polaridades variadas.

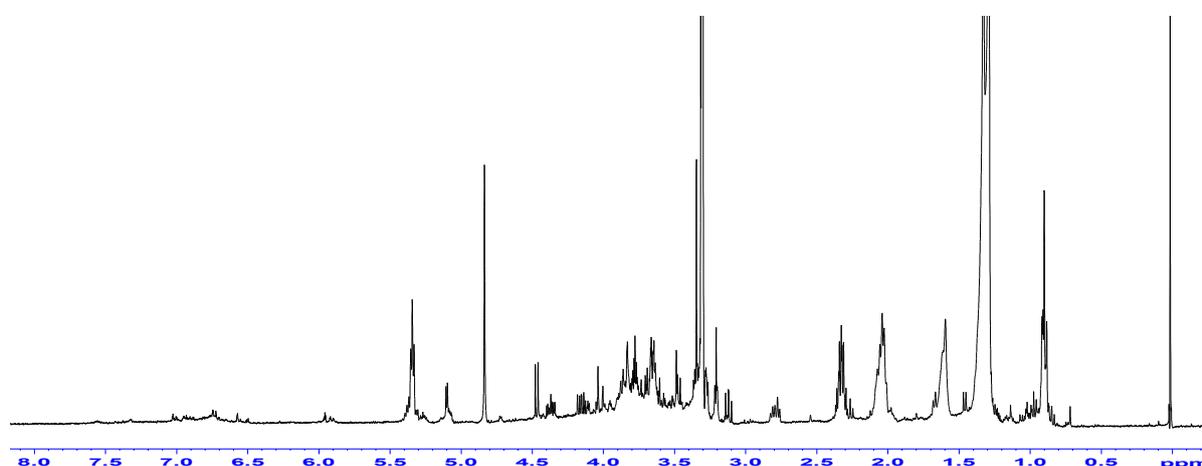


FIGURA 4.6 - Espectro de RMN de ^1H do extrato metanólico puro da polpa do açaí liofilizada (extrato c) por ASE 350. MeOH-d₄ em um equipamento 400 MHz.

Para o extrato aquoso puro da polpa do açaí (extrato d) foram realizados dois preparos de amostras, no primeiro, o extrato aquoso foi liofilizado e resuspendido em 600 μL de D_2O e, no segundo, o preparo foi realizado com 90% do extrato aquoso puro (sem secar) com 10% de D_2O . Em ambos os espectros de RMN de ^1H verificou-

se que os extratos aquosos apresentaram sinais na região de hidrogênios de aminoácidos (1,0-1,6 ppm) e na região de carboidratos (3,5-5,5) (Figura 4.7).

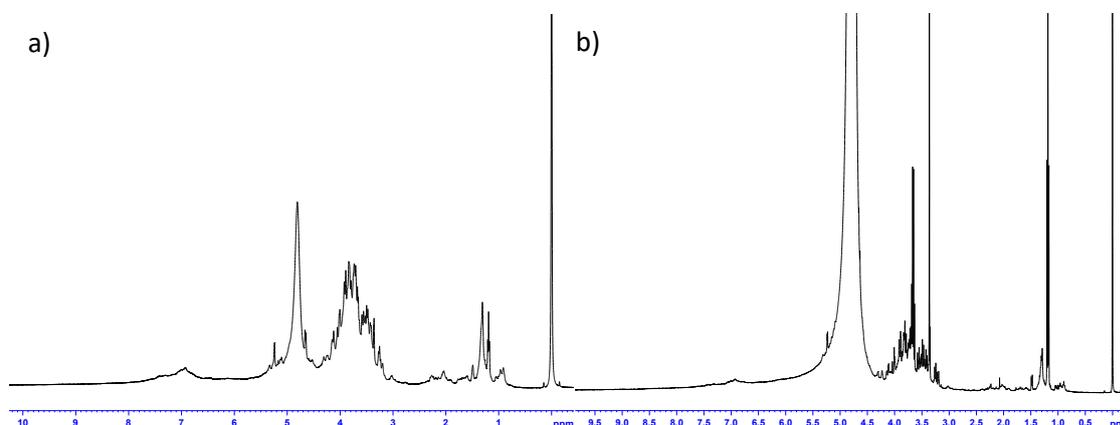


FIGURA 4.7 - Espectro de RMN de ^1H do extrato aquoso puro da polpa do açaí liofilizada (extrato d) por ASE 350. a) extrato liofilizado e b) extrato com 10% de D_2O .

No entanto não foram observados sinais com intensidade significativa na região de hidrogênios aromáticos (6,0 – 8,5 ppm). Possivelmente nas condições de trabalho utilizadas (temperatura, pressão e tempo de extração) a água não teve forte interação com as antocianinas, flavonoides não-antociânicos e outros compostos fenólicos que são presentes nos frutos do açaí (DEL POZO-INSFRAN et al., 2004; SCHAUSS et al., 2006a; PACHECO-PALENCIA et al., 2008, 2009; KANG et al., 2010; RIBEIRO et al., 2010; GORDON et al., 2012).

Alguns trabalhos que utilizaram a extração com água ou água acidificada em polpas do açaí e identificam diversos compostos fenólicos (LICHTENTHÄLER et al., 2005; (PACHECO-PALENCIA et al., 2009; ROJANO et al., 2011). Porém, com os nossos resultados, podemos sugerir que extração com água utilizando o ASE 350 nas condições analisadas não foi muito efetiva para a extração de compostos fenólicos na polpa do açaí liofilizada.

Em relação ao problema com a homogeneidade do campo para esses extratos, podemos sugerir que neles podem estar presentes substâncias com propriedades ferromagnéticas, como por exemplo, excesso de íons provenientes do material utilizado no preenchimento do cartucho de extração (terra diatomácea). Pois, apesar de ser composto principalmente por sílica (91%) pode contém impurezas como argilominerais, matéria orgânica, hidróxidos, areia quartzosa e carbonatos de cálcio e de magnésio (SOUZA et al., 2003).

Como objetivamos comparar os extratos da polpa do açaí comercial obtidos pela extração com ASE 350 e com a extração do tipo convencional, os experimentos foram repetidos na Embrapa Agroindústria Tropical (Fortaleza – CE) pela Dra. Lorena Mara Alexandre e Silva, utilizando a mesma matriz (amostra da polpa do açaí comercial CAI) e extrator DIONEX ASE 350. As verificações são discutidas a seguir.

8.3. Obtenção dos extratos realizadas na Embrapa Agroindústria Tropical (Fortaleza – CE)

Os cartuchos de extração foram preenchidos com cerca de cinco (5) g da polpa do açaí liofilizada sem adição de terra diatomácea. Foram realizados quatro (4) ciclos de extração com cinco (5) minutos de contato amostra/solvente, totalizando 30 minutos por fração com temperatura de 40° C e pressão de trabalho entre 1000 a 1500 *psi*. A purga foi realizada com N₂ (nitrogênio gasoso) por 80 s. Esses novos experimentos foram denominados condições de extração II. As extrações realizadas em cada cartucho e suas respectivas denominações (extração 1.1 a 3) podem ser verificadas na Tabela 4.5.

TABELA 4.5 – Extrações realizadas com a polpa do açaí comercial pelo extrator ASE 350 na Embrapa Agroindústria Tropical (repetição sem terra diatomácea).

Cartucho de extração 1 <i>Clean-up</i>	Cartucho de extração 2	Cartucho de extração 3
Hexano (extração 1.1)	Metanol (extração 2)	Água (extração 3)
Metanol (extração 1.2)		

Os extratos foram secos em rota-evaporador, acomodados em frascos âmbar tipo penicilina e encaminhados via correio para o laboratório de RMN da UFSCar - São Carlos. As amostras foram solubilizadas em solventes deuterados e analisados por RMN, no qual a extrato hexânico apresentou-se na forma de óleo amarelo e os demais extratos de coloração roxo escuro (Figura 4.8).

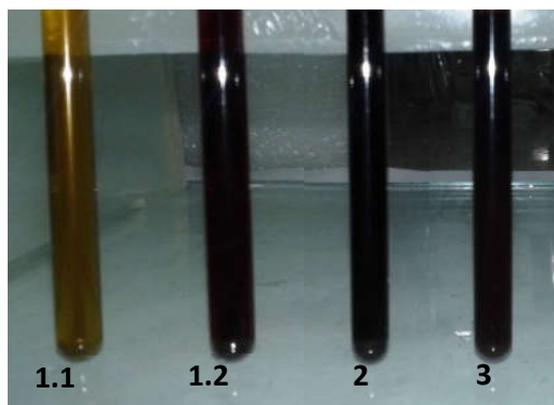


FIGURA 4.8 - Extratos da polpa do açai liofilizada comercial obtidos pelo sistema ASE 350 na Embrapa Agroindústria Tropical. Extrato hexânico (1.1); extrato metanólico desengordurado com hexano (1.2); extrato metanólico puro (2) e extrato aquoso puro (3).

8.3.1. Cartucho de extração 1 – *Clean up*

O espectro de RMN de ^1H do extrato hexânico nas novas condições de extração foi idêntico ao obtido com terra diatomácea (extrato a) (Figura 4.9).

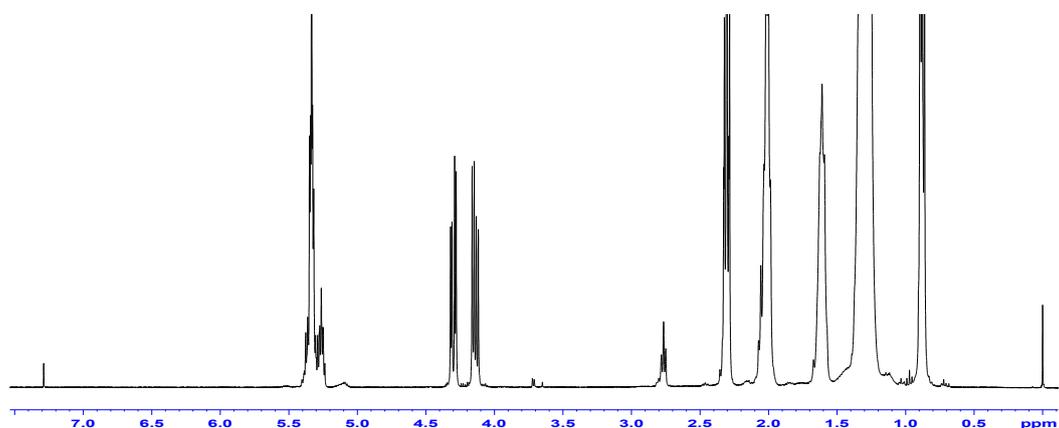


FIGURA 4.9 - Espectro de RMN de ^1H do extrato hexano (extrato 1.1) da polpa do açai comercial por ASE 350 obtido na Embrapa Agroindústria Tropical. CDCl_3 em um 400 MHz.

A mesma observação foi verificada para o extrato metanólico desengordurado com hexano (extrato 1.2), pois apresentou perfil espectral idêntico ao extrato obtido com terra diatomácea (extrato b) (Figura 4.3). No entanto, na aquisição do experimento para essa amostra, não houve problema na homogeneização do campo magnético.

Essa amostra apresentou um perfil espectral complexo, contendo vários sinais e com fortes intensidades por todo o espectro (0.8 – 7.5 ppm), mas principalmente na região de 3,0 a 4,0 ppm (Figura 4.10).

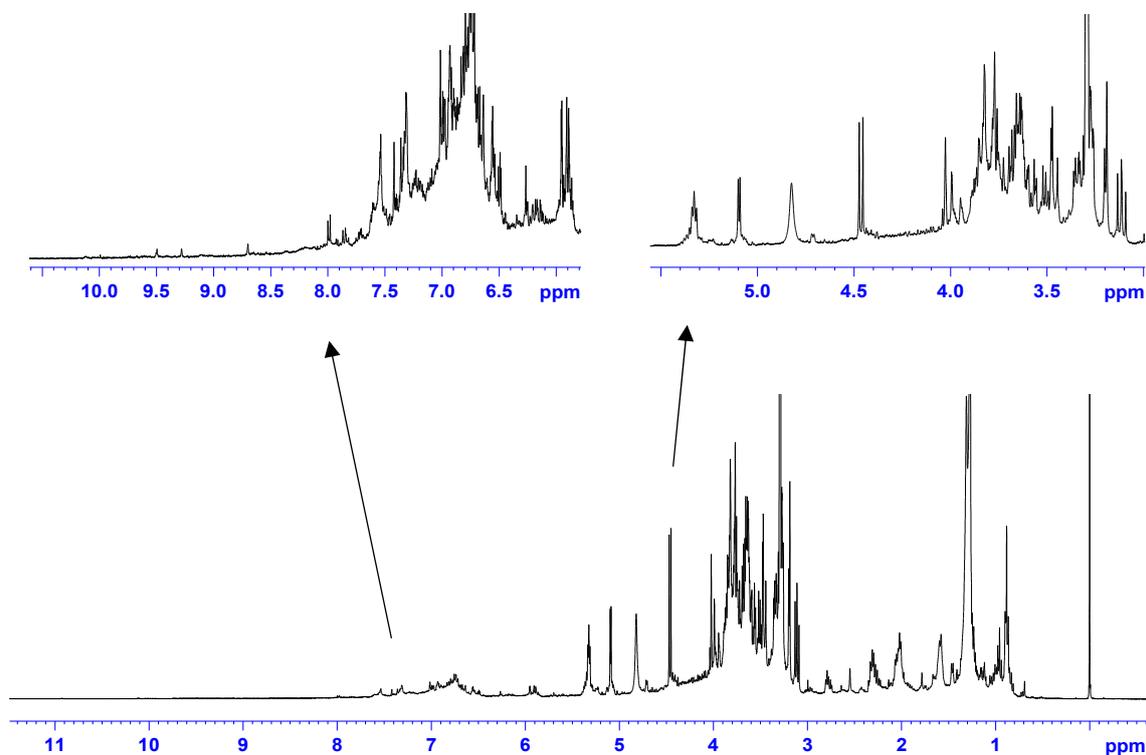


FIGURA 4.10 - Extrato metanólico desengordurado com hexano (extração 1.2) da polpa do açaí liofilizada por ASE com ampliação da região aromática e de carboidratos. MeOH- d_4 em um 400 MHz.

Posteriormente, a mesma amostra foi selecionada para estudo por LC-DAD-SPE/NMR para isolamento e identificação dos compostos minoritários presentes na polpa do açaí. Os métodos e resultados serão apresentados no Capítulo 5 (Item 10.3) deste trabalho.

8.3.2. Cartucho de extração 2 – Extração com MeOH

O espectro de RMN de ^1H do extrato metanólico puro (extrato 1.3) (Figura 4.11) foi idêntico ao extrato metanólico obtido com terra diatomácea (extrato c) (Figura 4.4). No entanto, não houve problema na homogeneização do campo magnético na aquisição do experimento para essa amostra.

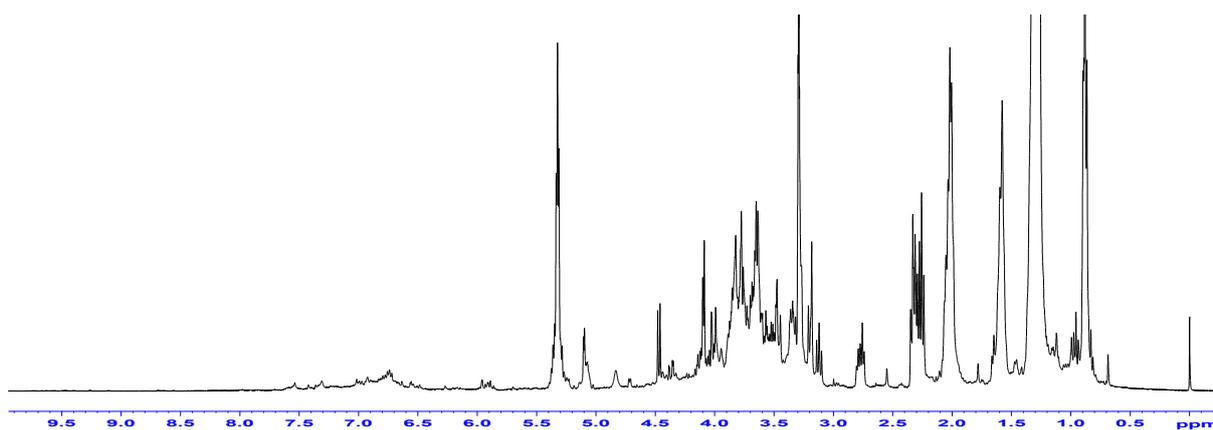


FIGURA 4.11 - Espectro de RMN de ^1H do extrato metanólico (extração 2) da polpa do açai liofilizada por ASE 350. MeOH-d_4 em um 400 MHz.

Verificou-se que o metanol nas condições de trabalho selecionadas interagiu com compostos de polaridades variadas da polpa do açai, pois observou-se sinais intensos na região de hidrogênios alifáticos, anoméricos de carboidratos e alguns menos intensos na região de hidrogênios aromáticos.

Com esse extrato foi possível realizar a comparação com uma extração metanólica da polpa do açai obtida por método convencional (preparo realizado conforme protocolo descrito na no Item 3.2 do Capítulo 2), no qual notou-se que o extrato metanólico obtido pela técnica de extração acelerada por solvente apresentou um perfil espectral com grande aumento na intensidade de todos os sinais que da extração metanólica convencional (Figura 4.12).

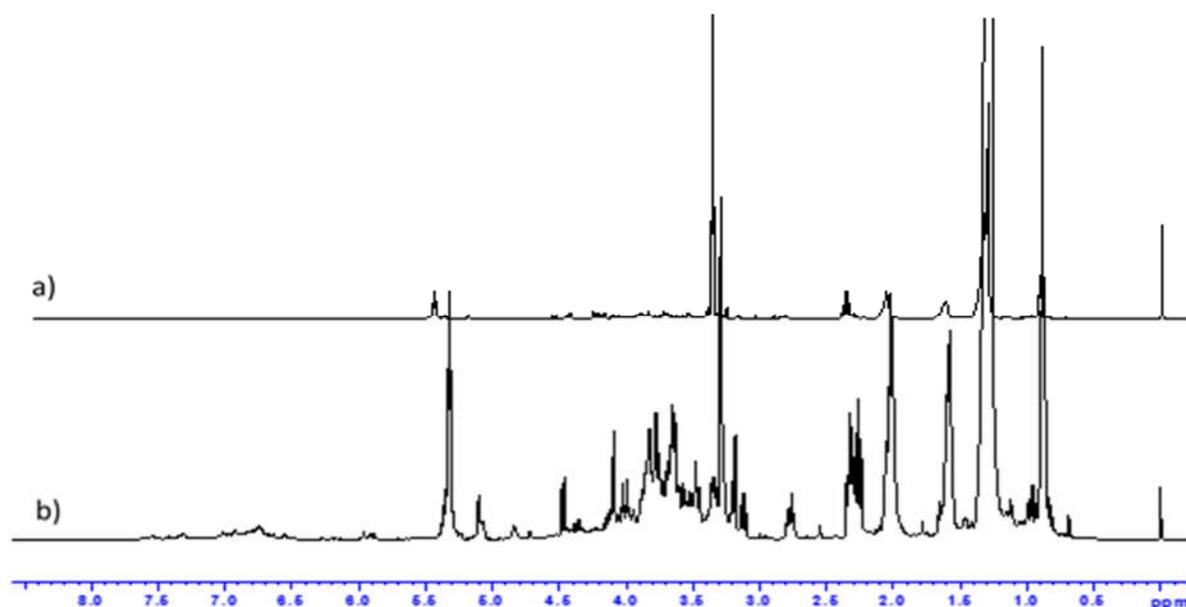


FIGURA 4.12 - Espectros de RMN de ^1H dos extratos metanólicos da polpa do açai liofilizada. a) Extração convencional (60 mg polpa do açai em 1 mL de MeOH-d_4) e b) Extração por ASE 350. Os espectros a e b não estão na mesma escala.

Isso mostrou que a técnica de extração acelerada por solvente apresentou um extrato com maior concentração dos compostos presentes na polpa do açaí liofilizado com menor tempo de extração e utilizando solvente não deuterado. O ASE é uma técnica alternativa muito viável para a extração dos compostos em amostras ambientais, alimentos e de constituintes ativos em produtos naturais (STICHER, 2008; MUSTAFA & TURNER, 2011).

No entanto, o equipamento Dionex ASE 350 que tivemos acesso é extremamente delicado e apresenta uma série de detalhes (variação na temperatura, pressão, entupimento do cartucho) que podem afetar a repetibilidade da extração quando envolve grande quantidade de amostras, perdendo dessa forma a robustez, o que torna inviável a obtenção de extratos para posterior tratamento quimiométrico.

8.3.3. Cartucho de extração 3 – Extração com H₂O

O espectro de RMN de ¹H do extrato aquoso puro (extrato 3) da polpa do açaí comercial liofilizada nas condições de extração II apresentou poucos sinais e sem resolução entre os deslocamentos químicos de 1,0 e 6,0 ppm (Figura 4.13).

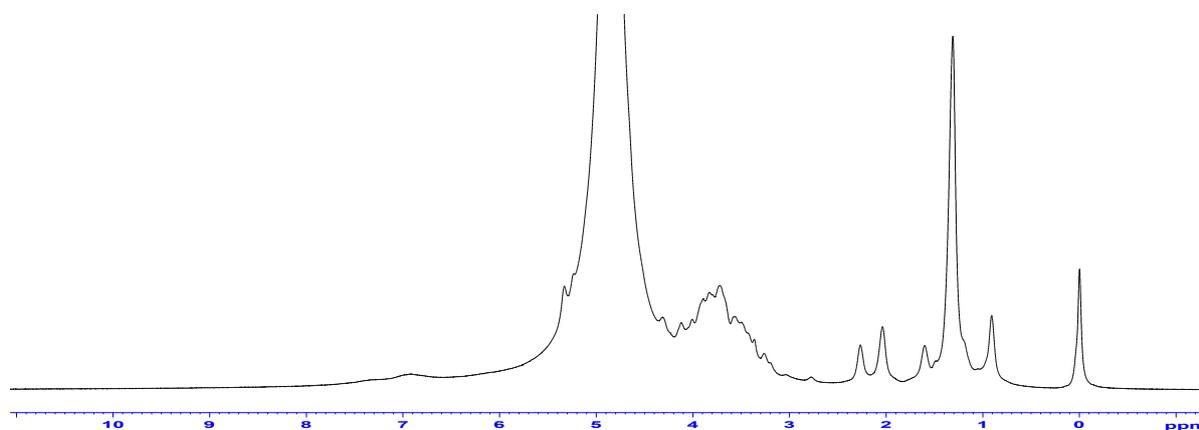


FIGURA 4.13 - Espectro de RMN de ¹H do extrato aquoso puro (extração 3) da polpa do açaí comercial liofilizada por extrator por ASE 350. D₂O em um 400 MHz.

Quando comparamos uma extração aquosa por método convencional (60 mg polpa do açaí em 1 mL de D₂O) com a extração aquosa por ASE 350, notamos que a primeira apresentou um perfil espectral de RMN de ¹H melhor que o obtido com a extração acelerada por solvente, pois é possível verificar mais sinais no espectro, principalmente na região de carboidratos (Figura 4.14).

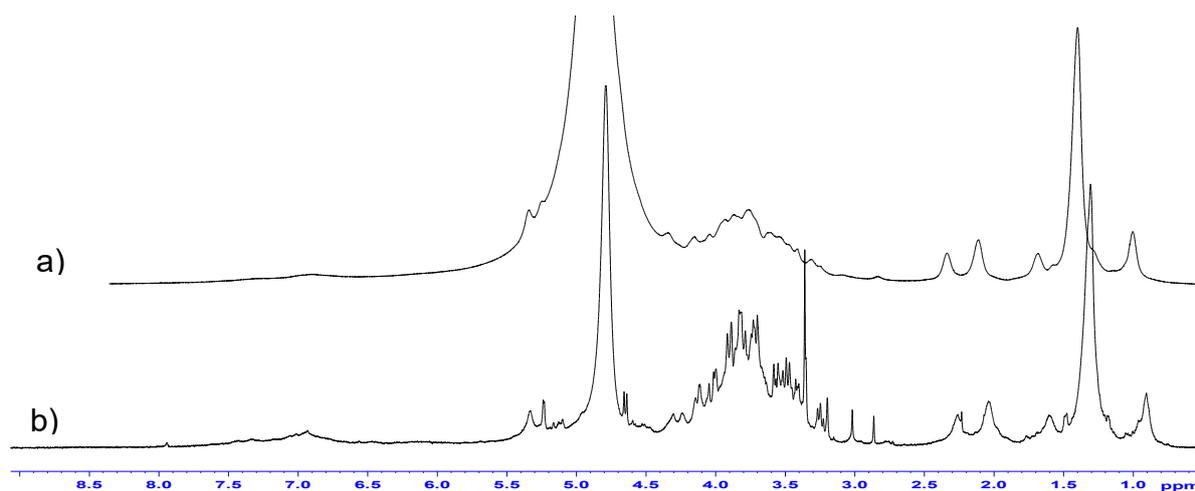


FIGURA 4.14 - Espectros de RMN de ^1H dos extratos aquosos da polpa do açaí liofilizada. a) Extração por ASE 350 e b) Extração convencional. D_2O em um 400 MHz.

Assim como discutido anteriormente, para esse extrato também não foram verificados sinais com intensidade significativa na região de hidrogênios aromáticos (6,5 – 9,0 ppm). Desta maneira, podemos sugerir que extração com água por ASE 350 tanto nas condições de extração I como nas condições de extração II, não foram eficientes para a extração de compostos fenólicos da polpa do açaí liofilizada.

Uma outra observação importante sobre o extrato aquoso foi a dificuldade da homogeneidade do campo magnético (*shimming*) no momento da aquisição do espectro de RMN de ^1H . Podemos sugerir que devido a sua afinidade com a água, possivelmente minerais presentes na polpa do açaí como potássio, cálcio, fósforo, magnésio, sódio, ferro, entre outros possam estar presentes em maior quantidade neste extrato que nos demais extratos da polpa do açaí analisados (GORDON et al., 2012; MENEZES et al., 2008; OLIVEIRA, CARVALHO & NASCIMENTO, 2000; OLIVEIRA et al., 2007).

8.4. Identificação dos compostos por RMN 1D e 2D

8.4.1. Extrato hexano

a) Compostos identificados

Conforme verificado anteriormente, o espectro de RMN de ^1H do extrato hexânico da polpa do açaí apresentou sinais característicos de compostos alifáticos como ácidos graxos e uma unidade de glicerol.

Na polpa do açaí já foram encontrados de 20,82 a 52,9% de lipídios (CARVALHO et al., 2017; RUFINO et al., 2011; NASCIMENTO et al., 2008; KANG et al., 2010; SCHAUSS et al., 2006a), no qual os principais ácidos graxos identificados por CG-MS são o oleico (18:1), linoleico (18:2), palmítico (18:0) e esteárico (16:0) (SCHAUSS et al., 2006b; NASCIMENTO et al., 2008; CARVALHO et al., 2011; FAVACHO et al., 2011; LUO et al., 2012).

Com base na literatura (BARISON et al., 2010; WYCOFF et al., 2015; COLZATO et al., 2008), os sinais referentes aos trigliceróis amplamente encontrados em amostras de óleos comestíveis foram verificados nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do extrato hexânico da polpa do açaí e são apresentados nas Figuras 4.15 e 4.16.

Os sinais verificados no espectro de RMN de ^1H dos trigliceróis do extrato hexânico da polpa do açaí por ASE (Figura 4.15) foram codificados e seus respectivos deslocamentos químico e denominação podem ser verificados na Tabela 4.6.

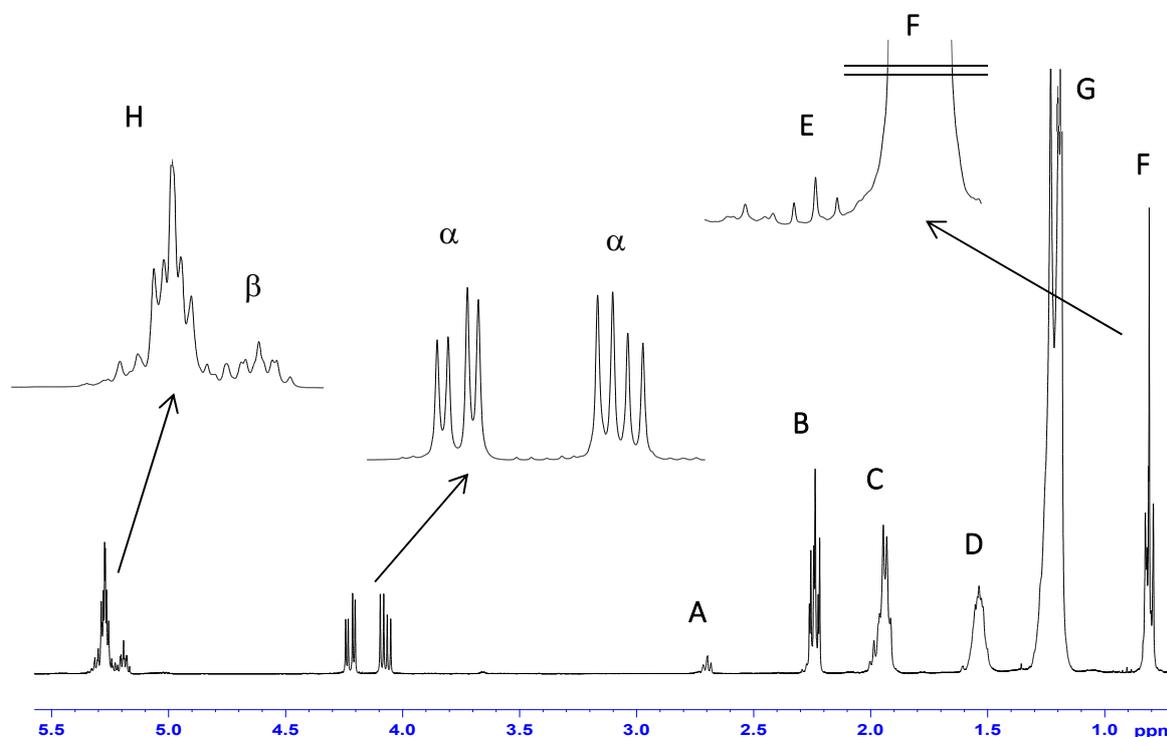


FIGURA 4.15 - Espectro de RMN de ^1H do extrato hexânico da polpa do açaí por ASE com atribuições dos sinais referentes a unidade glicerol e das cadeias de ácidos graxos. $\text{CHCl}_3\text{-d}_4$ em um 400 MHz.

TABELA 4.6 – Atribuição dos deslocamentos químicos de RMN de ^1H dos trigliceróis do extrato hexânico da polpa do açaí por ASE.

δ (ppm)*	Código	Denominação
0,88	F	metilas terminais de todos os ácidos graxos #
0,97	E	metila do ácido graxo linolênico
1,28	G	metilênicos de todos os ácidos graxos
1,60	D	metilênicos β carbonila de todos os ácidos graxos
2,01	C	metilênicos α olefinicos de todos os ácidos graxos insaturados
2,30	B	metilênicos α carbonila de todos os ácidos graxos
2,76	A	metilênicos entre olefinas dos ácidos graxos linoleico e linolênico
4,14	α	unidade de glicerol (-CH ₂ -O-CO-R)
4,30		
5,26	β	unidade de glicerol (> CH-O-CO-R)
5,33	H	Metílicos de todos os ácidos graxos insaturados

*Valores referenciados pelo sinal da referência interna TMS em 0.0 ppm.

Exceto para o ácido linolênico.

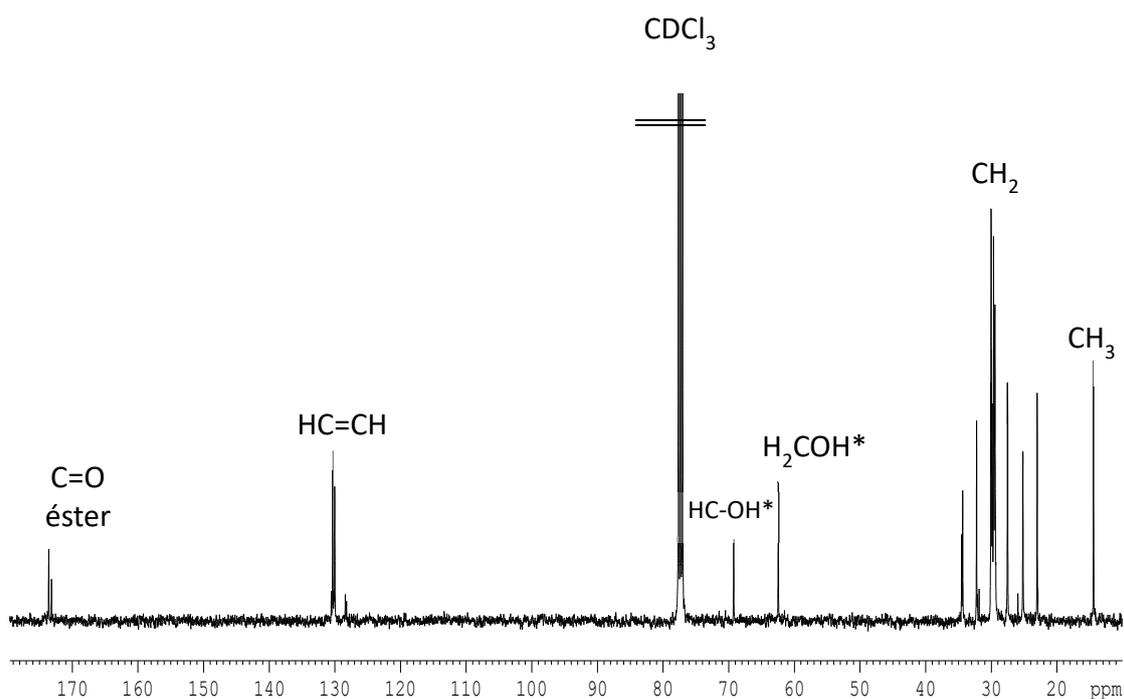


FIGURA 4.16 - Espectro de RMN de ^{13}C do extrato hexânico da polpa do açaí por ASE com atribuições. CDCl_3 em um equipamento 400 MHz.

*Sinais referentes aos trigliceróis

As atribuições dos trigliceróis presentes no extrato hexânico do açaí foram confirmadas com as correlações ^1H - ^1H e ^1H - ^{13}C verificadas nos espectros bidimensionais de COSY, HSQC e HMBC (Figuras 4.17 a 4.19).

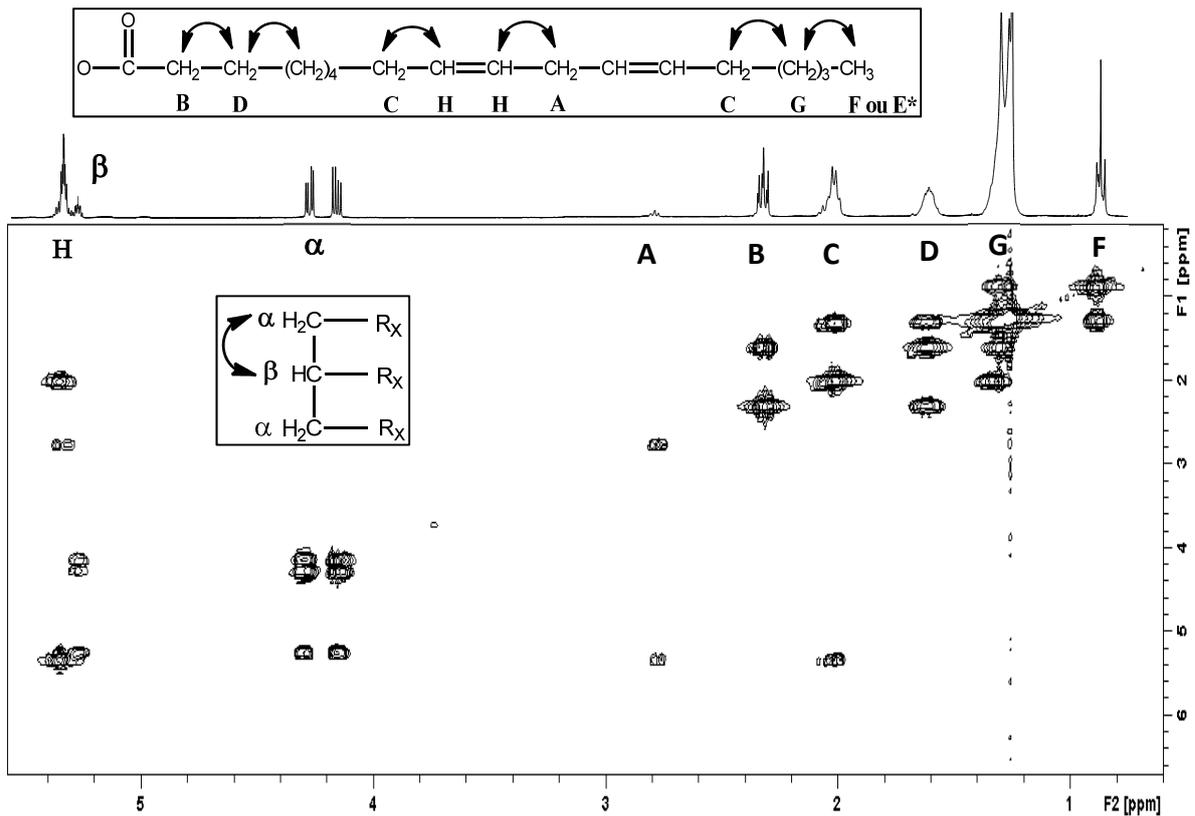


FIGURA 4.17 – Mapa de contorno COSY $^1\text{H}-^1\text{H}$ do extrato hexano da polpa do açaí por ASE 350 com atribuições. CDCl_3 em um 400 MHz.

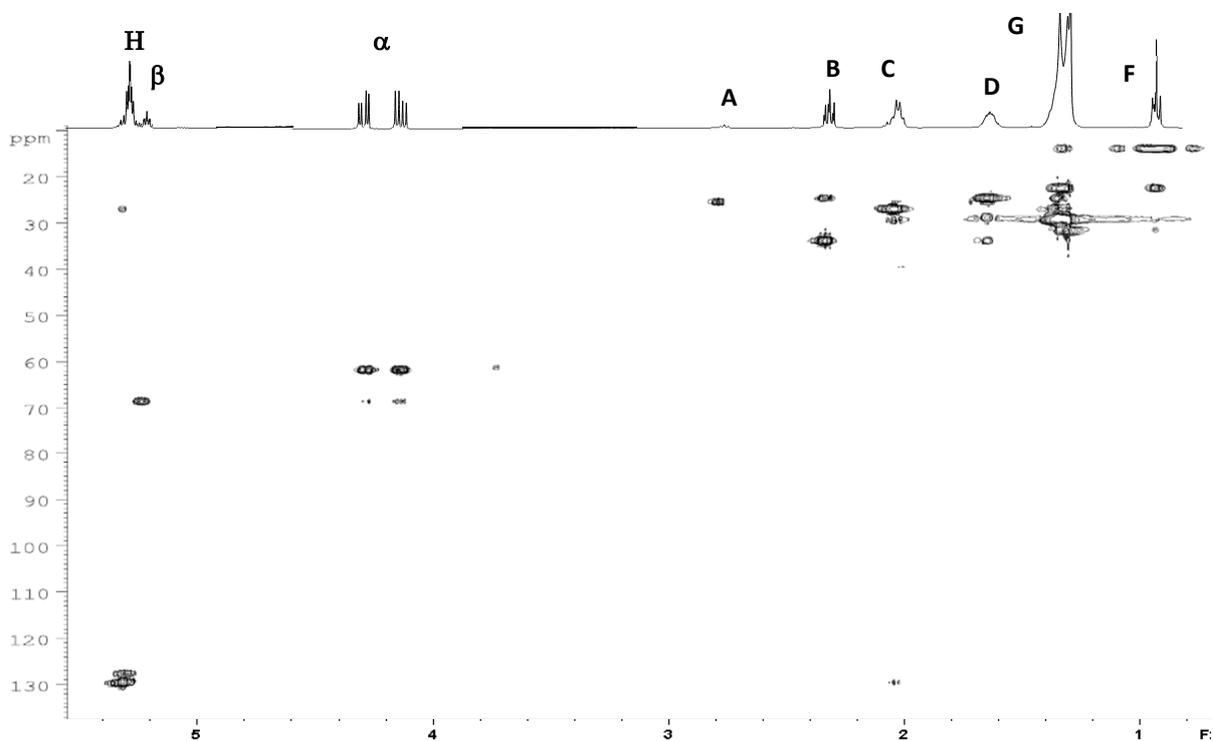


FIGURA 4.18 – Mapa de contorno HSQC do extrato hexano da polpa do açaí por ASE 350 com atribuições. CDCl_3 em um 400 MHz.

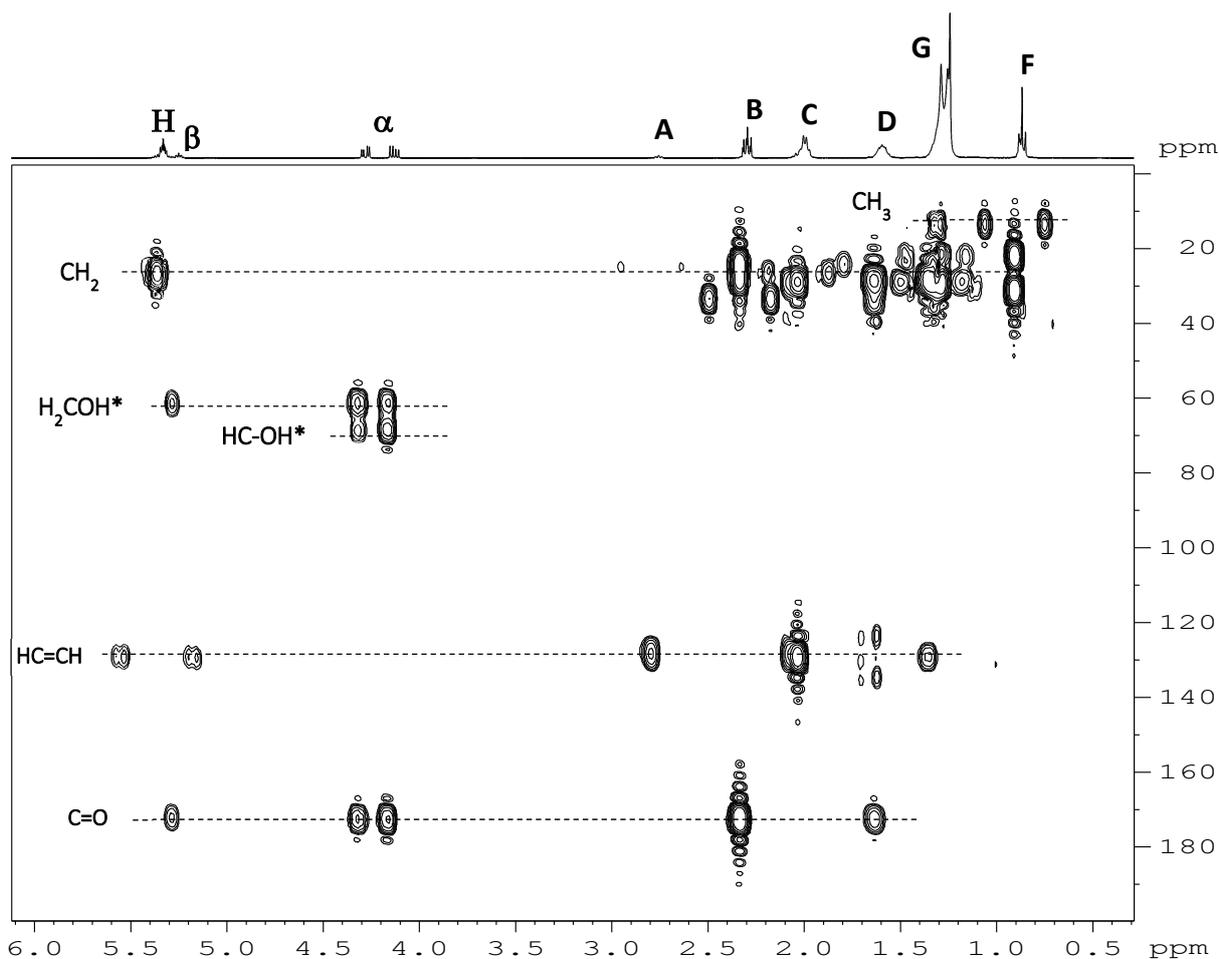


FIGURA 4.19 – Mapa de contorno HMBC do extrato hexano da polpa do açai por ASE 350 com atribuições dos trigliceróis. CDCl_3 em um 400 MHz. *Sinais referentes aos triglicerídeos.

O experimento de coeficiente de difusão (técnica DOSY) do extrato hexânico da polpa do açai foi realizado para verificar se os sinais dos hidrogênios da cadeia alifática (denominados A - H) se encontravam na forma de ésteres graxos de triglicerídeos ou como ácidos graxos livres.

O espectro obtido com os coeficientes de difusão para os compostos do extrato pode ser verificado na Figura 4.20.

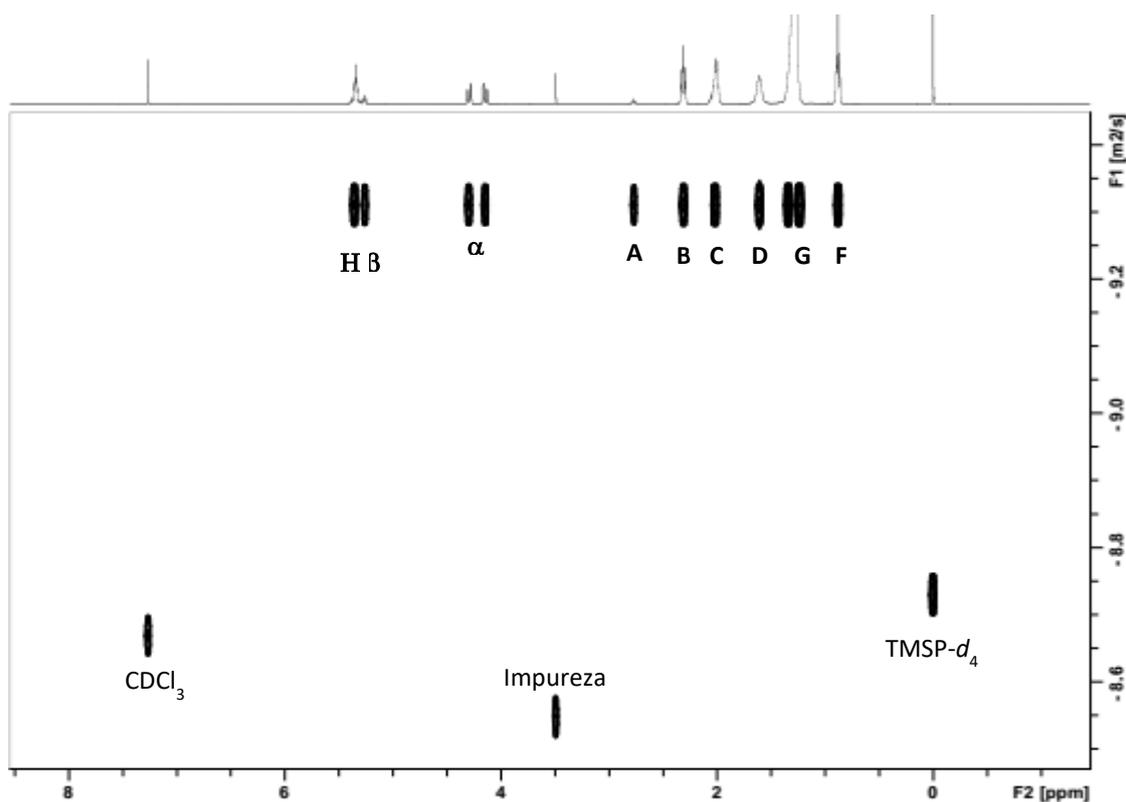


FIGURA 4.20 - Espectro de DOSY para o extrato hexânico da polpa do açaí liofilizada por ASE 350. CDCl_3 em um 400 MHz a 298 K.

Foi possível verificar que o índice de difusão para os hidrogênios da cadeia alifática (A - H) apresentaram o mesmo valor que para os sinais dos hidrogênios da unidade glicerol (α e β), isso mostra que o extrato hexânico do açaí (óleo do açaí) contém, em sua maioria, ésteres de triacilgliceróis.

b) Quantificação relativa dos ácidos graxos por RMN de ^1H

Na literatura são encontrados trabalhos que utilizam a RMN de ^1H para quantificação dos ácidos graxos presentes em óleos como uma alternativa a análise clássica por cromatografia gasosa (BARISON et al., 2010; LUO et al., 2012; FANG et al., 2013).

Dentre algumas metodologias propostas, selecionamos a divulgada por Barison e colaboradores em 2010, que se baseia na relação entre a área dos sinais característicos de cada cadeia acil graxo e da unidade do glicerol (Figura 4.21) e está didaticamente representada na Tabela 4.7.

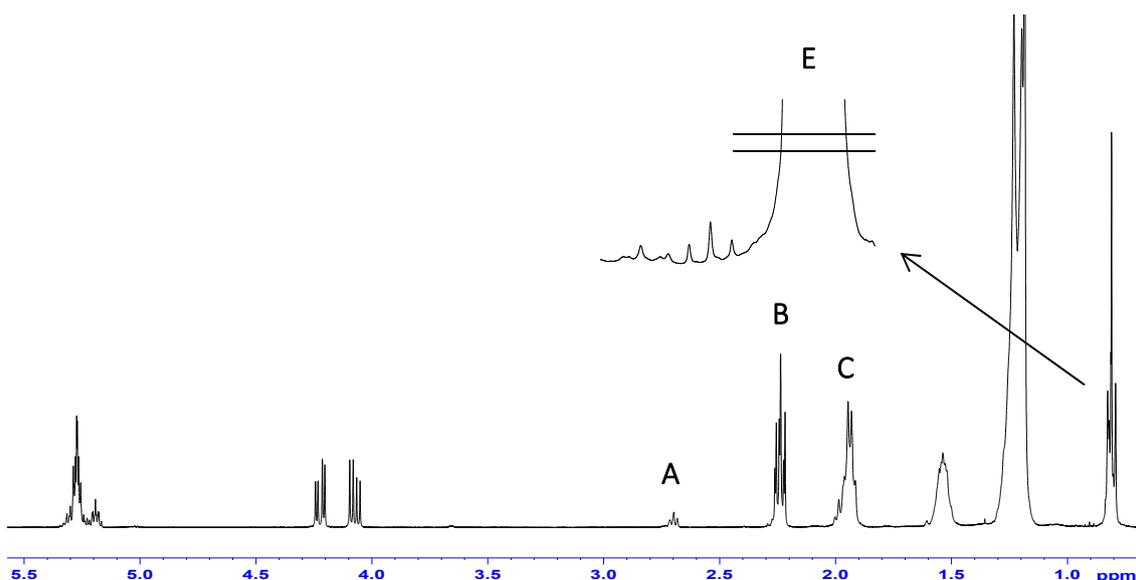


FIGURA 4.21 - Espectro de RMN de ^1H do extrato hexânico da polpa do açaí por ASE com atribuições dos sinais utilizados para a quantificação relativa dos ácidos graxos. $\text{CHCl}_3\text{-d}_4$ em um 400 MHz.

TABELA 4.7 – Metodologia utilizada para a determinação dos ácidos graxos por RMN de ^1H na polpa do açaí de acordo com BARISON et al., 2010.

Ácido graxo (éster)	δ (ppm)	Código	Área de referência do sinal do glicerol	Subtração
Linolênico (18:3)	0,97	E	22.2	-
Linoleico (18:2)	2,76	A	33.3	2 x [linolênico]
Oleico (18:1)	2,01	C	16.7	[linolênico] + [linoleico]
Saturados	2,30	B	33.3	[linolênico] + [linoleico] + [oleico]

Por RMN de ^1H pode-se obter a quantificação relativa dos ácidos graxos, no entanto não é possível distinguir os ácidos oleico (18:1) e palmitoleico (16:1), por isso os resultados obtidos para o sinal em 2,01 ppm (código **C**) são referentes a mistura dos dois ácidos monoinsaturados.

Os resultados obtidos do teor dos ácidos graxos da polpa do açaí liofilizada extraídos com hexano por ASE 350, juntamente com alguns dados da literatura podem ser verificados na Tabela 4.8.

TABELA 4.8 – Teor de ácidos graxos da polpa do açaí extraída com hexano por ASE 350 e outros valores encontrados na literatura.

Amostra	Tipo de ácido graxo (%)				Referência
	Linolênico	Linoleico	Oleico + Palmitoleico	Saturados	
Extrato hexânico da polpa do açaí por ASE 350	1,5	6,9	72,9	22,4	Este trabalho
Óleo da polpa do açaí #	1,5	7,4	68,1	23,0	LUO et al., 2012
Óleo da polpa do açaí *	0,8	12,5	60,5	26,1	SCHAUSS et al., 2006a.
Óleo da polpa do açaí *	1,1	11,5	59,8	27,5	ROGEZ, 2000 <i>apud</i> SMITH et al., 2012
Óleo da polpa do açaí *	0,55	7,28	56,8	28,3	NASCIMENTO et al., 2008
Óleo da polpa do açaí *	-	-	81,74	21,26	FAVACHO et al., 2011

*Quantificação por CG-MS; # Quantificação por RMN de ¹H

A análise da composição relativa mostrou que os ácidos monoinsaturados (72,9%) foram os majoritários, seguido dos ácidos saturados (22,4%) e em pequena proporção os ácidos poli-insaturados linoleico (6,9%) e linolênico (1,5%) no extrato hexano extraído da polpa do açaí comercial por ASE 350.

Os resultados encontrados nesse trabalho estão próximos aos obtidos com outros tipos de extração - hidrólise e partição líquido-líquido que demandam mais tempo e que são compostos de várias etapas (Tabela 4.9).

TABELA 4.9 – Metodologia de extração do óleo da polpa de açaí.

REFERÊNCIA	MODO DE EXTRAÇÃO
LUO et al., 2012	CHCl ₃ :MeOH (2:1)
SCHAUSS, et al., 2006a.	Hidrolise básica - AOAC 922.05
NASCIMENTO et al., 2008	Hidrolise ácida - AOAC 922.06
FAVACHO et al., 2011	Óleo comercial brasileiro

Em relação às técnicas convencionais, a extração acelerada por solvente (ASE 350) apresenta algumas vantagens como economia de tempo, menor quantidade de amostra e menor consumo de solvente orgânico, mostrando-se viável na extração do óleo da polpa do açaí.

A metodologia utilizada para quantificação relativa dos ácidos graxos por RMN de ¹H no óleo do açaí nesse trabalho forneceu dados que estão em concordância

com os reportados na literatura e que realizaram a identificação e quantificação dos ácidos graxos por CG-FID ou CG-MS.

As proporções encontradas nesse trabalho para os ácidos linolênico (1,5%) e linoleico (6,9%) apresentaram grande similaridade com os valores descritos por LUO e colaboradores (2012) também utilizando a quantificação relativa por RMN de ^1H que foram 1,5% e 7,4%, respectivamente. Com as vantagens de ser uma análise rápida, informativa e que não necessita de etapas no preparo da amostra (saponificação/derivatização) ou desenvolvimento de uma curva de calibração, tornam a técnica de quantificação por RMN muito eficiente para a análise dos ácidos graxos presentes no óleo de açaí.

8.4.2. Extratos metanólico puro e metanólico (*clean-up* hexano)

Os compostos identificados nos extratos metanólicos foram glicose, frutose, ácido p-hidroxifenilacético, ácido ascórbico, ácido succínico, colina, glicerofosfocolina, uracila. Os aminoácidos leucina, serina, ácido glutâmico, alanina, tirosina, treonina e, também ácidos graxos (Figura 2.6).

Foi possível notar que alguns compostos como etanol, acetona, ácido fórmico, ácido acético, γ -ácido aminobutírico (GABA), 5-HMF e butano-2,3-diol não estavam presentes nos extratos metanólico puro e metanólico desengordurado, isso sugere que a rapidez na extração realizada pelo extrator acelerado por solvente possivelmente diminui os processos naturais de degradação e/ou fermentação que ocorrem na polpa de açaí.

Na Figura 4.22 é possível verificar um espectro de RMN de ^1H do extrato metanólico com as atribuições dos compostos identificados.

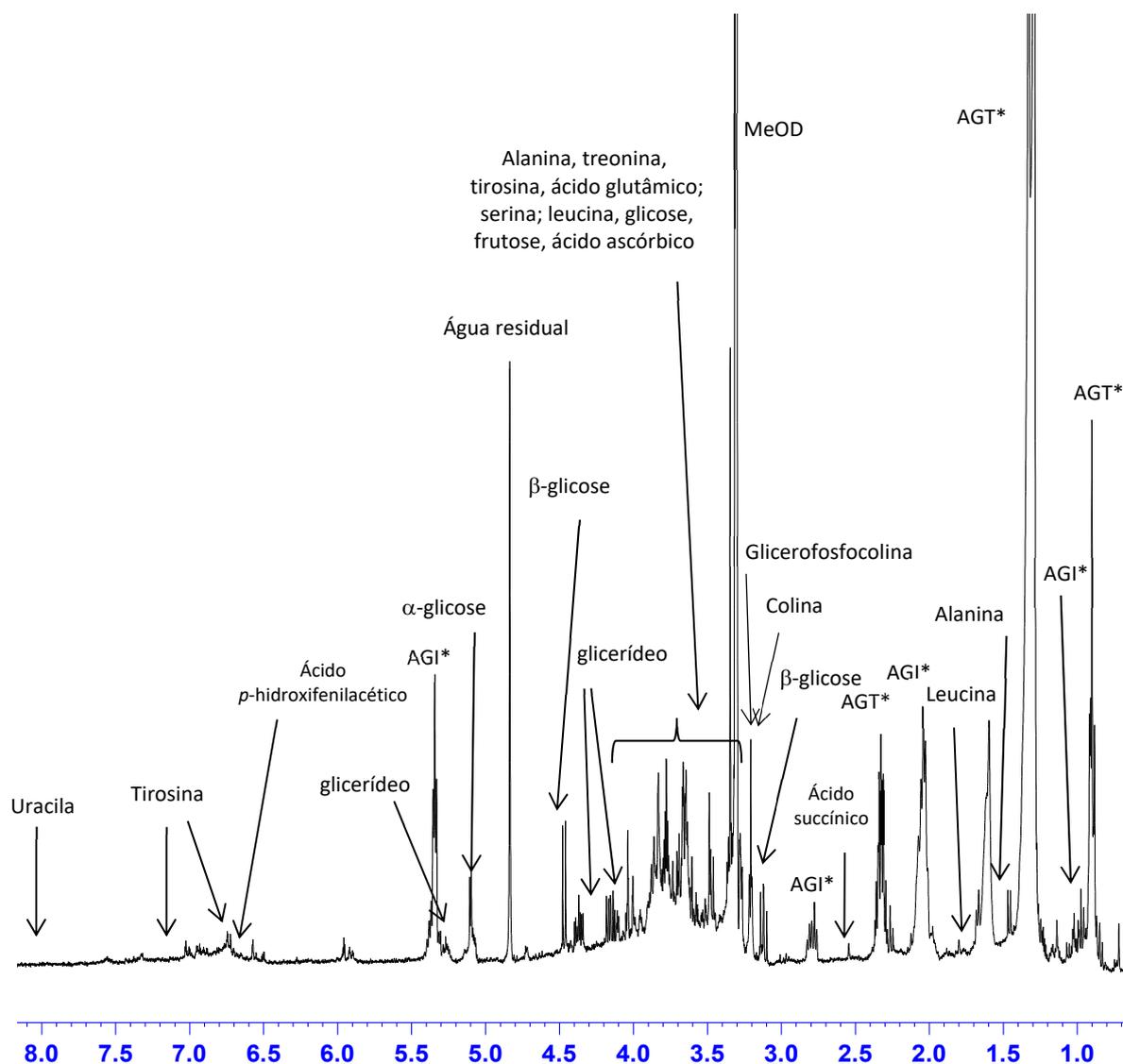


FIGURA 4.22 - Espectro de RMN de ^1H do extrato metanólico da polpa do açai por ASE 350 com atribuições dos sinais dos compostos identificados. $\text{MeOH-}d_4$ em um 400 MHz. *AG: ésteres de ácidos graxos saturados e insaturados.

8.4.3. Extrato aquoso puro

Os compostos identificados nos extratos aquosos da polpa do açai foram os metabolitos primários α -glicose (δ 5,23 d), β -glicose (δ 4,64 d), frutose (4.11; 4.05; 4.01; 3.91; 3.81; 3.70 e 3.56 m), alanina (δ 1,48 d), outros compostos como etanol (δ 1,18 t e 3,66 q), acetona (δ 2,23 s) e os contaminantes metanol residual (δ 3,36 s) e acetonitrila (δ 2,07 s).

Na Figura Figura 4.23 é possível verificar um espectro de RMN de ^1H com atribuições dos 7 compostos caracterizados. Esses compostos já haviam sido identificados no extrato metanólico puro descrito anteriormente (Capítulo 2; Item 4.4).

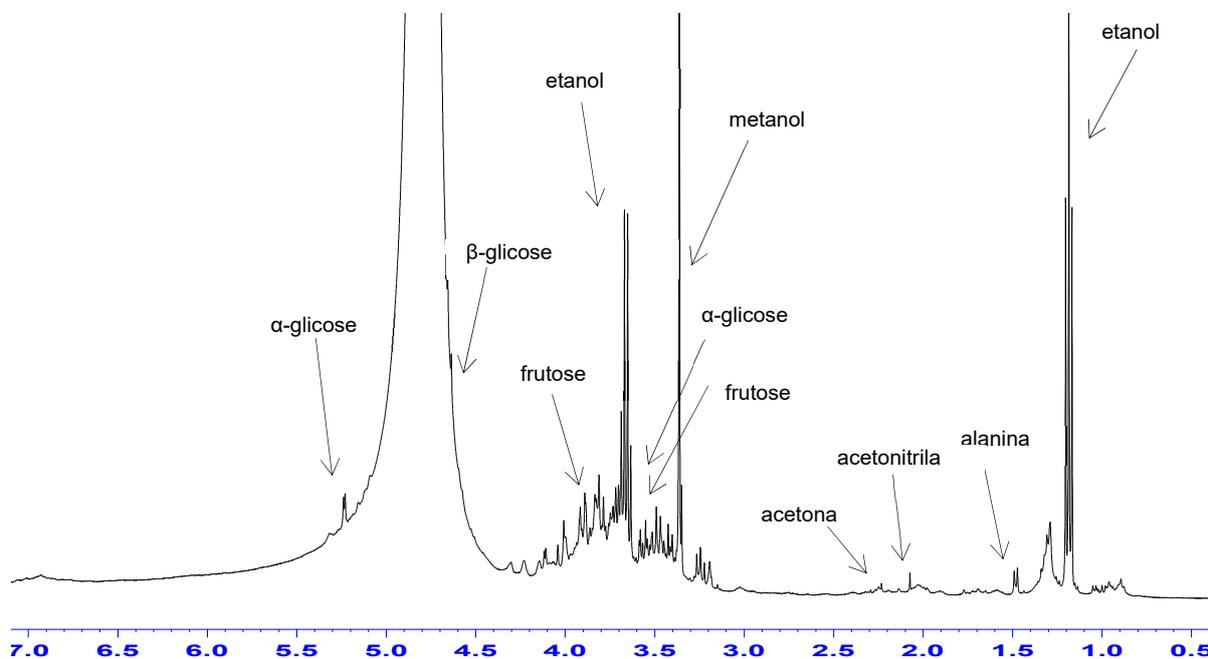


FIGURA 4.23 - Espectro de RMN de ^1H do extrato aquoso puro da polpa do açaí liofilizada por ASE 350 com atribuições dos compostos identificados. D_2O em um equipamento 400 MHz.

Nota-se que os sinais referentes ao etanol (1,18 e 3,66 ppm) apresentaram maior intensidade que os demais sinais do espectro. Essa observação sugere que provavelmente o processo de fermentação natural ocorreu no extrato aquoso da polpa de açaí aquoso.

A fermentação alcoólica é um processo milenarmente utilizado na fabricação de bebidas alcoólicas (vinho, cerveja, cachaça), fabricação de pães e há algumas décadas na produção de álcool combustível. O etanol como um subproduto da fermentação já foi encontrado em matrizes de alimentos ricos em carboidratos como mel e suco de laranja (BOFFO et al., 2009; DE OLIVEIRA et al., 2014).

*Capítulo V: USO DO LC-DAD-SPE/NMR NO
MODO DE OPERAÇÃO TIME-SLICE PARA O
ISOLAMENTO DE COMPOSTOS MINORITÁRIOS DA
POLPA DO AÇAÍ*

9. PARTE EXPERIMENTAL

9.1. Materiais diversos

Os solventes utilizados nas corridas cromatográficas (acetonitrila e metanol) foram grau HPLC da marca Panreac™ (Lote 36109116153 e 22188116153, respectivamente) e a água ultrapura foi obtida do sistema Milli-Q™ (Millipore, São Paulo, Brasil). O ácido trifluoracético (TFA) usado na fase móvel foi grau HPLC da Tedia™ (Lote 1011342). A pré-coluna (*guard column*) utilizada foi da Phenomenex™ com cartucho de fase estacionária Luna C18 (4,6 mm x 150 mm 3 µm). As colunas cromatográficas utilizadas nesse estudo foram: Eclipse XDB C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm) denominada Coluna 1; Kromasil C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) denominada Coluna 2 e Restek Bifenil (150 x 4,6 mm, 5 µm) denominada Coluna 3. O metanol deuterado foi da Acros Organics™ (D, 99,8%, Lote A0385216) e os tubos de RMN da Bruker™ (Ø 3 mm x 70 mm).

9.2. Preparo da amostra

O extrato metanólico desengordurado com hexano obtido com o extrator ASE™ 350 (Dionex™) de uma das polpas do açaí comercializada na cidade de Belém-PA (Tópico 8.2.1, Capítulo 4) foi utilizado para isolamento de compostos minoritários por LC-DAD-SPE/NMR. Para as análises cromatográficas foram solubilizados 99,7 mg deste extrato em 1300 µL da solução de MeOH:H₂O (1:1). A amostra foi filtrada para retirada de possível material particulado em filtro de membrana PVDF (Tedia Brasil®, 25 mm, 0,45 µm). As amostras foram pesadas em balança analítica digital BioPrecisa (modelo FA-2104N) com precisão de 0,1 mg.

9.3. Desenvolvimento das condições cromatográficas por planejamento fatorial

Para o planejamento experimental foram utilizados o programa Excel™ da Microsoft Office 365™ (versão 1804) e o programa *Matlab*™ R2014a. A resposta para cada experimento foi obtida através do número de bandas (λ 232 nm) gerada

automaticamente nos mesmos parâmetros em todas as análises através do programa HyStar™ 2.3 (Bruker BioSpin).

Os estudos para o desenvolvimento da melhor condição cromatográfica do extrato metanólico da polpa do açaí foram realizados em 2 etapas, sendo a primeira a fim de obter informações de variáveis importantes (Etapa 1 - Planejamento Experimental) e a segunda, realizar a otimização das condições cromatográficas com eliminação de espaços vazios e aumento de seletividade e resolução cromatográfica (Etapa 2 - Otimização das condições cromatográficas).

a) Etapa 1 – Planejamento experimental

A fim de obter uma condição cromatográfica para o extrato metanólico da polpa do açaí que fornecesse a maior capacidade de pico (número de picos separados no espaço cromatográfico) realizou-se um planejamento fatorial completo (PEREIRA FILHO, 2015) variando condições físico-químicas que afetam a separação cromatográfica (CASS & CASSIANO, 2015; SNYDER, KIRKLAND & DOLAN et al., 2010; CASS & DEGANI, 2001) e utilizando as colunas cromatográficas disponíveis no laboratório de RMN.

Sabe-se que a capacidade de pico no modo gradiente de eluição é afetada pela retenção e seletividade da análise por HPLC. A fase estacionária, o tipo e porcentagem de modificador orgânico (solvente B), a temperatura, a vazão da fase móvel e a concentração do tampão são alguns fatores que afetam a seletividade/fator de separação (α) (SNYDER, KIRKLAND & DOLAN, 2010). Assim, na primeira etapa foram analisadas as variáveis: tipo de fase estacionária (coluna 1 e 2), tipo do modificador orgânico (metanol e acetonitrila) e a inclinação do gradiente. Dessa forma, foi realizado um planejamento fatorial completo 2^3 ou seja 2 níveis e 3 variáveis com total de 8 experimentos utilizando estas variáveis (Tabelas 5.3 e 5.4). Foram mantidos constantes: a temperatura do forno (35 °C), a vazão da fase móvel (1 mL.min⁻¹), o volume de injeção (15 µL) da amostra e a concentração da amostra (solução 76,7 mg.mL⁻¹). Os experimentos foram realizados em triplicatas (totalizando 24 análises).

TABELA 5.1 – Variáveis e níveis do planejamento fatorial realizado para desenvolvimento das condições cromatográficas do extrato do açaí por LC-UV.

Planejamento Fatorial Completo 2³		
Variáveis	Níveis	
	Alto (1)	Baixo (-1)
Coluna cromatográfica	Eclipse C18 4,6 x 150 mm 5 µM	Kromasil C18 4,6 x 250 mm 5 µM
Modificador orgânico (Solvente B)	Metanol (MeOH)	Acetonitrila (ACN)
Inclinação do gradiente de eluição*	Maior	Menor

* O fator G (inclinação) foi realizado considerando o comprimento da coluna.

TABELA 5.2 – Experimentos do planejamento fatorial para desenvolvimento com as variáveis codificadas nos níveis alto (1) e baixo (-1).

Grupos de análises	Experimentos	Coluna cromatográfica (Variável 1)	Modificador orgânico (Variável 2)	Gradiente de eluição (Variável 3)
A	1	-1	-1	-1
	5	-1	-1	1
B	3	-1	1	-1
	7	-1	1	1
C	2	1	-1	-1
	6	1	-1	1
D	4	1	1	-1
	8	1	1	1

Sabe-se que para evitar erros sistemáticos no sistema, é indicado que a execução dos experimentos seja de maneira aleatória (PEREIRA FILHO, 2015; BARROS NETO, SCARMINIO & BRUNS, 2006). No entanto, algumas variáveis na apresentam dificuldades operacionais ao se realizar frequentes mudanças, que podem levar a gasto de solventes, demanda excessiva de tempo e, que por sua vez acabam inviabilizando o estudo de planejamento.

Sendo assim, devido ao tempo de condicionamento da coluna cromatográfica ao variar os solventes entre as análises, os experimentos foram executados em grupos (Tabela 5.4). Por exemplo, no grupo A realizou-se as replicatas para os experimentos número 1 e 5 que utilizou a coluna Kromasil (-1) com modificador orgânico acetonitrila (-1) alterando-se apenas a variável 3 (gradiente de eluição), após estas, passou-se para as análises do grupo B com os experimentos 3 e 7, mantendo a coluna cromatográfica Kromasil (-1) e alterando o modificador orgânico (v2) para metanol (1).

Além disso, antes de cada bloco de análises tomou-se alguns cuidados a fim de garantir que os experimentos fossem realizados nas mesmas condições

experimentais. Tais como, avaliação da qualidade da coluna (limpeza, injeção de padrões para verificação da resolução cromatográfica e a verificação da pressão); limpeza e condicionamento da coluna entre cada injeção para garantir a repetibilidade e, avaliação da qualidade do cromatógrafo (limpeza das linhas, calibração das lâmpadas UV-Vis, verificação da pressão e ausência de vazamentos e/ou bolhas).

9.4. Equipamentos

9.4.1. LC-UV-SPE

As análises cromatográficas e isolamento dos compostos da polpa do açaí foram realizados em um cromatógrafo Agilent (1200 series) com degaseificador (G1322A), bomba quaternária (Agilent G13AA1), amostrador automático (G1329A), detector por arranjo de diodos com comprimento de onda variável (DAD, B0614) e forno de coluna (Shimadzu CTO-10AS VP, localizados no Laboratório de RMN da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). A unidade trocadora de cartuchos automática *Prospekt 2* (ACE – *Automatic Cartridges Exchanger*, Bruker Biospin GmbH©) é acoplada ao cromatógrafo e, composta por cartuchos de SPE (*Solid Phase Extraction*) HySphere™ Resin *General Phase* (10 mm x 2mm, 10 µm, fase estacionária polidivinilbenzeno) e bomba *Knauer* (K120, Bruker Daltonik, V01.11). O programa para controle e aquisição do sistema acoplado LC-UV foi *HyStar 2.3* (Bruker Biospin). Na Figura 5.1 podem ser visualizados os módulos do sistema LC-DAD-SPE: A - cromatógrafo; B - detector DAD; C – bomba Knauer K120; D - unidade ASE com bandeja de cartuchos SPE; E – controlador; F - linha de gás (N₂) para secagem dos cartuchos SPE e G - forno de coluna.

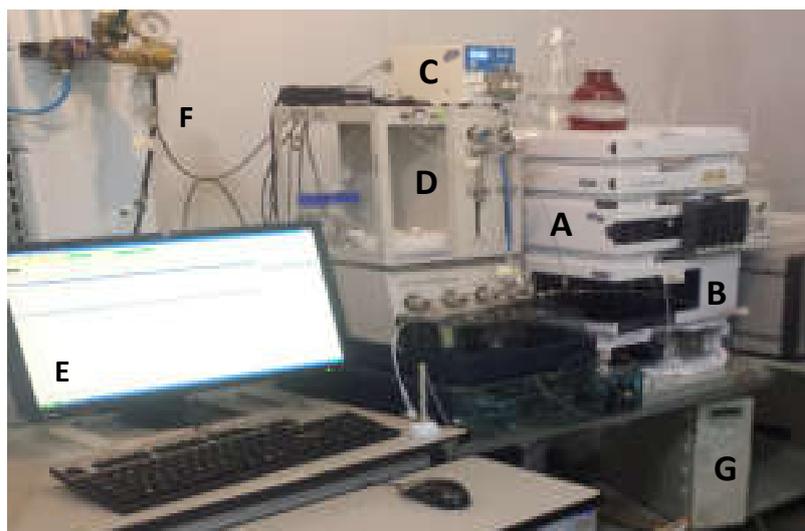


FIGURA 5.1–Equipamento de LC-DAD-SPE/NMR do Laboratório de RMN da UFSCar.

9.4.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os experimentos foram adquiridos em um espectrômetro Bruker AVANCE III 14,1 Tesla (600 MHz para frequência do hidrogênio e 150 MHz para ^{13}C) com magneto modelo *Ultrashield PlusTM* e sonda criogênica TCI (*Triple Resonance Cryoprobe Inverse - $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$*) de 5 mm equipada com gradiente de campo no eixo z e unidade de ajuste automático de sintonia ATMA[®] (*Automatic Tuning and MAtching*) localizado no Laboratório de RMN do Departamento de Química da UFSCar, São Carlos – SP. Os parâmetros de aquisição e processamento utilizados nos experimentos de RMN de ^1H e para os bidimensionais podem ser verificados nas Tabelas 5.3 e 5.4.

TABELA 5.3. Parâmetros de aquisição e processamento dos espectros de RMN de ^1H .

PARÂMETROS	RMN DE ^1H
Sequência de pulso* (denominação Bruker)	noesypr1D
Tempo de aquisição (AQ)	3.63 s
Tempo de espera entre cada aquisição (d1)	3 s
Número de promediações (ns) [#]	8
Largura do pulso (p1) [^]	7.25 μs (90°)
Tempo de mistura (d8)	0,30 s
Atenuação da potência para saturação do sinal do HDO (PI9)	51.97 dB
Janela espectral (SW)	15 ppm
Número de pontos digitalizados TD (F1)	65.536
Número de pontos usados no processamento (SI)	65.536
Fator de multiplicação exponencial (LB)	0.3 Hz
Temperatura	298 K

*Sequência de pulso com pré-saturação do sinal da água do solvente (HOD); [^]Calibração do pulso de 90° realizada em cada amostra; [#]Ajustado de acordo com a concentração de cada amostra.

TABELA 5.4– Parâmetros de aquisição e processamento dos espectros de RMN 2D.

PARÂMETROS	gCOSY	gHSQC [#]	gHMBC [^]
Sequência de pulso*	cosygpprpf	hsqcetgpprsisp2.2	hmbcgpplndqf
AQ (F2)	0,22	0,22	0,22
AQ (F1)	0,014	0,0035	0,0035
d1	1,0 s	1,0 s	1,0 s
ns	8	16	128
SW (F2)	15 ppm	15 ppm	15 ppm
SW (F1)	15 ppm	238 ppm	238 ppm
SI (F2)	4098	4098	4098
SI (F1)	1024	1024	1024

*Denominação Bruker. O p1 foi calibrado no experimento de RMN de ¹H para cada amostra; [#]Constante de acoplamento ¹H–¹³C de 145 Hz; [^]Constante de acoplamento ¹H–¹³C (J1) foi de 145 Hz e ¹H–¹³C (J2-J3) de 8 Hz.

O TD foi de 4098 pontos em F1 e 256 pontos em F2 para todos os experimentos de RMN 2D. O processamento dos dados de RMN foi realizado com o programa TopSpin 3.1 (Bruker *BioSpin* GmbH, Alemanha).

9.4.3. Espectrometria de massa (MS)

Os experimentos de massa foram realizados em um sistema acoplado UHPLC-DAD-qTOF localizado no Laboratório Separare do Departamento de Química da UFSCar. A unidade cromatográfica é composta por um cromatógrafo (Shimadzu Kioto) com duas bombas quaternárias (LC-30AD) equipadas com unidade de gradiente de baixa pressão, auto-injetor (SIL-30AC) com alça de amostragem de 500 µL, dois degaseificadores (DGU-20ASR), detector por arranjo de diodo com comprimento de onda variável (DAD, SPD-M30A), forno (CTO-20AC), controladora (CBM 20A). Este sistema cromatográfico foi acoplado ao espectrômetro de massas de alta resolução equipado com fonte de ionização por ESI (*electrospray ionization*) modelo QqToF Impact II HD (Bruker Daltonics – Impact, Alemanha). O programa para controle e aquisição foi *HyStar*TM (Bruker Biospin) e o processamento dos dados foi realizado com o programa *DataAnalysis*TM 4.2 (Bruker Daltonics GmbH, Alemanha).

O experimento de *full scan* das amostras foi realizado nos modos positivos e negativos e, os experimentos de íons totais e de íons produtos (autoMS) no modo negativo de ionização. Os espectros foram adquiridos com uma faixa de relação massa carga (*m/z*) de 50 a 1200. As condições de trabalho foram: vazão de 0,21 mL/min, pressão do nebulizador 1,0 bar, vazão do gás de secagem (N₂) 8 L/min, temperatura de secagem 250 °C, energia célula de colisão foi 5 eV, tensão do *End*

Plate e capilar de 500 V e 4000 V, respectivamente. As análises foram realizadas com a coluna Zorbax Eclipse XDB C18 (50 x 4.6 mm 1.8 μ M), com aquisição na faixa de 190 nm a 400 nm. As fases móveis utilizadas foram solução de ácido fórmico 50 μ M (Solução A) e acetonitrila com ácido fórmico 50 μ M (Solução B). O gradiente de eluição utilizado foi 7.5-54% B durante 19,70 min, 100% de B até 23,10 min (limpeza) e condicionamento até 31,40 min (7.5-5%B) com uma vazão de 0,21 mL/min e volume de injeção de 0,15 μ L. Foram analisadas as frações isoladas e, o extrato metanólico da polpa do açaí com concentração de 5 mg.mL⁻¹ em 50:50 MeOH:H₂O (v/v).

10. RESULTADOS E DISCUSSÕES

10.1. Desenvolvimento das condições cromatográficas

Os experimentos do planejamento experimental para a coluna 1 (Eclipse C18 4,6 x 150 mm; nível -1) foram executados e, ao realizar as análises do planejamento com a coluna 2 (Kromasil C18 4,6 x 250 mm; nível 1) verificou-se que a mesma apresentou pouca seletividade devido à baixa retenção dos compostos e portanto, fornecendo menor número de bandas (Figura 5.2).

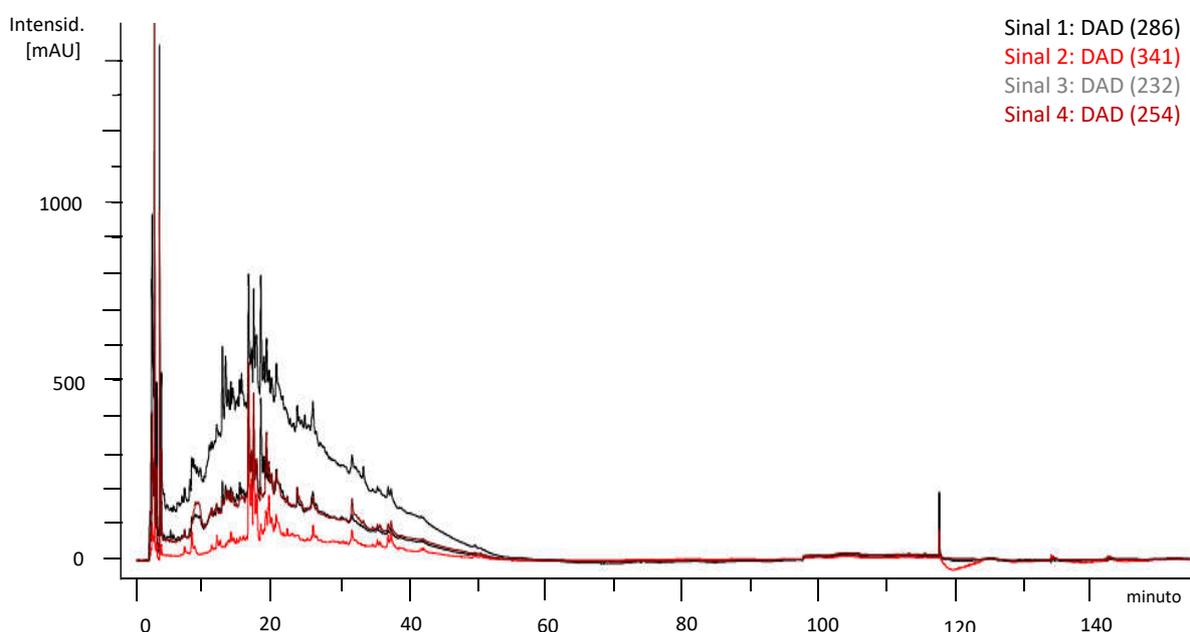


FIGURA 5.2 – Cromatograma do extrato metanólico da polpa do açaí. Eluente A (H₂O) e eluente B (ACN). Eluição com gradiente exploratório de 5 a 100% de B durante 60 minutos a 35°C com 1 mL.min⁻¹ com coluna 2 (Kromasil C18 250 mm).

Assim, a coluna 2 (Kromasil) foi desconsiderada do planejamento experimental, substituída pela coluna 3 (Bifenil Restek 150 cm x 4,6 mm x 5 µm) e, afim de otimizar o tempo de equipamento, um novo planejamento fatorial foi montado optando-se por trabalhar com as variáveis que afetam majoritariamente a seletividade e, fixando a inclinação do gradiente em 60 minutos (Tabela 5.5).

TABELA 5.5 - Variáveis e níveis do novo planejamento fatorial 2² realizado para o desenvolvimento das condições cromatográficas do extrato metanólico da polpa do açaí por LC-UV.

Planejamento Fatorial Completo 2²		
Variáveis	Nível (-1)	Nível (+1)
Coluna cromatográfica	Eclipse XDB C18 4,6 x 150 mm 5 µM	Bifenil Restek 4,6 x 150 mm 5 µM
Modificador orgânico (Solvente B)	Metanol (MeOH)	Acetonitrila (ACN)

Os experimentos para o novo planejamento foram realizados em triplicatas totalizando 12 experimentos. Os cromatogramas podem ser verificados no APÊNDICE (Item 5).

Para os cálculos da análise de variância (ANOVA) (PEREIRA FILHO, 2015) foram excluídas duas (2) réplicas que apresentaram problemas na análise devido a problemas instrumentais. Os resultados para o planejamento podem ser verificados na Tabela 5.6.

TABELA 5.6 – Níveis e respostas do novo planejamento fatorial 2² realizado para o desenvolvimento das condições cromatográficas do extrato metanólico da polpa do açaí por LC-UV.

Experimentos	V1 (coluna)	V2 (modificador orgânico)	Resposta (nº de bandas cromatográficas em 232 nm)
1	-1	-1	111
3	-1	-1	111
4	-1	1	115
5	-1	1	116
6	-1	1	116
7	1	1	97
8	1	1	100
9	1	1	99
10	1	-1	105
11	1	-1	106

Com os dados da tabela 5.7 foram realizados os cálculos para identificação dos efeitos importantes (PEREIRA FILHO, 2015) no qual, verificou-se que a variável coluna cromatográfica (v1) e sua interação com o modificador orgânico apresentaram efeitos significativos no número de bandas cromatográficas e, que o modificador orgânico (v2) não apresentou um efeito significativo no nível de confiança de 95%. Com esses valores de resposta foi realizado o cálculo de Análise de Variância

(ANOVA) (Tabela 5.7) para o modelo recalculado desconsiderando o modificador orgânico como variável.

TABELA 5.7 – Tabela de ANOVA para o número de bandas cromatográficas do novo planejamento 2² (modelo recalculado).

	PARÂMETRO	Soma quadrática	Grau de liberdade	Média quadrática	F_{calculado} (95%)	F_{tabelado} (95%)
F1	Regressão	463,75	2	231,87	187,64	8,94
	Resíduo	8,65	7	1,24	-	-
	Total	472,4	9	52,49		
F2	Erro Puro	5,83	6	0,97	2,89	5,98
	Falta de ajuste	2,82	1	2,82	-	-
	Variação explicada (R ²)	0,98				

A análise de variância apresentou coeficiente de correlação (r^2) de 0,98 próximo a 1, indicando um ajuste adequado do modelo às respostas observadas. O F_1 calculado (187,6) foi bem maior que o F_1 tabelado (8,94) e o valor de F_2 calculado (2,89) foi menor que F_2 tabelado (5,98), evidenciando que o modelo foi significativo e não apresentou falta de ajuste em um nível de confiança de 95%.

Logo, o modelo matemático encontrado a partir dos dados experimentais do planejamento e seus coeficientes estatisticamente significativos podem ser verificados na Equação 1, onde C é a variável coluna e O é o modificador orgânico. No qual a partir deste, foi construído um gráfico de contorno (Figura 5.3).

$$y = 107,6 (\pm 0,86) - 5,62 C (\pm 0,87) - 2,87 (\pm 0,87) C.O$$

Equação 1

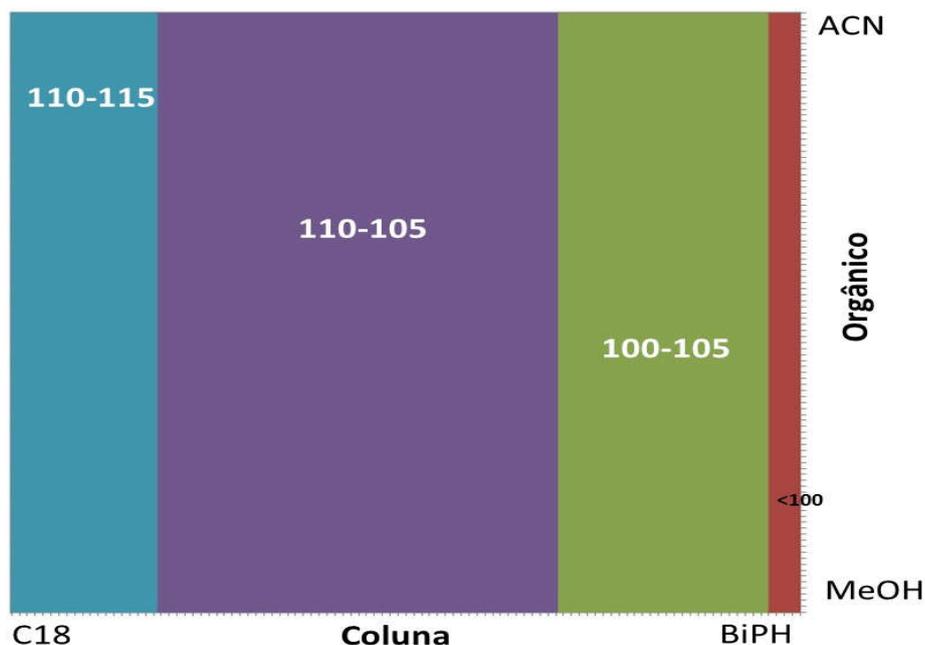


FIGURA 5.3 - Gráfico de contorno para a otimização das variáveis 1 (Coluna cromatográfica) e 2 (Modificador orgânico). Os valores em branco são referentes ao número de bandas cromatográficas verificadas nos experimentos do planejamento. ACN= Acetonitrila; MeOH= Metanol; BiPH= Coluna Bifenil Restek e C18 = Coluna Eclipse XDB C18.

Através da análise do gráfico de contornos (Figura 5.3) foi possível verificar que a região de máximo número de bandas cromatográficas (região azul do gráfico de contorno) para o extrato da polpa do açaí foi utilizando a coluna Eclipse C18 (Coluna 1) com número de bandas cromatográficas de 110 a 115.

Uma vez que os cálculos matemáticos não indicaram qual o melhor modificador orgânico (MeOH ou ACN) e objetivamos otimizar tempo de equipamento e as condições para os experimentos de *trapping* por SPE, uma análise detalhada dos cromatogramas obtidos com o modificador orgânico ACN e com MeOH (Figura 5.4) foi realizada. No qual foi possível verificar que ao utilizar a ACN foram obtidas 115 bandas com um menor tempo de análise (32 minutos) quando comparado ao MeOH que forneceu 111 bandas cromatográficas com 49 minutos de corrida.

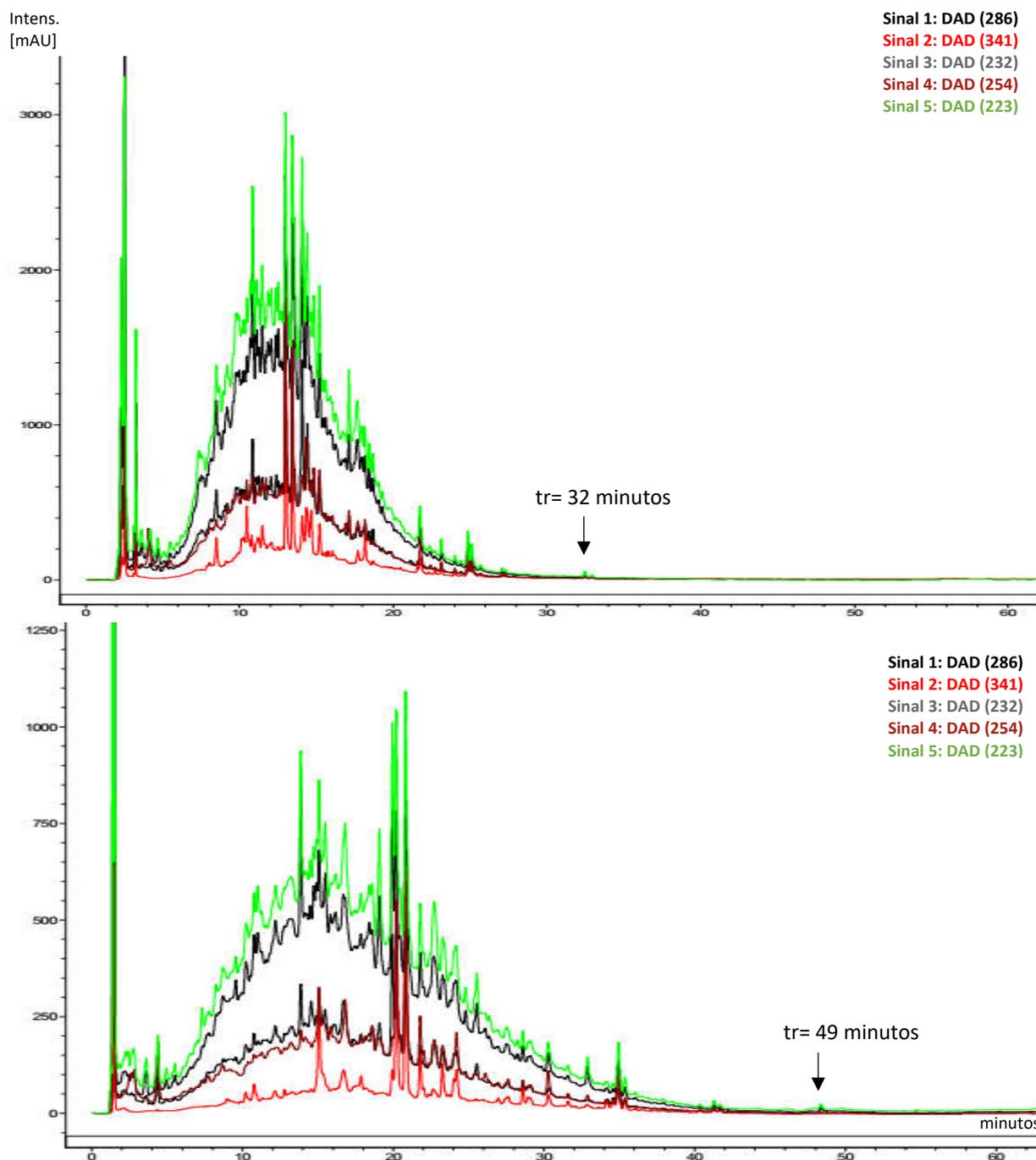


FIGURA 5.4 – Cromatograma do extrato metanólico da polpa do açai. Eluição com gradiente exploratório de 5 a 100% de B durante 60 minutos a 35°C com 1 mL.min⁻¹ em coluna Eclipse C18 (4,6 x 150 mm). Eluente A (H₂O) e eluente B: ACN (acima) e MeOH (abaixo).

Desta forma, a melhor condição cromatográfica obtida na Etapa 1 foi com coluna cromatográfica 1 (Eclipse C18 4,6 x 150 mm 5 µm) com o modificador orgânico acetonitrila e, estes foram utilizados na Etapa 2 de otimização das condições para a

realização da concentração (*trapping*) dos compostos do extrato metanólico da polpa do açaí.

b) Etapa 2 - Otimização das condições cromatográficas

Após a verificação da melhor condição de seletividade (α) com o auxílio da quimiometria, realizou-se a segunda etapa para a otimização das condições cromatográficas do extrato metanólico da polpa do açaí, a fim de realizar um ajuste fino na capacidade de pico e diminuir espaços vazios do cromatograma.

Nesta etapa do trabalho foram analisadas a temperatura do forno (35 e 55°C), pH da fase móvel (solventes acidificados com ácido trifluoroacético), inclinação do gradiente e, a variação da vazão da fase móvel dentro das condições indicadas para a coluna utilizada (1,0; 0,8 e 0,6 mL.min⁻¹) (SNYDER, KIRKLAND & DOLAN, 2010). A fim de otimizar a discussão deste capítulo, os cromatogramas obtidos nesta etapa do trabalho podem ser visualizados no APÊNDICE (Item 5.1).

Desta forma após os experimentos de otimização, as melhores condições cromatográficas encontradas para o extrato metanólico da polpa do açaí foram: Coluna 1 (Eclipse XDB C18 4,6 x 150 mm 5 μ M), solvente A (H₂O + 0.025% TFA) e solvente B (ACN + 0.025% TFA), gradiente de eluição de 7.5 % - 54 % por 60 min, 100% de B por 10 min (limpeza da coluna), 7.5 % - 54 % de B por 15 min (condicionamento da coluna), totalizando 95 min de análise. A vazão da fase móvel foi de 1 mL. min⁻¹, a temperatura do forno de 35°C, volume de injeção de 15 μ L e, comprimento de onda monitorados em 341 e 205 nm. O cromatograma com essas condições pode ser verificado na Figura 5.5.

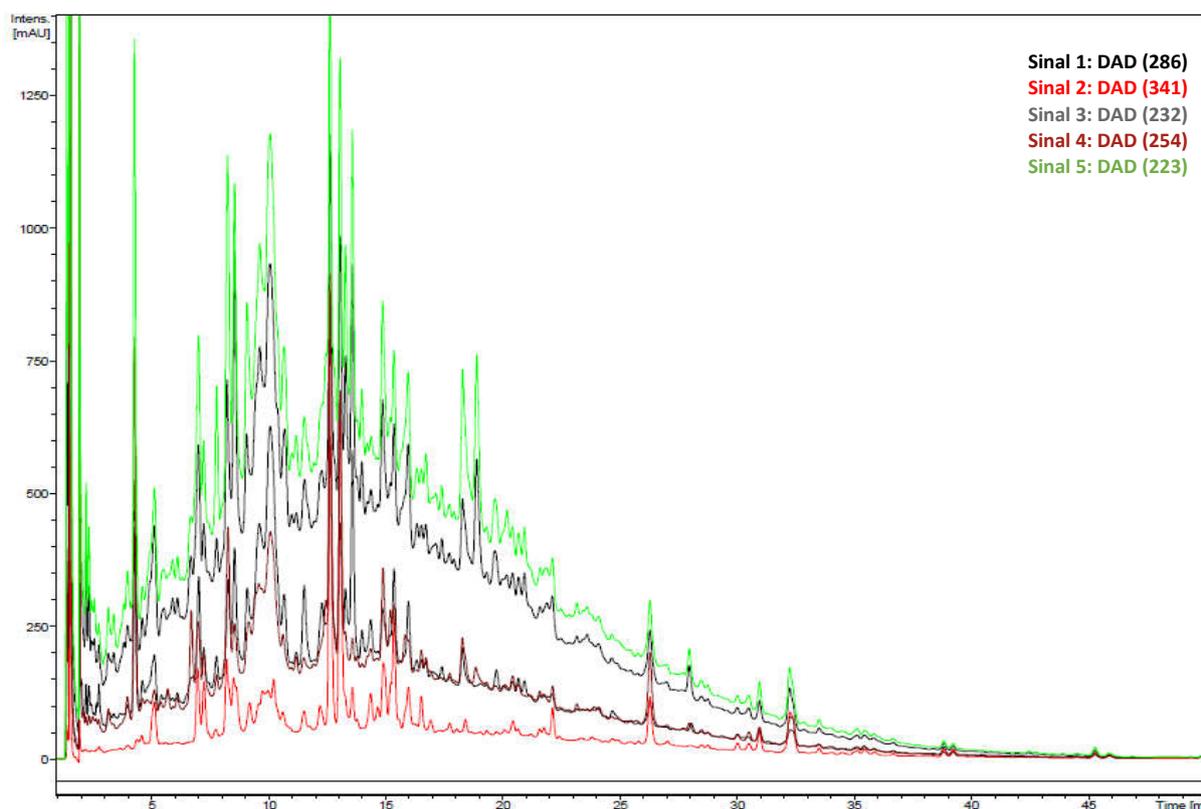


FIGURA 5.5 – Cromatograma do extrato metanólico da polpa do açaí liofilizado desengordurado com hexano obtido por ASE™ 350 com as condições cromatográficas otimizadas.

É possível verificar no cromatograma (Figura 5.5) que a polpa do açaí é rica em diversos compostos com alta e média polaridade pois, apresentou bandas cromatográficas dos minutos iniciais (metabólitos mais polares) até aproximadamente 45 minutos de análise (metabólitos menos polares). Este perfil cromatográfico com 115 picos separados em 232 nm nos mostrou a complexidade da matriz e confirmou o desafio em isolar compostos direto de um extrato bruto por LC-SPE, mesmo com o modo de operação por fatiamento por tempo (*time-slice*) no qual é possível concentrar compostos com baixa absorção na região do ultravioleta (UV).

10.2. Análises por LC-UV-SPE/NMR

Desde a instalação do equipamento LC-DAD-SPE/NMR no Laboratório de RMN da UFSCar – São Carlos, seu uso em trabalhos do grupo foi com os modos de operação por fluxo contínuo, armazenamento em capilares e em cartuchos SPE com os ajustes por *threshold* e *time slice* (THOMASI et al., 2014; THOMASI, 2014b; SILVA et al., 2013b; THOMASI et al., 2016; MORAES et al., 2017; CARDOSO et al.,

2017). O pesquisador Thomasi utilizou o *time-slice* em uma fração butanólica do caldo de fermentação da bactéria *S. cebimarensis* com intervalo fixo de 15 segundos durante toda a análise (Figura 5.6b), mas não obteve sucesso. Já Silva e colaboradores isolaram 3 compostos não declarados em uma amostra de fitoterápico comercializado na internet (THOMASI, 2014b; SILVA et al., 2013b).

O armazenamento de compostos em cartucho SPE com os ajustes por *threshold* ocorre com o desvio da fase móvel vindo da cromatografia para a linha da unidade ASE que contém o cartucho SPE através da seleção da banda cromatográfica de interesse por intensidade de absorção no detector UV. Ou seja, a banda selecionada pelo operador ao atingir um valor determinado é fixada no cartucho (Figura 5.6a). E com o ajuste por *time-slice*, ocorre o “fatiamento” do cromatograma em intervalos fixos de tempo e cada *slice* é direcionado para um cartucho de SPE onde é acumulado de 15 a 30 corridas cromatográficas (Figura 5.6b). Este método não depende da intensidade de absorção no UV, sendo uma vantagem frente ao *threshold* pois, isso poderia representar um problema em compostos com baixa absorção que possam apresentar banda cromatográfica pequena, mas que o analito não está necessariamente em pequena concentração (THOMASI, 2014; ELIPE, 2003).

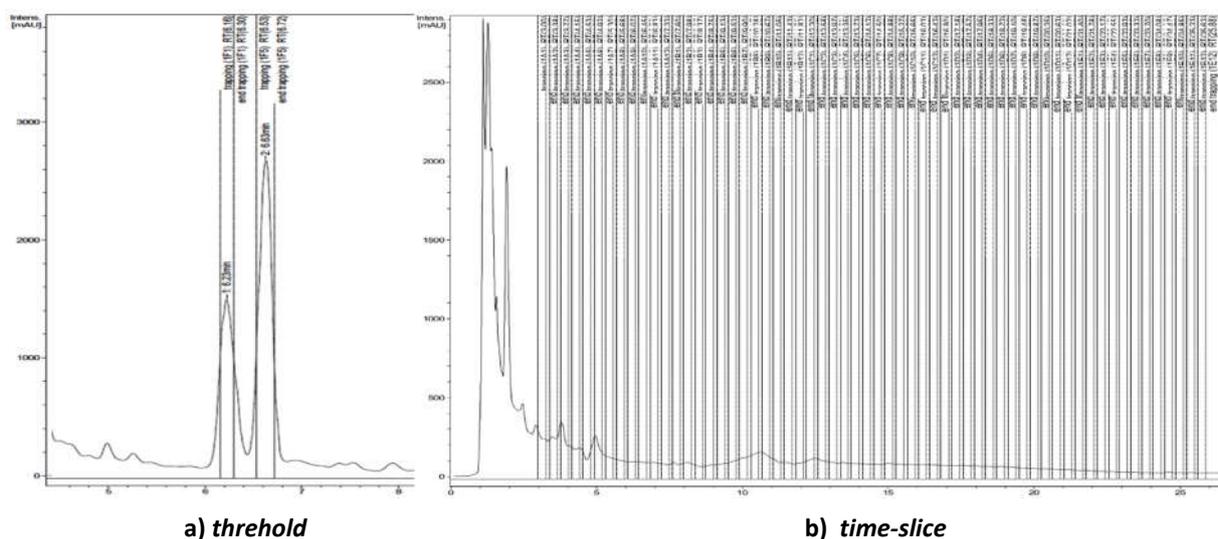


FIGURA 5.6 - Representação das modalidades de *trapping* em cartucho SPE. Figura adaptada (Thomasi, tese de doutorado, 2014).

Para este trabalho, a nossa proposta foi realizar o isolamento de bandas de interesse selecionadas no cromatograma do extrato da polpa do açaí por LC-SPE com o modo de operação *time slice*, mas adequando o tempo de *slice* (fatiamento) de

acordo com a largura da banda cromatográfica, desviando a banda para um mesmo cartucho SPE nas diversas injeções a fim de aumentar a concentração do soluto presente na fração. Para isso, exaustivas tentativas foram realizadas para o completo entendimento das unidades da técnica hifenada LC-DAD-SPE e sua comunicação com o programa HyStar™. No manual do equipamento, troca de informações com a equipe técnica da Bruker™ e artigos da literatura encontramos apenas o uso do *time slice* com tempo fixo e normalmente utilizando todo o tempo de corrida cromatográfica.

Desta forma, foi então realizado o *trapping* para 17 bandas cromatográficas com polaridades e intensidades de absorção no UV distintas selecionadas no cromatograma (Figura 5.7). Foram realizadas 30 injeções consecutivas direcionando as bandas de interesse para cartuchos de SPE HySphere™ Resin *General Phase* (fase estacionária polidivinilbenzeno), visto que essa fase estacionária apresentou boa retenção de uma vasta classe de compostos encontrados em produtos naturais (CLARKSON et al., 2007).

Com essa análise têm-se a perspectiva de adsorver e concentrar os analitos presente em cada banda cromatográfica, que foram denominadas: T1 (tr: 1,90 min), T2 (tr: 2,35 min), T3 (tr: 4,51 min), T4 (tr: 7,25 min), T5 (tr: 8,76 min), T6 (tr: 13,02 min), T7 (tr: 18,50 min), T8 (tr: 26,53 min), T9 (tr: 30,0 min), T10 (tr: 33,48 min), T11 (tr: 36,33 min), T12 (tr: 45,73 min), T13 (tr: 9,88), T14 (tr: 13,83), T15 (tr: 22,17), T16 (tr: 36,45) e T17 (tr: 39,95) (Figuras 5.7 e 5.8)

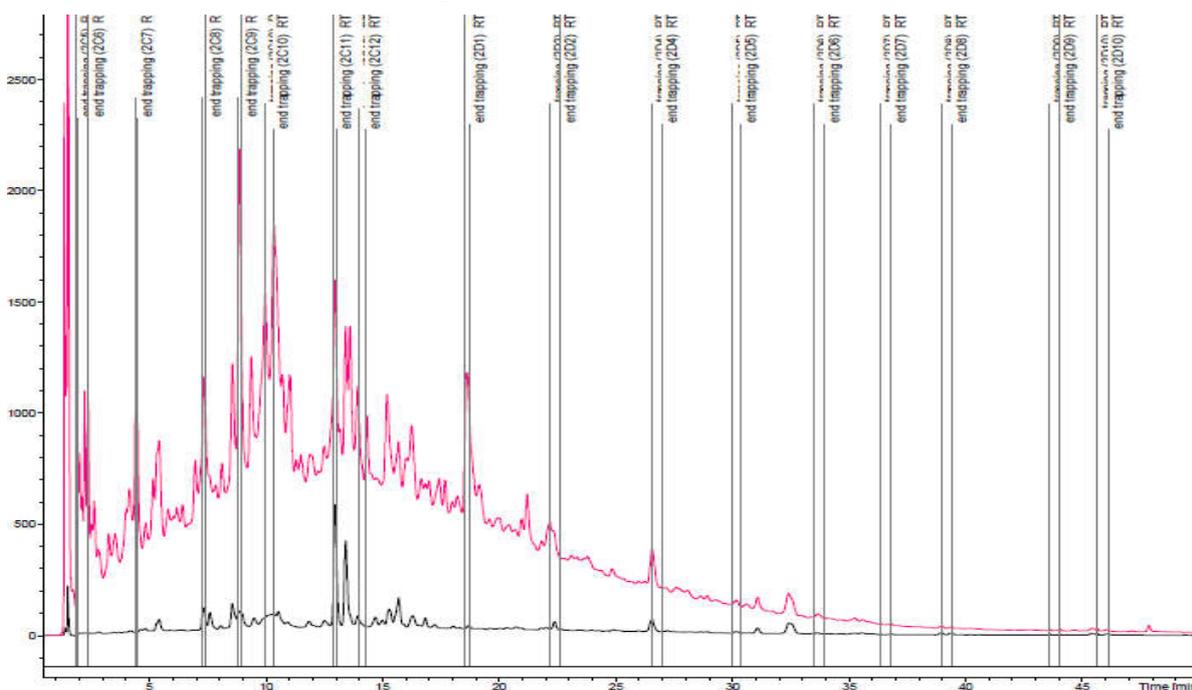


FIGURA 5.7 - *Trapping* por LC-SPE com modo *time slice* utilizando período e intervalo de tempo variáveis. Extrato metanólico da polpa do açai obtido por ASE™ 350.

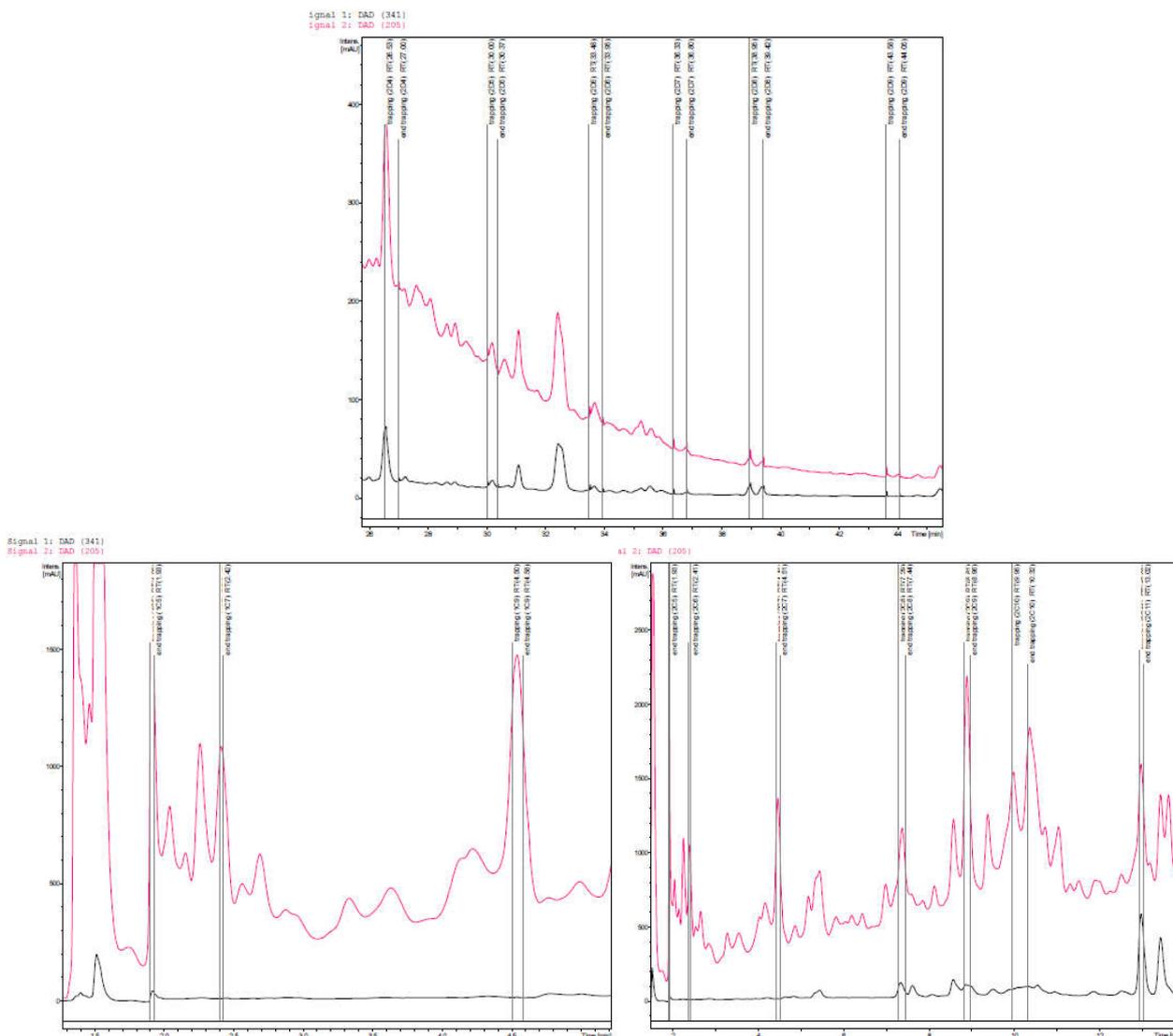


FIGURA 5.8 - Ampliação das regiões do cromatograma com *trapping* do extrato metanólico da polpa do açai por LC-SPE pelo modo *time slice*. λ 341 (linha em preto) e 205 nm (linha em rosa). Eluente A (H_2O + 0,025% TFA) e eluente B (ACN + 0,025% TFA). Eluição gradiente 7,5-54% de B durante 60 minutos a 35°C com $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ em coluna Eclipse C18.

Após a etapa de *trapping*, os cartuchos de SPE contendo os analitos das bandas cromatográficas foram secos por 30 min com N_2 (g), eluídos com 250 μL de $\text{MeOH-}d_4$ diretamente em tubos de RMN (Bruker, 3 mm) à 25°C, adquiridos os experimentos de RMN de ^1H e, para amostras que apresentaram boa relação sinal/ruído foram realizados os experimentos de RMN 2D e, então as frações foram armazenadas em *vials* no refrigerador.

Os espectros de RMN de ^1H das amostras obtidas no *trapping* do extrato metanólico da polpa do açai podem ser verificados nas figuras 5.9 e 5.10.

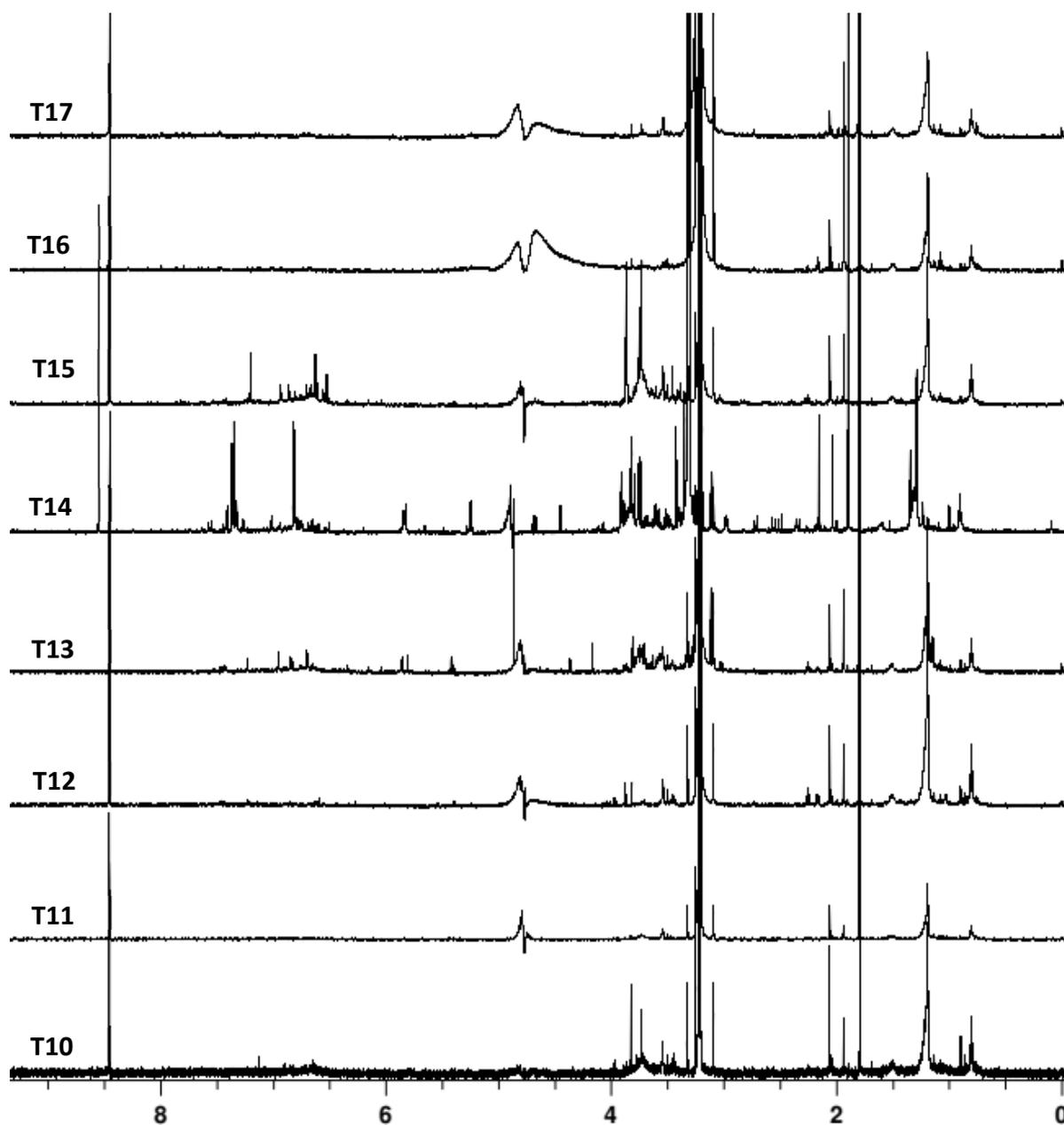


FIGURA 5.9 – Espectros de RMN de ¹H para as frações T10 a T17 coletadas dos cartuchos SPE por *time slice*. Sequência de pulso *noesypr1d* (denominação Bruker). 64 varreduras. MeOH-*d*₄ em um 600 MHz com *cryoprobe*.

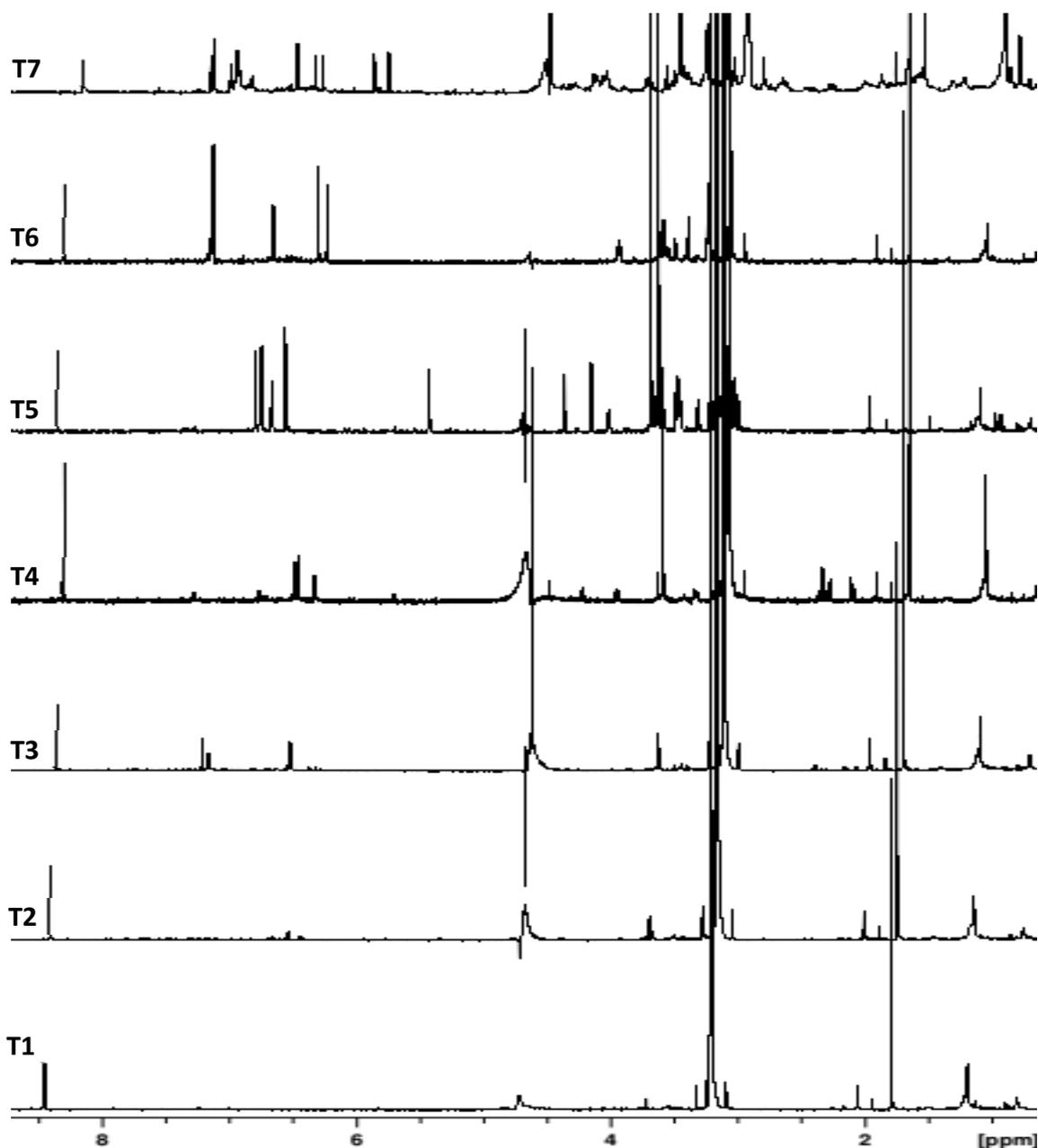


FIGURA 5.10 – Espectros de RMN de ^1H para as frações T1 a T9 coletadas dos cartuchos SPE por *time slice*. Sequência de pulso *noesypr1d* (denominação Bruker). $\text{MeOH-}d_4$ em um 600 MHz com *cryoprobe*.

Analisando os espectros de RMN de ^1H (Figura 5.9 e 5.10) foi possível verificar que algumas amostras não apresentaram boa retenção na fase estacionária HySphere™ Resin *General Phase* e, para algumas frações que apresentaram relação sinal/ruído consideráveis (T3, T4, T5, T6, T7 e T14), as que tiveram suas estruturas identificadas serão discutidas no item seguinte.

10.3. Identificação dos compostos isolados por LC-SPE

10.3.1. Banda cromatográfica T3

Da banda cromatográfica T3 (tr: 4,51 min) foram obtidos 0,2 mg que foram submetidos às análises por RMN uni (^1H), bidimensionais (COSY e HSQC) e, espectrometria de massa (MS) de alta resolução.

As análises de MS no modo negativo de ionização mostraram no espectro de *full scan* o íon molecular desprotonado $[\text{M}-\text{H}]^-$ com m/z 153.0226 e sugerindo a fórmula molecular $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_4$. No experimento de fragmentação AutoMS no modo negativo de ionização foi obtido o fragmento majoritário em m/z 109.0301 (100%) referente a perda de m/z 44 (CO_2) (Figura 5.11) (PACHECO-PALENCIA et al., 2009 e PANDEY et al., 2015).

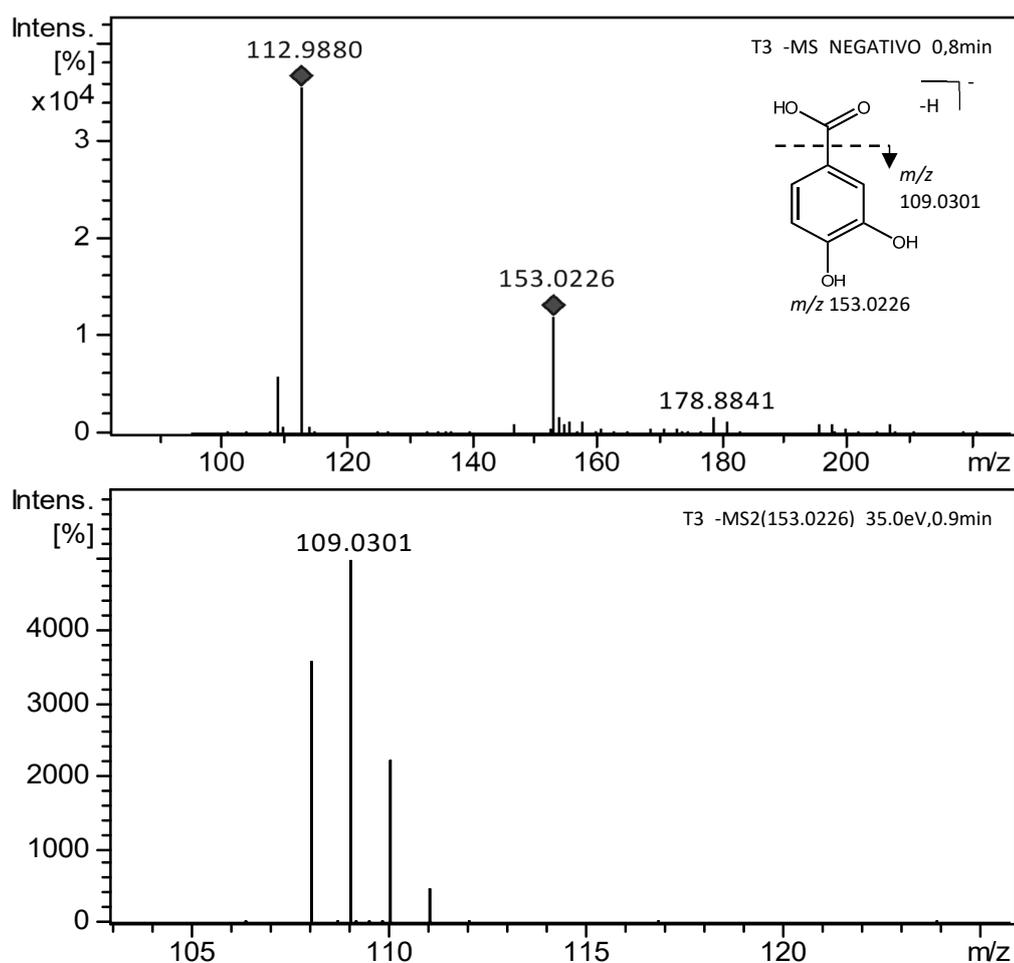


FIGURA 5.11 – Espectros de massa no modo negativo da banda T3 (acima), e MS² do íon m/z 153.0197 (abaixo) com a fragmentação para o íon observado.

A análise dos dados de RMN de ^1H (Figura 5.12) indicou um espectro simples, compostos por sinais na região de hidrogênios aromáticos e olefínicos, sendo um duplete em δ 7,30 ($J = 1,80$ Hz), um duplete de duplete em δ 7,24 ($J = 8,30$ e $1,80$ Hz) e um outro duplete em δ 6,62 ($J = 8,30$ Hz) indicando a presença de uma anel aromático com padrão 1, 3 e 4 substituído.

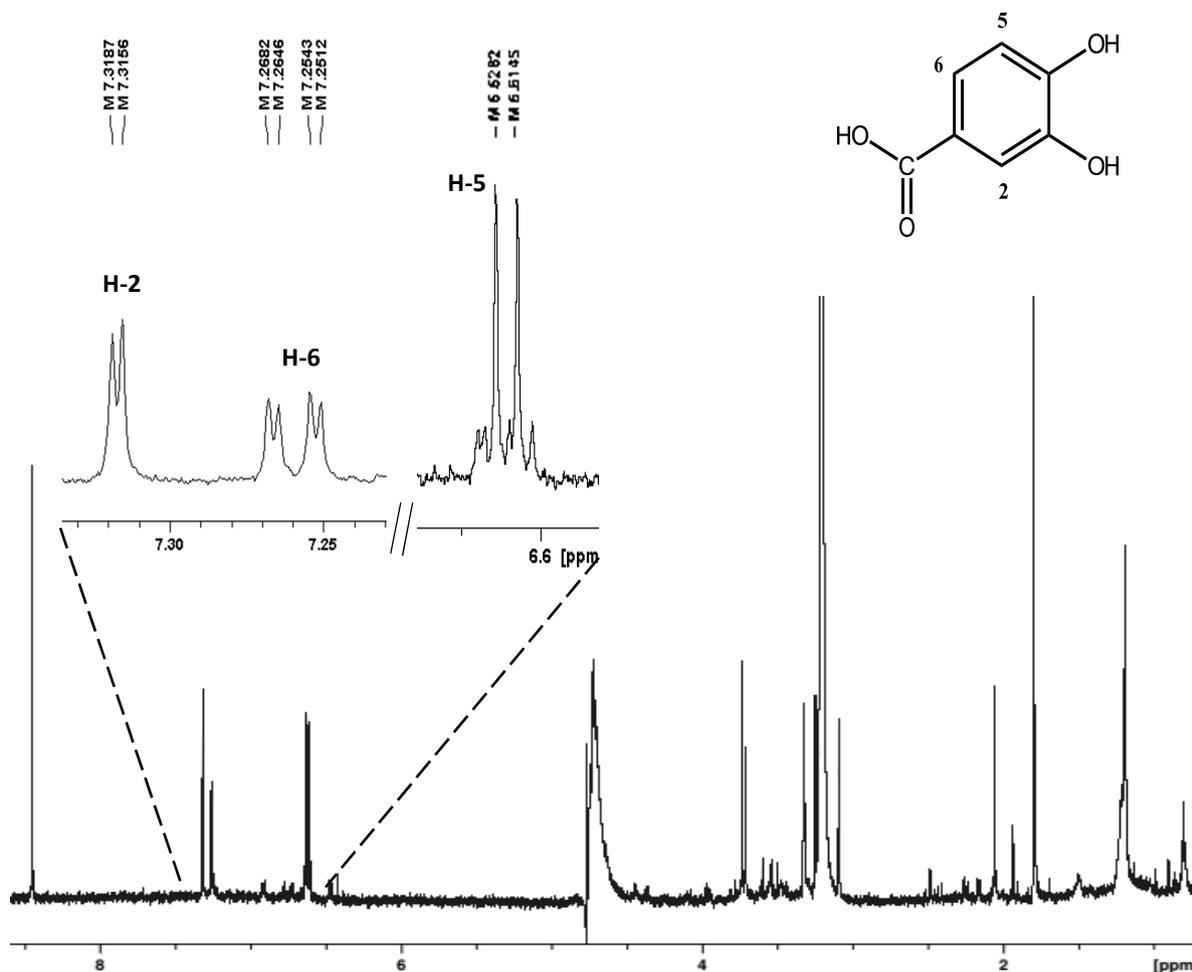


FIGURA 5.12 – Espectro de RMN de ^1H da banda cromatográfica T3 ($t_r = 4,51$ min). Isoladamento por LC-SPE com *trapping* por *time-slice*. 30 injeções com $15 \mu\text{L}$ do extrato metanólico da polpa do açaí. Sequência de pulso *noesypr1D*. 8 varreduras. $\text{MeOH-}d_4$ em um 600 MHz com *cryoprobe*.

Com o mapa de contorno COSY (Figura 5.13) foi verificada a correlação entre os hidrogênios δ 7,24 (H6) e δ 6,62 (H5) e, no mapa de contorno HSQC (Figura 5.14) foram verificados os valores de deslocamento químico dos carbonos diretamente ligados, no qual houve correlação do carbono em δ 118,15 (C-2) com o hidrogênio δ 7,30 (H-2); δ 123,5 com o hidrogênio em δ 7,24 e δ 115,4 ligado ao

hidrogênio δ 6,62 confirmando a presença do anel aromático tri substituído com a presença de grupo carboxila.

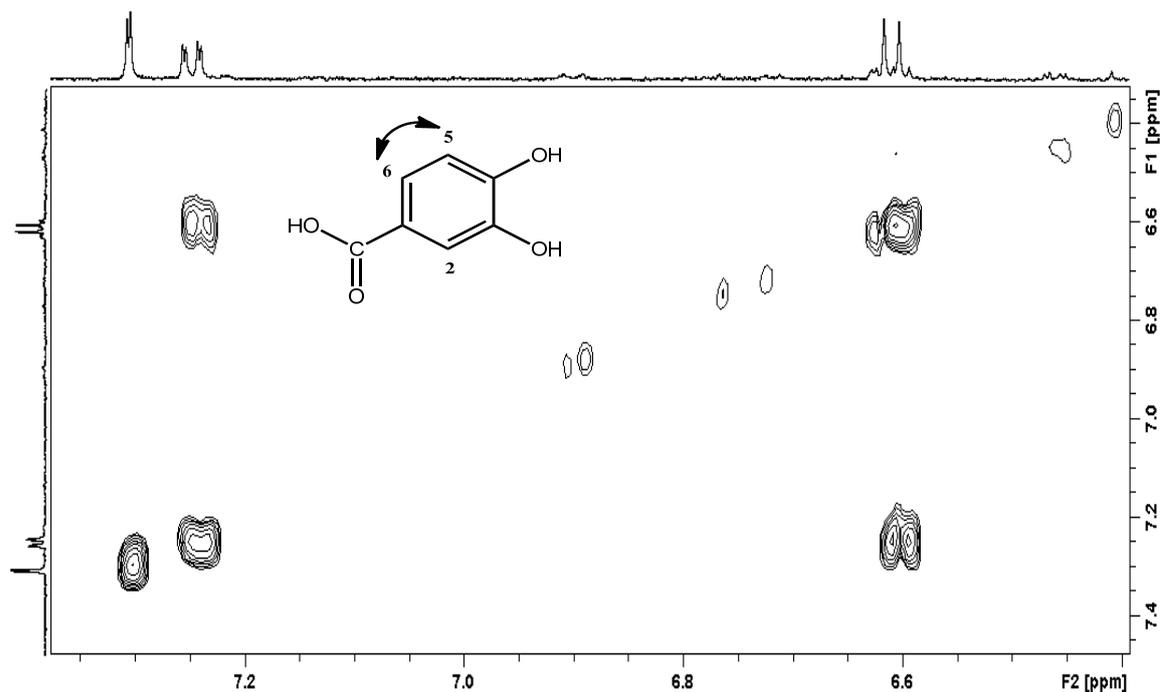


FIGURA 5.13 – Mapas de contorno COSY da banda T3. Isolamento por LC-SPE do extrato metanólico da polpa do açaí com 16 varreduras. MeOH- d_4 em um 600 MHz com *cryoprobe*.

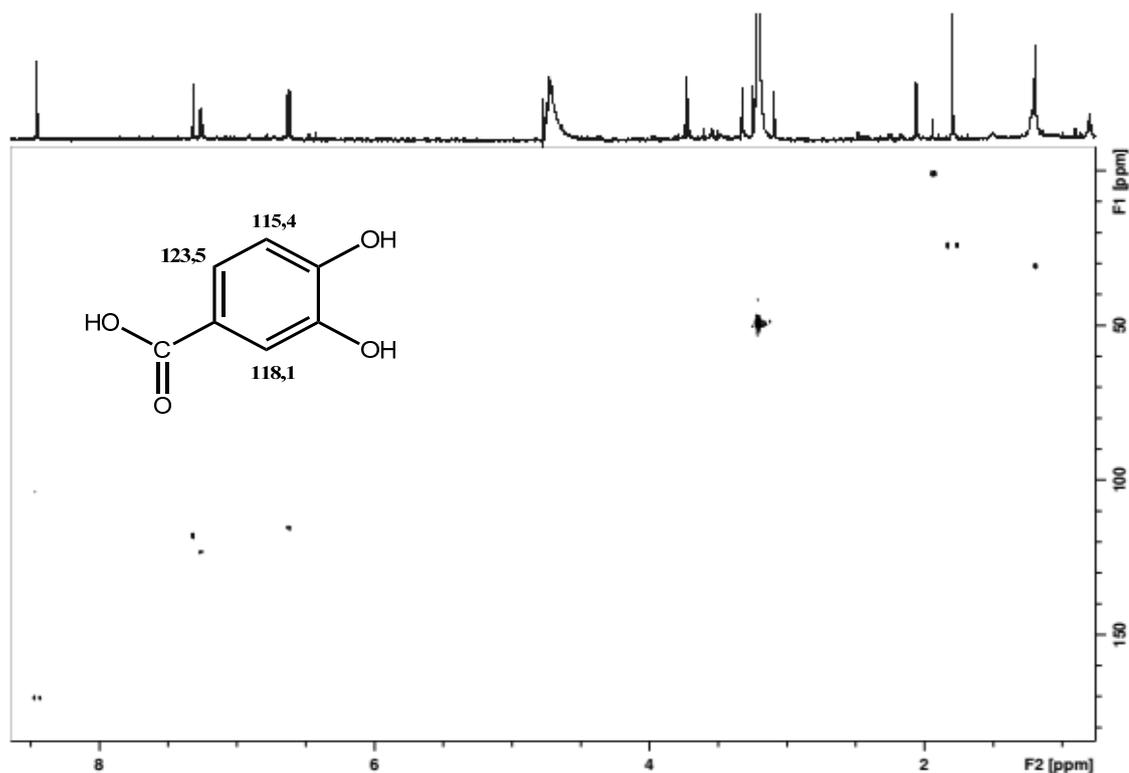


FIGURA 5.14 – Mapas de contorno HSQC da banda T3 isolada por LC-SPE do extrato metanólico da polpa do açaí com 32 varreduras. MeOH- d_4 em um 600 MHz com *cryoprobe*.

De acordo com os dados espectroscópicos verificados por RMN e das informações verificados por MS, o composto majoritário presente na banda T3 possui a estrutura do ácido protocatecuico (Figura 5.15 e Tabela 5.9).

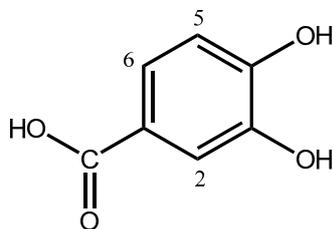


FIGURA 5.15 – Fórmula estrutural do ácido protocatecuico identificado na banda T3.

TABELA 5.8 – Dados de RMN para o composto majoritário da banda T3 (0,2 mg em 130 μ l de MeOH- d_4 em um 600 MHz com *cryoprobe* a 298 K).

Posição	δ $^1\text{H}^*$ (J em Hz)	δ ^{13}C	COSY
2	7,30 <i>d</i> (1,80)	118,1	-
6	7,24 <i>dd</i> (8,30; 1,80)	123,5	5
5	6,62 <i>d</i> (8,30)	115,4	6

* multiplicidade = d (duplete); dd (duplete de duplete)

Esse composto já foi identificado no açaí por meio da técnica de cromatografia líquida acoplada a detector por espectrometria de massas (LC-MS) com o uso de padrões comerciais (PACHECO-PALENCIA et al., 2009; GORDON et al., 2012; LICHTENTHALER et al., 2005).

A concentração desse composto é baixa na polpa do açaí, no qual já foram relatados 0,177 mg/100 g (PACHECO-PALENCIA et al., 2009) e 0,65 mg/100 g (GORDON et al., 2012). Gordon e pesquisadores citam ainda que a concentração do ácido protocatecuico diminui com o grau de maturação dos frutos (GORDON et al., 2012).

10.3.2. Banda cromatográfica T5

Da banda cromatográfica T5 (tr: 7,44 min) foram obtidos 0,6 mg que foram submetidos às análises por RMN uni (^1H) e bidimensionais (COSY, HSQC e HMBC) e espectrometria de massa (MS) de alta resolução.

As análises por MS no modo negativo de ionização (Figura 5.16) mostraram no espectro de *full scan* o íon $[\text{M-H}]^-$ com m/z 553.2046 referente à

molécula desprotonada, e sugerindo a fórmula molecular $C_{26}H_{34}O_{13}$. No experimento de fragmentação AutoMS no modo negativo de ionização foram observados os fragmentos m/z 325.1149 (100%) seguidos de 112.9851 (43,5%), 310.0885 (26,4%), 165.0567 (17,6%) e 373.1391 (18.1%).

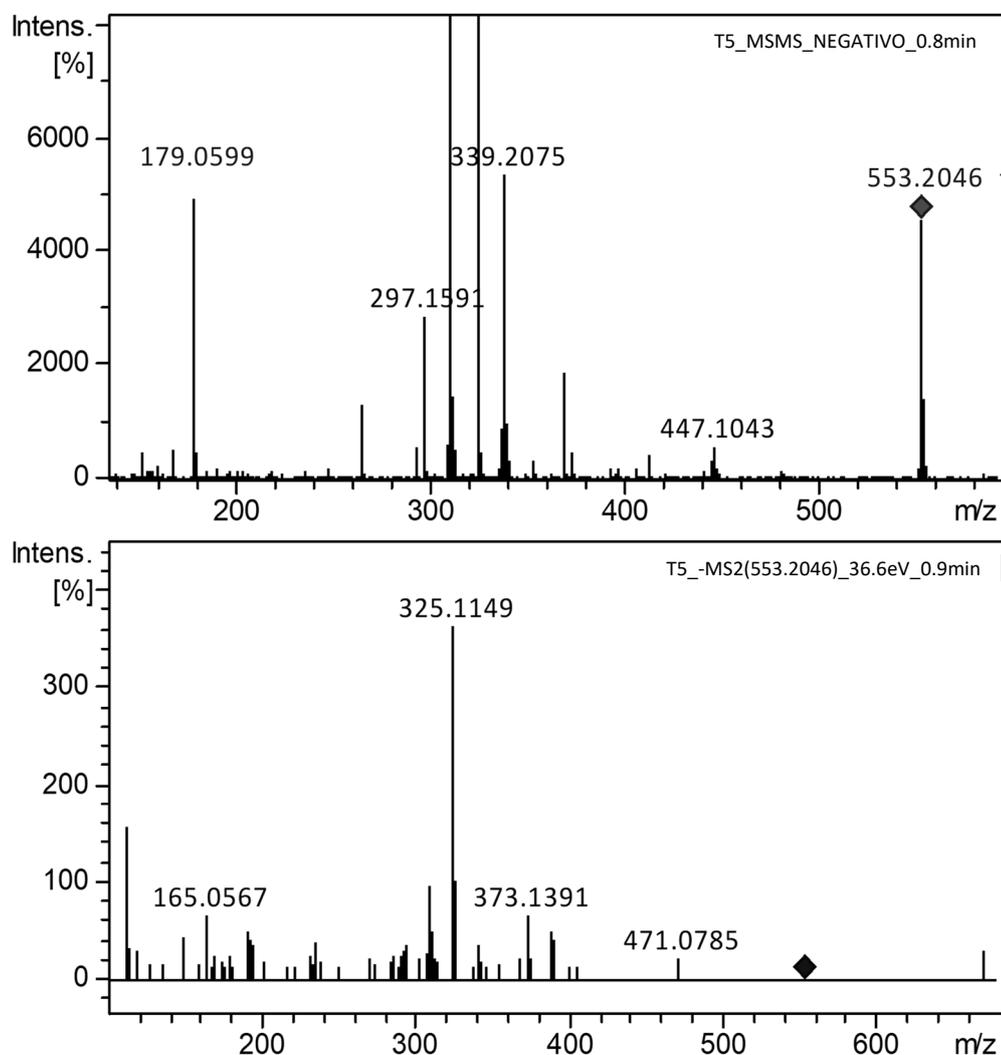


FIGURA 5.16 – Espectros de massa (MS/MS) no modo negativo da banda cromatográfica T5 (acima) e fragmentos do íon m/z 553.2046 (abaixo).

O espectro de RMN de 1H da banda T5 (Figura 5.17 e 5.18) apresentou um perfil complexo com sinais na região de hidrogênios aromáticos e olefínicos e, de carboidratos. Na região aromática, um duplete com deslocamento químico em δ 6,99 ($J=1,85$ Hz; H-2), um duplete de duplete em δ 6,86 (H-6) com constante de acoplamento *orto* ($J= 8,3$) e *meta* (1,85 Hz) e, um outro duplete em δ 6,75 ($J= 8,30$ Hz; H-5) indicam a presença de um anel aromático do tipo 1,3 e 4 substituído (Unidade A) (SILVA et al., 2009).

Um duplete em δ 6,94 ($J=1,30$ Hz; H-2') e um singleto largo em 6,95 (H-6') indicaram hidrogênios aromáticos com substituição meta em um anel tetra substituído (Unidade B).

A presença de hidrogênio anomérico de glicose em δ 4,35 (d , $J=7,85$ Hz; H-1"), duas metoxilas em δ 3,82 (s, H-3-OMe) e δ 3,88 (s, H-3'-OMe) e demais hidrogênios (δ 3,38-4,56) também foram verificados.

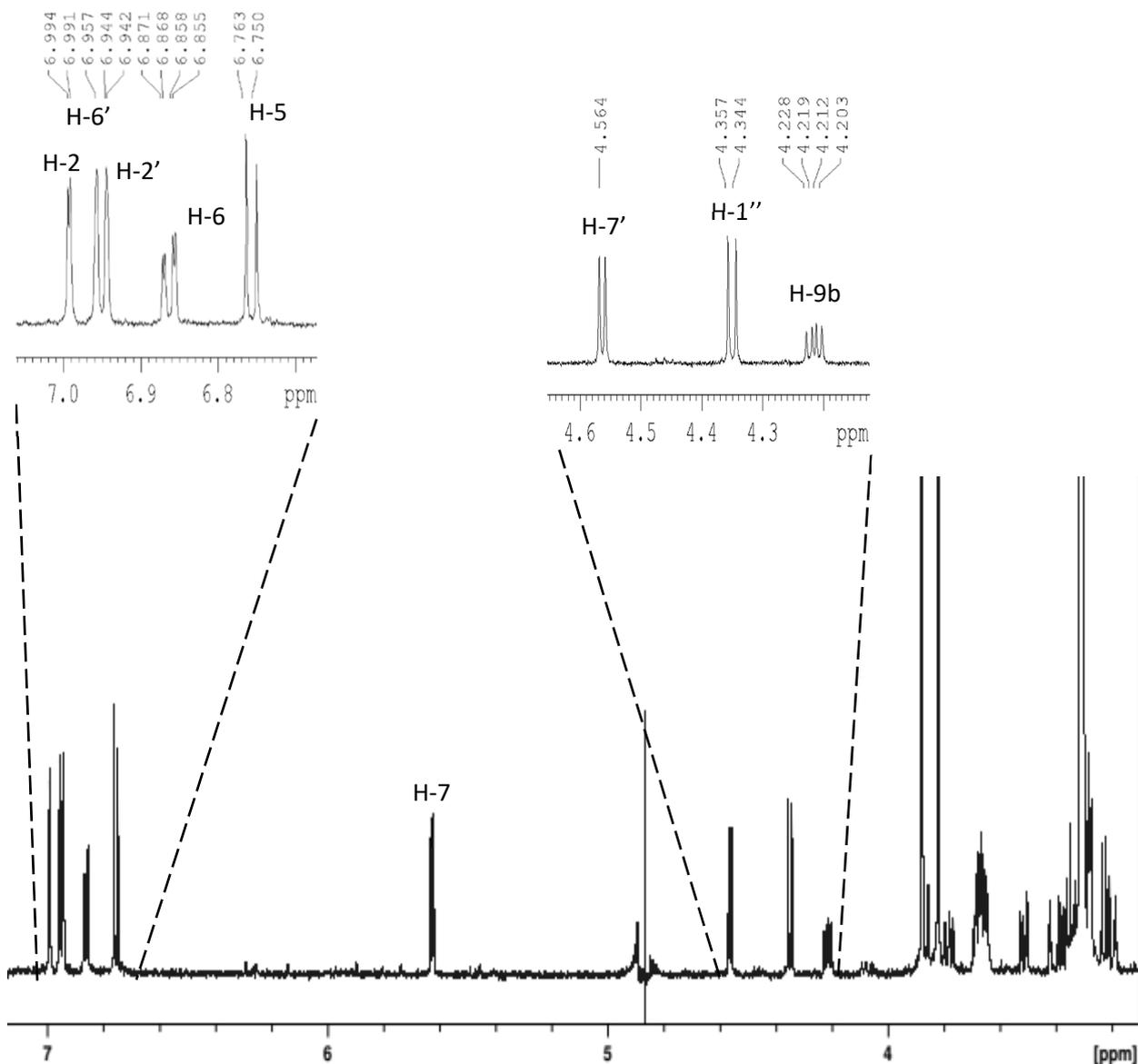
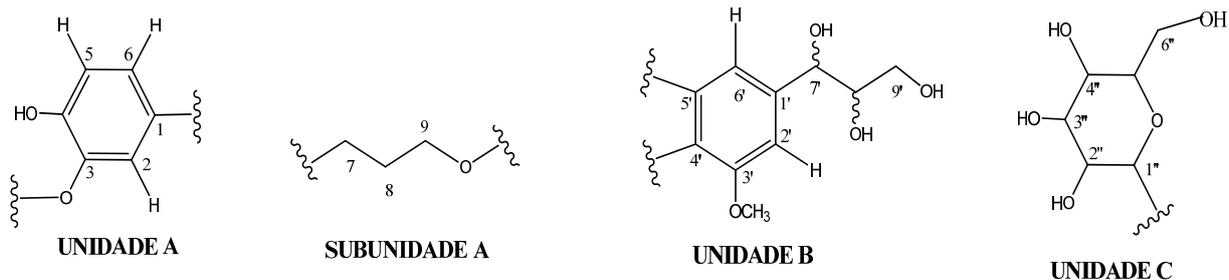


FIGURA 5.17 – Espectro de RMN de ^1H da banda cromatográfica T5 ($t_r = 7,44$ min). Isolamento por LC-SPE com *trapping* por *time-slice*. 30 injeções de 15 μL do extrato metanólico da polpa do açaí. Sequência de pulso *noesypr1D* com 8 varreduras. $\text{MeOH-}d_4$ em um 600 MHz com *cryoprobe*.

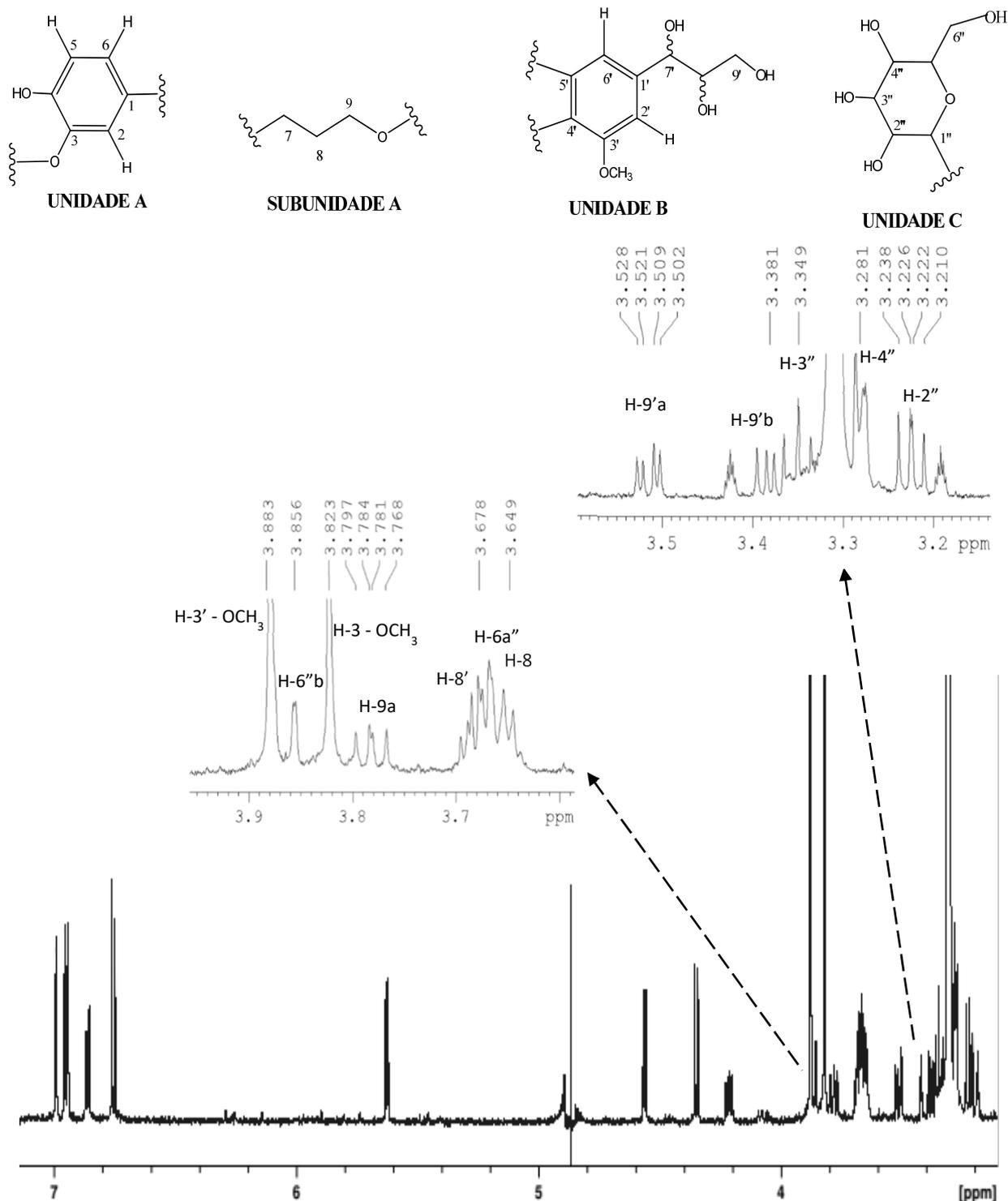


FIGURA 5.18 – Espectro de RMN de ^1H da banda cromatográfica T5 ($t_r = 7,44$ min). Isolamento por LC-SPE com *trapping* por *time-slice*. 30 injeções de 15 μL do extrato metanólico da polpa do açaí. Sequência de pulso *noesypr1D* com 8 varreduras. MeOH-d_4 em um 600 MHz com *cryoprobe*.

Com as análises do mapa de contorno COSY (Figura 5.19) foi possível verificar a correlação entre os hidrogênios vicinais δ 6,75 (H-5) e δ 6,86 (H-6) da unidade A; entre os hidrogênios δ 4,56 (H-7') com δ 3,67 (H-8') e, este com os hidrogênios em δ 3,52 (H-9'a) e 3,38 (H-9'b) da cadeia propan-1,2,3-triol da unidade B. As correlações entre os hidrogênios da unidade C (H-1" a H-5") confirmam a unidade glicosídica e, verificou-se também a correlação entre o hidrogênio em δ 5,62 (H-7) com o hidrogênio em δ 3,64 (H-8) e este mostrou correlação com os hidrogênios diastereotópicos em δ 3,78 (H-9a) e 4,21 (H-9b).

Com a análise do mapa de contorno HSQC foi verificado o deslocamento químico dos carbonos diretamente ligados aos hidrogênios da estrutura. Os valores encontrados para a estrutura podem ser visualizados na Figura 5.20 e na Tabela 5.10.

O deslocamento químico de carbonos (δ 63,4 a 78,9) encontrados para os hidrogênios da unidade C e o valor em δ 105,1 (C-1") correlacionado ao hidrogênio anomérico (H-1") confirmam o carboidrato com ligação do tipo O-glicosídica (ALBURQUERQUE et al., 2014; PIZZOLATTI et al., 2003).

As correlações verificadas em δ 111,2 (C-2), δ 116,7 (C-5), δ 120,3 (C-6) confirmam um anel aromático 1, 3 e 4 substituídos, assim como os valores encontrados para os carbonos em δ 113,0 (C-2') e δ 117,7 (C-6') confirmam um segundo anel aromático com padrão de substituição 1, 3, 4 e 5 substituídos.

Os carbonos das metoxilas foram confirmadas em δ 57,1 (C-3) e δ 57,5 (C-3'), e os carbonos em 76,7 (C-7'), δ 79,0 (C-8') e δ 64,9 (C-9) estão de acordo com a cadeia propan-1,2,3-triol da unidade B. Os valores de deslocamento químico encontrados em δ 89,2 (C-7), δ 53,7 (C-8) e δ 73,0 (C-9) sugerem um sistema benzofurano e, essa suposição foi confirmada através da análise do experimento HMBC (Figura 5.21).

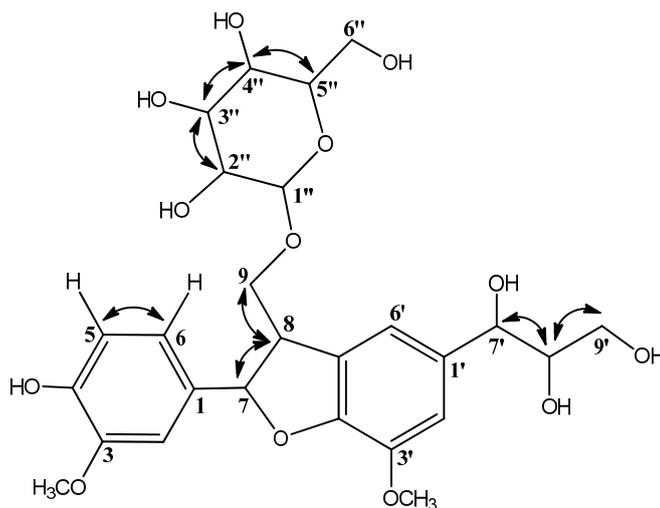
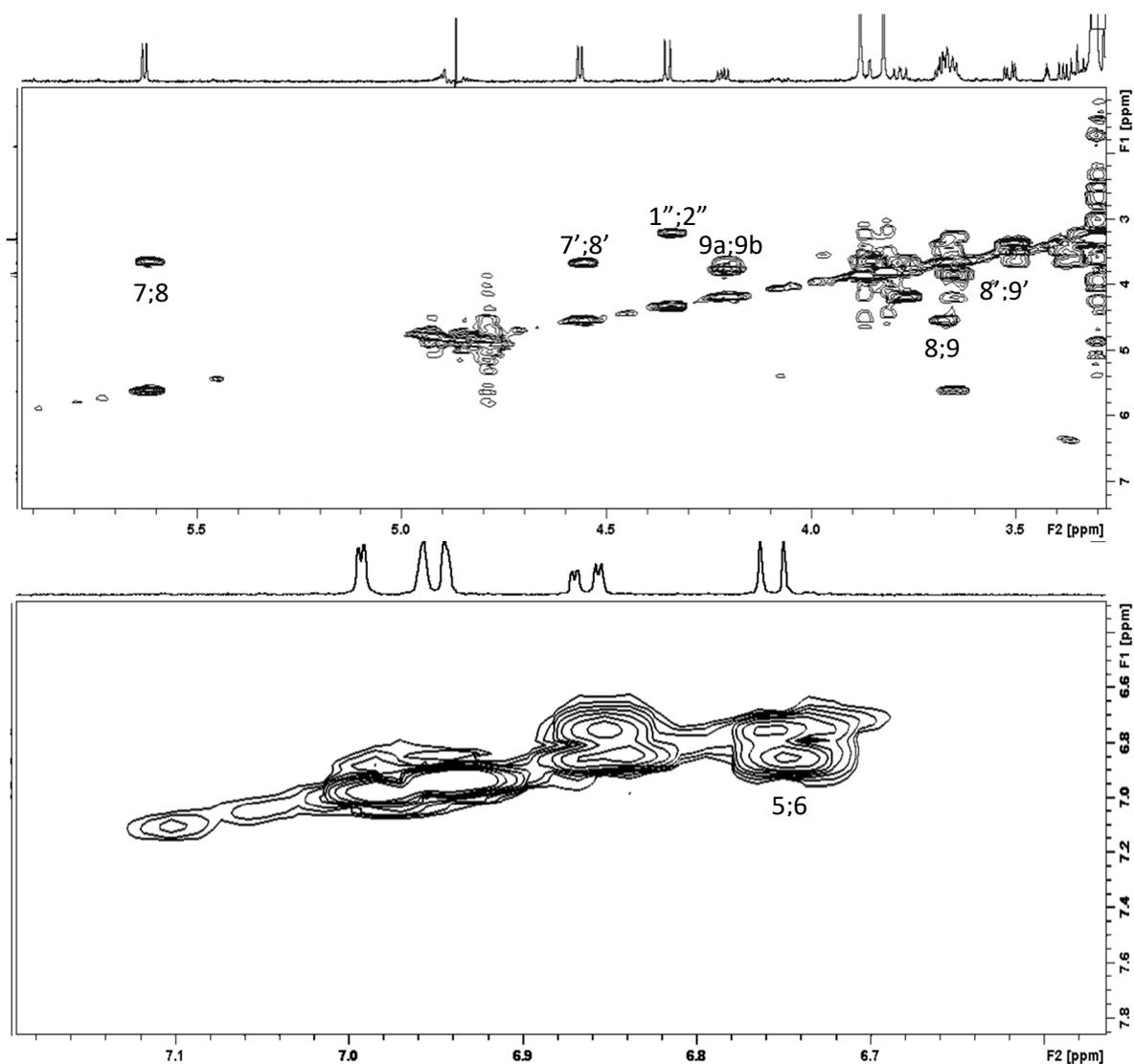


FIGURA 5.19 – Mapa de contorno COSY da banda cromatográfica T5 com as correlações verificadas na estrutura. Sequência de pulso *cosygppraqf* com 8 varreduras. MeOH-*d*₄ em um 600 MHz com *cryoprobe*.

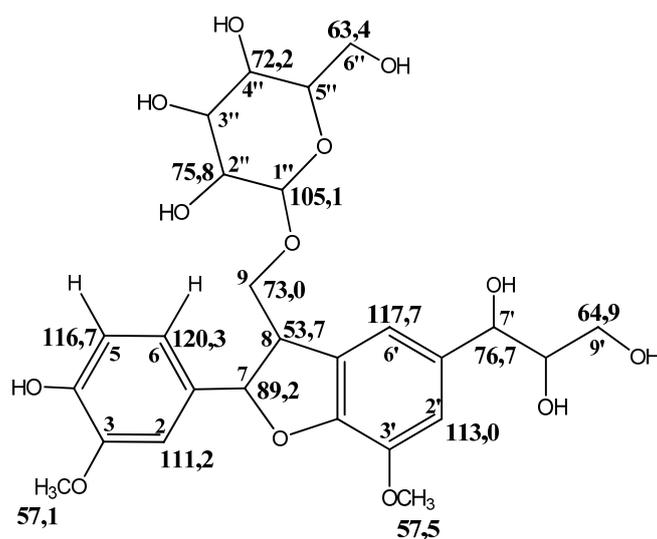
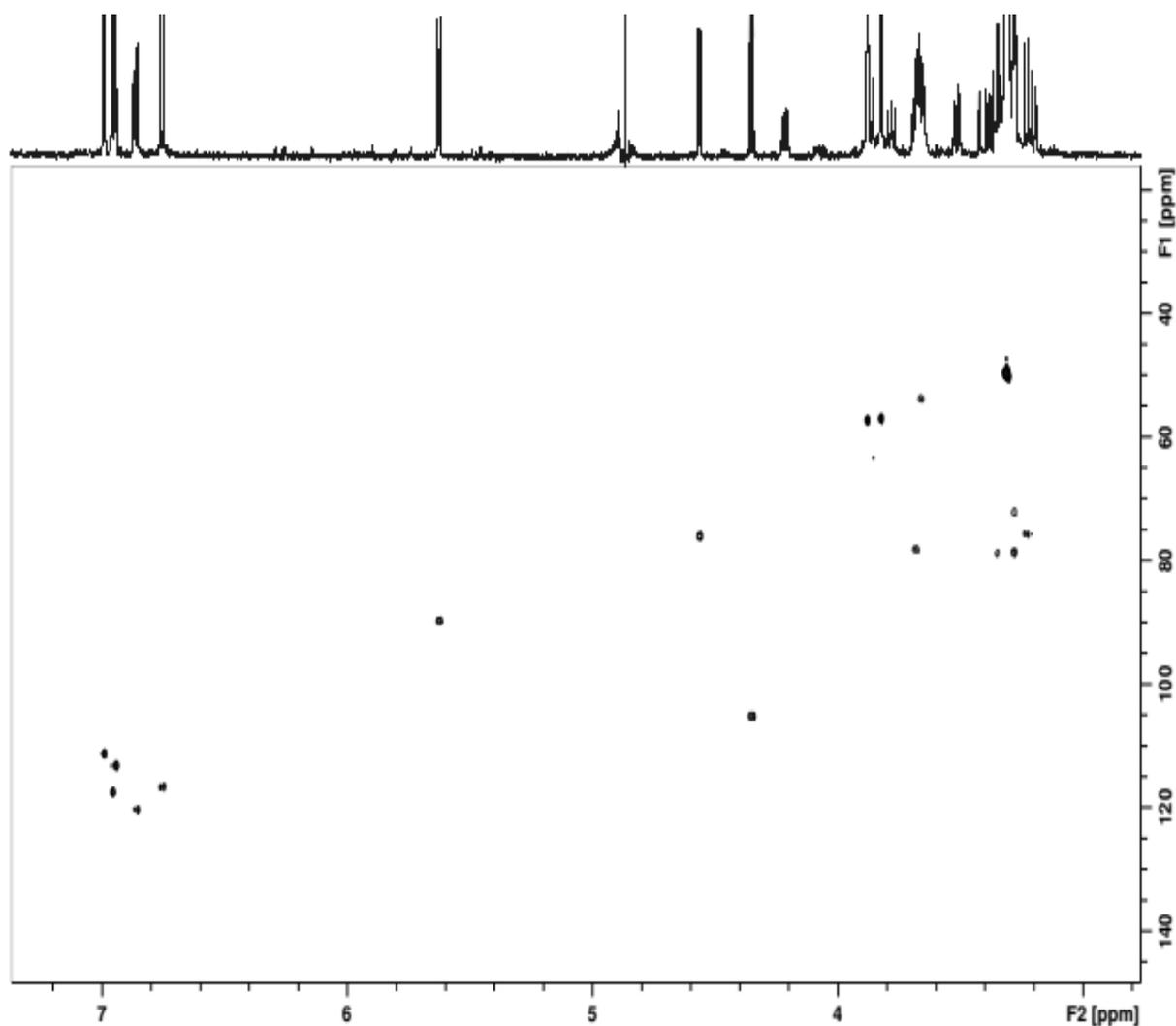


FIGURA 5.20 – Mapa de contorno HSQC da banda cromatográfica T6 com as correlações ^1H - ^{13}C (J_1) atribuídas na estrutura. Sequência de pulso *hsqcetgp* com 16 varreduras. MeOH- d_4 em um 600 MHz com *cryoprobe*.

Com o experimento de HMBC (Figura 5.21) foi possível verificar a conexão entre as 3 partes (unidades A, B e C) e subunidade A da molécula através das correlações a longa distância (J^{2-3}) entre os átomos de hidrogênio e carbono e, dessa maneira foi possível confirmar a estrutura proposta (Figura 5.22). Na qual, o hidrogênio aromático em δ 6,99 (H-2) e δ 6,86 (H-6) apresentaram correlação com o carbono em δ 89,2 (C-7) confirmando a ligação da cadeia carbônica com o anel aromático da unidade A. Da mesma forma, o respectivo hidrogênio δ 5,62 (H-7) mostrou correlação com o carbono C-1 (δ 136,0) do anel aromático e os δ 53,7 (C-8) e δ 73,0 (C-9) da cadeia carbônica. O hidrogênio anomérico da β -glicose (δ 4,35, H-1") apresentou correlação com o carbono em δ 73,0 (C-9), mostrando a conexão da unidade glicolítica com a cadeia carbônica da unidade A.

A verificação da conexão das unidades A com a unidade B com formação do anel heterocíclico foi confirmada através da correlação entre os hidrogênios enantiotópicos da posição 9 (δ 3,78, Ha; δ 4,21, Hb) e H-8 (δ 3,64) com o carbono em 130,3 (C-5') e da correlação do hidrogênio H-7 (δ 5,62) com o deslocamento químico em δ 148,1 referente ao carbono da posição 4 do anel B.

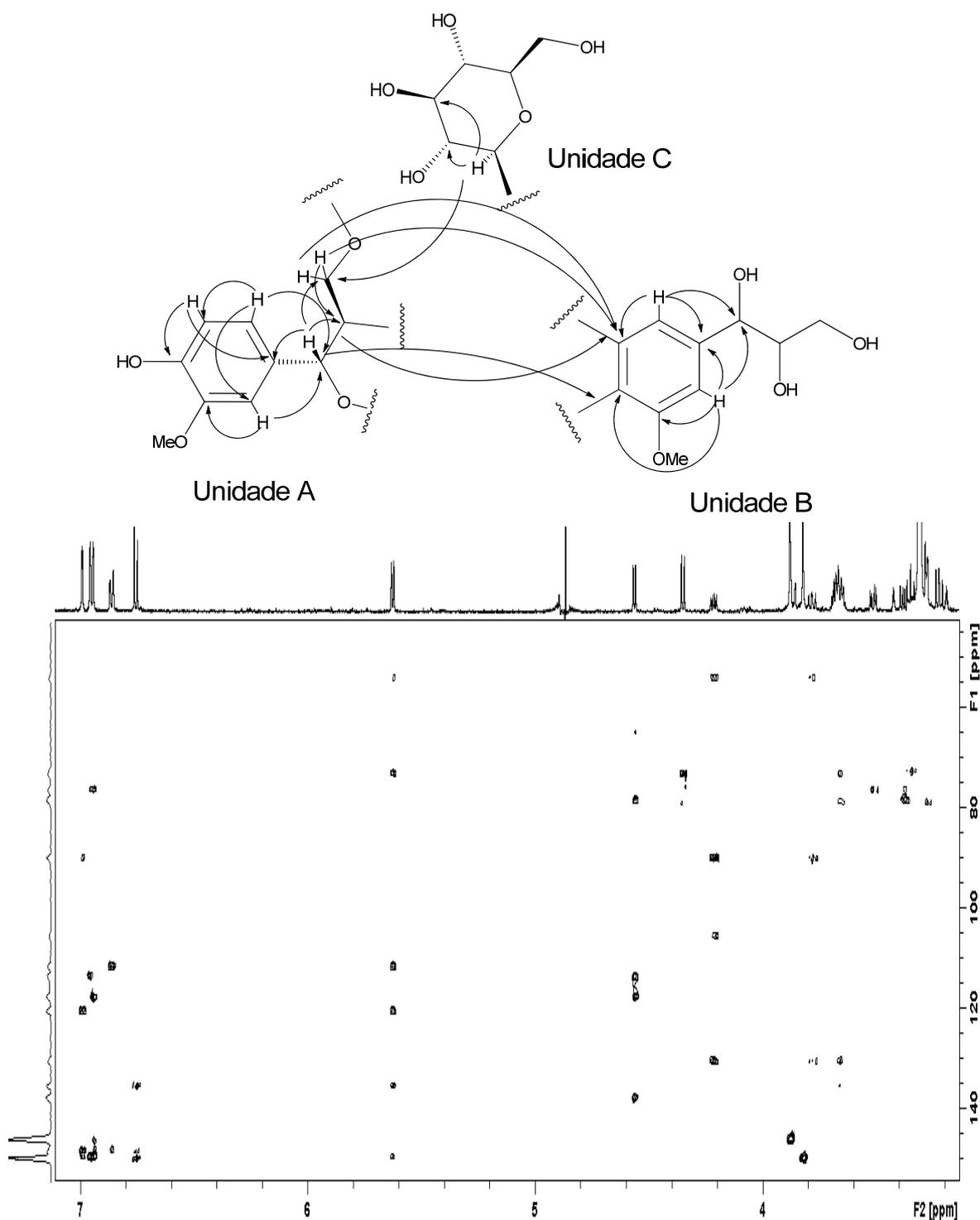


FIGURA 5.21 – Mapa de contorno HMBC da banda cromatográfica T5 com as correlações verificadas na estrutura. Sequência de pulso *hmbcgp1pndqf* com 128 varreduras. MeOH-*d*₄ em um 600 MHz com *cryoprobe*.

Dessa forma, a partir da extensiva análise dos dados espectroscópicos verificados por RMN e das informações fornecidas pelas análises por MS, como o íon

molecular (m/z 553.1943) com a possível fórmula molecular de $C_{26}H_{34}O_{13}$, sugere-se que o composto majoritário presente na banda cromatográfica T5 seja o álcool 9-O- β -D-glicopiranosídeo-7',8'-dihidróxi-dehidroconiferílico (Figura 5.22).

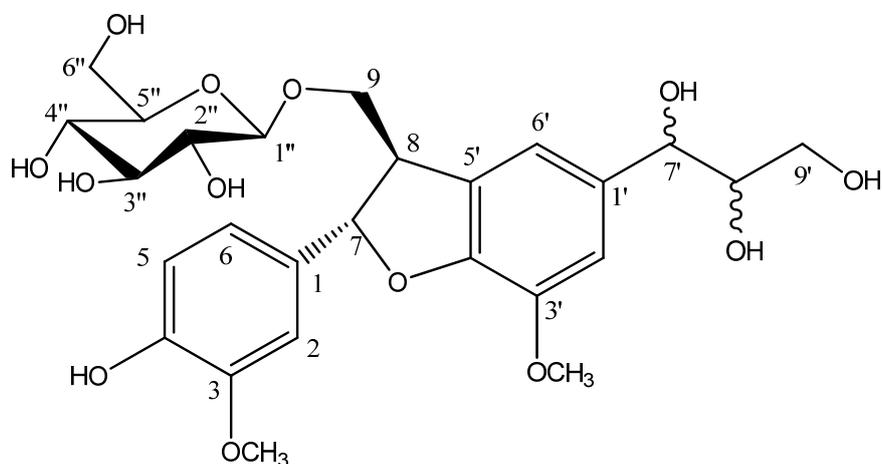


FIGURA 5.22 – Fórmula estrutural da álcool-9-O- β -D-glicopiranosídeo-(+)-7S8R-7',8'-dihidróxi-dehidroconiferílico identificada na banda T5.

A comparação com dados encontrados na literatura (HU et al., 2014) mostra que a configuração dos centros estereogênicos em C-7 e C-8 pode ser atribuída de acordo com o valor de constante de acoplamento do H-7, no qual a configuração do isômero com configuração absoluta 7R,8S possui $J = 5,2$ Hz e o isômero 7S,8R possui $J = 6,4$ Hz. Em nosso trabalho verificou-se a constante de acoplamento de 6,10 Hz, sugerindo a configuração relativa de 7S,8R para a estrutura em análise. Os dados espectroscópicos para essa estrutura foram sumarizados na Tabela X.

TABELA 5.9 – Dados de RMN para o composto majoritário da banda cromatográfica T5 (0,6 mg em 130 μ L de MeOH- d_4 em um 600 MHz com *cryoprobe* a 298 K).

Posição	δ $^1\text{H}^*$ (J in Hz)	δ ^{13}C	COSY	HMBC
1	-	136,0	-	-
2	6,99 <i>d</i> (1,85)	111,2	6	89,2; 116,7; 135,6; 148,1; 149,7
3-OMe	3,82 <i>s</i>	57,1	-	149,7
3	-	149,7	-	-
4	-	148,1	-	-
5	6,75 <i>d</i> (8,30)	116,7	6	135,6; 148,1; 149,7
6	6,86 <i>dd</i> (8,30; 1,85)	120,3	2; 5	111,2; 148,1

Continuação Tabela 5.10

Posição	δ ¹ H* (J in Hz)	δ ¹³ C	COSY	HMBC
7	5,62 <i>d</i> (6,0)	89,2	8	53,7; 73,0; 111,2; 120,3; 135,6; 149,7
8	3,64-3,66	53,7	7; 9b	73,0; 130,3
9a	3,78 <i>dd</i> (7,80; 9,50)	73,0	9b	53,7; 89,2; 105,1; 130,3
9b	4,21 <i>dd</i> (9,50; 5,40)		9a	
1'	-	137,4	-	-
2'	6,94 (<i>d</i> , 1,30)	113,0	-	76,7; 117,7; 145,4; 149,6
3'-OMe	3,88 <i>s</i>	57,5	-	145,4
3'	-	145,4	-	-
4'	-	149,6	-	-
5'	-	130,3	-	-
6'	6,95 <i>sl</i>	117,7	-	76,7; 113,0; 149,6
7'	4,56 <i>d</i> (6,10)	76,7	8'	64,9; 79,0; 117,7; 137,4
8'	3,67 – 3,69 <i>m</i>	79,0	7'; 9a; 9b	-
9'a	3,52 <i>dd</i> (11,2; 4,0)	64,9	9b	76,7; 79,0
9'b	3,38 <i>dd</i> (11,2; 6,4)		9a	
1''	4,35 <i>d</i> (7,85)	105,1	2''	75,8
2''	3,22 <i>dd</i> (9,20;7,8,5)	75,8	1''	78,9; 105,1
3''	3,33 – 3,35 <i>m</i>	78,9	-	72,2; 78,9
4''	3,26 – 3,28 <i>m</i>	72,2	-	78,5
5''	3,26 – 3,28 <i>m</i>	78,5	6''a	72,2; 130,3
6''a	3,64 – 3,67 <i>m</i>	63,4	5''; 6''b	78,5; 130,3
6''b	3,85 – 3,86 <i>m</i>		6''a	72,2

* multiplicidade = s (simpleto); d (duplete); dd (duplete de duplete); m (multiplete).

Essa neolignana glicosídica possui apenas um único relato na literatura e, foi encontrado em polpas do açaí (HU et al., 2014). Seu isolamento ocorreu através de várias técnicas de separação, no qual foram obtidos 11 mg do composto a partir de 1 Kg de polpa do açaí.

Essa substância apresenta moderada cito toxicidade em células de HL-60 (IC₅₀ de 19,0 µg/mL) e significativa atividade antioxidante (IC₅₀ de 0,80 µg/mL) (HU et al., 2014).

10.3.3. Banda cromatográfica T6

Da banda cromatográfica T6 (tr: 13,02 min) foram obtidos 0,5 mg que foram submetidos às análises por RMN uni (^1H) e bidimensionais (COSY, HSQC e HMBC) e, espectrometria de massa (MS) de alta resolução.

As análises por MS no modo negativo de ionização mostraram no espectro de *full scan* o íon molecular desprotonado $[\text{M-H}]^-$ com m/z 447.1003 e com sugestão de fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{O}_{11}$. No experimento de fragmentação em em AutoMS no modo negativo de ionização foram obtidos os fragmentos em m/z 327.0561 (100%), 357.0671 (82,6%), 297.0446 (28,9%) e 285.0400 (20,0%) (Figura 5.23).

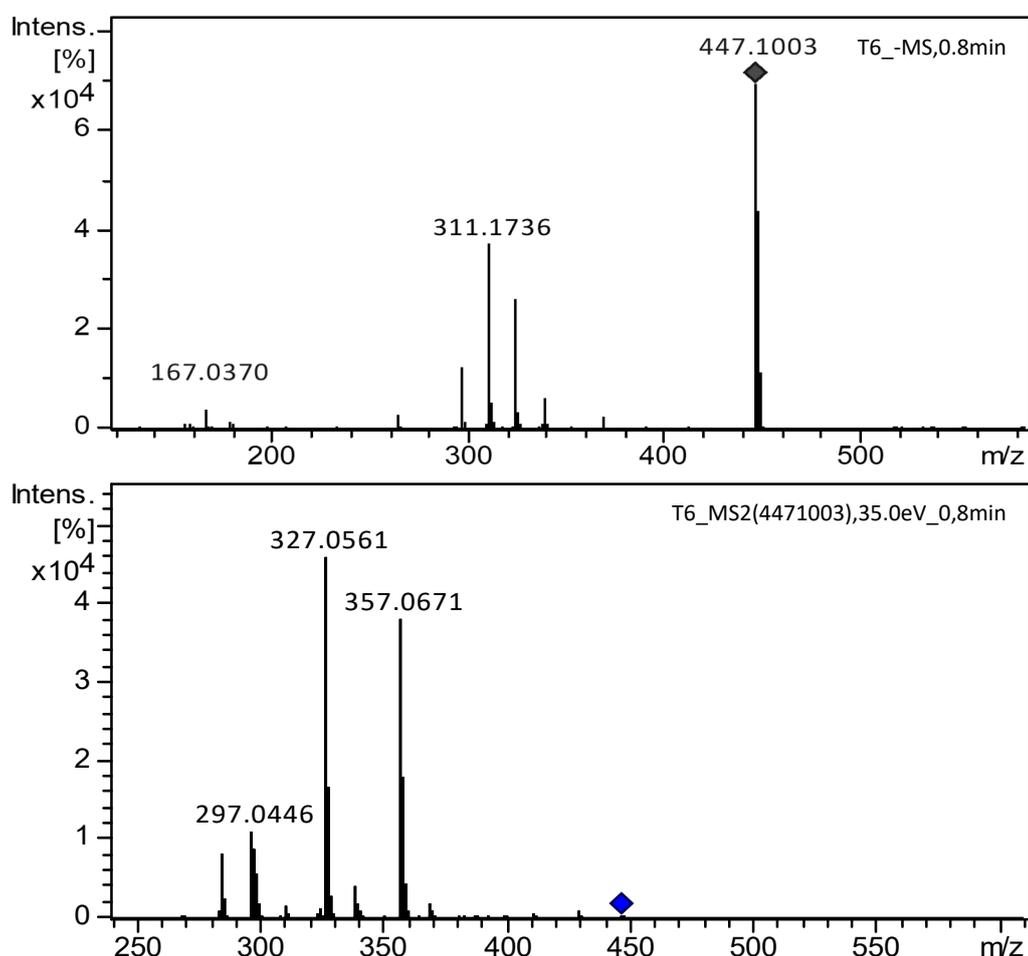


FIGURA 5.23 – Espectros de massa no modo negativo para a banda T6 (acima) e fragmentos do íon molecular m/z 447.1003 (abaixo).

O espectro de RMN de ^1H da banda T6 (Figura 5.24 e 5.25) forneceu sinais de hidrogênios na região de aromáticos e olefínicos e, na região de

carboidratos. Na região aromática, um singleto com deslocamento químico em δ 6,48 (s, H-8) é compatível com o padrão de flavonoides tri substituído do anel A e, um outro singleto em δ 6,54 (H-3) é característico de hidrogênio metínico do anel C de flavonas (SILVA et al., 2009).

Um duplete em δ 6,90 ($J= 8,30$ Hz; H-6), um duplete de duplete em δ 7,39 ($J= 8,30$ e $2,30$ Hz; H-5) e um outro duplete em δ 7,37 ($J= 2,30$ Hz; H-2) indicam três hidrogênios localizados no anel B da estrutura do flavonoide no qual seu deslocamento químico e constantes de acoplamento são característicos do padrão de substituição em 1',3' e 4, possibilitando a suposição das funções oxigenadas na posição 3' e 4' (KANG et al., 2010; SILVA et al., 2009).

Os sinais na região de carboidratos sugerem que uma das substituições no anel B do flavonoide seja uma unidade de glicose devido ao sinal em δ 4,18 (d, H-2", $J= 9,40$ Hz), os sinais entre δ 3,41 a 3,86 e, do hidrogênio anomérico em δ 4,90 (H-1", $J= 9,40$ Hz) verificado através do experimento de HSQC (Figura 5.27). A região do hidrogênio anomérico no espectro de RMN de ^1H foi afetada pela sequência de pulso utilizada (noesypr1D) e, a sua constante de acoplamento ($J= 9,40$ Hz) foi verificada através da análise do espectro de bidimensional COSY (Figura 5.26).

O valor alto da constante de acoplamento e o deslocamento químico do H-1" da glicose (δ 4,90; $J= 9,40$ Hz) em uma região relativamente desblindada indicam de ligação direta no anel B da flavona, sugerindo um flavonoide do tipo C-glicosilado (KANG et al., 2010; KANG et al., 2010). Essa suposição é confirmada com o experimento de HSQC (Figura 5.27) que mostrou a correlação com carbono em 75,5 ppm (ALBUQUERQUE et al., 2014 e PIZZOLATTI et al., 2003).

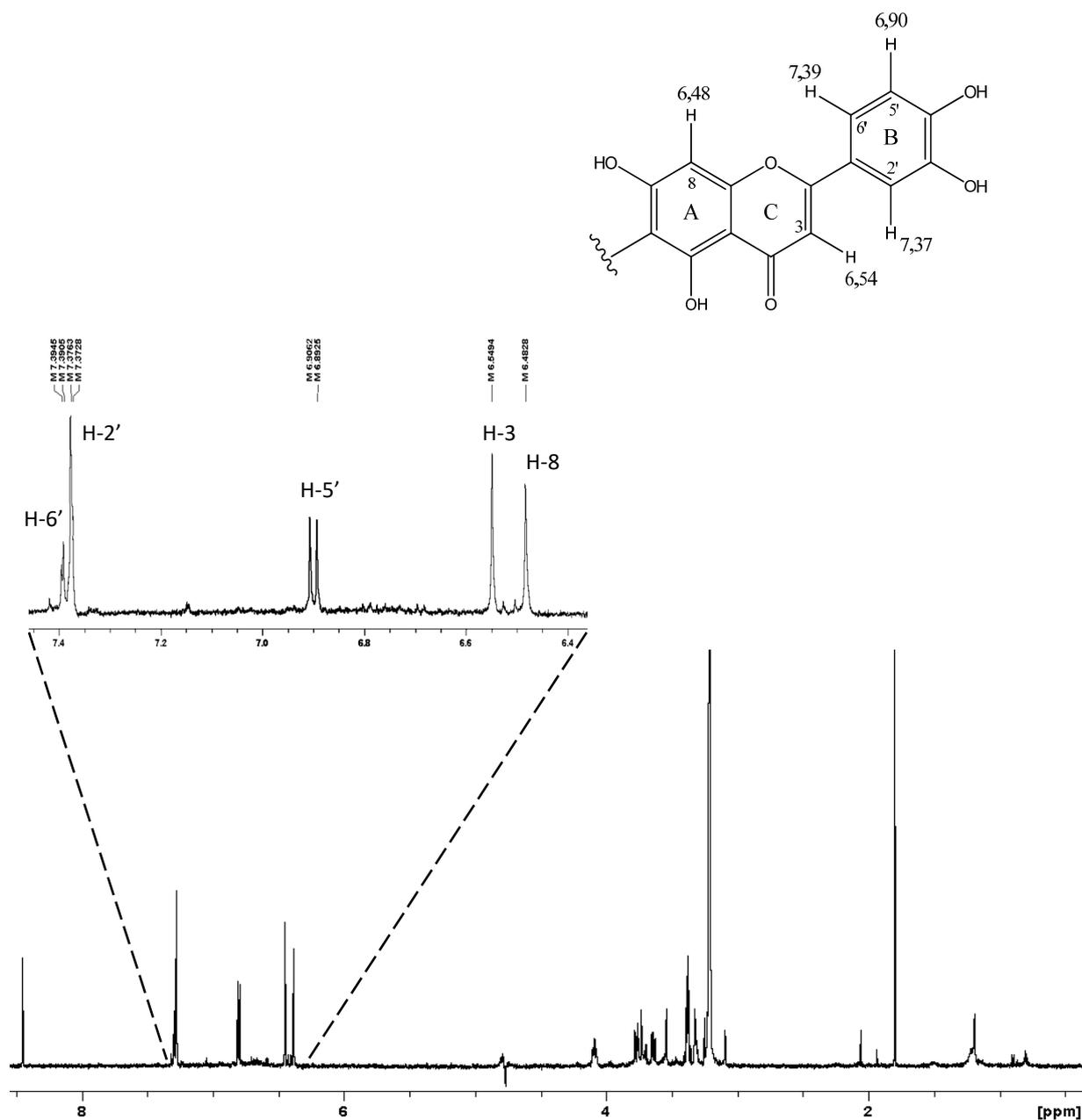


FIGURA 5.24 - Espectro de RMN de ¹H da banda cromatográfica T6 (tr = 13,02 min). Isolamento por LC-SPE com *trapping* por *time-slice*. 30 injeções de 15 µL do extrato metanólico da polpa do açaí. Sequência de pulso *noesypr1D* com 8 varreduras. MeOH-*d*₄ em um 600 MHz com *cryoprobe*.

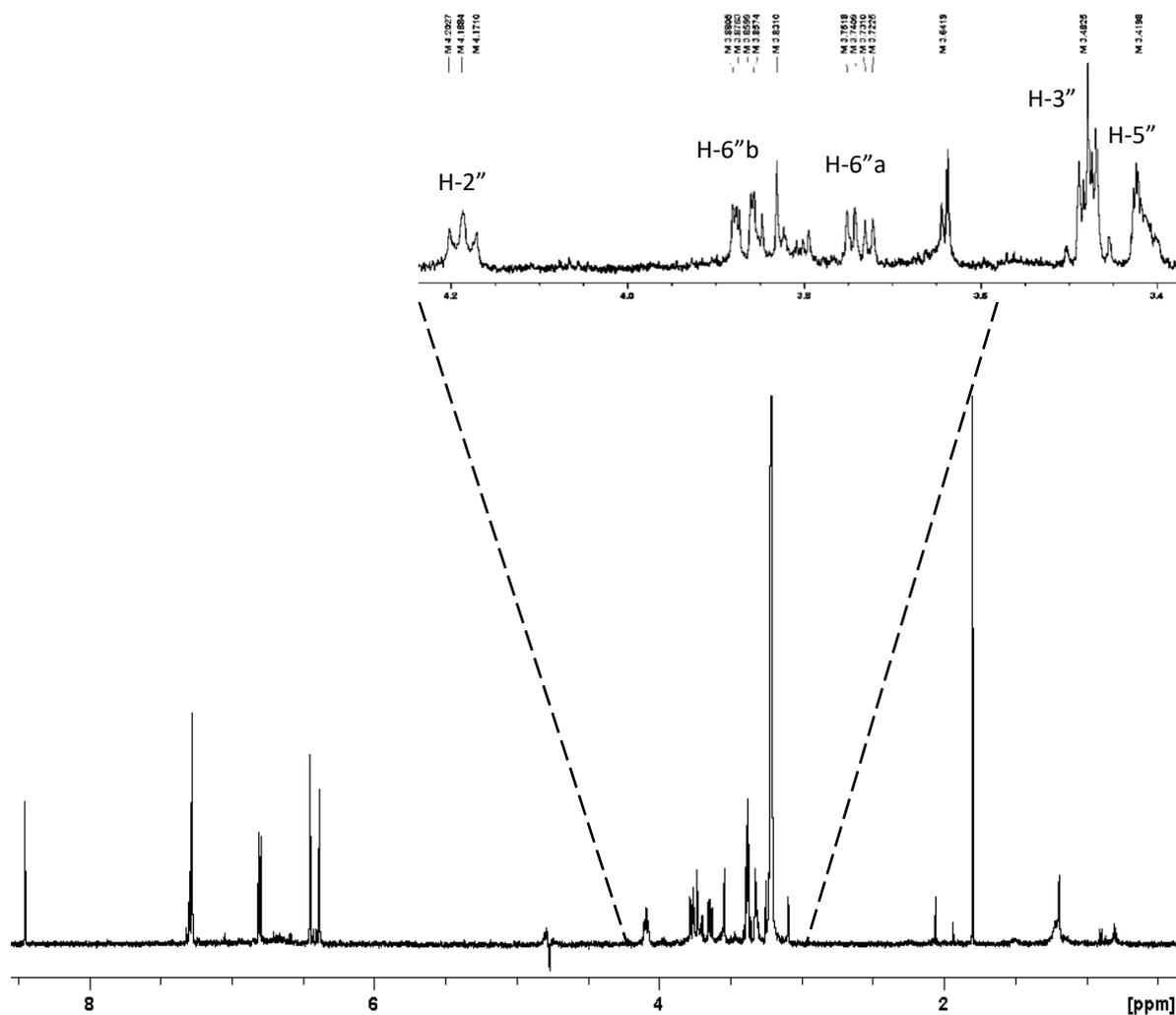
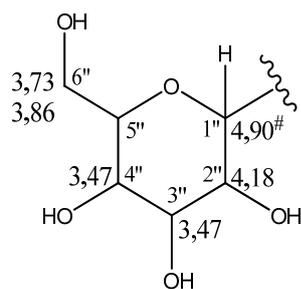


FIGURA 5.25 – Espectro de RMN de ^1H da banda cromatográfica T6 ($t_r = 13,02$ min). Isolamento por LC-SPE com *trapping* por *time-slice*. 30 injeções de $15\ \mu\text{L}$ do extrato metanólico da polpa do açaí. Sequência de pulso *noesypr1D* com 8 varreduras. $\text{MeOH-}d_4$ em um 600 MHz com *cryoprobe*.

Com o mapa de contorno COSY (Figura 5.26) foram verificados correlação entre os hidrogênios vicinais δ 7,39 (H-6) e δ 6,90 (H-5) do anel A do flavonoide e entre os hidrogênios da unidade de glicose (H-2'' a H-6'').

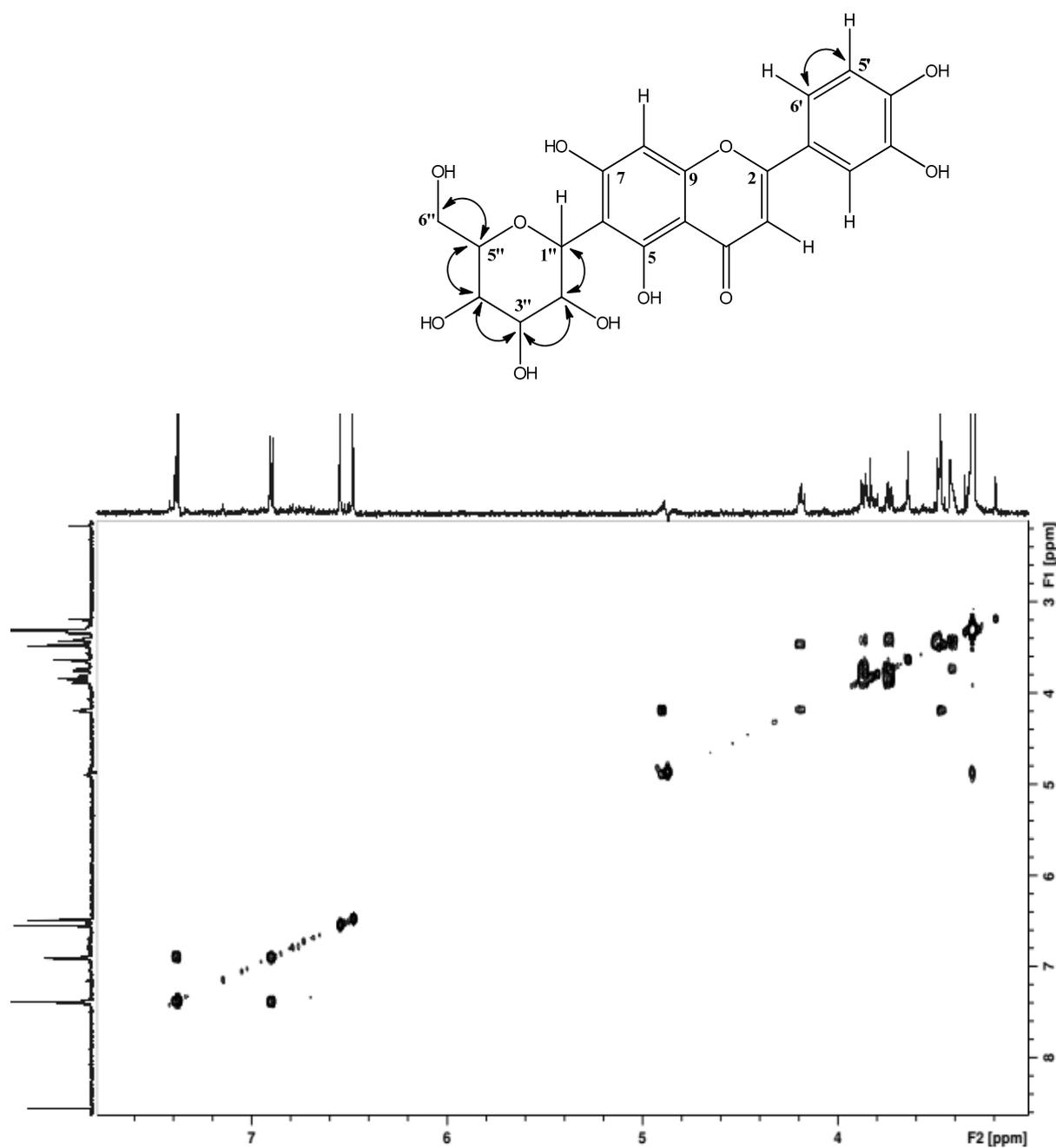


FIGURA 5.26 – Mapa de contorno COSY da banda cromatográfica T6 com as correlações verificadas para a estrutura. Sequência de pulso *cosygpprqf* com 8 varreduras. MeOH-*d*₄ em um 600 MHz com *cryoprobe*.

Nas análises do mapa de contorno HSQC (Figura 5.27) foram verificados o deslocamento químico dos carbonos diretamente ligados aos hidrogênios da estrutura, no qual a correlação do carbono com deslocamento químico em δ 75,5 com o hidrogênio anomérico em δ 4,90 (H-1'') indica que a glicose está ligada diretamente

ao anel aromático. Flavonoides do tipo O-glicosilados possuem deslocamento químico do carbono (C-1'') mais desblindado, na região de 98,0 a 103 ppm (ALBUQUERQUE et al., 2014; PIZZOLATTI et al., 2003).

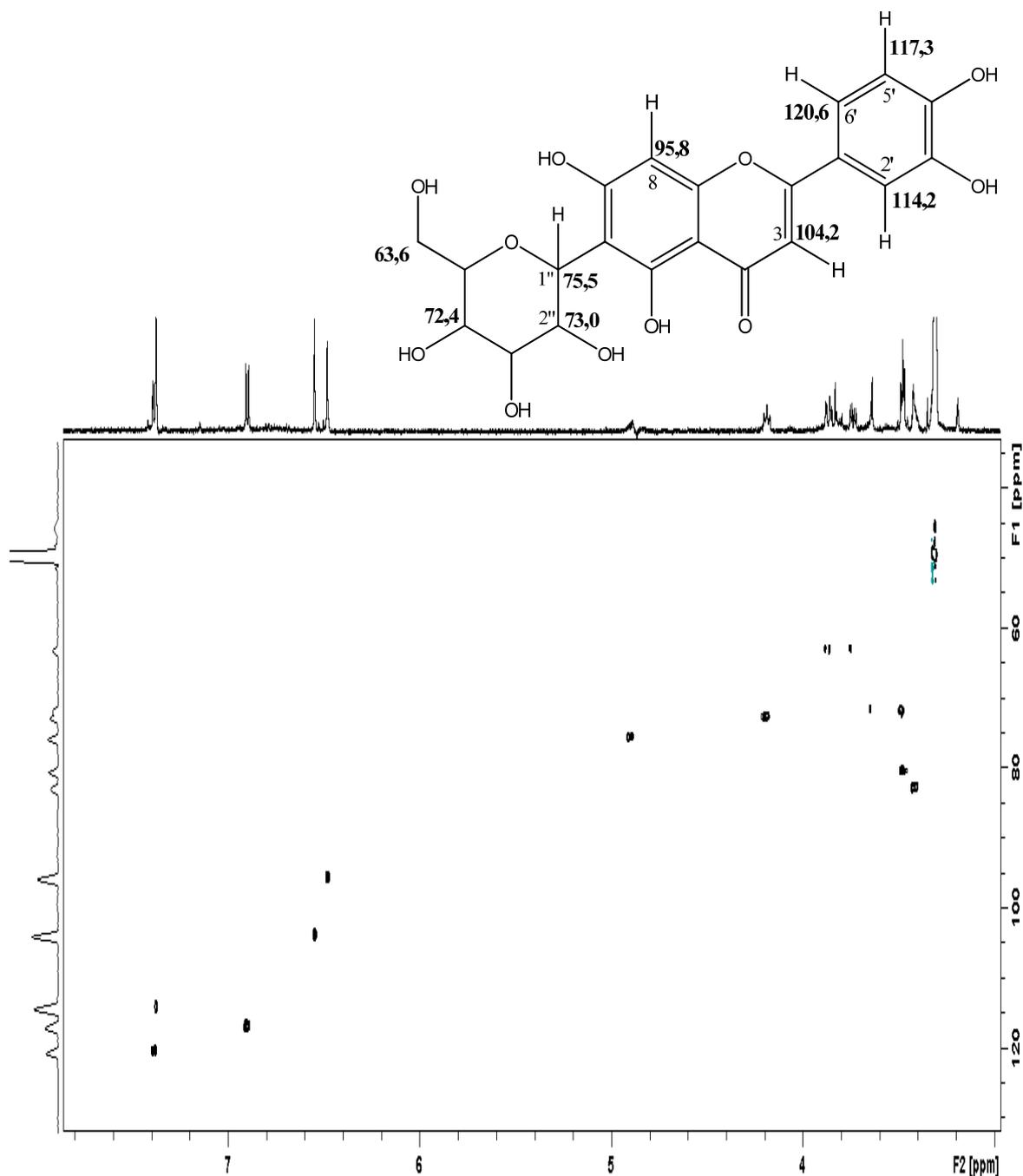


FIGURA 5.27 – Mapa de contorno HSQC da banda cromatográfica T6 com as atribuições verificadas para a estrutura. Sequência de pulso *hsqctgtp* com 16 varreduras. MeOH-*d*₄ em um 600 MHz com *cryoprobe*.

Com o experimento HMBC (Figura 5.28) foi possível verificar as correlações a longa distância (J^{2-3}) entre os átomos de hidrogênio e carbono da estrutura em análise. O hidrogênio H-1'' (δ 4,90) apresentou correlação com os

carbonos em δ 162,3 (C-5), δ 109,2 (C-6) e δ 165,6 (C-7) do anel B da glicona do flavonoide, confirmando sua posição (C-6). O hidrogênio H-3 (δ 6,54) apresentou correlação com o carbono δ 183,0 (C-4) atribuído a uma carbonila, com o carbono em δ 166,5 (C-2) e com δ 123,5 (C-1') confirmando sua correta atribuição no anel C do flavonoide. Assim como como foi possível observar a correlação do hidrogênio δ 6,48 (H-8) com os carbonos em δ 165,6 (C-7), δ 159,1(C-9) e 105,0 (C-10) confirmando esse padrão de substituição no anel A do flavonoide.

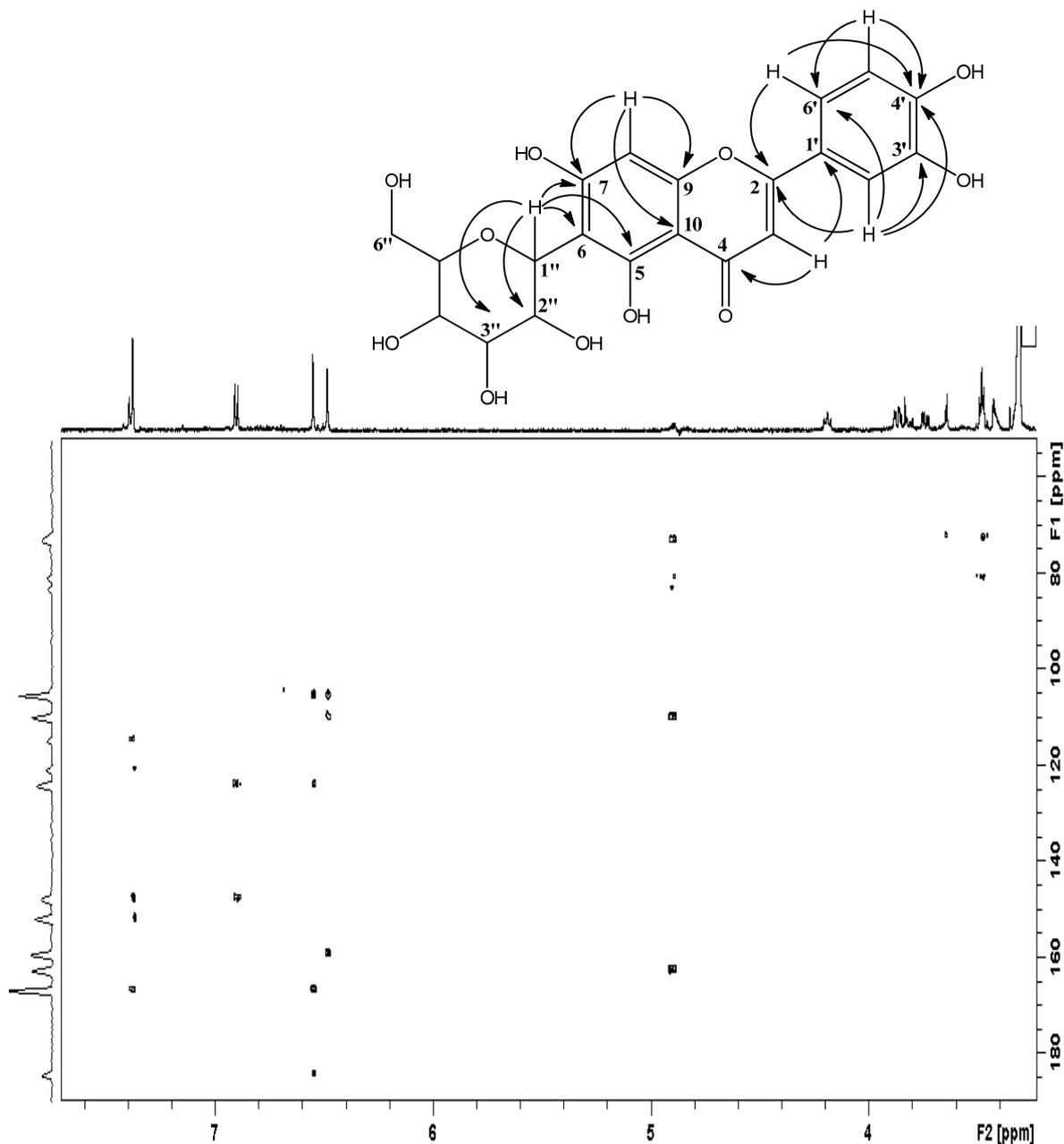


FIGURA 5.28 – Mapa de contorno HMBC da banda cromatográfica T6 com as correlações verificadas para a estrutura. Sequência de pulso *hmbcgp1pndqf* com 128 varreduras. MeOH-*d*₄ em um 600 MHz com *cryoprobe*.

Com base na proposta estrutural verificada por RMN, confirmou-se a estrutura com os dados verificados por MS pois, o padrão de fragmentação verificado no espectro de MS² para a banda T6 é característico de flavona-C-glicosilada. Foram verificados os sinais de íons produtos em m/z 357.0617 [M-H-90]⁻, m/z 327.0560 [M-H-120]⁻ relativos a fragmentação da glicose anexada ao flavonoide, os sinais de m/z 429 [M-H-H₂O] e m/z 285.0400 referente ao luteolin aglicona devido a clivagem da ligação C-glicosídica (PACHECO-PALENCIA et al., 2009; PEREIRA et al., 2005) (Figura 5.29).

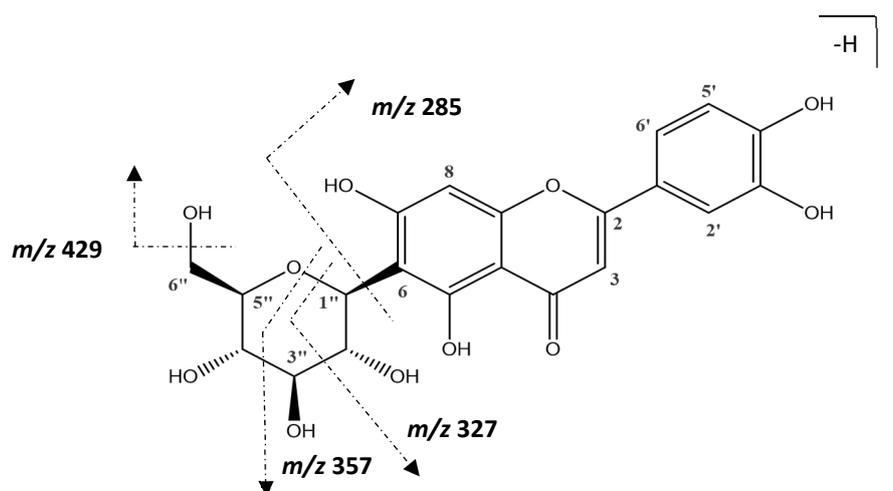


FIGURA 5.29 – Fragmentação para os íons observados da banda T6 por MS2 no modo negativo.

Dessa forma, com base nos dados espectroscópicos verificados por RMN, das informações verificados por MS como íon molecular (m/z 447.0915), do padrão de fragmentação e comparação com dados da literatura (KANG et al., 2010; SCHAUSS et al., 2006a; PACHECO-PALENCIA et al., 2009), sugere-se que o composto majoritário presente na banda cromatográfica T6 seja a homoorientina (Figura 5.30 e Tabela 5.11).

Esse composto é descrito nas polpas do açaí (SCHAUSS et al., 2006a; KANG et al., 2010; GALLORI et al., 2004; PACHECO-PALENCIA, 2009) e foi identificado por meio da técnicas de HPLC-DAD e HPLC-MS com o uso de padrões comerciais (SCHAUSS et al., 2006a) e, isolado uma única vez através de fitoquímica clássica, onde foram obtidos 11 mg do composto a partir de 1,80 Kg de polpa do açaí (KANG et al., 2010). Pacheco-Palencia e colaboradores encontraram 34,8 mg/kg de

homoorientina em um kilo (1 Kg) de polpa em um estudo de quantificação por LC-MS (PACHECO-PALENCIA, 2009).

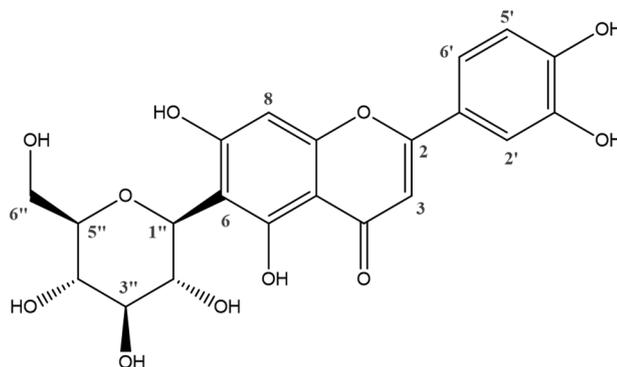


FIGURA 5.30 – Fórmula estrutural da homoorientina (luteolin-6-C-glucosídeo) identificada na banda T6.

TABELA 5.10– Dados de RMN para o composto majoritário da banda cromatográfica T6 (0,5 mg em 130 μ L de MeOH- d_4 em um 600 MHz com *cryoprobe* a 298 K).

Posição	δ $^1\text{H}^*$ (J in Hz)	δ ^{13}C	COSY	HMBC
2	-	166,5	-	-
3	6,54 s	104,2	-	183,0; 166,5; 123,5
4	-	183,0	-	-
5	-	162,3	-	-
6	-	109,2	-	-
7	-	165,6	-	-
8	6,48 s	95,8	-	105,0; 159,1; 165,6
9	-	159,1	-	-
10	-	105,0	-	-
1'	-	123,5	-	-
2'	7.37 [^] (2,30)	114,2	5'	120,6; 151,7; 166,5
3'	-	151,7	-	-
4'	-	147,3	-	-
5'	6.90 d (8,30)	117,3	2'	120,6; 147,3
6'	7.39* dd (8,30; 2,30)	120,6	-	114,2; 166,5; 147,3
1''	4,90 [#] (9,40)	75,5	2''	73,7; 80,8; 83,2 ;109,2 162,3; 165,6
2''	4,18 t (9,40)	73,0	1''; 3''	-
3''	3,46-3,48 m	80,8	2''	72,4;
4''	3,46-3,48 m	72,4	-	63,6; 80,8
5''	3,41 -3,42 m	83,2	6''	-
6''	3,73 dd (12,20; 4,5) (Ha)	63,6	5''	80,8
	3,86 dd (12,20; 4,5) (Hb)			72,4;

* multiplicidade = s (simpleto); d (duplete); t (tripleto); dd (duplete de duplete); m (multiplete);
[^] sinal com sobreposição; [#] sinal afetado pela saturação do HDO do solvente (δ ^1H por HSQC e J por COSY).

CONCLUSÕES

O uso da técnica de RMN de ^1H aliada a quimiometria foi muito viável no estudo das polpas do açaí pois verificou-se tendências em relação ao tipo de cultivo, a sazonalidade, ao melhoramento genético realizado pela Embrapa Amazônia Oriental, o modo de armazenamento da polpa congelada pelos comerciantes de Belém (PA) e a identificação de possíveis marcadores da degradação da polpa do açaí.

As amostras com controle agrônômico possuem maior concentração de aminoácidos, carboidratos, triacilgliceróis com cadeia insaturada e compostos aromáticos e, os sem controle possuem maior teor de triacilgliceróis saturados. Na safra do açaí ocorre maior produção de ácidos graxos insaturados, frutose e glicose que na entressafra. E nesta, verificou-se que as polpas do açaí sofrem processos de degradação por fermentação oxidativa, fermentação acética e alteração na concentração da colina e glicerofosforilcolina.

Por meio de análises físico-químicas, centesimais e composição fenólica foi verificada a grande variabilidade nas características químicas das polpas do açaí, no qual pode estar relacionada ao fator genético da espécie, condições edafoclimáticas, de cultivo, processamento dos frutos, entre outros. Alguns genótipos podem ser considerados promissores pois apresentaram maior teor de aminoácidos, carboidratos, ácidos graxos insaturados e compostos aromáticos verificados nas análises por RMN de ^1H e, no teor de fibras, lipídios, antocianinas e fenólicos através das análises físico-químicas.

A extração acelerada por solvente é uma técnica muito eficiente para a realização de *clean-up* e obtenção de extratos em matrizes complexas quando comparada com métodos convencionais e, a técnica LC-DAD-SPE/NMR se mostrou muito eficiente e interessante para a obtenção de compostos em baixa concentração. Os compostos identificados foram: homoorientina, ácido protocatecuico e uma neolignana.

Esse trabalho mostrou que a técnica de RMN é uma ferramenta robusta, extremamente útil, que apresenta boa repetibilidade e grande potencial para a obtenção de informações químicas das polpas do açaí liofilizado. E os resultados observados contribuem no desenvolvimento do controle de qualidade do açaí e com o avanço das pesquisas do Programa de Melhoramento Genético da Açaizeiro desenvolvido pela Embrapa Amazônia Oriental.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, C. H. DE; TAVARES, J. F.; OLIVEIRA, S. L. DE; SILVA, T. S.; GONÇALVES, G. F.; COSTA, V. C. DE O.; AGRA, M. DE F.; PESSOA, H. DE L. F.; SILVA, M. S. "Flavonoides glicosilados de *Erythroxyllum pulchrum* A. St.-Hill (Erythroxyllaceae)". *Quim. Nov.*, **37** (4): 663, 2014.
- ALCANTARA, G. B.; HONDA, N. K.; FERREIRA, M. M. C. & FERREIRA, A. G. "Chemometric analysis applied in ¹H HR-MAS NMR and FT-IR data for chemotaxonomic distinction of intact lichen samples". *Anal. Chim. Acta.*, **595**: 3, 2007.
- ALEXANDRE, D.; CUNHA, R. L. & HUBINGER, M. D. "Conservação do açaí pela tecnologia de obstáculos". *Cienc. Tecnol. Aliment.*, **24** (1): 114, 2004.
- ALEXANDRE SILVA, L. M. *Preparo de amostras para análises por ressonância magnética nuclear*. 1o ed. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2016.
- ALISSA, E. M. & FERNS, G. A. "Functional Foods and Nutraceuticals in the Primary Prevention of Cardiovascular Diseases". *J. Nutr. Metab.*, **2012**: 1, 2012.
- ALONSO-SALCES, R. M.; HÉBERGER, K.; HOLLAND, M. V.; MORENO-ROJAS, J. M. & MARIANI, C. "Multivariate analysis of NMR fingerprint of the unsaponifiable fraction of virgin olive oils for authentication purposes". *Food Chem.*, **118** (4): 956, 2010.
- ALVES FILHO, E. G.; ALMEIDA, F. D. L.; CAVALCANTE, R. S.; DE BRITO, E. S.; CULLEN, P. J.; FRIAS, J. M.; BOURKE, P.; FERNANDES, F. A. N. & RODRIGUES, S. "¹H NMR spectroscopy and chemometrics evaluation of non-thermal processing of orange juice". *Food Chem.*, **204**: 102, 2016.
- ANDRADE, K. P.; ALENCAR, L. & BRAGANÇA, R. DO N. P. "Importância do preparo da amostra para o sucesso da análise de alimentos". *Hig. Aliment.*, **22** (160): 38, 2008.
- AOAC. *Official methods of analysis of AOAC International*. 16o ed. Gaitheersburg: AOAC, 1997.
- BARISON, A. *Emprego da RMN HR-MAS e Análises Quimiométricas no Reconhecimento e Avaliação de Soja (Glycine max) Geneticamente Modificada*, 2005. Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar. 285 p.
- BARISON, A.; SILVA, C. W. P.; CAMPOS, F. R.; SIMONELLI, F.; LENZ, A. & FERREIRA, A. G. "A simple methodology for the determination of fatty acid composition in edible oils through ¹H NMR spectroscopy". *Magn. Reson. Chem.*, **48**: 642, 2010.
- DE BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S. & BRUNS, R. E. "25 anos de quimiometria no Brasil". *Quim. Nov.*, **29** (6): 1401, 2006.
- BAYER, E. & KELLER, T. "On-line coupling of high-performance liquid chromatography and nuclear magnetic resonance". *J. Chromatogr.*, **186**: 497, 1979.
- BEEBE, K. R.; PELL, R. J. & SEASHOLTZ, M. B. *Chemometrics: A practical guide*. New York: John Wiley e Sons, 1998.
- BELÉM, A. "Selo garante qualidade do açaí vendido em Belém e é motivo de comemoração". Disponível em: <<http://agenciabelem.com.br/Noticia/152263/selo-garante-qualidade-do-acai-vendido-em-belem-e-e-motivo-de-comemoracao>>. Acesso em: 24/3/2018.
- BEN-YOSEPH, O.; BADAR-GOFFER, R. S.; MORRIS, P. G. & BACHELARD, H. S. "Glycerol 3-phosphate and lactate as indicators of the cerebral cytoplasmic redox state in severe and mild hypoxia respectively: a ¹³C- and ³¹P-NMR study". *Biochem.*, **291**: 915, 1993.
- BENTHIN, B.; DANZ, H. & HAMBURGER, M. "Pressurized liquid extraction of medicinal plants". *J. Chromatogr.*, **837**: 211, 1999.
- BERNAUD, F. S. R.; RODRIGUES, T. C. "Fibra alimentar – Ingestão adequada e efeitos sobre a saúde do metabolismo". *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, **57** (6): 397, 2013.
- BERTOCCHI, F. & PACI, M. "Applications of high-resolution solid-state NMR spectroscopy in food science". *J. Agric. Food Chem.*, **56**: 9317, 2008.
- BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R. E.; OLIVEIRA, E. P.; VILLAR, L. S. & ESCALEIRA, L. A. "Talanta Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry". *Talanta*, **76**: 965, 2008.
- BIEBL, H.; MENZEL, K.; ZENG, A. & DECKWER, W. "Microbial production of 1, 3-propanediol". *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **52**: 289, 1999.

BOBBIO, F. O.; DRUZIAN, J. I.; ABRÃO, P. A.; BOBBIO, P. A. & FADELLI, S. "Identificação e quantificação das antocianinas do fruto do açaizeiro (*Euterpe oleracea*) Mart.". *Food Sci. Technol.*,20 (3): 388, 2000.

BOFFO, E. F. & FERREIRA, A. G. "Natural isotopic fractionation studied by nuclear magnetic resonance (SNIF-NMR)". *Quim. Nov.*,29 (3): 456, 2006.

BOFFO, E. F.; TAVARES, L. A.; FERREIRA, M. M. C. & FERREIRA, A. G. "Classification of Brazilian vinegars according to their ¹H NMR spectra by pattern recognition analysis". *LWT - Food Sci. Technol.*,42 (9): 1455, 2009.

BOFFO, E. F.; TAVARES, L. A.; TOBIAS, A. C. T.; FERREIRA, M. M. C.; FERREIRA, A. G. "Identification of components of Brazilian honey by ¹H NMR and classification of its botanical origin by chemometric methods". *LWT - Food Sci. Technol.*,49 (1): 55, 2012.

BRASIL. "MAPA discute plano de apoio à cadeia produtiva do açaí do Pará". Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/noticias/mapa-discute-plano-de-apoio-a-cadeia-produtiva-do-acai-do-para>>. Acesso em: 13/3/2018.

BRASIL DOU. Art. 9 - Decreto 326: Condições higiênico-sanitárias e boas práticas de processamento do açaí. Governo do Estado do Pará: Diário Oficial Belém 20-janeiro-2012, 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 1, de 7 de janeiro de 2000. Aprova o Regulamento Técnico Geral para fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para polpa de fruta. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2000. Seção 1, p. 54.

BRERETON, R. G. *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*. England: John Wiley e Sons, 2003.

CALIGIANI, A.; ACQUOTTI, D.; PALLA, G. & BOCCHI, V. "Identification and quantification of the main organic components of vinegars by high resolution ¹H NMR spectroscopy". *Anal. Chim. Acta.*, **585**: 110, 2007.

CARDOSO, J. O.; THOMASI, S. S.; VENÂNCIO, T.; PITTA, I. R.; LIMA, M. DO C. A. DE; OLIVEIRA, R. V. "Preparative separation and structural identification of impurities of an New α -adrenoceptor agonist using stacking injection, LC-MS and LC-SPE-NMR". *J. Braz. Chem Soc.*,28 (6): 1038, 2017.

CARDOZA, L. A.; ALMEIDA, V. K.; CARR, A.; LARIVE, C. K. & GRAHAM, D. W. "Separations coupled with NMR detection". *Trends Anal. Chem.*,22 (10): 766, 2003.

CARPINELLI, G.; PODO, F.; VITO, M. DI; PROIETTI, E. & GESSANI, S. "Modulations of glycerophosphorylcholine and phosphorylcholine in Friend erythroleukemia cells upon in vitro induced erythroid differentiation : a ³¹P NMR study". *FEBS Lett.*,176 (1): 88, 1984.

CARVALHO, A. V.; MATTIETTO, R. A. & SILVA, P. A. "Otimização dos parâmetros tecnológicos para produção de estruturado a partir de polpa de açaí Optimization of the technological parameters to". *Brazilian J. Food Technol.*,13 (4): 232, 2010.

CARVALHO, A. V.; DA SILVEIRA, T. F. F.; MATTIETTO, R. DE A.; DE OLIVEIRA, M. DO S. P. & GODOY, H. T. "Chemical composition and antioxidant capacity of açaí (*Euterpe oleracea*) genotypes and commercial pulps". *J. Sci. Food Agric.*,97 (5): 1467, 2017.

CARVALHO, A. V.; SILVEIRA, T. F. F.; MATTIETTO, R. DE A. & OLIVEIRA, M. DO S. P. DE. "Chemical composition and antioxidant capacity of açaí (*Euterpe oleracea*) genotypes and commercial pulps". *J. Sci food Agric*, **1**: 1, 2016.

CASS, Q. B. & DEGANI, A. L. G. *Desenvolvimento de métodos por HPLC: Fundamentos, Estratégias e Validação* . Série Apontamentos. São Carlos: EdUFSCar, 2001

CASS, Q. B.; CASSIANO, N. *Cromatografia Líquida : Novas tendências e aplicações*. 1 ed. Rio de Janeiro: Elsevier Campus, 2015.

CAYRES, C. A.; PEEIRA, K. S. & PENTEADO, A. L. "Qualidade microbiológica de açaí industrializado". *Higiene*,31 (268/269): 134, 2017.

CHAUTON, M. S.; GALLOWAY, T. F.; KJORSVIK, E.; STORSETH, T. R.; PUVANENDRAN, V.; MEEREN, T. VAN DER; KARLSEN, O.; RONNESTAD, I. & HAMRE, K. "¹H NMR metabolic profiling of cod (*Gadus morhua*) larvae : potential effects of temperature and diet composition during early developmental stages". *Biol. Open*,4 (1): 1671, 2015.

- CHIN, Y.-W.; CHAI, H.-B.; KELLER, W. J. & KINGHORN, A. D. "Lignans and Other Constituents of the Fruits of *Euterpe oleracea* (Acai) with Antioxidant and Cytoprotective Activities". *J. Agric. Food Chem.*, **56**: 7759, 2008.
- CLARIDGE, T. D. W. *High resolution NMR techniques in organic chemistry*. Oxford: Tetrahedron Organic Chemistry Series, 1999.
- COLNAGO, L. A.; AZEREDO, R. B. V.; NETTO, A. M. & ANDRADE, F. D. "Rapid analyses of oil and fat content in agri-food products using continuous wave free precession time domain NMR". *Magn. Reson. Chem.*, **49**: 113, 2011.
- COLOMBO, R.; FERREIRA, T. C. R.; ALVES, S. A.; CARNEIRO, R. L. & LANZA, M. R. V. "Application of the response surface and desirability design to the Lambda-cyhalothrin degradation using photo-Fenton reaction". *J. Environ. Manage.*, **118**: 32, 2013.
- COLZATO, M.; FORATO, L. A.; COLNAGO, L. A. & ASSIS, O. B. G. *Análise comparativa dos espectros de 1H RMN de óleos comestíveis oxidados*. São Carlos: Comunicado Técnico 92 - EMBRAPA INSTRUMENTAÇÃO, 2008.
- CONSTANTINO, M. G. *Química Orgânica: curso básico universitário*. Rio de Janeiro: LTC, 2008.
- COSTA, C. A. DA; OLIVEIRA, P. R. B. DE; BEM, G. F. DE; PIRES, K. M. P.; SOUSA, JOSÉ, P.; RESENDE, A. C.; MOURA, R. S. DE & VALENÇA, S. DOS S. "Euterpe oleracea Mart. -derived polyphenols prevent endothelial dysfunction and vascular structural changes in renovascular hypertensive rats: role of oxidative stress". *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.*, **385**: 1199, 2012.
- DARNET, S.; SERRA, J. L.; MANOEL, A. & MELLER, L. H. "A high-performance liquid chromatography method to measure tocopherols in assai pulp (*Euterpe oleracea*)". *Food Res. Int.*, **44** (7): 2107, 2011.
- DEFERNEZ, M. & COLQUHOUN, I. J. "Factors affecting the robustness of metabolite fingerprinting using 1 H NMR spectra". *Phytochemistry*, **62**: 1009, 2003.
- DEL POZO-INSFRAN, D.; BRENES, C. H. & TALCOTT, S. T. "Phytochemical Composition and Pigment Stability of Acai (*Euterpe oleracea* Mart.)". *J. Agric. Food Chem.*, **52** (6): 1539, 2004.
- DEL POZO-INSFRAN, D.; PERCIVAL, S. S. & TALCOTT, S. "Acai (*Euterpe oleracea* Mart.) Polyphenolics in Their Glycoside and Aglycone Forms Induce Apoptosis of HL-60". *J. Agric. Food Chem.*, **54**: 1222, 2006.
- DENNIS, E. A. & PLUCKTHUN, A. "Phosphorus-31 NMR of Phospholipids. in Micelles". In *Phosphorus-31 NMR, Principles and Application*. Ed: Academic Press Ins., 1984. p.423–447.
- DEWICK, P. C. *Medicinal Natural Products*. 2o ed. New York: John Wiley e Sons, 2001. 515 p.
- DE ROSSO, V.; HILLEBRAND, S.; CUEVAS MONTILLA, E.; BOBBIO, F. O.; WINTERHALTER, P. & MERCADANTE, A. Z. "Determination of anthocyanins from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) and açai (*Euterpe oleracea* Mart.) by HPLC-PDA-MS/MS". *J. Food Compos. Anal.*, **21** (4): 291, 2008.
- DIONEX. "Acceleration solvente extraction". Disponível em: <www.thermofisher.com/order/catalog/product/083114>.
- ELIPE, M. V. S. "Advantages and Disadvantages of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy as Hyphenated Technique spectroscopy as a hyphenated technique". *Anal. Cham.*, **497**: 1, 2003.
- ERCOLINI, D.; FERROCINO, I.; NASI, A.; NDAGIJIMANA, M.; VERNOCCHI, P.; STORIA, A. LA; LAGHI, L.; MAURIELLO, G.; GUERZONI, M. E.; VILLANI, F.; II, F. & UNIVERSITA, V. "Monitoring of Microbial Metabolites and Bacterial Diversity in Beef Stored under Different Packaging Conditions". *Appl. Environ. Microbiol.*, **77** (20): 7372, 2011.
- EXARCHOU, V.; GODEJOHANN, M.; BEEK, T. A. VAN; GEROTHANASSIS, I. P. & VERVOORT, J. "LC-UV-Solid-Phase Extraction-NMR-MS combined with a cryogenic flow probe and its application to the identification of compounds present in greek oregano on a combination of NMR spectroscopy with mass spec- sample amount required". *Anal. Cham.*, **75** (22): 6288, 2003.
- EXARCHOU, V.; KRUCKER, M.; BEEK, T. A. VAN; VERVOORT, J.; GEROTHANASSIS, I. P. & ALBERT, K. "LC – NMR coupling technology: recent advancements and applications in natural products analysis". *Magn. Reson. Chem.*, **43**: 681, 2005.

FAVACHO, H. A. S.; OLIVEIRA, B. R.; SANTOS, K. C.; MEDEIROS, B. J. L.; SOUSA, P. J. C.; FABIO, F. & CARVALHO, J. C. T. "Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Euterpe oleracea* oil". *Ver. Bras. Farmacogn.*, 21 (1): 105, 2011.

FERREIRA, C. K. B. Oxidação lipídica em alimentos e sistemas biológicos: mecanismos gerais e implicações nutricionais e patológicas. *Ver. Nutr.*, 11 (1): 3, 1998.

FIGUEROA, J. G.; SEGURA-CARRETERO, A.; BORRAS-LINARES, I.; LOZAN-SANCHEZ, J. & QUIRANTES-PINÉ, R. "Optimization of drying process and pressurized liquid extraction for Avocado peel by-product". *Electrophoresis.*, 1: 1, 2018.

FILHO, E. G. A.; SARTORI, L.; SILVA, L. M. A.; VENÂNCIO, T.; CARNEIRO, R. L. & FERREIRA, A. G. "1H qNMR and chemometric analyses of urban wastewater". *J. Braz. Chem. Soc.*, 26 (6): 1257, 2015.

FMS. "Products pressurized liquid extraction". Disponível em: <<http://www.fms-inc.com/Products/PressurizedLiquidExtraction.aspx>>.

FRAGOSO, M. F.; PRADO, M. G.; BARBOSA, L.; ROCHA, N. S. & BARBISAN, L. F. "Inhibition of mouse urinary bladder carcinogenesis by açai fruit (*Euterpe oleracea* Martius) intake". *Plant Foods Hum Nutr.*, 67 (3): 235, 2012.

FREITAS, D. DOS S.; NUNES, W. DA S.; APPARECIDO, R. DO P.; LOPES, T. I. B. & ALCANTARA, G. B. "NMR-based approach reveals seasonal metabolic changes in Mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.)". *Magn. Reson. Chem.*, 56 (5): 311, 2018.

G1 PA. "Belém fecha pontos de venda de açai por risco da Doença de Chagas". Disponível em: <<http://g1.globo.com/brasil/noticia/2011/10/belem-fecha-pontos-de-venda-de-acai-por-risco-da-doenca-de-chagas.html>>. Acesso em: 23/4/2018.

G1 PA. "Fiscalização encontra papel higienico misturado com açai em Belém". Disponível em: <<http://g1.globo.com/pa/para/noticia/2014/06/fiscalizacao-encontra-papel-higienico-misturado-com-acai-em-belem.html>>. Acesso em: 23/4/2018a.

G1 PA. "A maioria dos pontos de venda de açai de Belém são irregulares". Disponível em: <<http://g1.globo.com/pa/para/noticia/2014/06/maioria-dos-pontos-de-venda-de-acai-de-belem-sao-irregulares-diz-devisa.html>>. Acesso em: 23/4/2018b.

G1 PA. "Belém conta com 54 pontos de venda com o selo "Açai Bom"". Disponível em: <<http://g1.globo.com/pa/para/noticia/2015/07/belem-counta-com-54-pontos-de-venda-o-selo-acai-bom-confira-o-mapa.html>>. Acesso em: 24/3/2018.

G1 PA. "Ponto de venda de açai é flagrado com selo "Acai Bom' falso em Belém.". Disponível em: <<http://g1.globo.com/pa/para/noticia/2016/06/ponto-de-venda-de-acai-e-flagrado-com-selo-acai-bom-falso-em-belem.html>>. Acesso em: 23/4/2018.

LE GALL, G.; DUPOINT, M. S.; MELLON, F. A.; DAVIS, A. L.; COLLINS, G. J.; VERHOEYEN, M. E. & COLQUHOUN, I. J. "Characterization and content of flavonoid glycosides in genetically modified tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits". *J. Agric. Food Chem.*, 51: 2438, 2003.

GALLORI, S.; BILIA, A. R.; BERGONZI, M. C.; BARBOSA, W. L. R. & VINCIERI, F. F. "Polyphenolic constituents of fruit Pulp of *Euterpe oleracea* Mart. (açai palm)". *Chromatographia*, 59 (11–12): 739, 2004.

GEORGÉ, A.; BRAT, P.; ALTER, P.; AMIOT, M. J. "Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products". *J. Agri. Food Chem.*, 53: 1370, 2005.

GIL, A. M.; DUARTE, I. F.; GODEJOHANN, M.; BRAUMANN, U.; MARASCHIN, M. & SPRAUL, M. "Characterization of the aromatic composition of some liquid foods by nuclear magnetic resonance spectrometry and liquid chromatography with nuclear magnetic resonance and mass spectrometric detection". *Anal. Chim. Acta.*, 488: 35, 2003.

GIL, V. M. S. & GERALDES, C. F. G. C. Ressonância Magnética Nuclear: Fundamentos, métodos e aplicações. 2o ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2002.

GIUSTI, M.M.; WROLSTAD, R.E. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. New York: John Wiley & Sons, 2001. Unit. F1.2.1-13.

- GODEJOHANN, M.; PREISS, A.; HANNOVER, D.-; CHEMIE, A. & CHEMIE, L. A. "Application of on-Line HPLC - ¹H NMR to environmental samples: analysis of groundwater near former ammunition plants". *Anal. Chem.*,69 (18): 3832, 1997.
- GORDON, A.; CRUZ, A. P. G.; CABRAL, L. M. C.; DE FREITAS, S. C.; TAXI, C. M. A. D.; DONANGELO, C. M.; DE ANDRADE MATTIETTO, R.; FRIEDRICH, M.; DA MATTA, V. M. & MARX, F. "Chemical characterization and evaluation of antioxidant properties of Açai fruits (*Euterpe oleracea* Mart.) during ripening". *Food Chem.*,133 (2): 256, 2012.
- GOTTLIEB, H. E.; KOTLYAR, V. & NUDELMAN, A. "NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities". *J. Org. Chem.*,62 (21): 7512, 1997.
- HAN, S. H.; LEE, S. J.; MOON, J. H. & PARK, K. H. "GacS-dependent production of 2R , 3R-butenediol by *Pseudomonas chlororaphis* O6 is a major determinant for eliciting systemic resistance against *erwinia carotovora* but not against *Pseudomonas syringae* pv . *tabaci* in Tobacco". *Mol. Plant-Microbe Interact.*,19 (8): 924, 2006.
- HARRIS, R. K. "Applications of solid-state NMR to pharmaceutical polymorphism and related matters". *J. Pharm. Pharmacol.*,**59**: 225, 2007.
- HASHI, K.; OHKI, S.; MATSUMOTO, S.; DEGUCHI, K.; YAMADA, K.; NOGUCHI, T.; SAKAI, S.; YANAGISAWA, Y.; IGUCHI, S.; YAMAZAKI, T.; TANAKA, R.; NEMOTO, T.; SUEMATSU, H.; MIKI, T.; SAITO, K & SHIMIZU, T. "Achievement of 1020 MHz NMR". *J. Magn. Reson.*,**256**: 30, 2015.
- HILLER, W.; SINHA, P.; HEHN, M. & PASCH, H. "Online LC-NMR from an expensive toy to a powerful tool in polymer analysis". *Prog. Polym. Sci.*, 39 (5): 979, 2013.
- HOFFMANN, A. & NACHTIGALL, G. R. "Fatores edafoclimáticos". *Frutas do Bras.* p.25–31, 2003.
- HOGAN, S.; CHUNG, H.; ZHANG, L.; LI, J.; LEE, Y.; DAI, Y. & ZHOU, K. "Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from açai". *Food Chem.*,118 (2): 208, 2010.
- HOLZGRABE, U.; DEUBNER, R.; SCHOLLMAYER, C. & WAIBEL, B. "Quantitative NMR spectroscopy — Applications in drug analysis". *J. Pharm. Biomed. Anal.*,**38**: 806, 2005.
- HOOGENBOOM, G. "Contribution of agrometeorology to the simulation of crop production and its applications". *Agric. For. Meteorol.*,**103**: 137, 2000.
- IBGE. "Produção da Extração vegetal e da Silvicultura". Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/pevs/quadros/brasil/2016>>. Acesso em: 23/4/2018.
- JOHNSTON, C. "Functional foods as modifiers of cardiovascular disease". *Am. J. Lifestyle Med.*,**3**: 39, 2010.
- KANG, J.; LI, Z.; WU, T.; JENSEN, G. S.; SCHAUSS, A. G. & WU, X. "Anti-oxidant capacities of flavonoid compounds isolated from acai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.)". *Food Chem.*,122 (3): 610, 2010.
- KANG, J.; THAKALI, K. M.; XIE, C.; KONDO, M.; TONG, Y.; OU, B.; JENSEN, G.; MEDINA, M. B.; SCHAUSS, A. G. & WU, X. "Bioactivities of açai (*Euterpe precatoria* Mart .) fruit pulp , superior antioxidant and anti-inflammatory properties to *Euterpe oleracea* Mart . q". *Food Chem.*,133 (3): 671, 2012.
- KANG, J.; XIE, C.; LI, Z.; NAGARAJAN, S.; SCHAUSS, A. G.; WU, T. & WU, X. "Flavonoids from acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp and their antioxidant and anti-inflammatory activities". *Food Chem.*,128 (1): 152, 2011.
- KORTESNIEMI, M.; VUORINEN, A. L.; SINKKONEN, J.; YANG, B.; RAJALA, A. & KALLIO, H. "NMR metabolomics of ripened and developing oilseed rape (*Brassica napus*) and turnip rape (*Brassica rapa*)". *Food Chem.*,**172**: 63, 2015.
- LAMANNA, R.; PISCIONERI, I.; ROMANELLI, V. & SHARMA, N. "A preliminary study of soft cheese degradation in different packaging conditions by ¹H-NMR". *Magn. Reson. Chem.*, **46**: 828, 2008.
- LEE, J.; DURST, R. W.; WROLSTAD, R. E. "Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study". *J. AOAC Int.*,88 (5): 1269, 2005.

- LEHOTAY, S. J. & LEE, C.-H. "Evaluation of a fibrous cellulose drying agent in supercritical fluid extraction and pressurized liquid extraction of diverse pesticides". *J. Chromatogr. A*, **785**: 313, 1997.
- LEME, A. B. P.; BIANCHI, S. R.; CARNEIRO, R. L. & NOGUEIRA, A. R. A. "Optimization of sample preparation in the determination of minerals and trace elements in honey by ICP-MS". *Food Anal. Methods*, **7**: 1009, 2014.
- LIÃO, L. M.; CHOZE, R.; CAVALCANTE, P. P.; SANTO, S. DA C.; FERRI, P. H. & FERREIRA, A. G. "Perfil químico de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris*) pela técnica de high resolution magic angle spinning (HR-MAS)". *Quim. Nov.*, **33** (3): 634, 2010.
- LICHTENTHÄLER, R.; RODRIGUES, R. B.; MAIA, J. G. S.; PAPAGIANNOPOULOS, M.; FABRICIUS, H. & MARX, F. "Total oxidant scavenging capacities of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) fruits". *Int. J. Food Sci. Nutr.*, **56** (1): 53, 2005.
- LIMA, V. L. A. G.; MELO, E. D. A. & LIMA, D. E. DA S. "Efeito da luz e da temperatura de congelamento sobre a estabilidade das antocianinas da pitanga roxa". *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, **25** (1): 92, 2005.
- LIU, B.; KONGSTAD, K. T.; WIESE, S.; JÄGER, A. K. & STAERK, D. "Edible seaweed as future functional food : Identification of α - glucosidase inhibitors by combined use of high-resolution α - glucosidase inhibition profiling and HPLC-HRMS-SPE-NMR .". *Food Chem.*, **203**: 16, 2016.
- LIU, Z.; QIN, J.; GAO, C.; HUA, D.; MA, C.; LI, L.; WANG, Y. & XU, P. "Bioresource technology production of (2 S , 3 S) -2 , 3-butanediol and (3 S) -acetoin from glucose using resting cells of *Klebsiella pneumonia* and *Bacillus subtilis*". *Bioresour. Technol.*, **102** (22): 10741, 2011.
- LOCCI, E.; PIRAS, C.; MEREU, S.; MARINCOLA, F. C.; SCANO, P.; CHIMICHE, S.; UNIVERSITARIA, C. & SESTU, S. S. À. B. "1H NMR metabolite fingerprint and pattern recognition of mullet (*Mugil cephalus*) bottarga". *J. Agric. Food Chem.*, **59**: 9497, 2011.
- LOENING, N. M.; CHAMBERLIN, A. M.; ZEPEDA, A. G.; GONZALEZ, R. G.; CHENG, L. L. "Quantification of phosphocholine and glycerophosphocholine with 31 P edited 1 H NMR spectroscopy". *NMR Biomed.*, **18**: 413, 2005.
- LOMMEN, A.; GODEJOHANN, M.; VENEMA, D. P.; HOLLMAN, P. C. H. & SPRAUL, M. "Application of Directly Coupled HPLC - NMR - MS to the Identification and Confirmation of Quercetin Glycosides and Phloretin Glycosides in Apple Peel". *Anal. Chem.*, **72** (8): 1793, 2000.
- LUO, R.; TRAN, K.; LEVINE, R. A.; NICKOLS, S. M.; MONROE, D. M.; SABAA-SRUR, A. U. O.; SMITH, R. E. "Distinguishing Components in Brazilian Açaí (*Euterpe oleracea* Mart .) and in Products Obtained in the USA by Using NMR". **86**, 1, 2012.
- MALCHER, E. T & CARVALHO, J. C. T. "The influence of seasonality on the anthocyanin concentration in the açaí fruit (*Euterpe oleracea* Mart.) from the Brazilian amazon". *Int. J. Plant, Anim. Environ. Sci.*, **1** (3): 224, 2011.
- MANLY, B. J. F. *Métodos Estatísticos Multivariados: uma introdução*. 3o ed. Porto Alegre: Bookman, 2005.
- MANTOVANI, I. S. B.; FERNANDES, S. B. O. & MENEZES, F. S. "Constituintes apolares do fruto do açaí (*Euterpe oleracea* M. - *Arecaceae*)". *Rev. Bras. Farmacogn.*, **13**: 41, 2003.
- MANUAL AMIX. AMIX-Viewer & AMIX Software Manual. 2009.
- MATHEUS, M. E.; FERNANDES, S. B. DE O.; SILVEIRA, C. S.; RODRIGUES, V. P.; MENEZES, F. DE S. & FERNANDES, P. D. "Inhibitory effects of *Euterpe oleracea* Mart. on nitric oxide production and iNOS expression". *J. Ethnopharmacol.*, **107** (2): 291, 2006.
- MATTIETTO, R. A.; ABREU, L. F.; FURTADO, A. A. L.; SOUZA, C. S. & DA SILVA, V. S. O. "Microbiological evaluation of the industrial processing of pasteurized açaí pulp". *International Horticultural Congress*. Lisboa-Portugal, 2010. n. 127, p. 1-2.
- MATTIETTO, R. A.; MATTA, V. M.; TSUKUI, A.; CORDEIRO, B. S. & DA SILVA, R. F. Avaliação de perdas de antocianinas totais ao longo da linha de processamento de polpa de açaí pasteurizada e congelada. *Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos*. Campinas-SP, 2009. n.8, p. 1-2.
- MENEZES, E. M. DA S.; TORRES, A. T. & SABAA SRUR, A. U. "Valor nutricional da polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Mart) liofilizada". *Acta Amaz.*, **38** (2): 311, 2008.

MERCHANT, T. E. & GLONEK, T. "31P NMR of phospholipid glycerol phosphodiester residues". J. Lipid Res.,31 (3): 479, 1990.

MIAO, Z.; JIN, M.; LIU, X. & GUO, W. "The application of HPLC and microprobe NMR spectroscopy in the identification of metabolites in complex biological matrices". Anal Bioanal Chem, 1: 1, 2015.

MONTEIRO, J. E. B. A. Agrometeorologia dos cultivos: o fator meteorológico na produção agrícola. 1a ed. Brasília: INMET, 2009.

MORGANO, M. A.; QUEIROZ, S. C. DO N. & FERREIRA, M. M. C. "Application of exploratory analysis to the differentiation of vegetables". Brazilian J. Food Technol.,2 (1): 73, 1999.

MORAES, V. R. S.; THOMASE, S. S.; SPRENGER, R. F.; PRADO, V. M. J.; CRUZ, E. M. O.; CASS, Q. B.; FERREIRA, A. G.; BLANK, A. F. "Secondary metabolites from an infusion of Lippia gracilis Schauer using the LC-DAD-SPE/NMR hyphenation technique". J. Braz. Chem. Soc.,28 (7): 1335, 2017.

MORGANO, M. A.; QUEIROZ, S. C. DO N.; FERREIRA, M. M. C. "Application of exploratory analysis to the differentiation of vegetables". Brazilian J. Food Technol.,2 (1): 73, 1999.

MOURA, R. S. DE; PIRES, K. M. P.; FERREIRA, T. S.; LOPES, A. A.; TISCOSKI NESI, R.; RESENDE, A. C.; SOUSA, P. J. C.; SILVA, A. J. R. DA; PORTO, L. C. & VALENCA, S. S. "Addition of açai (Euterpe oleracea) to cigarettes has a protective effect against emphysema in mice". Food Chem. Toxicol.,49 (4): 855, 2011.

MULABAGAL, V. & CALDERÓN, A. I. "Liquid chromatography / mass spectrometry based fingerprinting analysis and mass profiling of Euterpe oleracea (açai) dietary supplement raw materials". Food Chem.,134 (2): 1156, 2012.

MUSTAFA, A. & TURNER, C. "Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review". Anal. Chim. Acta,703 (1): 8, 2011.

NASCIMENTO, R. J. S. DO; COURI, S.; ANTONIASSI, R. & FREITAS, S. P. "Composição Em ácidos graxos do óleo da polpa de açai fatty acids composition of açai pulp oil obtained by enzymatic", 30 (2): 498, 2008.

NASCIMENTO, R. J. S. DO; COURI, S.; ANTONIASSI, R. & FREITAS, S. P. "Composição em ácidos graxos do óleo da polpa de açai extraído com enzimas e com hexano". Rev. Bras. Frutic.,30 (2): 498, 2008.

NEVES, L. T. B. C.; CAMPOS, D. C. DOS S.; MENDES, J. K. S.; URNHANI, C. O. & ARAÚJO, K. G. M. "Qualidade de frutos processados artesanalmente de açai (Euterpe oleracea MART .)". Rev. Bras. Frutic.,37 (3): 729, 2015.

NOGUEIRA, O. L.; CARVALHO, C. J. R.; MULLER, C. H.; GALVÃO, E. U. P.; MARTINS E SILVA, H. & RODRIGUES, J. E. L. F. Coleção Plantar - A cultura do açai. 1o ed. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - SPI, 1995.

NOGUEIRA, O. L.; FIGUEIREDO, F. J. C. & MULLER, A. A. Açai. 1o ed. Belém: Embrapa Amazônia Oriental - Sistema de Produção 4, 2005.

OLAWODE, E. O.; TANDLICH, R & CAMBRAY, G. "1H-NMR profiling and chemometric analysis of selected honeys from South Africa, Zambia and Slovakia". Molecules,23 (578): 1, 2018.

DE OLIVEIRA, C. R.; CARNEIRO, R. L. & FERREIRA, A. G. "Tracking the degradation of fresh orange juice and discrimination of orange varieties: An example of NMR in coordination with chemometrics analyses". Food Chem.,164: 446, 2014.

OLIVEIRA, M. DO S.; CARVALHO, J. E. U. & NASCIMENTO, W. M. O. "Açai (Euterpe oleracea Mart.)". Série Frutas Nativas. Funep, Jaboticabal, 2000. 52 p.

OLIVEIRA, S. P. DE; NETO, J. T. DE F. & PENA, R. DA S. Açai : Técnicas de cultivo e processamento. Fortaleza: Instituto Frutal, 2007.

OLIVEIRA, S. P. DE; NETO, J. T. DE F.; QUEIROZ, J. A. L. DE. Açazeiro: cultivo e manejo para produção de frutos. Embrapa Amazônia Oriental, 2014. 20p.

ORM. "Certificação de "Açai Bom" envolve 54 pontos de venda". Disponível em: <<http://www.ormnews.com.br/noticia/certificacao-de-acai-bom-envolve-54-pontos-de-venda>>. Acesso em: 23/4/2018.

- ORM. "Cai número de pontos com o selo " Açai Bom "" . Disponível em: <[http://www.orm.com.br/amazonia/gerais/NTg0MQ==/Cai-numero-de-pontos--com-o-selo-"Açai-Bom"](http://www.orm.com.br/amazonia/gerais/NTg0MQ==/Cai-numero-de-pontos--com-o-selo-)>. Acesso em: 23/4/2018.
- PACHECO-PALENCIA, L. A.; DUNCAN, C. E. & TALCOTT, S. T. "Phytochemical composition and thermal stability of two commercial açai species, *Euterpe oleracea* and *Euterpe precatoria*". *Food Chem.*,115 (4): 1199, 2009.
- PACHECO-PALENCIA, L. A; MERTENS-TALCOTT, S. & TALCOTT, S. T. "Chemical composition, antioxidant properties, and thermal stability of a phytochemical enriched oil from Acai (*Euterpe oleracea* Mart.)". *J. Agric. Food Chem.*,**56**: 4631, 2008.
- PANDEY, R.; RAMESHKUMAR, K. B.; KUMAR, B. "Ultra high performance chromatography tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of multiple bioactive constituents using a polarity switching technique". *J Sep Sci*,38 (8): 1277, 2015.
- PAULI, G. F.; GODECKE, T.; JAKI, B. U. & LANKIN, D. C. "Quantitative ¹H NMR development and potential of an analytical method: an update". *J. Nat. Prod.*,**75**: 834, 2012.
- PEREIRA, C. A. M.; YARIWAKE, J. H.; MCCULLAGH, M. "Distinction of the C-glycosylflavone isomer pairs orientin / isorientin and vitexin / isovitexin using HPLC-MS exact mass measurement and in-source CID". *Phytochem. Anal.*,16 (1): 295, 2005.
- PEREIRA FILHO, E. R. Planejamento fatorial em química: maximizando a obtenção de resultados. 1o ed. São Carlos: Coleção Apontamentos EdUFScar, 2015.
- PÉREZ-TRUJILLO, M.; GÓMEZ-CARAVACA, A. M.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNANDEZ-GUTIÉRREZ, A. & PARELLA, T. "Separation and identification of phenolic compounds of extra virgin olive oil from *olea europaea* L. by HPLC-DAD-SPE-NMR / MS . Identification of a new diastereoisomer of the aldehydic form of oleuropein aglycone". *J. Agric. Food Chem.*,**58**: 9129, 2010.
- PIZZOLATTI, M. G.; JR, A. C.; SZPOGANICZ, B.; BRAZ-FILHO, R.; SCHRIPSEMA, J. "Flavonoides glicosilados das folhas e flores de *Bauhinia forficata* (Leguminosae)". *Quim. Nov.*,26 (4): 466, 2003.
- RAMAKRISHNAN, V. & LUTHRIA, D. "Recent application of NMR in food and dietary studies". *J. Sci. Food Agric.*,97 (1): 1 , 2017.
- VAN DER REST, B. "Glycerophosphocholine Metabolism in Higher Plant Cells . Evidence of a New". *Society.*,**130**: 244, 2002.
- REST, V. DER; BOISSON, A.; GOUT, E.; BLIGNY, R. & DOUCE, R. "Glycerophosphocholine Metabolism in Higher Plant Cells . Evidence of a New Glyceryl-Phosphodiester Phosphodiesterase". *Plant Physiol.*,**130**: 244, 2002.
- RIBEIRO, C. M. R. & SOUZA, N. A. "Esquema geral para elucidação de substâncias orgânicas usando métodos espectroscópicos e espectrométricos". *Quim. Nov.*,30 (4): 1026, 2007.
- RIBEIRO, J. C.; ANTUNES, L. M. G.; AISSA, A. F.; DARIN, J. D. AR. C.; DE ROSSO, V. V.; MERCADANTE, A. Z. & BIANCHI, M. DE L. P. "Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects after acute and subacute treatments with açai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) on mice using the erythrocytes micronucleus test and the comet assay". *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*,695 (1–2): 22, 2010.
- RIZZON, L. A. Sistema de Produção de Vinagre. Versão Eletrônica: Embrapa Uva e Vinho, 2006.
- RODRIGUES, R. B.; LICHTENTHALER, R.; ZIMMERMANN, B. F.; PAPAGIANNOPOULOS, M.; FABRICIUS, H.; MARX, F.; MAIA, J. G. & ALMEIDA, O. "Total oxidant scavenging capacity of *Euterpe oleracea* Mart. (acai) seeds and identification of their polyphenolic compounds". *J. Agric. Food Chem.*,54 (12): 4162, 2006.
- ROGEZ, H.; POMPEU, D. R.; AKWIE, S. N. T. & LARONDELLE, Y. "Journal of food composition and analysis sigmoidal kinetics of anthocyanin accumulation during fruit ripening : A comparison between açai fruits (*Euterpe oleracea*) and other anthocyanin-rich fruits". *J. Food Compos. Anal.*,24 (6): 796, 2011.
- ROJANO, B.; ZAPATA, I.; ALZATE, A.; MOSQUERA, A.; CORTÉS, F. & GAMBOA, L. "Polifenoles y Actividad Antioxidante del Fruto Liofilizado de Palma Naidi (Açai Colombiano)(*Euterpe oleracea* Mart)". *Fac. Nac. Agron. Medellín*,64 (2): 6213, 2011.

- RUFINO, M. DO S. M.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; ARRANZ, S.; ALVES, R. E.; DE BRITO, E. S.; OLIVEIRA, M. S. P. & SAURA-CALIXTO, F. "Açaí (Euterpe oleraceae) "BRS Pará": A tropical fruit source of antioxidant dietary fiber and high antioxidant capacity oil". *Food Res. Int.*,44 (7): 2100, 2011.
- SACCHI, R. & PAOLILLO, L. "NMR for food quality and traceability". In: *Advances in Food Diagnostics*. p.101–117, 2007.
- SANTOS, G. M. dos; MAIA, G. A.; SOUSA, P. H. M. de; COSTA, J. M. C.; FIGUEIREDO, R. W.; PRADO, G. M.do. "Correlação entre atividade e compostos bioativos de polpas comerciais de açaí (Euterpe oleracea Mart)". *Arch Latinoam Nutr.*, 58 (2): 187, 2008.
- SANTOS, M. DA S. & COLNAGO, L. A. "Validação de método quantitativo por RMN de 1H para análises de formulações farmacêuticas". *Quim*,36 (2): 324, 2013.
- SAVORANI, F.; PICONE, G.; BADIANI, A.; FAGIOLI, P. & CAPOZZI, F. "Metabolic profiling and aquaculture differentiation of gilthead sea bream by 1 H NMR metabonomics". *Food Chem.*,120 (3): 907, 2010.
- SCHANTZ, M. M.; NICHOLS, J. J. & WISE, S. A. "Evaluation of pressurized fluid extraction for the extraction of environmental matrix reference materials". *Anal. Chem.*,69 (20): 4210, 1997.
- SCHAUSS, A. G.; WU, X.; PRIOR, R. L.; OU, B.; HUANG, D.; OWENS, J.; AGARWAL, A.; JENSEN, G. S.; HART, A. N. & SHANBROM, E. "Antioxidant Capacity and Other Bioactivities of the Freeze-Dried Amazonian Palm Berry, Euterpe oleraceae Mart. (Acai)". *J. Agric. Food Chem.*,54 (22): 8604, 2006.
- SCHAUSS, A. G.; XIANLI, W.; PRIOR, R. L. P.; OXIN, B. O. U.; ATEL, D. I. P.; UANG, D. E. H. & ABABICK, J. A. P. K. "Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried amazonian palm berry, Euterpe oleraceae Mart. (Acai)". *J. Agric. Food Chem.*,1: 8598, 2006.
- SCHOLOTTERBECK, G. & CECCARELLI, S. M. "LC – SPE – NMR – MS : a total ana - lysis system for bioana - lysis". *Bioanalysis*,1 (3): 549, 2009.
- SEBRAE. "Boletim Açaí : a superfruta que ganhou o gosto e o mercado saudável nos EUA". SEBRAE, n. 24, 2015.
- SECCO, D.; WANG, C.; SHOU, H.; WHELAN, J. "Phosphate homeostasis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* , the key role of the SPX domain-containing proteins". *FEBS Lett.*,586 289, 2012.
- SHUMILINA, E.; CIAMPA, A.; CAPOZZI, F.; RUSTAD, T. & DIKIY, A. "NMR approach for monitoring post-mortem changes in Atlantic salmon fillets stored at 0 and 4 °c". *Food Chem.*,184: 12, 2015.
- SHUMILINA, E.; DYKYY, A. & DIKIY, A. "Development of a statistical model to detect quality and storage conditions of Atlantic salmon". *Food Chem.*,258: 381, 2018.
- SHUMILINA, E.; SLIZYTE, R.; MOZURAITYTE, R.; DYKYY, A.; STEIN, T. A. & DIKIY, A. "Quality changes of salmon by-products during storage : Assessment and quantification by NMR". *Food Chem.*,211: 803, 2016.
- SILVA, D. F.; VIDAL, F. C. B.; SANTOS, D.; COSTA, M. C. P.; MORGADO-DÍAZ, J. A.; SOARES, D.; NASCIMENTO, M. DO D. S. B. & MOURA, R. S. DE. "Cytotoxic effects of Euterpe oleracea Mart. in malignant cell lines". *BMC Complementary Altern. Med.*, 14 (175): 1, 2014.
- SILVA, J. A.; DAMASCENO, B. P. G. DE L.; SILVA, F. L. H.; MADRUGA, M. S. & SANTANA, D. P. "Aplicação da metodologia de planejamento fatorial e análise de superfícies de resposta para otimização da fermentação alcoólica". *Quim. Nova*,31 (5): 1073, 2008.
- SILVA, L. M. A.; FILHO, E. G. A.; THOMASI, S. S.; SILVA, B. F.; FERREIRA, A. G. & VENÂNCIO, T. "Use of diffusion-ordered NMR spectroscopy and HPLC – UV – SPE – NMR to identify undeclared synthetic drugs in medicines illegally sold as phytotherapies". *Magn. Reson. Chem.*, 1: 1, 2013.
- SILVA, T. M. S.; CARVALHO, M. G. DE; BRAZ-FILHO, R. "Estudo espectroscópico em elucidação estrutural de flavonoides de *Solanum jabrense* Agra e Nee e *S paladosum* Moric". *Quim. Nova*,32 (5): 1119, 2009.
- SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16:14, 1965.

- SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. L. & CROUCH, S. R. Fundamentos de química analítica. São Paulo: Thomson Learning, 2006.
- SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. Introduction to modern liquid chromatography. 3rd ed. New Jersey: Willey-VCH, 2010.
- SOUSA, C. L.; MELO, G. M. C. & ALMEIDA, S. C. S. "Avaliação da qualidade do açaí (Euterpe oleracea, Mart.) comercializado na cidade de Macapá - AP". B. CEPPA, 17 (2): 127, 1999.
- SOUSA, M. A. DA C.; YUYAMA, L. K. O.; AGUIAR, J. P. L. & PANTOJA, L. "Suco de açaí (Euterpe oleracea Mart.): avaliação microbiológica, tratamento térmico e vida de prateleira". Acta Amaz., 36 (4): 483, 2006.
- SOUZA, G. P.; FILGUEIRA, M.; ROSENTHAL, R. & HOLANDA, J. N. F. "Caracterização de material compósito diatomáceo natural". Cerâmica., 49: 40, 2003.
- DE SOUZA, M. O.; SILVA, L. S.; MAGALHÃES, C. L. DE B.; FIGUEIREDO, B. B.; COSTA, D. C.; SILVA, M. E.; PEDROSA, M. L. & LÚCIA, M. "The hypocholesterolemic activity of açaí (Euterpe oleracea Mart.) is mediated by the enhanced expression of the ATP-binding cassette , subfamily G transporters 5 and 8 and low-density lipoprotein receptor genes in the rat"., 2 (32): 976, 2012.
- DE SOUZA, M. O.; SILVA, M.; SILVA, M. E.; OLIVEIRA, R. DE P. & PEDROSA, M. L. "Diet supplementation with acai (Euterpe oleracea Mart.) pulp improves biomarkers of oxidative stress and the serum lipid profile in rats"., 26: 804, 2010.
- SPRAUL, M.; FREUNS, A. S.; NAST, R. E.; WITHERS, R. S.; MAAS, W. & CORCORAN, O. "Advancing NMR Sensitivity for LC-NMR-MS Using a Cryoflow Probe : Application to the Analysis of Acetaminophen Metabolites in Urine". Anal. Chem., 75 (6): 1546, 2003.
- SPYROS, A. A. & DAIS, P. NMR Spectroscopy in Food Analysis. Vancouver: Royal Society Chemistry, 2012.
- STICHER, O. "Natural Product Isolation". Nat. Prod. Reports., 25: 517, 2008.
- STURM, S. & SEGER, C. "Liquid chromatography – nuclear magnetic resonance coupling as alternative to liquid chromatography – mass spectrometry hyphenations : Curious option or powerful and complementary routine tool ?". J. Chromatogr. A., 1259: 50, 2012.
- SUN, H.; GE, X.; LV, Y. & WANG, A. "Application of accelerated solvent extraction in the analysis of organic contaminants , bioactive and nutritional compounds in food and feed". J. Chromatogr. A., 1237: 1, 2012.
- TARLEY, C. R. T.; SILVEIRA, G.; SANTOS, W. N.; MATOS, G. D. & SILVA, E. G. P. "Chemometric tools in electroanalytical chemistry : Methods for optimization based on factorial design and response surface methodology". Microchem. J., 92 (1): 58, 2009.
- THERMO SCIENTIFIC. "Unsurpassed Extraction Technology Accelerated Solvent Extraction". 1: 1, 2013.
- THOMASI, S. S. Aplicação de LC-SPE/NMR na caracterização de substâncias isoladas de cultivos da bactéria marinha *Streptomyces cebimarensis* SS99BA-2., 2014. Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar. 215 p.
- THOMASI, S. S.; GRANATO, A. C.; ROMANO, L. H.; DHOOGHE, L.; NASCIMENTO, E. S. P.; BADINO, A. C.; SILVA, M. F. G. F.; FERREIRA, A. G. & VENÂNCIO, T. "Unusual 2(1H)-pyrazinones isolated from a culture of a Brazilian Marine-derived Streptomyces sp.". Nat. Prod. Commun., 9 (9): 1275, 2014.
- THOMASI, S. S.; LADEIRA, C.; FERREIRA, D.; SPRENGER, R. DA F.; BADINO, A. C.; FERREIRA, A. G. & VENÂNCIO, T. "Identification of two new phosphorylated polyketides from a Brazilian Streptomyces sp. through the use of LC - SPE / NMR". Helv. Chim. Acta., 99: 281, 2016.
- TODASCA, M.-C.; FOTESCU, L.; CHIRA, N.; DELEANU, C. & ROSCA, S. "Composition changes in wines produced by different growing techniques examined through 1H-NMR spectroscopy". Rev. Chim., 62 (2): 131, 2011.
- TODE, C.; MAOKA, T. & SUGIURA, M. "Application of LC-NMR to analysis of carotenoids in foods". J. Sep. Sci., 32: 3659, 2009.

- TOMITA, S.; SAITO, K.; NAKAMURA, T.; SEKIYAMA, Y. & KIKUCHI, J. "Rapid discrimination of strain-dependent fermentation characteristics among *Lactobacillus* strains by NMR-based metabolomics of fermented vegetable juice". *PLoS One*, 12 (7): 1, 2017.
- TSENG, L.; BRAUMANN, U.; GODEJOHANN, M.; LEE, S. & ALBERT, K. "Structure identification of aporphine alkaloids by on-line coupling of HPLC-NMR with loop storage". *J. of Chem. Soc.*, **47**: 1231, 2000.
- VILLA, P.; CASTEJÓN, D.; HERRAIZ, M.; HERRERA, A. "¹H-HRMAS NMR study of cold smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*) treated with E-beam". *Magnetic Reson. Chem.*, 1 (51): 350, 2013.
- WATANABE, N. & NIKI, E. "Direct coupling of FT-NMR to high performance liquid chromatography". *Proc. Japan Acad.*, 54 (B): 194, 1978.
- WYCOFF, W.; LUO, R.; SCHAUSS, A. G.; NEAL-KABABICK, J.; SABAA-SRUR, A. U. O.; MAIA, J. G. S.; TRAN, K.; RICHARDS, K. M. & SMITH, R. E. "Chemical and nutritional analysis of seeds from purple and white açai (*Euterpe oleracea* Mart.)". *J. Food Compos. Anal.*, **41**: 181, 2015.
- YE, Y.; LIMIN, Z.; HUIRU, T. & XIAOJUN, Y. "Survey of nutrients and quality assessment of crab paste by ¹H NMR spectroscopy and multivariate data analysis". *Chinese Sci. Bull.*, 57 (25): 3353, 2012.
- ZEISEL, S. H.; MAR, M.; HOWE, J. C. & HOLDEN, J. M. "Concentrations of choline-containing compounds and betaine in common foods". *Am. Soc. Nutr. Sci.*, **133**: 1302, 2003.
- ZHAO, L.; HE, Y.; DENG, X.; YANG, G.; LI, W.; LIANG, J. & TANG, Q. "Response surface modeling and optimization of accelerated solvent extraction of four lignans from *fructus schisandrae*". *Molecules*, **17**: 3618, 2012.

APÊNDICES

CAPÍTULO 3 – ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DAS POLPAS DO AÇAÍ E TRATAMENTO QUIMIOMÉTRICO DOS DADOS

1. COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E FENÓLICA DAS POLPAS DO AÇAÍ COMERCIAL E DE GENÓTIPOS.

TABELA 1 – Resultados de pH, acidez titulável, sólidos solúveis e composição centesimal nas polpas comercializadas em Belém (PA) e de genótipos da CPATU (Belém – PA).

CÓDIGO	PARÂMETROS #							
	pH	A. T. (g/100g ác.cítrico)	S.S.T (°Brix)	UMIDADE† (g/100g)	CINZAS† (g/100g)	FIBRAS† (g/100g)	PROTEÍNAS† (g/100g)	LIPÍDIOS† (g/100g)
SAFRA 2014								
G1	5,18±0,01	1,13±0,06	3,4±0,58	3,06±0,08	3,63±0,14	11,71±0,20	10,1±0,01	39,98±0,66
G2	5,35±0,10	1,01±0,00	3,06±0,00	1,64±0,13	3,57±0,05	28,83±0,37	15,12±0,85	46,38±0,22
G3	5,33±0,04	1,39±0,16	5,78±0,58	1,25±0,22	4,41±0,01	25,65±0,30	12,71±0,24	35,54±0,23
G4	5,14±0,02	1,29±0,03	4,08±0,00	4,36±0,18	3,80±0,12	10,96±0,27	9,18±0,19	47,19±0,09
G5	5,31±0,00	1,36±0,03	6,46±0,58	3,84±0,15	3,95±0,02	23,92±0,36	14,03±0,20	35,62±0,12
G6	5,25±0,02	1,39±0,06	5,10±0,00	2,82±0,16	3,70±0,12	11,40±0,19	8,43±0,09	44,80±0,33
G7	5,03±0,00	1,50±0,05	5,1±0,00	2,4±0,22	3,71±0,07	15,91±0,40	9,480,19	51,15±0,10
G8	m.i	m.i	5,10±0,0	2,74±0,10	2,68±0,07	7,23±1,17	6,79±0,12	25,38±0,06
G9	5,17±0,00	1,36±0,03	7,14±0,00	2,23±0,05	3,43±0,03	13,63±0,14	9,92±0,03	43,99±0,31
G10	5,23±0,00	1,37±0,10	6,46±0,58	2,75±0,08	3,68±0,07	20,37± 0,15	15,67± 0,12	46,02±0,06
G11	5,22±0,00	1,55±0,06	5,1±0,0	2,53±0,32	3,83±0,11	9,32±0,33	8,45±0,20	41,53±0,37
G12	m.i	m.i	4,08±0,00	3,25±0,12	2,82±0,11	19,11±0,12	7,41±0,17	39,23±0,25
CAU	5,24±0,05	1,34±0,01	4,08±0,00	2,23±0,05	3,43±0,04	13,63±0,06	9,92±0,48	43,99±0,31

CAL	5,06±0,04	1,46±0,00	7,14±0,00	4,36±0,18	3,80±0,12	10,96±0,27	9,17±0,19	47,19±0,09
CAI	5,09±0,02	1,44±0,03	3,06±0,00	1,35±0,23	3,63±0,14	11,71±0,34	10,10±0,18	39,98±0,92
CAP	5,16±0,02	1,61±0,03	3,74±0,58	2,21±0,07	4,65±0,01	7,08±0,22	7,98±0,23	51,96±0,17
CPA	5,12±0,00	1,58±0,09	7,14±0,00	2,26±0,20	4,89±0,03	9,15±0,19	7,96±0,23	48,97±0,37
CFA	5,13±0,00	1,25±0,03	6,46±0,58	2,42±0,10	4,07±0,05	8,36±0,08	8,34±0,14	49,56±0,16
CA25	5,08±0,01	1,70±0,06	7,82±0,58	1,78±0,17	4,03±0,04	10,19±0,22	8,78±0,24	46,93±0,30
CBA	5,15±0,01	1,59±0,07	6,8±0,58	1,98±0,14	4,28±0,00	6,85±0,02	19,53±0,14	52,96±0,06
CAC	5,56±0,42	1,81±0,11	8,5±0,58	2,13±0,23	4,22±0,06	9,37±0,09	18,13±0,24	46,55±0,14
CAF	5,01±0,01	1,81±0,00	8,16±0,00	1,42±0,10	3,94±0,04	7,48±0,13	17,77±0,07	50,23±0,38
ENTRESSAFRA 2015								
	pH	A. T.	S.S.T	UMIDADE†	CINZAS†	FIBRAS†	PROTEÍNAS†	LIPÍDIOS†
G9	5,31±0,02	1,4±0,05	4,08±0,01	4,79±0,21	2,76±0,13	13,22±0,20	8,86±0,09	46,85±0,15
G13	5,21±0,01	1,33±0,07	6,80±0,59	4,52±0,18	4,23±0,04	14,94±0,14	7,42±0,22	34,67±0,38
G14	5,13±0,01	1,45±0,11	4,42±0,58	5,73±0,19	3,94±0,05	13,32±0,18	8,69±0,12	43,22±0,82
G15	5,34±0,02	1,60±0,07	3,06±0,00	3,16±0,12	4,37±0,03	27,66±0,57	10,04±0,02	19,24±0,30
G16	5,46±0,01	1,54±0,07	4,14±0,01	6,74±0,14	4,44±0,02	24,12±0,38	10,55±0,06	20,51±0,11
CAU	5,11±0,01	1,54±0,03	4,76±0,59	1,06±0,03	4,35±0,14	8,51±0,07	9,04±0,25	49,54±0,08
CAL	5,03±0,00	1,93±0,03	5,10±0,00	1,52±0,02	4,06±0,00	8,95±0,21	9,32±0,20	47,52±0,12
CAI	4,94±0,01	1,67±0,04	4,42±0,59	1,44±0,05	3,96±0,08	9,72±0,18	8,63±0,12	47,80±0,23
CAP	5,06±0,01	1,61±0,03	3,40±0,58	1,73±0,09	4,08±0,01	7,62±0,32	9,83±0,20	50,66±0,06
CPA	4,77±0,01	1,33±0,06	3,06±0,00	1,18±0,05	2,98±0,03	8,76±0,19	8,53±0,15	43,96±0,06
CFA	4,99±0,01	1,63±0,03	4,08±0,00	1,30±0,04	4,68±0,05	9,46±0,23	9,02±0,21	46,71±0,02
CA25	4,94±0,00	1,79±0,06	8,16±0,00	1,23±0,09	3,59±0,05	10,92±0,20	8,66±0,12	48,77±0,11
CBA	5,12±0,00	1,64±0,03	4,47±0,58	1,60±0,06	3,72±0,01	8,15±0,08	9,34±0,17	53,20±0,33
CAC	4,83±0,00	1,84±0,03	3,4±0,58	2,04±0,01	3,58±0,00	7,38±0,18	10,56±0,23	52,03±0,21
CAF	5,07±0,00	1,61±0,03	3,4±0,58	1,57±0,00	4,09±0,01	8,73±0,12	9,99±0,03	48,77±0,10
SAFRA 2015								
	pH	A. T.	S.S.T	UMIDADE†	CINZAS†	FIBRAS†	PROTEÍNAS†	LIPÍDIOS†
G1	5,04±0,01	1,40±0,00	7,48±0,58	3,20±0,15	3,16±0,00	21,42±0,59	16,44±0,60	42,42±0,24
G3	4,88±0,0	1,67±0,04	4,42±0,58	2,3±0,12	2,83±0,14	7,91±0,36	20,05±0,26	54,54±0,08

G4	5,16±0,0	1,34±0,02	4,76±0,58	2,05±0,13	4,27±0,05	12,07±0,62	9,54±0,17	44,47±0,05
G6	5,01±0,01	1,81±0,04	7,82±0,58	1,56±0,10	3,33±0,07	10,08±0,29	5,52±0,26	47,54±0,12
G7	4,95±0,00	1,75±0,03	5,44±0,58	1,09±0,07	3,33±0,03	8,02±0,14	9,61±0,31	50,53±0,19
G9	4,77±0,01	1,50±0,04	4,08±0,00	4,73±0,11	4,73±0,01	10,37±0,28	10,01±0,56	43,86±0,97
G11	4,74±0,00	1,42±0,04	3,06±0,01	5,67±0,09	5,67±0,09	25,89±0,23	8,09±0,21	22,53±0,19
G14	5,11±0,01	1,67±0,01	5,78±0,00	1,05±0,09	3,53±0,00	17,59±0,58	11,15±0,28	35,79±0,18
G16	4,82±0,01	1,7±0,04	3,06±0,0	2,41±0,01	2,41±0,04	29,35±0,10	8,54±0,11	14,16±0,23
G17	5,05±0,00	1,43±0,00	5,10±0,00	1,49±0,15	3,06±0,01	20,15±0,39	19,69±0,27	47,72±0,01
G18	5,01±0,02	1,51±0,03	5,1±0,58	3,22±0,08	2,98±0,05	9,44±0,04	10,29±0,30	52,79±0,14
G19	4,92±0,00	1,41±0,04	3,74±0,58	3,13±0,15	2,58±0,03	15,29±0,15	7,99±0,11	45,2±3,85
G20	4,93±0,00	1,16±0,02	2,38±0,58	0,83±0,017	1,92±0,03	7,64±0,12	8,73±0,24	63,08±0,02
G21	5,14±0,01	1,04±0,01	3,06±0,58	1,01±0,09	2,55±0,02	13,68±0,20	7,21±0,10	52,32±0,32
G22	5,06±0,02	0,85±0,02	4,76±0,58	1,26±0,18	2,05±0,02	19,75±0,13	6,36±0,20	46,17±0,46
G23	4,91±0,00	1,67±0,05	4,42±0,0	1,67±0,12	2,69±0,03	17,28±0,27	9,07±0,39	40,00±0,32
G24	4,95±0,01	1,55±0,01	3,74±0,58	0,78±0,09	3,48±0,34	12,71±0,13	8,04±0,68	48,82±0,67
G26	5,11±0,00	1,39±0,02	4,42±0,58	1,28±0,18	3,38±0,01	13,54±0,15	8,52±0,12	44,42±0,50
G27	4,9±0,01	1,6±0,04	3,4±0,58	1,18±0,05	2,99±0,02	10,6±0,59	8,94±0,26	50,62±0,18
G28	5,08±0,00	1,82±0,03	7,82±0,09	2,33±0,13	2,93±0,02	13,73±0,07	10,31±0,39	42,11±0,19
G29	4,92±0,01	1,53±0,00	4,76±0,58	2,66±0,12	3,48±0,03	12,89±0,11	8,32±0,09	45,52±0,13
G30	4,71±0,01	1,87±0,04	6,46±0,58	2,37±0,18	2,37±0,37	8,99±0,05	10,76±0,02	45,44±0,08
G31	5,02±0,00	1,38±0,01	6,80±0,00	3,00±0,27	2,86±0,04	8,48±0,62	9,66±0,21	50,09±0,07
G3-C2	4,81±0,02	1,59±0,02	6,80±0,09	1,49±0,06	4,11±0,01	21,60±0,15	15,95±0,48	41,50±0,07
G6-C2	5,01±0,02	1,23±0,03	11,22±0,0	3,00±0,03	3,88±0,00	24,96±0,23	13,3±0,12	36,02±0,18
G7-C2	5,03±0,00	1,47±0,00	5,10±0,00	4,66±0,08	3,36±0,02	31,73±0,14	10,22±0,21	44,46±0,24
G17-C2	5,07±0,00	1,19±0,04	4,42±0,58	1,98±0,09	3,09±0,07	18,27±0,10	20,26±0,08	49,58±0,03
G18-C2	4,95±0,00	1,42±0,02	13,6±0,58	3,05±0,11	3,00±0,00	15,81±0,42	19,4±0,02	52,79±0,14
G20-C2	5,24±0,01	1,40±0,05	7,48±0,56	2,21±0,13	4,42±0,04	32,21±0,58	11,25±0,08	21,72±0,13
G21-C2	4,48±0,01	1,33±0,00	5,44±0,58	1,74±0,10	3,37±0,05	21,89±0,06	15,9±0,23	49,91±0,43
G23-C2	5,11±0,01	1,59±0,03	4,76±0,59	4,30±0,03	4,61±0,38	19,59±0,13	18,91±0,16	38,38±0,43
CAU	4,58±0,01	1,66±0,00	3,74±0,58	3,24±0,05	8,83±0,02	17,18±0,36	15,85±0,23	48,65±0,20
CAL	4,95±0,01	2,05±0,04	7,48±0,59	2,41±0,04	2,41±0,04	10,07±0,32	8,61±0,05	48,09±0,25

CAI	4,68±0,01	2,12±0,03	4,76±0,58	4,03±0,09	4,03±0,00	12,86±0,04	9,25±0,35	42,56±0,10
CAP	5,07±0,01	1,57±0,07	5,44±0,58	2,14±0,11	4,65±0,02	8,45±0,09	10,12±0,24	48,72±0,12
CPA	4,97±0,00	1,67±0,03	7,14±1,09	2,52±0,18	3,98±0,04	9,92±0,12	9,57±0,36	46,86±0,07
CFA	5,19±0,01	1,33±0,00	6,46±0,58	4,08±0,11	4,15±0,03	7,11±0,14	9,13±0,25	49,66±0,06
CA25	4,74±0,01	1,53±0,00	6,80±0,59	2,89±0,12	3,88±0,02	21,12± 0,13	15,66 ±0,19	47,20±0,08
CBA	5,14±0,00	1,8±0,03	5,78±0,58	1,84±0,08	4,22±0,05	9,56±0,02	8,19±0,08	48,23±0,05
CAC	5,00±0,01	1,81±0,04	5,44±0,59	2,59±0,13	4,38±0,01	14,33± 0,09	19,12± 0,10	48,27±0,13
CAF	4,90±0,00	1,83±0,04	4,42±0,58	3,11±0,04	4,08±0,02	16,60±0,11	19,02±0,33	46,64±0,08
ENTRESSAFRA 2016								
	pH	A. T.	S.S.T	UMIDADE†	CINZAS†	FIBRAS†	PROTEÍNAS†	LIPÍDIOS†
G11	5,19±0,01	0,93±0,04	10,88±0,58	2,08±0,18	3,33±0,04	37,83±0,62	12,97±0,53	19,79±0,28
G6	5,05±0,00	1,89±0,01	36,40±1,21	2,71±0,04	3,91±0,10	18,68±0,05	18,07±0,56	45,29±0,54
CAU	4,88±0,00	1,29±0,04	11,22±0,0	1,80±0,17	3,77±0,01	21,13±0,33	20,33±0,03	46,26±0,10
CAL	5,10±0,01	1,44±0,03	13,6±0,58	2,89±0,15	3,92±0,05	23,69±0,22	18,72±0,02	44,39±2,21
CAI	4,89±0,00	1,42±0,03	12,58±0,58	3,61±0,18	3,36±0,02	20,59±0,89	17,27±0,00	46,52±0,14
CANM	5,02±0,00	1,85±0,01	32,90±1,21	3,95±0,04	3,78±0,01	21,40±0,05	13,02±0,10	40,37±0,22
CPA	4,94±0,01	1,22±0,01	25,9±1,21	4,63±0,99	2,82±0,27	18,00±0,16	13,59±0,31	34,44±9,66
CFA	5,04±0,01	1,57±0,03	15,64±0,58	2,50±0,13	4,54±0,01	19,25±0,56	17,08±0,02	43,61±0,10
CA25	4,84±0,00	1,42±0,03	14,96±0,58	2,53±0,40	3,31±0,02	24,12±0,16	17,24±0,04	45,16±0,17
CBA	5,10±0,00	1,84±0,01	20,3±2,42	1,50±0,05	3,30±0,04	22,28±0,78	20,97±0,10	48,73±0,13
CPDA	5,22±0,00	1,76±0,01	30,8±3,20	2,98±0,08	4,35±0,04	17,87±0,18	18,52±0,19	48,35±0,10
CAF	5,04±0,00	1,57±0,04	15,64±0,58	2,43±0,09	3,85±0,01	17,11±0,18	18,77±0,21	50,39±0,30
CPDA6h	5,10±0,0	1,87±0,03	15,64±0,58	5,12±0,11	3,63±0,77	18,45±0,01	18,99±0,09	49,21±1,35
CPDA12h	4,91±0,0	1,86±0,03	11,22±0,0	5,47±0,07	3,77±0,54	19,35±0,16	17,42±0,27	49,05±0,05
SAFRA 2016								
	pH	A. T.	S.S.T	UMIDADE†	CINZAS†	FIBRAS†	PROTEÍNAS†	LIPÍDIOS†
G13	5,11±0,00	1,57±0,00	15,40±0,60	3,43±0,49	3,66±0,03	25,51±0,34	11,50±0,23	37,97±0,32
CAU	5,07±0,0	1,73±0,01	30,8±1,21	1,12±0,15	4,17±0,02	20,30±0,20	15,85±0,17	48,78±0,37
CAL	5,01±0,02	1,76±0,01	16,1±0,60	5,42±0,58	4,27±0,01	20,49±0,57	15,24±0,13	43,17±0,25

CAI	5,13±0,00	1,57±0,01	37,10±1,21	2,46±0,01	4,13±0,04	22,06±1,28	14,30±0,18	44,20±1,93
CAP	5,13±0,00	1,45±0,05	36,4±1,21	1,80±0,08	4,40±0,03	19,29±0,36	16,94±0,22	49,83±0,52
CPA	5,01±0,01	1,51±0,04	16,45±0,60	2,81±0,21	3,89±0,04	21,54±0,31	16,01±0,35	47,49±0,14
CFA	4,83±0,01	1,89±0,02	12,95±0,60	3,14±0,08	4,31±0,04	17,27±0,18	17,1±0,36	50,35±0,32
CA25	4,99±0,02	1,79±0,10	11,55±1,05	7,01±0,22	3,61±0,04	22,54±0,18	15,46±0,25	47,63±0,45
CBA	5,01±0,00	1,80±0,03	11,90±0,60	2,75±0,16	4,23±0,21	14,65±0,11	18,00±0,24	49,85±0,42
CPDA	5,05±0,00	1,73±0,010	34,3±1,21	1,57±0,10	4,63±0,03	13,98±0,74	17,96±0,35	50,83±0,41
CAF	5,05±0,00	1,82±0,010	28,7±1,21	3,15±0,22	4,11±0,04	17,65±0,89	17,85±0,17	47,62±0,45
ENTRESSAFRA 2017								
	pH	A. T.	S.S.T	UMIDADE†	CINZAS†	FIBRAS†	PROTEÍNAS†	LIPÍDIOS†
CAU	4,91±0,00	1,97±0,07	21,57±1,21	1,19±0,03	3,08±0,02	20,05±0,39	28,44±1,00	56,80±0,09
CAL	4,99±0,01	1,87±0,06	22,19±1,18	1,21±0,08	3,62±0,02	23,08±0,21	16,63±0,27	45,68±0,11
CAI	5,12±0,01	1,85±0,03	26,31±1,17	2,34±0,10	3,16±0,01	17,71±0,56	18,30±0,35	51,16±0,19
CAP	5,10±0,01	1,98±0,03	24,35±1,18	2,80±0,19	3,54±0,01	19,88±0,80	20,44±0,53	39,16±0,13
CPA	5,01±0,02	1,97±0,07	24,25±1,17	3,22±0,12	2,98±0,02	18,17±0,76	11,22±0,09	40,56±1,32
CFA	4,91±0,00	2,29±0,03	25,67±1,17	1,09±0,05	4,13±0,02	21,94±0,32	19,07±0,13	49,48±0,52
CA25	5,06±0,02	1,66±0,03	27,65±1,17	1,10±0,05	3,40±0,02	27,02±0,56	14,43±0,47	44,22±0,34
CBA	4,93±0,01	1,98±0,03	26,36±1,18	1,03±0,03	3,29±0,02	26,47±0,78	12,51±0,01	49,54±0,07
CPDA	5,09±0,01	2,1±0,03	26,4±1,19	2,37±0,13	3,82±0,02	20,16±0,26	17,24±0,01	50,31±0,58
CAF	4,46±0,01	2,6±0,03	21,5±1,16	1,26±0,04	3,34±0,13	18,37±0,07	12,96±0,04	52,62±0,03

TABELA 2 – Resultados das medidas de antocianinas totais, antocianinas monoméricas e teor de fenólicos totais em polpas comercializadas em Belém- PA e de genótipos da CPATU (Belém – PA).

CÓDIGO	PARAMÊTROS		
	ANTOCININAS TOTAIS (mg/100g)*	ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS (mg/100g)*	FENÓLICOS TOTAIS (mg/100g)**
SAFRA 2014			
G8	1507,25±47,16	1346,17±84,87	1098,69±8,24
G12	681,1±33,85	515,75±9,03	1462,06±22
G2	113,56±1,44	83,6±1,29	1524,88±25,8
G3	602,33±6,99	515,7±23,15	1497,67±2,88
G6	1572,82±149,71	1345,58±87,86	2939,86±63,13
G11	1138,59±20,87	952,73±1,83	2335,11±24,9
G7	638,26±29,12	554,24±54,37	1920,33±4,37
G9	804,49±7,5	664,13±1,37	2170,13±20,3
G10	632,37±24,08	527,35±30,56	1526,39±5,52
G4	410,98±1,29	336,74±8,56	2333,80±5,56
CAU	1020,75±46,20	953,68±51,35	1997,88±22,31
CAL	1200,90±63,93	1159,33±8,08	2061,62±26,68
CAI	1401,60±59,97	1283,01±51,97	1911,71±28,98
CAP	684,96±17,41	478,00±8,91	1757,29±42,8
CPA	692,57±28,07	553,61±13,94	1757,29±42,8
CFA	1135,72±10,33	945,98±95,73	2096,97±28,6
CA25	842,19±61,34	653,37±46,8	2076,56±8,77
CBA	1247,54±50,68	1025,33±40,46	2033,75±19,7
CPDA	866,37±14,31	664,34±17,73	2000,05±16,4
CAF	1027,93±43,68	753,44±2,9	2978,39±64,6
ENTRESSAFRA 2015			
G13	1516,81±6,07	1342,97±6,32	2677,55±8,21
G15	371,13±12,83	273,71±19,83	833,86±34,13
G14	807,88±20,29	515,75±34,06	1708,21±12,4

G16	229,91±12,30	157,03±8,25	1529,29±11,91
G9	624,49±26,93	515,7±9,03	2075,04±9,47
CAU	617,61±1,99	483,96±19,78	1799,32±4,86
CAL	718,1±9,90	560,64±4,18	1232,27±28
CAI	867,62±19,38	807,18±23,17	1866,14±9,64
CAP	354,12±17,4	261,63±14,82	1794,74±4,64
CPA	673,33±6,19	595,23±11,04	1618,67±21,6
CFA	729,25±17,80	581,55±11,76	1623,70±16,08
CA25	627,91±23,9	451,04±3,11	1238,89±2,65
CBA	573,04±9,91	437,25±19,41	1626,42±2,58
CAC	768,61±21,51	641,52±2,48	2061,03±8,61
CAF	734,17±21,51	589,89±27,72	2180,16±18,3
SAFRA 2015			
G1	933,96±7,42	724,48±10,32	1700,01±3,26
G11	300,91±8,30	198,06±6,79	1690,71±14,38
G14	969,1±52,63	756,0±45,41	1733±16,4
G16	535,66±6,29	414,93±21,93	2147,44±17,4
G17	965,63±25,73	780,91±19,67	1703,56±72,18
G18	994,08±28,61	806,41±26,77	2107,69±31,3
G19	643,42±26,02	554,41±24,44	1656,3±55,16
G20	625,92±21,66	515,87±24,01	1185,67±24,5
G21	470,57±6,27	374,11±13,68	1080,55±42,5
G22	309,18±24,6	236,58±2,11	613,93±32,8
G23	1341,04±38,1	1147,65±48,69	1888,06±46,2
G24	830,85±51,59	637,99±27,42	1600,04±83,7
G26	288,85±22,8	204,13±10,26	1297,37±25,1
G27	967,16±24,07	781,54±41,30	2095,64±30,2
G28	1026,56±47,08	810,17±29,35	2462,11±79,6
G29	448,05±12,38	401,43±16,61	1970,46±18
G3	1110,76±15,54	933,18±23,34	1404,63±36,8
G30	946,53±24,67	655,15±14,89	2889,40±21,4
G31	1413,39±20,67	1169,41±22,47	2027,32±6,15
G4	184,21±4,64	122,96±2,72	1458,50±18

G6	1012,27±1,48	815,19±0,71	2015,08±25,6
G7	944,81±14,42	836,15±21,12	1603,63±70,2
G9	804,9±29,36	722,1±12,56	2641,62±10,8
G3-C2	957,11±0,58	761,09±1,35	2465,05±3,6
G6-C2	463,72±13,02	365,70±7,12	1211,76±4,6
G7-C2	922,19±9,97	749,91±12,53	3572,38±6,86
G17-C2	945,00±14,42	780,88±14,24	2966,55±22,1
G18-C2	703,95±26,72	549,34±17,90	1612,5±18
G20-C2	361,20±11,23	268,96±14,24	2356,88±10,8
G21-C2	206,93±9,09	133,53±7,12	1359,45±26,4
G23-C2	462,10±21,58	319,06±12,34	1612,77±18
CAU	1053,46±16,89	812,86±27,7	3175,17±79,9
CAL	898,31±34,66	749,04±31,24	2824,17±0,32
CAI	854,18±25,41	737,01±52,14	3256,01±34,8
CAP	451,3±0,98	258,18±12,75	1246,07±8,28
CPA	884,71±61,07	730,92±90,89	1863,77±23
CFA	728,22±4,97	545,6±1,23	1732,62±53,9
CA25	690,74±11,87	500,62±11,21	1479,67±46,72
CBA	739,63±19,32	563,09±12,03	1252,16±13,8
CAC	1101,91±9,74	924,33±11,30	1956,65±17,49
CAF	814,38±1,62	669,95±16,66	1858,69±8,27
ENTRESSAFRA 2016			
G11	322,1±1,39	227,2±2,51	1171±9,75
G6	448,5±0,88	241±2,43	1516±2,60
CAU	664,86±47,19	544,88±34,44	2149,36±0,95
CAL	481,71±12,80	360,17±9,53	1930,82±3,90
CAI	624,97±28,78	476,08±33,81	2029,37±19,76
CANM	405,11±3,52	272,69±1,64	2613,67±3,87
CPA	569,17±21,52	357,85±23,01	1619,42±5,90
CFA	624,58±28,94	480,81±33,69	1636,93±8,11
CA25	909,27±61,24	750,56±50,80	2413,63±3,86
CBA	593,57±53,33	426,30±38,71	1811,28±9,07
CAF	795,05±9,33	660,76±9,29	2202,49±25,58
CPDA	276,61±5,04	164,74±0,96	1373,40±4,85

CPDA-6h	113,05±0,028	82,62±0,07	1305,37±41,22
CPDA-12h	72,17±0,058	32,66±0,19	1178,23±20,55
SAFRA 2016			
G13	358,09±33,1	214,65±28,61	3197,97±6,40
CAU	761,62±68,59	480,86±70,90	2795,80±4,94
CAL	543,41±31,70	420,62±34,21	3665,29±5,89
CAI	664,35±19,01	520,21±56,41	2550,14±32,93
CANM	563,81±34,62	374,54±27,58	2628,74±6,52
CPA	781,40±85,03	508,30±216,88	2728,44±2,32
CFA	920,44±54,41	734,22±61,38	2640,08±6,55
CA25	534,0±31,70	383,71±66,84	2261,78±1,71
CBA	799,14±12,39	652,59±2,34	2913,32±5,23
CPDA	650,71±91,24	530,57±64,20	2955,34±2,52
CAF	590,58±66,74	348,73±10,13	3062,24±4,64
ENTRESSAFRA 2017			
CAU	449±0,86	400,08±1,29	2262,05±6,05
CAL	589,25±2,18	437,11±1,83	3040,83±2,25
CAI	902,96±0,25	716,74±0,42	3149,32±1,36
CANM	434,55±0,77	314,9±0,12	2973,26±3,32
CPA	425,77±0,44	296,46±1,27	2090,03±4,13
CFA	844,51±0,16	686,48±1,06	3177,14±7,16
CA25	482,61±1,49	357,13±3,07	4676,14±6,35
CBA	595,04±1,72	444,24±1,08	2045,37±6,51
CPDA	408,22±0,93	250,98±0,59	2064,24±3,46
CAF	479,73±1,0	342,37±1,35	2067,15±2,59

**CAPÍTULO 4 – USO DA EXTRAÇÃO ACELERADA POR SOLVENTE (ASE™ 350)
NA OBTENÇÃO DOS COMPOSTOS DA POLPA DO AÇAÍ COMERCIAL**

**1. IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS PRESENTES NOS EXTRATOS POR RMN
1D E 2D**

a) Extratos metanólico puro e metanólico (*clean-up* hexano)

TABELA 1 – Compostos identificados nos extratos metanólicos da polpa do açaí liofilizado obtidos por ASE 350.

n°	Composto	Próton	δ ¹ H em ppm (multiplicidade [#] , J em Hz)	COSY (δ ¹ H ppm)	HSQC (δ ¹³ C ppm)	HMBC (δ ¹³ C ppm)
Aminoácidos						
1	Leucina (Leu)	2	3,70 (m)	1,76	56,1	-
		5	0,97 (m)	1,76	25,3	41,7
2	Serina (Ser)	2	3,84 (m)	3,97	60,6	-
		3	3,97 (m)	3,84	62,6	-
3	Ácido glutâmico (Glu)	2	3,79 (dd, 6,45; 5,5)	-	58,50	-
		3a	2,0 (m)	-	30,14	-
		3b	2,10 (m)	-	30,96	-
		4	2,30 (m)	-	36,75	-
4	Tirosina (Tir)	2	3,94 (m)	-	58,9	-
		2', 6'	7,20 (m)	6,76	134,1	-
		3', 5'	6,76 (d, 8,5)	7,20	117,5	134,1
5	Alanina (Ala)	2	3,56 (q, 7,10)	1,46	-	-
		3	1,46 (d, 7,10)	3,58	25,9	54,0
6	Treonina (Treo)	3	3,50 (d, 5,0)	4,21	66,4	173,0
		2	4,21 (m)	3,50	66,0	173,0
Carboidratos						
7	α -glicose (α -gli)	1	5,08 (d, 3,50)	3,36	93,0	75,4; 77,1
		2	3,34 (m)	5,08	76,1	-
8	β -glicose (β -gli)	1	4,45 (d, 7,60)	3,12	96,0	-
		2	3,12* dd (7,80, 9,00)	4,45; 3,34	74,1	96,0
9	Frutose (Fru)	4	3,96 (m)	-	72,0	-
		5	4,02 (m)	-	75,3	62,5
Compostos Lipossolúveis						
10	Ésteres de ácidos graxos totais (AG)	F	0,88 (m)	1,28	16,3	-
		G	1,28 (m)	0,88; 1,59; 2,01;	26,0; 32,4	27,8
		D	1,59 (m)	1,27; 1,31; 2,32	27,8	30,7; 32,4; 172,0
		B	2,30 (dt, 7,40;7,50)	1,59	36,8	27,8; 172,0
11	Ésteres de ácidos graxos insaturados (AGI)	E	0,97 t (7,45)	-	16,3	-
		C	2,01 (m)	1,28; 2,30; 5,35	30,7	30,7; 128,0

		A	2,76 (m)	5,35	25,2	128,0
		H	5,35 (m)	2,76; 2,01	132,8	26,0
12	Glicerídeo (-CHO-)	β	5,25 (m)	4,14; 4,34	72,7	61,2; 174,1
	Glicerídeo (-CH ₂ O-)	α	4,14 dd (6,20; 11,95) 4,34 dd (4,40; 11,95)	5,25	61,61; 68,22	70,4; 172,7
Ácidos orgânicos						
13	Ácido ascórbico (Ac. Asc)	1'	3,98 (m)	3,65	71,62	-
		2'	3,62 – 3,65 (m)	3,98	63,95	-
		4	4,37 (m)	-	84,16	62,0
14	Ácido succínico (Suc)	2, 3	2,55 (s)	-	32,5	-
15	Ácido p-hidroxifenilacético (Ác. p-hfa)	3'	6,75 (m)	7,10	-	151,0
Outros						
16	Colina (Col)	N-(CH ₃) ₃	3,19 (s)	-	54,81	71,4
17	Glicerofosocolina (GPC)	N-(CH ₃) ₃	3,20 (s)	-	54,70	69,4
18	Uracila (Ura)	6	7,98 (d, 8,0)	5,70	-	-
		5	5,70 (d, 8,0)	8,00	-	-

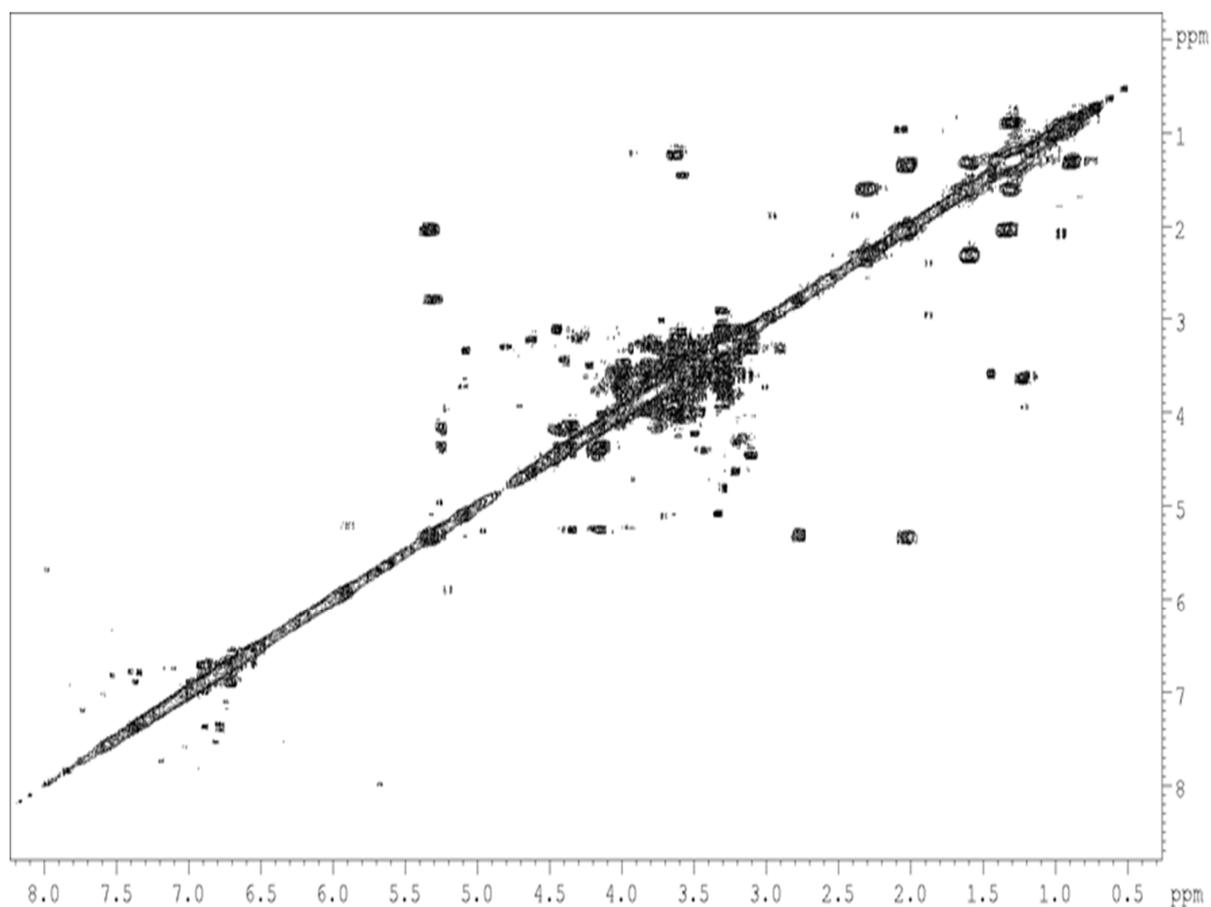


Figura 1 – Mapa de contorno COSY do extrato metanólico desengordurado com hexano. MeOH-*d*₄ em um equipamento 400 MHz.

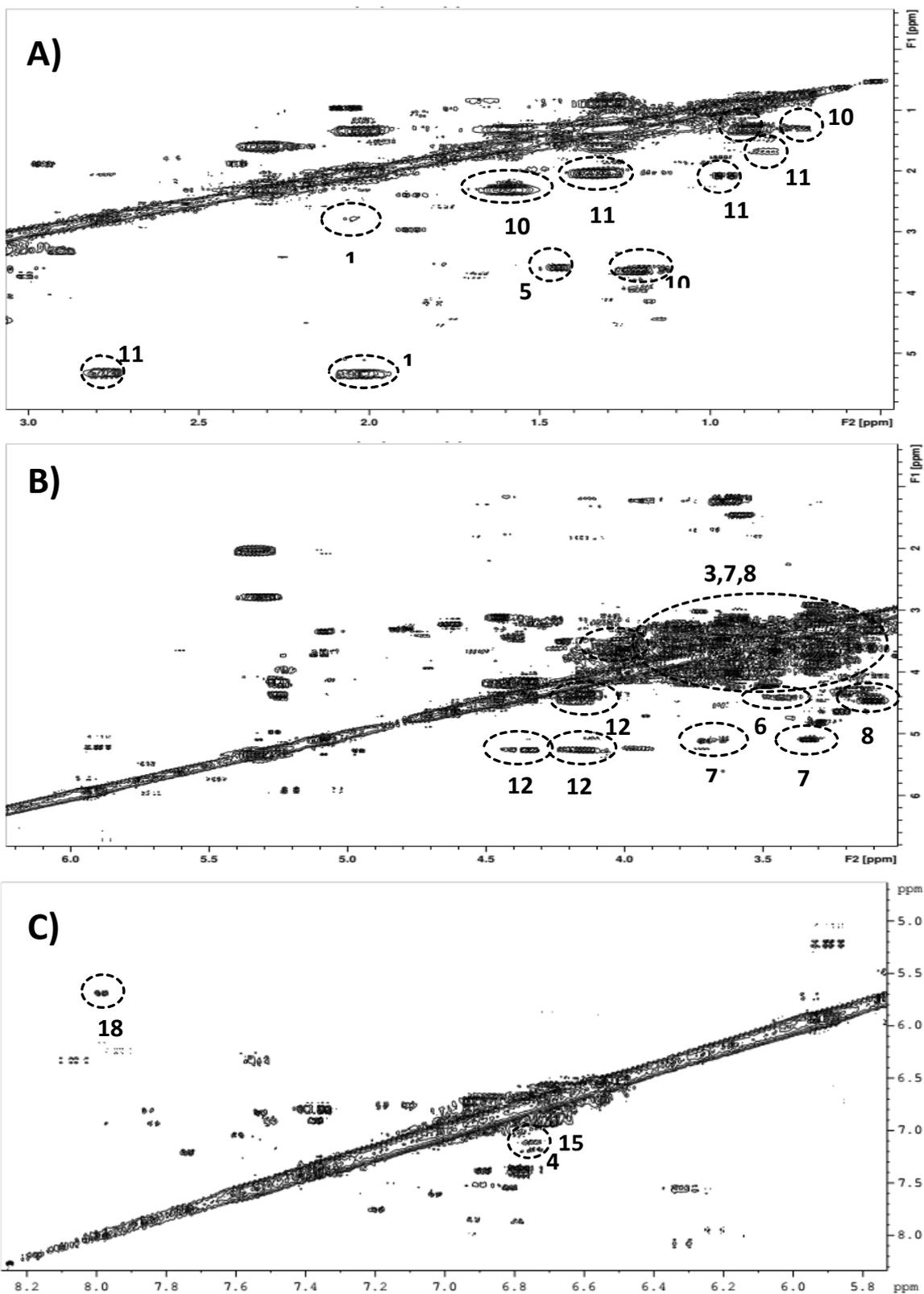


Figura 2 – Expansão do mapa de contorno COSY do extrato metanólico desengordurado com hexano. Regiões A) 0,0 a 3,0ppm; B) 3,0 – 6,0 ppm e C) 5,8 - 8,2 ppm. Compostos: **3**, Glu; **5**, Ala; **6**, Treo; **7**, α -gli; **8**, β -gli; **9**, Fru, **10**, AG; **11**, AGI; **12**, Glicerideo; **13**, Ác. asc; **15**, Ác. *p*-HFA; **18**, Ura.

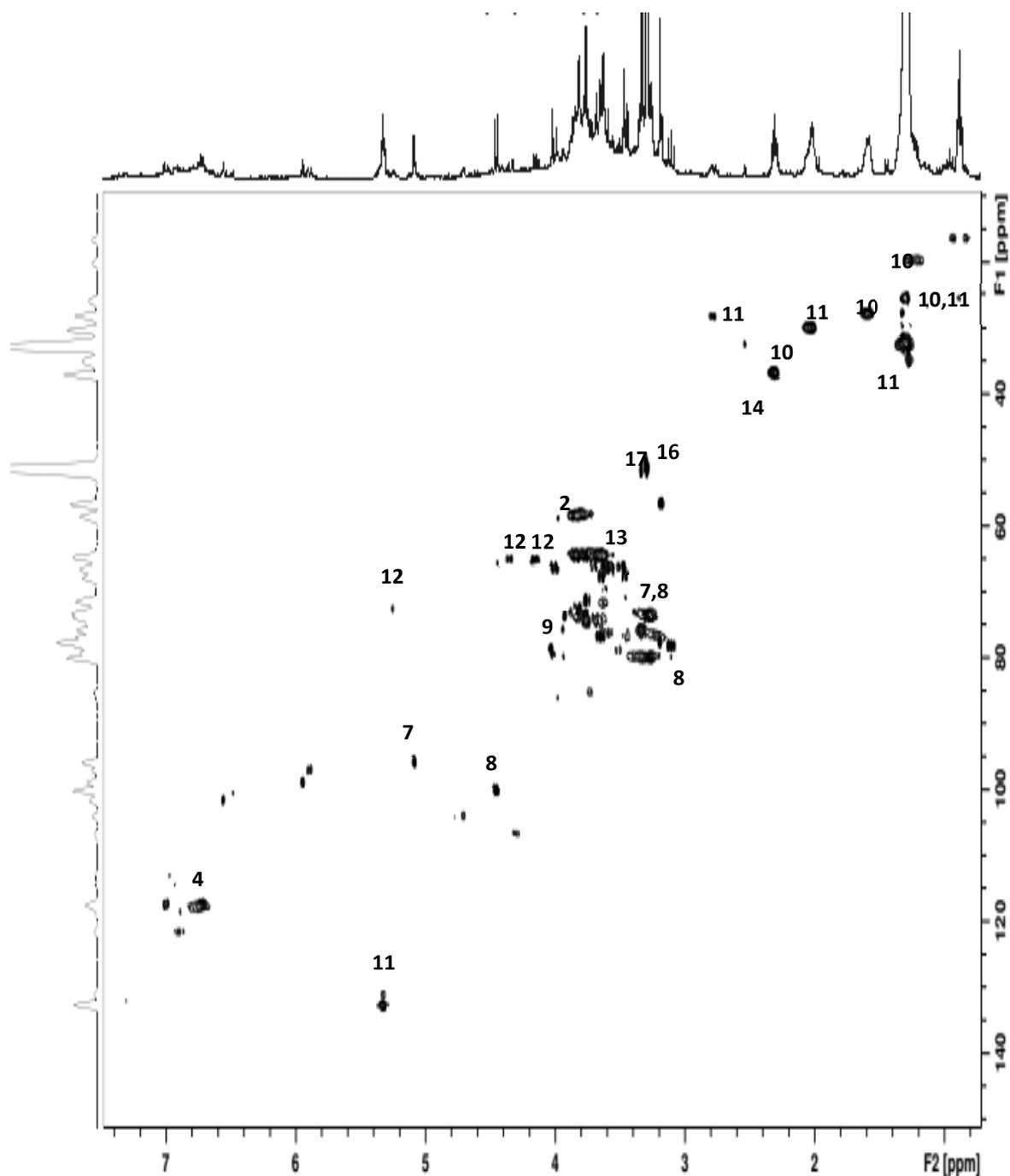


Figura 3 – Mapa de contorno HSQC ^1H - ^{13}C do extrato metanólico desengordurado com hexano. $\text{MeOH-}d_4$ em um 400 MHz. Compostos: **2**, Ser; **4**, Tir; **7**, α -gli; **8**, β -gli; **9**, Fru; **10**, AG; **11**, AGI; **12**, Glicerideo; **13**, Ác. asc; **14**, Suc; **16**, Col e **17**, GPC.

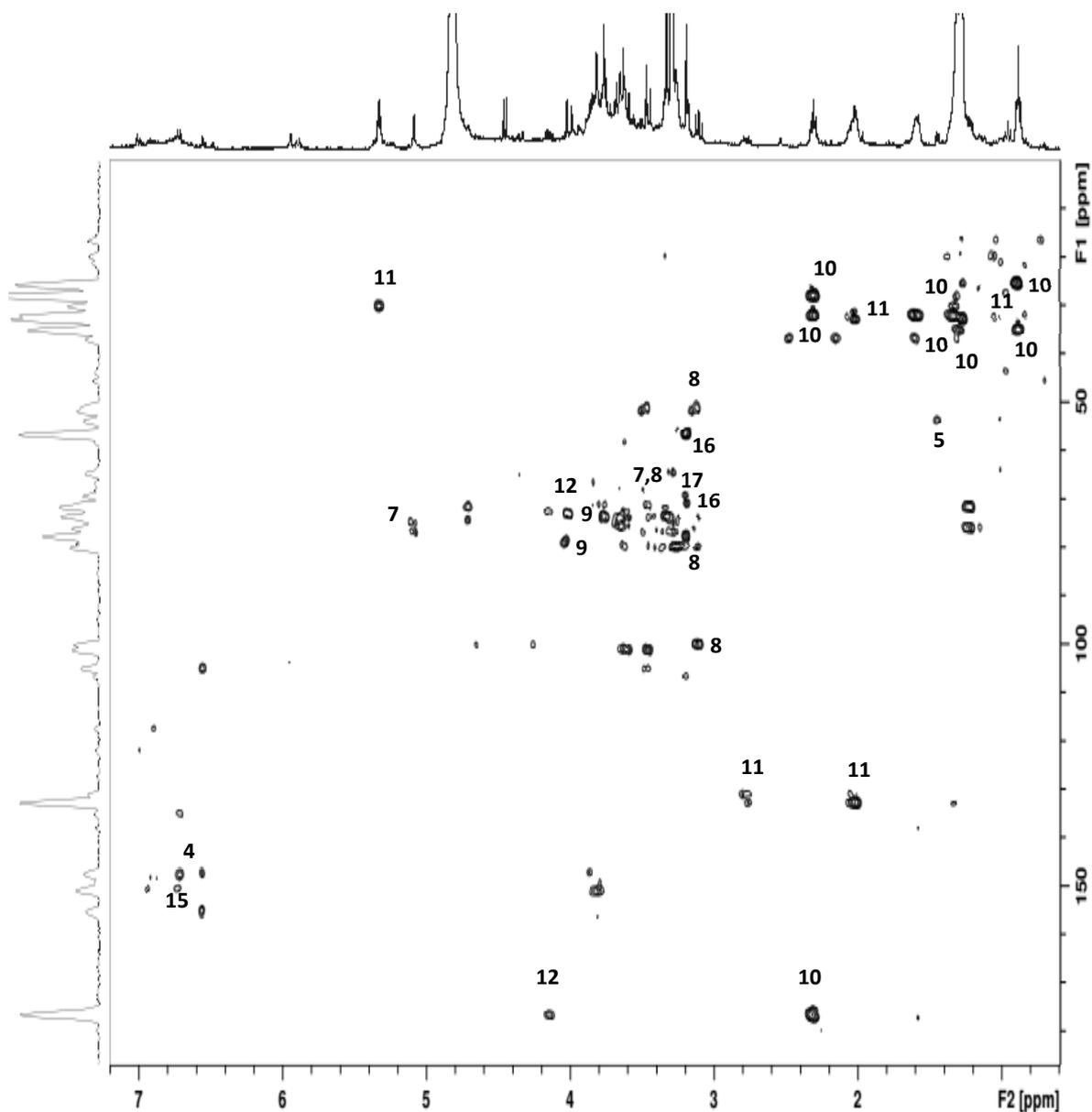


Figura 4 – Mapa de contorno HMBC ^1H - ^{13}C do extrato metanólico desengordurado com hexano. $\text{MeOH-}d_4$ em um 400 MHz. Compostos: **4**, Tir; **5**, Ala; **6**, Treo; **7**, α -gli; **8**, β -gli; **9**, Fru, **10**, AG; **11**, AGI; **12**, Glicerideo; **13**, Ác. asc; **14**, Suc; **15**, Ác. p-hfa; **16**, Col e **17**, GPC.

CAPÍTULO 5 - USO DO LC-DAD-SPE/NMR NO MODO DE OPERAÇÃO *TIME-SLICE* PARA O ISOLAMENTO DE COMPOSTOS MINORITÁRIOS DA POLPA DO AÇAÍ

1. DESENVOLVIMENTO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

1.1. ETAPA 1: PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

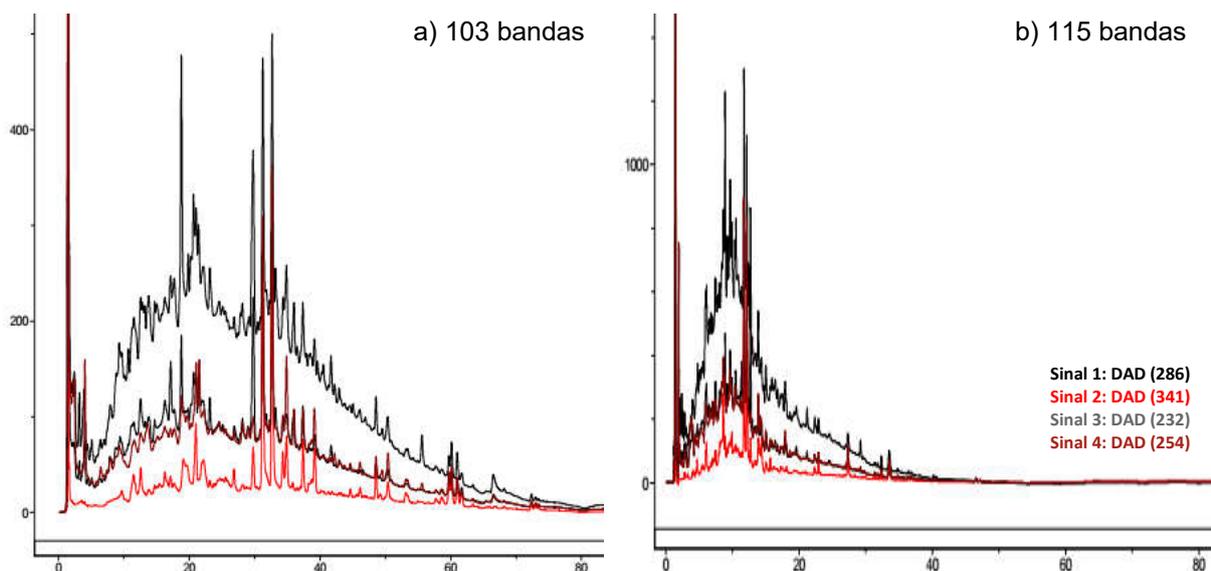


Figura 1 – Cromatograma do extrato da polpa do açai. Coluna 1 (Eclipse XDB C18 4,6 x 125 mm). 35°C. Vazão de 1,0 mL. min⁻¹. Exploratório de 5 – 100% B. a) Solvente A (H₂O) e solvente B (MeOH); b) Solvente A (H₂O) e solvente B (ACN). Gradiente de eluição (G=0,79).

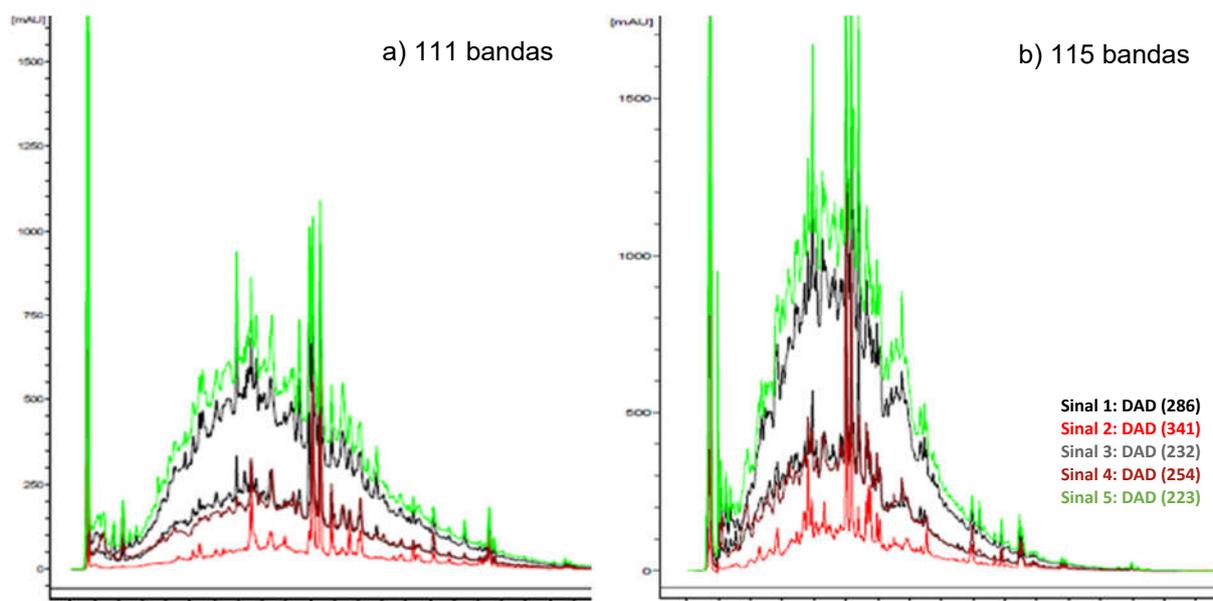


Figura 2 – Cromatograma do extrato da polpa do açai. Coluna 1 (Eclipse XDB C18 4,6 x 125 mm). 35°C. Vazão de 1,0 mL. min⁻¹. Exploratório de 5 – 100% B. a) Solvente A (H₂O) e solvente B (MeOH); b) Solvente A (H₂O) e solvente B (ACN). Inclinação do gradiente de eluição (G=1,58).

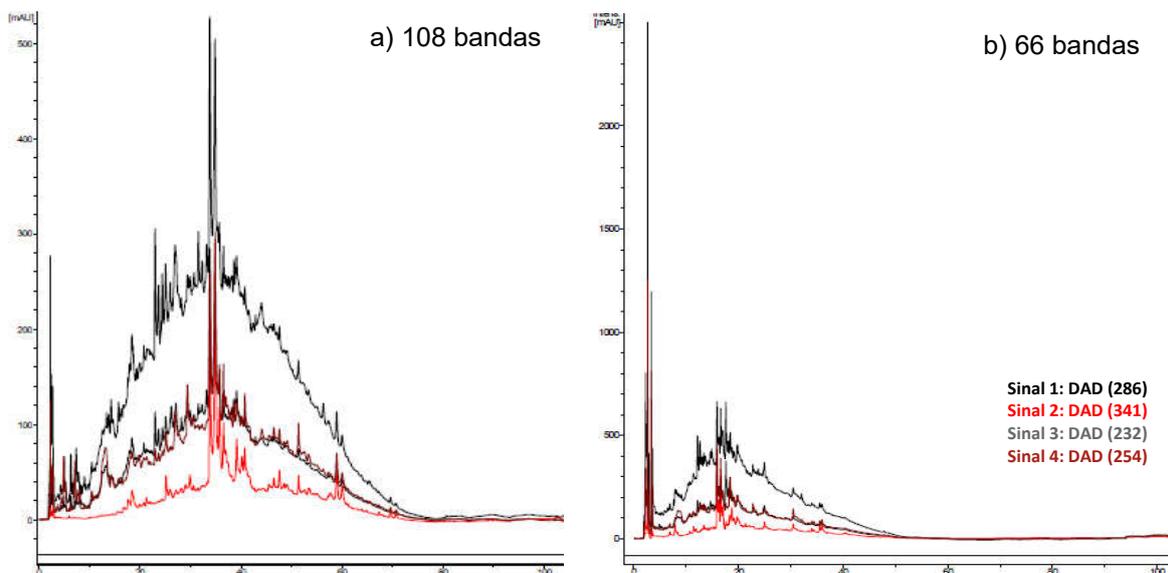


Figura 3 – Cromatograma do extrato da polpa do açai. Coluna 2 (Kromasil C18 4,6 x 250 mm). 35°C. Vazão de 1,0 mL. min⁻¹. Exploratório de 5 – 100% B. a) Solvente A (H₂O) e solvente B (MeOH); b) Solvente A (H₂O) e solvente B (ACN). Inclinação do gradiente de eluição (G=0,95).

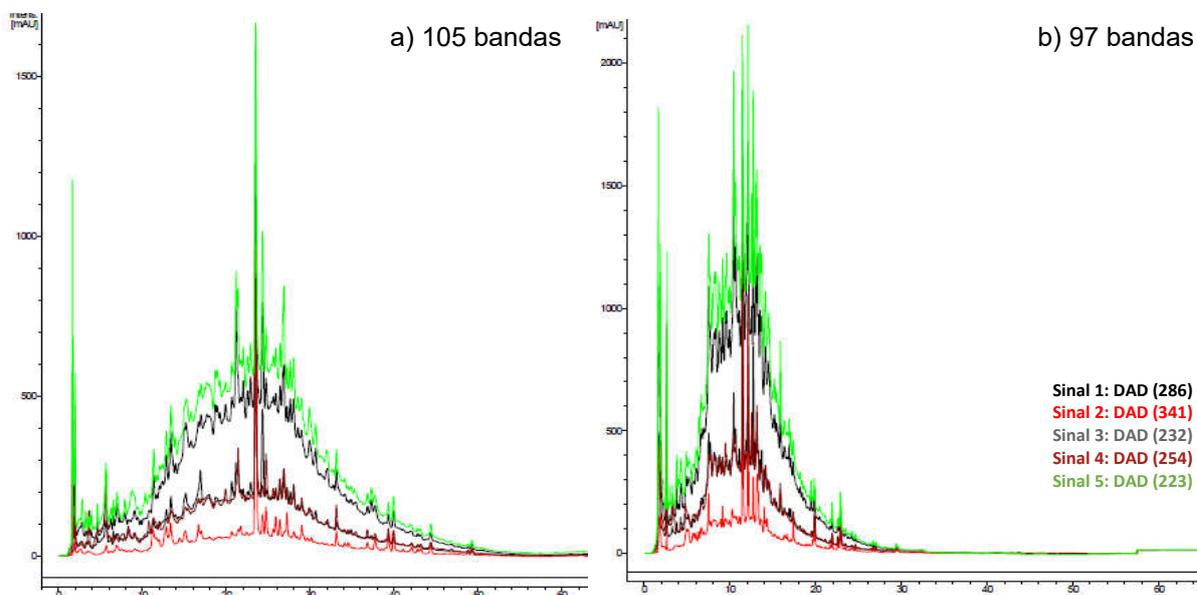


Figura 4 – Cromatograma do extrato da polpa do açai. Coluna 3 (Kromasil C18 4,6 x 250 mm). 35°C. Vazão de 1,0 mL. min⁻¹. Exploratório de 5 – 100% B. a) Solvente A (H₂O) e solvente B (MeOH); b) Solvente A (H₂O) e solvente B (ACN). Inclinação do gradiente de eluição (G=1,58).

1.2. ETAPA 2: OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

a) Análise da temperatura do forno

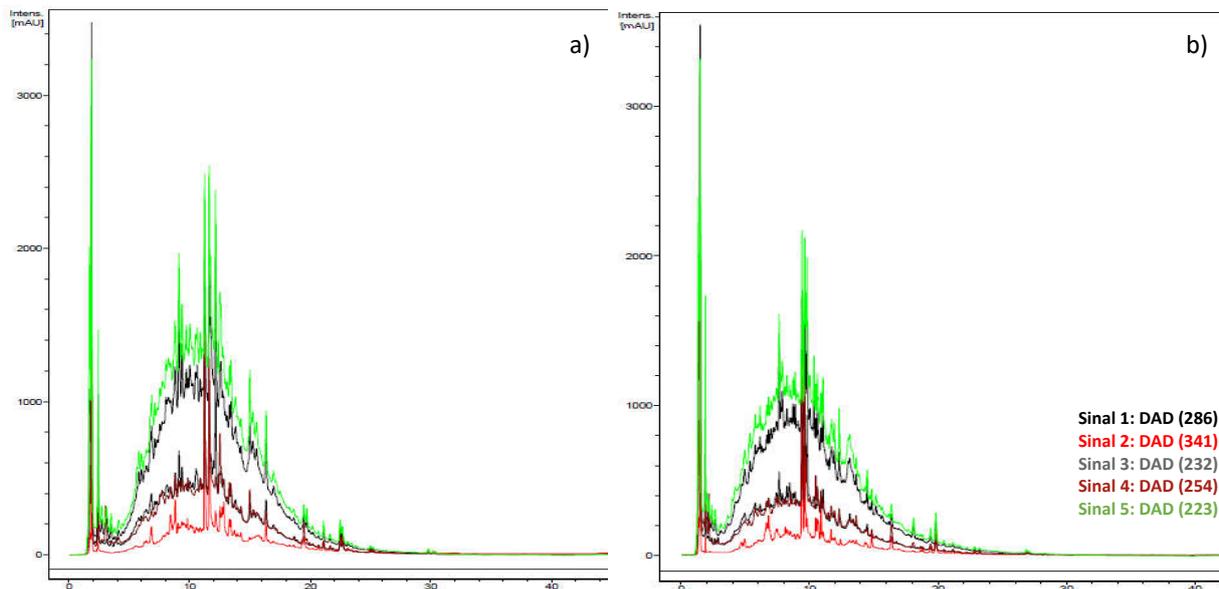


FIGURA 5 - Cromatograma do extrato metanólico da polpa do açai por ASE 350 com temperatura de forno em a) 35°C e b) 55°C. 1 mL.min⁻¹. Tempo de análise 60 min. Solvente A (H₂O) e solvente B (ACN).

b) Análise da fase móvel acidificada

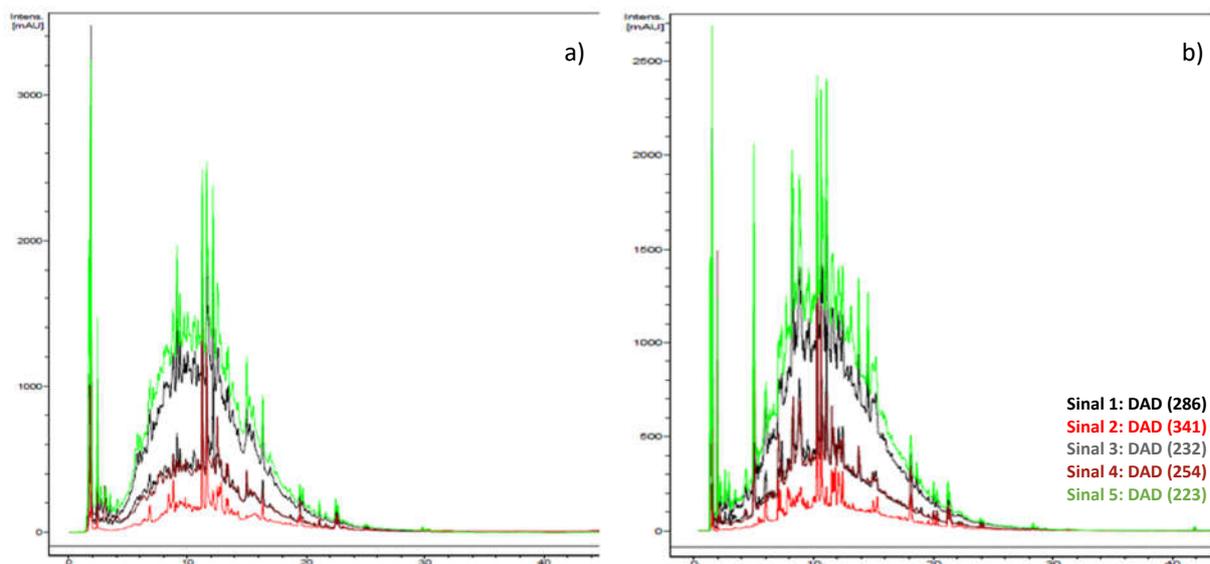


FIGURA 6 - Cromatograma do extrato metanólico da polpa do açai por ASE 350. 1 mL.min⁻¹. 35°C. Tempo de análise 60 min. Fase móvel: a) Solvente A (H₂O + 0,025% TFA) e solvente B (ACN + 0,025% TFA) e, b) fase móvel sem ácido.

c) Análise da inclinação da fase móvel

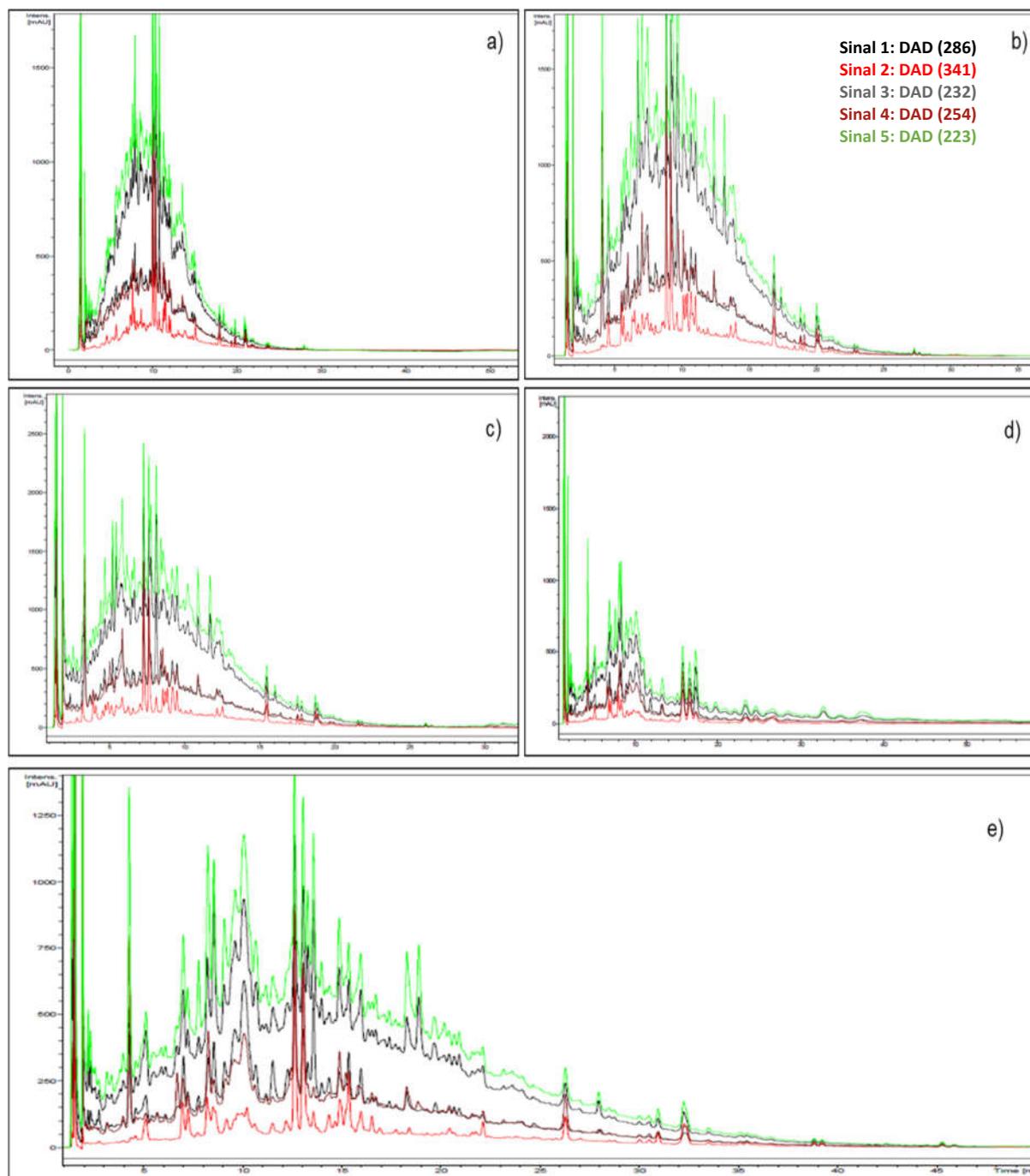


FIGURA 7 – Cromatograma do extrato metanólico da polpa do açaí por ASE 350. Solvente A ($H_2O + 0.025\%$ TFA) e solvente B (ACN + 0.025% TFA). $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. 35°C . Tempo de análise 60 min. Gradiente de eluição a) 5 – 100% de B; b) 7,5 – 100% de B; c) 10 -100% de B, d) Eluição isocrática 7,5% de B e e) 7,5 – 54% de B

d) Análise da vazão da fase móvel

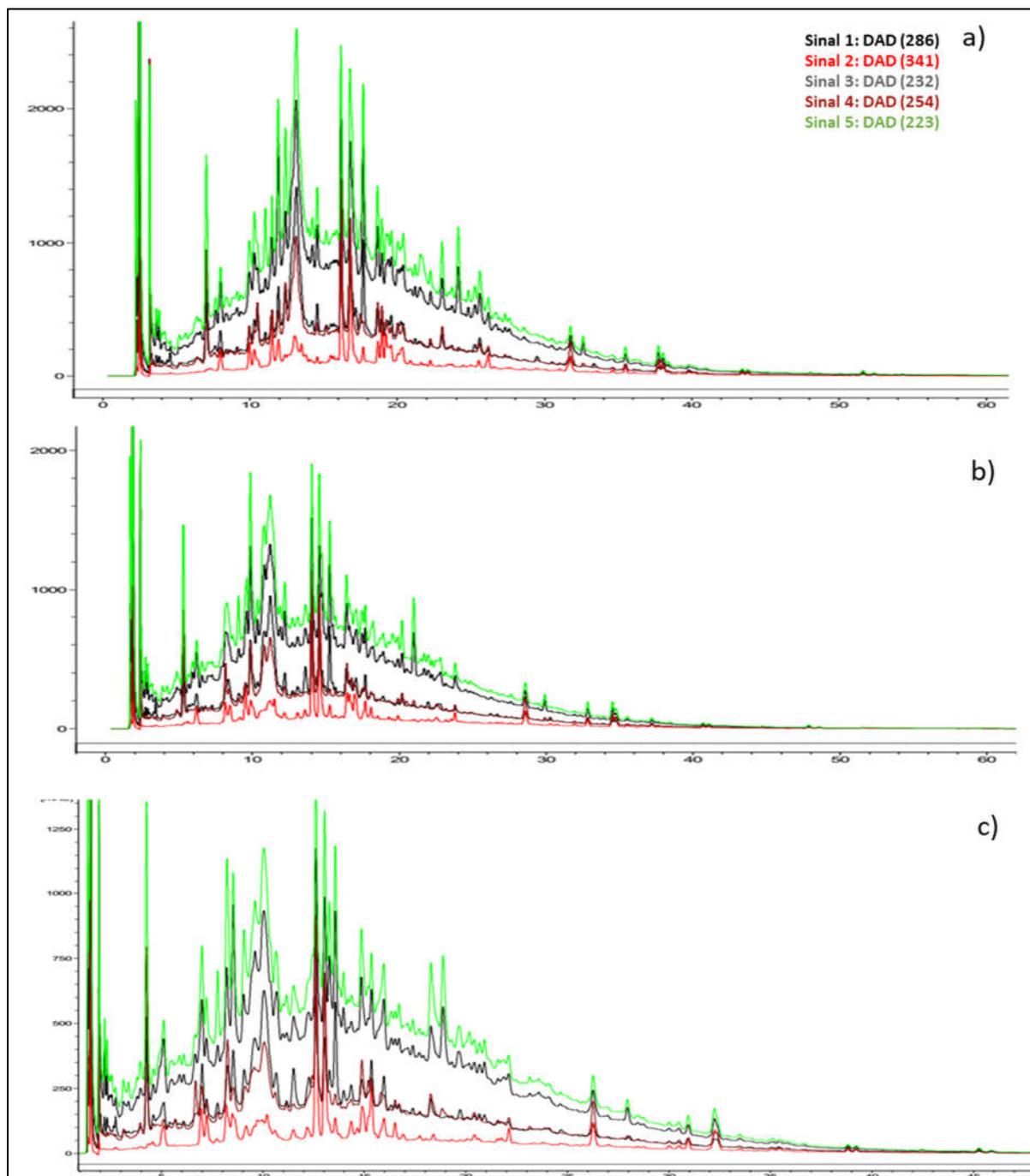


FIGURA 8 – Cromatograma do extrato metanólico da polpa do açaí por ASE 350. Solvente A ($H_2O + 0.025\%$ TFA) e solvente B ($ACN + 0.025\%$ TFA). $35^\circ C$. Tempo de análise 60 min. Gradiente de eluição 7,5 – 54% de B. Vazão da fase móvel a) $0,6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; b) $0,8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e c) $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.