

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

**“Análise da sazonalidade e regionalidade em suco
de laranja natural por ressonância magnética
nuclear (RMN) e quimiometria”**

Clayton Rodrigues de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira

**São Carlos - SP
2017**

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

**“Análise da sazonalidade e regionalidade em suco
de laranja natural por ressonância magnética
nuclear (RMN) e quimiometria”**

Clayton Rodrigues de Oliveira

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

Orientador: Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira

**São Carlos - SP
2017**




UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia


Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

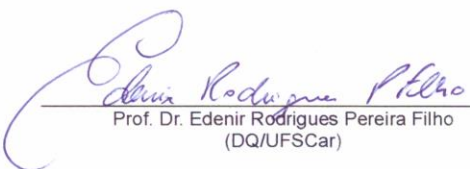
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de tese de doutorado do candidato Clayton Rodrigues de Oliveira, realizada em 27/10/2017:



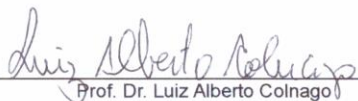
Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira
(DQ/UFSCar)



Prof. Dr. Marcos Roberto Monteiro
(DEMec/UFSCar)



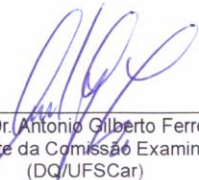
Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho
(DQ/UFSCar)



Prof. Dr. Luiz Alberto Colnago
(CNPDIA/EMBRAPA)

Prof. Dr. Andersson Barison
(DQ/UFPR)

Certifico que a sessão de defesa foi realizada com a participação à distância do membro Prof. Dr. Andersson Barison e, depois das arguições e deliberações realizadas, o participante à distância está de acordo com o conteúdo do parecer da comissão examinadora redigido no relatório de defesa do aluno Clayton Rodrigues de Oliveira.



Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira
Presidente da Comissão Examinadora
(DQ/UFSCar)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho em especial aos meus pais, a minha irmã e a todos meus familiares e amigos por estarem sempre comigo nos momentos importantes da minha vida.

EPÍGRAFE

Não tenha medo de arriscar, escolha um caminho, lute com perseverança e dedicação até o fim, pois verás que seus sonhos serão realizados.

Clayton R. de Oliveira

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todo dia me abençoar, ampliar meus horizontes e iluminar nessa vida que é tão curta.

Aos meus pais, minha irmã, minha avó e familiares por todo amor, carinho, força e dedicação em todos os momentos da minha vida. Pois sempre apostaram, apoiaram e estiveram do meu lado nas minhas decisões, além da alegria que sentem em presenciar todas as minhas conquistas.

Ao professor Dr. Antonio Gilberto Ferreira pela orientação, ensinamentos pessoais e profissionais, amizade e conhecimentos transmitidos durante a realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Tiago Venâncio pelos ensinamentos, amizade, críticas e sugestões.

Aos companheiros do laboratório de RMN e todos os colegas do departamento de química pela amizade, discussões, aprendizado e colaborações.

Aos técnicos do laboratório de RMN, Dona Lú e Sr. Paulo pela amizade, ensinamentos e descontrações ao longo destes anos.

A todos os professores e funcionários do DQ-UFSCar que de alguma forma colaboraram de forma direta ou indireta para o desenvolvimento deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

δ	Deslocamento químico
apk0.noe	Algoritmo para correção automática de fase e linha de base em experimentos com efeito nuclear Overhauser
aq	Tempo de aquisição
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-RMN	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Ressonância Magnética Nuclear
CLAE-RMN-EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Ressonância Magnética Nuclear e Espectrometria de Massas
CV	<i>Cross Validation</i> – Validação Cruzada
CVR ²	Coeficiente de Correlação Linear com Validação Cruzada
DNP	<i>Dynamic Nuclear Polarization</i>
d1	Tempo de espera entre cada aquisição
d8	Tempo de mistura
DMP	Dimetilprolina
ds	<i>Dummy scan</i>
EM	Espectrometria de Massas
GABA	Ácido gama-aminobutírico
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
GLX	Ácido Galacturônico
HMF	5-Hidroximetilfurfural
IV	Espectroscopia na região do infravermelho
Ib	Fator de multiplicação exponencial aplicada no FID
MAPA	Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento

n.O.e	<i>Nuclear Overhauser Effect</i> – Efeito Nuclear <i>Overhauser</i>
ns	Número de promediações
O1	Frequência de irradiação
p0	Duração do pulso de radiofrequência – Pulso de 90°, com fase diferente de p1.
p1	Duração do pulso de radiofrequência – Pulso de 90°, com fase diferente de p0.
PC	<i>Principal Component</i> – Componente Principal
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> – Análise de Componentes Principais
pldb9	Atenuação do pulso de pré-saturação em Decibéis
PLS-DA	<i>Partial Least Squares Discriminant Analysis</i> – Análises Discriminantes por Mínimos Quadrados Parciais
PULCON	Rotina automática para Cálculo do pulso de 90°
R²	Coefficiente de Correlação Linear
RG	Ganho do receptor
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMSEC	<i>Root Mean Square Error of Calibration</i> – Erro Quadrático Médio de Calibração
RMSECV	<i>Root Mean Square Error of Validation</i> – Erro Quadrático Médio de Validação
si	Número de pontos utilizados no processamento dos espectros
SNIF-NMR	<i>Site Specific Natural Isotopic Fractionation studied by Nuclear Magnetic Resonance</i>
sw	Janela espectral em ppm
swh	Janela espectral em Hertz
SGF	<i>Sure Global Fair</i>
td	Número de pontos utilizados na aquisição do espectro
TMSP-d4	Trimetilsililpropionato de sódio deuterado
UV	Espectroscopia na região do Ultravioleta
USDA	<i>United States Department Agricultural</i> – Departamento de Agricultura dos Estados Unidos

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Amostras de suco de laranja integral para as variedades tardias coletadas durante a safra de 2013.....	12
Tabela 2: Amostras de suco de laranja integral para as variedades precoces e tardias coletadas durante a safra de 2014.	13
Tabela 3: Metabólitos caracterizados nas amostras de suco de laranja natural.....	37
Tabela 4: Parâmetros obtidos durante a construção do modelo PLS-DA para classificação das amostras de suco de laranja fresco em função do ano da safra. .	55
Tabela 5: Parâmetros obtidos durante a construção do modelo PLS-DA para classificação das amostras de suco de laranja fresco referente às variedades de laranja natal e valência nas 3 diferentes regiões estudadas na safra de 2013.	58
Tabela 6: Parâmetros obtidos durante a construção do modelo PLS-DA para classificação das amostras de suco de laranja fresco referente ao tipo de laranja: precoce (classe 1) ou tardia (classe 2) na safra de 2014.	59
Tabela 7: Parâmetros obtidos durante a construção do modelo PLS-DA para classificação das amostras de suco de laranja precoce referente às variedades precoces: hamlin (classe 1) e pera (classe 2) na safra de 2014.....	61
Tabela 8: Parâmetros obtidos durante a construção do modelo PLS-DA para classificação das amostras de suco de laranja tardia referente às variedades precoces: natal (classe 1) e valência (classe 2) na safra de 2014.	62
Tabela 9: Parâmetros obtidos durante a construção do modelo PLS-DA para classificação das amostras de suco de laranja hamlin referente à região 1 (classe 1), região 2 (classe 2) e região 3 (classe 3) na safra de 2014.....	65
Tabela 10: Parâmetros obtidos durante a construção do modelo PLS-DA para classificação das amostras de suco de laranja pera referente à região 1 (classe 1), região 2 (classe 2) e região 3 (classe 3) na safra de 2014.....	67
Tabela 11: Parâmetros obtidos durante a construção do modelo PLS-DA para classificação das amostras de suco de laranja natal referente à região 1 (classe 1), região 2 (classe 2) e região 3 (classe 3) na safra de 2014.....	69
Tabela 12: Parâmetros obtidos durante a construção do modelo PLS-DA para classificação das amostras de suco de laranja valência referente à região 1 (classe 1), região 2 (classe 2) e região 3 (classe 3) na safra de 2014.....	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Maiores produtores mundiais de laranja, exportadores e produtores de suco de laranja, e importadores mundiais de suco de laranja concentrado a 65°Brix.2

Figura 2: Estrutura química da Dimetilprolina e Florina..... 6

Figura 3: Origem geográfica da coleta das amostras de suco de laranja integral. Representação 1 no mapa corresponde a região 1 (localização -20.7096, -48.53182), 2 corresponde a região 2 (localização -21.78482, -48.17864) e 3 corresponde a região 3 (localização -22.33799, -47.17337)..... 11

Figura 4: Ilustração da coleta das amostras nos diferentes talhões para cada região monitorada..... 12

Figura 5: Representação para a sequência de pulsos *noesygppr1d* denominação Bruker. a) escrita e b) gráfica. $TE(d1)$ = tempo de espera entre cada promediação; P_1 e P_0 = pulsos de 90° com diferentes fases; Tm (d8) = tempo de mistura; t_{G1} e t_{G2} = pulsos de gradiente de campo; AQ = tempo de aquisição. 15

Figura 6: Representação da sequência de pulso *jresgpprqf* denominação Bruker. a) escrita e b) gráfica. $TE(d1)$ = tempo de espera entre cada promediação; P_1 = pulso de 90°; P_2 = pulso de 180°; t_0 = tempo de evolução; t_{G1} e t_{G2} = pulsos de gradiente de campo; AQ = tempo de aquisição. Eu Já tinha feito essa correção e você partiu da MERDA da sua versão e não da minha..... 16

Figura 7: Representação dos pontos de dados na região de 1,12 – 1,20 ppm em um espectro de RMN de 1H , referente ao sinal do grupo metila do etanol numa amostra típica de suco de laranja integral. a) Cada intervalo de 16 Hz corresponde há ~262 pontos de dados no espectro, b) enquanto que após gerar a *bucket table* cada intervalo de 16 Hz corresponde apenas a 1 variável..... 17

Figura 8: Representação dos pontos de dados na região de 1,12 – 1,20 ppm em um espectro de RMN de 1H , referente ao sinal do grupo metila do etanol numa amostra típica de suco de laranja integral. a) Cada intervalo de 16 Hz corresponde há ~262 pontos de dados no espectro, b) enquanto que após utilizar cada ponto de dado para gerar uma *bucket table*, cada intervalo de 16 Hz corresponde a mesma quantidade variáveis (~262 variáveis). 18

Figura 9: Gráfico da calibração da temperatura experimental entre o período de 2013 a 2015 para o equipamento de RMN com a amostra TEMPCAL. 22

Figura 10: Gráfico para verificação do funcionamento do gradiente de campo entre fevereiro/2013 e maio/2015 para o equipamento de RMN com a amostra *Water Supression*..... 23

Figura 11: Gráfico para verificação do pulso de 90° entre fevereiro/2013 e setembro/2014 para o equipamento de RMN com a amostra *Water Supression*..... 24

Figura 12: Gráfico para verificação da supressão do sinal do solvente (água) entre outubro/2013 e maio/2015 para o equipamento de RMN com a amostra <i>Water Supression</i>	24
Figura 13: Gráfico para verificação da largura de linha espectral através da meia altura do sinal do TMS- d_4 em 0,00 ppm no espectro de RMN de 1H entre maio/2013 e setembro/2014 para o equipamento de RMN com a amostra <i>Water Supression</i> ..	25
Figura 14: Gráfico para verificação da qualidade espectral através da relação sinal/ruído no espectro de RMN de 1H após o ajuste da presaturação do sinal do solvente (água) entre outubro /2013 e setembro/2014.....	26
Figura 15: (a) Gráfico para verificação da concentração do ácido málico na amostra QUANTREF através dos sinais em 4,59 ppm (dd) e 2,89 ppm (dd) no espectro de RMN de 1H entre abril/2014 e janeiro/2015. (b) Visão geral do espectro de RMN de 1H da amostra QUANTREF contendo 20 mM de ácido gálico e 60 mM de ácido málico em H_2O , com expansão dos sinais 2 e 3 referentes ao ácido málico.....	28
Figura 16: (a) Gráfico para verificação da concentração do ácido gálico na amostra QUANTREF através do sinal em 7,16 ppm (s) no espectro de RMN de 1H entre abril/2014 e janeiro/2015. (b) Visão geral do espectro de RMN de 1H da amostra QUANTREF contendo 20 mM de ácido gálico e 60 mM de ácido málico em H_2O , com expansão do sinal 1 referente ao ácido gálico.....	29
Figura 17: Visão geral para os espectros de RMN de 1H das amostras de suco de laranja natural das variedades hamlin (a), pera (b), natal (c) e valência (d) na região de 9,0 a 0,0 ppm.....	30
Figura 18: Visão expandida em 256 vezes para os espectros de RMN de 1H das amostras de suco de laranja natural das variedades hamlin (a), pera (b), natal (c) e valência (d) na região de 10,0 a 6,0 ppm.	31
Figura 19: Visão expandida em 64 vezes para os espectros de RMN de 1H das amostras de suco de laranja natural das variedades hamlin (a), pera (b), natal (c) e valência (d) na região de 2,7 a 0,5 ppm.	32
Figura 20: Caracterização dos metabólitos encontrados no suco de laranja natural da variedade valência via RMN de 1H nas faixas de 2.9 a 0.5 ppm (a), 6.0 a 3.0 ppm (b) e 9.0 a 6.0 ppm (c), de acordo com a Tabela 3.	34
Figura 21: Visão geral do mapa de correlação homonuclear 1H - 1H (gCOSY) de uma amostra de suco de laranja natural da variedade natal. Retirar. Eu já havia corrigido isso.	35
Figura 22: Visão geral do mapa de correlação heteronuclear direta 1H - ^{13}C (gHSQC) de uma amostra de suco de laranja natural da variedade natal. Retirar. Eu já havia corrigido isso.	35

Figura 23: Visão geral do mapa de correlação heteronuclear a longas distâncias 1H-13C (gHMBC) de uma amostra de suco de laranja natural da variedade natal..... 36

Figura 24: Estrutura química dos metabólitos caracterizados nas amostras de suco de laranja natural..... 39

Figura 25: (a) Gráfico de escores da PC1 (91,0%) x PC3 (0,5%) para amostras de suco de laranja natal da safra 2013 nas regiões 1, 2 e 3, bem como os gráficos de pesos (b) das PC's 1, 2 e 3 destacando as variáveis de maior importância na análise da PCA. As setas indicadas na figura (b) correspondem aos metabólitos: 1 – sacarose, 2 – α -glicose, 3 – β -glicose, 4 – ácido cítrico e 5 – etanol..... 41

Figura 26: (a) Gráfico de escores da PC1 (91,0%) x PC2 (7,0%) para amostras de suco de laranja valência da safra 2013 nas regiões 1, 2 e 3, bem como os gráficos de pesos (b) das PC's 1, 2 e 3 destacando as variáveis de maior importância na análise da PCA. As setas indicadas na figura (b) correspondem aos metabólitos: 1 – sacarose, 2 – α -glicose, 3 – β -glicose, 4 – ácido málico, 5 – ácido cítrico e 6 – etanol..... 42

Figura 27: Período de coleta das amostras de suco de laranja fresco durante a safra de 2014 para as variedades de laranja hamlin, pera, natal e valência. 43

Figura 28: Gráfico de escores da PC1 (65,38%) x PC2 (18,72%) e PC2 (16,70%) x PC3 (11,58%) para amostras de suco de laranja hamlin (a) e pera (d) na safra de 2014 região 1, respectivamente. Gráficos de pesos das PC's 1 e 2 (b e c) e PC's 2 e 3 (e e f) para as amostras de suco e laranja hamlin e pera, respectivamente..... 45

Figura 29: Gráfico de escores da PC1 (41,02%) x PC2 (20,57%) e PC1 (51,29) x PC2 (17,14%) para amostras de suco de laranja hamlin (a) e pera (d) na safra de 2014 região 2, respectivamente. A soma dos valores obtidos para a variância explicada foi de 61,59% e 68,43% para as 2 primeiras PC's dos sucos das laranjas hamlin e pera, respectivamente. Gráficos de pesos das PC's 1 e 2 das amostras de suco de laranja hamlin (b e c) e pera (e e f). 46

Figura 30: Gráfico de escores da PC1 (21,22%) x PC2 (18,52%) e PC1 (54,52) x PC2 (13,00%) para amostras de suco de laranja hamlin (a) e pera (d) na safra de 2014 região 3, respectivamente. Gráficos de pesos das PC's 1 e 2 das amostras de suco de laranja hamlin (b e c) e pera (e e f). 48

Figura 31: Gráfico de escores da PC1 (71,29%) x PC2 (9,84%) e PC1 (43,74) x PC2 (26,43%) para amostras de suco de laranja natal (a) e valência (d) na safra de 2014 região 1, respectivamente. Gráficos de pesos das PC's 1 e 2 das amostras de suco de laranja hamlin (b e c) e pera (e e f)..... 49

Figura 32: Gráfico de escores da PC1 (75,44%) x PC2 (6,81%) e PC2 (22,95%) x PC3 (10,85%) para amostras de suco de laranja natal (a) e valência (d) na safra de 2014 região 2, respectivamente. Gráficos de pesos das PC's 1, 2 e 3 das amostras de suco de laranja natal (b e c) e valência (e e f). 51

Figura 33: Gráfico de escores da PC1 (31,58%) x PC2 (30,92%) e PC1 (38,64%) x PC2 (23,12%) para amostras de suco de laranja natal (a) e valência (d) na safra de 2014 região 3, respectivamente. Gráficos de pesos das PC's 1 e 2 das amostras de suco de laranja natal (b e c) e valência (e e f).....	53
Figura 34: Esquema ilustrativo para classificação das amostras de suco de laranja fresco em função do ano da safra, do tipo de laranja, da variedade e da região de coleta utilizando a classificação por PLS-DA.....	54
Figura 35: Gráficos de classificação das amostras de suco laranja fresco referente à safra de 2013 (cor vermelho) e safra 2014 (cor verde) utilizando PLD-DA.	55
Figura 36: Gráficos de classificação das amostras de suco laranja fresco referente às variedades de laranja natal e valência nas 3 diferentes regiões estudadas na safra de 2013 utilizando PLD-DA. (a) e (b) variedades natal e valência região 1; (c) e (d) variedades natal e valência região 2, (e) e (f) variedades natal e valência região 3.	57
Figura 37: Gráficos de classificação das amostras de suco laranja fresco referente ao tipo de laranja: precoce (cor vermelho) e tardia (cor verde) na safra de 2014 utilizando PLD-DA.	59
Figura 38: Gráficos de classificação das amostras de suco laranja precoce referente às variedades: hamlin (cor azul escuro) e pera (cor azul claro) na safra de 2014 utilizando PLD-DA.	60
Figura 39: Gráficos de classificação das amostras de suco de laranja tardia referente às variedades: natal (cor branco) e valência (cor vermelho escuro) na safra de 2014 utilizando PLD-DA.	61
Figura 40: Gráficos de classificação das amostras de suco de laranja hamlin referente (a) à região 1 (cor verde), (b) região 2 (cor vermelho) e (c) região 3 (cor azul) da safra de 2014 utilizando PLD-DA.....	64
Figura 41: Gráficos de classificação das amostras de suco de laranja pera referente (a) à região 1 (cor verde), (b) região 2 (cor vermelho) e (c) região 3 (cor azul) da safra de 2014 utilizando PLD-DA.	66
Figura 42: Gráficos de classificação das amostras de suco de laranja natal referente (a) à região 1 (cor verde), (b) região 2 (cor vermelho) e (c) região 3 (cor azul) da safra de 2014 utilizando PLD-DA.	68
Figura 43: Gráficos de classificação das amostras de suco de laranja valência referente (a) à região 1 (cor verde), (b) região 2 (cor vermelho) e (c) região 3 (cor azul) da safra de 2014 utilizando PLD-DA.....	70
Figura 44: Representação da composição dos metabólitos presentes no suco de laranja integral.	72

Figura 45: Comparativo entre os valores obtidos na quantificação dos açúcares (sacarose, α e β -glicose e frutose), ácidos (cítrico, málico, ascórbico, succínico e γ -aminobutírico (GABA)); aminoácidos (prolina, arginina, alanina, treonina e valina), *ratio* e etanol para a variedade de laranja natal na safra 2013 e 2014..... 73

Figura 46: Comparativo entre os valores obtidos na quantificação dos açúcares (sacarose, α e β -glicose e frutose), ácidos (cítrico, málico, ascórbico, succínico e γ -aminobutírico (GABA)); aminoácidos (prolina, arginina, alanina, treonina e valina), *ratio* e etanol para a variedade de laranja valência na safra 2013 e 2014. 74

Figura 47: Comparativo entre os valores obtidos na quantificação dos açúcares (sacarose, α e β -glicose e frutose), ácidos (cítrico, málico, ascórbico, succínico e γ -aminobutírico (GABA)); aminoácidos (prolina, arginina, alanina, treonina e valina), *ratio* e etanol para o suco da variedade hamlin ao longo da safra de 2014. O círculo interno dos gráficos representam a quantificação do início da safra e os externos referentes ao fim da safra..... 76

Figura 48: Comparativo entre os valores obtidos na quantificação dos açúcares (sacarose, α e β -glicose e frutose), ácidos (cítrico, málico, ascórbico, succínico e γ -aminobutírico (GABA)); aminoácidos (prolina, arginina, alanina, treonina e valina), *ratio* e etanol para o suco da variedade pera ao longo da safra de 2014. O círculo interno dos gráficos representam a quantificação do início da safra e os externos referentes ao fim da safra..... 77

Figura 49: Comparativo entre os valores obtidos na quantificação dos açúcares (sacarose, α e β -glicose e frutose), ácidos (cítrico, málico, ascórbico, succínico e γ -aminobutírico (GABA)); aminoácidos (prolina, arginina, alanina, treonina e valina), *ratio* e etanol para o suco da variedade natal ao longo da safra de 2014. Os círculos internos dos gráficos representam a quantificação do início da safra, intermediários referentes ao meio, e os externos referentes ao fim da safra..... 79

Figura 50: Comparativo entre os valores obtidos na quantificação dos açúcares (sacarose, α e β -glicose e frutose), ácidos (cítrico, málico, ascórbico, succínico e γ -aminobutírico (GABA)); aminoácidos (prolina, arginina, alanina, treonina e valina), *ratio* e etanol para o suco da variedade valência ao longo da safra de 2014. Os círculos internos dos gráficos representam a quantificação do início da safra, intermediários referentes ao meio, e os externos referentes ao fim da safra. 81

RESUMO

ANÁLISE DA SAZONALIDADE E REGIONALIDADE EM SUCO DE LARANJA NATURAL POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) E QUIMIOMETRIA. Nos últimos anos a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) vem se tornando uma ferramenta analítica cada vez mais útil para avaliar a qualidade de alimentos, em especial suco de frutas. Neste contexto, a RMN tem apresentado soluções para identificar fraudes como à adição de substâncias indevidas ou não permitidas em suco de frutas, vinhos, méis, cachaça, café, azeite de oliva, etc.. A construção de bancos de dados é usada com este propósito, a qual permite quantificar simultaneamente uma grande quantidade de substâncias presente nas amostras, além de fornecer informações sobre origem, variedade e tipo de fruta utilizada na produção de um suco. O objetivo desse trabalho foi avaliar a sazonalidade e regionalidade em suco de laranja integral usado para produção de suco concentrado destinado à exportação, através das variedades de laranja hamlin, pera, natal e valência (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). As técnicas de RMN de ^1H e 2D nos permitiu caracterizar mais de 20 metabólitos presentes no suco de laranja integral, além de quantificar o conteúdo de açúcares (sacarose, α e β -glicose e frutose), ácidos (cítrico, málico, ascórbico, succínico e γ -aminobutírico (GABA)); aminoácidos (prolina, arginina, alanina, treonina e valina), *ratio* e etanol. Os efeitos da sazonalidade foram avaliados através das análises por componentes principais (PCA), onde foi possível constatar que a região 3 foi aquela que apresentou os períodos sazonais mais bem definidos ao longo das safras 2014 para as variedades pera, natal e valência. Ao contrario das demais variedades, a variedade hamlin teve os períodos sazonais mais bem definidos na região 2 ao longo da safra de 2014. Os dados de RMN de ^1H aliados às análises supervisionadas de *Partial Least Squares Discriminant Analysis* (PLS-DA) possibilitaram construir modelos onde foi possível distinguir o ano da safra, o tipo de laranja (precoce ou tardia), tipo de variedade (hamlin, pera, natal ou valência) e a região (1, 2 ou 3) de onde o suco de laranja foi obtido.

ABSTRACT

ANALYSIS OF SEASONALITY AND REGIONALITY IN FRESH ORANGE JUICE BY USING NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE (NMR) AND CHEMOMETRICS. The Nuclear Magnetic Resonance (NMR) has been become increasingly helpful as an analytical tool to assess the food quality, specially to highlight fruit juice in the last few years. In this context, NMR has presented solutions to identify frauds such as addition of unauthorized or not allowed compounds in fruit juices, wines, honeys, spirits, coffees, olive oil, etc.. The development of databases is used for this purpose which enables to perform at the same time the quantification of large numbers of compounds into the samples, as well as to provide the information about origin, variety and type of fruit that were used throughout orange juice production. The purpose of this study was to evaluate the seasonality and regionality in fresh orange juice used to produce concentrated orange juice for exportation through the orange varieties hamlin, pera, natal, and valência (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). ^1H NMR and 2D analysis enabled us to characterize more than 20 compounds in fresh orange juice, and also to quantify the content of sugars (sucrose, α and β -glucose, and fructose), acids (citric, malic, ascorbic, succinic, and γ -aminobutyric (GABA)), aminoacids (proline, arginine, alanine, threonine, and valine), *ratio* and ethanol. The seasonality effects were evaluated by using principal components analysis (PCA), where it was possible to determine that region 3 showed more explicitly defined seasonality stages for the varieties pera, natal and valência across the 2014 harvest. In contrast, the hamlin type presented more defined seasonality stages in region 2 for 2014's harvest. The ^1H NMR allied to supervised analysis of Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) lead to development of models where it was possible to distinguish the year of harvest, type of orange (early or late), type of variety (hamlin, pera, natal or valência) and the region (1, 2 or 3) where the orange juice was obtained.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	v
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Suco de laranja no Brasil e no mercado mundial	1
1.2. Uma visão geral da Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	4
1.3. Aplicação da RMN em suco de frutas e bebidas.....	5
1.4. Análise Quimiométrica aplicada a dados de RMN	7
2. OBJETIVOS.....	10
3. MATERIAIS E MÉTODOS	11
3.1 Origem, coleta e preparo das amostras.	11
3.2 Preparo da solução para correção do pH das amostras	13
3.3 Aquisição dos dados de RMN de ^1H e <i>J-resolved</i>	14
3.4 Aquisição dos dados de RMN 2D (bidimensionais).....	16
3.5 Análises quimiométricas.....	16
3.5.1 <i>Retangular bucket</i>	17
3.5.2 <i>Take one point as bucket</i>	17
3.6 Análise por Componentes Principais (PCA) e Modelos de Classificação....	18
3.7 Análises Quantitativas	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1 Aquisição dos dados de RMN	21
4.2 Caracterização dos metabólitos presentes no suco de laranja natural.....	30
4.3 Modelos e análises quimiométricas para avaliação da regionalidade e sazonalidade das amostras de suco de laranja natural.....	40

4.3.1	Avaliação da regionalidade e sazonalidade em suco de laranja fresco por PCA	40
4.3.2	Avaliação da regionalidade em suco de laranja fresco	54
4.4	Quantificação dos metabólitos presente no suco de laranja natural	71
5.	CONCLUSÕES	82
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

1. INTRODUÇÃO

1.1. Suco de laranja no Brasil e no mercado mundial

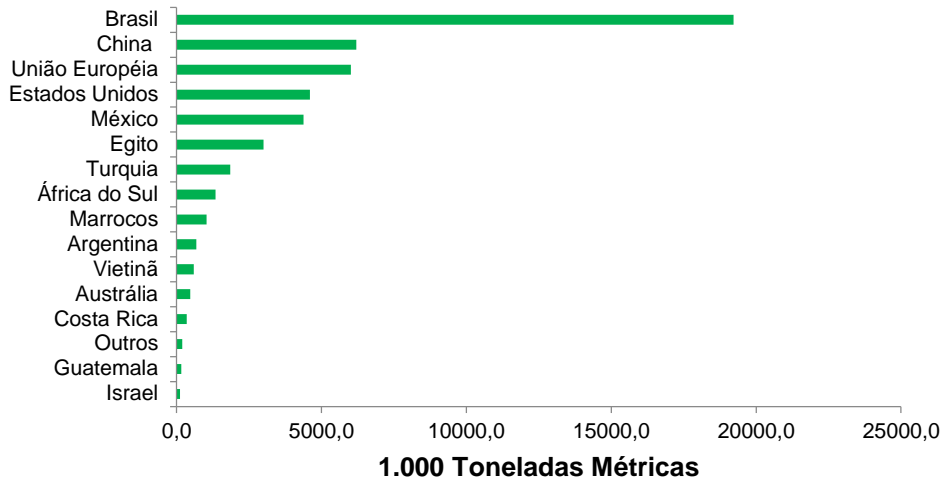
A primeira indústria de suco de laranja não concentrado no Brasil foi montada durante a segunda guerra mundial pelo governo do estado de São Paulo, para evitar o desperdício das safras de laranja e visando abastecer o mercado local. Porém, este empreendimento fracassou devido, principalmente, à falta de consumidores. Em 1962, a produção brasileira de suco de laranja tomou um novo impulso, devido à geada ocorrida no estado da Flórida, onde cerca de 13 milhões de árvores adultas tiveram que ser destruídas e, esse fato, contribuiu para a inserção do Brasil no mercado mundial. Neste mesmo ano, o Brasil se tornou um dos grandes exportadores para o mercado interno dos Estados Unidos e da Europa, preenchendo uma lacuna deixada pelos americanos^{1 e 2}.

A primeira indústria de suco de laranja voltada para a exportação foi criada em 1963, em um período denominado “modernização conservadora” da agricultura. Os incentivos às exportações, isenções tributárias e crédito rural subsidiado foram as principais características deste período compreendido entre 1965 a 1979. Na década de 80, a citricultura brasileira continuou seu processo de expansão, apesar da crise financeira mundial e as condições climáticas não favoráveis na Flórida, maior produtor dos Estados Unidos, proporcionando ao Brasil o primeiro lugar dentre os produtores mundiais de citros².

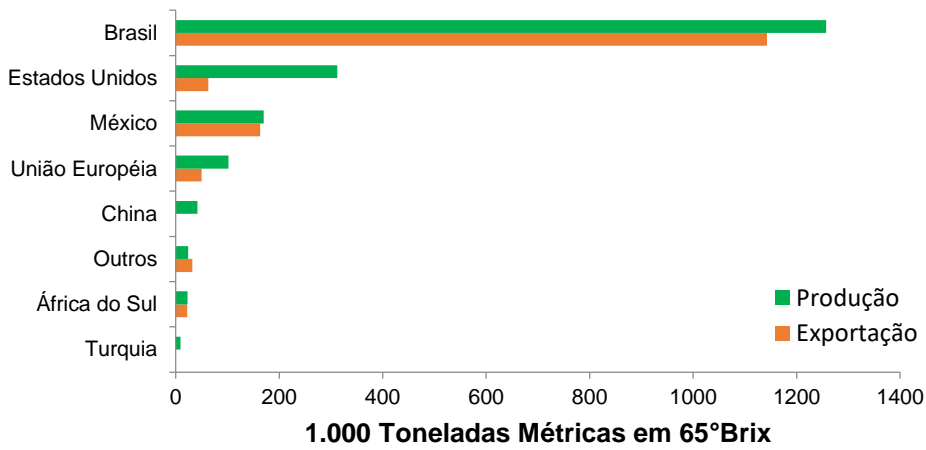
Atualmente, o Brasil é o maior produtor mundial de laranja. Grande parte da produção é destinada a fabricação de suco concentrado, onde aproximadamente 91% são exportados, conforme apontado recentemente pelo USDA (*United States Department of Agriculture*) nos gráficos da Figura 1³.

O principal destino da produção de suco de laranja concentrado do Brasil é o mercado europeu, onde este mercado representa cerca de 66,7% das exportações. Os Estados Unidos, desde a tragédia climática ocorrida na Flórida na década de 80 é o segundo maior destino das exportações de suco de laranja brasileiro. Outros países como Canadá, China, Japão, Rússia e Austrália são destinos importantes para exportação de suco de laranja brasileiro³.

Produção Mundial de Laranja em Julho-2016/17



Produção Mundial de Suco de Laranja em Julho-2016/17



Importação Mundial de Suco de Laranja em Julho-2016/17

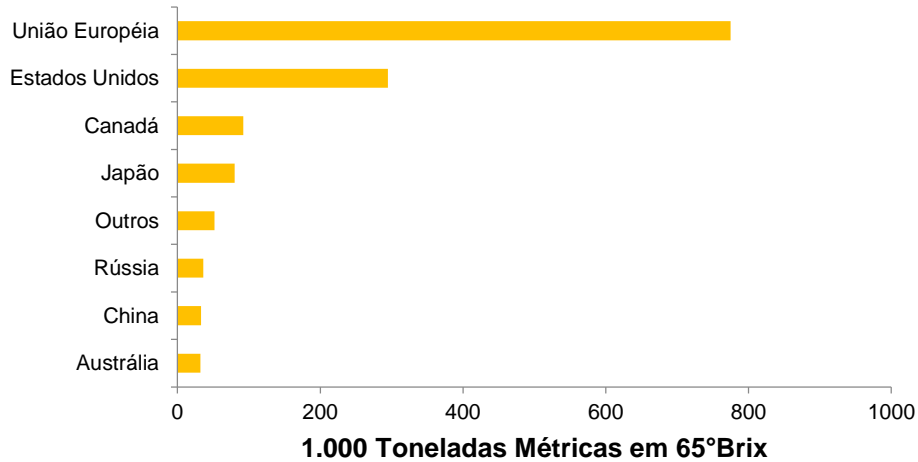


Figura 1: Maiores produtores mundiais de laranja, exportadores e produtores de suco de laranja, e importadores mundiais de suco de laranja concentrado a 65°Brix.

Os maiores produtores brasileiros de suco de laranja estão localizados no estado de São Paulo e nos municípios da região do triângulo mineiro, por isso a região é chamada de Cinturão Citrícola (do inglês *Citrus Belt*). Com centenas de milhares de hectares plantados, a citricultura envolve direta e indiretamente cerca de 200 mil empregos, promovendo uma massa salarial de quase R\$ 700 milhões³⁻⁵.

Os principais cultivares ou variedades utilizadas para o processamento de suco são as variedades de laranja Hamlin, por ser considerada precoce; a Pera, de meia estação, mas para alguns produtores é considerada precoce; e a Natal e Valência, que são tardias. A diversidade das variedades de laranjas, condições de clima e solo favoráveis no Brasil propicia a produção de laranja o ano todo.

As variedades hamlin, pera, natal e valência são também chamadas de laranjas doces, cuja espécie é *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, da família das Rutáceas (*Rutaceae*), as quais são cultivadas em regiões de climas mais úmidos, com temperaturas moderadas entre 15 °C e 29 °C e com a necessidade de bastante incidência de sol⁶.

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), através do Decreto n°. 6.871, de 04 de junho de 2009, que regulamenta a Lei n° 8.918 de 14 de julho de 1994, define o suco de laranja sendo uma bebida não fermentada, não concentrada e não diluída obtida da laranja madura e sã, por processamento tecnológico, submetida a tratamento para assegurar a sua apresentação e conservação até o momento do consumo. Não pode conter substâncias estranhas à fruta, excetuadas as previstas na legislação específica. É proibida à adição de aromas e corantes artificiais.

O suco de laranja comercial pode ser apresentado ao consumidor de três maneiras: concentrado ou desidratado, integral e reconstituído. O suco de laranja concentrado ou desidratado é parcialmente ou quase que totalmente feito à remoção da água natural contida no suco, enquanto que o suco de laranja integral é pasteurizado, sem adição de açúcar e em concentração natural. O suco de laranja reconstituído é produzido a partir do suco de laranja concentrado ou desidratado, onde é feita a diluição com água potável em sua formulação até atingir sua condição de suco integral ou ao teor de sólidos solúveis mínimo estabelecido nos respectivos padrões de identidade e qualidade para cada tipo de suco integral, sendo obrigatório constar em sua rotulagem a origem do suco utilizado para sua elaboração, se concentrado ou desidratado, sendo opcional o uso da expressão "reconstituído"^{7 e 8}

1.2. Uma visão geral da Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) como é aplicada nos dias atuais por químicos, médicos, engenheiros, etc., surgiu no início dos anos de 1930 com a introdução de sua teoria pelo físico alemão Gorter⁹. Todavia, o uso da RMN só começou a ser apreciada na área da química, principalmente por químicos orgânicos para elucidação estrutural de compostos, quando os alunos Proctor e Yu¹⁰ de Felix Bloch introduziram o conceito de deslocamento químico.

Tradicionalmente, o interesse do uso RMN sempre foi voltado para verificação e elucidação de estruturas, assim como a análise de pureza de substâncias¹¹. Entretanto, nas últimas duas décadas a RMN tem se mostrado como uma potente e versátil ferramenta nos mais variados campos de aplicação tais como: farmacêuticos, clínicos, alimentícios e industriais.

A necessidade em campos como os da metabolômica/metabonômico e food/foodomics fez com que a RMN expandisse muito rapidamente nos últimos anos, com aplicações em análises de misturas e triagens. Tais desenvolvimentos foram permitidos, graças aos avanços e melhorias dos *hardwares* e *softwares* dos espectrômetros de RMN, integrado ao preparo de amostra e rápidos trocadores de amostras¹¹⁻¹³.

Alguns aspectos como a velocidade com que se podem adquirir os espectros e fazer várias amostras em pouco tempo, tendo o mínimo preparo e com excelente reprodutibilidade dos dados, fazem da RMN uma poderosa técnica analítica. Apesar de ser uma técnica não destrutiva e poder detectar um grande número de compostos simultaneamente em uma única medida experimental, a espectroscopia de RMN apresenta como desvantagem a baixa sensibilidade, quando comparada com a espectrometria de massas (EM), espectroscopias nas regiões do infravermelho (IV) e ultravioleta (UV)^{12 e 14}.

Apesar da baixa sensibilidade da técnica, avanços em novos *designs* e uso de líquidos criogênicos em sondas, tem minimizado essa desvantagem da técnica de RMN. Por exemplo, aplicações utilizando *dynamic nuclear polarization* (DNP)¹⁵ e sondas microcapilares permitem trabalhar com nano volumes para obter maior sensibilidade em pequenas quantidades de amostras¹⁶⁻¹⁹. Os sistemas hifenados como a CLAE-RMN (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Ressonância Magnética Nuclear) e CLAE-EPS-RMN (Cromatografia Líquida de Alta

Eficiência combinado com Extração por Fase Sólida acoplada à Ressonância Magnética Nuclear), são também alternativas para analisar e identificar compostos químicos individualmente ou em misturas complexas em níveis muito baixos²⁰⁻²².

1.3. Aplicação da RMN em suco de frutas e bebidas

Em meados da década de 90 foi quando começou a surgir os primeiros trabalhos envolvendo a técnica de RMN de ^1H aplicada a suco de frutas. Esses primeiros trabalhos tiveram como base apresentar o potencial da técnica frente à caracterização e quantificação de vários metabólitos em misturas complexas em uma única análise, de modo rápido e com o mínimo de preparo das amostras.

Dez anos depois, Campo e colaboradores (2006) fizeram a quantificação dos ácidos: cítrico, málico e aspártico em diferentes variedades de sucos: laranja, maçã, apricot, kiwi, pêra, morango e abacaxi - em pH específico onde não ocorre a sobreposição de sinais – utilizando a técnica de RMN de ^1H ²³.

Além da caracterização e quantificação, os pesquisadores mostraram a possibilidade em conseguir avaliar processos de adulterações e fraudes em suco de frutas não só através da RMN ^1H ²⁴⁻²⁷, mas também através da relação isotópica entre $^2\text{H}/^1\text{H}$ pela técnica SNIF – NMR (*Site Specific Natural Isotopic Fractionation studied by Nuclear Magnetic Resonance*).

Com intuito de utilizar cada vez a RMN no monitoramento da qualidade dos sucos, à busca por “impressões digitais ou marcadores” (*fingerprints*) que pudessem evidenciar a qualidade ou adulteração nos sucos de frutas ficou cada vez mais importante. Algumas delas sendo um único metabólito como referência, mas em outros casos o uso de espectros autênticos como referências. Por exemplo, a Florina (3,5-dihidroxifenil- β -D-glucopiranosídeo) isolada via CLAE da casca de laranja e caracterizada via RMN, foi detectada em diferentes concentrações em sucos comerciais provenientes da Espanha e do Brasil, a presença dessa substância é um indicativo que o suco foi extraído exaustivamente em seu processo de produção, caracterizando-a como “*fingerprint*” de adulteração e/ou contaminação do suco²⁸.

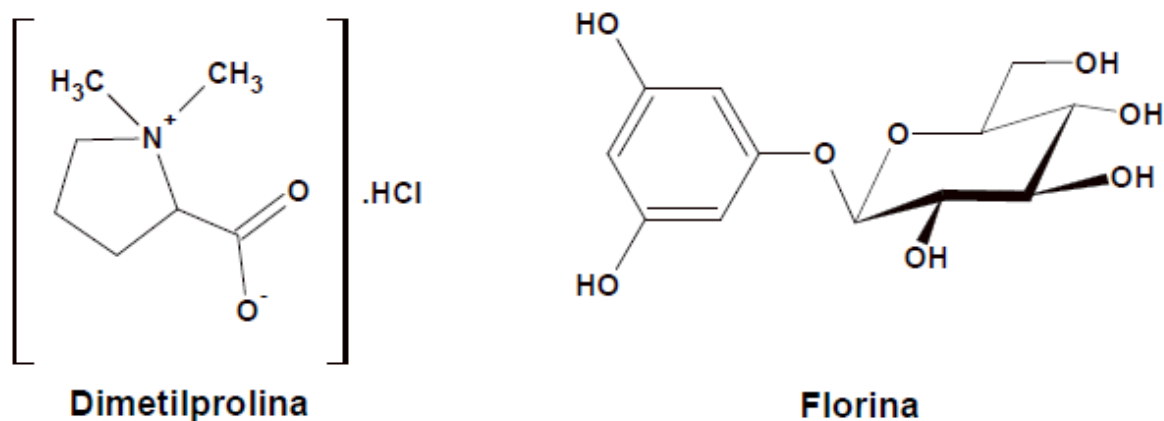


Figura 2: Estrutura química da Dimetilprolina e Florina.

A adição intencional de água no suco de laranja durante o seu processo de produção pode ser detectada no espectro de RMN de ¹H aliado a quimiometria através da substância dimetilprolina (DMP), a qual também é conhecida como “*fingerprint*” de adulteração e/ou contaminação do suco de laranja²⁹. Outro alvo de adulteração em sucos de laranjas é o ácido cítrico. Como a concentração de ácido cítrico é um dos parâmetros para se avaliar a qualidade do suco, falsificações com adição intencional de ácido cítrico sintético podem ser “desmascaradas” utilizando não só a técnica SNIF-NMR (através da relação isotópica ²H/¹H) como a EM (através da relação isotópica ¹³C/¹²C)³⁰.

Outros estudos envolvendo o monitoramento da degradação de suco de laranja *in natura* e néctares comerciais de laranja em diferentes temperaturas de armazenamento mostraram o aumento da concentração de etanol, ácidos láctico, pirúvico, fumárico, fórmico e succínico ao longo de 48h, utilizando dados de RMN de ¹H e análises de quimiométricas³¹.

Trabalho semelhante em suco de manga usando a RMN de ¹H para monitorar as mudanças ocorridas através do crescimento e contaminação microbológica com *Penicillium expansum*, também mostrou a formação de um vasto grupo de compostos indesejáveis provenientes do processo fermentativo do suco ao longo de 132 horas³².

Recentemente, Soares M. V. L. *et al.* (2016) monitoram o efeito da degradação térmica em suco de maracujá utilizando a técnica de RMN. No trabalho os pesquisados monitoram via RMN duas temperaturas (85°C e 140°C) em diferentes tempos (4, 15, 30 e 60 segundos) de processos térmicos usados na pasteurização do suco de maracujá. Eles constataram a que a temperatura de

140°C durante 60 segundos foi a condição que propiciou a degradação da sacarose e a formação da 5-hidroximetil-2-furfural (HMF)³³.

Desse modo, a partir de trabalhos pioneiros como os de Belton, P. S. et al. (1996 e 1998); Martin, G. G. et al. (1996); Louche, L. M. M. et al. (1998); Martin, G. J. et al. (1996); Pupin, A. M. et al. (1998) e Peter Rink et al. (2008) e vários outros trabalhos publicados na literatura tiveram contribuições fundamentais para a construção e o desenvolvimento do banco de dados usado pela SGF (*Sure Global Fair*) e seus parceiros para avaliar a qualidade do suco de frutas^{25 e 26, 28,34-36}.

Atualmente, para ser comercializado no mercado europeu, o suco de laranja e de frutas em geral passa por várias análises para avaliação da sua qualidade. A SGF e seus parceiros são responsáveis para atestar a qualidade desses produtos e, dentre as técnicas utilizadas a RMN é uma delas. Com experimentos relativamente rápidos (RMN de ¹H e *J-res* em aproximadamente 15 minutos cada amostra), comparado a outras técnicas, é possível obter informações a respeito do processo de produção do suco de laranja. Nesse rápido “*screening*” é possível quantificar aproximadamente 25 metabólitos presentes no suco de laranja através dessas análises de RMN, além de aferir a origem, o tipo de suco e as variedades/espécies da fruta usadas em sua produção³⁷.

1.4. Análise Quimiométrica aplicada a dados de RMN

O suco de laranja é uma matriz muito complexa e a sua composição pode variar em função das espécies/variedades de laranjas utilizadas nas misturas (blends), dos fatores de sazonalidade/regionalidade, dos processos de produção, das condições de armazenamento e estocagem, etc. Um método que pode ser empregado na análise dos diferentes produtos comerciais é a RMN de ¹H, tornando possível em uma única medida à observação de um grande número de substâncias presentes na amostra; levando-se em consideração o limite de detecção da técnica e a possibilidade de sobreposição dos sinais.

No entanto, frente a um número muito grande de espectros, tanto pelo número de réplicas como pelo número de amostras, a comparação visual para a sua discriminação torna-se bastante trabalhosa devido ao elevado número de informações neles contidos. O uso de programas estatísticos nos permite distinguir com clareza as sutilezas tanto em relação à variação dos constituintes químicos quanto à sua quantidade³⁸. A quimiometria é constituída de métodos matemáticos e

estatísticos que decompõem dados multivariados complexos em dados simples e de mais fácil interpretação, permitindo uma melhor compreensão das informações presentes na matriz quando comparada com um banco de dados³⁹.

Há vários artifícios matemáticos para realizar as análises por componentes principais (PCA), em que é possível dar diferentes “pesos” as variáveis do banco de dados em função do método aplicado, por exemplo, dados centrados na média, autoescalados e escalonamento por unidade de pareto⁴⁰⁻⁴². É possível também, trabalhar com métodos para redução da dimensão dos dados numa matriz, como por exemplo, análises de *bucket table*, algoritmos de seleção de variáveis, trabalhar com faixas específicas dos dados ou ainda trabalhar com todas as variáveis.

A utilização da quimiometria como ferramenta estatística aplicada aos dados de RMN de um modo geral tem sido muito explorada pela comunidade dessa área nas últimas décadas, principalmente quando o foco de estudo refere-se à análise de misturas complexas ou apenas para um *screening* inicial dessas misturas. Nesse sentido, vários trabalhos têm sido reportados na literatura apresentando diferentes metodologias para uso da RMN e a quimiometria⁴³⁻⁵⁰.

Em 2001, Luisa Mannina e colaboradores utilizaram a RMN de ¹H aliada a quimiometria para analisar amostras de azeites de oliva extras virgens obtidos durante três anos (1996, 1997 e 1998) em três diferentes regiões da Itália a fim de avaliar o potencial dessa técnica na caracterização geográfica desses azeites. Nesse trabalho, sem qualquer hipótese prévia e com erros estatísticos muito baixos, conseguiu-se discriminar a produção anual nas diferentes regiões estudadas e, através da combinação dos dados dos diferentes anos de produção de azeite, foi possível agrupar as amostras de acordo com as posições geográficas, independentemente do tipo de cultivo empregado. Além disso, os autores enfatizaram a importância da amostragem e o cuidado que deve ser tomado durante a interpretação dos dados⁵¹.

Em 2008, Viggiani L. e colaboradores fizeram o uso da RMN de ¹H e ¹³C para caracterização de dez tipos de vinhos produzidos por uvas negras na região da Basilicata, sul da Itália. Nesse trabalho, os pesquisadores conseguiram verificar diferenças do perfil metabólico dos vinhos estudados, e quando comparado com vinhos produzidos na região da Campania, também sul da Itália, eles verificaram diferenças associadas à origem geográfica e a colheita da safra⁵².

Posteriormente, Goldemann R. *et.al* em 2013 também desenvolveram através da RMN de ^1H combinado com análises de dados multivariados, supervisionadas e não supervisionadas, além de métodos estatísticos conseguiram diferenciar o tipo de uva, a origem geográfica e o ano da safra em vinhos produzidos na Alemanha. Os pesquisadores coletaram cuidadosamente aproximadamente 600 amostras autênticas, correspondentes a 5 áreas de colheitas no sul e sudoeste para construção do banco de dados⁵³.

Em 2011, pesquisadores da Dinamarca propuseram através das análises de RMN de ^1H combinados com estatística quantitativa descritiva (análise sensorial) e quimiometria, usar as técnicas em conjunto com língua magnética para avaliar os efeitos das características sensoriais como o amargor, gosto do tomate, doçura, acidez, densidade, vermelhidão e metais em molhos de tomates⁵⁴.

Pesquisadores japoneses em 2012 utilizaram a RMN de ^{13}C e análises quimiométricas para a diferenciação de grãos de cafés arábica e robusta provenientes de seis diferentes regiões. Nesse trabalho, os pesquisadores verificaram alterações significativas em 14 metabólitos presentes nos grãos de cafés⁵⁵. Em 2015, Arana V. A. e colaboradores também classificaram através do extrato de café via RMN de ^1H e quimiometria, a origem de grãos cafés 100% arábica proveniente da Colômbia comparado com outras regiões. Nesse trabalho, os pesquisadores relatam a importância de construir esses modelos de classificação, como mecanismo para países preservarem a origem e a qualidade dos seus produtos⁵⁶.

Como se pode observar através dos trabalhos citados anteriormente, sejam eles com mais de 15 anos de publicação ou recentemente, existe uma quantidade extensa de trabalhos disponíveis na literatura envolvendo a técnica de RMN aliada a quimiometria aplicados em alimentos. Tal fato demonstra não só a versatilidade, como a robustez, rapidez e quantidade de informações que se pode obter a partir dos dados gerados a partir da técnica de RMN.

2. OBJETIVOS

- 2.1** Avaliar o efeito da sazonalidade e regionalidade em suco de laranja fresco das variedades de laranja hamlin, pera, natal e valência em três diferentes regiões do estado de São Paulo utilizando a RMN de ^1H e ferramentas quimiométricas.
- 2.2** Caracterizar e quantificar via ERETICTM II os principais metabólitos presentes nas variedades/espécies das laranjas hamlin, pera, valência e natal.
- 2.3** Construir modelos estatísticos para classificar a safra, o tipo de laranja, as variedades/espécies e a origem do tipo de suco de laranja fresco.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Origem, coleta e preparo das amostras.

As amostras de suco laranja integral foram coletadas durante as safras de 2013 e 2014 para a execução e desenvolvimento deste projeto. A coleta das amostras ocorreu em três diferentes regiões do estado de São Paulo, as quais foram denominadas de região 1, região 2 e região 3, conforme indicado na Figura 3.



Figura 3: Origem geográfica da coleta das amostras de suco de laranja integral. Representação 1 no mapa corresponde a região 1 (localização -20.7096, -48.53182), 2 corresponde a região 2 (localização -21.78482, -48.17864) e 3 corresponde a região 3 (localização -22.33799, -47.17337).

Fonte: https://www.google.com/maps/d/edit?hl=pt-BR&hl=pt-BR&mid=1IXn6j_hpRGeZxLI6M67YokgS7kk&ll=-6.122820162458389%2C-63.403566710156156&z=4

As variedades estudadas na safra de 2013 foram às laranjas tardias: natal e valência, onde foram feitas coletas em quintuplicatas amostrais para cada lote de cada região, cuja amostragem foi feita em diferentes “talhões” nas fazendas produtoras. A Figura 4 e Tabela 1 ilustram mais claramente as 150 amostras estudadas nas três diferentes regiões da safra de 2013.

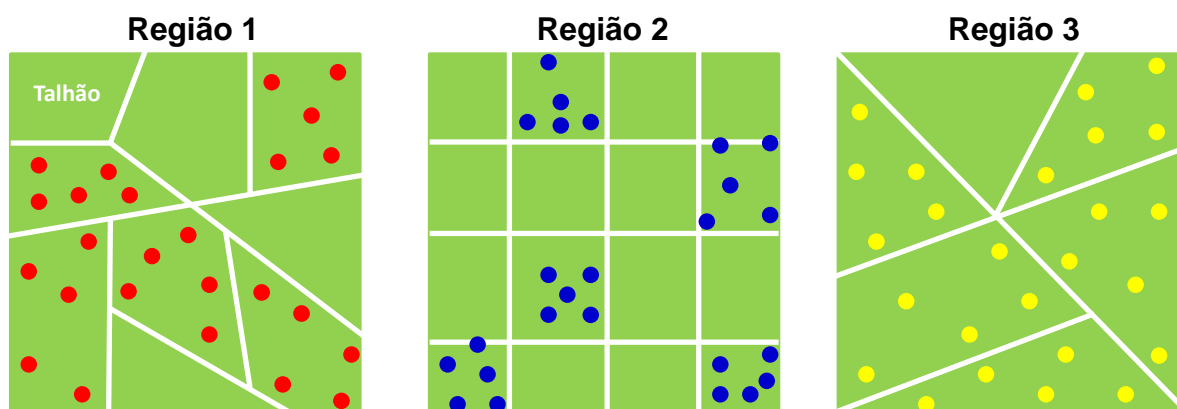


Figura 4: Ilustração da coleta das amostras nos diferentes talhões para cada região monitorada.

Tabela 1: Amostras de suco de laranja integral para as variedades tardias coletadas durante a safra de 2013.

Safra 2013				
Laranjas tardias				
	Natal	Total de amostras	Valência	Total de amostras
Região 1	5 lotes	25 amostras	5 lotes	25 amostras
Região 2	5 lotes	25 amostras	5 lotes	25 amostras
Região 3	5 lotes	25 amostras	5 lotes	25 amostras

Ao contrário da safra de 2013, a safra de 2014 foi acrescentada duas variedades de laranjas precoces, a hamlin e a pera, além das variedades tardias da safra de 2013. Nesta safra foi avaliado o período sazonal de cada variedade, em que os períodos de coleta foram divididos em duas partes, início e fim para as variedades precoces e, início, meio e fim para as variedades tardias. A Tabela 2 ilustra a distribuição das amostras em cada região, bem como o período de coleta para cada variedade, na qual totalizou a quantidade de 750 amostras durante a safra de 2014.

Tabela 2: Amostras de suco de laranja integral para as variedades precoces e tardias coletadas durante a safra de 2014.

Safra 2014					
Laranjas precoces					
	Período de coleta na safra	Hamlin	Total de amostras	Pera	Total de amostras
Região 1	início	5 lotes	25 amostras	5 lotes	25 amostras
	fim	5 lotes	25 amostras	5 lotes	25 amostras
Região 2	início	5 lotes	25 amostras	5 lotes	25 amostras
	fim	5 lotes	25 amostras	5 lotes	25 amostras
Região 3	início	5 lotes	25 amostras	5 lotes	25 amostras
	fim	5 lotes	25 amostras	5 lotes	25 amostras
Laranjas tardias					
	Período de coleta na safra	Natal	Total de amostras	Valência	Total de amostras
Região 1	início	5 lotes	25 amostras	5 lotes	25 amostras
	meio	5 lotes	25 amostras	5 lotes	25 amostras
	fim	5 lotes	25 amostras	5 lotes	25 amostras
Região 2	início	5 lotes	25 amostras	5 lotes	25 amostras
	meio	5 lotes	25 amostras	5 lotes	25 amostras
	fim	5 lotes	25 amostras	5 lotes	25 amostras
Região 3	início	5 lotes	25 amostras	5 lotes	25 amostras
	meio	5 lotes	25 amostras	5 lotes	25 amostras
	fim	5 lotes	25 amostras	5 lotes	25 amostras

Após a coleta, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 10 minutos, em seguida retirada uma alíquota de 900 uL (90% v/v) do sobrenadante e adicionado 100 uL (10% v/v) de solução tampão, cujos pHs das amostras foram ajustados para a faixa de 3.0 ± 0.1 . Em seguida, as amostras foram homogeneizadas em vórtex por 10 segundos e transferidos 600 uL para tubos de RMN de 5,0 mm para a execução das análises.

3.2 Preparo da solução para correção do pH das amostras

A solução tampão utilizada no preparo das amostras de suco de laranja integral constitui-se de 1M KH_2PO_4 (di-hidrogenofosfato de potássio), 0,1% TMS- d_4 (3-trimetilsililpropionato de sódio – d_4), 2 mM de NaN_3 (azida de sódio), D_2O (óxido de deutério) e DCI (cloreto de deutério).

Para preparar 100 mL da solução tampão, dissolveu-se 13,6 g de KH_2PO_4 e 13,0 mg de NaN_3 em aproximadamente 85 mL de D_2O . Em um frasco separado, dissolveu-se 3,0 g de TMS- d_4 em aproximadamente 5 mL de D_2O , em

seguida, a solução foi colocada em banho ultra - som para homogeneização. Após a homogeneização, as soluções foram misturadas, e o pH da solução tampão foi ajustado com DCI para o pH de 1,8. Por fim, o volume da solução tampão foi ajustado para 100 mL com D₂O.

3.3 Aquisição dos dados de RMN de ¹H e *J-resolved*

Todos os experimentos de RMN de ¹H e *J-resolved* foram executados em um equipamento Bruker Avance III de 9,4 T (400 MHz para frequência do hidrogênio), equipado com uma sonda PABBI de 5,0 mm de diâmetro interno e gradiente de campo, acessório automático de “*tuning and matching*” (ATMATM), unidade de controle de temperatura externa BCU-I, e trocador de amostra automática “*Sample-Xpress*™”.

Todos os dados de RMN foram adquiridos a 300 K sem rotacionar as amostras. Antes da aquisição dos dados de RMN de ¹H e *J-resolved*, um tempo de espera de 5 minutos foi assegurado para cada amostra após a inserção no magneto, para garantir que o equilíbrio da temperatura de 300 K fosse respeitado. Em seguida, utilizando uma rotina padrão de automação via interface ICON-NMR (*software Bruker TopSpin*TM), foi realizado sintonia automática (ATMA), trava de lock para o solvente (LOCK), ajuste de fase do lock (AUTOLOCK), homogeneidade de campo ou “*shimming*” (TOPSHIM), calibração de pulso de 90° para um intervalo de 25 Hz na região de saturação do sinal do solvente (PULCON).

Os dados de RMN de ¹H foram adquiridos com 32 promediações (ns), 4 “*dummy scans*” (ds), 65536 pontos de dados durante a aquisição (td), largura espectral de 8223,685 Hz ou 20,5524 ppm (sw), 16 de ganho do receptor (rg), tempo de aquisição entre cada promediação 3,98 s (aq), tempo de espera entre cada promediação de 4,00 s (d1) e 10 ms de tempo de mistura (d8). Para a supressão do sinal do solvente no espectro de RMN de ¹H, utilizamos a sequência de pulsos NOESY 1D (sequência de pulso *noesygprr1d* denominação Bruker), conforme apresentado na Figura 5, com gradiente de campo, com frequência de irradiação em 1882,80 Hz (o1) durante o tempo de espera e o tempo de mistura. Para efetuar o processamento dos dados, os FIDs foram multiplicados previamente por função exponencial de 0,3 Hz (lb) para aplicar a transformada de Fourier. A correção da fase e da linha de base nos espectros de RMN de ¹H foram realizadas através da

rotina *apk0.noe* (algoritmo interno do programa TopSpin 3.0), onde só é permitida a correção de zero ordem na fase dos espectros, bem como quando os dados são adquiridos no modo de digitalização “*baseopt*”. Por fim, os dados de RMN de ^1H foram referenciados através do sinal do TMS- d_4 em 0,0 ppm.

Sequência de pulsos *noesygppr1D* (denominação Bruker)

a) $\text{TE}(d1) - t_{G1} - P_1(90^\circ) - 4\mu\text{s} - P_1(90^\circ) - T_m(d8) - t_{G2} - P_0(90^\circ) - \text{AQ}$

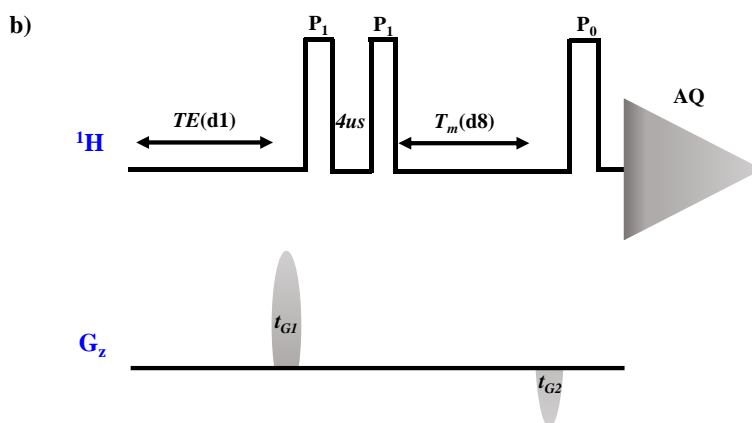


Figura 5: Representação para a sequência de pulsos *noesygppr1d* denominação Bruker. a) escrita e b) gráfica. $\text{TE}(d1)$ = tempo de espera entre cada promediação; P_1 e P_0 = pulsos de 90° com diferentes fases; $T_m(d8)$ = tempo de mistura; t_{G1} e t_{G2} = pulsos de gradiente de campo; AQ = tempo de aquisição.

Os dados de RMN 2D, ou espectros de *J-resolved*, foram adquiridos aplicando a supressão do sinal do solvente durante o tempo de espera ($d1$) com o mesmo formato que no espectro de RMN de ^1H . Onde, utilizamos a sequência de pulsos de correlação homonuclear “*jresgpprqf*” (denominação Bruker) com gradiente de campo, conforme ilustrado na Figura 6. Os valores configurados para o tempo de espera foi de 2,00 s ($d1$), enquanto que os valores para o pulso de 90° ($p1$) e ganho do receptor (rg) foram os mesmos que os dados de RMN de ^1H . Foram utilizados 16 “*dummy scans*” (ds), com 40 incrementos de evoluções (td em $F1$ ou t_0), 4 promediações (ns), 8K de pontos de dados adicionados durante a aquisição do FID (td em $F2$), 0,61 s de tempo de aquisição (aq), para uma janela espectral de 16,70 ppm (sw). Em $F1$, o tempo de aquisição foi de 0,26 s e largura espectral de 0,1949 ppm (78 Hz).

Sequência de pulsos *jresgpprqf* (denominação Bruker)

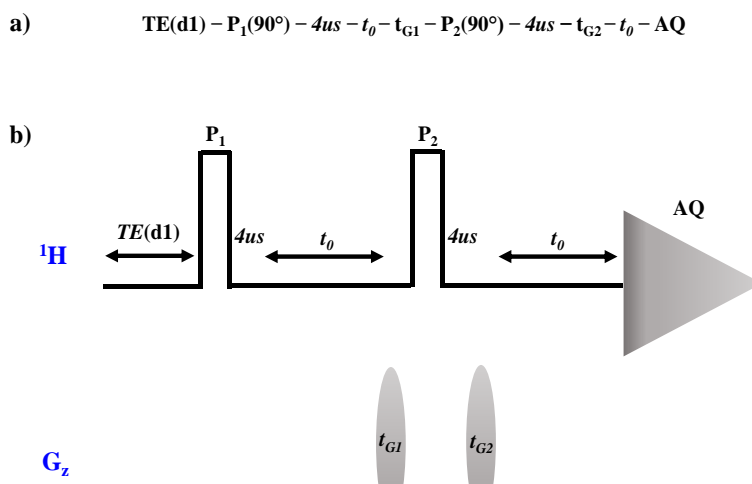


Figura 6: Representação da sequência de pulso *jresgpprqf* denominação Bruker. a) escrita e b) gráfica. $TE(d1)$ = tempo de espera entre cada promediação; P_1 = pulso de 90° ; P_2 = pulso de 180° ; t_0 = tempo de evolução; t_{G1} e t_{G2} = pulsos de gradiente de campo; AQ = tempo de aquisição.

3.4 Aquisição dos dados de RMN 2D (bidimensionais)

Para caracterizar o maior número de compostos presentes no suco de laranja integral, das variedades precoces (hamlin e pera) e tardias (natal e valência), foram utilizados os experimentos bidimensionais com gradiente de campo: COSY, HSQC e HMBC, através das sequências de pulsos *cosygpprqf*, *hsqcetgp* e *hmbcgpplndqf* (denominação Bruker).

Os experimentos bidimensionais de COSY, HSQC e HMBC foram realizados com largura espectral (swh) em F2 de 6038,65 Hz, 6038,65 Hz, 8223.69 Hz, em F1 6038,65 Hz, 23142.67 Hz e 24149.48 Hz, com 16, 48 e 104 promediações (ns), respectivamente. O tempo de espera (d1) utilizado nos experimentos foi de 1 s, com 4 k de pontos de dados durante a aquisição na dimensão em F1 (TD em F1), e na dimensão em F2 de 256 (TD em F2) para os experimentos de COSY e HSQC, e 300 pontos para o experimento de HMBC.

3.5 Análises quimiométricas

As análises multivariadas dos dados de RMN de 1H foram realizadas utilizando o programa Amix™ versão 3.9.3. Para realização das análises por

componentes principais (PCA), as regiões referentes ao sinal da água (4.70 ppm), as extremidades espectrais e o sinal do TMS- d_4 (região de 15,00 – 10,00 ppm e região de 0,65 – -5,00 ppm), e a região referente ao sinal da acetona (2.22 – 2,00 ppm) foram excluídas. Dois diferentes métodos foram testados nas análises por PCA, o método por “*bucket table*” e “*take one point as bucket*”.

3.5.1 Retangular bucket

A construção da matriz de dados por bucket table foi realizada através do método simples retangular, onde a largura usada pra cada *bucket* foi de 0,04 ppm, o qual reduziu a matriz de dados para 500 segmentos. Dentro de cada *bucket* foi realizado o método de integração a partir da soma das intensidades dos espectros, e nenhum método de dimensionamento dos dados foi aplicado (*no scaling*), conforme apresentado na Figura 7 a seguir.

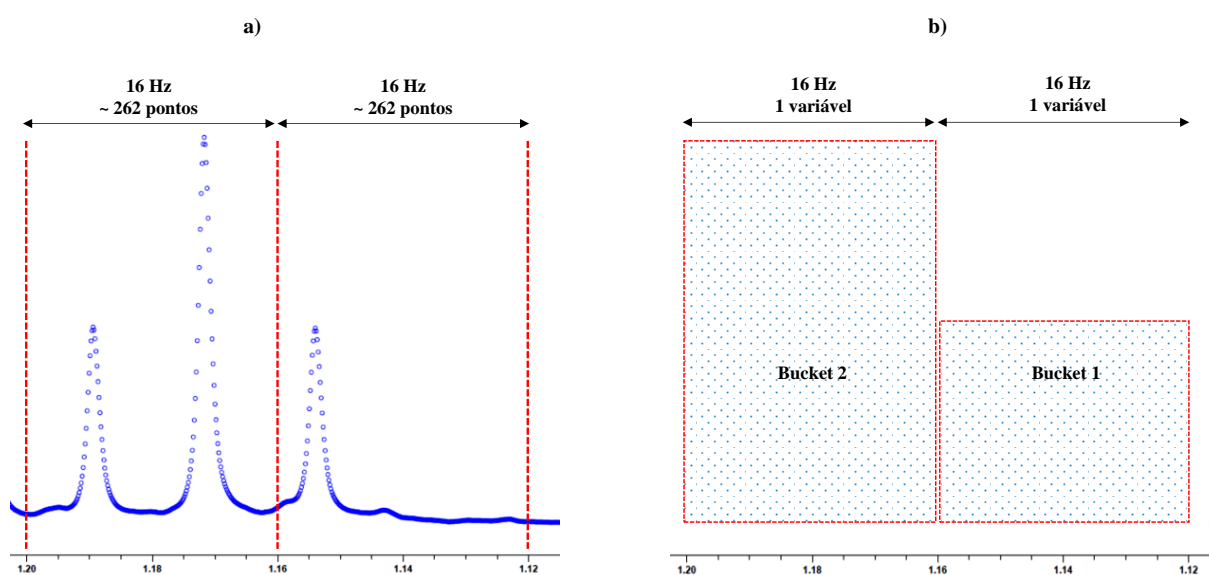


Figura 7: Representação dos pontos de dados na região de 1,12 – 1,20 ppm em um espectro de RMN de ^1H , referente ao sinal do grupo metila do etanol numa amostra típica de suco de laranja integral. a) Cada intervalo de 16 Hz corresponde há ~262 pontos de dados no espectro, b) enquanto que após gerar a *bucket table* cada intervalo de 16 Hz corresponde apenas a 1 variável.

3.5.2 Take one point as bucket

O método *take one point as bucket*, ou seja, gerar um bucket para cada ponto de dado foi selecionado, onde as variáveis da matriz gerada correspondem ao

mesmo número de pontos de dados que no espectro original. Cada *bucket* foi criada utilizando o método de integração a partir da soma das intensidades dos espectros, e nenhum método de dimensionamento dos dados foi aplicado (*no scaling*). A Figura 8 abaixo ilustra a *bucket table* gerada utilizando o método descrito anteriormente.

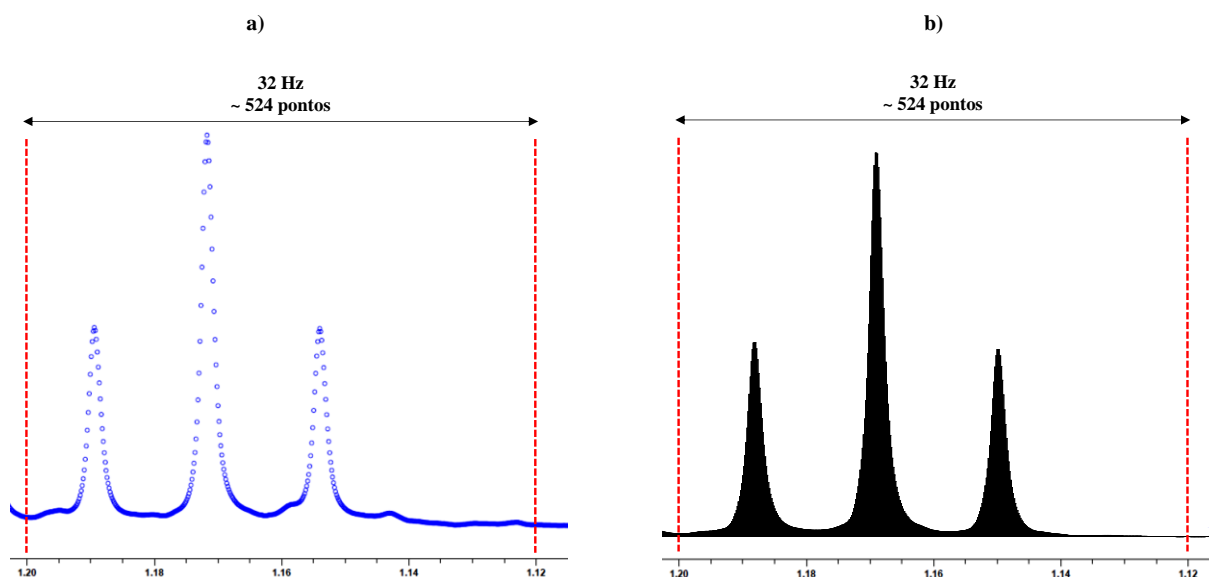


Figura 8: Representação dos pontos de dados na região de 1,12 – 1,20 ppm em um espectro de RMN de ^1H , referente ao sinal do grupo metila do etanol numa amostra típica de suco de laranja integral. a) Cada intervalo de 16 Hz corresponde há ~262 pontos de dados no espectro, b) enquanto que após utilizar cada ponto de dado para gerar uma *bucket table*, cada intervalo de 16 Hz corresponde a mesma quantidade variáveis (~262 variáveis).

3.6 Análise por Componentes Principais (PCA) e Modelos de Classificação

Após a criação das *bucket tables*, as análises por PCA foram realizadas sem dimensionamento das variáveis (correspondentes às colunas da matriz), ou seja, *no scaling* ou dados centrados na média. Contudo, outros dois dimensionamentos foram realizados, tais como *scale to unit variance* e *pareto scaling*, porém os resultados desses métodos não apresentaram resultados satisfatórios para as análises por PCA, portanto, os mesmos não serão apresentados na discussão dos resultados.

O método supervisionado PLS-DA (*Partial Least Square – Discriminant Analysis*) foi utilizado para construir os modelos de classificação de suco de laranja

das diferentes regiões (região 1, 2 e 3), variedades (hamlin, pera, natal e valência), tipo de variedade (tardia ou precoce) e ano da safra (2013 ou 2014).

Os modelos de classificação foram obtidos com grande número de variáveis latentes, realizando validação cruzada por subclasses randômicas para diminuir a chance de sobreajuste dos modelos. Os principais parâmetros utilizados para avaliar a qualidade dos modelos criados foram: a) a sensibilidade que é a razão entre as amostras classificadas corretamente pelas amostras constituídas na classe; b) a especificidade que representa a razão entre as amostras que não pertencem à classe classificada corretamente pelas amostras que não pertencem a classe; c) classificação dos erros é a razão entre as amostras classificadas erroneamente pelas amostras classificadas corretamente; d) RMSEC (*Root Mean Square Error of Calibration*) e RMSECV (*Root Mean Square Error of Cross-Validation*) representa o ajuste do modelo em relação aos dados de calibração e validação; e) bias e CV bias (*Cross Validation*) representa o erro sistemático calculado no modelo; f) R^2 e CV R^2 que é o coeficiente de correlações linear.

3.7 Análises Quantitativas

A quantificação dos metabólitos presentes no suco de laranja foi realizada via software TopSpinTM versão 3.1 pl 3, utilizando a ferramenta chamada Eretic II. O método se baseia na proporcionalidade entre as massas, a intensidade absoluta e o número de núcleos de hidrogênio presente em cada sinal.

A correlação é feita entre a integral do sinal de interesse com o número de hidrogênios presentes na amostra de referência cuja concentração é conhecida em um espectro de RMN de ^1H . Cabe ressaltar que, os espectros de RMN de ^1H da amostra de referência e as amostras de suco de laranja foram adquiridos sob as mesmas condições experimentais para a realização da quantificação.

A amostra utilizada como referência na quantificação dos metabólitos presentes no suco de laranja é composta por 20,0 mM de ácido gálico e 60,0 mM de ácido málico dissolvidos em água destilada. Após o preparo da solução de referência, uma alíquota contendo 90% da amostra de referência foi misturada com 10% de solução ácida para ajuste de pH (descrita no item 3.2) e transferidos 600 μL para tubo de RMN de 5 mm. Para garantir a estabilidade da amostra, o tubo de RMN foi selado imediatamente após a adição da amostra.

Assim, a amostra de referência é composta por três sinais no espectro de RMN de ^1H , um deles na região de 7,16 ppm referente ao sinal do ácido gálico, e os outros dois em 4,59 ppm e 2,89 ppm referentes ao ácido málico. O sinal do ácido gálico foi utilizado para quantificar as amostras com sinais mais intensos no espectro e RMN de ^1H , tais como os açúcares (sacarose, frutose, glicose) e etanol, enquanto que os sinais do ácido málico foram utilizados para quantificar os sinais menos intensos, por exemplo, aminoácidos (prolina, arginina, leucina, etc.) e ácidos orgânicos (cítrico, ascórbico, succínico e málico).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Aquisição dos dados de RMN

A construção de modelos quimiométricos a partir de dados multivariados obtidos pelas técnicas de ressonância magnética nuclear de alto e baixo campo, espectrometria de massas, infravermelho, cromatografia, requer qualidade mínima para a construção de modelos confiáveis e robustos.

Os dados de RMN de ^1H obtidos para a construção dos modelos apresentados neste trabalho foram adquiridos de acordo com o procedimento experimental do “*FoodScreener SGF-Juice ProfilingTM*”, desenvolvido pela empresa Bruker e a SGF (*Sure Global Fair*) para análise de sucos de frutas por RMN no mercado europeu.

No procedimento experimental deste trabalho foram utilizadas três amostras para verificar o bom funcionamento do equipamento de RMN: 1) TEMPCAL – para verificação e calibração da temperatura experimental; 2) WATER SUPPRESSION – para verificação do perfil do gradiente de campo, pulso de 90° , supressão do sinal do solvente (água), largura de linha e resolução espectral; 3) QUANTREF – para verificação das concentrações de ácido gálico e málico da amostra de referência.

A amostra TEMPCAL foi utilizada para garantir que os experimentos fossem adquiridos na mesma temperatura, onde a faixa definida no procedimento do *FoodScreener SGF-Juice ProfilingTM* é de 300K com variação de $\pm 0,1\text{K}$.

O gráfico da

Figura 9 mostra a calibração da temperatura com a amostra TEMPCAL entre o período de 2013 a 2015. No gráfico da podemos observar que a temperatura experimental manteve-se dentro do intervalo definido pelo protocolo da SGF de $\pm 0,1\text{K}$, sendo que nos meses 03, 04 e 11 de 2014, e o mês 01 de 2015 próximos dos limites, porém dentro da faixa de valores estabelecidos como aceitáveis. A calibração da temperatura é um parâmetro extremamente importante na obtenção de dados em RMN, pois este parâmetro influencia diretamente na variação do deslocamento dos metabólitos presentes no suco de laranja. Com isso, o seu monitoramento assegura que possíveis variações nos deslocamentos químicos dos metabólitos contidos nas amostras, sejam características da própria amostra ou

podendo ser variações provenientes de outras fontes, tais como: variação do pH, concentração ou solvente.

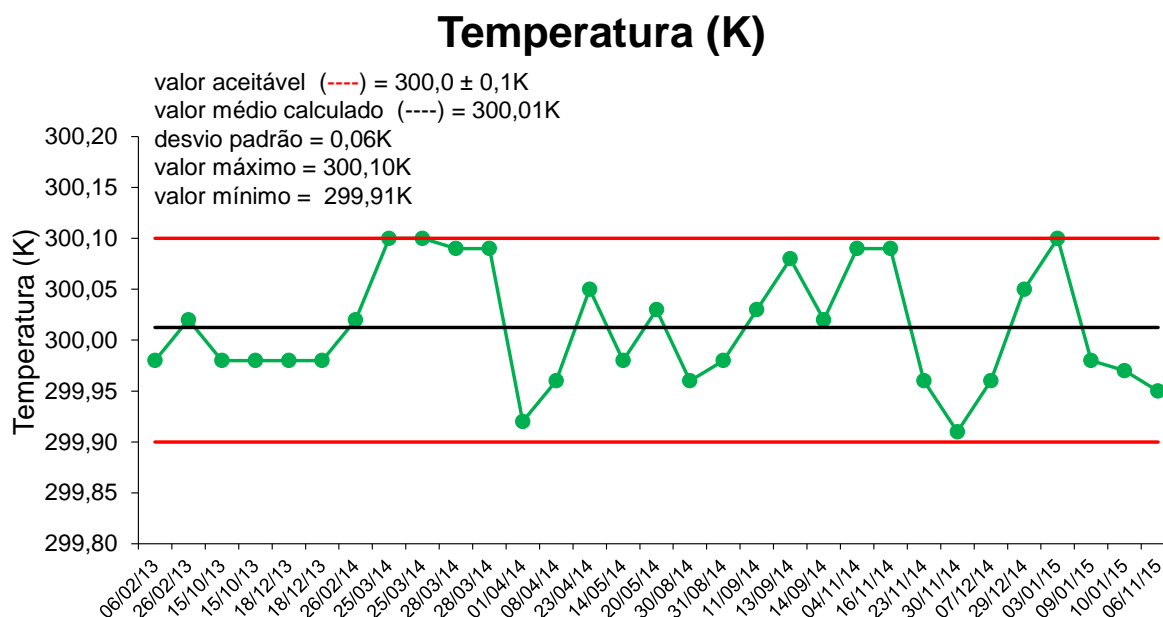


Figura 9: Gráfico da calibração da temperatura experimental entre o período de 2013 a 2015 para o equipamento de RMN com a amostra TEMPCAL.

Após a calibração da temperatura experimental, a verificação do perfil do gradiente de campo, pulso de 90° , supressão do sinal do solvente (água), largura de linha e resolução espectral foram realizados com a amostra WATER SUPPRESSION. A verificação desses cinco parâmetros é fundamental para avaliar o bom funcionamento da sequência de pulsos, a homogeneidade de campo, bem como a relação sinal/ruído dos dados adquiridos.

A verificação do gradiente de campo (Figura 10), o pulso de 90° (Figura 11) e a supressão do sinal do solvente (Figura 12) permite avaliar se todos os componentes contidos na sequência de pulsos estão funcionando de maneira eficiente. Nesse trabalho, utilizamos a sequência de pulsos (*noesygp1d*) com efeito de n.O.e. (*nuclear Overhauser effect*) e pulsos de gradiente de campo para a presaturação do sinal do solvente durante o tempo de mistura nos experimentos de RMN de 1H . Os três parâmetros citados anteriormente não possuem uma faixa limite estabelecida pelo protocolo da SGF. Entretanto, o monitoramento desses parâmetros tornar-se bastante importante para verificar o bom funcionamento da sequência de pulsos e qualidade dos dados que serão adquiridos.

Desse modo foi possível observar que o valor médio calculado para a integral da área do sinal do gradiente de campo, correspondente a faixa de irradiação de 20,0 a 0,0 ppm do núcleo de ^1H apresentou um valor de área absoluta de 626063, com desvio padrão em relação a média de 14499, tendo valores máximo e mínimo de 652574 e 596584, respectivamente.

Gradiente de campo

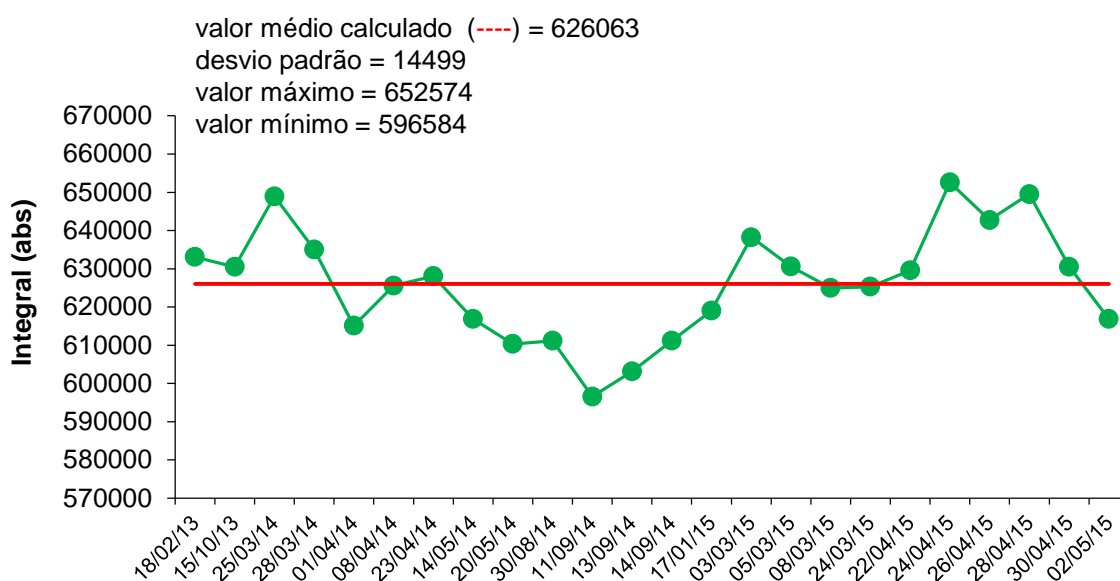


Figura 10: Gráfico para verificação do funcionamento do gradiente de campo entre fevereiro/2013 e maio/2015 para o equipamento de RMN com a amostra *Water Supression*.

O monitoramento do pulso de 90° para presaturação do sinal do solvente (água), na amostra *Water Supression* contendo 2 mM de sacarose apresentou valor médio de 8,62 μs , com desvio padrão em relação à média de 0,13 μs , tendo valores máximo e mínimo de 8,85 μs e 8,34 μs , respectivamente, conforme apresentado na Figura 11. A partir do pulso de 90° , o monitoramento da frequência de irradiação para a presaturação do sinal do solvente (ω_1) apresentou valor médio de 1880,72 Hz, desvio padrão em relação à média de 0,35 Hz, valor máximo de 1881,29 Hz e mínimo de 1879,55 Hz (Figura 12).

Pulso de 90°

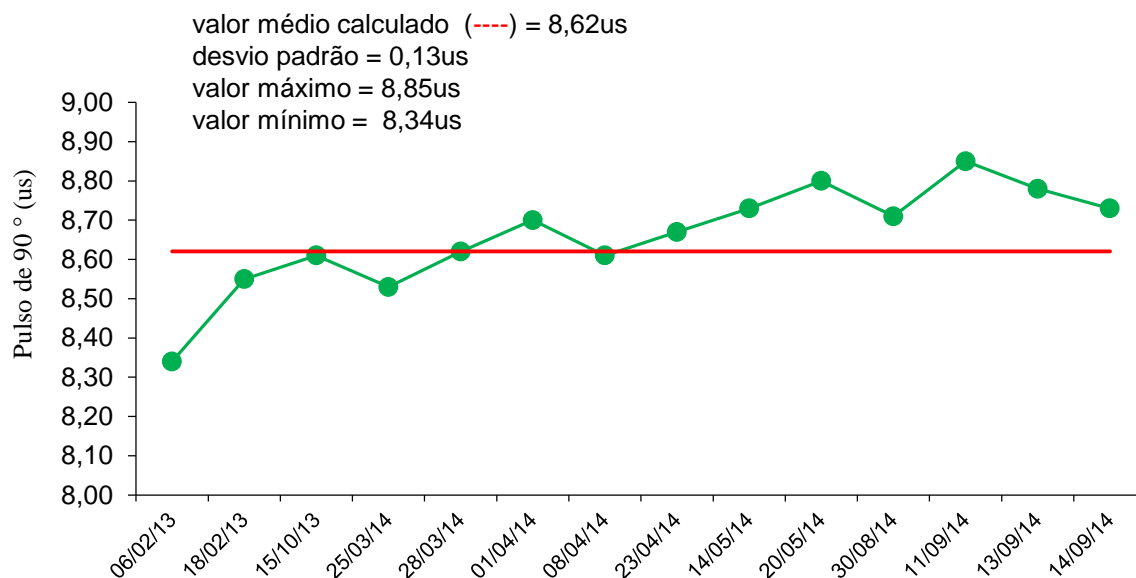


Figura 11: Gráfico para verificação do pulso de 90° entre fevereiro/2013 e setembro/2014 para o equipamento de RMN com a amostra *Water Supression*.

O1 (Presaturação do sinal da água)

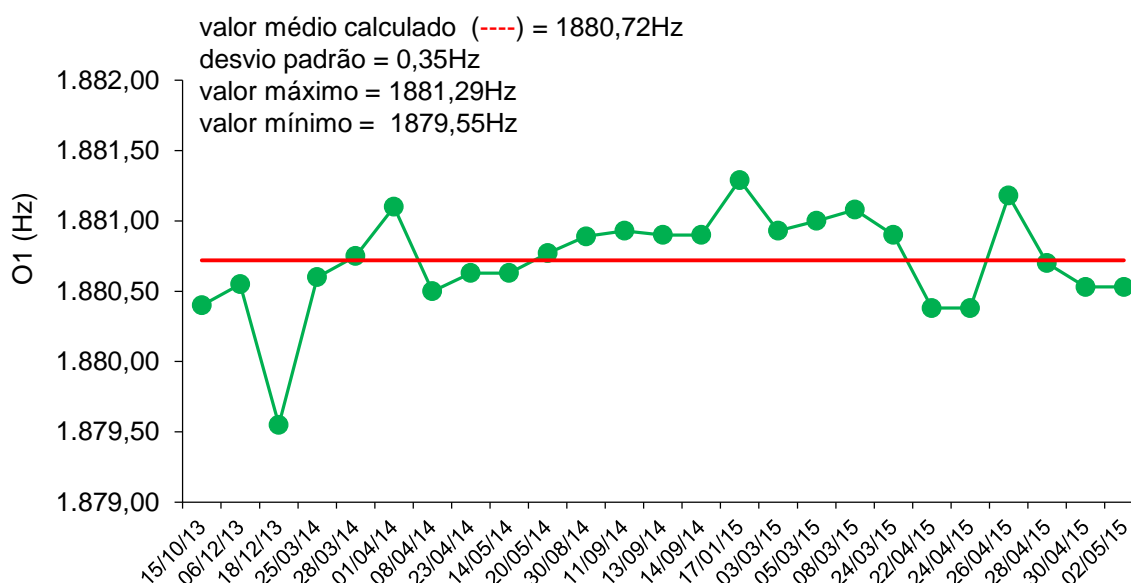


Figura 12: Gráfico para verificação da supressão do sinal do solvente (água) entre outubro/2013 e maio/2015 para o equipamento de RMN com a amostra *Water Supression*.

Sinal do TMSP- d_4 (Hz)

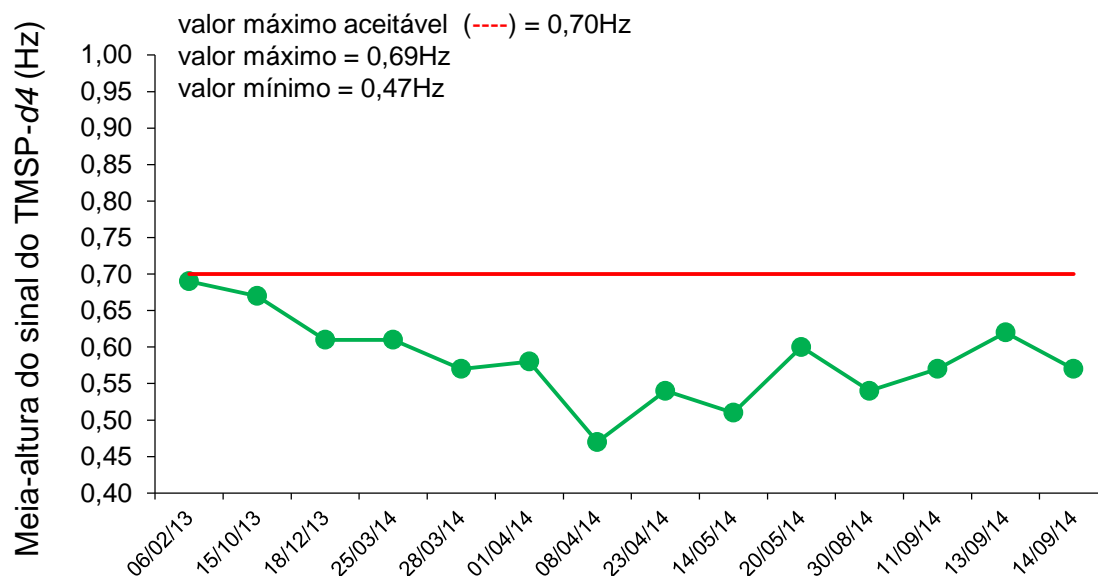


Figura 13: Gráfico para verificação da largura de linha espectral através da meia altura do sinal do TMSP- d_4 em 0,00 ppm no espectro de RMN de ^1H entre maio/2013 e setembro/2014 para o equipamento de RMN com a amostra *Water Supression*.

Ao contrário da verificação do gradiente de campo, do pulso de 90° e a supressão do sinal do solvente, o monitoramento da qualidade do sinal do TMSP- d_4 em 0,0 ppm apresenta valor máximo aceitável de 0,70 Hz na meia altura do sinal. A qualidade e simetria do sinal do TMSP- d_4 , usado também como referência interna para calibração do espectro de RMN de ^1H , tem como consequência assegurar a qualidade na resolução dos demais sinais no espectro. Tal sucesso é possível ser alcançado a partir da boa homogeneidade de campo e do bom ajuste dos três parâmetros citados anteriormente.

Como pode ser observado na Figura 13 os valores obtidos para meia altura do sinal do TMSP- d_4 ficaram abaixo de 0,70 Hz, com valor máximo de 0,69Hz e mínimo de 0,47 Hz, indicando estarem dentro dos valores definidos no protocolo de análises.

Resolução espectral após a presaturação do sinal da água

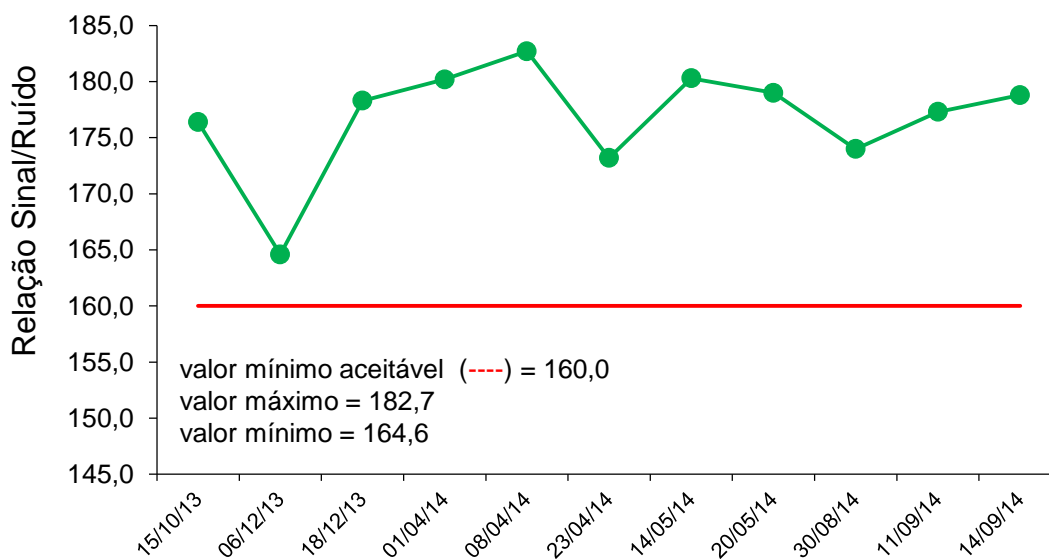


Figura 14: Gráfico para verificação da qualidade espectral através da relação sinal/ruído no espectro de RMN de ^1H após o ajuste da presaturação do sinal do solvente (água) entre outubro /2013 e setembro/2014.

Assim como o sinal do TMS- d_4 indica um bom ajuste na qualidade da presaturação do sinal do solvente, é importante avaliar a qualidade espectral como um todo a partir da relação sinal/ruído na amostra *Water Supression*.

A resolução espectral também apresenta um valor mínimo aceitável de 160 para o espectro de RMN de ^1H após a presaturação do sinal do solvente (água). O valor máximo obtido foi de 182,7 e o mínimo de 164,6, os quais mostraram que os dados foram adquiridos com qualidade exigida no protocolo experimental.

Por fim, após verificar das condições mínimas exigidas no protocolo experimental para obter dados de boa qualidade, a última etapa é realizada com a verificação da amostra QUANTREF.

Nesta etapa são verificadas as concentrações dos ácidos málico e gálico, usados como referências na quantificação por ERETIC II dos metabólitos presentes no suco de laranja, cujos valores são 60 mM e 20 mM, respectivamente.

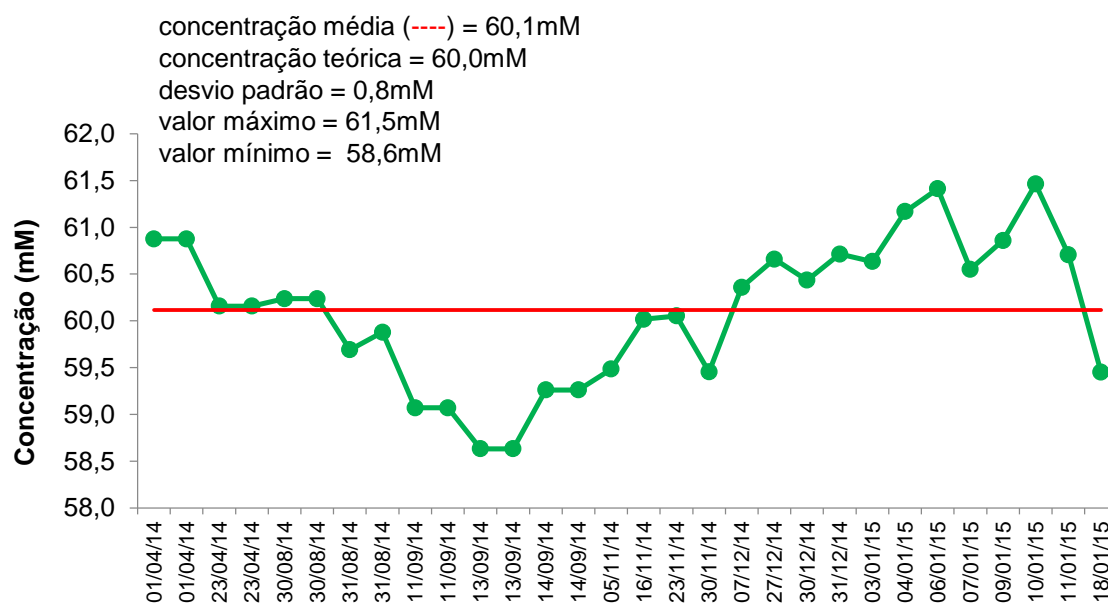
As concentrações são determinadas a partir da verificação dos valores absolutos das integrais de cada sinal. No caso do ácido málico, a área da integral é determinada na faixa de 4,64 - 4,55 ppm (sinal 2) da Figura 15b, e o ácido gálico na

faixa de 7,22 - 7,11 ppm (sinal 1) da Figura 16b. Com isso, basta determinar as concentrações usando os modelos lineares: $y = 796289x + 1691868$ para o ácido málico e $y = 2074229x - 1721978$ para ácido gálico. Os modelos univariados criados apresentaram excelentes coeficientes de correlação linear (R^2), sendo respectivamente 0,9994 e 0,9979 para os ácidos málico e gálico.

Com base nos dois modelos criados é possível obter a concentração média para os dois ácidos. A concentração média do ácido málico foi 60,1 mM, com desvio padrão de 0,8 mM, valor máximo de 61,5 mM e mínimo de 58,6 mM entre abril/2014 e janeiro/2015 conforme a Figura 15a. Para o ácido gálico, a concentração média foi 20,5 mM, desvio padrão de 0,7 mM, valor máximo de 20,7 mM e mínimo de 20,0 mM (Figura 16a).

a)

Ácido málico



b)

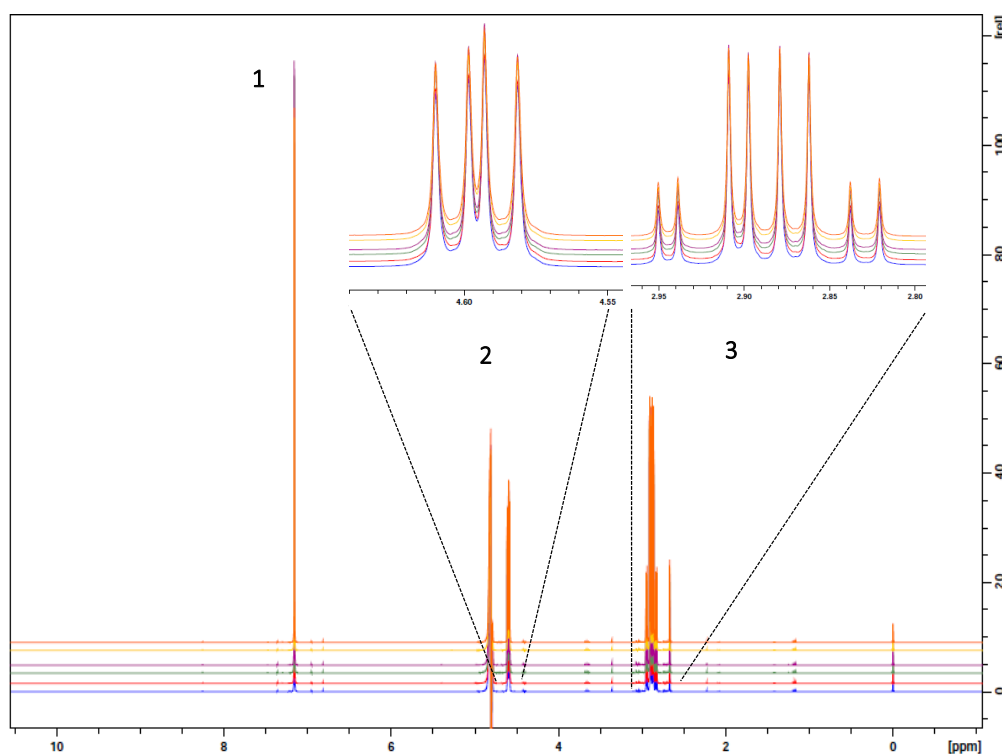
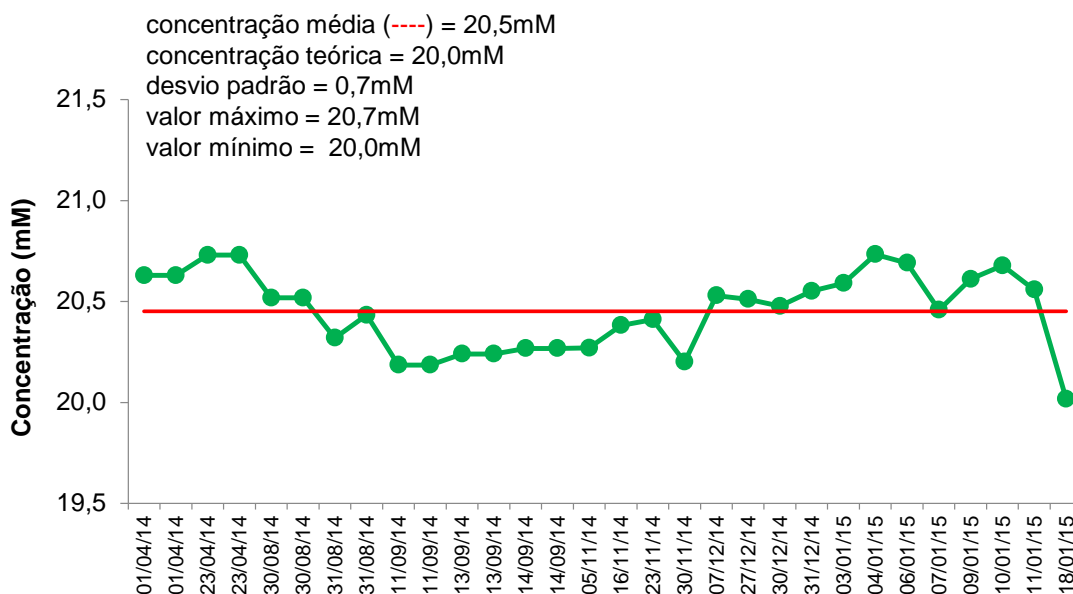


Figura 15: (a) Gráfico para verificação da concentração do ácido málico na amostra QUANTREF através dos sinais em 4,59 ppm (dd) e 2,89 ppm (dd) no espectro de RMN de ^1H entre abril/2014 e janeiro/2015. **(b)** Visão geral do espectro de RMN de ^1H da amostra QUANTREF contendo 20 mM de ácido gálico e 60 mM de ácido málico em H_2O , com expansão dos sinais 2 e 3 referentes ao ácido málico.

a)

Ácido gálico



b)

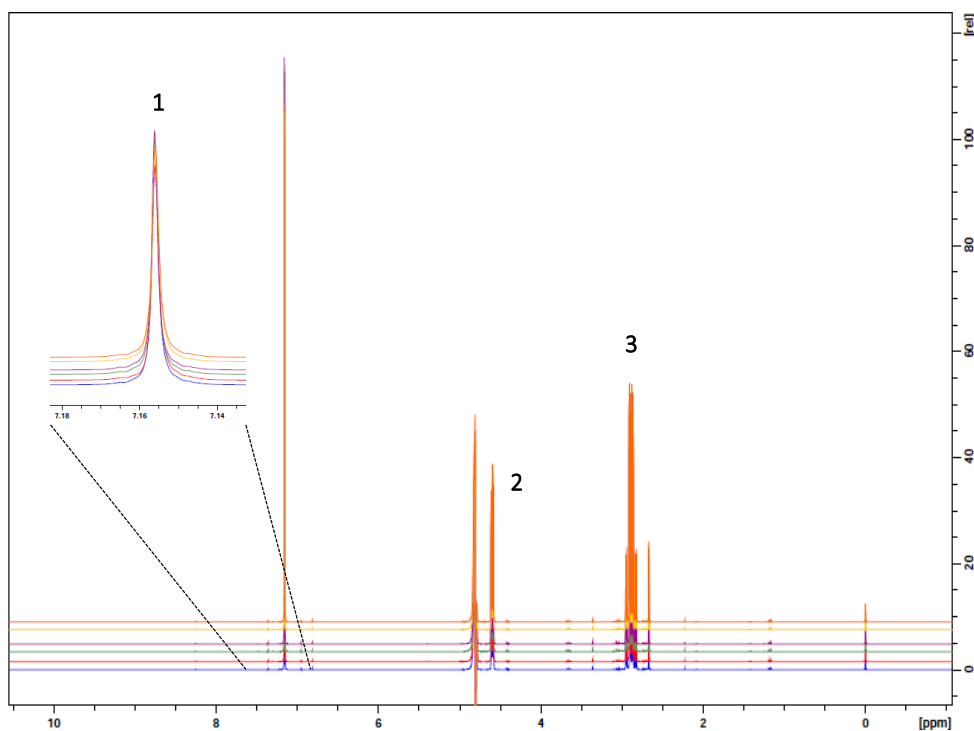


Figura 16: (a) Gráfico para verificação da concentração do ácido gálico na amostra QUANTREF através do sinal em 7,16 ppm (s) no espectro de RMN de ^1H entre abril/2014 e janeiro/2015. (b) Visão geral do espectro de RMN de ^1H da amostra QUANTREF contendo 20 mM de ácido gálico e 60 mM de ácido málico em H_2O , com expansão do sinal 1 referente ao ácido gálico.

4.2 Caracterização dos metabólitos presentes no suco de laranja natural

Espectros típicos de RMN de ^1H para as amostras de suco de laranja fresco das variedades de laranjas hamlin e pera (precoces) e laranjas natal e valência (tardias) são apresentados na Figura 17. Também são apresentados nas Figura 18 e Figura 19, a visão expandida das regiões de 10,0 a 6,0 ppm e 2,7 a 0,5 ppm, respectivamente para essas amostras.

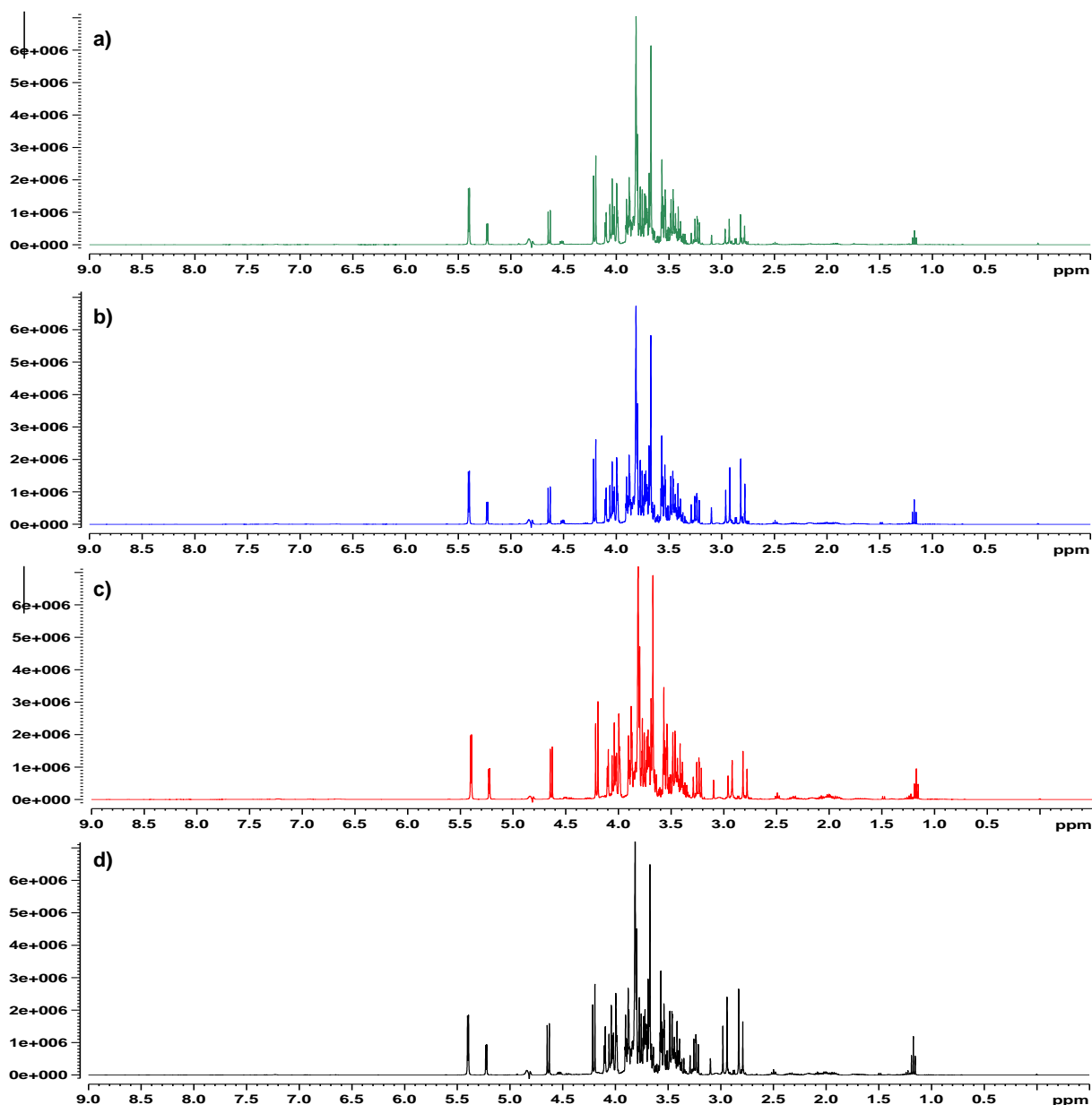


Figura 17: Visão geral para os espectros de RMN de ^1H das amostras de suco de laranja natural das variedades hamlin (a), pera (b), natal (c) e valência (d) na região de 9,0 a 0,0 ppm.

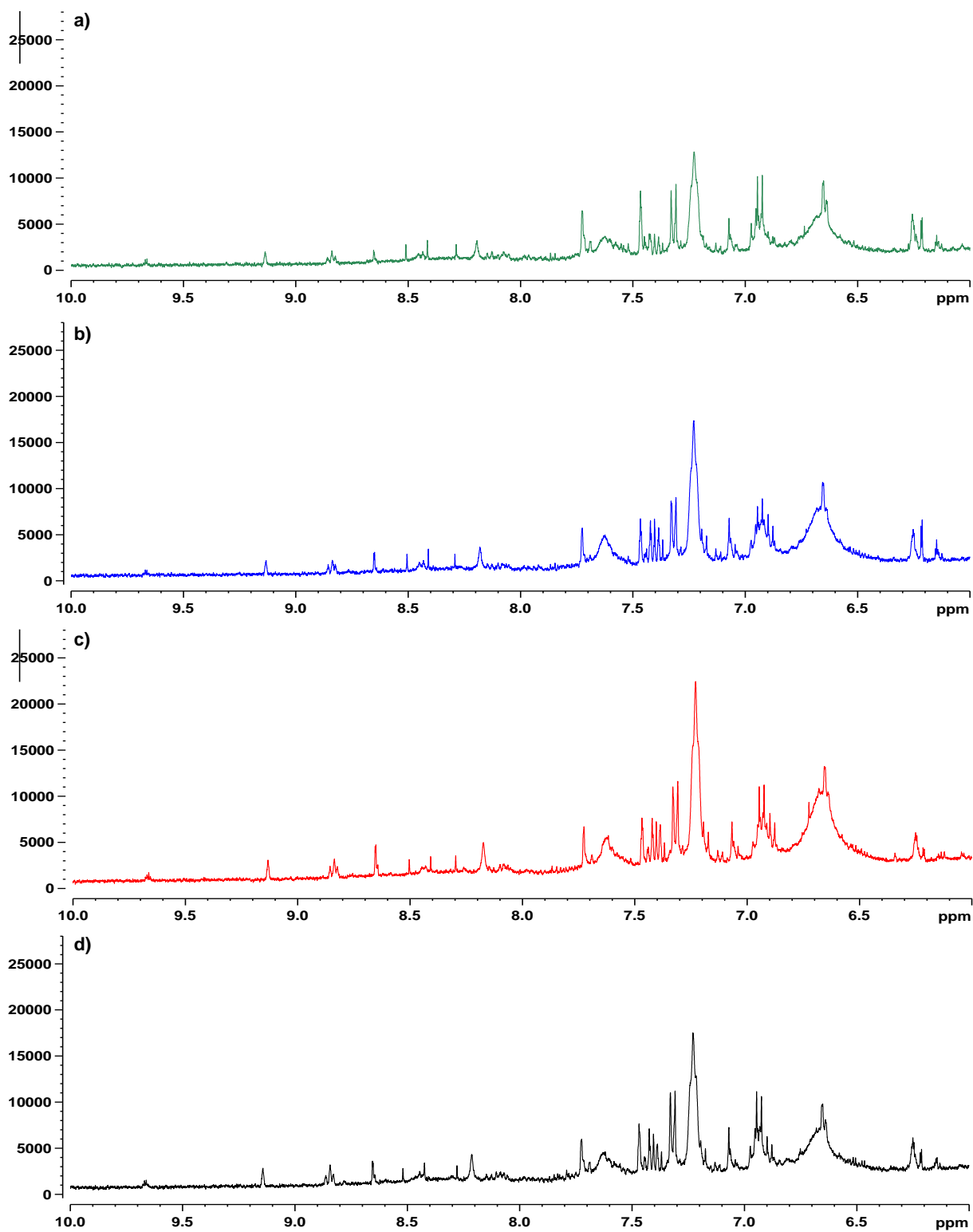


Figura 18: Visão expandida em 256 vezes para os espectros de RMN de ¹H das amostras de suco de laranja natural das variedades hamlin (a), pera (b), natal (c) e valência (d) na região de 10,0 a 6,0 ppm.

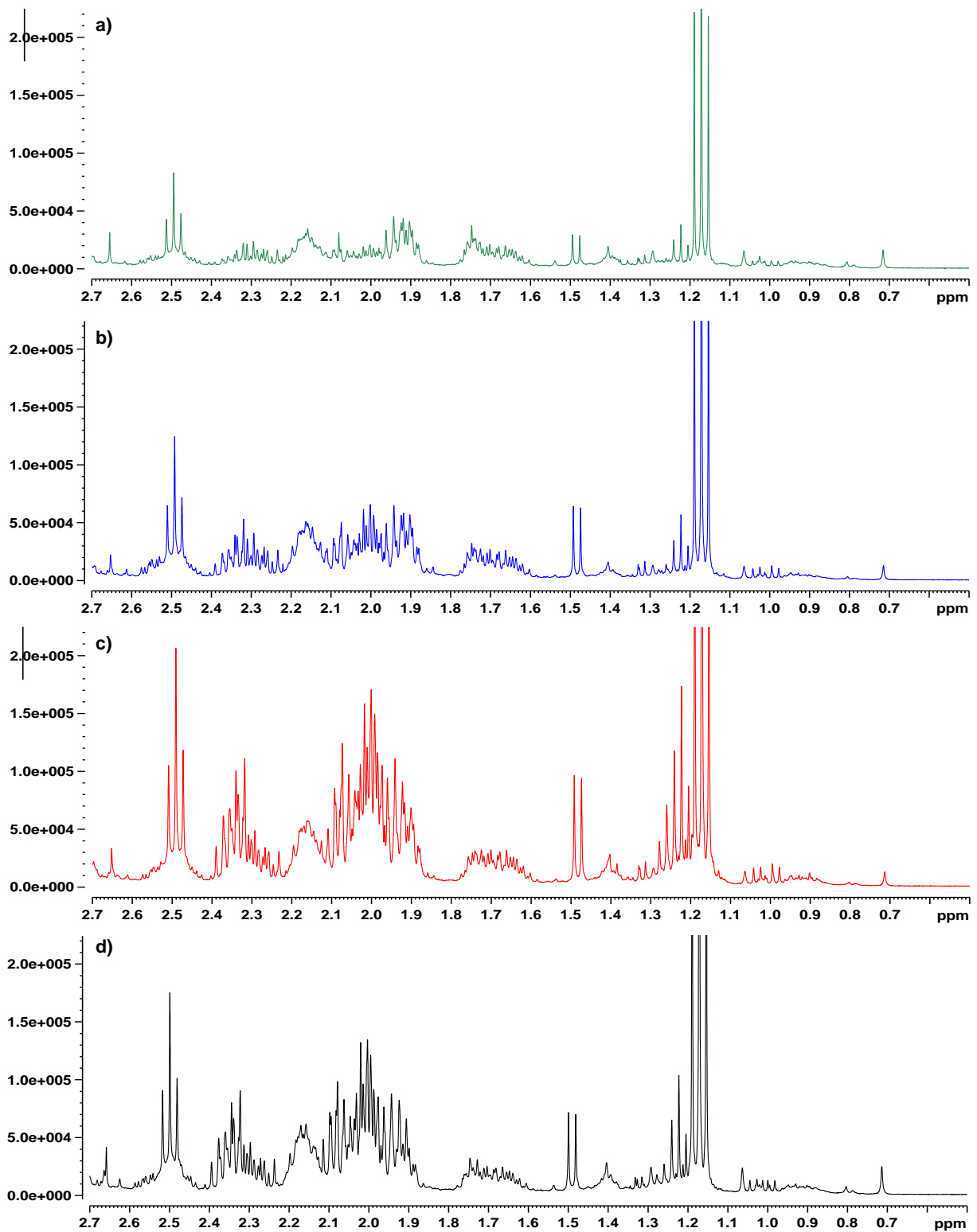


Figura 19: Visão expandida em 64 vezes para os espectros de RMN de ¹H das amostras de suco de laranja natural das variedades hamlin (a), pera (b), natal (c) e valência (d) na região de 2,7 a 0,5 ppm.

A caracterização dos metabólitos presentes no suco de laranja natural foram realizadas através dos experimentos de ^1H (Figura 20), mapas de correlações homonucleares via experimento de COSY (Figura 21), correlações heteronucleares diretas e a longas distâncias via acoplamento escalar (acima de uma ligação química), via experimentos de HSQC (Figura 22) e HMBC (Figura 23), respectivamente.

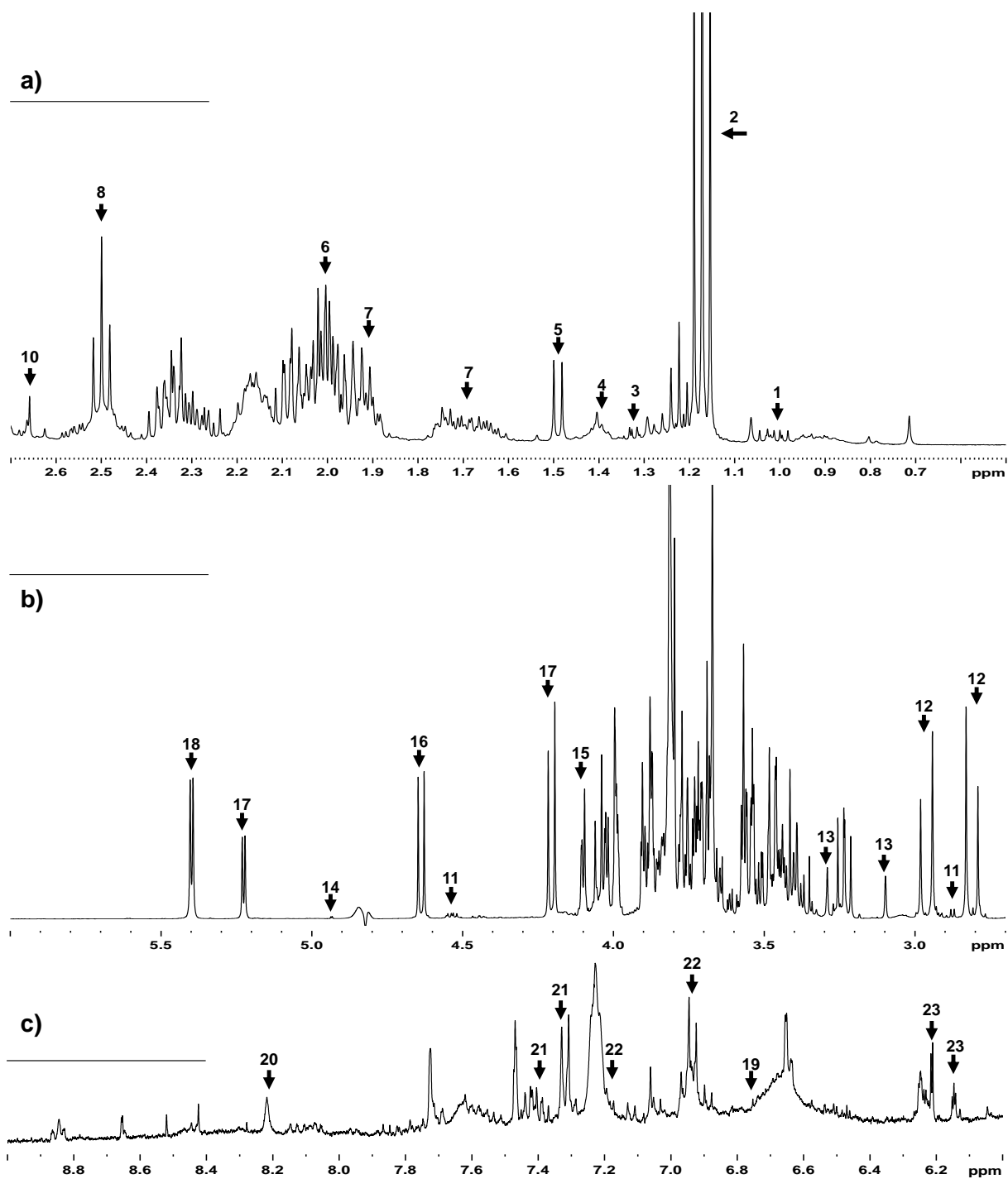


Figura 20: Caracterização dos metabólitos encontrados no suco de laranja natural da variedade valência via RMN de ¹H nas faixas de 2.9 a 0.5 ppm (a), 6.0 a 3.0 ppm (b) e 9.0 a 6.0 ppm (c), de acordo com a Tabela 3.

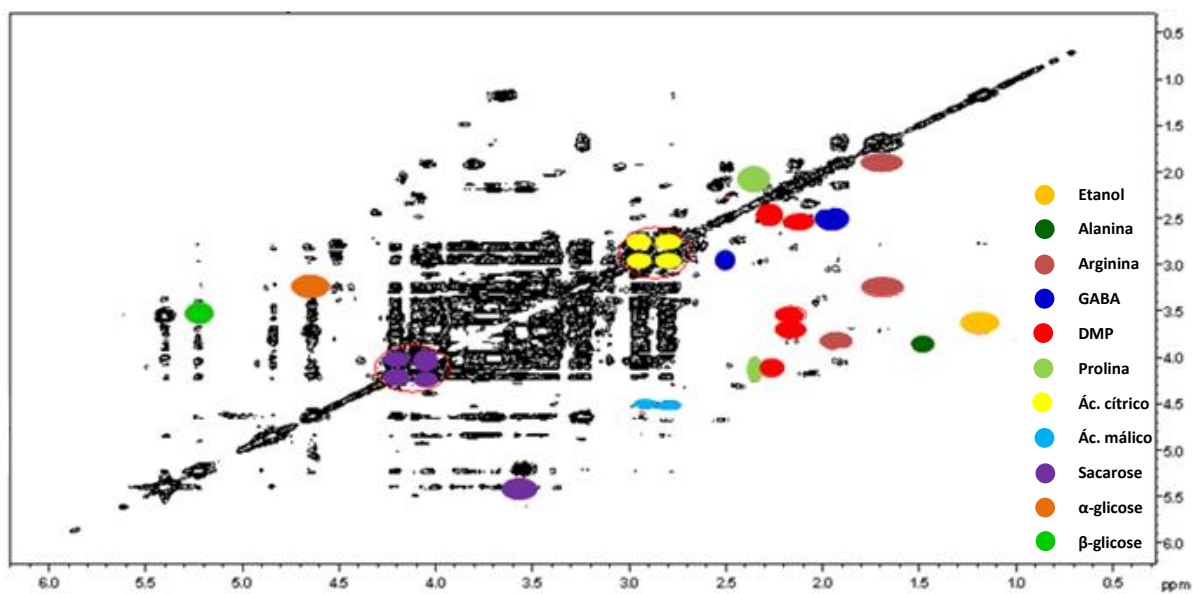


Figura 21: Visão geral do mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H (COSY) de uma amostra de suco de laranja natural da variedade natal.

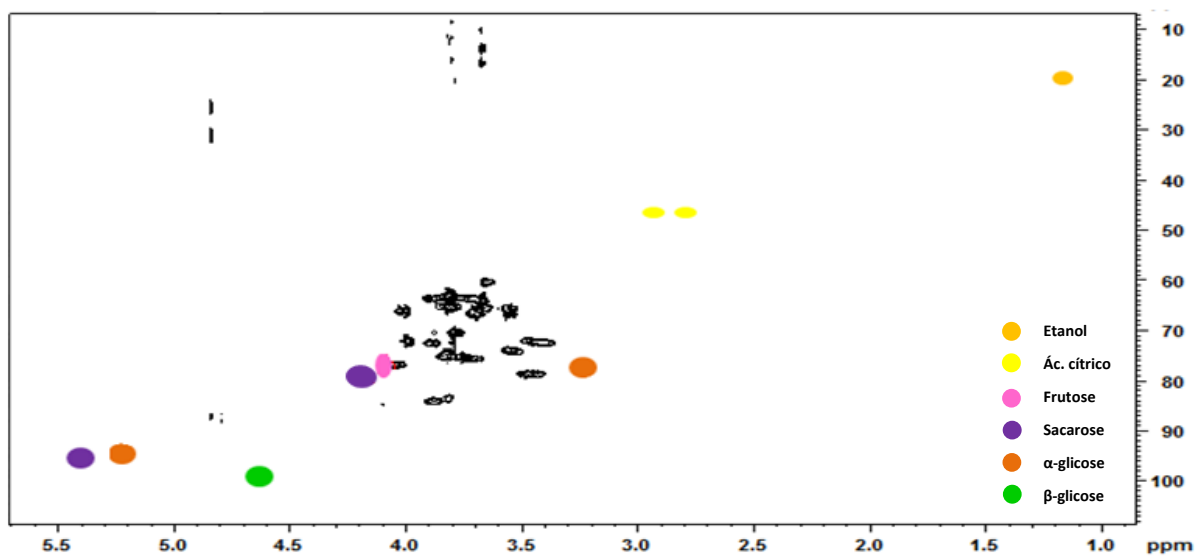


Figura 22: Visão geral do mapa de correlação heteronuclear direta ^1H - ^{13}C (HSQC) de uma amostra de suco de laranja natural da variedade natal.

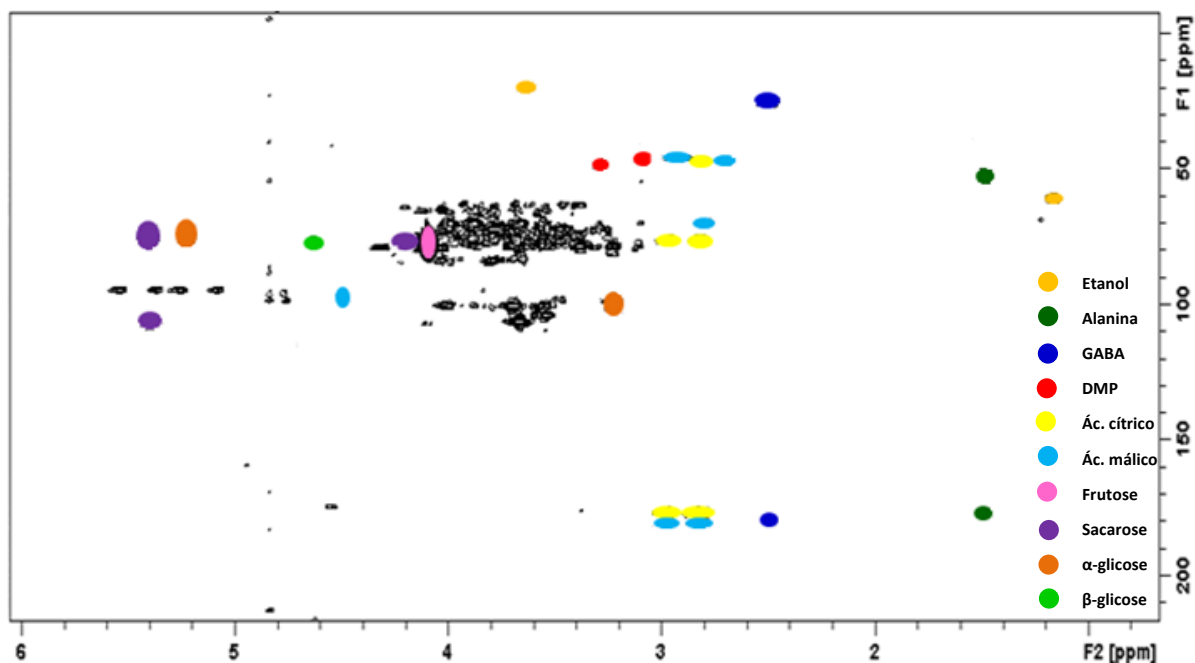


Figura 23: Visão geral do mapa de correlação heteronuclear a longas distâncias ^1H - ^{13}C (HMBC) de uma amostra de suco de laranja natural da variedade natal.

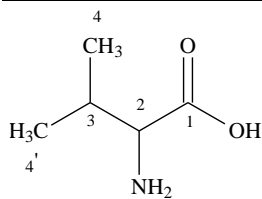
Além dos experimentos realizados, foram feitas análises de “sugestões” no software AMIXTM versão 3.9.7, através da base de dados de referência BBIORFCODE para alimentos da Bruker, contendo 300 metabólitos em várias faixas de pH disponibilizado no laboratório de RMN da UFSCar². Para garantir maior segurança na caracterização dos metabólitos encontrados no suco de laranja natural, também foram utilizadas comparações com os dados publicados na literatura científica¹.

Dessa maneira foram caracterizados 23 metabólitos presentes no suco de laranja fresco, os quais estão ilustrados e apresentados detalhadamente na Tabela 3, cujas estruturas químicas são apresentadas na Figura 24.

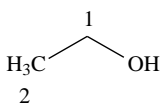
Tabela 3: Metabólitos caracterizados nas amostras de suco de laranja natural.

	Metabólitos	Deslocamento químico (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	Atribuição
1	valina	0.98	d	7.0	CH ₃
		1.03	d	7.0	CH ₃
2	etanol	1.17	t	7.2	CH ₃
		3.65	q	7.2	CH ₂
3	treonina	1.32	d	6.85	CH ₃
4	ácido láctico	1.39	d	7.00	CH ₃
5	alanina	1.48	d	7.7	CH ₃
6	prolina	1.94-2.10	m	--	CH ₂
7	arginina	1,59-1,80	m	--	CH ₂
		1.87-1.98	m	--	CH ₂
8	ácido γ -aminobutírico (GABA)	1.94	m	--	CH ₂
		2.50	t	7.5	CH ₂
		3.00-3.08	m	--	CH ₂
9	ácido acético	2,07	s	--	CH ₃
10	ácido succínico	2.65	s	--	CH ₂
11	ácido málico	2.78	dd	7.5;17.2	CH ₂
		2.89	dd	4.5;17.2	CH ₂
		4.52	dd	4.5;7.5	CH
12	ácido cítrico	2.80	d	15.9	CH ₂
		2.95	d	15.9	CH ₂
13	dimetilprolina (DMP)	3.09	s	--	CH ₃
		3.29	s	--	CH ₃
14	ácido ascórbico	4.93	d	1.8	CH
15	frutose	4.09-4.11	m	--	CH
16	β -glicose	4.63	d	7.9	CH
17	sacarose	4.04	t	8.7;8.7	CH
		4.20	d	8.7	CH
		5.40	d	3.9	CH
18	α -glicose	5.22	d	3.8	CH
19	ácido fumárico	6.74	s	--	CH
20	ácido fórmico	8.20	s	--	CH
21	fenilalanina	7.29-7.34	m	--	CH
		7,39-7,45	m	--	CH
22	tirosina	6,86-6,91	m	--	CH
		7,16-7,20	m	--	CH
23	florina	6,15	m	--	CH
		6,21	m	--	CH

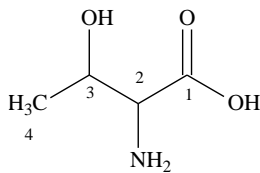
s-singlete, d-duplete, dd-duplo duplete, t-triplete, q-quarteto, m-multiplete.



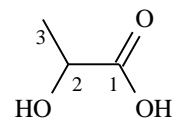
1-Valina



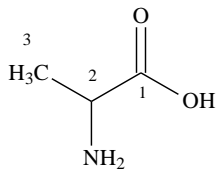
2-Etanol



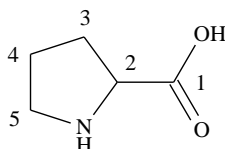
3-Treonina



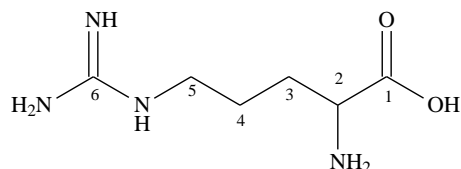
4-Ácido Láctico



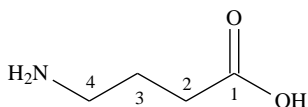
5-Alanina



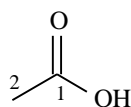
6-Prolina



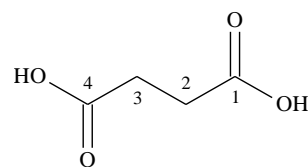
7-Arginina



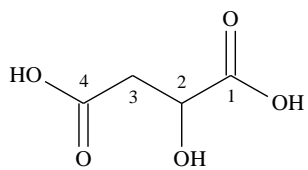
8-Ácido γ-aminobutírico (GABA)



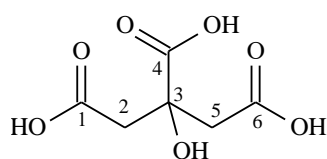
9-Ácido acético



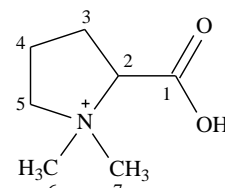
10-Ácido succínico



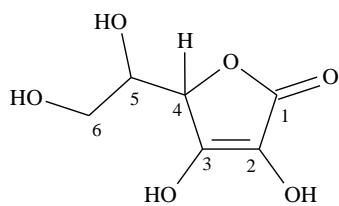
11-Ácido málico



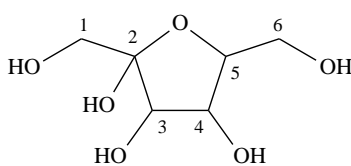
12-Ácido Cítrico



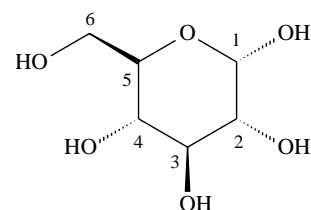
13-Dimetilprolina



14-Ácido ascórbico



15-Frutose



16-β-glicose

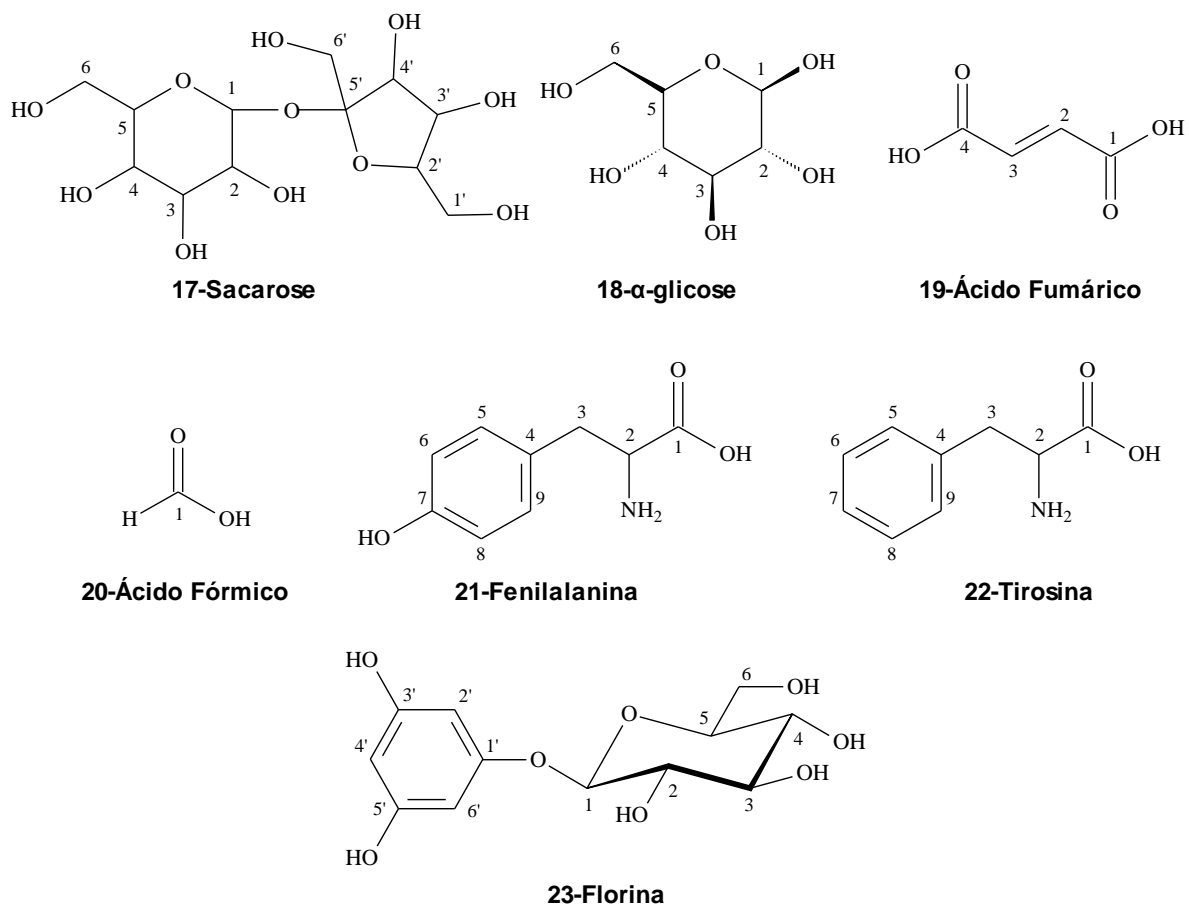


Figura 24: Estrutura química dos metabólitos caracterizados nas amostras de suco de laranja natural.

4.3 Modelos e análises quimiométricas para avaliação da regionalidade e sazonalidade das amostras de suco de laranja natural

4.3.1 Avaliação da regionalidade e sazonalidade em suco de laranja fresco por PCA

Para avaliar os efeitos da sazonalidade e regionalidade nas amostras de suco de laranja fresco, as variedades de laranja hamlin, pera, natal e valência foram estudadas separadamente em cada região na safra de 2014, enquanto que a safra de 2013 foram avaliados apenas os efeitos da regionalidade para cada variedade. Para tais observações, utilizamos o método de análise quimiométrica não supervisionada, ou seja, análises por componentes principais (**PCA**).

As análises por componentes principais permitem avaliar e visualizar possíveis variações contidas nos grupos de amostras, sendo elas por agrupamentos de amostras ou através das dispersões ao longo das componentes principais (**PC's**). Com intuito de avaliar as variações nas amostras através dos principais metabólitos, optou-se em trabalhar com os dados centrados na média, o qual dá maior peso para as variáveis desses metabólitos.

Durante o monitoramento da safra de 2013, foram avaliadas apenas as variedades tardias: natal (75 amostras) e valência (75 amostras), onde não houve divisão de coleta de amostras ao longo da safra, ao contrário da safra de 2014 onde houve divisões em início, meio e fim dependendo da variedade estudada. Portanto, o efeito da sazonalidade foi observado através do comparativo nas três diferentes regiões para a mesma variedade, tendo um total de 25 amostras por região de cada variedade estudada na safra de 2013.

A análise por PCA apresentada na Figura 25 para a variedade de suco de laranja natal foi realizada utilizando a região espectral de 10,00 a 0,65 ppm, com *bucket tables* de largura de 0,04 ppm e remoção do sinal residual da água de 4,90 ppm a 4,70 ppm. Conforme pode ser observado na parte (a) da figura, existe uma forte tendência nas amostras se agruparem de acordo com a região de coleta, onde é possível enxergar de maneira clara a formação de 3 grupos. Entretanto, as amostras da região 1 (cor verde) apresentam-se mais dispersas ao longo dos valores positivos da PC1 e PC3, quando comparadas com as amostras da região 2 (cor vermelha) e 3 (cor azul). As amostras da região 3 foram aquelas que apresentaram menores dispersões, estando fortemente agrupadas nos valores

negativos da PC1. Já as amostras da região 2 apresentaram-se dispersão intermediária ao longo dos valores negativos da PC3, quando comparadas com as amostras da região 1 e 3. A soma dos valores obtidos para as 3 primeiras PC's [PC1 (91,0%), PC2 (8,0%) e PC3 (0,5%)] apresentou explicação de 99,5% do total da variância do banco de dados.

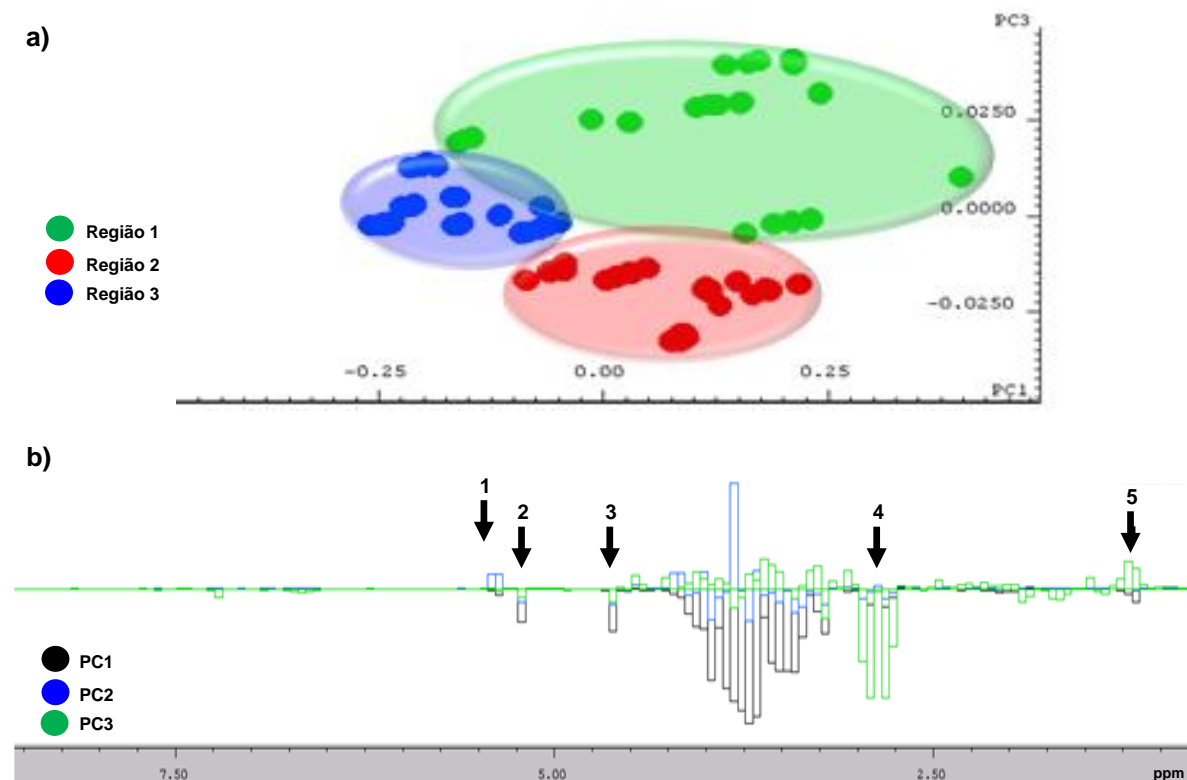


Figura 25: (a) Gráfico de escores da PC1 (91,0%) x PC3 (0,5%) para amostras de suco de laranja natal da safra 2013 nas regiões 1, 2 e 3, bem como os gráficos de pesos (b) das PC's 1, 2 e 3 destacando as variáveis de maior importância na análise da PCA. As setas indicadas na figura (b) correspondem aos metabólitos: 1 – sacarose, 2 – α -glicose, 3 – β -glicose, 4 – ácido cítrico e 5 – etanol.

De acordo com o gráfico de pesos, figura (b), as variáveis que tiveram maiores contribuições para os agrupamentos e dispersões observadas são aquelas referentes aos sinais dos metabólitos: sacarose (4,20 ppm), α -glicose (5,22 ppm), β -glicose (4,63 ppm), ácido cítrico (2,80 ppm e 2,95 ppm) e etanol (1,17 ppm).

De maneira oposta, as amostras de suco de laranja valência apresentaram-se mais dispersas ao longo da safra de 2013, quando comparadas com as amostras de suco de laranja natal. Considerando que as análises de PCA foram feitas no mesmo intervalo espectral, largura de *bucket tables* e remoção do sinal residual da água.

Na análise do gráfico de escores da Figura 26 (a), observa-se a formação de subgrupos para as 3 regiões estudadas ao longo da PC1 e PC2. As amostras da região 1 (cor verde) foram aquelas que apresentaram maior dispersão dos dados ao longo dos valores positivos e negativos da PC1, quando comparadas com as amostras das regiões 2 (cor vermelha) e 3 (cor azul). Quando comparadas com as amostras de suco laranja natal da região 1 (Figura 25 a), ambas variedades tiveram maiores dispersões para essa região, a qual indica ser a região de maior variação durante a safra de 2013. As amostras da região 2 foram aquelas que tiveram menor dispersão dos dados nos dois subgrupos observados, tendo amostras extremamente agrupadas em um dos subgrupos nos valores negativos da PC1 e PC2. Entretanto, as amostras da região 3 apresentaram a formação de um subgrupo nos valores negativos da PC2 e outro subgrupo nos valores centrais da PC1 e PC2.

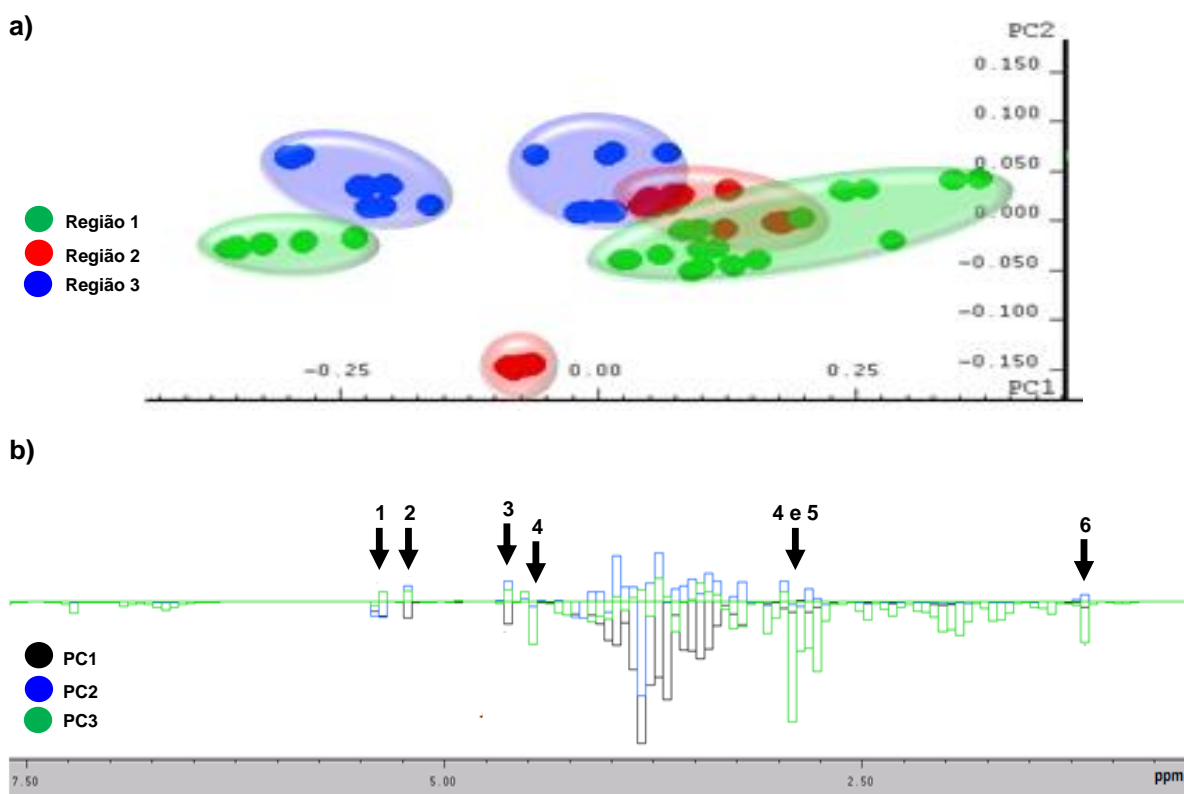


Figura 26: (a) Gráfico de escores da PC1 (91,0%) x PC2 (7,0%) para amostras de suco de laranja valência da safra 2013 nas regiões 1, 2 e 3, bem como os gráficos de pesos (b) das PC's 1, 2 e 3 destacando as variáveis de maior importância na análise da PCA. As setas indicadas na figura (b) correspondem aos metabólitos: 1 – sacarose, 2 – α - glicose, 3 – β -glicose, 4 – ácido málico, 5 – ácido cítrico e 6 – etanol.

Mesmo com a formação de subgrupos ao longo da safra, ainda é possível discriminar as amostras em função da região estudada. A soma dos valores obtidos para a variância explicada do banco de dados foi de 98,0 % para as 2 primeiras PC's [PC1 (91,0%) e PC3 (7,0%)]. Na análise do gráfico de pesos da Figura 26 (b), os principais metabólitos responsáveis pelas dispersões e agrupamentos observados nas amostras de suco de laranja valência foram: sacarose (4,20 ppm), α - glicose (5,22 ppm), β -glicose (4,63 ppm), ácido cítrico (2,80 ppm e 2,95 ppm), ácido málico (4,52 ppm) e etanol (1,17 ppm).

Os resultados observados nas análises de PCA da safra de 2013 mostraram dispersão considerável dos dados ao longo das PC's, indicando serem características provenientes da sazonalidade de cada variedade estudada. Assim, o monitoramento da safra de 2014 foi dividido em períodos de coleta de amostras ao longo da safra. As amostras de suco laranja das variedades precoces: hamlin e pera foram divididas em início e fim da safra, enquanto que as variedades tardias: natal e valência foram divididas em início, meio e fim de safra. As divisões apresentadas para cada variedade estão relacionadas à produção de suco de laranja durante a safra, e não exatamente ao período em que a safra teve início ou fim.

Em geral, a duração da safra de suco de laranja precoce corresponde ao período de aproximadamente de 15 a 30 dias, enquanto que as variedades tardias em torno de 2 a 3 meses. A Figura 27 mostra os pontos de quanto foram coletadas as amostras de suco fresco para a safra de 2014 para as variedades tardias e precoces nas 3 regiões estudadas.

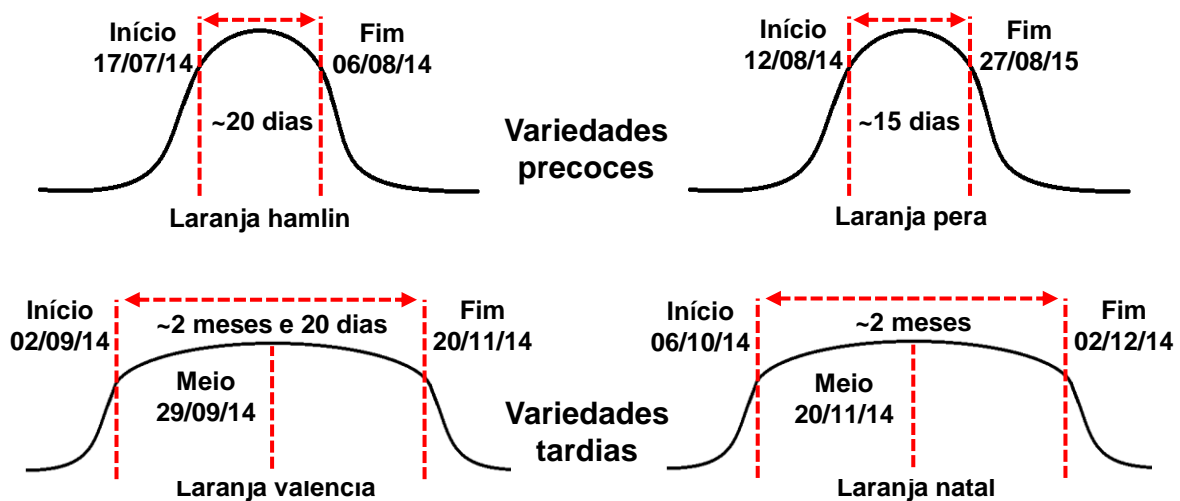


Figura 27: Período de coleta das amostras de suco de laranja fresco durante a safra de 2014 para as variedades de laranja hamlin, pera, natal e valência.

Assim, o monitoramento dos efeitos da sazonalidade e regionalidade para a safra de 2014 totalizou aproximadamente 750 amostras analisadas. Em que, 300 amostras são correspondentes às variedades precoces e 450 amostras para as variedades tardias, onde foram coletadas 25 amostras em cada período da safra para cada variedade estudada.

A realização das análises de PCA foram feitas na região espectral de 10,00 a 0,65 ppm, com a remoção do sinal residual da água de 4,90 ppm a 4,70 ppm, utilizando cada ponto da região como um *bucket table* (*take one point as bucket*). Esse procedimento experimental para as análises de PCA com as amostras da safra de 2014, foram aqueles que demonstraram resultados mais satisfatórios quando comparados com o método adotado com as amostras da safra de 2013.

Na Figura 28 são mostrados os gráficos de escores para as análises de PCA das amostras de suco de laranja das variedades precoces: hamlin (**a**) e pera (**d**) na região 1. Podemos observar que as amostras do suco de laranja hamlin apresentaram tendências na formação de dois grupos, o primeiro (cor preta) referente às amostras coletadas no início da safra nos valores negativos da PC1, e o segundo (cor vermelha) relacionado às amostras coletadas no fim da safra nos valores positivos da PC1. Ambos os grupos tiveram um subgrupo de amostras do início da safra se agrupando com as amostras do fim da safra, e um subgrupo do fim se agrupando com as amostras do início da safra. Esses agrupamentos observados nas análises da PCA podem ser um indicativo de transição do período da safra ou apenas características relacionadas ao ponto de coleta das amostras. Já as amostras de suco de laranja pera (Figura 28 **d**) apresentaram tendência clara na separação dos grupos do início (cor preta) e fim (cor vermelha) da safra. Em que as amostras do início estão agrupadas nos valores positivos da PC1 e negativos da PC2, enquanto que as amostras do fim encontram-se agrupadas nos valores negativos da PC1 e positivos da PC2. A soma dos valores obtidos para a variância explicada do banco de dados das amostras de suco de laranja hamlin foi de 84,10 % para as 2 primeiras PC's [PC1 (65,38%) e PC2 (18,72%)], e para as amostras de suco de laranja pera de 83,94 % para as 3 primeiras PC's [PC1 (55,66%), PC2 (16,70%) e PC3 (11,58%)].

Através dos gráficos de pesos da Figura 28 para as variedades hamlin (**b** e **c**) e pera (**e** e **f**) na região 1, podemos dizer que as variáveis referentes aos sinais dos metabólitos: sacarose (4,20 ppm), α -glicose (5,22 ppm), β -glicose (4,63 ppm),

frutose (4,11 – 4,09 ppm) , ácido cítrico (2,80 ppm e 2,95 ppm), ácido málico (4,52 ppm), ácido succínico (2,65 ppm), prolina (2,10 – 1,94 ppm), treonina (1,32 ppm) e etanol (1,17 ppm) foram aqueles que tiveram maiores influência nas separações dos grupos, levando em consideração que os dados foram centrados na média para as análises por PCA.

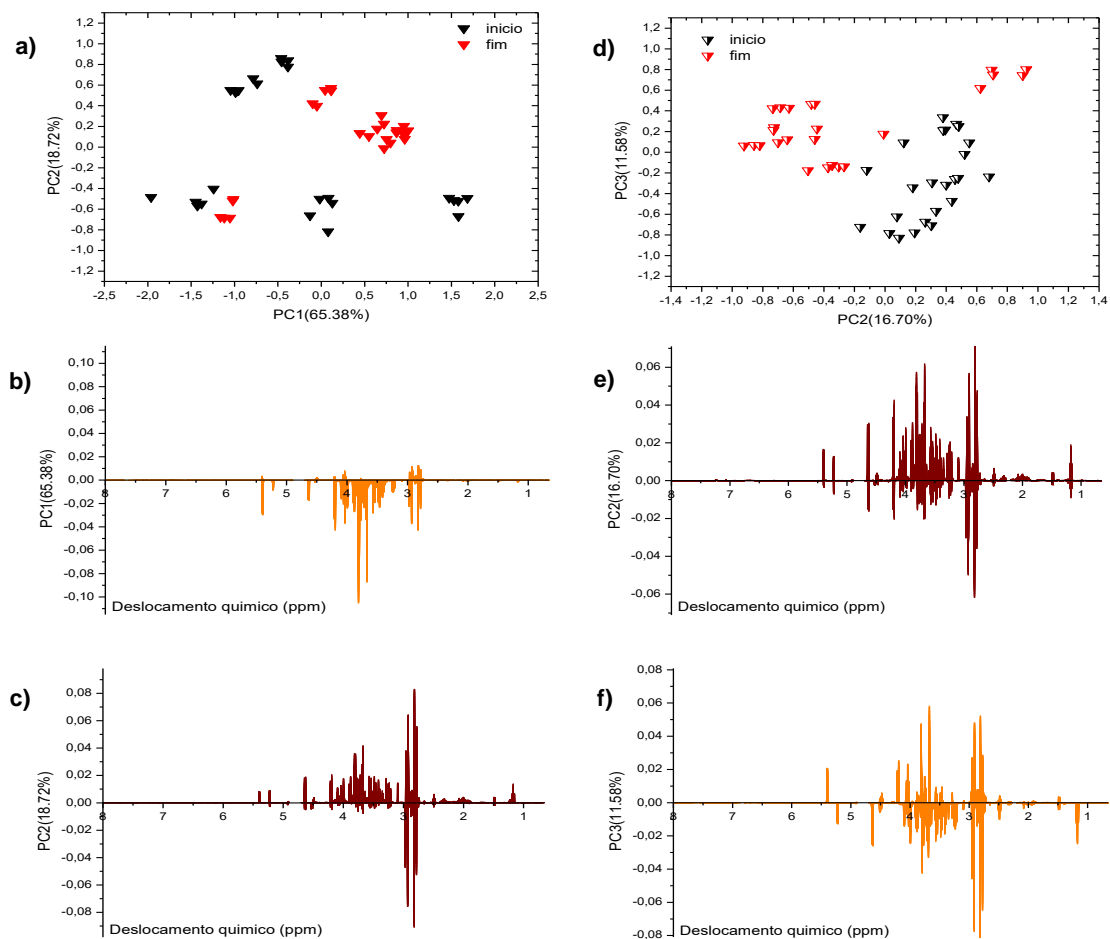


Figura 28: Gráfico de escores da PC1 (65,38%) x PC2 (18,72%) e PC2 (16,70%) x PC3 (11,58%) para amostras de suco de laranja hamlin (a) e pera (d) na safra de 2014 região 1, respectivamente. Gráficos de pesos das PC's 1 e 2 (b e c) e PC's 2 e 3 (e e f) para as amostras de suco de laranja hamlin e pera, respectivamente.

As amostras de suco de laranja precoce da região 2 apresentaram uma diferenciação clara entre os períodos do início e fim da safra de 2014. De acordo com os gráficos de escores da Figura 29 (a) e (d), as amostras do início da safra (cor preta) das variedades hamlin e pera apresentaram a formação de grupos de amostras ao longo dos valores positivos da PC1 e PC2, enquanto que as amostras

do fim da safra tiveram seus grupos formados ao longo dos valores negativos da PC1 e PC2, respectivamente para as variedades hamlin e pera. O mesmo comportamento observado na região 1 foi observado na região 2, onde um grupo de amostras do início da safra se agrupa com as amostras do fim, e vice-versa, o qual indica ser um período de transição da safra ou características dos locais onde esses grupos de amostras foram coletados.

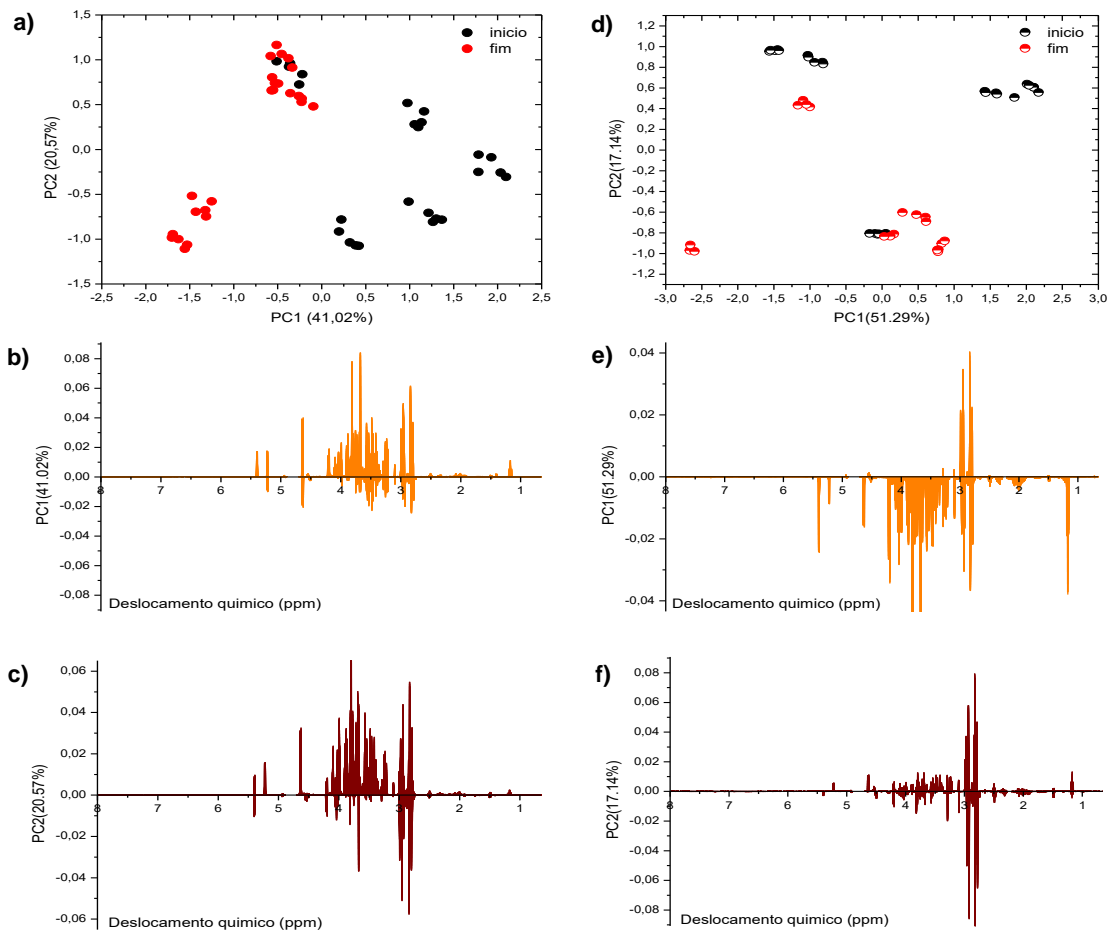


Figura 29: Gráfico de escores da PC1 (41,02%) x PC2 (20,57%) e PC1 (51,29) x PC2 (17,14%) para amostras de suco de laranja hamlin (a) e pera (d) na safra de 2014 região 2, respectivamente. A soma dos valores obtidos para a variância explicada foi de 61,59% e 68,43% para as 2 primeiras PC's dos sucos das laranjas hamlin e pera, respectivamente. Gráficos de pesos das PC's 1 e 2 das amostras de suco de laranja hamlin (b e c) e pera (e e f).

Os gráficos de pesos da Figura 29 mostram que as variáveis que mais contribuíram para diferenciação dos grupos observados, de acordo com o método

utilizado foram a sacarose (4,20 ppm), α - glicose (5,22 ppm), β -glicose (4,63 ppm), frutose (4,11 – 4,09 ppm) , ácido cítrico (2,80 ppm e 2,95 ppm e o etanol (1,17 ppm).

O suco das laranjas precoces da região 3 apresentaram os períodos da safra mais bem definidos para a variedade pera (**d**) que as amostras de suco de laranja hamlin (**a**), conforme são mostrados no gráfico de escores da Figura 30. As amostras do início da safra (cor preta) da variedade hamlin apresentaram mais dispersas ao longo dos valores positivos e negativos da PC1 e PC2, enquanto que as amostras do fim da safra (cor vermelha) encontraram em sua maioria nos valores positivos da PC1, com exceção a um grupo de amostra que se encontra nos valores negativos da PC1. Apesar da dispersão das amostras ao longo da PC1 e PC2, é possível observar uma tendência em separar as amostras do início e do fim da safra ao longo das PC's. Ao contrário das amostras de suco de laranja hamlin, as amostras de suco de laranja pera tiveram os períodos da safra bem definidos ao longo da PC1 e PC2. Onde amostras do início da safra (cor preta) encontram-se nos valores negativos da PC1, e amostras do fim da safra (cor vermelha) encontra-se nos valores positivos da PC1.

A soma dos valores obtidos para a variância explicada do banco de dados das amostras de suco de laranja hamlin foi de apenas 39,74% para as 2 primeiras PC's [PC1 (21,22%) e PC2 (18,52%)], e para as amostras de suco de laranja pera de 67,52 % [PC1 (54,52%), PC2 (13,00%)]. De acordo com os gráficos de pesos da Figura 30 (**b**), (**c**), (**e**) e (**f**) as variáveis referentes à sacarose (4,20 ppm), α - glicose (5,22 ppm), β -glicose (4,63 ppm), frutose (4,11 – 4,09 ppm) , ácido cítrico (2,80 ppm e 2,95 ppm e o etanol (1,17 ppm) foram aquelas que mais contribuíram para as informações alcançadas nas análises de PCA.

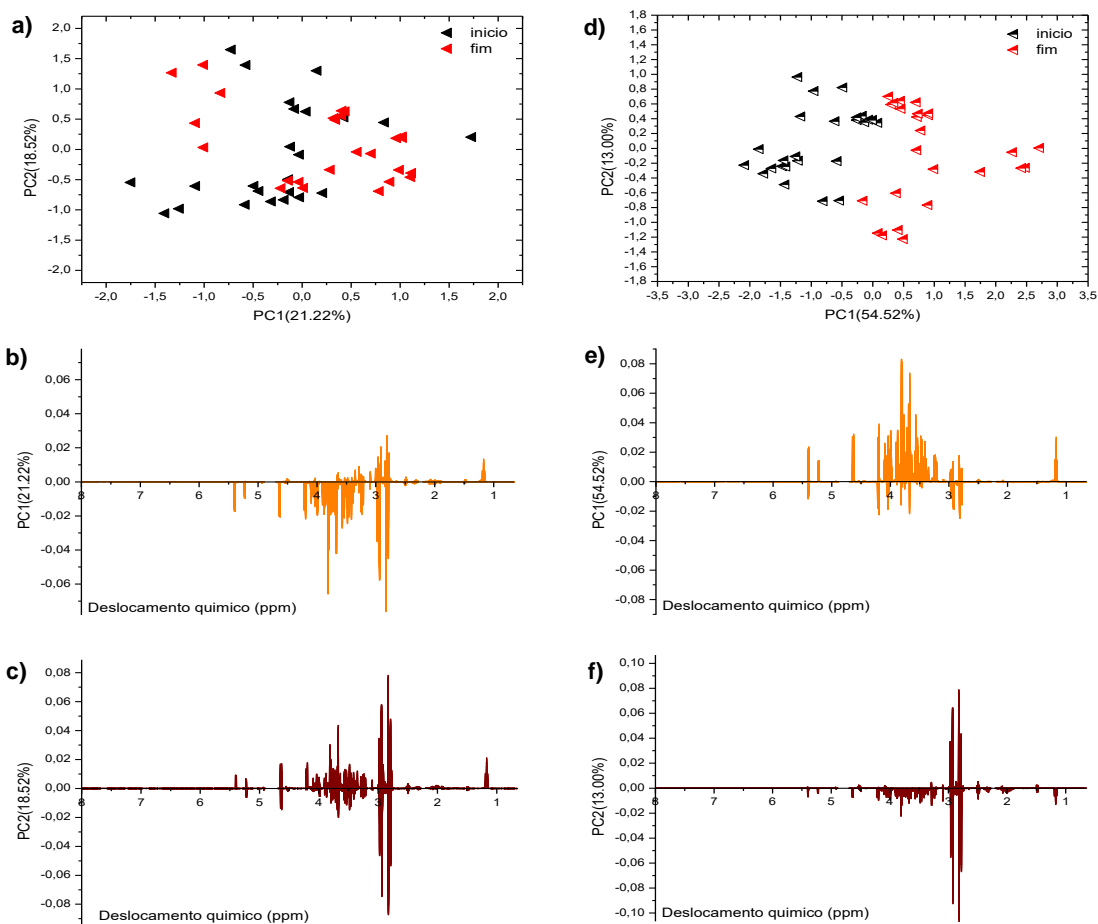


Figura 30: Gráfico de escores da PC1 (21,22%) x PC2 (18,52%) e PC1 (54,52) x PC2 (13,00%) para amostras de suco de laranja hamlin (a) e pera (d) na safra de 2014 região 3, respectivamente. Gráficos de pesos das PC's 1 e 2 das amostras de suco de laranja hamlin (b e c) e pera (e e f).

As variedades tardias foram analisadas com o mesmo procedimento experimental que as amostras das variedades precoces da safra de 2014, com exceção para as amostras da região 2, onde os melhores resultados obtidos foram para a faixa espectral de 10,0 - 5,50 ppm. As amostras do início, meio e fim da safra correspondem às cores preta, verde e vermelho, respectivamente para as regiões 1, 2 e 3.

Na região 1, conforme pode ser observado no gráfico de escores da Figura 31 (a), as amostras de suco de laranja natal encontram-se bem dispersas ao longo das componentes principais 1 e 2. Entretanto é possível observar uma tendência de separação das amostras do início da safra nos valores negativos da

PC1, enquanto que as amostras do meio e fim da safra encontram-se mais agrupadas nos valores positivos da PC1. Contudo, as amostras referentes ao meio da safra apresentam mais centralizadas na PC1 e PC2, e as amostras do fim da safra tendem a se dispersarem ao longo dos valores positivos da PC1. Ao contrário das amostras de suco de laranja pera, as amostras da laranja valência apresentam-se menos dispersas ao longo da PC1 e PC2, principalmente para as amostras do início e meio da safra que se encontram bem agrupadas no centro das PC's. Diferentemente, as amostras do fim da safra apresentam-se mais dispersas ao longo dos valores negativos da PC1, indicando maior variação dos metabólitos durante este período da safra.

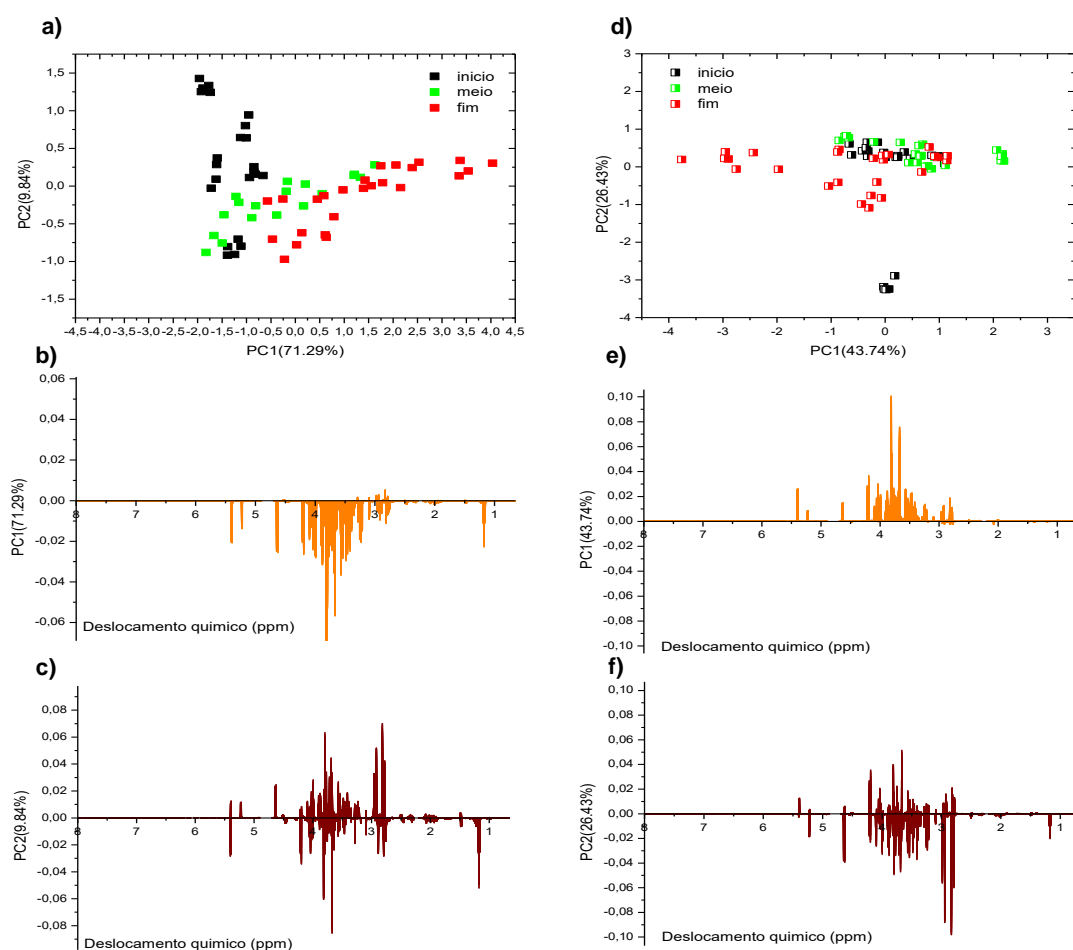


Figura 31: Gráfico de escores da PC1 (71,29%) x PC2 (9,84%) e PC1 (43,74) x PC2 (26,43%) para amostras de suco de laranja natal (a) e valência (d) na safra de 2014 região 1, respectivamente. Gráficos de pesos das PC's 1 e 2 das amostras de suco de laranja hamlin (b e c) e pera (e e f).

Logo, pode-se dizer que as amostras de suco de laranja da variedade natal do meio e fim da safra são muito semelhantes durante estes períodos da safra, enquanto que as amostras do fim apresentam diferentes dos outros dois, com maior variação dos seus metabólitos. Do mesmo modo, as amostras de suco de laranja valência do início e fim da safra apresentam-se muito semelhantes e com poucas variações dos seus metabólitos, enquanto que para as amostras do fim ocorre uma variação maior dos metabólitos.

De acordo com os gráficos de pesos da Figura 31 **(b)**, **(c)**, **(e)** e **(f)** as variáveis referentes à sacarose (4,20 ppm), α - glicose (5,22 ppm), β -glicose (4,63 ppm), frutose (4,11 – 4,09 ppm) , ácido cítrico (2,80 ppm e 2,95 ppm), GABA (1,94 ppm e 2,50 ppm), prolina (1,94 – 2,10 ppm), arginina (1,59 – 1,80 ppm e 1,87 – 1,98 ppm), alanina (1,48 ppm) e o etanol (1,17 ppm) foram aquelas que mais tiveram influência nas separações e tendências observadas nas análises de PCA. A soma dos valores obtidos para a variância explicada do banco de dados das amostras de suco de laranja natal foi de 81,13% e 70,17% para as amostras de suco de laranja valência para as 2 primeiras PC's.

Na região 2, as amostras de suco de laranja natal e valência apresentaram muito dispersas ao longo das PC1, PC2 e PC3. A Figura 32**(a)** mostra as amostras de suco de laranja natal do início da safra menos dispersas que as amostras do meio e fim nos valores positivos da PC2. As amostras do meio da safra encontram-se nos valores negativos da PC1, com exceção de um grupo de amostras que se encontram nos valores positivos da PC1. As mostras do fim da safra também se encontram nos valores negativos da PC1, contudo dois grupos de amostras estão nos valores positivos da PC1, com alta correlação com as amostras do início da safra.

O comportamento das amostras de suco de laranja valência na região 2, conforme o gráfico de escores da Figura 32 **(d)** mostram a formação dos grupos do início, meio e fim da safra mais bem definidos que as amostras da variedade natal. As amostras do início e meio da safra tendem a ficar nos valores negativos da PC1, com exceção ao um grupo de amostras que se encontra nos valores mais positivo da PC1, demonstrando ser um grupo de amostra diferente das demais amostras. Apesar de estarem correlacionadas nos valores negativos da PC1 com as amostra do início da safra, a maioria das amostras do meio tendem a ficarem nos valores positivos da PC2, com um grupo de amostras do início altamente correlacionado

com essas amostras. Menos dispersas que as amostras do início e meio da safra, as amostras do fim encontram-se bem agrupadas nos valores positivos da PC1, indicando pouca variação dos metabólitos neste período da safra.

A soma dos valores obtidos para a variância explicada do banco de dados das amostras de suco de laranja natal foi de 82,25% para as 2 primeiras PC's [PC1 (75,44%) e PC2 (6,81%)], e para as amostras de suco de laranja valência de 73,57% para as 3 primeiras PC's [PC1 (39,77%), PC2 (22,95%) e PC3 (10,85%)].

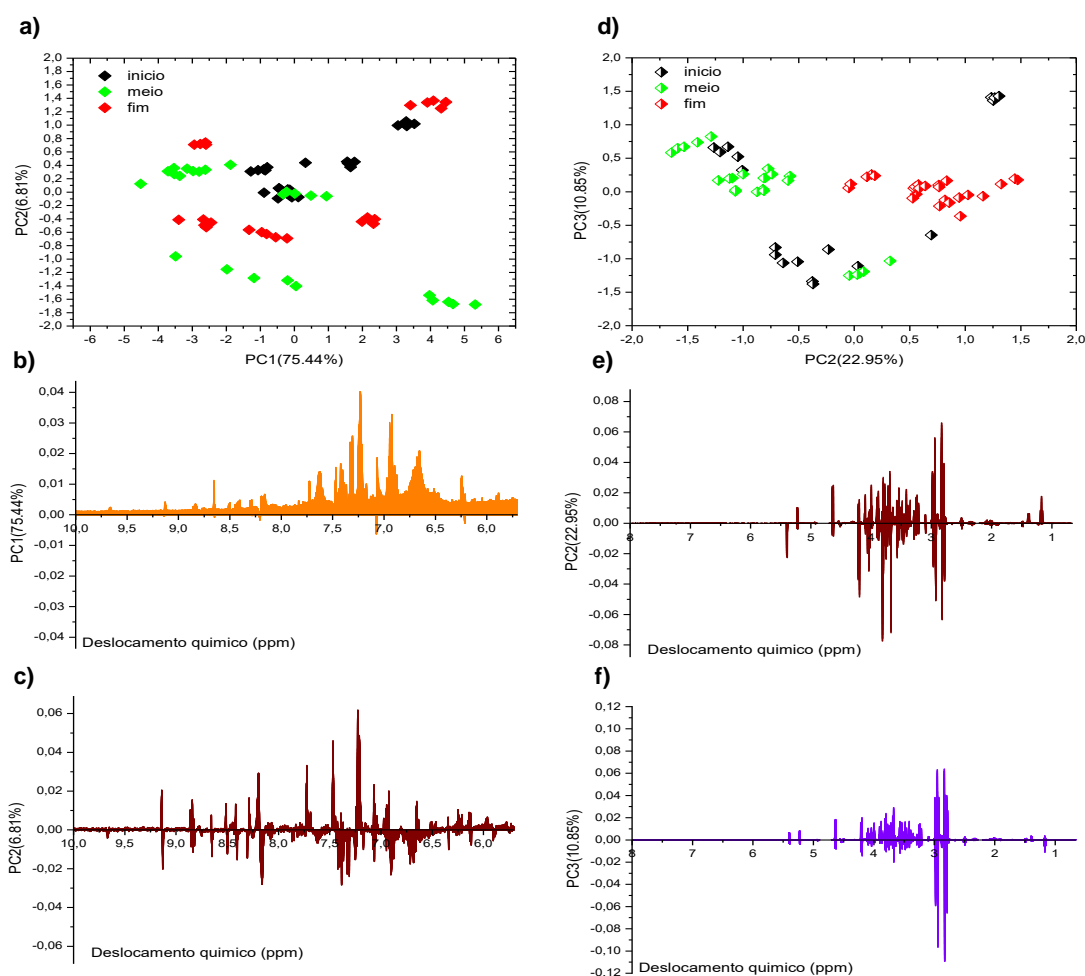


Figura 32: Gráfico de escores da PC1 (75,44%) x PC2 (6,81%) e PC2 (22,95%) x PC3 (10,85%) para amostras de suco de laranja natal (a) e valência (d) na safra de 2014 região 2, respectivamente. Gráficos de pesos das PC's 1, 2 e 3 das amostras de suco de laranja natal (b e c) e valência (e e f).

Os gráficos de pesos da Figura 32 (b), (c), (e) e (f) indicaram que as variáveis que mais contribuíram para as separações e tendências observadas na região 2, de acordo com o método utilizado para as análises de PCA, correspondem

aos metabólitos: ácido fórmico (8,20 ppm), fenilalanina (7,29 – 7,34 ppm e 7,39 – 7,45 ppm), tirosina (6,86 – 6,91 ppm e 7,16 – 7,20 ppm), florina (6,15 ppm e 6,21 ppm), sacarose (5,40 ppm e 4,20 ppm), α - glicose (5,22 ppm), β -glicose (4,63 ppm), ácido cítrico (2,80 ppm e 2,95 ppm), alanina (1,48 ppm), treonina (1,32 ppm) e o etanol (1,17 ppm), além dos metabólitos não identificados em 9,20 ppm, 7,35 ppm e 6,65 ppm.

As amostra da região 3 apresentaram claramente uma variação dos seus metabólitos durante o início da safra, quando comparadas com as amostras do meio e fim da safra das variedades natal e valência, conforme apresentado no gráfico de escores da Figura 33 (a) e (d). As amostras do início da safra encontram-se nos valores negativo da PC1 para ambas as variedades, apesar de algumas amostras da variedade valência terem mostrado uma forte correlação com as amostras do meio da safra. As amostras do meio e fim da safra da variedade natal possuem uma forte correlação ao longo dos valores positivos das PC1, tendo as amostras do fim mais dispersas nos valores negativos da PC2. Já as amostras do meio e fim da safra da variedade valência tiveram a formação de dois grupos, onde as amostras do meio da safra concentraram nos valores negativos da PC2, enquanto que as amostras do fim da safra nos valores positivos da PC2. Assim, podemos dizer que as amostras ao longo da safra da variedade valência apresentaram variação clara dos seus metabolitos durante os três períodos de coleta.

As variáveis que mais contribuíram para as separações e tendências observadas na região 3 correspondem aos metabólitos: sacarose (5,40 ppm e 4,20 ppm), α - glicose (5,22 ppm), β -glicose (4,63 ppm), ácido cítrico (2,80 ppm e 2,95 ppm) e o etanol (1,17 ppm), de acordo com o procedimento experimental aplicado nas análises de PCA e através das análises dos gráficos de pesos da Figura 33 (b), (c), (e) e (f). Assim, a soma dos valores obtidos para a variância explicada do banco de dados das amostras de suco de laranja natal foi de 62,50% para as 2 primeiras PC's [PC1 31,58% e PC2 30,92%], e para as amostras de suco de laranja valência de 61,76% [PC1 38,64% e PC2 23,12%] na região 3.

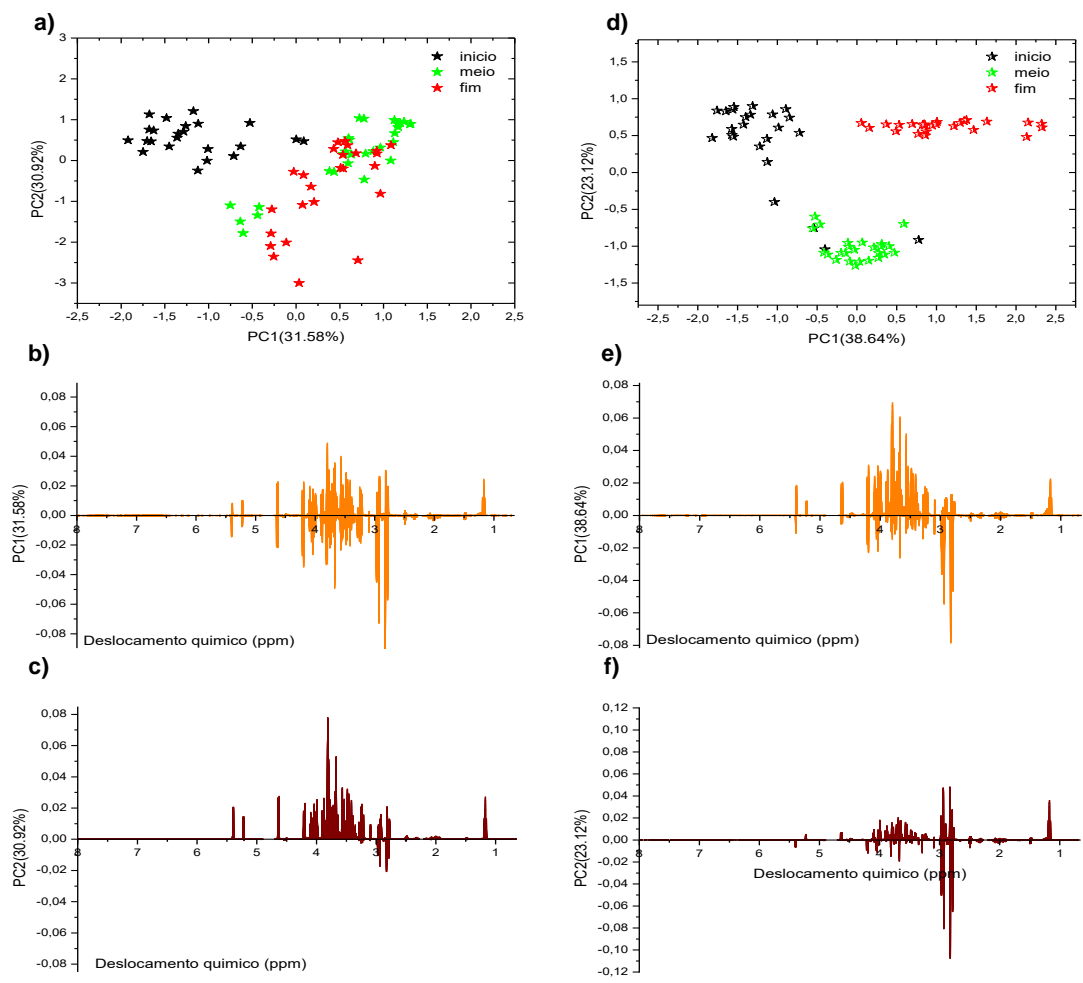


Figura 33: Gráfico de escores da PC1 (31,58%) x PC2 (30,92%) e PC1 (38,64%) x PC2 (23,12%) para amostras de suco de laranja natal (a) e valência (d) na safra de 2014 região 3, respectivamente. Gráficos de pesos das PC's 1 e 2 das amostras de suco de laranja natal (b e c) e valência (e e f).

4.3.2 Avaliação da regionalidade em suco de laranja fresco

Com o intuito de classificar as amostras de suco de laranja de acordo com o ano da safra, o tipo de laranja, a variedade e a região de coleta utilizamos o método de classificação multivariado PLS-DA (*Partial Least Square – Discriminant Analysis*) (Figura 34).

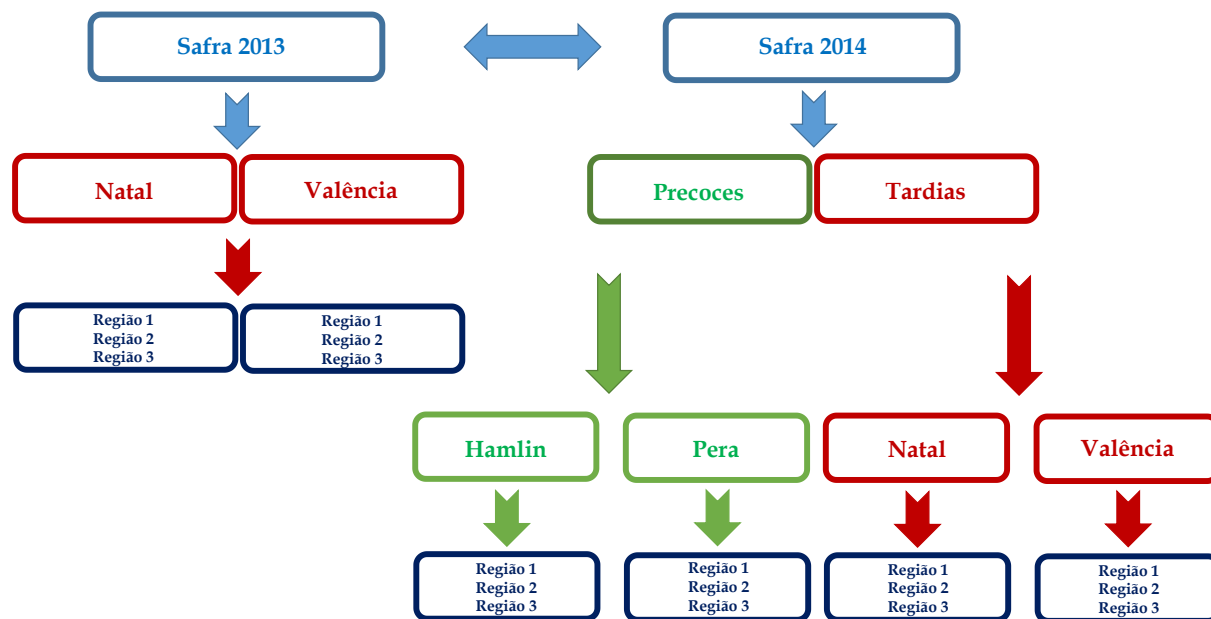


Figura 34: Esquema ilustrativo para classificação das amostras de suco de laranja fresco em função do ano da safra, do tipo de laranja, da variedade e da região de coleta utilizando a classificação por PLS-DA.

Conforme ilustrado no esquema da Figura 34, a primeira classificação para o PLS – DA nas amostras de suco de laranja fresco se baseou no ano da safra. Nesta etapa, foram classificadas as amostras em função do ano da safra utilizando todas as amostras do banco de dados e todas as variáveis espectrais. Os dados foram derivados, normalizados pela área e centrados na média, com a utilização de 7 variáveis latentes, aplicando-se validação cruzada por subclasses randômicas com 5 interações e 10 subclasses para construção dos modelos. Foram criadas 2 classes no modelo, onde a primeira classe refere-se as amostras da safra de 2013 e segunda classe refere-se as amostras da safra de 2014, corresponde à um total de aproximadamente 900 amostras (Figura 35). Podemos observar na classe 1 que apenas um pequeno grupo de 3 amostras da safra de 2013 (cor vermelho) e 3 amostras da safra de 2014 (cor verde) ficaram abaixo e acima, respectivamente, da linha de relevância na horizontal (cor preto) do modelo PLS-DA. O mesmo efeito

acontece na classificação das amostras da classe 2, onde as mesmas 3 amostras da safra de 2013 ficaram acima da linha de relevância do modelo e 3 amostras da safra de 2014 ficaram abaixo da linha de relevância.

Mesmo com algumas amostras não sendo classificadas adequadamente, podemos afirmar que os modelos construídos apresentaram resultados muito concisos na classificação das amostras em função do ano da safra. Assim, podemos dizer que 99% das amostras foram classificadas corretamente de acordo com suas classes.

Os principais parâmetros obtidos no modelo de classificação do PLS-DA estão descritos na Tabela 4 abaixo.

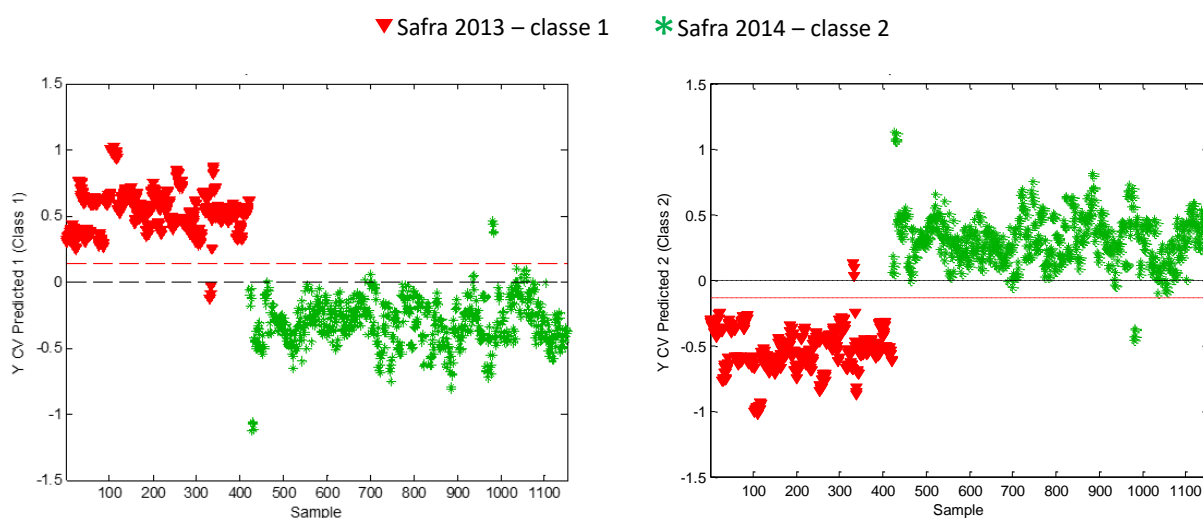


Figura 35: Gráficos de classificação das amostras de suco laranja fresco referente à safra de 2013 (cor vermelho) e safra 2014 (cor verde) utilizando PLD-DA.

Tabela 4: Parâmetros obtidos durante a construção do modelo PLS-DA para classificação das amostras de suco de laranja fresco em função do ano da safra.

Parâmetros de classificação PLS-DA		
Parâmetros	Classe 1	Classe 2
Sensibilidade (Cal)	0,993	0,993
Especificidade (Cal)	0,993	0,993
Sensibilidade (Val)	0,993	0,993
Especificidade (Val)	0,993	0,993
Classificação dos erros (Cal)	0.00699	0.00699
Classificação dos erros (Val)	0.00699	0.00699
RMSEC	0.41095	0.66132
RMSECV	0.41307	0.66319
Bias	-0.36577	-0.63423

CV Bias	-0.36541	-0.63459
R ²	0.849	0.849
CV R ²	0.841	0.841

Após a classificação das amostras em função do ano da safra, foi construído um modelo para classificar as variedades em cada região, ou seja, em diferenciar a variedade natal da variedade valência na região 1, região 2 e região 3. Para isto, também foram utilizadas todas as amostras do banco de dados e todas as variáveis espectrais referentes à safra de 2013. Os dados foram derivados, normalizados pela área e centrados na média, com a utilização de 12 variáveis latentes, aplicando-se validação cruzada por subclasses randômicas com 5 interações e 10 subclasses para construção dos modelos.

Um total de 6 classes foram construídas, onde a classe 1 se refere a variedade natal da região 2, classe 2 para a variedade valência da região 2, classe 3 para a variedade natal da região 1, classe 4 para a variedade valência da região 1, classe 5 para a variedade natal da região 3 e a classe 6 para a variedade valência da região 3. A Figura 36 estão apresentadas as classes de cada variedade nos modelos PLS-DA construídos.

Os modelos construídos apresentaram resultados satisfatórios, pois através deles é possível distinguir cada variedade estudada em função da região monitorada. Cabe ressaltar que para as amostras das variedades natal (classe 3) e valência (classe 4) da região 1, houveram algumas amostras de outras variedades que ficaram acima dos valores positivos da linha de relevância (cor vermelho), propiciando um erro maior durante a classificação dessas amostras nos modelos construído, conforme apresentado na Tabela 5. O mesmo efeito foi observado para as amostras da variedade valência (classe 2) na região 2, onde algumas amostras de outra variedade ultrapassaram os valores positivos da linha de relevância no modelo construído.

Conforme citado anteriormente, os principais parâmetros obtidos durante a construção dos modelos de classificação das amostras na safra de 2013 são apresentados na Tabela 5.

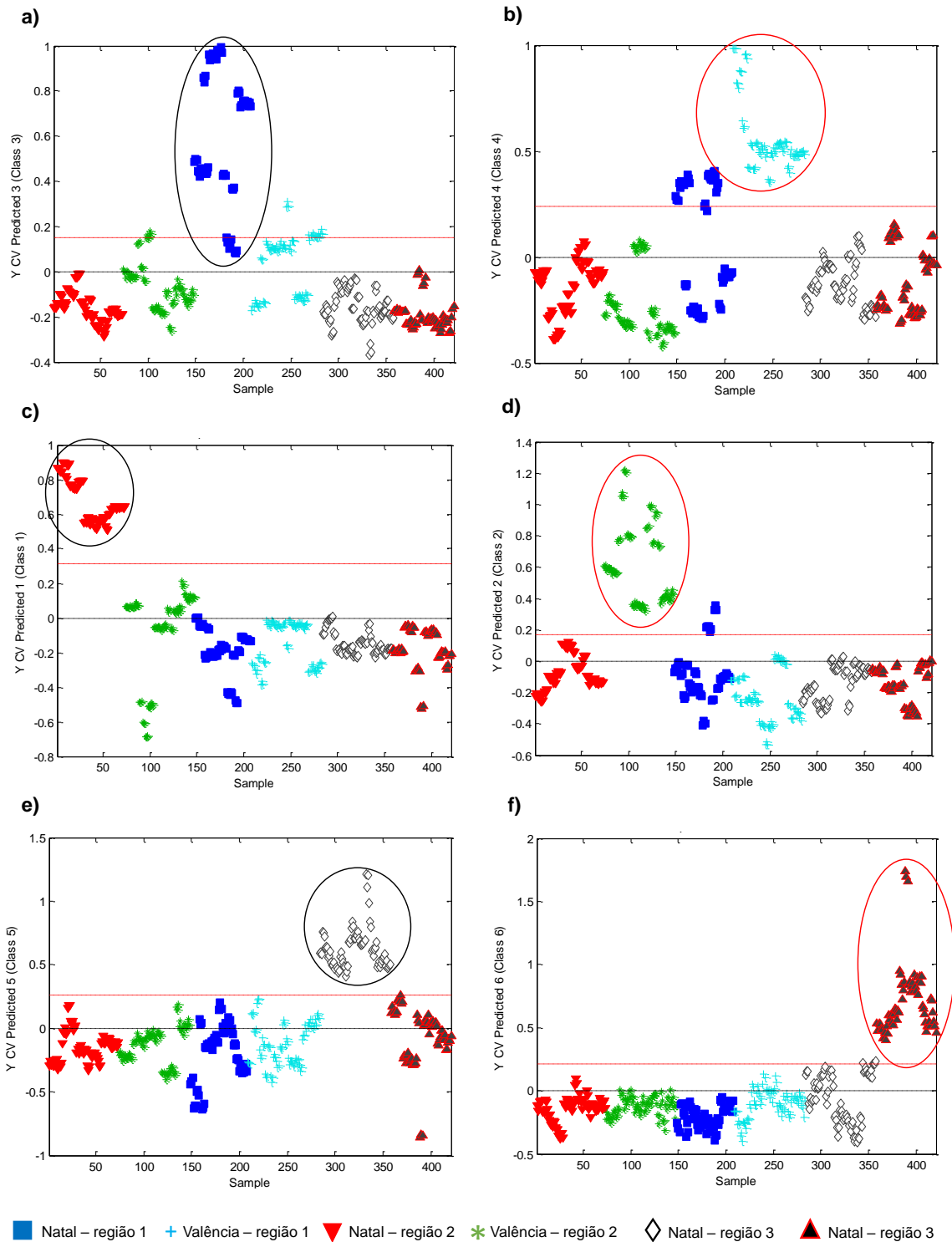


Figura 36: Gráficos de classificação das amostras de suco laranja fresco referente às variedades de laranja natal e valência nas 3 diferentes regiões estudadas na safra de 2013 utilizando PLD-DA. (a) e (b) variedades natal e valência região 1; (c) e (d) variedades natal e valência região 2, (e) e (f) variedades natal e valência região 3.

Tabela 5: Parâmetros obtidos durante a construção do modelo PLS-DA para classificação das amostras de suco de laranja fresco referente às variedades de laranja natal e valência nas 3 diferentes regiões estudadas na safra de 2013.

Parâmetros de classificação PLS-DA						
Parâmetros	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4	Classe 5	Classe 6
Sensibilidade (Cal)	1,000	1,000	0,900	1,000	1,000	1,000
Especificidade (Cal)	1,000	0,974	0,972	0,931	1,000	0,992
Sensibilidade (Val)	1,000	1,000	0,867	1,000	1,000	1,000
Especificidade (Val)	1,000	0,974	0,950	0,927	0,999	0,989
Classificação dos erros (Cal)	0	0,013006	0,06385	0,03468	0	0,004190
Classificação dos erros (Val)	0	0,013006	0,09187	0,03642	0,00058	0,00559
RMSEC	0,23519	0,255660	0,23118	0,27783	0,25899	0,21560
RMSECV	0,24098	0,26086	0,23629	0,28325	0,26816	0,228811
Bias	-0,17340	-0,17815	-0,14252	-0,17815	-0,17815	-0,14964
CV Bias	-0,17447	-0,17890	-0,14331	-0,17770	-0,17819	-0,14744
R ²	0,824	0,729	0,770	0,690	0,759	0,811
CV R ²	0,809	0,755	0,713	0,669	0,730	0,771

A classificação das amostras da safra de 2014 se baseou inicialmente em atribuir um modelo que pudesse diferenciar o suco das laranjas precoces das amostras de suco de laranjas tardias. Após os resultados obtidos, podemos julgar que os modelos criados demonstraram serem capazes em diferenciar os dois tipos de suco de laranjas estudadas.

Os parâmetros utilizados para a construção dos modelos para esse conjunto de amostras foram os mesmos utilizados na classificação das amostras da safra de 2013. Nesse modelo foram utilizadas 7 variáveis latentes, validação cruzada por subclasses randômicas com 5 interações e 10 subclasses. Um total de 2 classes foram geradas, a classe 1 atribuída ao suco de laranja precoce e a classe 2 ao suco de laranja tardia.

Os resultados e os principais parâmetros obtidos para a classificação do tipo de suco de laranja estão apresentados na Figura 37 e Tabela 6. Os modelos de classificação construídos conseguiram diferenciar claramente o tipo de suco de laranja para a variedade precoce de suco de laranja da variedade tardia na safra de 2014. Cabe ressaltar que algumas amostras de suco de laranja precoce (cor vermelho, classe 1) encontram-se acima dos valores positivos da linha de relevância em vermelho da Figura 37, e que o mesmo acontece com algumas amostras de

suco de laranja tardia (cor verde, classe 2). Isso pode ser explicado através classificação dos erros de validação que está em aproximadamente em 8,5% para as duas classes construídas, conforme apresentado na Tabela 6.

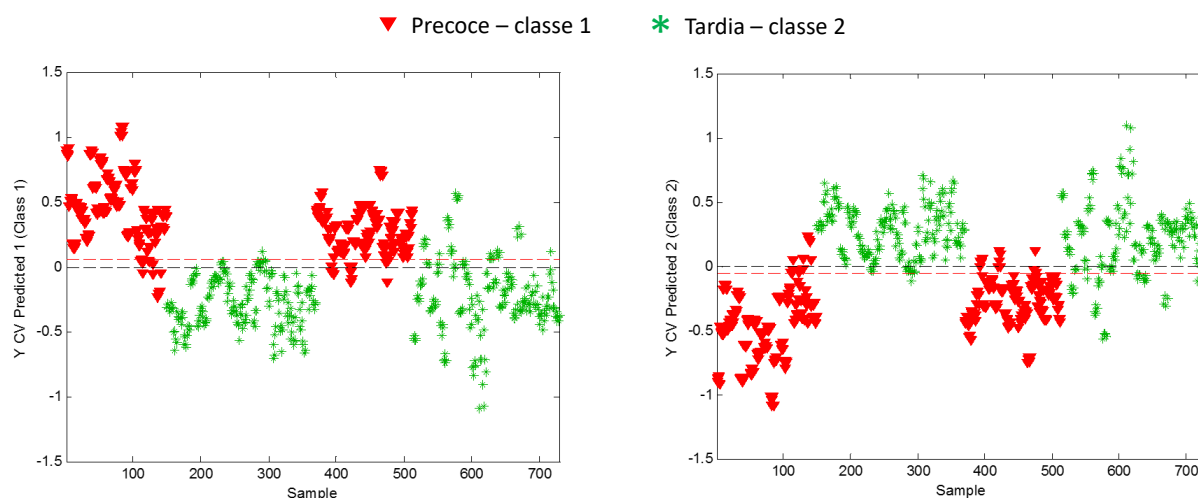


Figura 37: Gráficos de classificação das amostras de suco laranja fresco referente ao tipo de laranja: precoce (cor vermelho) e tardia (cor verde) na safra de 2014 utilizando PLD-DA.

Tabela 6: Parâmetros obtidos durante a construção do modelo PLS-DA para classificação das amostras de suco de laranja fresco referente ao tipo de laranja: precoce (classe 1) ou tardia (classe 2) na safra de 2014.

Parâmetros de classificação PLS-DA		
Parâmetros	Classe 1	Classe 2
Sensibilidade (Cal)	0,946	1,000
Especificidade (Cal)	1,000	0,946
Sensibilidade (Val)	0,926	1,000
Especificidade (Val)	1,000	0,926
Classificação dos erros (Cal)	0,02684	0,02685
Classificação dos erros (Val)	0,03691	0,03691
RMSEC	0,56809	0,54971
RMSECV	0,57327	0,55356
Bias	-0,51027	-0,48973
CV Bias	-0,51110	-0,48890
R ²	0,751	0,751
CV R ²	0,732	0,732

Após a diferenciação do tipo de suco de laranja precoce do suco de laranja tardia nos modelos PLS-DA da Figura 37, foram construídos modelos para diferenciar as variedades de laranjas precoces (hamlin e pera) e tardias (natal e

valência). Em ambos os modelos criados (Figura 38 e Figura 39) os resultados também mostraram bastantes satisfatórios na diferenciação das variedades para cada tipo de suco estudado.

A construção dos modelos apresentado na Figura 38 seguem os mesmos parâmetros utilizados nos modelos anteriores, com exceção ao número de variáveis latentes que foi 5. A classe 1 do modelo criado refere-se as amostras da variedade hamlin e a classe 2 refere-se a variedade de suco de laranja pera. Os principais parâmetros obtidos durante a construção dos modelos estão apresentados na Tabela 7.

De acordo com a Figura 38, as amostras da variedade hamlin (cor azul escuro) podem ser diferenciadas das amostras de suco de laranja pera (cor azul claro). O primeiro gráfico mostra que aproximadamente 93% das amostras da classe 1 (hamlin) estão acima da linha de tolerância do modelo criado, onde algumas amostras da classe 1 encontram-se abaixo da linha de tolerância (valores negativos). O mesmo acontece no segundo gráfico da classificação para as amostras da classe 2 (pera), onde algumas amostras da classe 1 encontram-se acima dos valores positivos da linha de tolerância, entretanto todas amostras da classe 2 foram classificadas como 100% pertencentes as amostras da variedade pera. Logo, podemos dizer que os modelos criados demonstraram que é possível diferenciar as duas variedades, hamlin e pera, ao longo da safra de 2014 utilizando PLS-DA.

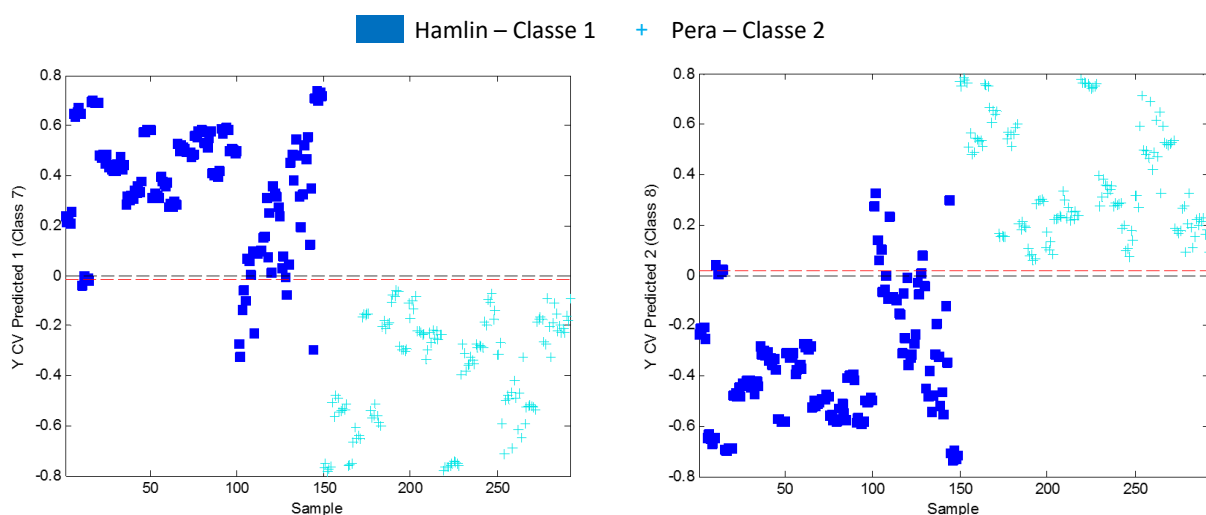


Figura 38: Gráficos de classificação das amostras de suco laranja precoce referente às variedades: hamlin (cor azul escuro) e pera (cor azul claro) na safra de 2014 utilizando PLD-DA.

Tabela 7: Parâmetros obtidos durante a construção do modelo PLS-DA para classificação das amostras de suco de laranja precoce referente às variedades precoces: hamlin (classe 1) e pera (classe 2) na safra de 2014.

Parâmetros de classificação PLS-DA		
Parâmetros	Classe 1	Classe 2
Sensibilidade (Cal)	0.946	1.000
Especificidade (Cal)	1.000	0.946
Sensibilidade (Val)	0.926	1.000
Especificidade (Val)	1.000	0.926
Classificação dos erros (Cal)	0.02685	0.02685
Classificação dos erros (Val)	0.03691	0.03691
RMSEC	0.56809	0.54971
RMSECV	0.57327	0.55356
Bias	-0.51027	-0.48973
CV Bias	-0.51110	-0.48890
R ²	0.751	0.751
CV R ²	0.732	0.732

Para a construção dos modelos da variedade tardia na Figura 38, os parâmetros utilizados foram os mesmos que nos modelos anteriores, com exceção ao número de variáveis latentes que foram 12. A classe 1 do modelo criado refere-se as amostras da variedade natal e a classe 2 refere-se a variedade de suco de laranja valência. Os principais parâmetros obtidos durante a construção dos modelos estão apresentados na Tabela 7.

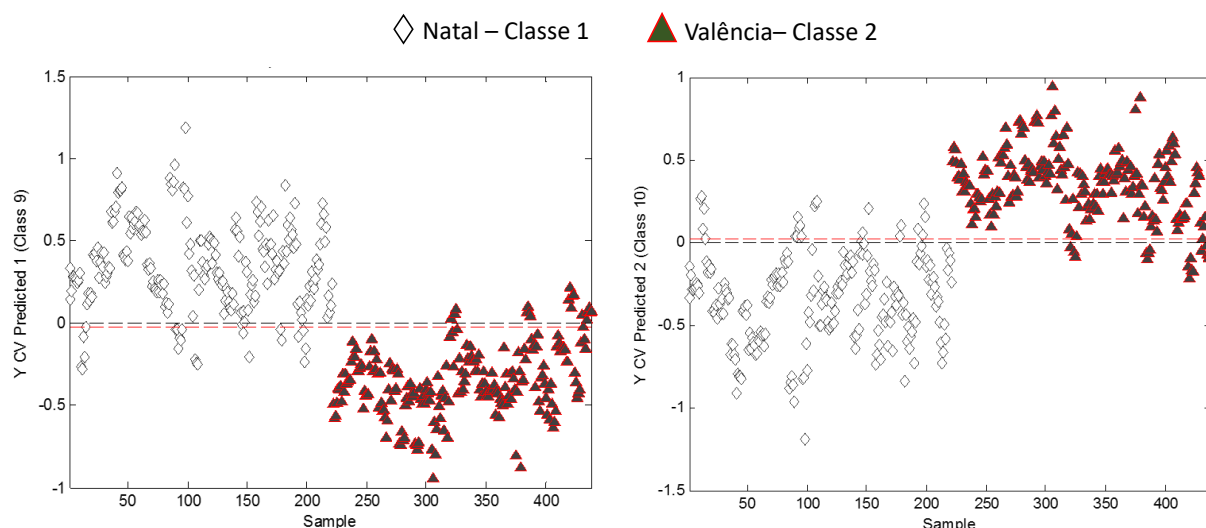


Figura 39: Gráficos de classificação das amostras de suco de laranja tardia referente às variedades: natal (cor branco) e valência (cor vermelho escuro) na safra de 2014 utilizando PLD-DA.

Tabela 8: Parâmetros obtidos durante a construção do modelo PLS-DA para classificação das amostras de suco de laranja tardia referente às variedades precoces: natal (classe 1) e valência (classe 2) na safra de 2014.

Parâmetros de classificação PLS-DA		
Parâmetros	Classe 1	Classe 2
Sensibilidade (Cal)	0,914	0,922
Especificidade (Cal)	0,922	0,914
Sensibilidade (Val)	0,910	0,910
Especificidade (Val)	0,910	0,910
Classificação dos erros (Cal)	0,08216	0,08216
Classificação dos erros (Val)	0,09041	0,09041
RMSEC	0,57406	0,56605
RMSECV	0,58900	0,57552
Bias	-0,50457	-0,49543
CV Bias	-0,50457	-0,49543
R ²	0,700	0,7000
CV R ²	0,666	0,666

Conforme apresentado na Figura 38, as amostras da variedade natal (cor branca) também foram diferenciadas das amostras de suco de laranja valência (cor vermelha) a partir dos modelos de classificação. O primeiro gráfico mostra que aproximadamente 91% das amostras da classe 1 (natal) estão acima da linha de tolerância do modelo criado, onde algumas amostras da classe 1 encontram-se abaixo da linha de tolerância (valores negativos). O mesmo acontece com as amostras da classe 2 (valência) no segundo gráfico, onde algumas amostras também encontram-se abaixo da linha de tolerância, mas que a maioria das amostras foram classificadas corretamente (91%) por estarem acima dos valores positivos da linha de tolerância. Mesmo assim, também podemos dizer que os modelos construídos são capazes em diferenciar as variedades de suco de suco de laranja natal de valência na safra de 2014.

De acordo com o esquema da Figura 34, a etapa final da classificação teve como objetivo diferenciar as amostras de cada variedade em função da região estudada. Dessa maneira, os parâmetros utilizados nos modelos das Figura 40, Figura 41, Figura 42 e Figura 43 foram os mesmos aplicados nos modelos anteriores, tendo como diferenças as quantidades de variáveis latentes que foram 5, 12, 10 e 11 para os modelos correspondentes ao suco das variedades hamlin (Figura 40), pera (Figura 41), natal (Figura 42) e valência (Figura 43), respectivamente.

Um total de 3 classes foram criadas referentes as regiões estudadas, onde a classe 1 refere-se a região 1, classe 2 à região 2, e classe 3 região 3 para todas as variedades de suco de suco de laranja. Os principais parâmetros obtidos durante a construção dos modelos de classificação para cada variedade estão apresentados nas Tabela 9, Tabela 10, Tabela 11 e Tabela 12.

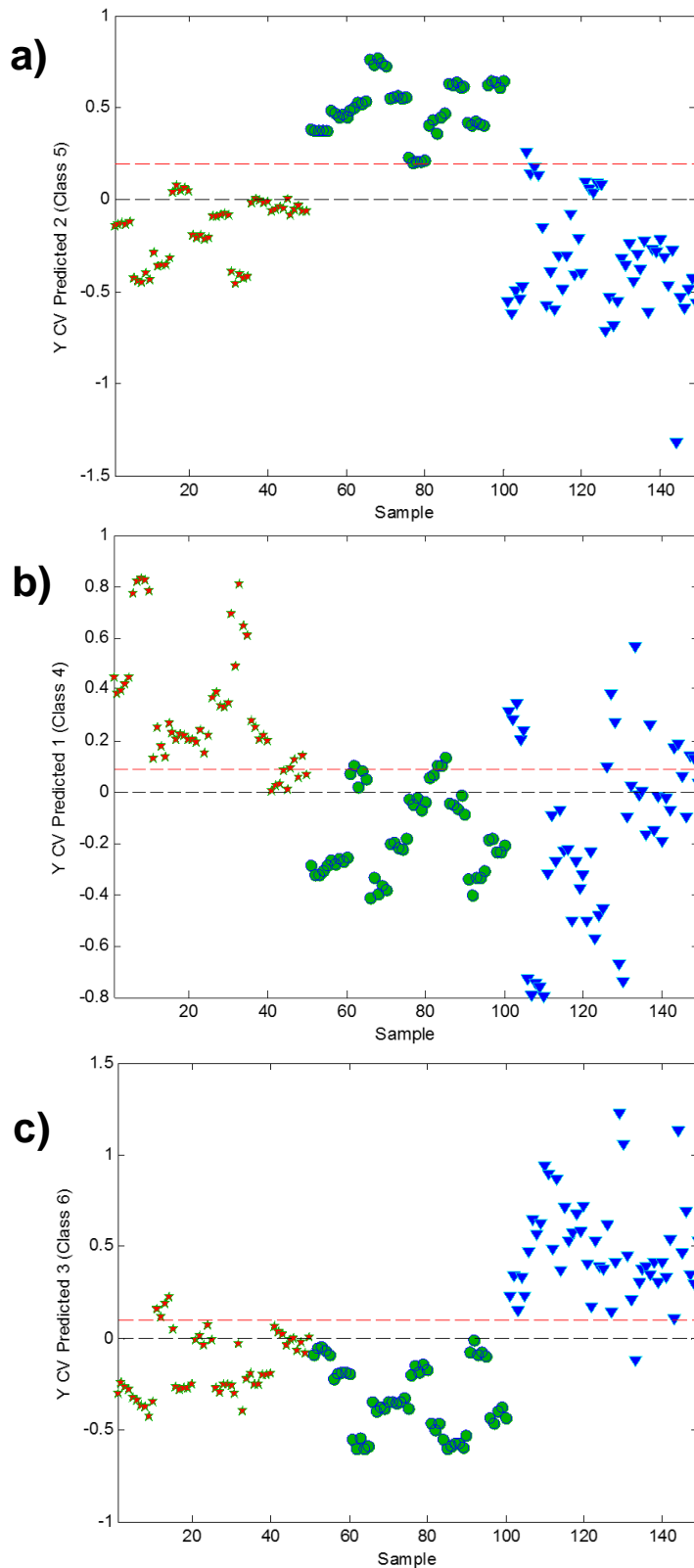
Os modelos criados apresentaram resultados satisfatórios para a classificação de cada variedade em função da região de estudo. Os modelos da variedade hamlin tiveram um total de 149 amostras na criação dos modelos (Figura 40). Durante a criação dos modelos, apenas algumas amostras da região 3 (classe 3) ficaram acima dos valores positivos da linha de tolerância na classificação das amostras da região 2 (classe 2) da Figura **b**, indicado que estão amostras apresentam uma grande correlação com as amostras dessa classe.

Os modelos criados para as variedades pera, com um total de 143 amostras também mostraram que algumas amostras da região 2 e 3 ficaram acima da linha de tolerância na classificação das amostras da região 1, onde mesmo acontece na classificação das amostras das regiões 2 e 3.

Para os modelos das amostras de suco de laranja natal, um pequeno grupo de amostras das regiões 2 e 3 ficaram acima dos valores positivos da linha de tolerância na classificação das amostras da região 1. Na classificação das amostras da região 2, algumas amostras da região 1 ficaram no limite dos valores da linha de tolerância e para a região 3 um pouco acima. O mesmo acontece na classificação da região 3, onde poucas amostras das regiões 2 e 3 ficaram ligeiramente acima da linha de tolerância. Os modelos criados tiveram um total de 221 amostras durante a classificação.

A variedade de suco de laranja valência teve um total de 217 amostras durante a construção dos modelos. Na classificação das amostras da região 1 algumas amostras das regiões 2 e 3 apresentaram acima da linha de tolerância. O mesmo acontece na classificação da região 3, onde um pequeno número de amostras da região de 1 e 2 encontra-se acima dos valores da linha de tolerância. Já na classificação das amostras da região 2, algumas amostras da região 1 e 3 estão no limite da linha de tolerância.

Tais características observadas durante na criação dos modelos podem ser explicadas pelos erros de classificação, o que está associado a grande semelhança que pode existir entre as amostras mesmo sendo de diferentes regiões.

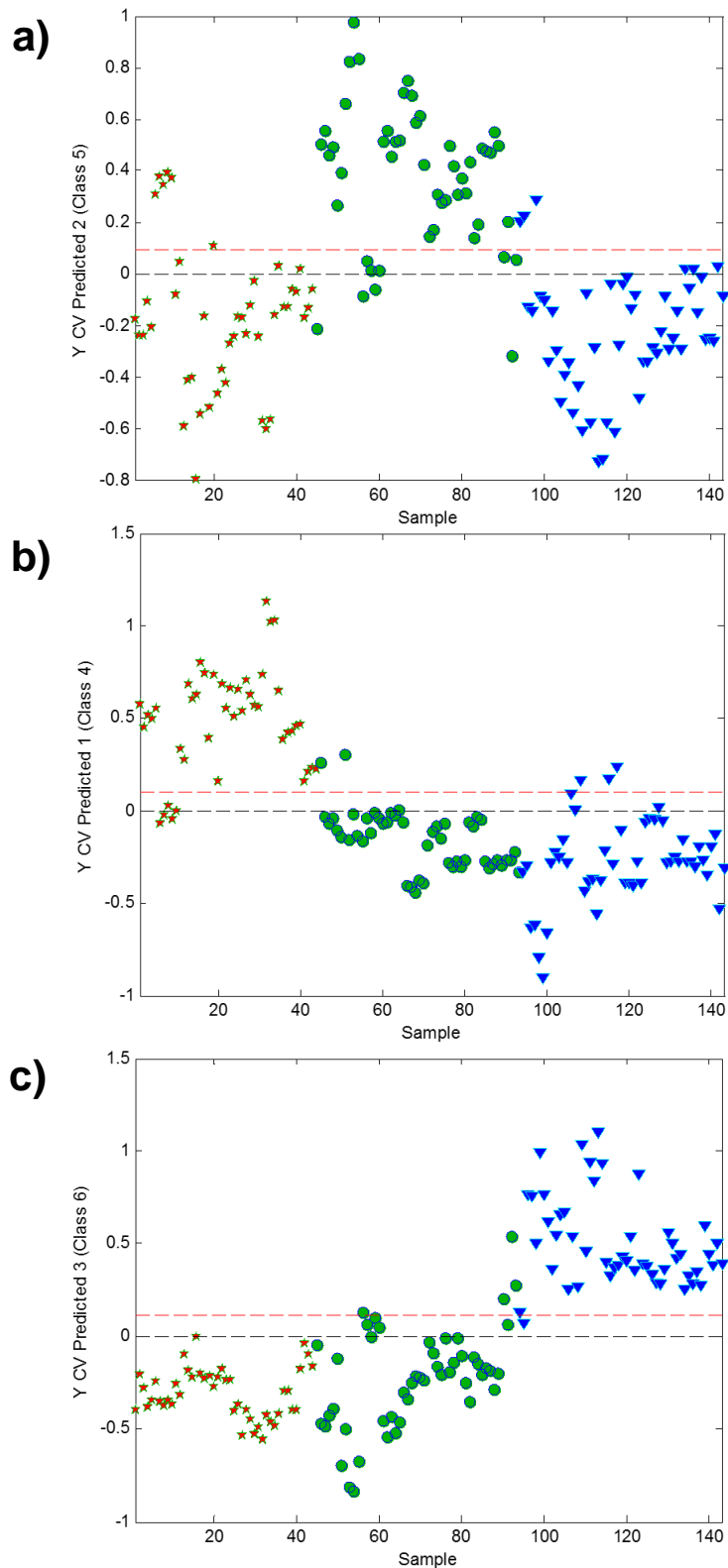


● Região 1 – classe 1
 ★ Região 2 – classe 2
 ▼ Região 3 – classe 3

Figura 40: Gráficos de classificação das amostras de suco de laranja hamlin referente (a) à região 1 (cor verde), (b) região 2 (cor vermelho) e (c) região 3 (cor azul) da safra de 2014 utilizando PLD-DA.

Tabela 9: Parâmetros obtidos durante a construção do modelo PLS-DA para classificação das amostras de suco de laranja hamlin referente à região 1 (classe 1), região 2 (classe 2) e região 3 (classe 3) na safra de 2014.

Parâmetros de classificação PLS-DA			
Parâmetros	Classe 1	Classe 2	Classe 3
Sensibilidade (Cal)	0.857	0.886	1.000
Especificidade (Cal)	0.915	0.960	0.968
Sensibilidade (Val)	0.804	0.886	0.972
Especificidade (Val)	0.909	0.945	0.959
Classificação dos erros (Cal)	0.11398	0.07702	0.01613
Classificação dos erros (Val)	0.14370	0.08409	0.03443
RMSEC	0.45068	0.38795	0.41236
RMSECV	0.48111	0.40727	0.42906
Bias	-0.34266	-0.30769	-0.34965
CV Bias	-0.35029	-0.30454	-0.34517
R ²	0.620	0.738	0.790
CV R ²	0.531	0.665	0.722

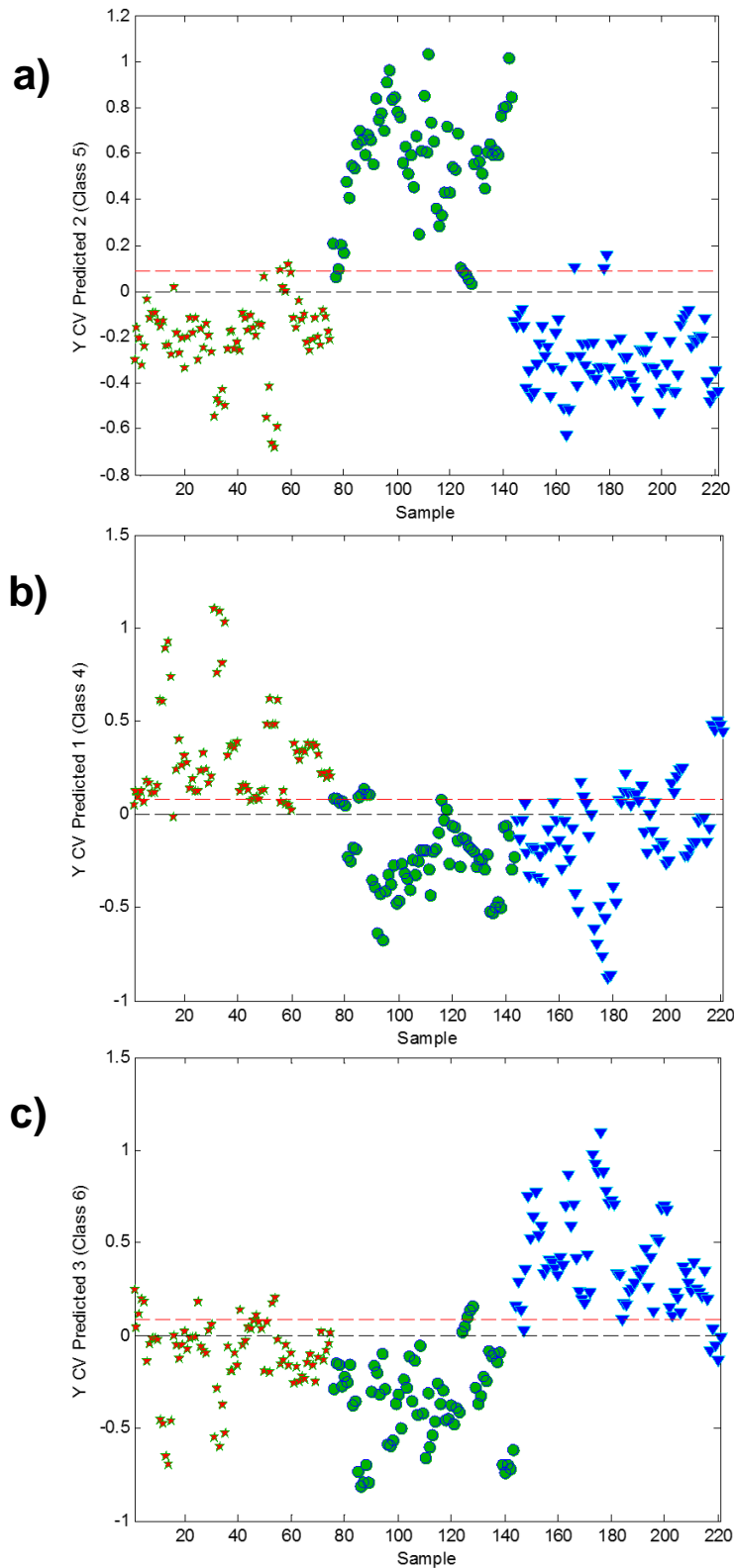


● Região 1 – classe 1 ★ Região 2 – classe 2 ▼ Região 3 – classe 3

Figura 41: Gráficos de classificação das amostras de suco de laranja pera referente (a) à região 1 (cor verde), (b) região 2 (cor vermelho) e (c) região 3 (cor azul) da safra de 2014 utilizando PLD-DA.

Tabela 10: Parâmetros obtidos durante a construção do modelo PLS-DA para classificação das amostras de suco de laranja pera referente à região 1 (classe 1), região 2 (classe 2) e região 3 (classe 3) na safra de 2014.

Parâmetros de classificação PLS-DA			
Parâmetros	Classe 1	Classe 2	Classe 3
Sensibilidade (Cal)	0.857	0.886	1.000
Especificidade (Cal)	0.915	0.960	0.968
Sensibilidade (Val)	0.804	0.886	0.972
Especificidade (Val)	0.909	0.945	0.959
Classificação dos erros (Cal)	0.11398	0.07702	0.01613
Classificação dos erros (Val)	0.14370	0.08409	0.03443
RMSEC	0.45068	0.38795	0.41236
RMSECV	0.48111	0.40727	0.42906
Bias	-0.34266	-0.30769	-0.34965
CV Bias	-0.35029	-0.30454	-0.34517
R ²	0.620	0.738	0.790
CV R ²	0.531	0.665	0.722

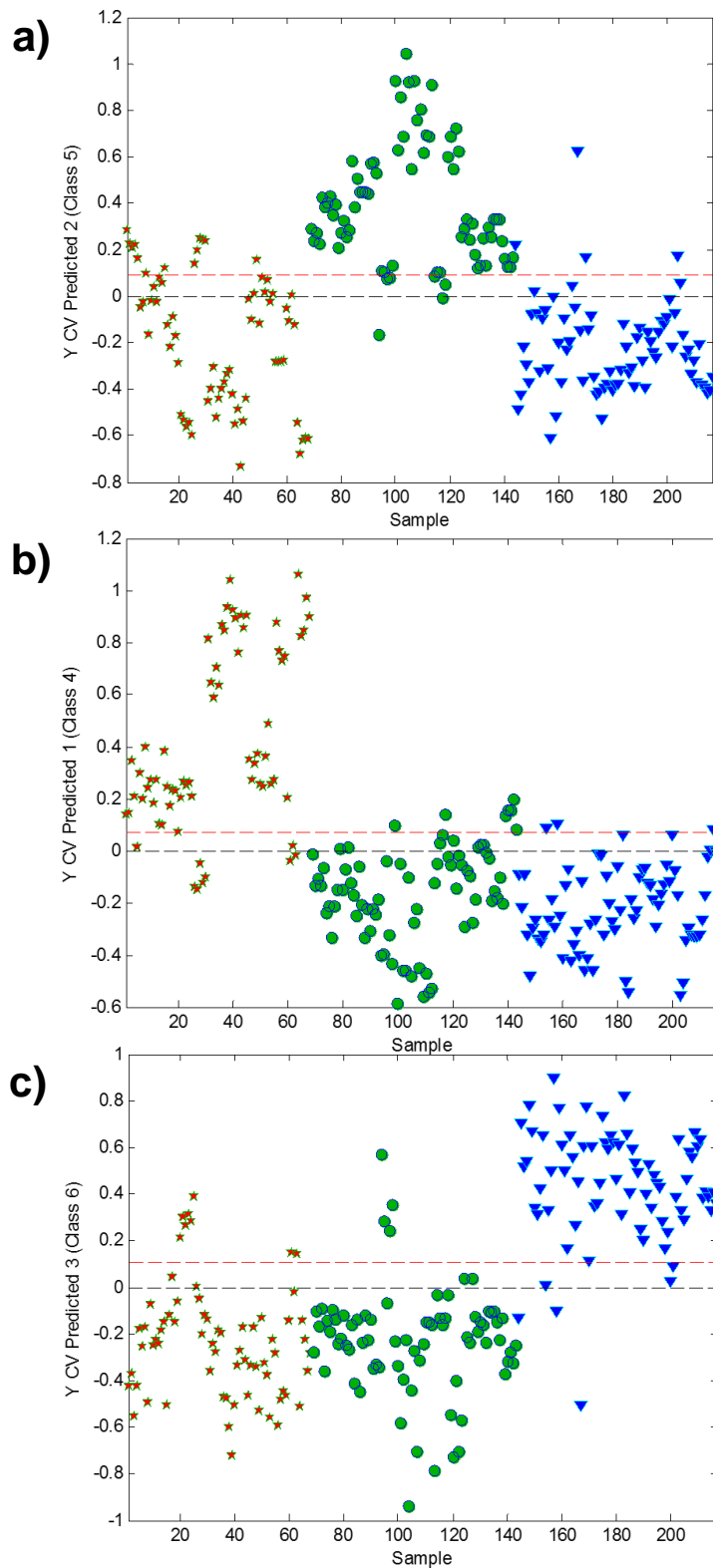


● Região 1 – classe 1 ★ Região 2 – classe 2 ▼ Região 3 – classe 3

Figura 42: Gráficos de classificação das amostras de suco de laranja natal referente (a) à região 1 (cor verde), (b) região 2 (cor vermelho) e (c) região 3 (cor azul) da safra de 2014 utilizando PLD-DA.

Tabela 11: Parâmetros obtidos durante a construção do modelo PLS-DA para classificação das amostras de suco de laranja natal referente à região 1 (classe 1), região 2 (classe 2) e região 3 (classe 3) na safra de 2014.

Parâmetros de classificação PLS-DA			
Parâmetros	Classe 1	Classe 2	Classe 3
Sensibilidade (Cal)	0.971	0.987	0.923
Especificidade (Cal)	1.000	0.877	0.951
Sensibilidade (Val)	0.941	0.853	0.903
Especificidade (Val)	0.970	0.837	0.917
Classificação dos erros (Cal)	0.01471	0.06831	0.06294
Classificação dos erros (Val)	0.04444	0.15484	0.08998
RMSEC	0.36442	0.47421	0.45569
RMSECV	0.37203	0.49440	0.47205
Bias	-0.30769	-0.33937	-0.35294
CV Bias	-0.30801	-0.33919	-0.35280
R ²	0.821	0.511	0.636
CV R ²	0.798	0.438	0.579



● Região 1 – classe 1 ★ Região 2 – classe 2 ▼ Região 3 – classe 3

Figura 43: Gráficos de classificação das amostras de suco de laranja valência referente (a) à região 1 (cor verde), (b) região 2 (cor vermelho) e (c) região 3 (cor azul) da safra de 2014 utilizando PLD-DA.

Tabela 12: Parâmetros obtidos durante a construção do modelo PLS-DA para classificação das amostras de suco de laranja valência referente à região 1 (classe 1), região 2 (classe 2) e região 3 (classe 3) na safra de 2014.

Parâmetros de classificação PLS-DA			
Parâmetros	Classe 1	Classe 2	Classe 3
Sensibilidade (Cal)	0.947	0.897	0.919
Especificidade (Cal)	0.901	0.953	0.930
Sensibilidade (Val)	0.920	0.868	0.905
Especificidade (Val)	0.880	0.933	0.916
Classificação dos erros (Cal)	0.07596	0.07496	0.07551
Classificação dos erros (Val)	0.09986	0.09973	0.08926
RMSEC	0.45141	0.42023	0.43245
RMSECV	0.46631	0.43495	0.44486
Bias	-0.31336	-0.34562	-0.34101
CV Bias	-0.34439	-0.31323	-0.34238
R ²	0.627	0.636	0.685
CV R ²	0.564	0.578	0.642

4.4 Quantificação dos metabólitos presente no suco de laranja natural

As análises quimiométricas não supervisionadas (PCA) aplicadas inicialmente nos diferentes grupos de amostras de suco de laranja forneceram informações importantes sobre as principais alterações, semelhanças ou diferenças dos metabólitos presentes no suco de laranja. Por meio dos gráficos de pesos e da caracterização estrutural dos metabólitos realizada previamente foi possível quantificar e avaliar as possíveis alterações ocorridas durante as safras, nas regiões, variedades e nos períodos sazonais.

Como pode ser observado na Figura 44, aproximadamente 90% do suco de laranja é composto por água e 10% restante pode ser considerado como sendo “extrato de suco de laranja”. No extrato de suco de laranja cerca de 50% são açúcares, e o restante são ácidos orgânicos, metabólitos secundários, minerais, vitaminas e flavorizantes.

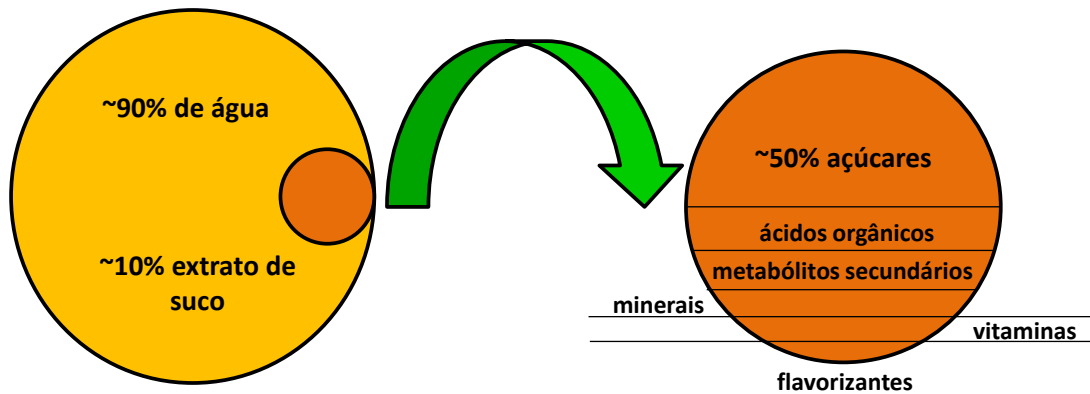


Figura 44: Representação da composição dos metabólitos presentes no suco de laranja integral.

As análises de PCA, de acordo com o método aplicado, mostraram que os principais metabólitos presentes no suco de laranja que tiveram algum tipo de variação foram os sinais referentes à sacarose, frutose, α e β -glicose, prolina, arginina, alanina, treonina, valina, e os ácidos cítrico, málico, ascórbico, succínico, γ -aminobutírico (GABA) e etanol.

A partir destas informações obtidas nas análises por PCA, utilizou-se o método de quantificação ERETIC II para avaliar a concentração desses metabólitos ao longo das safras, regiões e nos períodos sazonais.

Os gráficos apresentados nas Figura 45 e Figura 46 mostram a quantificação dos metabólitos nas safras de 2013 e 2014 para as variedades precoces e tardias. Nos gráficos estão apresentados os resultados da quantificação para os açúcares que são representados pela soma da concentração em mM de sacarose, α e β -glicose e frutose; ácidos, como a soma dos valores das concentrações dos ácidos cítrico, málico, ascórbico, succínico e GABA; aminoácidos, soma dos valores de prolina, arginina, alanina, treonina e valina; além dos valores para concentração de etanol e da estimativa do valor de *ratio*.

Conforme descrito na introdução, o *ratio* é um parâmetro utilizado na indústria de suco de cítricos para indicar o grau de maturação do fruto, por meio da relação entre os sólidos solúveis ($^{\circ}$ Brix) e acidez total titulável. Os valores referentes ao *ratio* apresentados neste trabalho foram considerados com a razão entre o somatório dos valores de concentração dos açúcares pelo somatório da concentração de ácidos quantificados.

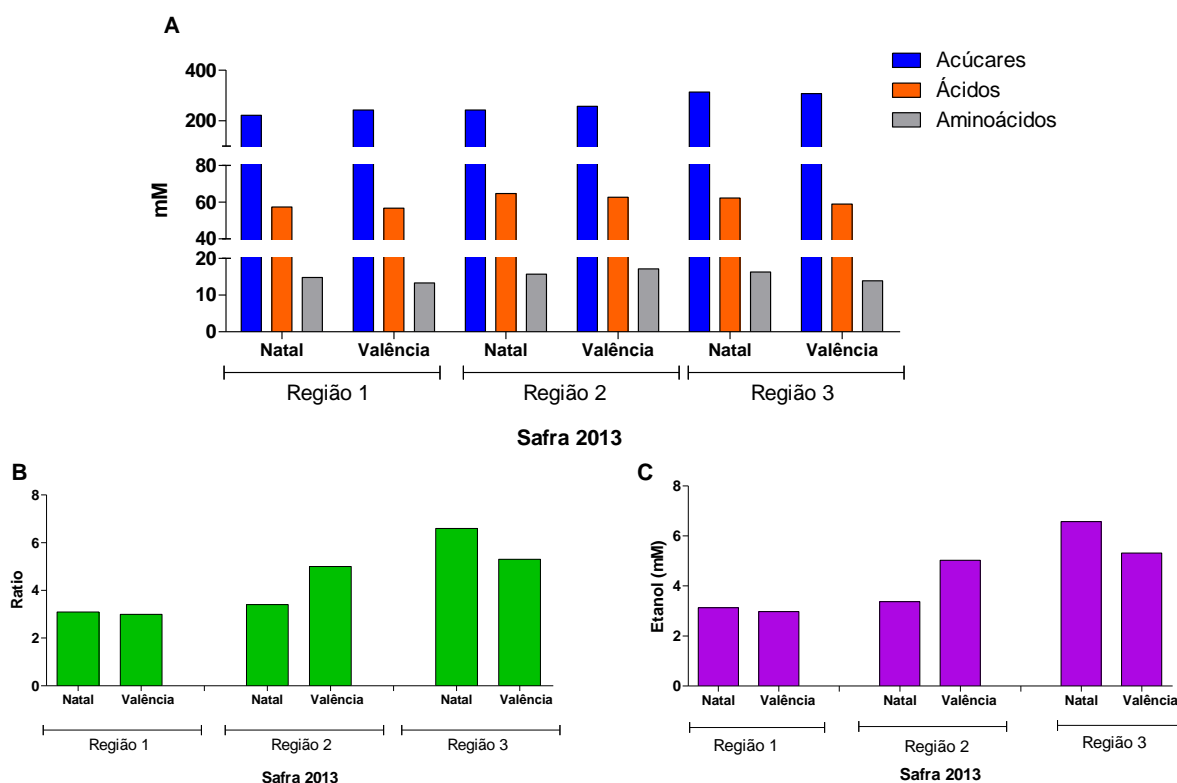


Figura 45: (a) Comparativo entre valores obtidos na quantificação dos açúcares (sacarose, α e β -glicose e frutose), ácidos (cítrico, málico, ascórbico, succínico e γ -aminobutírico - GABA); aminoácidos (prolina, arginina, alanina, treonina e valina); (b) *ratio* e (c) etanol para a variedade de laranjas tardias da safra 2013.

De acordo com a **Figura 45** e 46 podemos observar de modo geral que o suco de laranja da variedade natal obteve aumento na concentração de açúcares, ácidos e aminoácidos da safra 2013 para 2014 na proporção de aproximadamente 1,20 a 1,34 vezes; 1,23 a 1,40 vezes; 1,41 a 1,66 vezes, respectivamente, para nas três regiões estudadas. Conseqüentemente, a concentração de etanol também apresentou aumento de aproximadamente 1,48 a 3,39 vezes em todas as regiões. Em relação ao *ratio*, ocorreu um pequeno aumento de 1,16 vezes na região 2, na região 1 permaneceu praticamente igual, e na região 3 houve uma diminuição de cerca de 1,23 vezes.

Também se pode observar que a região 3 é a região que se tem maior concentração de açúcares no suco de laranja em ambas as safras de 2013 e 2014, que conseqüentemente apresentou o maior *ratio* (5,2) na safra de 2013 e 4,2 na safra de 2014. Logo, podemos dizer que o suco de laranja da natal da região 3 apresenta grau de maturidade maior ou semelhante as demais regiões.

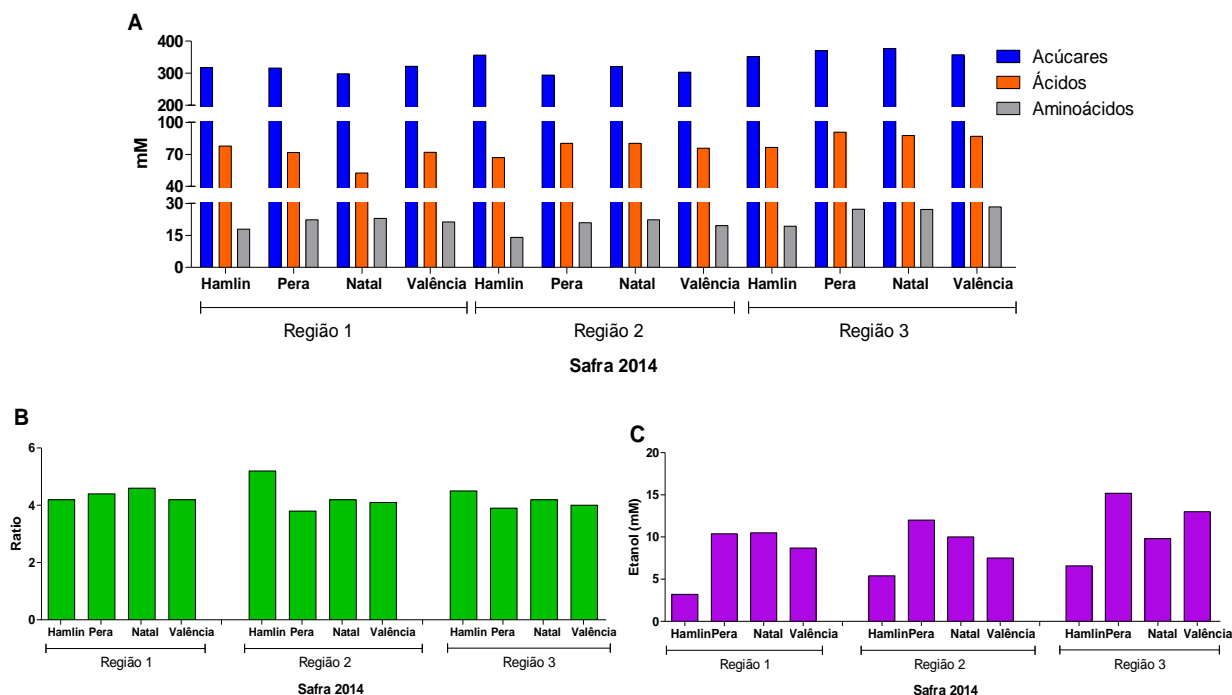


Figura 46: (a) Comparativo entre os valores obtidos na quantificação dos açúcares (sacarose, α e β -glicose e frutose), ácidos (cítrico, málico, ascórbico, succínico e γ -aminobutírico – GABA); aminoácidos (prolina, arginina, alanina, treonina e valina), (b) *ratio* e (c) etanol para a variedade de laranjas precoces e tardias na safra 2014.

Conforme observado anteriormente no comparativo da quantificação das amostras de suco de laranja natal entre a safra de 2013 e 2014, o suco de laranja valência também apresentou aumento na concentração de açúcares (~1,16 a 1,32 vezes), ácidos (~1,26 a 1,47 vezes) e aminoácidos (~1,14 a 2,04 vezes). A concentração de aminoácidos na região 3 apresentou um valor de destaque comparado aos demais, pois a concentração apresentou um pouco mais que dobro que a safra anterior.

Os valores da concentração de etanol também tiveram aumento de 1,50 a 2,45 vezes em decorrência do aumento da concentração dos açúcares presentes no suco de laranja. Entretanto, os valores de *ratio* apresentam valores muito semelhantes aos da safra de 2013, sendo que apesar da região 3 apresentar maior concentração de açúcares, o valor de *ratio* diminuiu 1,18 vezes, puxado pelo aumento da concentração de ácidos nas amostras.

O mesmo procedimento de quantificação foi realizado para avaliar os efeitos da sazonalidade nas variedades hamlin, natal, pera e valência na safra de 2013.

Conforme descrito no procedimento experimental, os períodos de coleta das amostras durante a safra das variedades precoces foram início e fim, e para as variedades tardias em início, meio e fim nas 3 regiões estudadas. Na Figura 47A podemos observar o comparativo do comportamento dos metabólitos monitorados (açúcares, ácidos e aminoácidos) no decorrer da safra de 2014, bem com as variações ocorridas nas três diferentes regiões de coleta para variedade hamlin.

De modo geral, podemos dizer que a região 3 é a região onde se tem maior concentração de açúcares, ácidos e aminoácidos. Entretanto, as amostras de suco da região 3 apresentaram maior conteúdo de etanol que as regiões 2 e 3, onde se observa aumento de 92% comparados aos valores iniciais da safra (Figura 47C). Esse aumento poderia estar associado com o aumento da concentração de açúcares ao longo da safra o qual foi de 5,0 % do início para o fim da safra, entretanto a concentração de açúcares quantificados nas amostras da região 1 foi de 20,4% em relação ao início da safra, mas a concentração de etanol apresentou queda de 7,3%, ao contrário do esperado.

A concentração de aminoácidos na região 3 também apresentou aumento expressivo comparado as outras regiões, sendo de 35,6%, enquanto que as região 1 e 2 houveram quedas de 6,3% e 13,1%, respectivamente (Figura 47A).

Em relação ao *ratio* das amostras (Figura 47B), podemos dizer que as amostras da região 2 são aquelas que apresentam maior maturidade e menor variação ao longo da safra, uma vez que a variação da concentração dos açúcares e ácidos foram as menores entre as regiões. As regiões 1 e 2 tiveram aumento de *ratio* em 16,7% e 10,6% ao longo da safra, já que a concentração de ácidos foram pouco relevantes ao longo da safra.

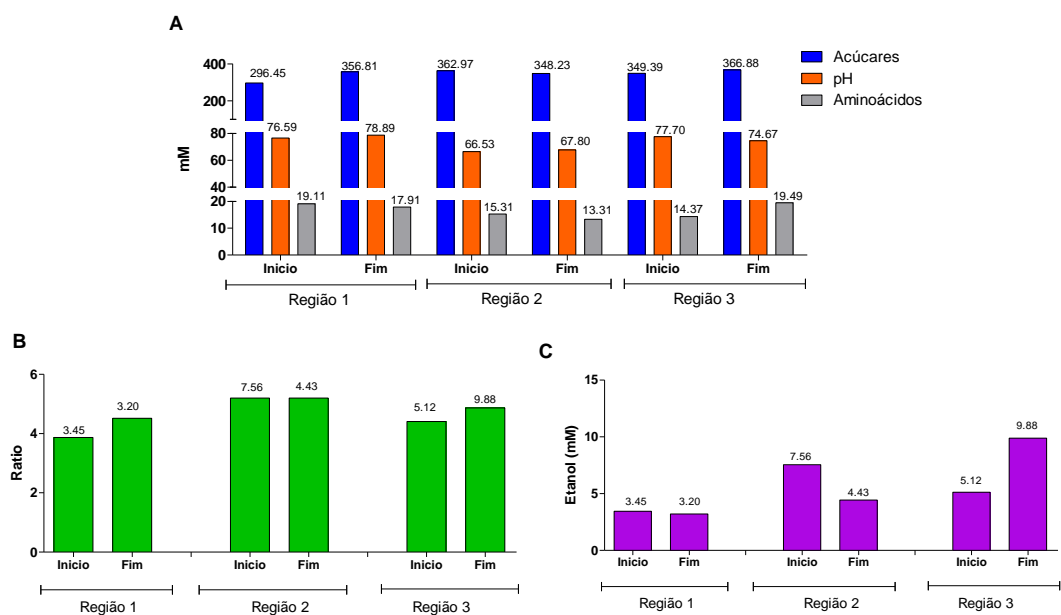


Figura 47: Comparativo entre os valores obtidos na quantificação dos açúcares (sacarose, α e β -glicose e frutose), ácidos (cítrico, málico, ascórbico, succínico e γ -aminobutírico (GABA)); aminoácidos (prolina, arginina, alanina, treonina e valina) (A), *ratio* (B) e etanol (C) para o suco da variedade hamlin ao longo da safra de 2014.

As amostras de suco de laranja pera da safra de 2014 (Figura 48A) também apresentaram maiores concentrações de açúcares, aminoácidos e ácidos na região 3, igual as amostra de suco de laranja da variedade hamlin. A concentração de açúcares e aminoácidos no início da safra foram de 395 mM e 27,7 mM nesta região, mas que no fim da safra apresentaram quedas de 21,4% e 7,1% em relação aos valores iniciais. Como as concentrações dos ácidos apresentaram aumento de 9,7% e a queda do conteúdo de açúcares, teve como consequência a diminuição do valor do *ratio* em 24,5% (Figura 48B). Outro fato importante em destacar foi à concentração de etanol em 21,0 mM (139,6%) no fim da safra (Figura 48C), considerado o maior valor de concentração dentre as amostras de suco de laranja do tipo precoce.

As amostras de suco de laranja correspondentes a região 1 tiveram conteúdo de açúcares e ácidos semelhantes as amostras da região 3, porém um pouco menor (Figura 48A). A concentração de açúcares apresentou queda de 8,6% e 5,4% para a concentração dos ácidos. Os valores encontrados para *ratio* (Figura 48B) e para a concentração de etanol (Figura 48C) foram de queda em 3,5% e aumento de 15,0%, respectivamente, em relação aos valores iniciais da safra.

O valor de 17,7 mM encontrado no fim da safra para a concentração de aminoácidos na região 2 foi o menor nas 3 regiões. Esse valor representou queda de 27,2% em relação ao valor inicial da safra. Com relação ao conteúdo de açúcares e ácidos houve pequenas variações em relação aos valores iniciais da safra, sendo queda de 2,7% e aumento de 8,4% para cada um deles (Figura 48A).

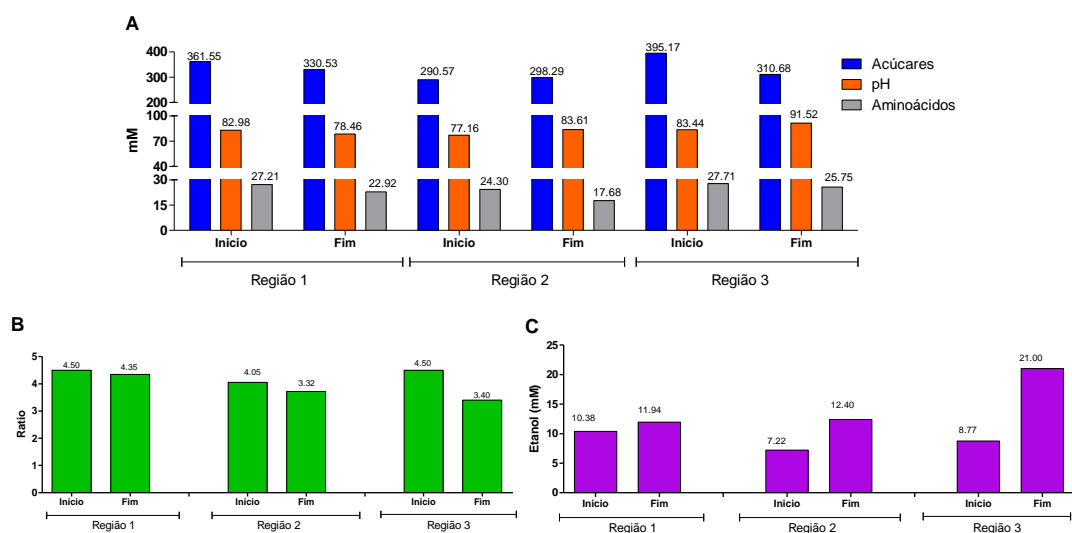


Figura 48: Comparativo entre os valores obtidos na quantificação dos açúcares (sacarose, α e β -glicose e frutose), ácidos (cítrico, málico, ascórbico, succínico e γ -aminobutírico (GABA)); aminoácidos (prolina, arginina, alanina, treonina e valina) (A), *ratio* (B) e etanol (C) para o suco da variedade pera ao longo da safra de 2014.

As amostras de suco de laranja natal de modo geral, assim como as variedades precoces hamlin e pera, também apresentaram maiores valores de concentrações para os açúcares, ácidos e aminoácidos na região 3, conforme os gráficos da **Figura 49A**. As concentrações de açúcares apresentaram queda de 1,8% no meio da safra e aumento de 1,3% no fim da safra em relação aos valores iniciais. Já a concentração de ácidos e aminoácidos apresentaram queda em ambos os períodos da safra, sendo 12,2% e 32,4% para o meio, 6,7% e 24,2% para o fim da safra.

O conteúdo de etanol encontrando nas amostras do meio da safra foi maior de todos os períodos de coleta (**Figura 49C**), regiões e variedades de suco, correspondendo ao valor de 21,2 mM (aumento de 117,6%). Contudo, a concentração de etanol diminuiu em 15,5% no fim da safra em relação ao valor inicial.

As amostras da região 2 apresentaram quedas no meio e fim da safra para as concentrações de açúcares (11,8% e 23,5%), ácidos (43,6% e 23,7%) e aminoácidos (23,8% e 31,5%) (**Figura 49A**). Contudo o *ratio* de 6,2 correspondentes ao meio da safra foi o maior de todas as variedades, indicando que as amostras estavam com alto grau de maturidade nos frutos (**Figura 49B**). Conseqüentemente, o conteúdo de etanol apresentou aumento de 50,5% no meio da safra e declínio de 37,2% em relação aos valores iniciais (**Figura 49C**).

Ao contrário das amostras das regiões 1 e 3, as amostras da região 2 tiveram o conteúdo de açúcares, ácidos e aminoácidos aumentados em 10,7%, 11,6% e 22,4% no fim da safra em relação aos valores iniciais (**Figura 49A**). O valor do *ratio* teve maior alteração no meio da safra, aumento de 13,6% em relação ao valor inicial (**Figura 49B**).

Os valores de *ratio* referentes ao meio da safra da variedade natal nas três regiões foram os maiores que os valores do início e fim da safra (**Figura 49B**). Esses valores estão de acordo com o esperado pelos produtores, onde o meio da safra normalmente indica o melhor grau maturidade e qualidade dos frutos para produção de suco. Cabe ressaltar que o grau de maturidade ideal dos frutos pode ocorrer também entre os períodos de transição das safras.

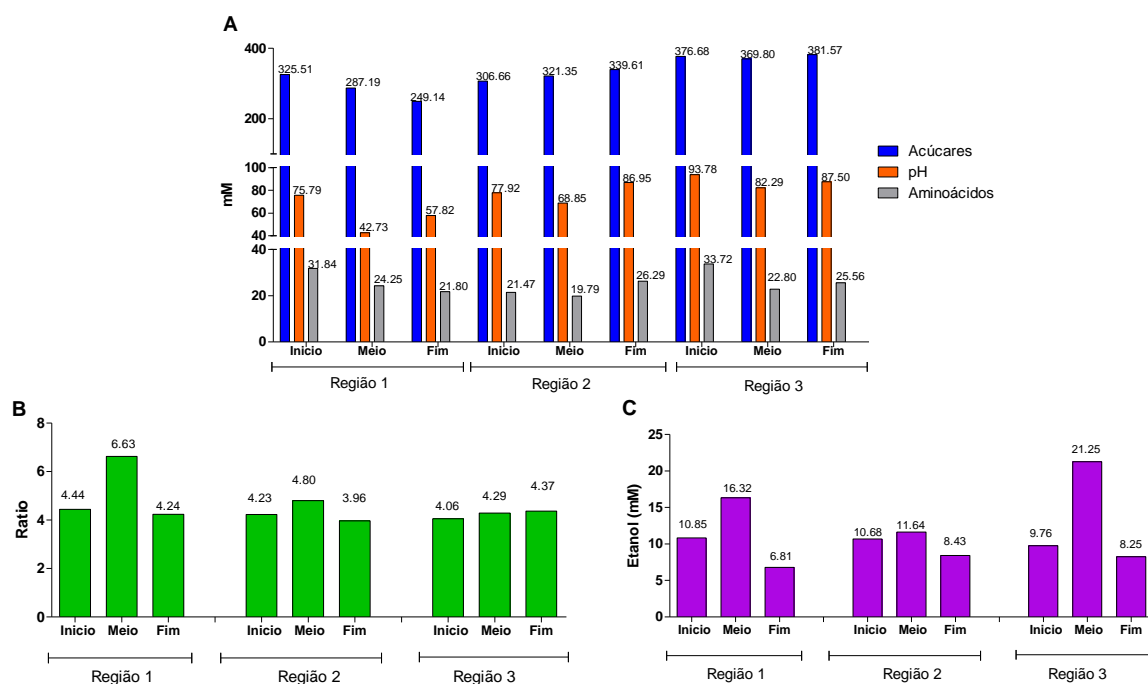


Figura 49: Comparativo entre os valores obtidos na quantificação dos açúcares (sacarose, α e β -glicose e frutose), ácidos (cítrico, málico, ascórbico, succínico e γ -aminobutírico (GABA)); aminoácidos (prolina, arginina, alanina, treonina e valina) (A), *ratio* (B) e etanol (C) para o suco da variedade natal ao longo da safra de 2014.

Definitivamente, podemos dizer que a região 3 foi aquela que propiciou maior produção de açúcares, ácidos e aminoácidos para as variedades hamlin, pera, natal e valência na safra de 2013 e 2014.

Conforme apontado na Figura 50A as amostras de suco de laranja da região 3 foram aquelas que apresentaram maior concentração de açúcares, aminoácidos e ácidos quando comparadas com as amostras da região 1 e 2. A concentração de açúcares nesta região diminuiu em 9,6% no meio e 6,7% no fim da safra. De maneira oposta, a concentração de ácidos e aminoácidos tiveram aumento gradativo ao longo da safra, correspondendo em 28,6% (meio) e 34,5% (fim) para os ácidos, e 2,0% (meio) e 2,1% (fim) para os aminoácidos. Logo, os valores de *ratio* possuíram queda de 35,4% (meio) e 38,2% (fim) (Figura 50B). O conteúdo de etanol ao longo da safra diminuiu 26,8% no meio e aumento em 45,9% no fim (Figura 50C).

Semelhante as amostras da região 3 e as amostras da região 1 apontaram queda na concentração dos açúcares ao longo da safra, sendo 6,4% no meio e 3,1% no fim. A concentração dos ácidos e aminoácidos também tiveram

queda em relação aos valores iniciais da safra, estando em 25,6% e 3,1% para os ácidos, e 5,8% e 12,8% para os aminoácidos (Figura 50A).

Os valores de *ratio* apresentaram aumento ao longo da safra, tendo 26,7% (meio) e 6,8% (fim) (Figura 50B). Já a concentração de etanol apresentou aumento gradativo em relação aos valores iniciais em 10,4% e 50,6% (Figura 50C).

Seguindo o mesmo comportamento das amostras de suco laranja da variedade natal, a região 2 foi aquela que apresentou menor concentração de açúcares ao longo da safra, correspondendo a 307 mM, além de apresentar a menor variação na concentração (2,7% e -1,0%) que as regiões 1 e 3 (Figura 50A). A concentração de ácidos demonstraram queda de 14,6% (meio) e 11,8% (fim), sendo significativo o suficiente para aumentarem os valores de *ratio* em 8,2% (meio) e 6,7% (fim) (Figura 50B), uma vez que a queda da concentração de açúcares foi pequena ao longo da safra.

A concentração de aminoácidos apresentaram oscilações ao longo da safra, havendo aumento em 24,7% no meio da safra e queda em 8,0% no fim (Figura 50A). O conteúdo de etanol, similarmente a região 1, apresentou aumento gradativo ao longo da safra em 34,1% e 89,3% (Figura 50C).

Cabe ressaltar para as amostras de suco de laranja valência na região 1 e 2 apresentaram maiores valores de *ratio* no meio da safra indicando maturidade dos frutos. Ao contrário destas duas regiões, a região 3 apresentou maior valor de *ratio* logo no início da safra, e que o mesmo foi diminuindo no decorrer da safra, indicando que os frutos foram perdendo maturidade comparadas ao início da safra.

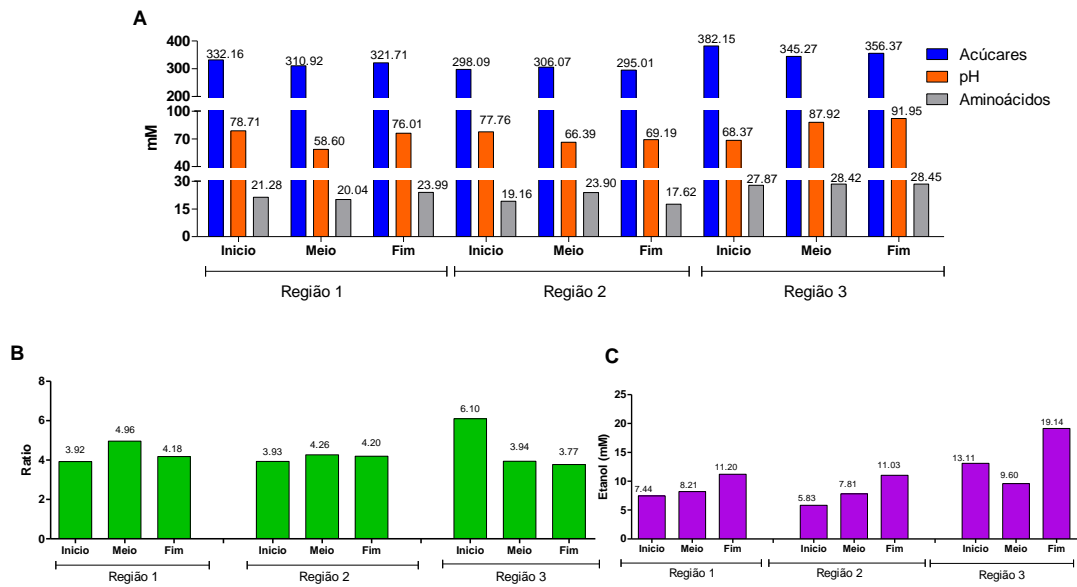


Figura 50: Comparativo entre os valores obtidos na quantificação dos açúcares (sacarose, α e β -glicose e frutose), ácidos (cítrico, málico, ascórbico, succínico e γ -aminobutírico (GABA)); aminoácidos (prolina, arginina, alanina, treonina e valina) (A), *ratio* (B) e etanol (C) para o suco da variedade valência ao longo da safra de 2014.

5. CONCLUSÕES

A ressonância magnética nuclear (RMN de ^1H) combinada com a quimiometria mostrou-se com uma potente ferramenta no estudo da sazonalidade e regionalidade em suco de laranja integral para as variedades de laranjas precoces (hamlin e pera) e tardias (natal e valência) nas três diferentes regiões estudadas. Os dados de RMN de ^1H e bidimensionais possibilitaram caracterizar 23 metabolitos, onde 15 deles foram quantificados via ERETIC IITM, conforme proposto nos objetivos do trabalho.

A quantificação via ERETIC IITM mostrou aumento na concentração dos açúcares, ácidos e aminoácidos entre 20% a 66% para a variedade natal, e 16% a 104% para a variedade valência entre a safra de 2013 e 2014. Os valores de ratio tiveram maior alteração na variedade natal de 16% a 23%, enquanto que a variedade valência de 18% apenas na região 3. O conteúdo de etanol teve aumento expressivo de 48% a 239% para a variedade natal e para a variedade valência de 50% a 145%. Com isso, podemos dizer que as amostras da safra de 2014 apresentaram maior grau de maturidade que as amostras da safra de 2013. Também podemos concluir que a região 3 foi a que apresentou melhor maturidade dos frutos na safra de 2013 e 2014, e para todas as variedades estudadas (hamlin, pera, natal e valência).

No estudo da sazonalidade foi possível constatar que os dados de RMN de ^1H combinados com as análises de PCA mostraram que as amostras de suco de laranja da variedade hamlin teve os períodos da safra de 2014 mais bem definidos na região 2, enquanto que a variedade pera apresentou nas regiões 1, 2 e 3. A variedade natal apresentou os períodos mais bem definidos na região 1, e a variedade valência nas regiões 2 e 3. Os sinais referentes à sacarose, frutose, α e β -glicose, prolina, arginina, alanina, treonina, valina, e os ácidos cítrico, málico, ascórbico, succínico, γ -aminobutírico (GABA) e etanol, foram aqueles que mais contribuíram para diferenciação da sazonalidade, de acordo com o método de análise utilizado.

Os modelos de classificação possibilitaram diferenciar com êxito o ano da safra entre 2013 e 2014, o tipo de suco (tardia ou precoce), a variedade de laranja (hamlin, pera, natal ou valência), e por fim o período de coleta da safra, conforme pretendido no trabalho. Portanto, a RMN aliada às análises multivariadas

demonstrou ser eficiente para avaliar os efeitos da sazonalidade e regionalidade no suco laranja, indicando quais metabólitos tiveram maiores alterações ao longo das safras, além de poder mensurar essas alterações, com fácil manuseio e preparo das amostras, sendo uma ferramenta alternativa em casos onde ferramentas tradicionais não sejam suficientes na resolução de problemas encontrados na citricultura.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRASIL, AGRONÉGOCIOS. Associação Brasileira Exportadores de Cítricos. (Online). Disponível em: <http://www.abecitrus.com.br>. Acesso em outubro de 2012.
2. BRASIL, ADVFN. Advanced Financial Network. (Online). Disponível em: http://wiki.advfn.com/pt/Suco_de_laranja:Hist%C3%B3ria. Acesso em outubro de 2012.
3. ESTADOS UNIDOS, USDA. United States of Department of Agricultural. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf>. Acesso em outubro de 2017.
4. NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R.. O retrato da citricultura brasileira. FEA-RP e FUNDACE. Ribeirão Preto – SP. p. 01-137. 2010
5. BRASIL, AGROLINK. Brasil lidera exportações de suco e busca novos mercados. (Online). Disponível em: http://www.agrolink.com.br/noticias/brasil-lidera-exportacao-de-sucos-e-busca-novos-mercados_131408.html. Acesso em setembro de 2012.
6. FIGUEIRA, R., NOGUEIRA, A.M.P., DUCATTI, C., QUEIROZ, E. C., PEREIRA, A.G. S.. “Análise Físico-Química e Legalidade em Bebidas de Laranja”. *Alimentos e Nutrição*. Araraquara-Brasil. V.21, n.2, p. 267-272, 2010.
7. BRASIL, MAPA. Decreto 6.871, de 04 de Junho de 2009. Ementa: Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de Junho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Publicado no Diário Oficial da União de 05 de junho de 2009.
8. BRASIL, UFRGS. Legislação para Sucos. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/alimentus1/feira/prfruta/sucolar/capa3.htm>. Acesso em setembro 2017.
9. GORTER, C. J. Negative results of an attempt to direct nuclear magnetic spins. *Physica*, 3:995-998, 1936.
10. PROCTOR, W. G. and YU, F. C.. The dependence of a Nuclear Magnetic Resonance frequency upon chemical compound. *Physical Review*. California – EUA. vol. 77, p. 717-717, 1950.
11. SPRAUL, M.; SCHÜTZ, B.; HUMPFER, E.; MÖTTER, M.; SCHÄFER, H.; KOSWIG, S.; RINKE, P.. Mixture analysis by NMR as applied to fruit juice quality control. *Magnetic Resonance in Chemistry*. Baden-Württemberg – Germany. vol. 47, p. 130-137. 2009.
12. SPRAUL, M.; SCHÜTZ, B.; RINKE, P.; KOSWIG, S.; HUMPFER, E.; SCHÄFER, H.; MÖTTER, M.; FANG, F.; MARX, U. C.; MINOJA, A.. NMR-Based multi parametric quality control of fruit juices: SGF Profiling. *Nutrients*. Rhesinstetten - Germany. vol. 01, p. 148-155. 2009.

13. MARKKLEY, J.L., BRUSCHWEILER, R., EDISON, A.S., EGHBALNIA, H.R., POWERS, R., RAFTERY, D., WISHART, D.S.. The future of NMR-based metabolomics. *Current Opinion in Biotechnology. Science Direct*,43, p. 33-40, 2017.
14. NORD, L. I.; VAAG, P.; DUUS, J. O.. Quantification of organic and amino acids in beer by ¹H NMR spectroscopy. *Analytical Chemistry. Copenhagen – Denmark. vol. 76, p. 4790-4798. 2004.*
15. KISWANDHI, A., NIEDEBALKI, P., PARISH, C., WANG, Q., LUMATA, L.. Assembly and performance of a 6.4 T cryogen-free dynamic nuclear polarization system. *Magnetic Resonance in Chemistry. Texas-USA. vol. 55, p.846-852.*
16. GRANT, C., WU, C., OPELLA, S. J.. Probes for high field solid-state NMR of lossy biological samples. *Journal of Magnetic Resonance. California-USA. Vol. 204, p. 180-188, 2010.*
17. KC, R., HENRY, I. D., PARK, G. H. J., RAFTERY, D.. Design and construction of a versatile dual volume heteronuclear double resonance microcoil NMR probe. *Journal of Magnetic Resonance. Indiana-USA. Vol. 197, p.186-192, 2009.*
18. KC, R, GOWDA, Y. N., DJUKOVIC, D, HENRY, I. D., PARK, G. H. J., RAFTERY, D.. Susceptibility-matched plugs for microcoil NMR probes. *Journal of Magntic Resonance. Indiana-USA. Vol. 205, p. 63-68, 2010.*
19. NAKASHIMA, Y., BOSS, M., RUSSEK, S.E., MORELAND, J.. Single bead detection with an NMR microcapillary probe. *Journal of Magnetic Resonance. Fukuoka-Japão.Vol. 224, p.71-77, 2012.*
20. CLARKSON, C.; SIBUM, M.; MESEN, R.; JAROSZEWSKI, J. W.. Evaluation of on-line solid-phase extraction parameters for hyphenated, high performance liquid chromatography-solid- phase extraction-nuclear magnetic resonance application. *Journal of Chromatography A. Copenhagen – Denmark. vol. 1165, p. 1-9. 2007.*
21. JAROSZEWSKI, J. W.. Hyphenated NMR methods in natural products research, part 1: direct hyphenation. *Planta Medica. Copenhagen – Denmark. vol. 71, p. 691-700. 2005.*
22. JAROSZEWSKI, J. W.. Hyphenated NMR methods in natural products research, part 2: HPLC-SPE-NMR and other new trends in NMR hyphenation. *Planta Medica. Copenhagen – Denmark. vol. 71, p. 795-802. 2005.*
23. CAMPO, DEL G.; BERREGI, I.; CARACENA, R. and SANTOS, J. I.. Quantitative analysis of malic and citric acids in fruit juices using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Analytica Chimica Acta. San Sebastián - Spanish. vol. 556, p. 462–468, 2006.*
24. MARTIN, G. G.; MARTIN, Y.L.; NAULET, N. and MCMANUS, J. D.. Application of ²H SNIF-NMR and ¹³C SIRA-MS analyses to maple syrup: detection of added sugars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry. Nantes - France. vol. 44, p. 3206-3213, 1996.*

25. MARTIN, G. J.; KOZIET, J.; ROSSMANN, A. and DENNIS, J. Site-specific natural isotope fractionation in fruit juices determined by deuterium NMR an European inter-laboratory comparison study. *Analytica Chimica Acta*. Nantes - France. vol. 321, p. 137-146, 1996.
26. PUPIN, A. M.; DENNIS, M. J.; PARKER, I.; KELLY, S.; BIGWOOD, T. and TOLEDO, M. C. F.. Use of isotopic analyses to determine the authenticity of Brazilian orange juice (*Citrus sinensis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. São Paulo - Brasil. vol. 46, p. 1369-1373, 1998.
27. JAMIN, E.; GUERIN, R.; RETIF, M.; LEES, M. and MARTIN, G.J. Improved detection of added water in orange juice by simultaneous determination of the oxygen-18/oxygen-16 isotope ratios of water and ethanol derived from sugars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Nantes - France. vol. 51, p. 5202-5206, 2003.
28. LOUCHE, L. M. M.; GAYDOU, E. M. ; LESAGE, J. C.. Determination of phlorin as peel marker in orange (*Citrus sinensis*) fruits and juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Marseille - France. vol. 46, p. 4193-4197, 1998.
29. LE GALL, G.; COLQUHOUN, I. J.; DAVIS, A. L.; COLLINS, G. J.; VERHOEYEN, M. E.. Metabolite profile of tomato (*Lycopersicon esculentum*) using ¹H NMR spectroscopy as a tool to detect potential unintended effects followings a genetic modification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Norwich – United Kingdom. vol. 51, p. 2447-2456. 2003.
30. JAMIN, E.; MARTIN, F.; SANTAMARIA-FERNANDEZ, R. and LEES, M.. Detection of Exogenous Citric Acid in Fruit Juices by Stable Isotope Ratio Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Nantes - France. vol. 53, p. 5130-5133, 2005.
31. 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 Chemistry*, 164 (0), 446-453, 2014.
32. DUARTE, I. F.; DELGADILHO, I.; GIL, A. M.; Study of natural mango juice spoilage and microbial contamination with *Penicillium expansum* by high resolution ¹H NMR spectroscopy. *Food Chemistry*. Aveiro – Portugal. vol. 96, p. 313-324, 2006.
33. SOARES, M. V., ALVES FILHO, E. G., SILVA, L.M.A., NOVOTNY, E. H., CANUTO, K.M., WURLITZER, N. J., NARAIN, N., BRITO, E.S. Tracking thermal degradation on passion fruit juice through Nuclear Magnetic Resonance and chemometrics. *Food Chemistry*. Fortaleza-Brasil. 2016.
34. BELTON, P.S.; DELGADILLO, I.; HOLMES, E.; NICHOLLS, A.; NICHOLSON, J.K.; SPRAUL, M. Use of High-Field ¹H NMR Spectroscopy for the Analysis of Liquid Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Norwich – United Kingdom. vol. 44, p. 1483-1487, 1996.
35. BELTON, P. S.; COLQUHOUN, I. J.; KEMSLEY, E. K.; DELGADILHO, I.; ROMA, P.; DENNIS, M. J.; SHARMAN, M.; HOLMES, E.; NICHOLSON, J. K.;

- SPRAUL, M.. Application of chemometrics to the ^1H RMN spectra of apple juices: discriminations between apple varieties. *Food Chemistry*. Norwich – United Kingdom. vol. 61, n. 01/02, p. 207-213. 1998
36. RINKE, P. and SPRAUL, M.. Successful application of SGF – Profiling. *New Food*. Germany. Vol. 1, p. 18-23, 2008.
37. Alemanha, BIOSPIN, B. *Metabolite Reference Database*. (Online). Disponível em: <https://www.bruker.com/products/mr/nmr/nmr-software/nmr-software/bbiorefcode/overview.html>. Acesso 23 de Abril de 2017.
38. DEFERNEZ, M. and COLQUHOUN, I. J. Factors affecting the robustness of metabolite fingerprinting using ^1H NMR spectra. *Phytochemistry*. Norwich – United Kingdom. vol. 62, p. 1009–1017, 2003.
39. PEDERSEN, D. K.. “Spectroscopy and chemometric exploration of food quality: early prediction of meat quality”. Denmark, Department of Dairy and Food Science – *The Royal Veterinary and Agricultural University*, 2002. Ph.D. Thesis. 233 p.
40. NASCIMENTO, E. S. P.. “Análise metabolômica via RMN: amostras de urina e látex”. São Carlos, Programa de Pós – Graduação em Química – *UFSCar*, 2011. Tese de doutorado, 171 p.
41. MONAKHOVA, Y.B., TSIKIN, A.M., KUBALLA, T., LACHENMEIER, D.W. & MUSHTAKOVA, S.P. "Independent component analysis (ICA) algorithms for improved spectral deconvolution of overlapped signals in H-1 NMR analysis: application to foods and related products". *Magn Reson Chem*, 52 (5), 231-240, 2014.
42. ALVES FILHO, E. G.. “Análises de compostos orgânicos não específicos no esgoto sanitário doméstico através das técnicas RMNq E HPLC-(UV/MS)-SPE-ASS-NMR”. São Carlos, Programa de Pós – Graduação em Química – *UFSCar*, 2014. Tese de doutorado, 21-25 p.
43. RENO, J.P., BIELICKI, G., DEPONGE, C., GACHON, P., MMICOL, D., RITZ, P.. Characterization of animal products according to geographic origin and feeding diet using nuclear magnetic resonance and isotope ratio mass spectrometry. Part II: Beef meat. *Food Chemistry*. France. Vol. 86, p. 251-256, 2004.
44. SACCO, D.; BRESCIA, M. A.; SGARAMELLA, A.; CASIELLO, G.; BUCCOLIERE, A.; OGRINC, N. and SACCO, A.. Discrimination between Southern Italy and foreign milk samples using spectroscopic and analytical data. *Food Chemistry*. Italy. Vol. 114, p. 1559-1563, 2009.
45. CALIGIANI, A., COISSON, J.D., TRAVAGLIA, F., ACQUOTTI, D., PALLA, G., PALLA, L. & ARLORIO, M. "Application of ^1H NMR for the characterisation and authentication of "Tonda Gentile Trilobata" hazelnuts from Piedmont (Italy)". *Food Chemistry*, 148, 77-85, 2014.

46. CALIGIANI, A., PALLA, L., ACQUOTTI, D., MARSEGLIA, A. & PALLA, G. "Application of H-1 NMR for the characterisation of cocoa beans of different geographical origins and fermentation levels". *Food Chemistry*, 157, 94-99, 2014.
47. LONGOBARDI, F., VENTRELLA, A., BIANCO, A., CATUCCI, L., CAFAGNA, I., GALLO, V., MASTRORILLI, P. & AGOSTIANO, A. "Non-targeted 1H NMR fingerprinting and multivariate statistical analyses for the characterisation of the geographical origin of Italian sweet cherries". *Food Chemistry*, 141 (3), 3028-3033, 2013.
48. PARK, S.J., HYUN, S.H., SUH, H.W., LEE, S.Y., MIN, T.S., AUH, J.H., LEE, H.J., KIM, J.H., CHO, S.M. & CHOI, H.K. "Differentiation of Black Raspberry Fruits According to Species and Geographic Origins by Genomic Analysis and ¹H-NMR-based Metabolic Profiling". *J Korean Soc Appl Bi*, 55 (5), 633-642, 2012.
49. SCANO, P., ROSA, A., LOCCI, E., MANZO, G. & DESSI, M.A. "Modifications of the 1H NMR metabolite profile of processed mullet (*Mugil cephalus*) roes under different storage conditions". *Magnetic Resonance in Chemistry*, 50 (6), 436-442, 2012.
50. MONAKHOVA, Y.B., RUTLEDGE, D.N., ROSSMANN, A., WAIBLINGER, H.U., MAHLER, M., ILSE, M., KUBALLA, T. & LACHENMEIER, D.W. "Determination of rice type by H-1 NMR spectroscopy in combination with different chemometric tools". *Journal of Chemometrics*, 28 (2), 83-92, 2014.
51. MANNINA, L.; PATUMI, M.; PROIETTI, N.; BASSI, D. and SEGRE, A. L.. Geographical Characterization of Italian Extra Virgin Olive Oils Using High-Field 1H NMR Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Italy. Vol. 49, n. 06, p. 2687-2696, 2001.
52. VIGGIANI, L. e MORELLI, M. A. C.. Characterization of Wines by Nuclear Magnetic Resonance: A Work Study on Wines from the Basilicata Region in Italy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Potenza-Itália. Vol. 56, 8273-8279.
53. GODELMANN, R., FANG, F., HUMPFER, E., SCHUTZ, B., BANSBACH, M., SCHAFER, H. & SPRAUL, M. "Targeted and Nontargeted Wine Analysis by H-1 NMR Spectroscopy Combined with Multivariate Statistical Analysis. Differentiation of Important Parameters: Grape Variety, Geographical Origin, Year of Vintage". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61 (23), 5610-5619, 2013.
54. MALMENDAL, A., AMORESANO, C. TROTTA, R., LAURI, I., DE TITO, S., NOVELLINO, E., RANDAZZO, A.. NMR Spectrometers as "Magnetic Tongues": Prediction of Sensory Descriptors in Canned Tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Copenhagen-Dinamarca. Vol. 59, p.10831-10838, 2011.
55. WEI, F., FURIHATA, K., KODA, M., HU, F., KATO, R., MIYAKAWA, T., TANOKURA, M.. ¹³C NMR-Based Metabolomics for the Classification of Green Coffee Beans According to Variety and Origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Tóquio-Japão. Vol. 60, p. 10118-10125, 2012.

56. ARANA, V. A., MEDINA, J., ALARCON, R., MORENO, E., HEINTZ, L., SCHAFER H., WIST, J.. Coffee's country of origin determined by NMR: The Colombian case. *Food Chemistry*. Vol. 175, p.500-506, 2015.