

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**Emprego da RMN HR-MAS e análises quimiométricas no  
reconhecimento e avaliação de soja (*Glycine max*)  
geneticamente modificada**

ANDERSSON BARISON

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química como parte dos requisitos para a obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS, área de concentração QUÍMICA ORGÂNICA.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira

São Carlos/SP

2005

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

B253er

Barison, Andersson.

Emprego da RMN HR-MAS e análises quimiométricas no reconhecimento e avaliação de soja (*Glycine max*) geneticamente modificada / Andersson Barison. -- São Carlos : UFSCar, 2007.

268 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2005.

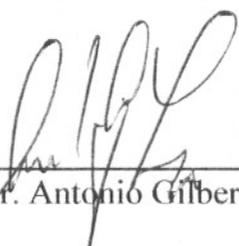
1. Ressonância magnética nuclear. 2. RMN HR-MAS. 3. Quimiometria. 4. Soja. 5. Soja geneticamente modificada. I. Título.

CDD: 543.0877 (20<sup>a</sup>)

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
*Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia*  
*Departamento de Química*  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**  
**Curso de Doutorado**

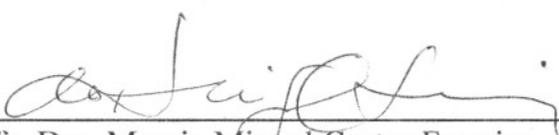
---

*Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou o exame de tese de doutorado do candidato **Andersson Barison** realizado em 29 de junho de 2005:*



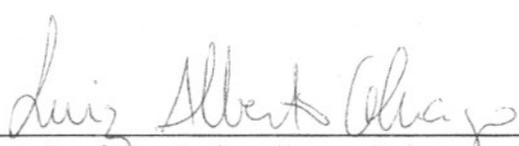
---

Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira



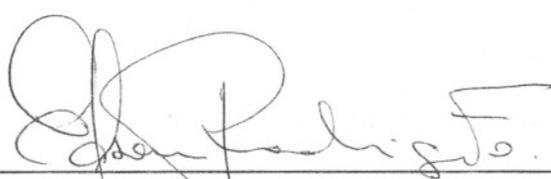
---

Profa. Dra. Marcia Miguel Castro Ferreira



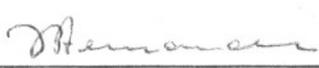
---

Prof. Dr. Luiz Alberto Colnago



---

Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho



---

Prof. Dr. João Batista Fernandes

Educação, Ciência e Tecnologia  
Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação

## DEDICATÓRIA

A **DEUS**, por me dar forças e oportunidades como esta.

A minha companheira **Francinete**, a quem muito amo e admiro, pelo constante e incondicional apoio, paciência, compreensão e incontestável afeto.

Aos meus pais, **Darci** e **Apolônia** que não mediram esforços e se empenharam ao máximo para que seus filhos pudessem alcançar a tão sonhada e transformadora “educação”, a qual não tiveram o privilégio, a minha eterna gratidão.

Aos meus irmãos, **Alisson** e **Adilson**.

Ao professor Dr. **Antonio Gilberto Ferreira** do DQ/UFSCar.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. **Antonio Gilberto Ferreira**, pela oportunidade, orientação, ensinamentos, incentivo e, principalmente, pela contribuição na formação como pesquisador.

Aos Profs. Drs. **Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva, Edson Rodrigues Filho, João Batista Fernandes, Quézia Bezerra Cass e demais professores** do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, pelos ensinamentos, colaborações e amizade.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. **Márcia Miguel Castro Ferreira** do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP, pelos ensinamentos e extraordinário apoio nas análises quimiométricas.

Ao Prof. Dr. **José Francisco Ferraz de Toledo** da Embrapa Soja – Embrapa, Londrina/PR, pelas amostras de soja e contribuições.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. **Ana Rita Nogueira de Araújo** da Embrapa Agropecuária Sudeste – Embrapa, São Carlos/SP, pelo empréstimo do moinho criogênico.

Aos amigos do **Laboratório de RMN, Alexandre, Alviclér, Angela, Cristina, Elisangela, Gláucia, Leila, Lucinéia e Mário**, pelas contribuições e ajuda na execução deste trabalho, pela amizade e agradável convivência durante a execução do trabalho no Laboratório de RMN.

A **Gláucia** pela importante ajuda, amizade e discussões na execução deste trabalho.

Aos amigos dos **Laboratórios de Produtos Naturais, Espectrometria de Massas, Síntese Orgânica, Síntese Inorgânica, Cromatografia, Analítica e LIEC**, pela convivência alegre e pela ajuda durante a execução deste trabalho.

Aos **Técnicos do Departamento de Química, Ademir, Doraí, Luciana, Paulo, Valdir**, pelo apoio técnico.

Ao **Programa de Pós-graduação em Química da UFSCar** e ao corpo técnico/administrativo, pela oportunidade de realização deste trabalho, apoio e serviços prestados.

A **CAPES, CNPq e FAPESP**, pela contribuição com recursos financeiros o que possibilitou a execução deste trabalho.

A **Bruker BioSpin**, pela gentil concessão da licença do programa AMIX e suporte nas análises de RMN.

Deixo aqui registrado o meu agradecimento a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

COSY	-	Correlated Spectroscopy
CPMG	-	Carr-Purcell-Meiboom-Gill
CV	-	Convencional(is)
EPSPS	-	5-EnolPyruvilShikimate-3-Phosphate Synthase
FID	-	Free Induction Decay
GM	-	Geneticamente Modificado(s)
HCA	-	Hierarchical Cluster Analysis
HMBC	-	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HR-MAS	-	High-Resolution – Magic Angle Spinning
HSQC	-	Heteronuclear Single Quantum Coherence
Hz	-	Hertz
IV	-	Infravermelho
J	-	Constante de acoplamento em Hertz
KNN	-	K-Nearest Neighbour
LB	-	Line Broadening
nOe	-	Nuclear Overhauser Effect
NS	-	Number of Scans
OGM	-	Organismo Geneticamente Modificado
PC	-	Principal Component
PCA	-	Principal Component Analysis
RMN	-	Ressonância Magnética Nuclear
RMN de <sup>1</sup> H	-	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN HR-MAS de <sup>1</sup> H	-	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio usando-se a técnica de HR-MAS
RR	-	Roundup Ready
SIMCA	-	Soft Independent Modelling of Class Analogy
T <sub>1</sub>	-	Relaxação longitudinal (spin-rede)
T <sub>2</sub>	-	Relaxação transversal (spin-spin)
TMS	-	Tetrametilsilano
TMSP- <i>d</i> <sub>4</sub>	-	Sal de sódio do ácido 3-(trimetilsilil)-3,3,2,2-tetradeuteriopropionico
δ	-	Deslocamento químico em partes por milhão (ppm)

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 - Produção mundial de soja, safra 2003/2004.....	3
TABELA 1.2 - Exportação de soja e de seus derivados em 2004. ....	3
TABELA 1.3 – Área e produção dos principais produtos agrícolas do Brasil, safra 2004/2005.....	4
TABELA 1.4 - Valor do agronegócio brasileiro (somente exportações) em 2004/2005. ....	4
Tabela 3.1 – Amostras de campo cedidas pela Embrapa soja.....	39
TABELA 4.1 – Atribuição dos deslocamentos químicos de RMN HR-MAS de <sup>1</sup> H dos triacilgliceróis de sementes de soja. ....	70
TABELA 4.2 – Atribuição dos deslocamentos químicos de RMN HR-MAS de <sup>13</sup> C dos triacilgliceróis de sementes de soja. ....	80
Tabela 4.3 – Teor de óleo das sementes de soja.....	203
TABELA 4.4 - Composição média dos ésteres graxos do óleo de soja. ....	205
Tabela 4.5 - Composição de ésteres graxos de uma amostra de óleo de soja obtido por diferentes métodos de cálculo.....	213
TABELA 4.6 – Composição dos triacilgliceróis do óleo das sementes de soja. ....	215
TABELA 4.7 – Classificação das amostras de diferentes cultivares de soja.....	220
TABELA 4.8 – Classificação das amostras em mistura em GM e CV.....	222
TABELA 4.9 - Classificação das amostras desconhecidas em GM e CV para cada cultivar de soja.....	223
TABELA 4.10 - Classificação das amostras desconhecidas em GM e CV para as amostras de campo do Estado de Mato Grosso.....	224
TABELA 4.11 - Classificação das amostras desconhecidas em GM e CV para as amostras de campo das regiões de Londrina e Ponta Grossa.....	225
TABELA 4.12 – Predição de amostras desconhecidas de acordo com regiões de Londrina e Ponta Grossa.....	227
TABELA 4.13 – Posto para as classes do modelo SIMCA.....	228
TABELA 4.14 – Resíduos e distâncias intra e interclasses observados para o modelo SIMCA.....	229
TABELA 4.15 - Predição das amostras desconhecidas pelo método SIMCA de acordo com a região. ....	230

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 – Representação da via metabólica do ácido chiquímico. ....	6
FIGURA 1.2 – Biossíntese do ácido corísmico pela via metabólica do ácido chiquímico. ....	8
FIGURA 1.3 – Representação esquemática da amostra girando no ângulo mágico. ....	13
FIGURA 1.4 – Representação de um rotor utilizado nas medidas de RMN HR-MAS ....	13
FIGURA 1.5 – Espectros de RMN de $^1\text{H}$ de uma amostra de semente de soja obtidos com e sem giro no ângulo mágico. ....	14
FIGURA 1.6 – Representação da seqüência de pulsos CPMG (Filtro de $T_2$ ) ....	17
FIGURA 1.7 – Representação da relaxação transversal ocorrida durante a aplicação da seqüência de pulsos CPMG ....	18
FIGURA 1.8 – Comparação entre espectros de RMN de $^1\text{H}$ adquiridos com a seqüência <i>zg</i> e CPMG ....	18
FIGURA 1.9 – Espectros de RMN de $^1\text{H}$ obtidos de amostras de soja de diferentes regiões produtoras. ....	19
FIGURA 1.10 – Representação da atuação da quimiometria nas interfaces das áreas da ciência. ....	20
FIGURA 1.11 – Espectros de RMN de $^1\text{H}$ referentes a várias amostras, utilizados para a construção de uma matriz de dados. ....	21
FIGURA 1.12 – Representação esquemática das formas de visualização dos resultados de análises exploratória de dados ....	23
FIGURA 1.13 – Representação esquemática dos métodos de classificação SIMCA e KNN. ....	26
FIGURA 1.14 – Comparação relativa das sensibilidades de várias ferramentas metabolômicas. ....	32
FIGURA 3.1 – Sistema de empacotamento de amostra para sonda de HR-MAS. ....	42
FIGURA 4.1 – Espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ de grãos de soja obtidos com diferentes tipos de preparo de amostra ....	51
FIGURA 4.2 – Espectro de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ somente do pericarpo das sementes de soja, adquiridos com a seqüência <i>zgpr</i> e CPMG. ....	52
FIGURA 4.3 – Comparação entre espectro de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ de amostras de sementes de soja moídas manualmente e criogenicamente ....	53
FIGURA 4.4 – Comparação entre um espectro de RMN de $^1\text{H}$ de óleo de soja e um espectro de RMN HR-MAS $^1\text{H}$ de sementes de soja ....	54
FIGURA 4.4 (Ampliação) – Comparação entre um espectros de RMN de $^1\text{H}$ de óleo de soja e de RMN HR-MAS $^1\text{H}$ de sementes de soja ....	55
FIGURA 4.5 – Espectro representativo de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ de folhas de plântulas de soja ....	56
FIGURA 4.6 – Comparação entre um espectro de RMN HR-MAS $^1\text{H}$ de sementes de soja obtidos sem e com o uso do filtro de $T_2$ . ....	57
FIGURA 4.7 – Comparação entre um espectro de RMN HR-MAS $^1\text{H}$ de folhas de plântulas de soja obtidos sem e com o uso do filtro de $T_2$ . ....	58
FIGURA 4.8 – Comparação entre espectros de RMN HR-MAS $^1\text{H}$ de três diferentes cultivares de soja. ....	59

FIGURA 4.8 (Continuação) – Ampliação da região de $\delta$ 9,0 a 6,0 ppm. ....	59
FIGURA 4.9 – Comparação entre espectros de RMN HR-MAS $^1\text{H}$ de uma cultivar de soja de diferentes regiões produtoras.....	60
FIGURA 4.10 – Comparação entre espectros de RMN HR-MAS $^1\text{H}$ de um espécime GM e seu respectivo espécime CV da cultivar BRS 133.....	60
FIGURA 4.10 (Continuação) – Ampliação da região de $\delta$ 4,30 a 0,75 ppm .....	61
FIGURA 4.10 (Continuação) – Ampliação da região de $\delta$ 9,5 a 6,0 ppm. ....	61
FIGURA 4.11 – Comparação entre espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ adquiridos através da excitação de todas as frequências e somente com excitação seletiva dos sinais de alta frequência .....	62
FIGURA 4.12 – Comparação entre espectros de RMN HR-MAS $^1\text{H}$ de folhas de diferentes cultivares de soja .....	63
FIGURA 4.13 – Comparação entre espectros de RMN HR-MAS $^1\text{H}$ de folhas de uma mesma cultivar de soja, porém obtida com sementes de diferentes regiões produtoras. ....	64
FIGURA 4.14 – Replicatas de espectros de RMN HR-MAS $^1\text{H}$ adquiridos de sementes de uma mesma cultivar de soja.....	66
FIGURA 4.15 – Replicatas de espectros de RMN HR-MAS $^1\text{H}$ adquiridos de folhas de uma mesma cultivar de soja.....	67
FIGURA 4.16 – Representação dos vários tipos de ésteres graxos e da unidade de glicerol, destacando os tipos de hidrogênio.....	69
FIGURA 4.17 – Espectro de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ de sementes de soja.....	69
FIGURA 4.18 – Correlações $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ observadas no experimento de <i>g</i> COSY, adquirido na sonda de HR-MAS para amostras de sementes de soja.....	72
FIGURA 4.18 (Ampliações) – Correlações $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ observadas no experimento de <i>g</i> COSY, adquiridos na sonda de HR-MAS para amostras de sementes de soja.....	73
FIGURA 4.19 – Experimento de HR-MAS 1D- <i>g</i> NOE em que o hidrogênio em $\delta$ 5,21 foi irradiado comparado com um espectro de hidrogênio de uma amostra de semente de soja .....	74
FIGURA 4.20 – Correlações $^1\text{J } ^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , observadas no experimento de <i>g</i> HSQC, adquiridos na sonda de HR-MAS para amostras de sementes de soja.....	78
FIGURA 4.21 – Correlações $^{\text{LR}}\text{J } ^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , observadas no experimento de <i>g</i> HMBC, adquirido na sonda de HR-MAS para amostras de sementes de soja.....	79
FIGURA 4.22 – Representação dos vários tipos de ésteres graxos e da unidade de glicerol, destacando os tipos de carbono .....	80
FIGURA 4.23 – Espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ , sem ajuste da fase e linha de base, somente com a fase ajustada e finalmente com a fase e a linha de base ajustadas.....	82
FIGURA 4.24 – Gráfico de escores da análise por PCA de um conjunto de espectros de RMN de $^1\text{H}$ sem correção de fase e linha de base, referente às amostras de sementes de soja de duas cultivares .....	84
FIGURA 4.25 – Gráfico de escores da análise por PCA de um conjunto de espectros de RMN de $^1\text{H}$ com correção de fase e linha de base, referente às amostras de sementes de soja de duas cultivares .....	85

FIGURA 4.26 – Gráfico de escores da análise por PCA de um conjunto de espectros de RMN de $^1\text{H}$ sem correção de fase e linha de base, porém utilizando o modo especial de integração dos sinais do programa AMIX <sup>®</sup> para cálculo dos <i>buckets</i> , referentes às amostras de sementes de soja de duas cultivares .....	86
FIGURA 4.27 – Espectro de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ representado em pontos .....	88
FIGURA 4.28 – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ transformado em <i>buckets</i> .....	88
FIGURA 4.29 – Gráfico de escores mostrando a discriminação entre amostras de sementes de soja de diferentes cultivares, utilizando-se <i>buckets</i> de 0,5 ppm.....	89
FIGURA 4.30 – Gráfico de escores mostrando a discriminação entre amostras de sementes de soja de diferentes cultivares, utilizando-se <i>buckets</i> de 0,1 ppm.....	90
FIGURA 4.31 – Gráfico de escores mostrando a discriminação entre amostras de sementes de soja de diferentes cultivares, utilizando-se <i>buckets</i> de 0,05 ppm.....	91
FIGURA 4.32 – Gráfico de escores mostrando a discriminação entre amostras de sementes de soja de diferentes cultivares, utilizando-se <i>buckets</i> de 0,01 ppm.....	92
FIGURA 4.33 – Gráfico de escores mostrando a discriminação entre amostras de sementes de soja da cultivar BRS134 proveniente de diferentes regiões produtoras, utilizando-se <i>buckets</i> de 0,5 ppm....	93
FIGURA 4.34 – Gráfico de escores mostrando a discriminação entre amostras de sementes de soja da cultivar BRS134 proveniente de diferentes regiões produtoras, utilizando-se <i>buckets</i> de 0,1 ppm....	94
FIGURA 4.35 – Gráfico de escores mostrando a discriminação entre amostras de sementes de soja da cultivar BRS134 proveniente de diferentes regiões produtoras, utilizando-se <i>buckets</i> de 0,05 ppm...	95
FIGURA 4.36 – Gráfico de escores mostrando a discriminação entre amostras de sementes de soja da cultivar BRS134 proveniente de diferentes regiões produtoras, utilizando-se <i>buckets</i> de 0,01 ppm...	96
FIGURA 4.37 – Representação dos tamanhos de <i>buckets</i> em ppm sobre um espectro de RMN de $^1\text{H}$ ..	97
FIGURA 4.38 – Gráfico de escores mostrando a discriminação entre amostras de sementes de soja de diferentes cultivares, em que os espectros sofreram uma multiplicação exponencial dos FIDs por um fator de 2 Hz .....	99
FIGURA 4.39 – Gráfico de escores mostrando a discriminação entre amostras de sementes de soja de diferentes cultivares, em que os espectros sofreram uma multiplicação exponencial Laurezentina dos FIDs por um fator de 1 Hz .....	100
FIGURA 4.40 – Gráfico de escores mostrando a discriminação entre amostras de sementes de soja de diferentes cultivares, em que os espectros sofreram uma multiplicação exponencial Laurezentina dos FIDs por um fator de 0,3 Hz .....	101
FIGURA 4.41 – Gráfico de escores, mostrando a discriminação entre amostras de sementes de soja da cultivar BRS 134, proveniente de diferentes regiões, em que os espectros sofreram uma multiplicação exponencial dos FIDs por um fator de 2 Hz .....	102

FIGURA 4.42 – Gráfico de escores, mostrando a discriminação entre amostras de sementes de soja da cultivar BRS 134, proveniente de diferentes regiões, em que os espectros sofreram uma multiplicação exponencial dos FIDs por um fator de 1 Hz .....	103
FIGURA 4.43 – Gráfico de escores, mostrando a discriminação entre amostras de sementes de soja da cultivar BRS 134, proveniente de duas diferentes regiões, em que os espectros sofreram uma multiplicação exponencial dos FIDs por um fator de 0,3 Hz, PC1 versus PC2 .....	104
FIGURA 4.44 – Gráfico de escores, mostrando a discriminação entre amostras de sementes de soja da cultivar BRS 134, proveniente de duas diferentes regiões, em que os espectros sofreram uma multiplicação exponencial dos FIDs por um fator de 0,3 Hz, PC1 versus PC3 .....	105
FIGURA 4.45 – Gráfico de escores mostrando a discriminação entre amostras de sementes de soja de diferentes cultivares em que os espectros sofreram uma multiplicação exponencial dos FIDs por um fator de 0,3 Hz, utilizando-se <i>buckets</i> de 0,01 ppm .....	107
FIGURA 4.46 – Gráfico de escores mostrando a discriminação entre amostras de sementes de soja de diferentes regiões em que os espectros sofreram uma multiplicação exponencial dos FIDs por um fator de 0,3 Hz, utilizando-se <i>buckets</i> de 0,01 ppm .....	108
FIGURA 4.47 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ adquiridos sem o uso do filtro de $T_2$ , mostrando a discriminação entre amostras de sementes de soja da cultivar BRS 134 proveniente de diferentes regiões .....	110
FIGURA 4.48 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ adquiridos com o emprego do filtro de $T_2$ , mostrando a discriminação entre amostras de sementes de soja da cultivar BRS 134 proveniente de diferentes regiões .....	111
FIGURA 4.49 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ adquiridos sem o emprego do filtro de $T_2$ , mostrando a discriminação entre amostras de sementes de soja de diferentes cultivares .....	112
FIGURA 4.50 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ adquiridos com o emprego do filtro de $T_2$ , mostrando a discriminação entre amostras de sementes de soja de diferentes cultivares .....	113
FIGURA 4.51 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ adquiridos com o emprego do filtro de $T_2$ , mostrando a discriminação entre amostras de sementes GM e CV da cultivar BRS133 .....	114
FIGURA 4.52 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ adquiridos sem o emprego do filtro de $T_2$ , mostrando a discriminação entre amostras de sementes GM e CV da cultivar BRS133 .....	115
FIGURA 4.53 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ , adquiridos com 512 varreduras e utilizando-se todo o espectro (9,5-0,5 ppm) na análise, mostrando a discriminação entre amostras de sementes de diferentes cultivares .....	117
FIGURA 4.54 – Gráfico de influências referente ao gráfico de escores de PC1 versus PC3 da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ , adquiridos com 512 varreduras e utilizando-se todo o espectro (9,5 a 0,5 ppm) na análise .....	118

FIGURA 4.55 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ , adquiridos com 512 varreduras e utilizando-se somente a região de 4,5 a 0,5 ppm dos espectros na análise, mostrando a discriminação entre amostras de sementes de diferentes cultivares.....	119
FIGURA 4.56 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ , adquiridos com 64 varreduras e utilizando-se somente a região de 4,5 a 0,5 ppm dos espectros na análise, mostrando a discriminação entre amostras de sementes de espécimens GM e CV da cultivar BRS133 .....	120
FIGURA 4.57 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ de sementes de uma mesma cultivar de soja (BRS133), mostrando a discriminação pela data de aquisição .....	122
FIGURA 4.58 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ de sementes de uma mesma cultivar de soja (BRS134), mostrando a discriminação pela data de aquisição .....	123
FIGURA 4.59 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ adquiridos no mesmo dia para sementes de uma mesma cultivar de soja, mostrando a distribuição aleatória das replicatas.....	124
FIGURA 4.60 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ de sementes de uma mesma cultivar de soja (BRS133), mostrando a discriminação entre os analistas.....	125
FIGURA 4.61 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ sementes de uma mesma cultivar de soja (BRS134), mostrando a discriminação entre os analistas.....	126
FIGURA 4.62 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ adquiridos sem o filtro de $T_2$ de sementes de uma mesma cultivar de soja (BRS134), mostrando a discriminação entre os analistas .....	127
FIGURA 4.63 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ de sementes da cultivar de soja BRS 134 (conjunto 1), mostrando a discriminação entre as regiões produtoras .....	129
FIGURA 4.64 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ de sementes da cultivar de soja BRS 134 (conjunto 2), mostrando a discriminação entre as regiões produtoras .....	130
FIGURA 4.65 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ de sementes da cultivar de soja BRS 134 (conjunto 3), mostrando a discriminação entre as regiões produtoras .....	131
FIGURA 4.66 – Influências das variáveis em PC1 referente a discriminação por região da figura 4.63 (conjunto 1).....	132
FIGURA 4.67 – Influências das variáveis em PC1 referente a discriminação por região da figura 4.65 (conjunto 3).....	133
FIGURA 4.68 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ de sementes, mostrando a discriminação entre as cultivares BRS 133 e BRS 134 .....	135

FIGURA 4.69 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ de sementes, mostrando a discriminação entre as cultivares BRS 133 e BRS 137 .....	136
FIGURA 4.70 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ de sementes, mostrando a discriminação entre as cultivares BRS 133 e EMBR 59 .....	137
FIGURA 4.71 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ de sementes, mostrando a discriminação entre as cultivares BRS 134 e BRS 137 .....	138
FIGURA 4.72 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ de sementes, mostrando a discriminação entre as cultivares BRS 134 e EMBR 59 .....	139
FIGURA 4.73 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ de sementes, mostrando a discriminação entre as cultivares BRS 137 e EMBR 59 .....	140
FIGURA 4.74 – Comparação das influências da cultivar BRS 133 com as demais.....	141
FIGURA 4.75 – Gráfico de influência em PC2, mostrando as variáveis que mais contribuíram para a discriminação entre as cultivares BRS 137 e EMBR 59. ....	143
FIGURA 4.76 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ de sementes, mostrando a discriminação entre as cultivares BRS 133, BRS 134 e BRS 137.....	144
FIGURA 4.77 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ de sementes, mostrando a discriminação entre as cultivares BRS 134, BRS 137 e EMBR 59.....	145
FIGURA 4.78 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ de sementes, mostrando a discriminação entre todas as cultivares, BRS 133, BRS 134, BRS 137 e EMBR 59, PC1 <i>versus</i> PC2 .....	146
FIGURA 4.79 – Gráfico de influência em PC2, mostrando as variáveis que mais contribuíram para a discriminação entre todas as cultivares. ....	147
FIGURA 4.80 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ de sementes, mostrando a discriminação entre todas as cultivares BRS 133, BRS 134, BRS 137 e EMBR 59, PC1 <i>versus</i> PC3.....	148
FIGURA 4.81 – Espectro representativo de IV obtido diretamente de uma amostra de sementes de soja. ....	149
FIGURA 4.82 – Espectros de IV de todas as cultivares de soja, contendo sete replicatas para cada cultivar. ....	150
FIGURA 4.83 – Gráfico de escores referente a análise por PCA de espectros de IV de sementes de soja mostrando a discriminação entre as cultivares .....	151
FIGURA 4.84 – Dendograma referente a análise por HCA de espectros de IV de sementes de soja, mostrando a discriminação entre as cultivares. ....	152
FIGURA 4.85 – Gráfico de escores referente a análise por PCA de espectros de IV de sementes de soja das cultivares BRS 134 e BRS 137.....	153
FIGURA 4.86 – Gráfico de escores referente a análise por PCA de espectros de IV de sementes de soja das cultivares BRS 133 e EMBR 59.....	154
FIGURA 4.87 – Gráfico de escores referente a análise por PCA de espectros de IV de sementes de soja, mostrando a discriminação entre as cultivares BRS 133 e BRS 134 .....	154
FIGURA 4.88 – Gráfico de escores referente a análise por PCA de espectros de IV de sementes de soja, mostrando a discriminação entre as cultivares BRS 133 e BRS 137 .....	155

FIGURA 4.89 – Gráfico de escores referente a análise por PCA de espectros de IV de sementes de soja, mostrando a discriminação entre as cultivares BRS 134 e EMBR 59 .....	155
FIGURA 4.90 – Gráfico de escores referente a análise por PCA de espectros de IV de sementes de soja, mostrando a discriminação entre as cultivares BRS 137 e EMBR 59 .....	156
FIGURA 4.91 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ de sementes da cultivar de soja (BRS133), mostrando a discriminação entre os espécimens CV e GM.....	158
FIGURA 4.92 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ de sementes da cultivar de soja (BRS134), mostrando a discriminação entre os espécimens CV e GM.....	159
FIGURA 4.93 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ de sementes da cultivar de soja (EMBR 59), mostrando a discriminação entre os espécimens CV e GM...	160
FIGURA 4.94 – Influências das variáveis em PC1 para a cultivar BRS 133 .....	162
FIGURA 4.95 – Influências das variáveis em PC1 para a cultivar BRS 134 .....	163
FIGURA 4.96 – Influências das variáveis em PC1 para a cultivar EMBR 59 .....	164
FIGURA 4.97 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ de sementes da cultivar de soja (BRS 137), mostrando a discriminação entre os espécimens CV e GM....	166
FIGURA 4.98 – Influências das variáveis em PC1 para a cultivar BRS 137 .....	168
FIGURA 4.99 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ de as cultivares de soja, com exceção da BRS 137, mostrando a discriminação entre os espécimens CV e GM.....	169
FIGURA 4.100 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ da mistura, mostrando a discriminação entre os espécimens CV e GM .....	171
FIGURA 4.101 – Influências das variáveis em PC1 para a mistura .....	172
FIGURA 4.102 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ das amostras do Mato Grosso, mostrando a discriminação entre os espécimens CV e GM .....	173
FIGURA 4.103 – Comparação dos gráficos de influências obtidos nas discriminações entre espécimens das amostras provenientes do Estado de Mato Grosso.....	175
FIGURA 4.104 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ das amostras da cultivar BRS 134, mostrando a discriminação por região produtora.....	177
FIGURA 4.105 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ das amostras da cultivar BRS 230, mostrando a discriminação por região produtora.....	178
FIGURA 4.106 – Comparação dos gráficos de influências obtidos nas discriminações entre região para a cultivar BRS 134.....	179
FIGURA 4.107 – Comparação dos gráficos de influências obtidos nas discriminações entre região para a cultivar BRS 230.....	180
FIGURA 4.108 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ das amostras da cultivar BRS 247, mostrando a discriminação por região produtora.....	181

FIGURA 4.109 – Comparação dos gráficos de influências obtidos nas discriminações entre região para a cultivar BRS 247 GM.....	182
FIGURA 4.110 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ das amostras de soja, mostrando a discriminação por região produtora e por cultivar .....	184
FIGURA 4.111 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ das amostras de soja, removendo-se as amostras anômalas, mostrando a discriminação por região produtora e por cultivar.....	185
FIGURA 4.112 – Gráfico de influências referente ao gráfico de escores de PC1 <i>versus</i> PC2 da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ de amostras de soja de diferentes cultivares e regiões produtoras, com remoção dos <i>outliers</i> .....	186
FIGURA 4.113 – Dendograma referente a análise por HCA de espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ das amostras de soja das cultivares BRS 134 e BRS 230, mostrando a discriminação por região produtora. ....	187
FIGURA 4.114 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ das amostras de soja, mostrando a discriminação por região produtora e por cultivar para amostras das cultivares BRS 134 CV e BRS 247 GM.....	188
FIGURA 4.115 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ das amostras de campo de Londrina, mostrando a discriminação por cultivar.....	189
FIGURA 4.116 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ das amostras de campo de Ponta Grossa, mostrando a discriminação por cultivar.....	190
FIGURA 4.117 – Comparação dos gráficos de influências obtidos nas discriminações entre cultivares de Londrina e entre cultivares de Ponta Grossa.....	191
FIGURA 4.118 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ de folhas de plântulas de soja, mostrando a discriminação por cultivar.....	193
FIGURA 4.119 – Comparação dos gráficos de influências obtidos nas discriminações entre cultivares de Londrina, usando-se espectros de folhas .....	194
FIGURA 4.120 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ de folhas de plântulas de soja, mostrando a discriminação por região de origem das sementes para a cultivar BRS 230.....	196
FIGURA 4.121 – Comparação dos gráficos de influências obtidos nas discriminações entre regiões, usando-se espectros de folhas. ....	197
FIGURA 4.122 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ de folhas de plântulas de soja, mostrando a discriminação por cultivar e por região de origem das sementes, PC1 <i>versus</i> PC2 .....	199
FIGURA 4.123 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ de folhas de plântulas de soja, mostrando a discriminação por cultivar e por região de origem das sementes, PC1 <i>versus</i> PC3 .....	200
FIGURA 4.124 – Comparação dos gráficos de influências obtidos nas discriminações entre cultivar e região, usando-se espectros de folhas. ....	201
FIGURA 4.125 – Espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ antes e após a extração do óleo de sementes de soja. ....	202

FIGURA 4.126 – Percentagem de óleo extraído das sementes de soja das amostras de Londrina e Ponta Grossa.....	204
FIGURA 4.127 – Espectros de RMN de $^1\text{H}$ de uma amostra de óleo de soja.....	208
FIGURA 4.128 – Quantificação do éster linolenato, através do espectro de RMN de $^1\text{H}$ do óleo de soja. ....	210
FIGURA 4.129 – Quantificação dos ésteres linoleato e saturados, através do espectro de RMN de $^1\text{H}$ do óleo de soja. ....	211
FIGURA 4.130 – Quantificação do éster oleato, através do espectro de RMN de $^1\text{H}$ do óleo de soja.....	212
FIGURA 4.131 – Ampliações de um espectro de RMN de $^1\text{H}$ de uma amostra de óleo para mostrar os sinais dos hidrogênios $\alpha$ das unidades de glicerol.....	214
FIGURA 4.132 – Comparação da produção de ésteres graxos entre as amostras das regiões de Londrina e Ponta Grossa.....	216
FIGURA 4.133 – Percentagem de ésteres graxos para as amostras da cultivar de soja BRS 134 CV....	216
FIGURA 4.134 – Percentagem de ésteres graxos para as amostras da cultivar de soja BRS 230 CV....	217
FIGURA 4.135 – Comparação da produção de ésteres graxos entre cultivares de uma mesma região..	218
FIGURA 4.136 – Modelo de classificação obtidos com as amostras das quatro diferentes cultivares de soja. ....	219
FIGURA 4.137 – Modelo de classificação obtidos com as amostras formadas pela mistura de espécimens GM e CV de todas as cultivares.....	221
FIGURA 4.138 – Modelo de classificação obtido com as amostras das cultivares BRS 134 e BRS 230 provenientes de ambas regiões de Londrina e Ponta Grossa. ....	226

## RESUMO

EMPREGO DA RMN HR-MAS E ANÁLISES QUIMIOMÉTRICAS NO RECONHECIMENTO E AVALIAÇÃO DE SOJA (*Glycine max*) GENETICAMENTE MODIFICADA. A biotecnologia tem possibilitado o desenvolvimento de organismos geneticamente modificados (OGMs), entre eles a soja, principal produto agrícola brasileiro. Permitindo assim, alterar as características da planta, visando aumentar a produtividade e reduzir custos. No entanto, é necessário avaliar os OGMs quanto a segurança alimentar e ambiental. Desta forma, são necessárias metodologias analíticas capazes de atuar na determinação da equivalência substancial destes novos organismos. Dentre as técnicas, a RMN possui um importante atrativo devido ao fato de fornecer um grande número de informações químicas sobre o sistema em estudo, em um único experimento. Além disso, a técnica de RMN HR-MAS possibilita a aquisição de medidas diretamente de materiais intactos (*In situ*), sem a necessidade de quaisquer etapas de preparo de amostra. Aliada a esta, a quimiometria é uma poderosa ferramenta que permite analisar e interpretar dados de alta complexidade, tais como, espectros de RMN. Neste trabalho, a RMN HR-MAS tem sido empregada para a aquisição de experimentos diretamente de sementes de soja e de folhas da planta. A aplicação de análises quimiométricas sobre os espectros de RMN HR-MAS possibilitou discriminar as amostras de acordo com a cultivar, origem geográfica e, principalmente, origem genética, bem como prever a origem de amostras desconhecidas através da construção de modelos de classificação. Para isso, toda a metodologia desde a aquisição dos espectros de RMN HR-MAS às análises quimiométricas foi desenvolvida e otimizada. A análise quimiométrica dos espectros de RMN HR-MAS tem permitido também determinar as diferenças na composição química entre as amostras, principalmente aquelas entre espécimens GM e convencionais, fornecendo importantes informações sobre a equivalência substancial da soja GM. Desta forma, a RMN HR-MAS aliada a quimiometria tem se mostrado uma importante ferramenta para atuar em estudos metabólicos e no controle de qualidade de produtos agrícolas.

## ABSTRACT

APPLICATION OF HR-MAS NMR AND CHEMOMETRIC ANALYSIS FOR DETECTION AND EVALUATION OF GENETICALLY MODIFIED SOYBEAN (*Glycine max*) CROPS. The Biotechnology has made possible the development of genetically modified (GM) organisms, including soybean, main Brazilian agricultural product. These GM specimens has been produced by changing some original characteristics of plant in order to increase productivity and to reduce production costs. However, these novel organisms should be evaluated, in order to verify its safety for environment and human and animal consume. In this context, it is necessary to develop new analytical methodologies for substantial equivalence determination of these novel plants. NMR is an important analytical tool allowing acquisition of a great number of chemical information in a single experiment. Within NMR techniques, HR-MAS makes possible direct acquisition on intact samples (*In situ*), without any sample treatment. In addition, chemometric analysis is a powerful tool, which allows interpretation of high complex data, such as NMR spectra. In this work, HR-MAS NMR has been employed for acquisition of NMR spectra directly of soybeans and leaves. Application of chemometric analysis on NMR data, has made possible to discriminate samples according to cultivar, geographic origin and mainly genetic origin, as well as to predict the identity of unknown samples by means of classification models. For this, all methodology, including HR-MAS NMR spectra measurements and chemometric analysis, was developed and optimized. Chemometric analysis performed on HR-MAS NMR spectra has also allowed to determine differences on chemical composition among samples, mainly those between traditional and GM specimens, giving important information about substantial equivalence of GM soybean crops. In conclusion, it has been demonstrated that HR-MAS NMR technique together with chemometric analysis is an important tool to be used in metabolomic studies and in quality control of agricultural products.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>x</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>xix</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xx</b>
<b>SUMÁRIO.....</b>	<b>xxi</b>
<b>1 – INTRODUÇÃO .....</b>	<b>2</b>
<b>1.1 – A soja.....</b>	<b>2</b>
1.1.1 – A soja geneticamente modificada.....	5
<b>1.2 – A Ressonância Magnética Nuclear .....</b>	<b>10</b>
1.2.1 – A técnica de High Resolution – Magic Angle Spinning (HR-MAS).....	10
1.2.2 – A seqüência de pulsos CPMG.....	16
<b>1.3 – Análises quimiométricas.....</b>	<b>19</b>
1.3.1 – Análise exploratória dos dados .....	20
1.3.1.1 – Análise dos gráficos de influências.....	23
1.3.2 – Classificação de amostras ou reconhecimento de padrões.....	25
<b>1.4 – Detecção de organismos geneticamente modificados.....</b>	<b>27</b>
<b>1.5 – Avaliação dos organismos geneticamente modificados (OGMs).....</b>	<b>29</b>
1.5.1 – Determinação da equivalência substancial dos OGMs.....	29
1.5.1.1 – Equivalência substancial da soja RR.....	33
<b>2 - OBJETIVOS.....</b>	<b>36</b>
<b>3 – EXPERIMENTAL .....</b>	<b>38</b>
<b>3.1 – Equipamentos .....</b>	<b>38</b>
<b>3.2 – Amostras.....</b>	<b>39</b>
3.2.1 – Sementes.....	39
3.2.2 – Folhas .....	40
3.2.3 – Óleo de soja.....	40
<b>3.3 – Preparo de amostra para aquisição dos espectros de RMN.....</b>	<b>40</b>
3.3.1 – Amostras <i>in natura</i> .....	40
3.3.1.1 – Sementes de soja .....	41
3.3.1.2 – Folhas de plântulas de soja .....	41
3.3.1.3 – Empacotamento das amostras .....	41
3.3.2 – Amostras de óleo.....	43
<b>3.4 – Preparo de amostra para aquisição dos espectros na região do infravermelho.....</b>	<b>43</b>
<b>3.5 – Aquisição dos experimentos de RMN.....</b>	<b>43</b>
3.5.1 – Amostras <i>in natura</i> .....	43

3.5.1.1 – Espectros de hidrogênio .....	43
3.5.1.2 – Experimentos de correlações homonucleares $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ .....	44
3.5.1.3 – Experimentos de correlações heteronucleares $^1\text{J}$ $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ .....	44
3.5.1.4 – Experimentos de correlações heteronucleares $^{LR}\text{J}$ $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ .....	44
3.5.1.5 – Experimentos para observação de efeito nuclear Overhauser .....	45
3.5.2 – Amostras de óleo .....	45
<b>3.6 – Aquisição dos espectros na região do infravermelho .....</b>	<b>45</b>
<b>3.7 – Análises quimiométricas .....</b>	<b>45</b>
3.7.1 – Transformações (Ajustes) .....	46
3.7.1.1 – Dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ .....	46
3.7.1.2 – Dos espectros na região do infravermelho .....	47
3.7.2 – Pré-processamentos .....	47
3.7.2.1 – Nas análises por componentes principais (PCA) .....	47
3.7.2.2 – Nas análises por agrupamento hierárquico (HCA) .....	47
3.7.3 – Análises exploratórias .....	48
3.7.4 – Classificação .....	48
<b>4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>50</b>
<b>4.1 – Preparo das amostras .....</b>	<b>50</b>
<b>4.2 – Resolução dos espectros de RMN HR-MAS de <math>^1\text{H}</math> .....</b>	<b>53</b>
<b>4.3 – O emprego da seqüência de pulsos CPMG na aquisição dos espectros de RMN HR-MAS de <math>^1\text{H}</math> .....</b>	<b>56</b>
<b>4.4 – Análise visual dos espectros de RMN HR-MAS de <math>^1\text{H}</math> .....</b>	<b>58</b>
4.4.1 – Análise visual dos espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ das sementes .....	58
4.4.2 – Análise visual dos espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ das folhas .....	63
<b>4.5 – Reprodutibilidade das medidas de RMN HR-MAS de <math>^1\text{H}</math> .....</b>	<b>64</b>
<b>4.6 – Atribuição dos sinais nos espectros de RMN HR-MAS de <math>^1\text{H}</math> de sementes de soja .....</b>	<b>67</b>
<b>4.7 – Ajustes dos espectros de RMN HR-MAS de <math>^1\text{H}</math> .....</b>	<b>81</b>
<b>4.8 – Pré-processamento dos dados .....</b>	<b>87</b>
4.8.1 – Avaliação do tamanho dos <i>buckets</i> (Variáveis) .....	87
4.8.2 – Avaliação do alisamento dos sinais .....	98
4.8.3 – Avaliação em conjunto do alisamento dos sinais e tamanho dos <i>buckets</i> .....	106
<b>4.9 – Comparação das análises quimiométricas de espectros obtidos com e sem o filtro de <math>T_2</math> .....</b>	<b>109</b>
<b>4.10 – Avaliação do número de varreduras e da região responsável pela discriminação .....</b>	<b>116</b>
<b>4.11 – Validação da metodologia .....</b>	<b>121</b>
4.11.1 – Análise da robustez .....	121
4.11.2 – Análise da reprodutibilidade .....	128
<b>4.12 – Análises quimiométricas das amostras de casa de vegetação .....</b>	<b>134</b>
4.12.1 – Discriminação e avaliação das cultivares .....	134
4.12.1.1 – Discriminação entre cultivares, utilizando espectros na região do infravermelho .....	149

4.12.2 – Discriminação e avaliação dos espécimens GM e CV através de sementes de soja ..	157
<b>4.13 – Análises quimiométricas das amostras de campo .....</b>	<b>173</b>
4.13.1 – Discriminação de amostras do Mato Grosso.....	173
4.13.2 – Discriminação de amostras de Ponta Grossa e Londrina .....	176
4.13.2.1 – Discriminação por região .....	176
4.13.2.2 – Discriminação por região e cultivar.....	183
4.13.2.3 – Discriminação por cultivar .....	188
4.13.2.4 – Discriminação por cultivar através de folhas de plântulas de soja.....	192
4.13.2.5 – Discriminação por região através de folhas de plântulas de soja .....	195
4.13.2.6 – Discriminação por região e cultivar através de folhas de plântulas de soja .....	198
<b>4.14 – Análise do óleo de soja das amostras de campo.....</b>	<b>202</b>
4.14.1 – Quantificação do teor de óleo nas sementes das amostras de campo .....	202
4.14.2 – Desenvolvimento de um novo método para determinar a composição de ésteres graxos no óleo por meio de espectros de RMN de <sup>1</sup> H .....	204
4.14.3 – Determinação da composição de ésteres graxos do óleo extraído das sementes de soja .....	215
<b>4.15 – Construção e emprego de modelos de classificação .....</b>	<b>219</b>
4.15.1 – Análise de amostras de casa de vegetação de diferentes cultivares .....	219
4.15.2 – Análise de amostras GM e CV de casa de vegetação.....	220
4.15.3 – Análise de amostras de campo de diferentes cultivares e regiões .....	226
<b>5 – CONCLUSÕES .....</b>	<b>233</b>
<b>6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>236</b>

# *Introdução*

## 1 – INTRODUÇÃO

### 1.1 – A soja

A soja (*Glycine max* L. Mer), originária da china, é uma das mais antigas espécies vegetais domesticadas pelo homem, sendo conhecida a mais de 5000 anos. O seu cultivo como alimento humano se deu a partir da expansão do seu cultivo no sudoeste asiático, o qual ocorreu por volta de 3000 anos atrás, tendo até hoje forte tradição na culinária de países desta região. No entanto, o seu cultivo extensivo no ocidente ocorreu somente no século XX, provavelmente devido ao aumento do intercâmbio entre países do ocidente e oriente. A partir de então, ocorreu uma rápida expansão mundial, sendo atualmente cultivada em quase todas as regiões aráveis do planeta. Atualmente, é responsável pela maior fonte de proteína e óleo para o consumo humano e animal (Embrapa: Circular Técnica, 1999).

No Brasil, o primeiro relato sobre a soja data de 1882, no Estado da Bahia. Mais tarde, em 1908 foi introduzida no Estado de São Paulo trazida por imigrantes japoneses. Porém, o seu cultivo para fins comerciais iniciou somente a partir da sua introdução no Estado do Rio Grande do Sul, em 1914, apresentando um grande aumento na produção nos anos seguintes e, iniciando-se então, a exportação deste produto agrícola pelo Brasil. Mas, foi na década de 70 que o Brasil passou a ser um dos grandes produtores mundiais de soja, devido ao desenvolvimento pela Embrapa de cultivares adaptadas às regiões de clima tropical, o qual permitiu o cultivo da soja nos cerrados brasileiros, onde a planta não se desenvolvia. Até então, as cultivares utilizadas no Brasil eram originárias dos Estados Unidos da América, e por isso, só eram produzidas no Estado do Rio Grande do Sul onde as condições climáticas eram semelhantes às regiões de cultivo dos Estados Unidos da América (Embrapa: Circular Técnica, 1999).

O avanço nas áreas de cultivo, a qual ainda está em expansão no Brasil e, principalmente, ao desenvolvimento tecnológico do setor agrícola, o qual permite o aumento da produtividade foram e são importantes fatores que contribuíram para que o país se tornasse o segundo produtor mundial (Tabela 1.1) e o maior exportador de soja, principalmente para a Europa e a China, que são os maiores mercados consumidores da soja brasileira, absorvendo cerca de 90 % das

exportações brasileiras de soja em grão (Tabela 1.2). Desta forma, a soja é o produto agrícola brasileiro mais importante, de maior produção e área de cultivo (Tabela 1.3). O complexo soja é também responsável pela maior contribuição na balança comercial (Tabela 1.4).

TABELA 1.1 - Produção mundial de soja, safra 2003/2004.

<b>País</b>	<b>Quantidade</b> em milhões de toneladas
Estados Unidos	74,29
Brasil	52,00
Argentina	35,00
China	16,51
Outros	16,80
<b>Total</b>	<b>194,60</b>

Fonte: United State Department of Agriculture - USDA

TABELA 1.2 - Exportação de soja e de seus derivados em 2004.

<b>País de destino</b>	<b>Quantidade</b> em toneladas
<b>Grão</b>	
Europa	7.783.047
China	5.678.005
Outros	5.786.637
<i>Total</i>	19.247.689
<b>Farelo</b>	14.485.621
<b>Óleo e derivados</b>	2.506.477

Fonte: Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB

TABELA 1.3 – Área e produção dos principais produtos agrícolas do Brasil, safra 2004/2005.

<b>Produto</b>	<b>Área</b> (milhões de ha)	<b>Produção</b> (Milhões de toneladas)
Soja	22,9	57,1
Milho	12,3	39,0
Feijão	3,9	2,8
Arroz	3,8	12,8
Trigo	2,8	6,0
Aveia	0,3	0,4
Sorgo	0,9	1,0
Algodão	1,2	1,4

Fonte: Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB

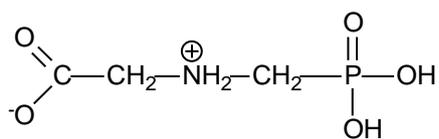
TABELA 1.4 - Valor do agronegócio brasileiro (somente exportações), em milhões de dólares em 2004/2005.

<b>Produto</b>	<b>Valor (Milhões US\$)</b>
Soja	2.470,2
Madeira e derivados	1.980,0
Carnes	1.679,5
Couro e peleteria	896,0
Açúcar	648,5
Café	575,2
Algodão	340,9
Laranja	334,7
Milho	307,8
Fumo	212,3
Trigo	200,6
Cacau	97,7
Bebidas	16,7

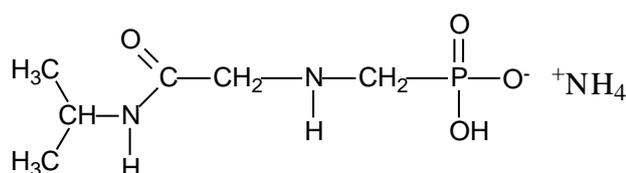
Fonte: SECEX

### 1.1.1 – A soja geneticamente modificada

A necessidade do controle de doenças e pragas na agricultura tem sido caracterizada pela ampla utilização de agentes químicos, os conhecidos agrotóxicos. Neste contexto, o controle de ervas daninhas em plantações agrícolas tem sido realizado pela aplicação de herbicidas, como aqueles a base de glifosato, tais como, o Roundup® da Monsanto (Monsanto, 2004), o mais conhecido e mais comercializado no mundo. Os compostos ativos do herbicida a base de glifosato são: o sal de amônio de isopropilamida de N-(fosfonometil) glicina e o ácido N-(fosfonometil) glicina (Monsanto, 2004). No Brasil, o glifosato tem sido amplamente utilizado, principalmente como dessecante em cultivos de plantio direto e nas entre linhas de cultura, sendo ativo para um grande número de espécies de ervas daninhas (Rodrigues e Almeida, 1995). O glifosato é um herbicida sistêmico de ação total, uma vez absorvido é transladado facilmente na planta, motivo pelo qual provoca a morte do sistema radicular e de estruturas reprodutivas de plantas perenes, como rizomas, bulbos e tubérculos. Além disso, possui rápida absorção pelo solo, o que permite a semeadura imediata, após sua aplicação. Por estes motivos tem revolucionado os sistema de plantio direto.



ácido N-(fosfonometil) glicina



sal de isopropilamida de N-(fosfonometil) glicina

Nas plantas, o glifosato atua na inibição da atividade da enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintetase (EPSPS), bloqueando a biossíntese dos aminoácidos aromáticos essenciais (fenilalanina, triptofano e tirosina) e, conseqüentemente, das proteínas e metabólitos secundários, dos quais estes são precursores (Figura 1.1), ocasionando uma desregulação metabólica geral (Kruze e col., 2000; Reddy e col., 2004; Obert e col., 2004; Mann, 1994). No entanto, o herbicida é incapaz de fazer a distinção entre erva daninha e cultura agrícola (não

seletivo). Portanto, a sua aplicação afeta ambas as espécies e, conseqüentemente, o seu emprego fica restrito até a emergência da cultura.

Buscando contornar este problema, a soja GTS-40-3-2, também conhecida como soja Roundup Ready (RR) foi desenvolvida pela Monsanto para conferir tolerância ao uso de glifosato (CropBiotech, 2003; Monsanto, 2004). A soja resistente ao glifosato foi desenvolvida pela introdução estável de um transgene proveniente de espécies de *Agrobacterium*, que também possui a capacidade de codificar uma enzima EPSPS (Kruse e col., 2000).

A enzima EPSPS proveniente do gene *cp4 epsps* de *Agrobacterium tumefaciens* é um polipeptídeo funcionalmente similar a enzima EPSPS das plantas, porém possui reduzida afinidade pelo glifosato. Desta forma, a expressão do gene *cp4 epsps* em plantas tem sido utilizada para conferir tolerância ao glifosato através da produção da enzima CP4 EPSPS, a qual permite manter os níveis normais dos aminoácidos aromáticos na soja RR, caso esta sofra uma aplicação de herbicida a base de glifosato. Ou seja, a expressão do gene *cp4 epsps* confere às plantas um desvio (uma ponte) na rota biossintética para a biossíntese dos aminoácidos aromáticos, a qual não é afetada pelo herbicida glifosato (Figura 1.1) (Kruse e col., 2000).

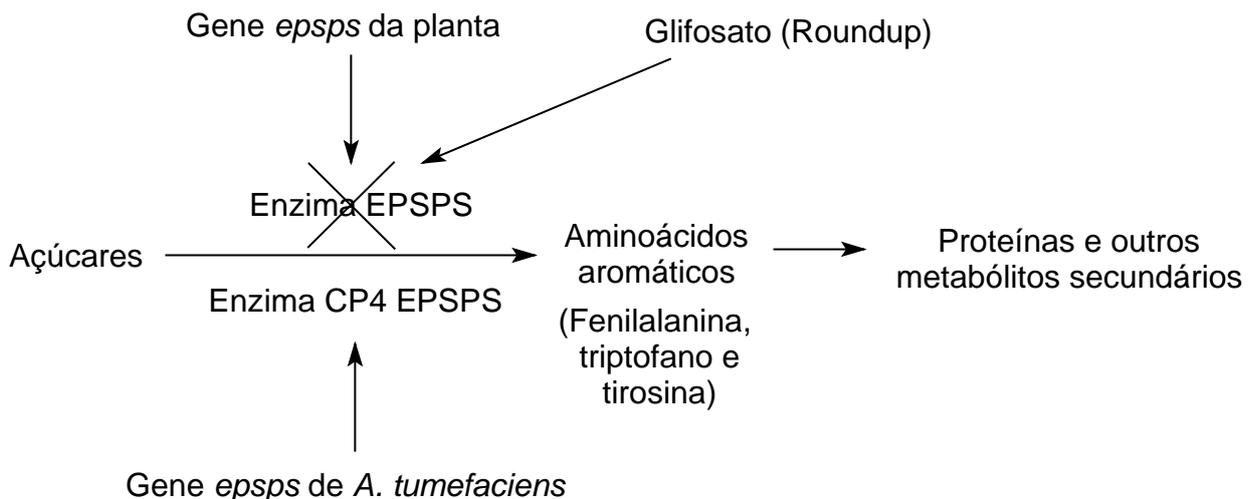


FIGURA 1.1 – Representação da via metabólica do ácido chiquímico para a biossíntese dos aminoácidos aromáticos.

Especificamente, a enzima EPSPS, as vezes também chamada de EPSP ou EPSPs, catalisa a reação do chiquimato-3-fosfato e fosfoenolpiruvato para produzir 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato mais fosfato inorgânico na via biosintética do ácido chiquímico (Figura 1.2). Esta reação ocorre em duas etapas: inicialmente a enzima EPSPS se liga ao chiquimato-3-fosfato, formando um complexo EPSPS-chiquimato-3-fosfato e, posteriormente, o fosfoenolpiruvato se encaixa neste complexo, dando prosseguimento à reação que tem como resultado a produção do 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato. O herbicida glifosato não se liga à enzima EPSPS livre, mas ao complexo EPSPS-chiquimato-3-fosfato, tornando-o inativo, impedindo assim que o fosfoenolpiruvato se ligue ao mesmo (Roberts *et al.*, 1998; Kruse *et al.*, 2000). A ligação se dá pela afinidade, o glifosato se liga ao complexo EPSPS-chiquimato-3-fosfato 115 vezes mais do que fosfoenolpiruvato e apresenta dissociação 23000 vezes mais lenta que o fosfoenolpiruvato (Kruse *et al.*, 2000). Já com a enzima CP4 EPSPS codificada pelo gene *cp4 epsps* ocorre exatamente o oposto, tendo elevada afinidade pelo fosfoenolpiruvato e baixa afinidade pelos inibidores de EPSPS.

A inibição da enzima EPSPS interfere no controle da entrada de carbono via ácido chiquímico, pelo aumento da atividade da enzima 3-deoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato sintetase (DAHPS), que é a reguladora da rota e que catalisa a reação da eritrose-4-fosfato com o fosfoenolpiruvato para produzir o deóxi-arabino-heptulosonato-7-fosfato, uma vez que o fosfoenolpiruvato excedente não estará sendo consumido. Como resultado, há um forte dreno de carbono do ciclo de Calvin, devido ao consumo elevado de eritrose-4-fosfato e um acúmulo de altos níveis de chiquimato, já que a via está interrompida pela inibição da EPSPS (Figura 1.2) (Kruse *et al.*, 2000; Reddy *et al.*, 2004).

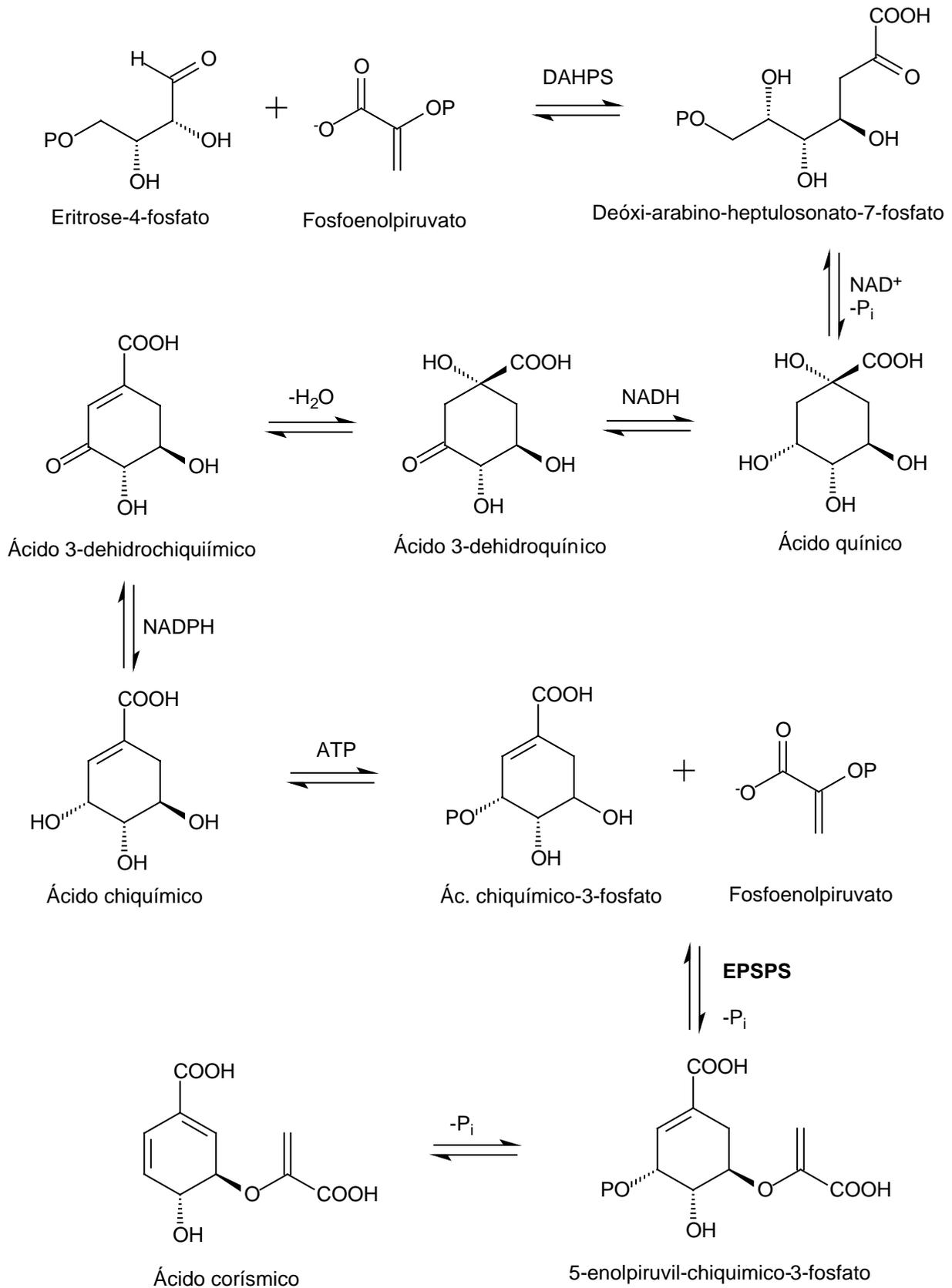


FIGURA 1.2 – Biosíntese do ácido corísmico pela via metabólica do ácido chiquímico (Mann, 1994; Roberts e col., 1998).

A enzima EPSPS é fortemente inibida pelo glifosato em todas as plantas, fungos e na maioria das bactérias. No entanto, ela não está presente em animais, o que explica a baixa toxicidade para mamíferos e também a necessidade do consumo dos aminoácidos derivado da rota do ácido chiquimico por estes (Kruse e col., 2000; Roberts e col., 1998). Além dos aminoácidos, a via do chiquimato é uma das, se não a mais importante via metabólica das plantas, sendo responsável pela produção de outros importantes metabólitos como: vitaminas (K e E), hormônios, alcalóides, lignina, antocianinas e flavonóides, entre outros.

Com o desenvolvimento da soja resistente ao glifosato, outras culturas agrícolas também tem sido geneticamente modificadas através da inserção do gene *cp4 epsps*, com o objetivo de conferir resistência ao herbicida glifosato, gerando uma série de culturas agrícolas Roundup Ready, que atualmente já são comercializadas, incluindo milho, arroz, tomate e fumo, entre outros (Obert e col., 2004; Kleter e Kuiper, 2002). De um modo geral, os organismos geneticamente modificados tolerantes a herbicidas tem predominado na agricultura, sendo a soja RR o de maior sucesso mundial, seguido pelos resistentes a insetos (James e col., 2003; Kleter e Kuiper, 2002; Gaskell e col., 1999).

Recentemente, tem sido introduzido além do gene *cp4 epsps* o gene *gox*, que confere capacidade de metabolização do glifosato em plantas com baixa capacidade para metabolizar o herbicida, reduzindo os níveis residuais de glifosato que permaneceram no produto comercial. Esse gene é responsável pela síntese da enzima C-P liase, que decompõe o glifosato, produzindo ácido aminometilfosfônico (AMPA) e glioxilato. Desta forma, a cultura que possuir os genes *cp4 epsps* e *gox*, terá a EPSPS insensível ao herbicida e ainda será capaz de metabolizá-lo, resultando, teoricamente, em um produto livre deste agrotóxico (Kruse e col.; 2000).

Muitas outras modificações genéticas em culturas agrícolas foram e estão sendo desenvolvidas, como por exemplo, batatas (Tacke e col., 1996; Perlak e col., 1993; Rho e col., 2004; Jaccaud e col., 2003) e tomates resistentes a vírus (Yang e col., 2005), tomates com tempo prolongado de amadurecimento (Noteborn e col., 2000), entre outros. Entre elas, uma interessante modificação genética da soja, resultou em uma espécie que produz maior teor de ésteres graxos do ácido oleico, passando dos 18-22% na soja convencional para cerca de 80% no espécimen geneticamente modificado, o que é muito importante para a dieta humana (Buhr e col., 2002; Hidalgo e col., 2002).

## 1.2 – A Ressonância Magnética Nuclear

Atualmente a Ressonância Magnética Nuclear (RMN), é sem dúvida uma das ferramentas mais poderosas e versáteis para a elucidação estrutural de compostos orgânicos. Desde o seu surgimento em 1945, a RMN tem sofrido grandes transformações, tais como, o desenvolvimento de imãs supercondutores, que permitiram obter campos magnéticos cada vez mais intensos, a transformada de Fourier que possibilitou o uso da técnica pulsada e com isso acumular vários FIDs (Free Induction Decay), e mais recentemente de sondas com gradiente de campo, as quais permitiram melhorar significativamente a qualidade dos experimentos (Kaiser, 2000). Além destes, o surgimento de sondas com giro no ângulo mágico (MAS) possibilitou a análise direta de materiais sólidos (Ni e Eads, 1992; Sacco e col., 1988). Posteriormente, o desenvolvimento de sondas alta resolução com giro no ângulo mágico (HR-MAS) tem permitido a análise direta de materiais *in natura*, tais como tecidos vegetais e animais com resolução espectral muito semelhante às obtidas para amostras em solução (Garrod e col., 1998).

Todas estas sofisticções que a RMN vem acumulando ao longo dos tempos tem possibilitado ampliar cada vez mais o seu campo de atuação, mudando drasticamente o conceito da técnica para os químicos, em que a elucidação estrutural é apenas uma das inúmeras aplicações desta técnica.

### 1.2.1 – A técnica de High Resolution – Magic Angle Spinning (HR-MAS)

A informação espectral de amostras sólidas e/ou semi-sólidas obtida através de sondas convencionais é severamente limitada, devido ao grande alargamento dos sinais. Esse alargamento, deve-se ao movimento molecular restrito de tais amostras, o qual é ocasionado principalmente por três fatores: acoplamentos dipolares, deslocamentos químicos anisotrópicos e diferenças na susceptibilidade magnética da amostra.

O acoplamento dipolar consiste na interação magnética dos spins nucleares através do espaço sem o intermédio de átomos ou elétrons. O efeito do acoplamento dipolar depende da posição relativa entre dois núcleos e, portanto, é bastante pronunciado em amostras sólidas, em que devido ao movimento lento das

moléculas, há tempo suficiente para que o mesmo ocorra. Assim, o campo magnético gerado por um dado nuclídeo pode influenciar, aumentando ou diminuindo o campo magnético sentido por um nuclídeo vizinho, fazendo com que este apresente uma extensa banda de frequências. Em amostras tais como soluções não viscosas, o rápido movimento molecular diminui a interação espacial entre os spins e, conseqüentemente, a influência do acoplamento dipolar (Claridge, 1999).

O deslocamento químico anisotrópico consiste nos diferentes deslocamentos químicos dos núcleos produzidos pelas diversas orientações das moléculas em relação ao campo magnético principal ( $B_0$ ), gerado pelo equipamento. Como a distribuição eletrônica nas moléculas não é esférica, o campo magnético sentido por um núcleo e, portanto, o deslocamento químico, tornam-se dependentes da orientação das ligações em relação a  $B_0$  (Claridge, 1999). Em moléculas como o benzeno, por exemplo, o deslocamento químico de  $^{13}\text{C}$  pode variar de duas a três centenas de ppm, conforme a molécula se posiciona em relação a  $B_0$  (Sanders e Hunter, 1987). Em amostras em soluções não viscosas, contendo moléculas de média e baixa massa molecular, devido a rápida reorientação molecular, observa-se apenas uma única frequência de ressonância para cada nuclídeo distinto quimicamente, referido como deslocamento químico isotrópico, correspondente a média dos deslocamentos químicos referentes a todas as orientações que a molécula pode assumir (Claridge, 1999).

As diferenças na susceptibilidade magnética deve-se a falta de homogeneidade física nas amostras sólidas, conseqüentemente, nuclídeos quimicamente idênticos podem apresentar várias frequências de ressonância dependendo da posição em que este se encontra na amostra, gerando novamente deslocamentos químicos anisotrópicos, ocasionando alargamento dos sinais.

Existe ainda outra diferença significativa entre a RMN para amostras em solução e as sólidas, com relação aos tempos de relaxação spin-rede ( $T_1$ ) e spin-spin ( $T_2$ ). Novamente, o movimento molecular restrito faz com que em amostras sólidas o tempo de relaxação spin-rede seja longo, necessitando de longos tempos de espera entre os acúmulos, e spin-spin seja curto, ocasionando o alargamento dos sinais (Claridge, 1999). Estes fenômenos são observados, devido à velocidade de relaxação spin-rede estar relacionada com a transferência de energia para moléculas próximas espacialmente. Desta forma, restringindo-se o movimento molecular, a constante de velocidade diminui, ocasionando um aumento no tempo de

relaxação spin-rede. Por outro lado, a relaxação spin-spin, ocorre pela transferência de energia para núcleos vizinhos, ou seja, a interação entre os spins é mais eficiente quando o movimento molecular é restrito, resultando na diminuição do tempo de relaxação spin-spin.

Os efeitos que provocam o alargamento dos sinais, com exceção dos fenômenos de relaxação, são quase que totalmente eliminados, senão bastante minimizados quando os espectros de amostras sólidas ou semi-sólidas são obtidos girando-as a altas velocidades no ângulo mágico.

O efeito de alargamento das linhas de ressonância causado pelo acoplamento dipolar (D) é significativamente reduzido, inclinando-se a amostra a exatamente  $54,74^{\circ}$  em relação ao campo magnético principal ( $B_0$ ) (Figura 1.3) uma vez que este possui uma dependência angular segundo a equação:

$$D \text{ proporcional a } \pm\mu_B r_{AB}^{-3} (3\cos^2\theta - 1)$$

Em que:  $\mu_B$  é o momento magnético do nuclídeo B;  $r_{AB}$  é a distância internuclear entre os nuclídeos A e B;  $\theta$  é o ângulo entre o vetor internuclear e o campo magnético aplicado ( $B_0$ ). O sinal  $\pm$  significa que os spins podem estar orientados a favor ou contra o campo aplicado. Desta forma, quando a amostra é inclinada a exatamente  $54,74^{\circ}$  em relação a  $B_0$ , o termo  $3\cos^2\theta - 1$  da equação torna-se zero, anulando o acoplamento dipolar e por este motivo chamado de “ângulo mágico” (Sanders e Hunter, 1987; Claridge, 1999; Broberg e Kenne, 2000).

O efeito de alargamento dos sinais causado por deslocamentos químicos anisotrópicos é resolvido girando-se a amostra a altas velocidades (Figura 1.3). A alta rotação supera os efeitos dos deslocamentos químicos anisotrópicos, desde que a frequência de rotação seja ao menos equiparável ao deslocamento por anisotropia. Assim, da mesma forma que nas amostras em solução, observa-se um único sinal, que é a média de todos os deslocamentos químicos referentes todas as possíveis orientações em relação a  $B_0$ . A velocidade de rotação mínima necessária varia de acordo com o campo magnético aplicado, quanto maior o campo maior será a velocidade de giro necessária para tornar os deslocamentos químicos isotrópicos. Por exemplo, em um equipamento de 9,4 Tesla (400 MHz), uma velocidade de giro superior a 5000 Hz é suficiente (Alberti e col., 2001 e Weybrighth e col., 1998).

Nos experimentos com giro no ângulo mágico, a amostra é contida num rotor de cerâmica, o qual é posicionado exatamente no ângulo mágico e girado ao redor do próprio eixo com auxílio de ar comprimido ou  $N_2$  gasoso (Figura 1.3).

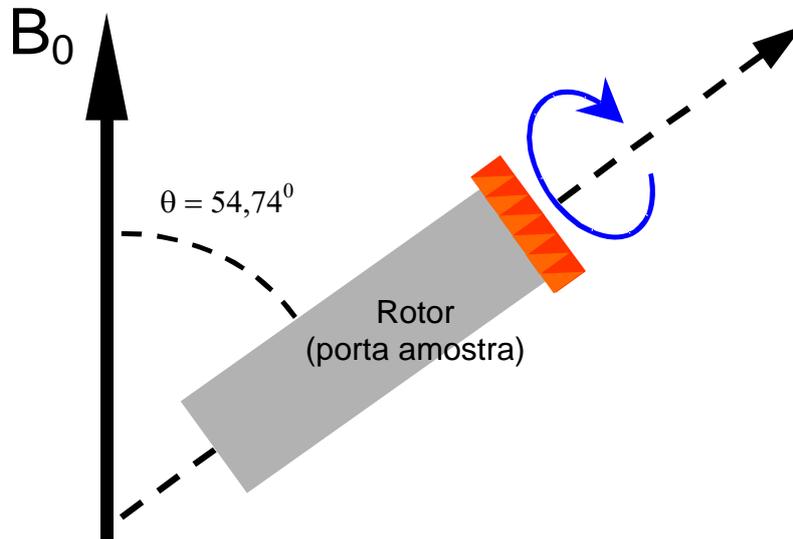


FIGURA 1.3 – Representação esquemática da amostra girando no ângulo mágico.

O efeito de alargamento dos sinais causado pelas diferenças na susceptibilidade magnética das amostras podem ser minimizadas através da fina moagem das amostras e pela disposição esférica que estas ocupam dentro do rotor (porta amostra da sonda de HR-MAS) conforme mostra a figura 1.4.

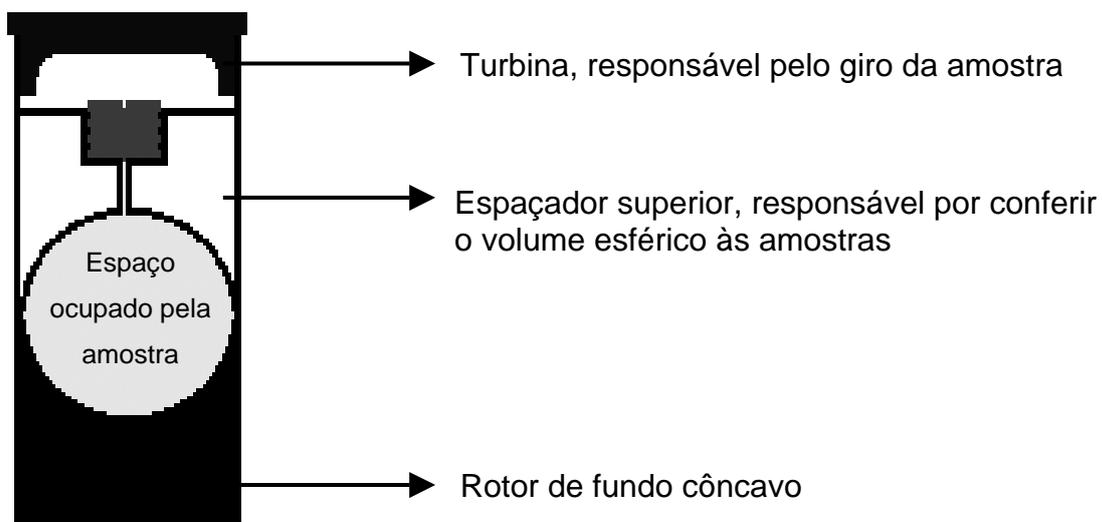


FIGURA 1.4 – Representação de um rotor (porta amostra) utilizado nas medidas de RMN HR-MAS.

Entretanto, os resultados somente são alcançados quando todas as condições são empregadas em conjunto. A simples inclinação da amostra no ângulo mágico, mas sem girar a amostra a altas velocidades não traduz nenhum efeito sobre a redução do alargamento das linhas de ressonância, como pode ser observado na figura 1.5. Porém, quando está é submetida também ao giro, o ganho na resolução dos espectros é bastante considerável (Figura 1.5) (Alberti e *col.*, 2001), assemelhando-se em muito aos de amostras em solução (Figura 1.5) (Broberg e Kenne, 2000 e Broberg e *col.*, 1998). Por este motivo, a técnica é conhecida como HR-MAS (High Resolution – Magic Angle Spinning).

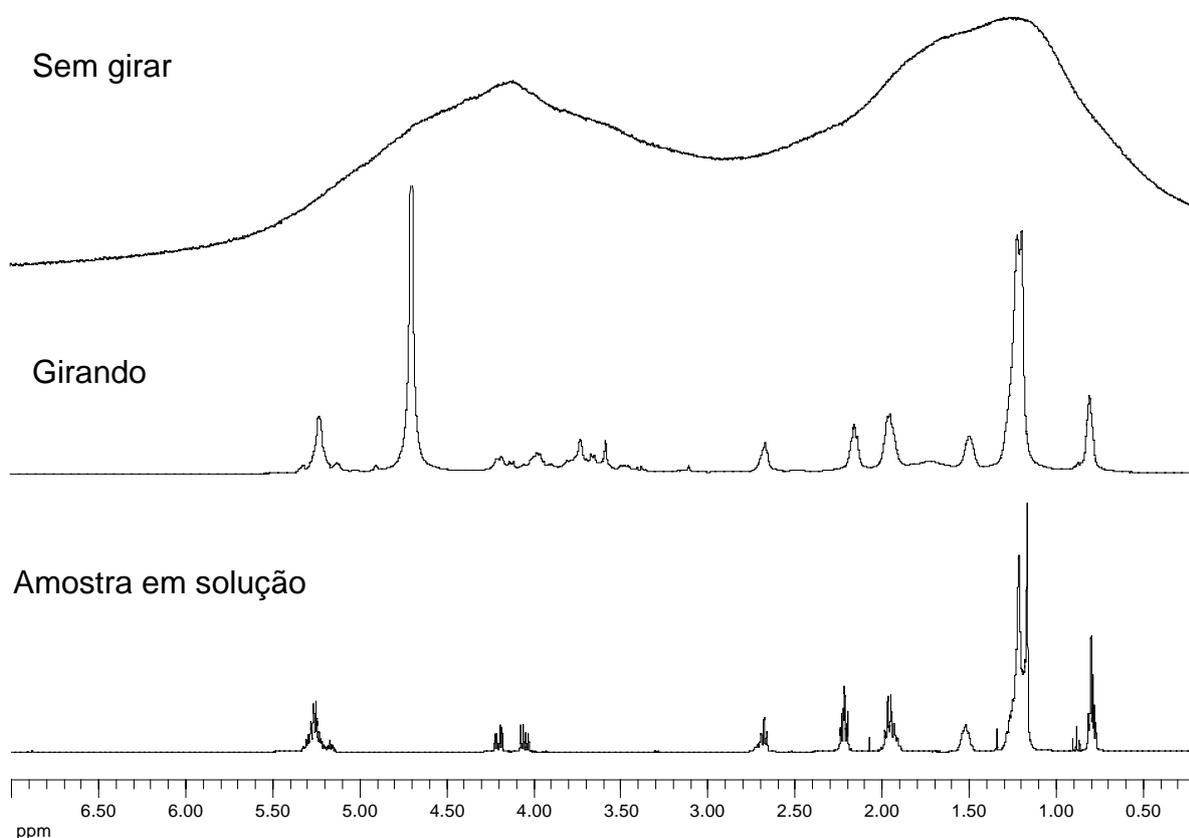


FIGURA 1.5 – Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de uma amostra de semente de soja obtidos com e sem giro no ângulo mágico, comparados a um espectro de RMN  $^1\text{H}$  obtido de uma amostra de óleo de soja em solução.

A grande vantagem da técnica de RMN HR-MAS é a possibilidade de análise direta de materiais intactos sem necessidade de nenhuma etapa de pré-tratamento de amostra, as quais consomem tempo e reagentes, além de poderem estar provocando alterações na composição química das amostras, por exemplo em

processos de extração. O principal requisito para que uma amostra seja analisada por esta técnica é que as moléculas apresentem algum grau de mobilidade, ou seja que não se apresentem em forma cristalina, consideradas como semi-sólidas. Condição já satisfeita nas amostras de tecidos animais e vegetais, (Broberg e Kenne, 2000). A técnica também é muito sensível, requerendo somente alguns miligramas de amostra e alguns minutos para se adquirir um espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Garrod e *col.*, 1998 e Broberg e *col.*, 1998), possibilitando assim detectar componentes em concentrações inferiores a um micromolar em uma mistura (Broberg e Kenne, 2000 e Broberg e *col.*, 1998). Além disso, as sondas de HR-MAS permitem o ajuste da homogeneidade do campo magnético (*shimming*), resultando em ganhos na resolução dos espectros obtidos (Garrod e *col.*, 1998). As seqüências de pulsos empregadas são as mesmas utilizadas na RMN de amostras em solução e não requer alta potência de desacoplamento ou técnicas especiais, comumente empregadas para sólidos verdadeiros (Garrod e *col.*, 1998). Estas sondas também possibilitam realizar experimentos bidimensionais, tais como COSY, HSQC e HMBC, extremamente úteis na identificação de compostos orgânicos, como tem sido demonstrado por Broberg e *col.*, (1998), Gil e *col.* (2000) e Sacco e *col.* (1998), em que possibilitou a identificação de uma grande quantidade de compostos em diferentes materiais *in natura* sem quaisquer processos de extração e/ou purificação. Métodos de análise direta que dispensam a necessidade de isolamento dos componentes são muito desejáveis, e por esta razão o interesse da aplicação técnica de RMN HR-MAS é crescente (Eads e Bryant, 1986; Belton e *col.*, 1996 e 1997).

Sacco e *col.*, 1988 iniciaram o emprego da técnica em alimentos ao adquirir espectros de RMN de  $^1\text{H}$  diretamente de amostras de farinha de trigo, bem como a verificação das variações na quantidade de proteínas, ocorridas no grão durante o seu armazenamento (Gil e *col.*, 1997). Vários outros exemplos na literatura ilustram o emprego da técnica de RMN HR-MAS na análise de alimentos. Entre eles podemos destacar: a caracterização da composição química de algumas frutas (Ni e Eads, 1992 e 1993a); o acompanhamento da variação metabólica durante o amadurecimento de frutas como banana (Ni e Eads, 1993b) e manga (Gil e *col.*, 2000) com uma grande quantidade de compostos identificados nos espectros pela análise direta de amostras intactas da fruta; estudos da germinação de

sementes de coníferas através de espectros obtidos diretamente das sementes (Sayer e Preston, 1996).

Além de amostras de alimentos, a espectroscopia de RMN HR-MAS tem sido utilizada para investigar a composição metabólica de componentes de baixa massa molecular em algas vermelhas em que foi detectado alterações na composição de acordo com as variações de seu cultivo (Broberg e *col.*, 1998 e Broberg e Kenne 2000) e em estudos dos componentes da parede celular de leveduras (Krainer e *col.*, 1994). No entanto, apesar do crescente número de publicações, o emprego da RMN HR-MAS na exploração de amostras vegetais é ainda um tanto tímido. Por outro lado, tem sido extensivamente utilizada na análise de tecidos animais, principalmente na identificação de tumores malignos, (Moka e *col.*, 1997; Cheng e *col.*, 1996). Por exemplo, a classificação de liposarcoma humano e lipoma (tecidos tumorais malignos) tem sido possível através de diferenças espectrais observadas nos espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  obtidos de tecidos *ex vivo*, demonstrando que a técnica pode ser utilizada no prognóstico de doenças (Millis e *col.*, 1999 e Middleton e *col.*, 1998).

Demonstrasse assim, o grande potencial de aplicações da técnica de RMN HR-MAS.

### 1.2.2 – A seqüência de pulsos CPMG

Mesmo girando-se a altas velocidades no ângulo mágico, os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de amostras de tecidos vegetais ou animais apresentam freqüentemente sinais alargados. Estes sinais são provenientes de moléculas de alta massa molecular, tais como os componentes das membranas da parede celular. Devido ao fato destes componentes serem rígidos, ou seja, apresentem baixa mobilidade molecular, também possuem  $T_2$  curto, ocasionando o alargamento dos seus sinais, que por sua vez causam a sobreposição de outros sinais, como o das moléculas de baixa massa molecular, dificultando a interpretação dos dados. Além disso, contribuem para diminuir a quantidade de informações contidas nos espectros, prejudicando assim as análises quimiométricas (Brereton, 2002).

Por outro lado, Carr, Purcell, Meiboom e Gill desenvolveram uma seqüência de pulsos que se aproveita do  $T_2$  curto de moléculas de alta massa

molecular em relação às de baixa massa molecular, para eliminar os sinais alargados destas moléculas dos espectros (Claridge, 1999; Broberg e col., 1998). Esta seqüência, conhecida como CPMG ou filtro de  $T_2$ , faz com que após a transferência da magnetização para o plano  $xy$ , pela aplicação inicial de um pulso de  $90^\circ$  na direção  $x$ , esta seja mantida neste plano através da aplicação de sucessivos pulsos de  $180^\circ$  na direção  $y$ . Nesta etapa, um curto período de tempo ( $\tau$ ) é permitido entre os pulsos de  $180^\circ$ , o qual é ajustado para permitir que ocorra a relaxação transversal principalmente de moléculas com  $T_2$  curto (Figura 1.6). Desta forma, os sinais referentes às macromoléculas não são observados devido a perda de coerência dos vetores magnetização destas no plano  $xy$  (Figura 1.7). O mesmo ocorre com o vetor magnetização das moléculas de baixa massa molecular (com  $T_2$  longo), porém em uma proporção muito menor (Claridge, 1999; Sacco e col., 1998) (Figura 1.7).

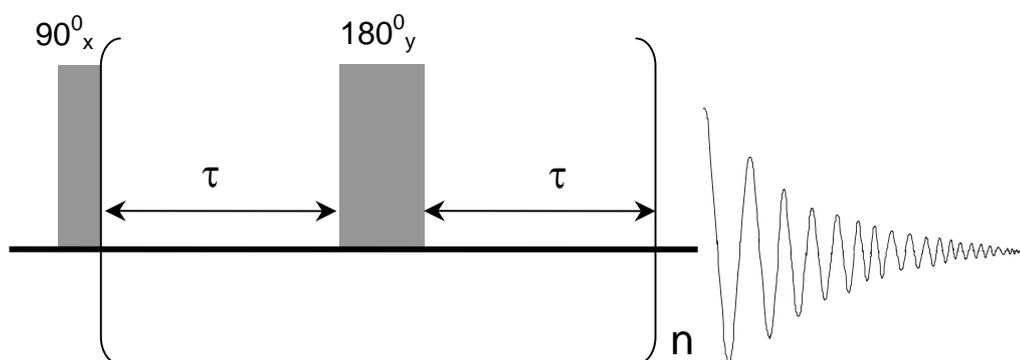
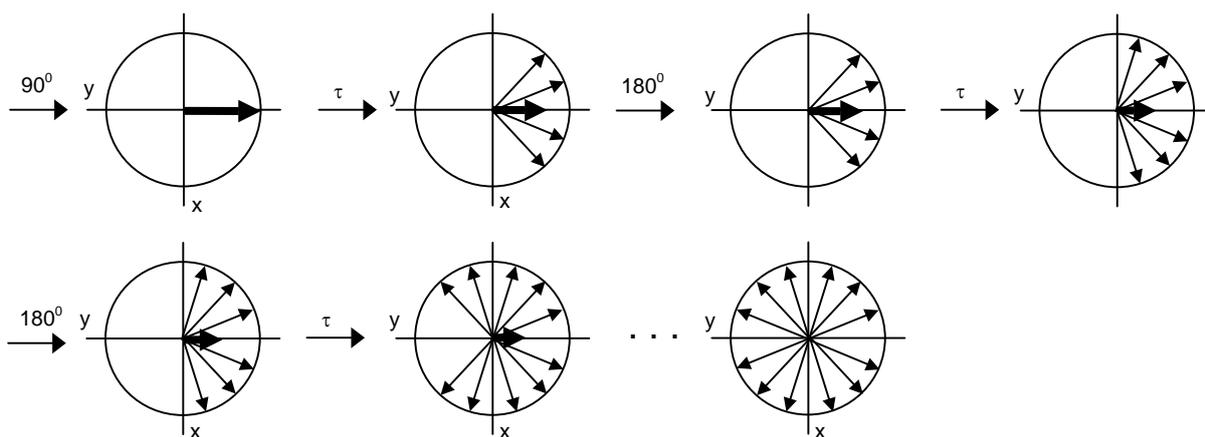


FIGURA 1.6 – Representação da seqüência de pulsos CPMG (Filtro de  $T_2$ ). Em que  $n$  significa o número de repetições e  $\tau$  o tempo de espera entre os pulsos de  $180^\circ$ .

A figura 1.8 mostra um exemplo prático do emprego da seqüência de pulsos CPMG em uma amostra proveniente de um produto natural, demonstrando a utilidade desta seqüência no estudo de amostras intactas, como sementes e tecidos vegetais, entre outras.

Para macromoléculas



Para micromoléculas

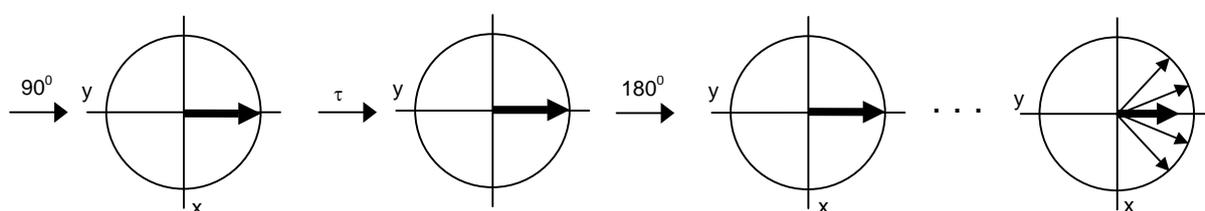


FIGURA 1.7 – Representação da relaxação transversal ocorrida durante a aplicação da seqüência de pulsos CPMG.

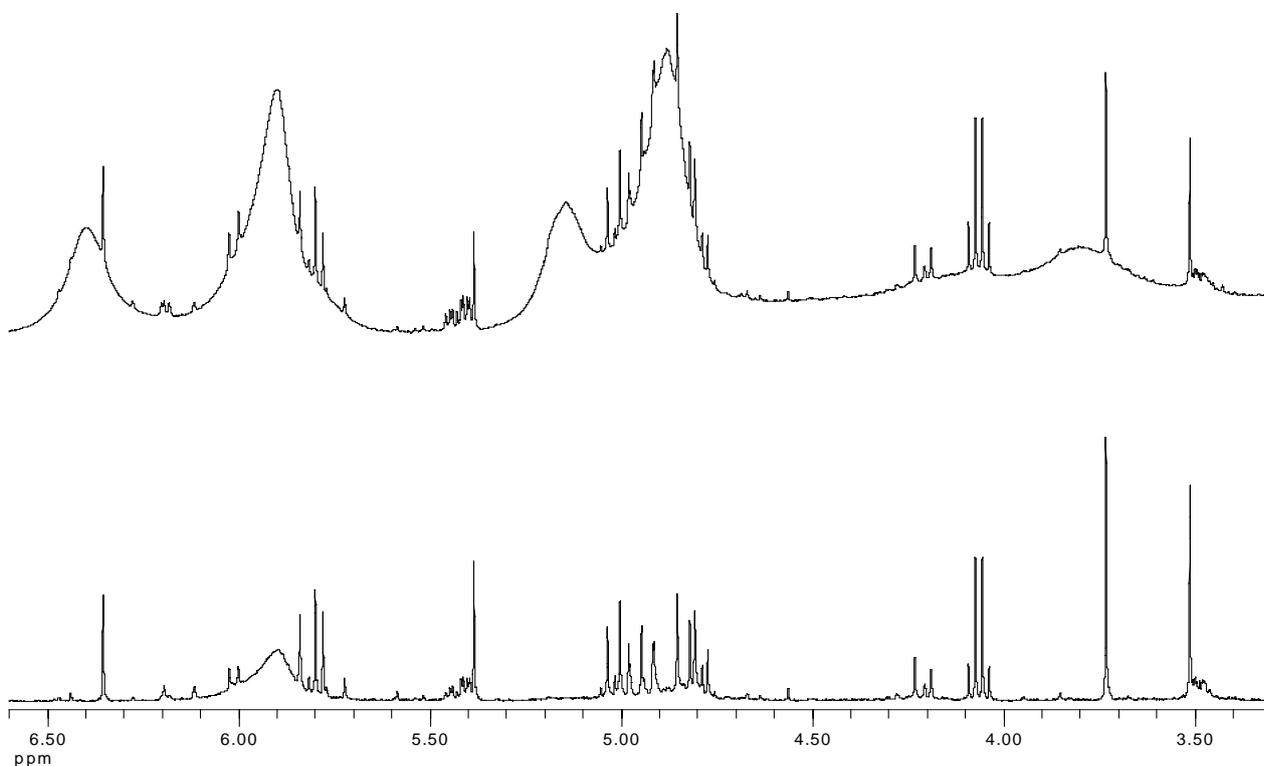


FIGURA 1.8 – Comparação entre espectros de RMN de  $^1\text{H}$  adquiridos com a seqüência zg (Superior) e CPMG (Inferior) para uma amostra em solução de produto natural, gentilmente cedida por F. R. Campos.

### 1.3 – Análises quimiométricas

Em espectros de RMN obtidos de amostras com alto grau de semelhança, a simples análise visual não permite extrair informações relevantes, uma vez que as diferenças são muito sutis. Isso pode ser observado na comparação de espectros de RMN de  $^1\text{H}$  obtidos de amostras de grãos de soja, provenientes de diferentes regiões (Figura 1.9). Sendo assim, são necessárias metodologias adequadas que permitem a análise e extração das informações químicas relevantes.

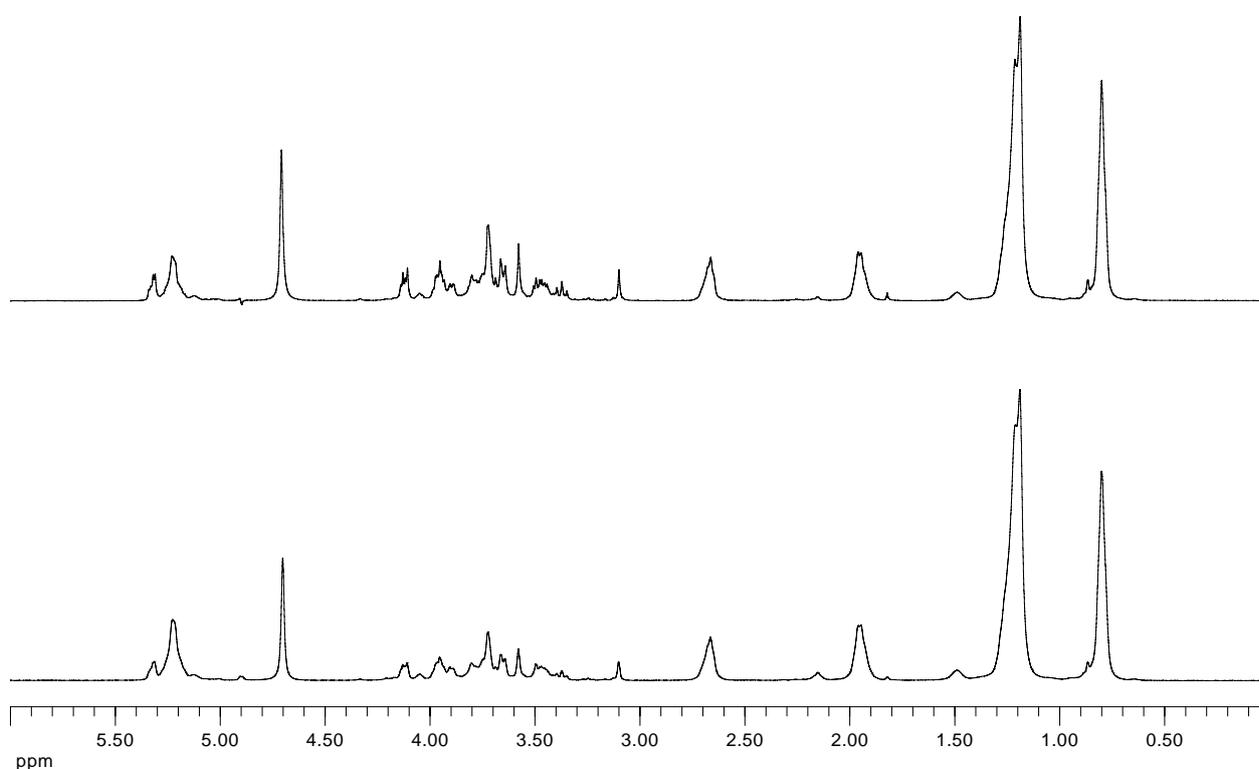


FIGURA 1.9 – Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  obtidos de amostras de soja de diferentes regiões produtoras.

Ao encontro desta necessidade, quimiometria é uma ferramenta estatístico-matemática valiosa, que em combinação com diferentes métodos químicos, possibilita a análise de um grande número de variáveis em uma única amostra (Brereton, 2002; Beebe e *col.*, 1998). Assim a quimiometria é uma ferramenta que vem atuando nas interfaces da ciência fazendo uma ligação entre a química e outras áreas como a matemática e a estatística (Figura 1.10).

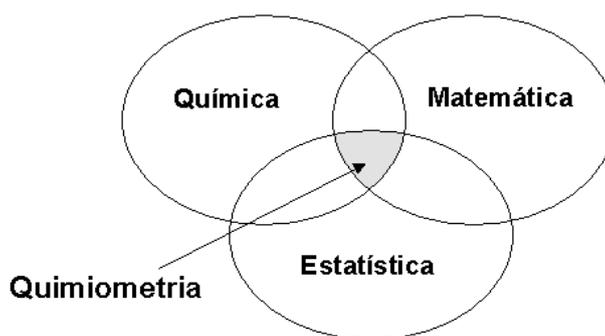


FIGURA 1.10 – Representação da atuação da quimiometria nas interfaces das áreas da ciência.

Neste contexto, os dados obtidos através da RMN, são muito atrativos para as análises quimiométricas, devido a grande quantidade de informações contida nestes, por exemplo em um único espectro de RMN de  $^1\text{H}$ . Dispensando assim, a necessidade de outras medidas analíticas para aumentar a quantidade de informações a respeito do sistema em estudo. Em resumo, a grande vantagem da união entre quimiometria e a RMN, deve-se ao fato de uma ser uma poderosa ferramenta de análise de dados complexos, enquanto que a outra possibilita a obtenção de um grande número de informações (variáveis) em uma única medida, de uma forma simples e rápida. Por esta razão, estudos envolvendo a aplicação em conjunto destas ferramentas vem aumentando significativamente.

Entre os métodos quimiométricos de análise de grande utilidade, empregados no desenvolvimento deste trabalho, podemos destacar a análise exploratória dos dados e a classificação de amostras.

### 1.3.1 – Análise exploratória dos dados

A análise exploratória dos dados destina-se a agrupar as amostras com características semelhantes e distingui-las das demais, que por sua vez poderão vir a formar outro grupo. Nesta, também é possível verificar a presença de amostras anômalas, ou que não seguem o mesmo comportamento das demais. Nas análises exploratórias multivariadas, todos os dados obtidos sobre as amostras em questão são organizados em uma única planilha, a qual é construída por  $n$  amostras e  $i$  variáveis, resultando em uma matriz  $n \times i$ . Desta forma, em um conjunto de dados formado por espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , por exemplo, as amostras são os próprios

espectros e as variáveis são os deslocamentos químicos dos sinais nos espectros (Figura 1.11) (Brescia e col., 2002b; Manual do AMIX 2004).

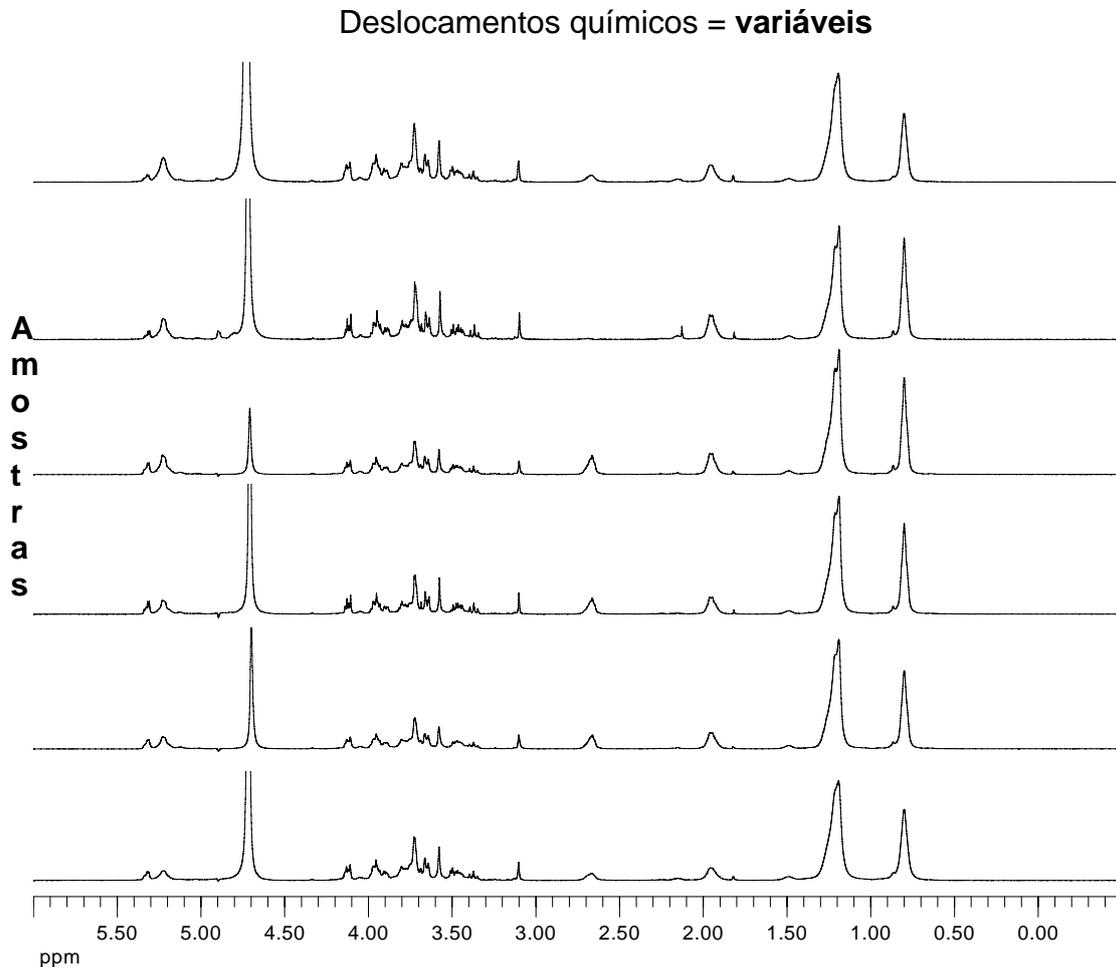


FIGURA 1.11 – Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  referentes a várias amostras, em que, os deslocamentos químicos destes e seus respectivos valores das intensidades serão utilizados para a construção de uma matriz de dados.

As análises exploratórias podem ser realizadas através da análise por agrupamento hierárquico (HCA: Hierarchical Cluster Analysis) e/ou através da análise por componentes principais (PCA: Principal Component Analysis). Ambas as técnicas são baseadas na suposição de que quanto mais semelhantes forem as amostras entre si, mais próximas estas estarão em um espaço multidimensional (Beebe e col., 1998).

Nas análises por agrupamentos hierárquicos os dados são apresentados de forma que se enfatize o agrupamento natural, o qual pode ser obtido considerando-se as amostras ou as variáveis. O agrupamento de amostras, revela as similaridades existentes entre as mesmas, enquanto que o agrupamento

das variáveis localiza as relações entre estas. Os resultados são apresentados sob a forma de dendogramas, em que pode ser observado o grau de similaridade existente, facilitando o reconhecimento de grupos. Quanto mais próximas as amostras forem conectadas, maior é a semelhança entre as mesmas (Beebe e *col.*, 1998) (Figura 1.12 A).

A análise por componentes principais consiste em um método não supervisionado de análise multivariada dos dados, freqüentemente empregada na análise de dados espectroscópicos para auxiliar na observação de tendências ou fenômenos não perceptíveis por simples observações (Alam e Alam, 2001; Brescia e *col.*, 2002b). O gráfico de PCA, resulta da construção de um conjunto de novos vetores, ortogonais entre si, chamados de componentes principais. Estes novos componentes, são combinações lineares das variáveis originais, construídos em ordem decrescente de variância, e portanto, de quantidade de informação, resultantes do agrupamento das variáveis altamente correlacionadas. Sendo assim, as análises por componentes principais reduzem a dimensionalidade do conjunto de dados original, de forma que as informações mais relevantes ficam concentradas nas primeiras componentes e as de menor importância nas últimas. Desta forma, as primeiras componentes são suficientes para descrever o sistema e extrair suas informações (Kowalski e Bender, 1972a; Alam e Alam, 2001; Beebe e *col.*, 1998; Brescia e *col.*, 2002a; Brescia e *col.*, 2002b; Brereton, 2002). A análise por PCA, assim como por HCA, é uma poderosa ferramenta de visualização, em que os resultados são mostrados na forma de gráficos planares ou tridimensionais, conhecidos como gráficos de escores em que as amostras são projetadas, sendo possível verificar o agrupamento das que são semelhantes entre si e ainda a discriminação em classes (Manual do AMIX 2004; Beebe e *col.*, 1998; Brereton, 2002; Sacco e *col.*, 1998) (Figura 1.12 B).

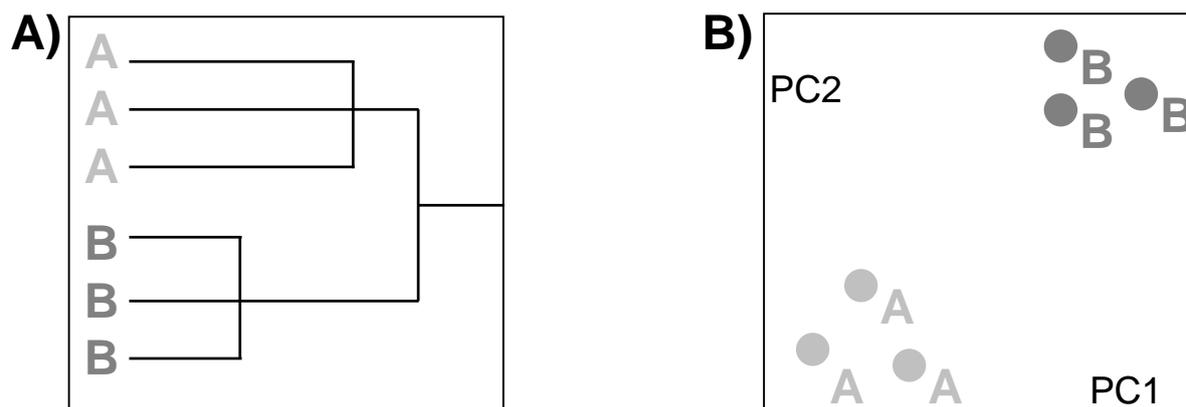


FIGURA 1.12 – Representação esquemática das formas de visualização dos resultados de análises exploratória de dados através da análise por agrupamento hierárquico (A) e por componentes principais (B).

Análises quimiométricas tem sido amplamente utilizadas na exploração de dados obtidos pela RMN, havendo muitas publicações na literatura, sobre os mais variados temas. Neste contexto, tem sido possível discriminar amostras de azeites de oliva (Zamora e *col.*, 2002; Shaw e *col.*, 1997; Sacchi e *col.*, 1996; Le Gall e *col.*, 2001; Vlahov e *col.* 2003; Mannina e *col.*, 2001), sucos (Belton e *col.*, 1998), farinhas de trigo (Brescia e *col.* 2002a; Sacco e *col.*, 1998), uvas (Forveille e *col.*, 1996) e vinhos (Brescia e *col.*, 2002b) de acordo com a origem geográfica e/ou variedade, bem como entre ecotipos (Ward e *col.*, 2003). Outros exemplos ressaltam a discriminação entre tipos de cervejas (Duarte e *col.*, 2002 e 2004; Spraul e *col.* 2005) e cafés (Charlton e *col.*, 2002). Plantas submetidas a diferentes condições de cultivo, também foram discriminadas pela aplicação de métodos quimiométricos de análises a espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , obtidos de extratos destas (Bailey e *col.*, 2003). Demonstrando assim, que a RMN aliada a quimiometria é uma importante ferramenta no controle de qualidade e autenticação destes produtos.

### 1.3.1.1 – Análise dos gráficos de influências

Quando é observada a distinção entre conjuntos de amostras nas análises por componentes principais, é possível verificar quais foram as variáveis que mais influenciaram para que ocorresse uma dada discriminação. Esta

informação é obtida através da análise dos gráficos de pesos (*loadings*) ou influências, o qual é obtido em conjunto com os gráficos de escores, e tem por objetivo explicar o resultado destes (Vogels e *col.*, 1996; Beebe e *col.*, 1998; Brereton, 2002; Brescia e *col.*, 2002a; Brescia e *col.*, 2002b; Manual do AMIX 2004; Manetti e *col.*, 2004). Portanto, em uma discriminação obtida a partir de espectros RMN, a análise dos gráficos de influências permitem revelar quais foram os sinais que mais influenciaram para que ocorresse a discriminação e, conseqüentemente, inferir as substâncias que caracterizam um ou outro conjunto de amostras, seja simplesmente por variações na concentração ou pela presença ou ausência de compostos (Manual do AMIX 2004; Sumner e *col.*, 2003; Brescia e *col.*, 2002a; Brescia e *col.*, 2002b; Manetti e *col.*, 2004).

Neste sentido, Duarte e *col.* (2002) demonstraram que os tipos de cerveja Ale e Lager diferem principalmente na composição química aromática. Além disso, os autores conseguiram identificar que os principais sinais, responsáveis pela distinção entre os tipos de cervejas eram dois sinais alargados em  $\delta$  6,80 e 7,50 ppm, observados nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ . Na discriminação de vinhos de acordo as regiões produtoras da Itália, Brescia e *col.* (2002a) observaram que os sinais em  $\delta$  2,37 e 2,03 ppm eram os responsáveis por discriminar as amostras provenientes da região norte das demais e que o sinal em  $\delta$  2,37 ppm, em uma segunda componente principal era o responsável por distinguir as amostras originárias da região central das demais regiões. Em outro trabalho, Le Gall e *col.* (2001) identificaram os compostos marcadores que caracterizam sucos de laranja originais ou adulterações. A análise dos gráficos de influências revelou que o suco original possui um teor menor de ácido cítrico em relação a polpa lavada, enquanto que esta apresenta um teor maior de dimetilprolina, entre outras observações. Belton e *col.* (1998) demonstraram que os níveis de ácido málico e sucrose são as variáveis mais importantes na caracterização da variedade utilizada em sucos de maçãs. Ward e *col.* (2003) detectaram a presença de altas concentrações de monossacarídeos, tais como glucose, manose, frutose e galactose em apenas um dos ecotipos de *Arabidopsis thaliana* estudados. Charlton e *col.* (2002) identificaram o 5-(hidroximetil)-2-furaldeído como o marcador químico que distingue cafés de diferentes produtores.

Ainda neste contexto, Manetti e *col.* (2004) em estudos metabolômicos, determinaram os metabólitos discriminantes entre espécimens geneticamente

modificados (GM) e convencionais (CV) de milho. Em um estudo semelhante, Le Gall e *col.* (2003) conseguiram determinar as diferenças na composição metabólica, quando compararam tomates GM e CV, cultivados sob as mesmas condições, assim como entre espécimens GM e selvagens de tabaco (Choi, e *col.*, 2004).

A tecnologia descrita nestes estudos demonstra que a RMN aliada a quimiometria pode com sucesso detectar pequenas diferenças entre espécimens, e portanto, representa uma ferramenta de grande potencial para detectar os efeitos não esperados em culturas geneticamente modificadas, e com isso, avaliar as conseqüências resultantes das modificações genéticas em termos da composição metabólica. A metodologia utilizada é relativamente simples, eficiente e pode ser aplicada na determinação da equivalência substancial de OGMs.

### **1.3.2 – Classificação de amostras ou reconhecimento de padrões**

Uma vez realizada uma análise exploratória, o resultado obtido pode ser utilizado na construção de modelos de classificação, os quais poderão ser empregados para prever a origem de amostras desconhecidas (Holmes e *col.*, 1994; Beebe e *col.*, 1998; Manual do Amix 2004; Kowalski e Bender, 1972a; Brescia e *col.* 2002a).

Há dois métodos de classificação comumente utilizados, o método SIMCA (Soft Independent Modelling of Class Analogy) e o método KNN (K-Nearest Neighbor). É interessante destacar aqui, que este último foi introduzido por Kowalski e Bender (1972b), aplicando-o justamente em dados de RMN.

No método SIMCA, o conjunto de dados de propriedades conhecidas (conjunto de treinamento) é submetido a uma análise por componentes principais para se obter as amostras agrupadas em classes. Em torno de cada classe de amostras são geradas hipercaixas, em que os limites são definidos para o nível de confiança desejado (Figura 1.13). A classificação da amostra desconhecida é realizada pela projeção desta no espaço dos escores e a verificação do alojamento desta dentro dos limites das hipercaixas (Figura 1.13). Por outro lado, se amostra desconhecida não for referente a nenhuma das classes do modelo, está não será classificada em nenhuma das classes (Figura 1.13), o que pode ser uma vantagem, quando pouco se conhece sobre a amostra. No entanto, se o modelo não tiver poder

de discriminação suficiente a amostra poderá ser classificada como pertencente a mais de uma classe (Beebe e *col.*, 1998; Manual do AMIX 2004).

Quando utiliza-se o método KNN, a classificação da amostra problema a uma determinada classe é feita considerando-se a distância desta em relação às amostras de uma determinada classe que estiver mais próxima (Kowalski e Bender, 1972b; Beebe e *col.*, 1998) (Figura 1.13). Este método portanto, obrigatoriamente classifica as amostras desconhecidas como pertencentes a uma ou a outra classe, sendo útil quando sabe-se, a princípio, que a amostra pertence a uma das classes do modelo (Kowalski e Bender, 1972b; Beebe e *col.*, 1998). Sendo assim, na figura 1.13, utilizando-se o método KNN, a amostra desconhecida 1 foi classificada como sendo pertencente a classe A, devido a distância desta com as amostras da classe A serem menores que as da classe B. O inverso, ocorre com a amostra problema 2, a qual foi classificada como pertencente a classe B. Enquanto que, pelo método SIMCA a amostra de origem desconhecida 1 foi classificada como pertencente a classe A e a amostra desconhecida 2 não foi classificada em nenhuma das classes.

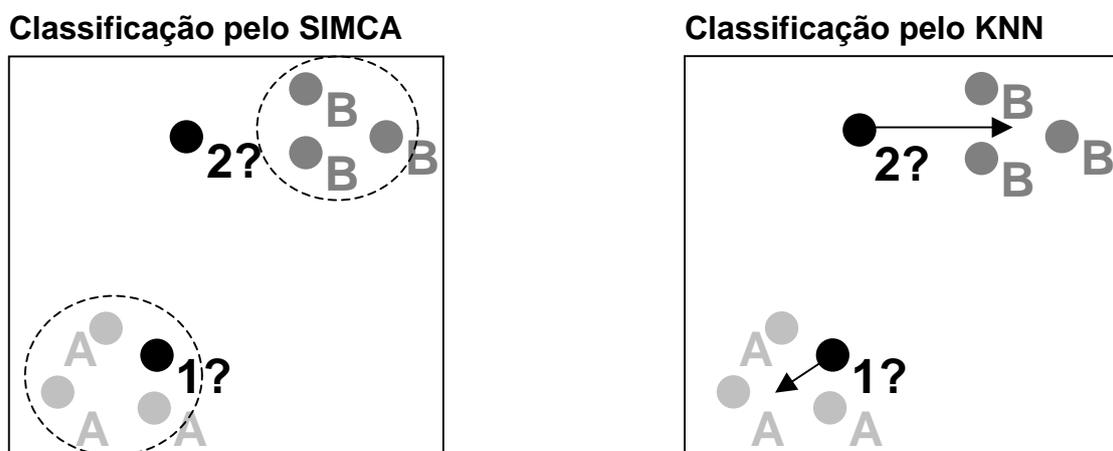


FIGURA 1.13 – Representação esquemática dos métodos de classificação SIMCA e KNN.

O emprego dos métodos de classificação a partir de modelos construídos com dados de RMN tem sido demonstrado na determinação da origem geográfica de amostras de vinhos tintos (Brescia e *col.* 2002b), azeites de oliva (Vlahov e *col.*, 2003; Zamora e *col.* 2002), cafés (Charlton e *col.*, 2002) e na predição da variedade e origem geográfica de azeites de oliva (Shaw e *col.* 1997). Outros exemplos enfocam a verificação de adulterações em sucos de laranja (Le

Gall e *col.*, 2001; Vogels e *col.*, 1996) e azeites de oliva, pela mistura com outros óleos de menor valor comercial (Fauhl e *col.*, 2000; Mavromoustakos e *col.*, 2000; Vigli e *col.*, 2003). Entre estas aplicações devemos dar especial destaque ao trabalho de Manetti e *col.* (2004) no qual puderam classificar amostras de sementes de milho em espécimens GM e CV. Também aos trabalhos realizados por Sacco e *col.* (1998) e por Brescia e *col.* (2002a) na determinação da origem geográfica de amostras de farinha de trigo, pela utilização da técnica de HR-MAS na aquisição de espectros de RMN de  $^1\text{H}$  diretamente das amostras intactas.

Demostrasse assim, a viabilidade do emprego de análises quimiométricas em dados de RMN para a predição da origem de amostras desconhecidas, principalmente no controle de qualidade de alimentos.

#### **1.4 – Detecção de organismos geneticamente modificados**

Desde os primeiros organismos geneticamente modificados (OGMs), técnicas de engenharia genética tem sido desenvolvidas e, como conseqüência, muitos genes tem sido introduzidos em plantas, obtendo-se um número cada vez maior de OGMs e com as mais variadas características. Isto tem sido comprovado pelo significativo aumento da área de cultivo com OGMs nos últimos anos (Yang e *col.*, 2005).

Por outro lado, o consumo de alimentos provenientes de OGMs tem provocado discussões em todo o mundo, sobre a segurança alimentar destes. Na comunidade Européia, a origem, qualidade e autenticidade dos produtos alimentícios tem sido considerados muito importantes (Peano e *col.*, 2004; Brescia e *col.*, 2002b; Sacco e *col.*, 1998; Entransfood, 2005; Miraglia e *col.*, 2004). Muitos países, estão implementando regulamentações para o uso e rotulagem de OGMs e de produtos que contenham ingredientes derivados destes (Miraglia e *col.*, 2004). No Brasil, a legislação sobre o uso de OGMs, inclusive em pesquisas científicas, cabe à Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) criada pela Lei de biossegurança, aprovada em 1995 (CTNBio, 2004). Além disso, os próprios consumidores finais estão cada vez mais preocupados em saber a origem do que estão adquirindo, uma vez que esta é tida como uma garantia adicional de qualidade (Yang e *col.* 2005; James e *col.*, 2003; Peano e *col.*, 2004; Brescia e *col.*, 2002a).

Consequentemente, metodologias analíticas práticas, confiáveis e precisas para a identificação de OGMs, desde as culturas agrícolas até os produtos industrializados, são requeridas. Neste sentido, um grande número de métodos analíticos para a detecção de OGMs, tem sido descritos (Rott, e *col.*, 2004; Miraglia e *col.*, 2004), inclusive para a detecção da soja RR (Rott, e *col.*, 2004; James e *col.*, 2003; Vaitilingom e *col.*, 1999; Lipp e *col.*, 2001; Vollenhofer e *col.*, 1999; Funguetto e *col.*, 2004; Bevilaqua e *col.*, 2000; Lilge e *col.*, 2003; Tillmann e West 2004)

Os OGMs e os produtos derivados destes, possuem características adicionais resultantes do(s) gene(s) introduzido(s), e portanto, podem ser identificados pela presença ou ausência do gene introduzido ou pela detecção de nova(s) proteína(s) codificadas por este(s) (Peano e *col.*, 2004; James e *col.*, 2003; Rho e *col.*, 2004) ou ainda por alterações na composição metabólica (Le Gall e *col.*, 2003). Por esta razão a maioria dos métodos desenvolvidos para a discriminação é feita com base na análise direta do DNA, através de métodos de PCR (Polymerase Chain Reaction) (James e *col.*, 2003; Yang e *col.*, 2005; Rho e *col.*, 2004; Jaccaud e *col.*, 2003; Vollenhofer e *col.*, 1999; Rott e *col.*, 2004; James e *col.*, 2003; Hurst e *col.*, 1999) ou pela detecção da presença enzima CP4 EPSPS (CropBiotech, 2003; Lipp e *col.*, 2001; van Duijn e *col.*, 1999 apud Rott e *col.*, 2004). No entanto, a detecção é realizada através de técnicas específicas, direcionadas aos transgenes. Assim, os métodos de PCR são específicos para cada modificação genética e, portanto, dependem do conhecimento prévio das possíveis modificações genéticas existentes em um determinado OGM. Entretanto, a maioria dos OGMs possuem os mesmos elementos controles, o promotor 35S e/ou o terminador NOS, sendo que, o conjunto de *primers* direcionados a estes nas reações de PCR podem ser utilizados para a detecção de qualquer OGM que possua um dos elementos controles (James e *col.*, 2003). No entanto, estão surgindo diversificações destes, e sendo assim, os métodos de PCR para a detecção de OGMs, estão se tornando restritos ao prévio conhecimento seja dos elementos controles e/ou dos transgenes.

Desta forma, métodos capazes de reconhecer OGMs independentes do tipo da modificação são desejáveis. Neste sentido, métodos que utilizam a espectroscopia de RMN tradicional (RMN de líquidos) aliados a métodos quimiométricos de análises tem sido descritos. Por exemplo, Manetti e *col.* (2004) foram capazes de identificar e classificar sementes de milho originados de plantas GM de acordo com a modificação genética, através de análises multivariadas dos

espectros de RMN de  $^1\text{H}$ . Da mesma forma, espécies GM de tabaco (Choi e *col.*, 2004) e de tomate (Le Gall e *col.*, 2003) foram discriminadas de suas respectivas espécies CV, sem a necessidade da atribuição dos sinais nos espectros de RMN. Já a utilização da técnica de RMN de alta resolução com giro no ângulo mágico (HR-MAS), na detecção de OGMs, ainda não tem sido descrita na literatura.

## **1.5 – Avaliação dos organismos geneticamente modificados (OGMs)**

O desenvolvimento de organismos geneticamente modificados (OGMs) tem o potencial de oferecer benefícios na qualidade nutricional dos produtos agrícolas utilizados para o consumo humano e animal, bem como aumentar a produtividade e diminuir os custos de produção (Le Gall e *col.*, 2003; Conner e Jacobs, 1999). No entanto, os benefícios da engenharia genética tem sido questionados sob diversos aspectos, principalmente em relação a segurança dos produtos oriundos destes novos organismos. Discussões tem sido levantadas sobre os possíveis riscos associados ao acúmulo de novos metabólitos, que as plantas geneticamente modificadas possam vir a produzir, tais como, toxinas e/ou compostos alérgicos. Alterações nas concentrações e/ou o surgimento de novos constituintes químicos nos OGMs e seus derivados podem estar associados às alterações nas rotas biossintéticas, ocasionadas pelas modificações genéticas (Conner e Jacobs, 1999; König e *col.*, 2004). Portanto, para garantir que os alimentos provenientes de OGMs sejam considerados seguros, estes devem ser submetidos a determinação da equivalência substancial, com o objetivo de verificar as conseqüências metabólicas resultantes do novo caminho biossintético (Rota alternativa) em relação a seus respectivos espécimens convencionais dos quais foram originados (Choi e *col.*, 2004; König e *col.*, 2004; Entransfood, 2005; Cellini e *col.*, 2004).

### **1.5.1 – Determinação da equivalência substancial dos OGMs**

Qualquer alimento é considerado seguro se nenhum efeito indesejado é notado pelo seu consumo. Assim, o princípio da equivalência substancial assume

que os alimentos convencionais, aqueles tradicionalmente cultivados, são considerados seguros pelo seu histórico de uso ao longo dos anos, e portanto, servem de referência na avaliação dos OGMs. No entanto, a determinação da equivalência substancial não é uma garantia absoluta de segurança, mas um indicativo das potenciais diferenças entre o organismo CV e o novo espécimen GM.

Além disso, as modificações genéticas podem causar efeitos não esperados, que não foram o propósito da modificação genética. Geralmente é impossível prever todas as alterações e as conseqüências da inserção de um gene exógeno em um organismo que não o possuía, devido a grande complexidade das interações metabólicas existentes nos organismos. Portanto, a avaliação de OGMS não pode se dar pela procura de compostos específicos, sendo necessário a aplicação de metodologias capazes de obter o perfil metabólico do novo espécimen com o objetivo de estabelecer *fingerprintings* para comparação com o organismo convencional (Entransfood, 2004; Cellini e col., 2004). As diferenças metabólicas, quando encontradas, são então investigadas com relação a seus impactos no consumo humano (por exemplo a toxicidade) e ao ambiente (Kuiper e col., 2001 e 2002; Kleter, 2002; König e col., 2004; Cellini e col, 2004). Neste sentido, o termo metabolômico está sendo empregado para descrever a comparação de perfis metabólicos (*fingerprintings*) de vegetais e microrganismos, fornecendo informações quantitativas e qualitativas em misturas complexas. Em outra vertente, o termo metabonômico tem sido utilizado para a comparação de perfis metabólicos em estudos com animais (Manetti e col., 2004; Ott e col., 2003; Sumner e col., 2003; Nicholson e Winlson, 1989). No entanto, não há um consenso na literatura sobre a utilização correta dos termos, apenas uma tendência na utilização do termo metabolômico.

Entre os métodos analíticos com potencial de atuar nos estudos metabolômicos destacam-se técnicas como: a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE); a Cromatografia Gasosa (CG), a Espectrômetria de Massas (EM) e a espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Porém, devido a alta complexidade e diversidade química de tais estudos, uma única técnica não é capaz de fornecer suficientes informações. Este problema vem sendo contornado pela hifenação entre estas técnicas (Sumner e col., 2003; Hall e col., 2002; Noteborn e col., 2000; Cellini e col, 2004).

A RMN apresenta a vantagem de possibilitar a detecção simultânea de todos os constituintes químicos (orgânicos) presentes em uma amostra. Por exemplo, um único espectro de RMN de hidrogênio, fornecendo informações qualitativas e quantitativas. Além disso, é uma ferramenta versátil, reproduzível e que necessita somente de procedimentos simples no preparo de amostra. A técnica pode ser usada para a rápida obtenção de *fingerprintings* para determinar e caracterizar as diferenças na composição química de amostras vegetais. Por outro lado, a RMN possui algumas desvantagens, como a baixa sensibilidade em relação às outras técnicas, não permitindo a detecção de componentes em baixa concentração e a grande sobreposição de sinais nos espectros, principalmente de  $^1\text{H}$ , agravado ainda mais no caso de extratos brutos e amostras *in natura* (Gavaghan e col., 2000; Le Gall e col., 2003; Manetti e col., 2004; Ward e col., 2003; Sumner e col., 2003; Cellini e col., 2004). A resolução espectral pode ser melhorada com a utilização de equipamentos de alto campo magnético, enquanto que, a sensibilidade pode ser aumentada também com o emprego de campos mais intensos e/ou com o uso de criosondas na aquisição das medidas (Kovacs e col., 2003; Spraul e Steffan, 2000). Neste contexto, Sumner e col. (2003) fizeram uma revisão dos métodos empregados nas determinações metabômicas, destacando-se as vantagens e desvantagens de cada técnica e da necessidade do emprego de métodos quimiométricos para auxiliar na interpretação dos dados. Uma interessante observação levantada nesta revisão com relação a RMN é que apesar de ser uma técnica de baixa sensibilidade é a mais versátil, devido a possibilidade de se ter uma visão geral em apenas uma única medida. Estes autores fazem uma excelente comparação com um *iceberg*, no qual a RMN é capaz de observar somente a ponta do mesmo (Figura 1.14), porém de fundamental importância para guiar subsequentes estudos a serem realizados por outras técnicas para um completo entendimento do sistema em questão. Apesar disso, ainda não há relatos na literatura do emprego da técnica de RMN HR-MAS com esta finalidade.

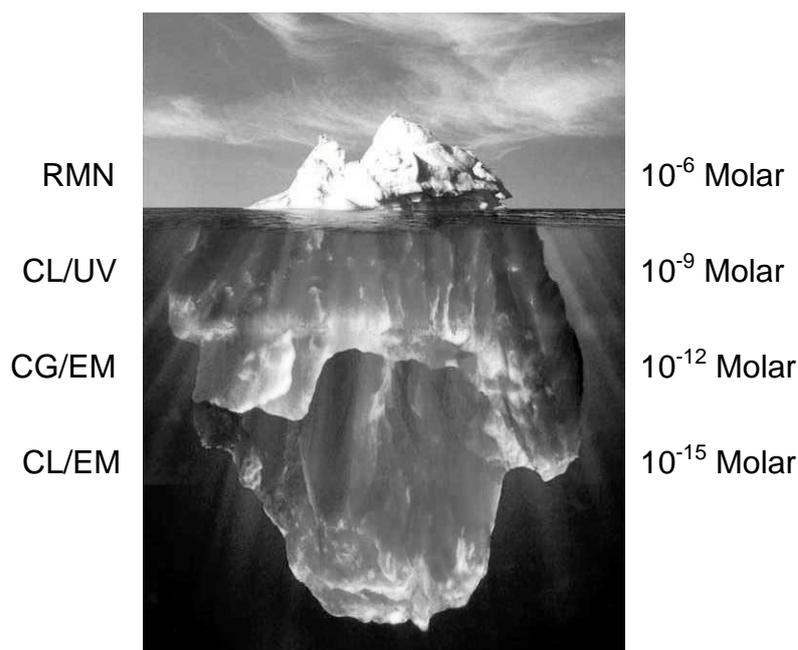


FIGURA 1.14 – Comparação relativa das sensibilidades de várias ferramentas metabolômicas (figura extraída de [www.sevencolors.org](http://www.sevencolors.org)).

Neste contexto, a RMN aliada a métodos estatísticos de análises multivariadas tem sido empregada em uma série de estudos metabolômicos. Ward e *col.*, (2003) caracterizaram diferenças metabólicas entre ecotipos de *Arabidopsis thaliana*, correlacionando-as com as funções dos genes da planta. Noteborn e *col.*, (2000) encontraram diferenças nos teores dos ácidos cítrico e glutâmico através da CLAE acoplada a RMN em tomates GM, para prolongar o tempo de amadurecimento. Já Le Gall e *col.*, (2003) determinaram as alterações ocorridas de vários metabólitos secundários em tomates GM para produzir maiores teores de flavonóides. Diferenças nos teores de ácido salicílico produzidas por espécies transgênicas e selvagens de tabaco tem sido observadas por Choi e *col.*, 2004. Obert e *col.* (2004) não encontraram diferenças estatisticamente significativas na composição química entre espécimens GM (para tolerar o herbicida glifosato) e CV de trigo. Enquanto que, no estudo realizado por Manetti e *col.* (2004), com o mesmo tipo de modificação genética em culturas milho, verificou-se que as amostras referentes a espécimens GM apresentaram menores teores de aminoácidos e de colina, quando comparados aos espécimens convencionais. Da mesma maneira, a aplicação de métodos quimiométricos de análises sobre espectros de RMN obtidos de fluidos biológicos tem permitido identificar as conseqüências da manipulação genética em linhagens de leveduras (Holmes e *col.*, 2000; Raamsdonk e *col.*, 2001).

Também, tem sido utilizados para verificar o efeito causado pela ação de herbicidas sobre a composição metabólica de plantas convencionais e GM (Taylor e col., 1999; Duke e col., 2003; Ott e col., 2003).

Estes estudos, bem como aqueles destacados anteriormente, demonstram claramente que a espectroscopia de RMN combinada com métodos estatísticos de análises podem com sucesso serem empregadas nos estudos metabolômicos de OGMs, representando uma poderosa ferramenta para detecção dos efeitos não esperados de uma modificação genética.

#### **1.5.1.1 – Equivalência substancial da soja RR**

Alguns estudos (Padgett e col., 1996) tem revelado que exceto para a tolerância ao glifosato, as espécimes GM de soja são quimicamente equivalentes às suas espécimes CV. Porém, o estudo foi realizado em amostras que não sofreram a ação do herbicida. A análise de amostras tratadas com herbicida tem sido realizada por Taylor e col. (1999) em que compararam a composição química entre sementes de soja provenientes de plantas tratadas e não tratadas (controle) com glifosato. Neste estudo, foram avaliados os níveis de aminoácidos aromáticos, uma vez que o glifosato inibe o caminho biossintético destes e também dos isoflavonóides, que são metabólicos secundários da mesma via metabólica, além dos níveis de óleos, carboidratos, nutrientes, fibras e polisacarídeos, não sendo encontradas diferenças significativas. No entanto, foi observado um claro aumento do teor de isoflavonóides nas sementes RR. Em um estudo semelhante, Duke e col., (2003) também não observaram diferenças significativas nos níveis de isoflavonóides, porém verificaram um acúmulo de glifosato e ácido aminometilfosfônico, um produto de degradação deste, nas sementes de soja. Reddy e col. (2004) demonstraram que o acúmulo deste composto causa injúria na planta, o que pode causar alterações na composição metabólica da mesma. Já sementes de soja provenientes de plantas convencionais tratadas com o herbicida glifosato apresentaram teores reduzidos de isoflavonóides (Duke e col., 2003), demonstrando que, neste caso, a atividade da enzima EPSPS nativa foi inibida.

No entanto, a mesma modificação genética de outras cultivares e soja, como aquelas produzidas no Brasil e diferentes das descritas na literatura, podem

não seguir o mesmo padrão de alterações das funções gênicas, ocasionando diferentes alterações na composição metabólica (Sumner *et al.*, 2003; Le Gall *et al.*, 2003; Manetti *et al.*, 2004). Havendo portanto, a necessidade de ferramentas disponíveis para auxiliar na completa investigação/avaliação dos novos espécimens que surgirão com uma freqüência e diversidade cada vez maior.

# *Objetivos*

## **2 - OBJETIVOS**

Discriminar amostras de sementes e folhas de soja de acordo com a cultivar, origem geográfica e ainda se estas são referentes a amostras geneticamente modificadas ou convencionais, bem como reconhecer a origem de amostras desconhecidas. Além disso, verificar quais são os fatores químicos responsáveis pelas diferenças entre os conjuntos de amostras. Para isso, utilizando-se apenas espectros de RMN de hidrogênio e na região o infravermelho obtidos diretamente de sementes de soja ou folhas de soja e a aplicação de métodos quimiométricos de análises.

*Experimental*

### **3 – EXPERIMENTAL**

#### **3.1 – Equipamentos**

##### **a) Espectrômetro de RMN**

Todas as medidas de RMN foram obtidas em um espectrômetro Bruker, modelo AVANCE DRX 400, operando a 9,4 Tesla, observando  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  a 400,13 e 100,62 MHz, respectivamente, equipado com as seguintes sondas:

- Sonda de alta resolução com giro no ângulo mágico (HR-MAS) para rotores de 4 mm com gradiente de campo na direção do ângulo mágico, utilizada na obtenção dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , bem como de experimentos bidimensionais, diretamente das sementes e folhas de plântulas de soja. Como porta amostras para a sonda de HR-MAS, foi utilizado um rotor de zircônio de volume esférico com capacidade de 12  $\mu\text{L}$ .
- Sonda multinuclear de observação direta de 5 mm, utilizada para aquisição de espectros de RMN de  $^1\text{H}$  do óleo de soja.

##### **b) Criomoinho**

As amostras de folhas de soja foram moídas em um moinho criogênico CertiPrep Freezer/Mill, modelo 6750.

##### **c) Liofilizador**

As amostras de folhas, após moagem criogênica foram liofilizadas em um liofilizador E-C Modulyo.

##### **d) Espectrofotometro de Infravermelho**

Os espectros de infravermelho foram obtidos em um equipamento Bruker, modelo Equinox 55, com transformada de Fourier.

## 3.2 – Amostras

### 3.2.1 – Sementes

Três conjuntos de amostras de sementes (grãos) de soja foram utilizados:

#### a) Amostras de casa de vegetação, cedidas pela Embrapa Soja

Sementes de soja de espécimes geneticamente modificados, bem como de seus respectivos espécimes convencionais referentes às cultivares BRS 133, BRS 134, BRS 137 e EMBR 59 foram fornecidas pela Embrapa Soja, localizada em Londrina/PR, através de uma parceria estabelecida com aquela Instituição. Os espécimes geneticamente modificados e seus respectivos espécimes convencionais foram cultivados absolutamente sob as mesmas condições em casa de vegetação, com o objetivo de garantir que a única diferença entre eles, seja devido à modificação genética e a nenhum outro fator.

#### b) Amostras de campo, cedidas pela Embrapa Soja

Sementes de soja de amostras de campo referente às regiões de Londrina e Ponta Grossa, ambas no Estado do Paraná foram cedidas pela Embrapa Soja, de acordo com a tabela 3.1

Tabela 3.1 – Amostras de campo cedidas pela Embrapa soja.

<b>Cultivar</b>	<b>Origem geográfica</b>	<b>Origem genética</b>
BRS 134	Ponta Grossa	Convencional
BRS 134	Londrina	Convencional
BRS 230	Ponta Grossa	Convencional
BRS 230	Londrina	Convencional
BRS 247	Ponta Grossa	GM
BRS 247	Londrina	GM
BR0068510	Ponta Grossa	Convencional

### **c) Amostras comerciais provenientes do município de Campo Novo do Parecis, Estado de Mato Grosso**

Foram obtidos dois conjuntos de amostras comerciais, provenientes de plantações no Estado de Mato Grosso, sendo um deles composto de espécimens GM e o outro de espécimens CV. No entanto, se desconhece a cultivar e se estas são provenientes de plantas que sofreram a aplicação de herbicida a base de glifosato.

#### **3.2.2 – Folhas**

Para obtenção de amostras de folhas de plântulas de soja, as sementes das amostras de campo foram plantadas em uma bandeja de mudas, segundo metodologia descrita por Barison (2000). Após 15 dias de cultivo as folhas foram então coletadas.

#### **3.2.3 – Óleo de soja**

Para a obtenção do óleo de soja de cada cultivar, as sementes das amostras de campo foram submetidas a um processo para a extração contínua do óleo. Neste, dez gramas de soja de cada cultivar já moídas foram submetidas a extração com éter etílico em um extrator Soxhlet, permitindo-se cinco ciclos no sistema. Após a extração, o solvente foi eliminado em um evaporador rotativo à pressão reduzida e sem aquecer o banho.

### **3.3 – Preparo de amostra para aquisição dos espectros de RMN**

#### **3.3.1 – Amostras *in natura***

Para a aquisição de espectros de RMN HR-MAS das amostras *in natura* (sementes e folhas) foi necessário preparar um pó das mesmas.

### 3.3.1.1 – Sementes de soja

Para aquisição dos espectros de RMN HR-MAS diretamente de amostras de grãos de soja, estes foram simplesmente moídos em um almofariz com auxílio de um pistilo, até formar um pó. Este mesmo pó também foi utilizado no preparo das pastilhas de KBr para a aquisição dos espectros na região do infravermelho.

### 3.3.1.2 – Folhas de plântulas de soja

Como estas não puderam serem moídas em uma cápsula, as mesmas foram então moídas em um moinho criogênico. Neste, as amostras foram mantidas imersas em nitrogênio líquido durante o processo de moagem, pelo sistema de martelos, de acordo com a seguinte programação do moinho:

Tempo de pré congelamento (antes de iniciar a moagem)	1 min.
Tempo de moagem	2 min.
Ciclos de moagem	3
Taxa de batimento	10 batidas/segundo
Intervalo de congelamento entre cada ciclo moagem	1 min.

Neste processo, obteve-se um pó finamente dividido, o qual foi então liofilizado por 24 horas para remoção da água natural das amostras.

### 3.3.1.3 – Empacotamento das amostras

Uma vez obtido o pó das folhas e sementes, introduziu-se cerca de 5 mg no rotor (porta amostras da sonda de HR-MAS) juntamente com algumas gotas de água deuterada e a suspensão foi homogeneizada dentro do próprio rotor. Em seguida introduziu-se o espaçador semi esférico no rotor, o qual confere a amostra um volume esférico dentro do rotor. Este mesmo espaçador também permite que o

excesso de amostra seja eliminado através de um pequeno orifício, o qual é então selado com um parafuso. Finalmente colocou-se a turbina que é responsável pelo giro do rotor. O sistema de empacotamento de amostra pode ser melhor entendido pela visualização da figura 3.1.

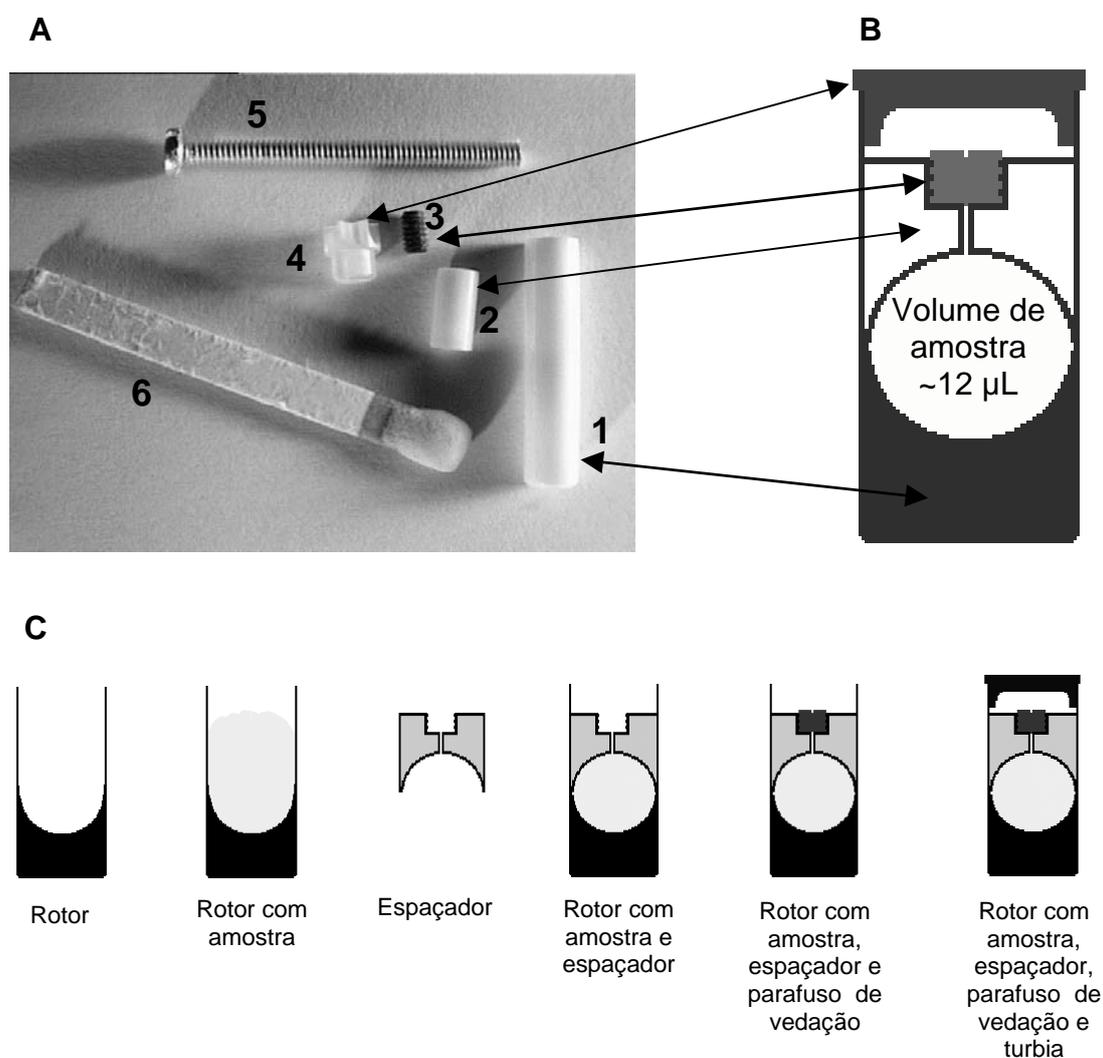


FIGURA 3.1 – Sistema de empacotamento de amostra para sonda de HR-MAS: A) Componentes do rotor, comparados com um palito de fósforo, 1 - Rotor de fundo semi esférico; 2 – Espaçador semi esférico; 3 – Parafuso de vedação; 4 – Turbina; 5 - Parafuso utilizado para a remoção do espaçador; 6 – Palito de fósforo; B) Representação do rotor montado; C) Esquema de empacotamento de amostra.

### 3.3.2 – Amostras de óleo

Para a aquisição dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  do óleo de soja, foram tomadas alíquotas de  $30\mu\text{L}$  da amostra e diluídas em  $0,6\text{ mL}$  de  $\text{CDCl}_3$  em tubos de RMN de  $5\text{ mm}$  de diâmetro.

### 3.4 – Preparo de amostra para aquisição dos espectros na região do infravermelho

Pastilhas de KBr foram preparadas pesando-se  $1\text{ mg}$  de pó de amostras de sementes de soja juntamente com  $100\text{ mg}$  de KBr. As pastilhas foram utilizadas para a aquisição dos espectros na região do infravermelho.

### 3.5 – Aquisição dos experimentos de RMN

#### 3.5.1 – Amostras *in natura*

##### 3.5.1.1 – Espectros de hidrogênio

Os espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  das amostras de grãos e folhas de soja foram adquiridos na frequência de  $400,13\text{ MHz}$  a temperatura ambiente da sala do equipamento ( $\sim 295\text{ K}$ ), usando-se as seqüências de pulsos *zg* e *CPMG* para as amostras de sementes, enquanto que para as amostras de folhas utilizou-se a seqüência *CPMG* com pré-saturação do sinal da água. Durante a aquisição dos espectros, as amostras foram giradas no ângulo mágico a  $5\text{ KHz}$ . Sal de sódio do ácido 3-(trimetilsilil)-3,3,2,2-tetradeuterio-propionico  $[(\text{CH}_3)_3\text{SiCD}_2\text{CD}_2\text{COO}^-\text{Na}^+$ , *TMS $P$ - $d_4$* ] foi utilizado como referência interna ( $\delta\ 0,00\text{ ppm}$ ) para os deslocamentos químicos dos espectros/experimentos de RMN HR-MAS. Os seguintes parâmetros foram utilizados nas aquisições: *D1* de  $1,2\text{ s}$ , *TD* de  $64\text{K}$ , *SI* de  $64\text{K}$ , *SW* de  $\sim 12\text{ ppm}$  e *NS* variável de acordo com o experimento. Quando a seqüência *CPMG* com ou sem pré-saturação do sinal da água foi empregada, os seguintes parâmetros

adicionais foram utilizados: D20 (tempo de espera entre os pulsos de  $180^\circ$ ) de 1 ms e n (número de ciclos) de 150.

### 3.5.1.2 – Experimentos de correlações homonucleares $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$

As correlações homonucleares  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  de amostras de sementes de soja foram obtidas pelo emprego de um experimento de *g*COSY com gradiente de campo, usando-se a seqüência de pulsos *cosygp*. Os seguintes parâmetros foram utilizados na aquisição: TDF2 de 4K, TDF1 de 256, NS de 8, SW em F2 e F1 de ~5,5 ppm.

### 3.5.1.3 – Experimentos de correlações heteronucleares $^1J$ $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$

As correlações heteronucleares  $^1J$   $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  de amostras de grãos de soja *in natura* foram obtidas através de experimentos de *g*HSQC com gradiente de campo, usando-se a seqüência de pulsos *invetgpsi* com os seguintes parâmetros: TD em F2 de 2K, TD em F1 de 400, NS de 32, SW de ~10,5 e ~220 ppm em F2 e F1, respectivamente, e tempo de correlação (D4) de 1,8 ms, otimizado para uma constante de acoplamento  $^1J_{\text{C,H}}$  de 140 Hz.

### 3.5.1.4 – Experimentos de correlações heteronucleares $^{\text{LR}}J$ $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$

O experimentos para a observação de correlações heteronucleares  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a longa distância de amostras de grãos de soja *in natura* foram obtidas através de experimentos de *g*HMBC com gradiente de campo, usando-se a seqüência de pulsos *inv4gpplrnd* com os seguintes parâmetros: TD em F2 de 4K, TD em F1 de 500, NS de 80, SW de ~11 e ~220 ppm em F2 e F1, respectivamente, ajustando-se o tempo de evolução (D6) para 62,5 ms, otimizado para uma constante de acoplamento C-H de 8 Hz. O filtro de passa baixa (D2) para eliminar as correlações  $^1J_{\text{C,H}}$  foi ajustado para 3,45 ms, otimizado para uma constante de acoplamento  $^{\text{LR}}J_{\text{C,H}}$  de 145 Hz.

### 3.5.1.5 – Experimentos para observação de efeito nuclear Overhauser

Os experimentos de 1D para a observação de nOe foram obtidos através da irradiação seletiva na frequência de cada hidrogênio, utilizando-se a seqüência de pulsos *selnogp.3* de acordo com os parâmetros: TD de 32K, SI de 32 K, D1 de 2 s, SW de ~10 ppm, NS de 512 e tempo de mistura (D8) de 300 ms.

### 3.5.2 – Amostras de óleo

Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  quantitativos das amostras de óleo de soja foram adquiridos na frequência de 400,13 MHz, a temperatura estável de 323 K utilizando-se a seqüência de pulsos *zg*. TMS [Tetrametilsilano:  $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$ ] foi utilizado como referência interna ( $\delta$  0,00 ppm) para os deslocamentos químicos dos espectros de RMN. Os seguintes parâmetros foram empregados: D1 de 5 s, TD de 64K (AQ de 7,8 s), SI de 64K, NS de 16 e SW de ~10 ppm

### 3.6 – Aquisição dos espectros na região do infravermelho

Os espectros de transmitância na região do infravermelho por transformada de Fourier foram adquiridos de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  (número de ondas:  $\bar{\nu}$ ) a uma resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ , acumulando-se 60 varreduras para cada amostra.

### 3.7 – Análises quimiométricas

As análises multivariadas foram realizadas empregando-se principalmente os espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  obtidos com a seqüência de pulsos CPMG. Em alguns casos foram utilizados espectros obtidos com a seqüência *zg*. As amostras foram adquiridas em replicatas que variaram entre os experimentos. Para alguns conjuntos de dados foram utilizados também espectros na região do infravermelho. As análises foram efetuadas com auxílios dos programas computacionais AMIX<sup>®</sup> da Bruker e Pirouette<sup>®</sup> da Infometrix.

### 3.7.1 – Transformações (Ajustes)

#### 3.7.1.1 – Dos espectros de RMN de $^1\text{H}$

Para obter os espectros de RMN utilizados nas análises quimiométricas, todos os FIDs (Free Induction Decay ou Decaimento livre da magnetização induzida) foram convertidos do domínio de tempo para o domínio de frequências pela aplicação da transformada de Fourier. Porém antes os FIDs sofreram uma multiplicação exponencial para alisamento dos sinais (LB) por um fator igual a 1 Hz e 64K pontos na parte real (SI). A linha de base dos espectros foi automaticamente corrigida aplicando-se um ajuste polinomial igual a zero, seguida de uma nova correção manual da fase, quando necessário. Quando este processo não foi suficiente para corrigir a linha de base, esta foi então manualmente corrigida multiplicando-se os espectros por uma função polinomial ajustada para a linha de base de cada espectro. Estes processos foram repetidos caso necessário para melhorar ainda mais o ajuste da linha de base e/ou da fase. Os espectros foram também calibrados em relação ao sinal de referência (TMSP- $d_4$  ou TMS  $\delta$  0,00). Estas transformações e/ou ajustes foram efetuadas no programa computacional XWINNMR<sup>®</sup> da Bruker, que também foi utilizado para a aquisição dos espectros. Por outro lado, não foram necessários quaisquer ajustes nos espectros, com exceção da calibração, quando foi utilizado o modo especial de integração dos sinais do programa AMIX<sup>®</sup> (AMIX Manual, 2004).

Para submeter os espectros a análise quimiométrica, o número de variáveis foi reduzido dividindo-se os espectros em pequenos intervalos de 0,05 ou 0,01 ppm cada, conhecido como *buckets*. A conversão dos espectros em *buckets* foi realizada com o auxílio do programa AMIX<sup>®</sup>, desenvolvido pela Bruker especialmente para tratar dados de RMN. As intensidades absolutas dos sinais foram usadas para a integração das áreas dos *buckets* e/ou foi utilizado um modo especial de integração, recentemente introduzido nas últimas versões do programa AMIX<sup>®</sup>, o qual dispensa a necessidade correção de fase e da linha de base dos espectros. Os *buckets* foram normalizados em relação a área total dos *buckets*. As áreas de cada *bucket* foram então utilizadas como variáveis de entrada nas análises quimiométricas. Quando todo o espectro foi utilizado, a região de 5,0 a 4,5 ppm

referente ao sinal da água foi desconsiderada, uma vez que o sinal do HDO situa-se nesta região.

### **3.7.1.2 – Dos espectros na região do infravermelho**

Da mesma forma que nos dados de RMN, para se obter os espectros na região do infravermelho, foi aplicada a transformada de Fourier sobre os interferogramas para converter os mesmos para o domínio de frequências em número de onda ( $\bar{\nu}$ ), porém sem quaisquer multiplicações exponenciais ou de outro tipo. Os espectros resultantes também foram normalizados para serem submetidos a análise quimiométrica. Estas transformações foram efetuadas no programa computacional OPUS<sup>®</sup> da Bruker, que também foi utilizado para a aquisição dos espectros.

## **3.7.2 – Pré-processamentos**

### **3.7.2.1 – Nas análises por componentes principais (PCA)**

Para a análise quimiométrica dos espectros de RMN HR-MAS de <sup>1</sup>H, todos os dados foram autoescalados, enquanto que para a análise dos espectros na região do IV, os dados foram centrados na média (Beebe e col., 1998).

### **3.7.2.2 – Nas análises por agrupamento hierárquico (HCA)**

Nas análises por HCA dos espectros de IV, além de centrar os dados na média, foram utilizadas as distâncias Euclidianas para o cálculo das similaridades das amostras, utilizando-se o método incremental para fazer as conexões (Beebe e col., 1998).

### 3.7.3 – Análises exploratórias

A análise por PCA é geralmente a primeira etapa na análise exploratória dos dados. Estas foram realizadas nos programas computacionais AMIX<sup>®</sup> da Bruker e/ou Pirouette<sup>®</sup> da Infometrix. Enquanto que, as análises por HCA foram realizadas somente no programa Pirouette<sup>®</sup>, uma vez que o programa AMIX<sup>®</sup> não suporta este tipo de análise.

### 3.7.4 – Classificação

A determinação da origem de amostras desconhecidas foram realizadas pelos métodos KNN e/ou SIMCA no programa Pirouette<sup>®</sup> da Infometrix. Os modelos KNN foram construídos com os dados autoescalados, da mesma forma que as análises exploratórias, usando o método incremental de ligação e as classificações se deu pela medida da distância Euclidiana ((Beebe e *col.*, 1998).

# *Resultados e discussão*

## 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 – Preparo das amostras

Foram testados vários procedimentos de preparo de amostra, de grãos de soja, para obtenção dos espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$ . Entre os quais, tentou-se simplesmente umedecer o grão em água deuterada e posteriormente introduzir um único fragmento deste no rotor da sonda de HR-MAS, bem como fragmentar o grão com auxílio de um bisturi e inserir os fragmentos no rotor. Tentou-se também fragmentar o grão (sem inchar em  $\text{D}_2\text{O}$ ) com auxílio de um bisturi e introduzir os fragmentos no rotor juntamente com gotas de água deuterada. No entanto, estes procedimentos de preparo de amostras resultaram em espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de baixa resolução (Figura 4.1), fato este devido a impossibilidade de realizar uma boa homogeneização do campo magnético e às grandes diferenças de susceptibilidade magnética da amostra. Além disso, o empacotamento da amostra com estes procedimentos foi extremamente difícil e laborioso.

Desta forma, os grãos foram submetidos à moagem, sem o pericarpo, uma vez que este possui alta resistência mecânica, em um almofariz com auxílio de um pistilo, resultando em um pó. Este pó foi introduzido no rotor juntamente com gotas de água deuterada, homogeneizado dentro do próprio rotor e em seguida selado. Este procedimento permitiu obter espectros de boa resolução como pode ser observado na figura 4.1. Além disso, a moagem dos grãos possibilitou introduzir uma maior quantidade de amostra no rotor, aumentando a sensibilidade do experimento, e com isso, reduzir o número de varreduras necessário na aquisição dos espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$ , diminuindo o tempo de aquisição.

De um modo geral os melhores resultados, tanto para as amostras de soja quanto para outros tipos de amostras estudadas no laboratório de RMN, foram obtidos com amostras finamente moídas. Sendo assim, as folhas de plântulas de soja foram submetidas a moagem criogênica, uma vez que foi impossível moê-las sem o seu congelamento.

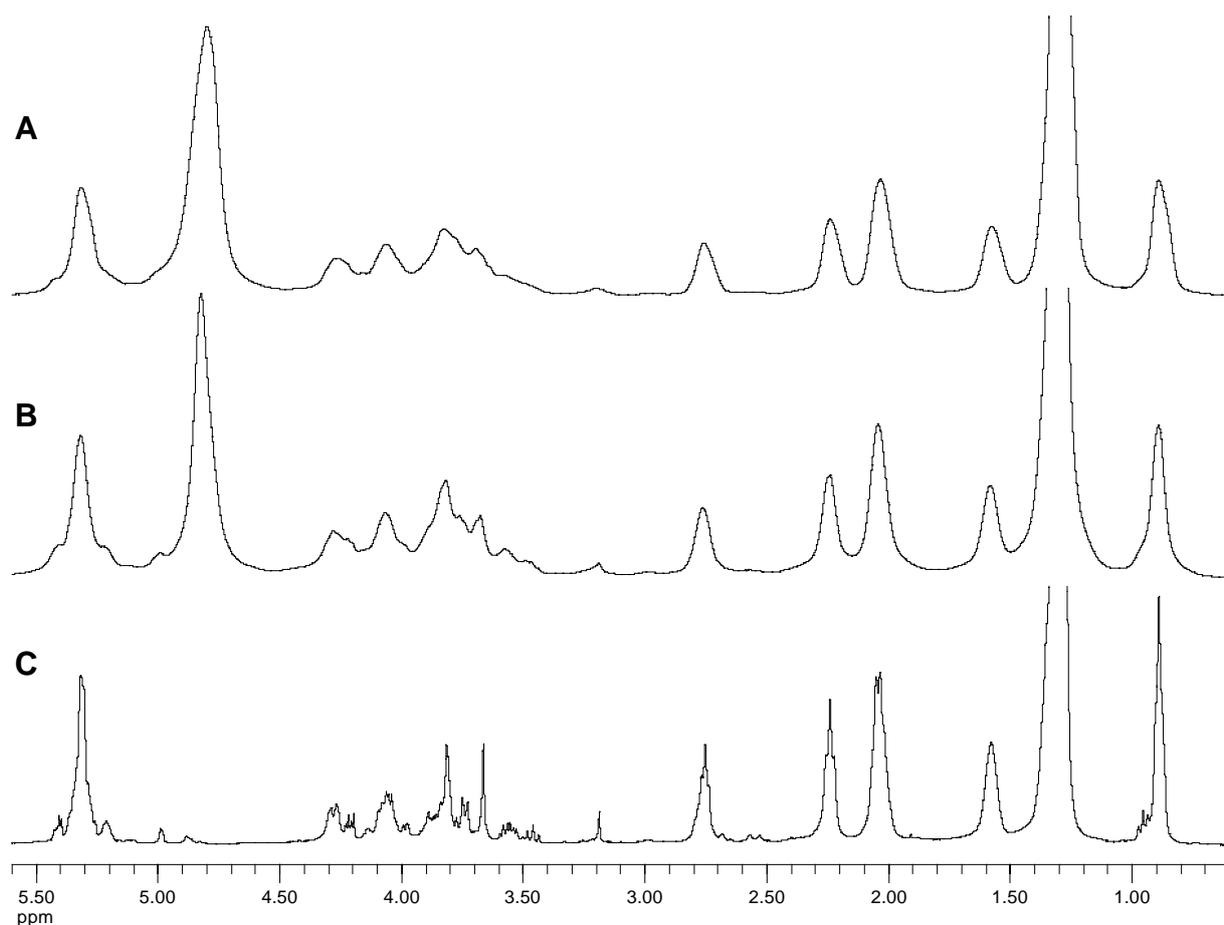


FIGURA 4.1 – Espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  de grãos de soja obtidos com diferentes tipos de preparo de amostra. A) O grão *in natura* foi picado com auxílio de um bisturi e os fragmentos foram introduzidos no rotor juntamente com  $\text{D}_2\text{O}$ ; B) O grão foi inchado em água deuterada e um único fragmento foi introduzido no rotor; C) O grão foi moído em um almofariz com auxílio de um pistilo e o pó formado foi inserido no rotor juntamente com algumas gotas de  $\text{D}_2\text{O}$ . Observação: o espectro C foi obtido com pré-saturação do sinal da água.

Como os grãos de soja somente puderam ser facilmente moídos sem o pericarpo, avaliou-se a informação espectral que poderia ser obtida deste, com o objetivo de verificar se poderíamos descartar o pericarpo das amostras. Assim uma amostra contendo somente pericarpo, removido dos grão de soja, foi submetida a moagem criogênica e do pó resultante, adquiriu-se espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$ . A análise destes espectros revelou a presença de poucos sinais alargados referentes a compostos poliméricos, uma vez que o uso da seqüência CPMG na aquisição do espectro eliminou praticamente todos os sinais do espectro (Figura 4.2). Sendo assim, não foi necessário a inclusão do pericarpo nas análises, uma vez que este não contribui com informações importantes nas análises quimiométricas.

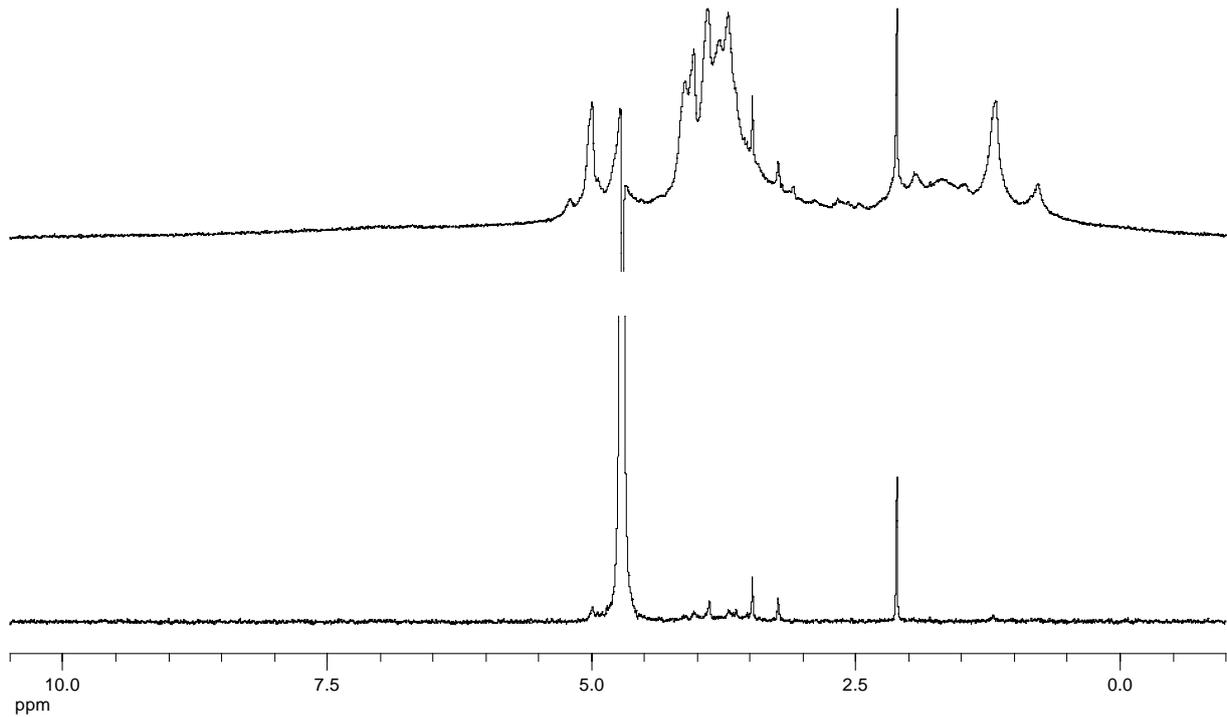


FIGURA 4.2 – Espectro de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  somente do pericarpo das sementes de soja, adquiridos com a seqüência *zgpr* (Superior) e CPMG (Inferior).

Avaliou-se também se a moagem criogênica dos grão de soja, sem o pericarpo, resultaria em uma melhora na resolução espectral. Como pode ser observado na figura 4.3, os espectros obtidos de sementes moídas no moinho criogênico apresentaram semelhante resolução que aquelas moídas manualmente. Com isso, a moagem dos grão pôde ser realizada simplesmente em um almofariz com auxílio de um pistilo.

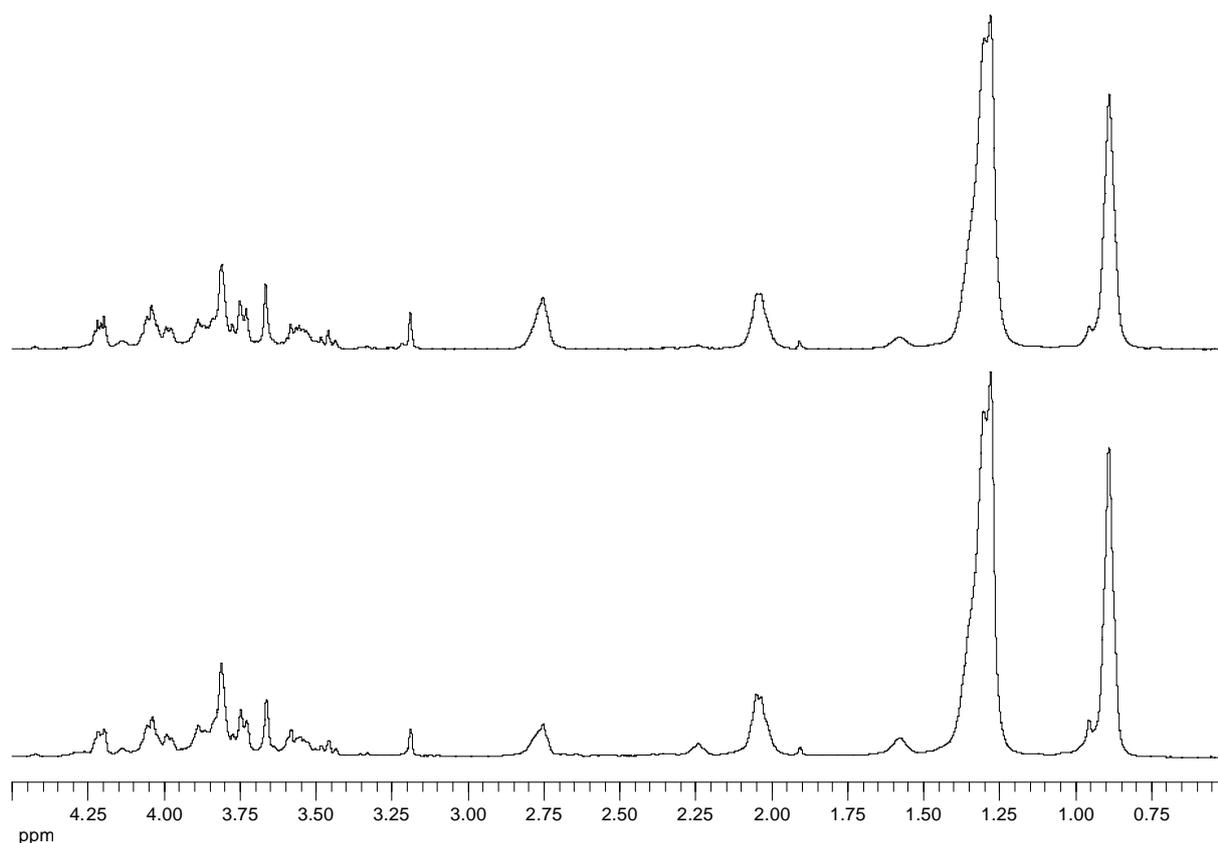


FIGURA 4.3 – Comparação entre espectro de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  de amostras de sementes de soja moídas manualmente (Superior) e criogenicamente (Inferior).

No caso das folhas de plântulas de soja, não foi possível preparar um pó das mesmas pela simples moagem em um almofariz. Desta forma, as folhas foram moídas com auxílio de um moinho criogênico. Além disso, as amostras de folhas apresentaram alta umidade, o que dificultou o inserção no rotor, mesmo após a moagem criogênica, além de gerar um sinal muito intenso de HOD nos espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$ , sendo portanto, necessária a remoção da água das amostras de folhas de soja com o auxílio de um liofilizador.

#### 4.2 – Resolução dos espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  obtidos diretamente de sementes de soja através da técnica de HR-MAS, apresentaram uma resolução espectral muito próxima a que é obtida para amostras em solução. Esta excelente resolução pode ser comprovada pela comparação entre espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  de sementes de soja com espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de amostras de óleo de soja,

obtidos em solução usando-se uma sonda convencional de líquidos (Figura 4.4). A comparação destes espectros pôde ser feita devido aos sinais da composição de triacilgliceróis das sementes de soja serem bastante pronunciados nos espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$ . A resolução pode ser melhor visualizada pela observação um sinal que não apresenta sobreposição, como é o caso do tripleto em  $\delta$  0,98 e 0,96 ppm nos espectros de óleo e semente de soja, respectivamente (Ampliação da figura 4.4). Este sinal é referente ao grupo metila da porção éster do ácido linolênico. Inclusive foi possível medir a constante de acoplamento (7,5 Hz) em ambos os espectros.

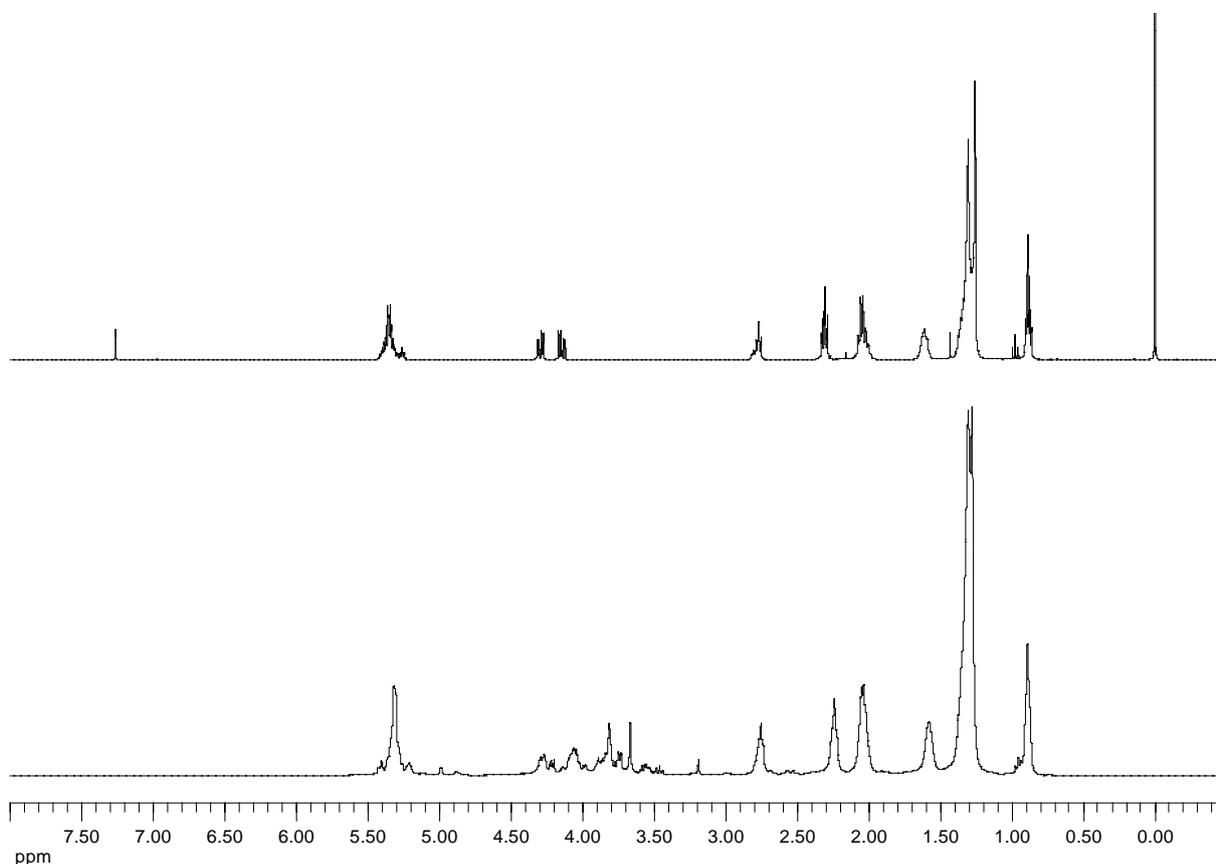


FIGURA 4.4 – Comparação entre um espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de óleo de soja (Superior) e um espectro de RMN HR-MAS  $^1\text{H}$  de sementes de soja (Inferior).

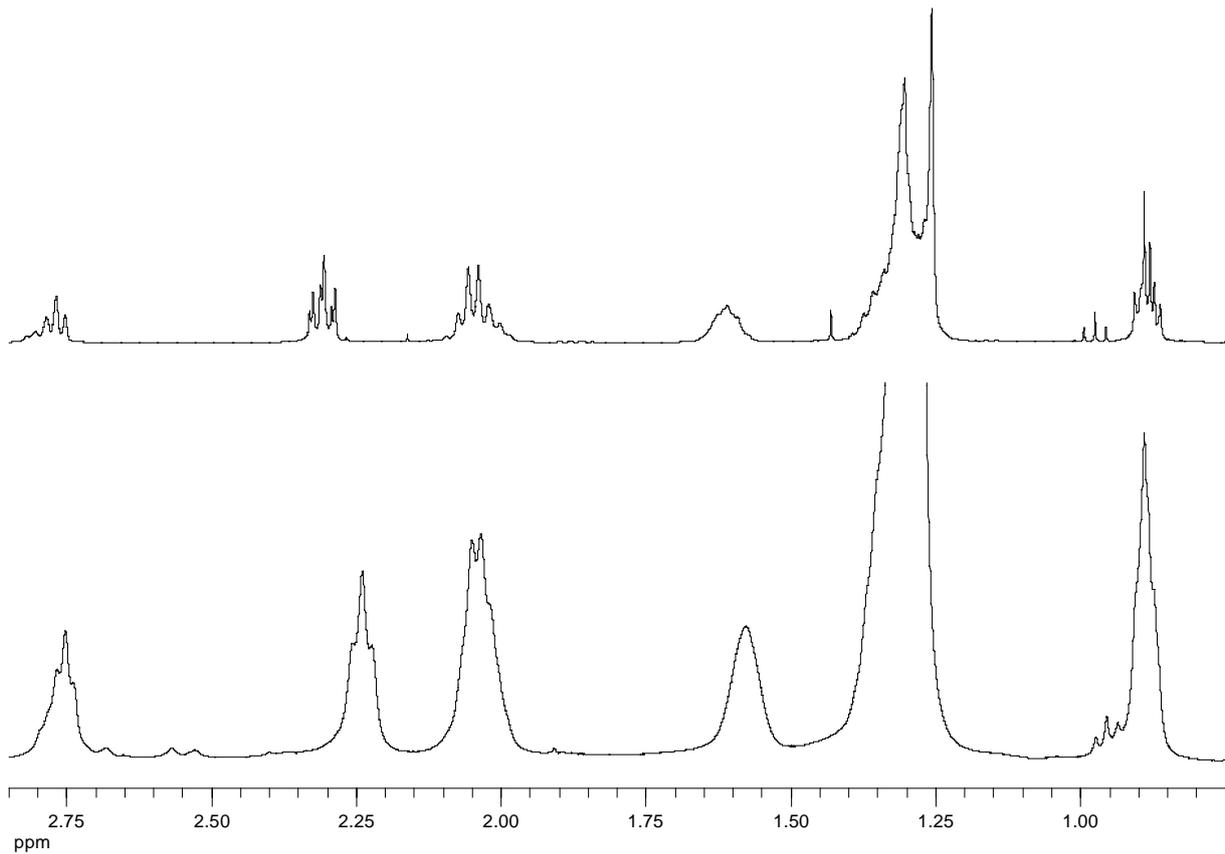


FIGURA 4.4 (Ampliação) – Comparação entre um espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de óleo de soja (Superior) e de RMN HR-MAS  $^1\text{H}$  de sementes de soja (Inferior).

Os espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  adquiridos diretamente de amostras de folhas de plântulas de soja, da mesma forma que os de sementes de soja, também apresentaram resolução espectral muito próxima das que são obtidas para amostras em solução, como pode ser observado na figura 4.5.

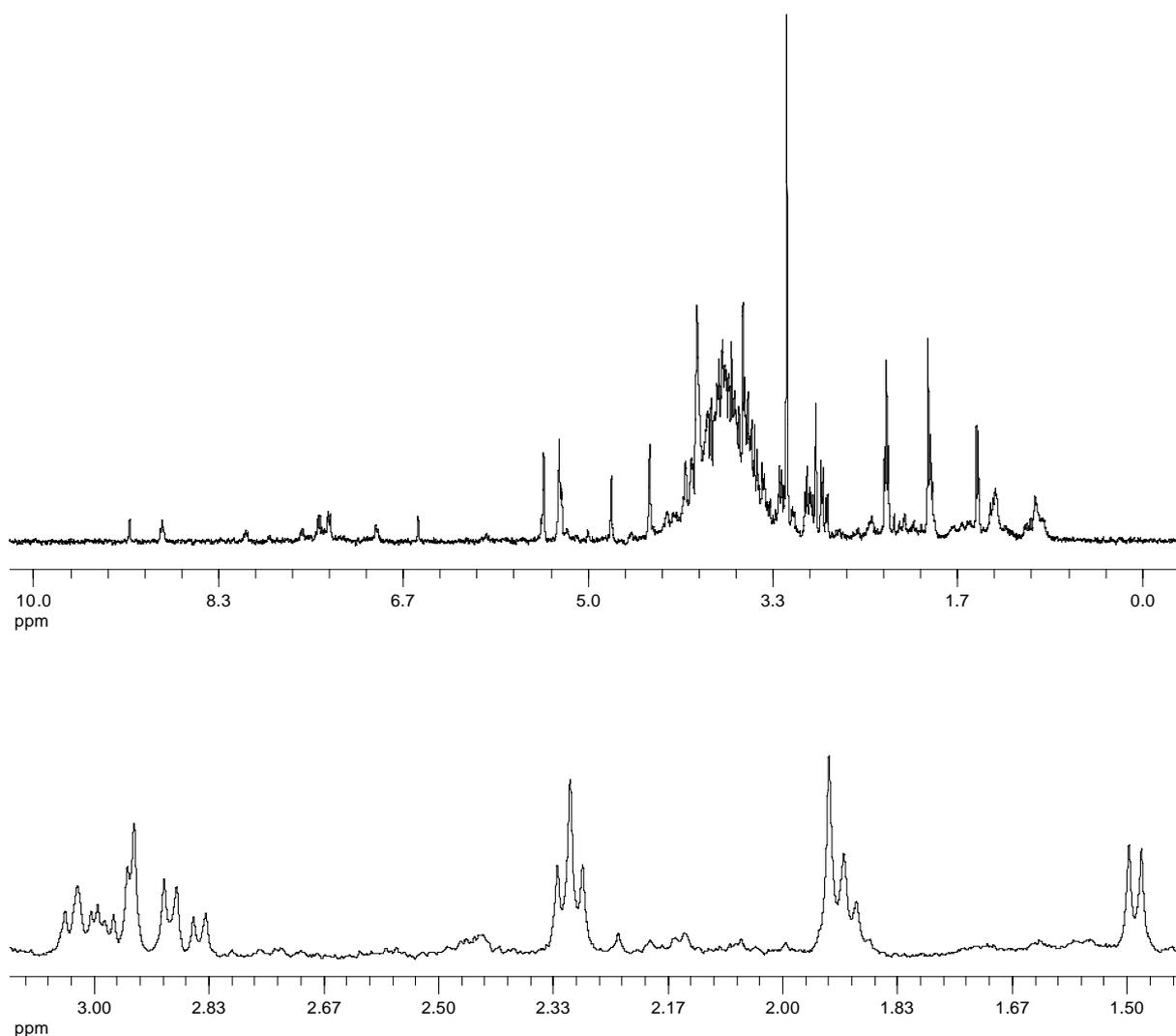


FIGURA 4.5 – Espectro representativo de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  de folhas de plântulas de soja (superior) e ampliação da região de  $\delta$  3,2 a 1,4 ppm (inferior).

### 4.3 – O emprego da seqüência de pulsos CPMG na aquisição dos espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$

O uso da seqüência de pulsos CPMG, também conhecida como filtro de  $T_2$ , na aquisição de espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  permitiu eliminar os sinais alargados dos espectros, provenientes de moléculas de alta massa molecular, tais como proteínas, polissacarídeos, ligninas e componentes da parede celular, entre outros. Com isso, tornando visível os sinais menos intensos e aumentando, portanto, a quantidade de informações nos espectros, o que é muito desejável nas análises quimiométricas (Figura 4.6). Além disso, o emprego do filtro de  $T_2$  dispensou a necessidade da supressão do sinal do HDO em  $\delta$  4,8 ppm (Figura 4.6). No entanto,

a eliminação de sinais dos espectros pelo uso do filtro de  $T_2$  deve ser avaliado com cuidado, uma vez que as informações referentes a estes sinais podem ter fundamental importância nas análises quimiométricas. Geralmente nas análises de materiais *in natura* os sinais das macro moléculas tem sido desprezados, pois acredita-se que as maiores variações entre espécimens ocorre na composição de baixa massa molecular (Sacco e col., 1998; Broberg e col., 1998; Broberg e Kenne, 2000; Bollard e col., 2000; Garrod e col., 2001). Mais adiante será discutido a influência do uso do filtro de  $T_2$  nas análises quimiométricas.

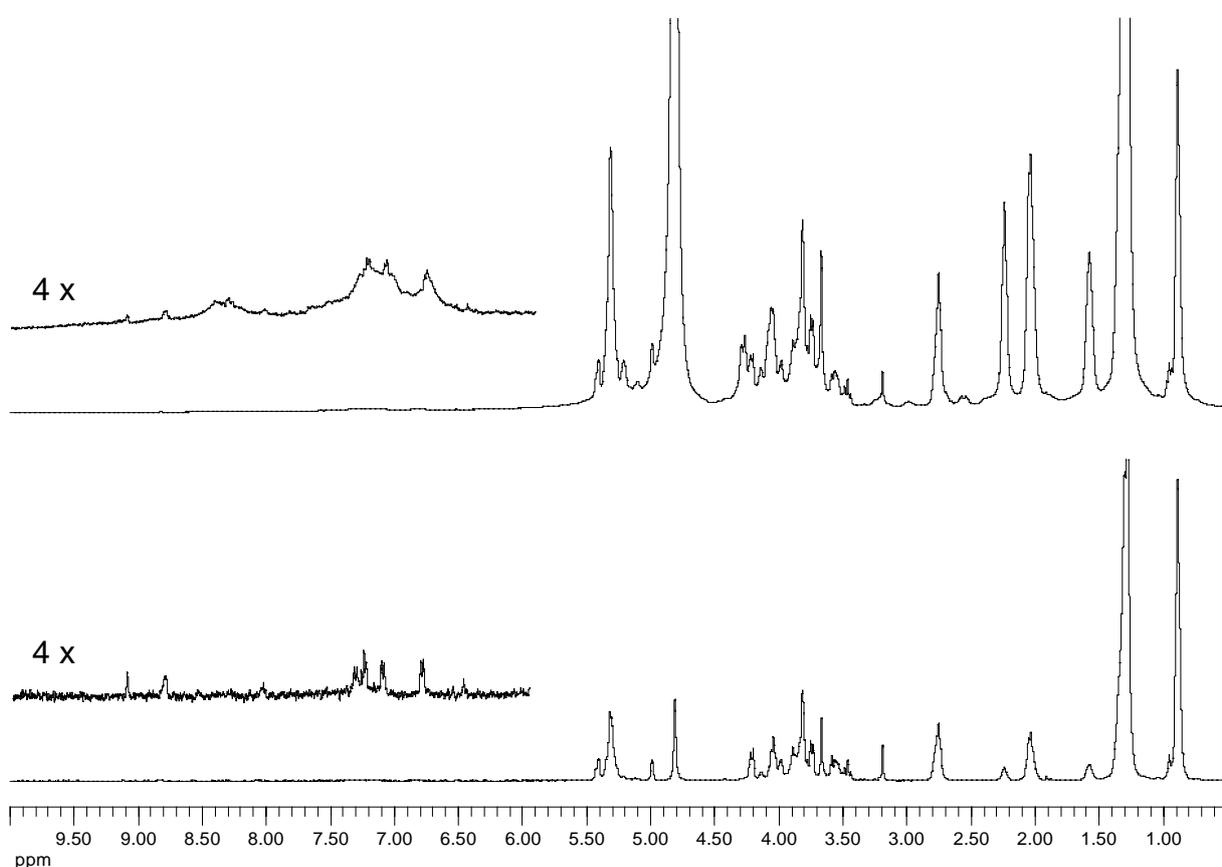


FIGURA 4.6 – Comparação entre um espectro de RMN HR-MAS  $^1\text{H}$  de sementes de soja obtidos sem (superior) e com (inferior) o uso do filtro de  $T_2$ , na aquisição.

O emprego da seqüência de pulsos CPMG também tem sido extremamente útil para melhorar significativamente a qualidade dos sinais dos espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  de amostras de folhas de soja (Figura 4.7). Neste caso, além do uso do filtro de  $T_2$ , foi necessário também a inserção de um novo bloco (pulsos e intervalos de tempo) na seqüência CPMG para realizar a pré-

saturação do sinal do HDO. Este bloco, consistiu da inserção de um pulso contínuo de irradiação seletiva da frequência do sinal do solvente, no início da seqüência CPMG, durante o tempo de relaxação.

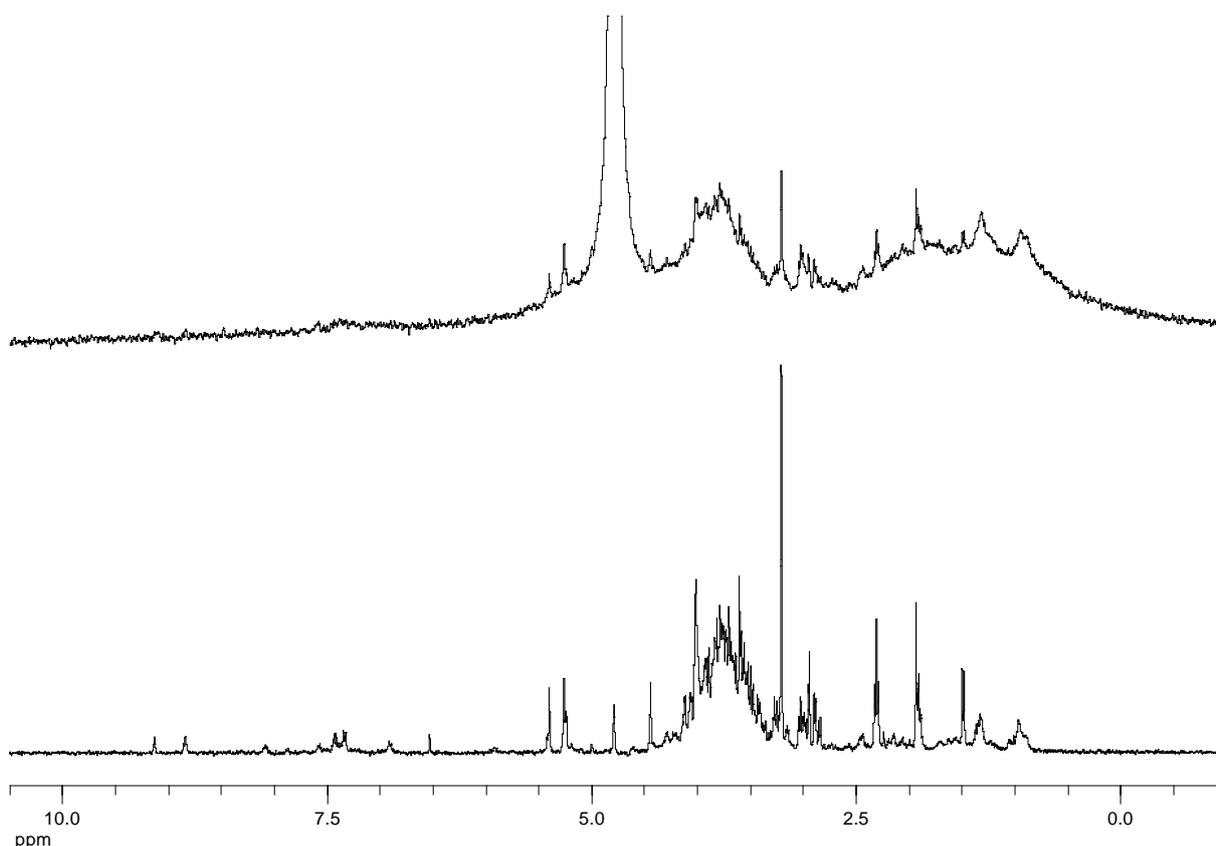


FIGURA 4.7 – Comparação entre um espectro de RMN HR-MAS  $^1\text{H}$  de folhas de plântulas de soja obtidos sem (superior) e com (inferior) o uso do filtro de  $T_2$ , na aquisição.

#### 4.4 – Análise visual dos espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$

##### 4.4.1 – Análise visual dos espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ das sementes

A análise visual dos espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  não permitiu identificar sinal(is) que caracterizem um ou outro determinado conjunto de amostras. A figura 4.8 mostra a comparação dos espectros de RMN HR-MAS de hidrogênio de três cultivares de soja obtidas em idênticas condições de cultivo. A figura 4.9 compara os espectros de uma mesma cultivar, mas de diferentes regiões

produtoras. Enquanto que, a figura 4.10 compara os espectros de um espécime CV com seu respectivo espécime GM.

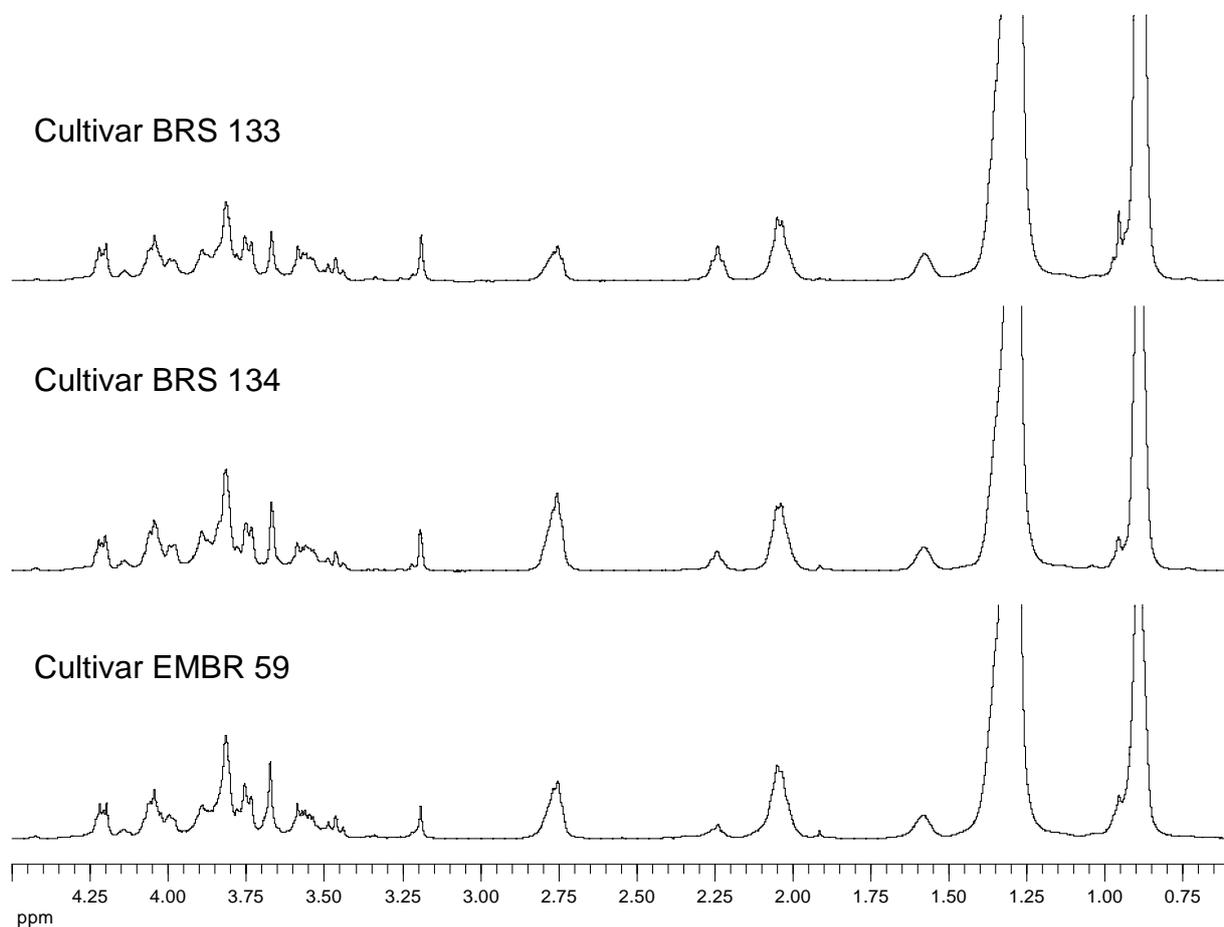


FIGURA 4.8 – Comparação entre espectros de RMN HR-MAS  $^1\text{H}$  de três diferentes cultivares de soja. Ampliação da região de  $\delta$  4,5 a 0,5 ppm.

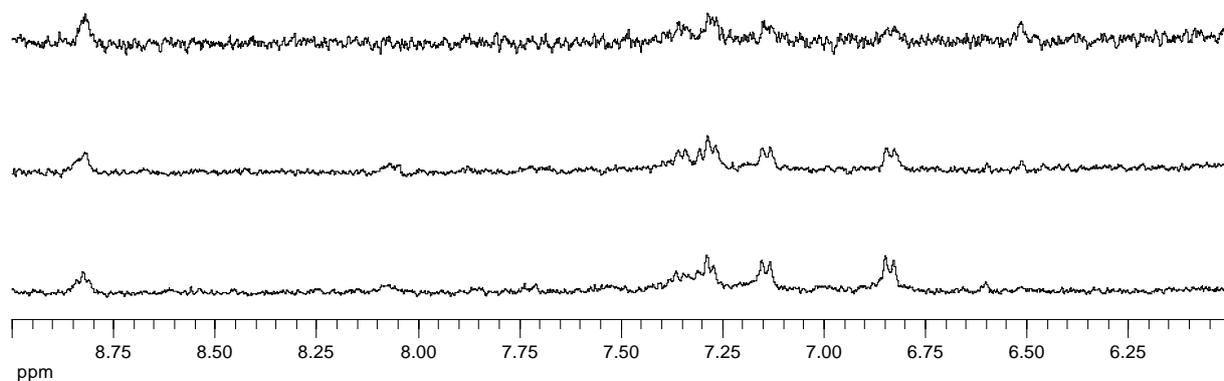


FIGURA 4.8 (Continuação) – Ampliação da região de  $\delta$  9,0 a 6,0 ppm.

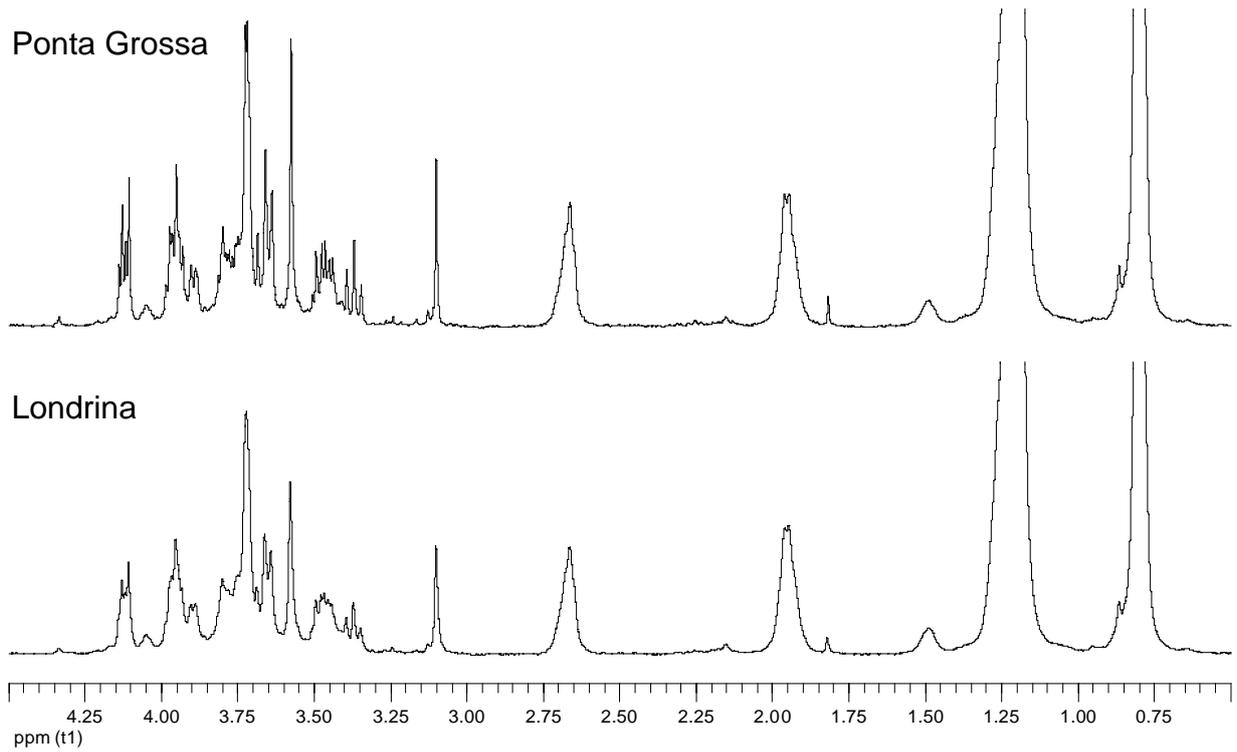


FIGURA 4.9 – Comparação entre espectros de RMN HR-MAS <sup>1</sup>H de uma cultivar de soja de diferentes regiões produtoras, região de  $\delta$  4,30 a 0,75 ppm.

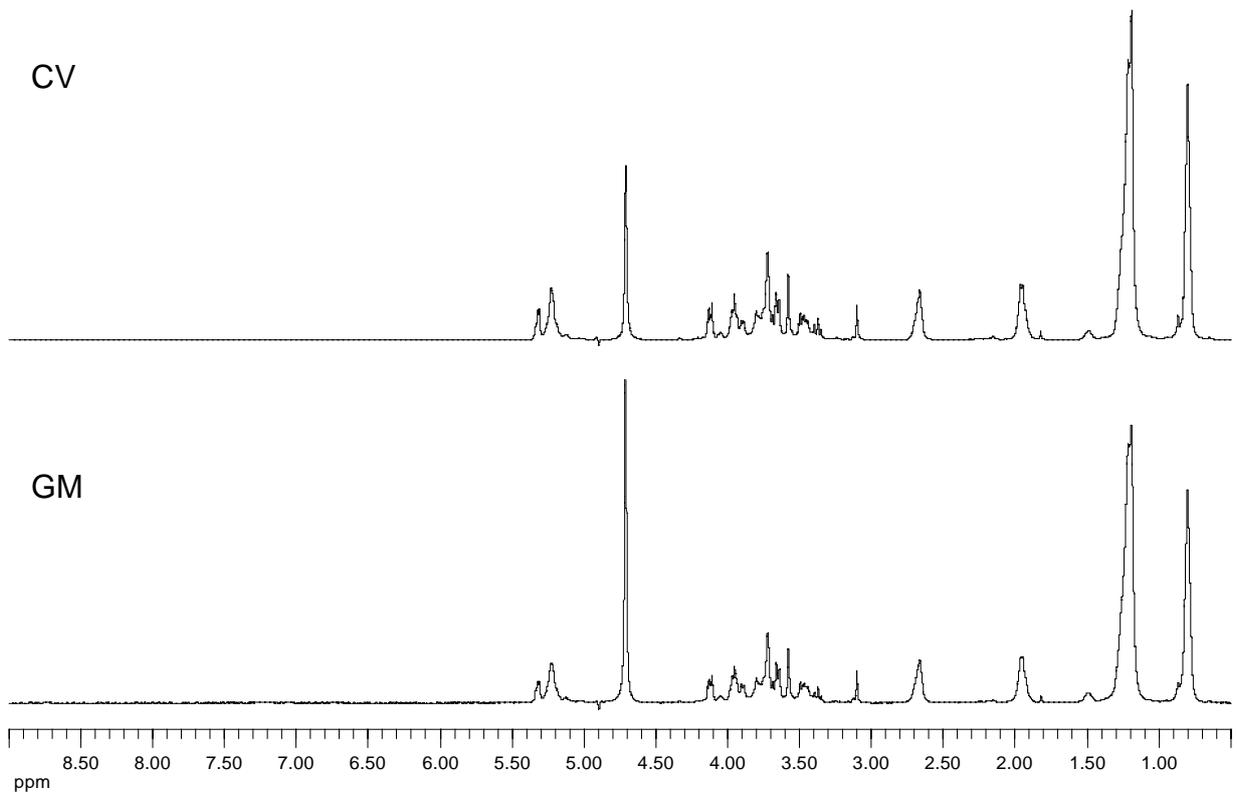


FIGURA 4.10 – Comparação entre espectros de RMN HR-MAS <sup>1</sup>H de um espécime GM e seu respectivo espécime CV da cultivar BRS 133.

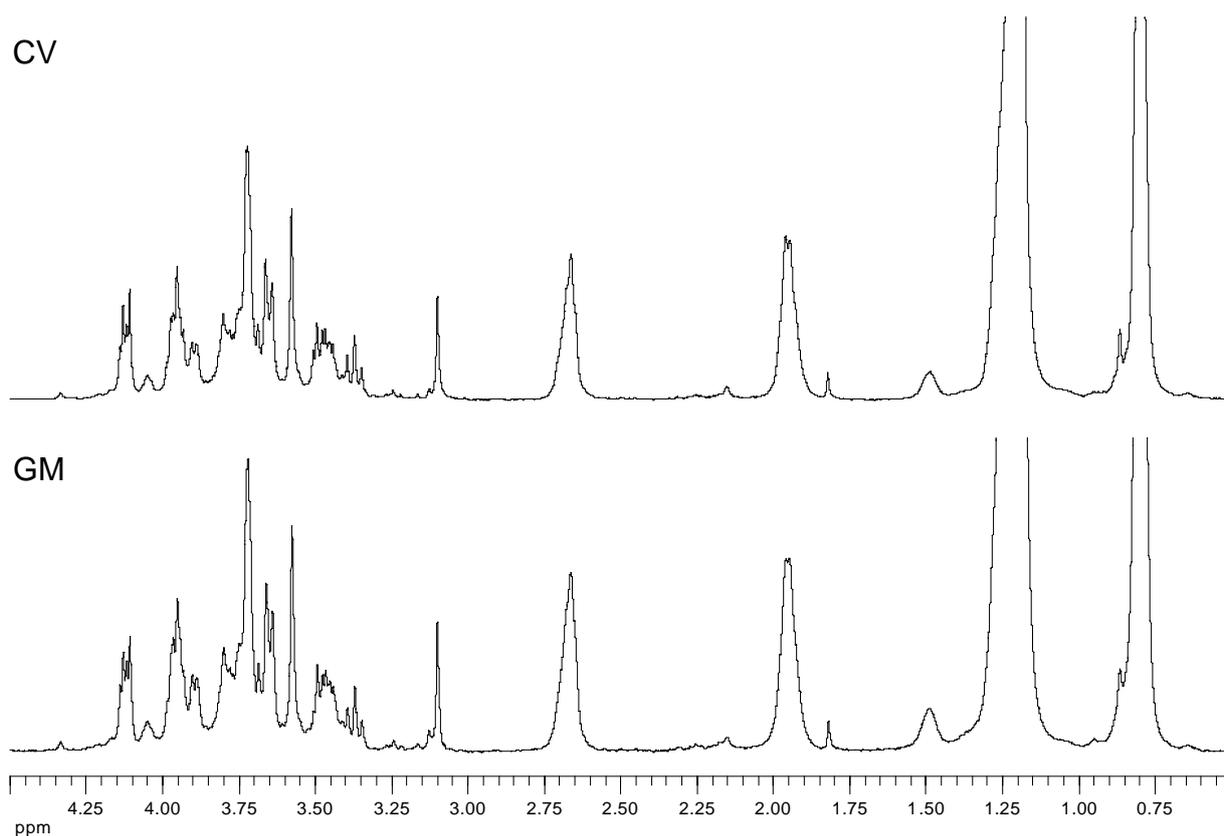


FIGURA 4.10 (Continuação) – Ampliação da região de  $\delta$  4,30 a 0,75 ppm.

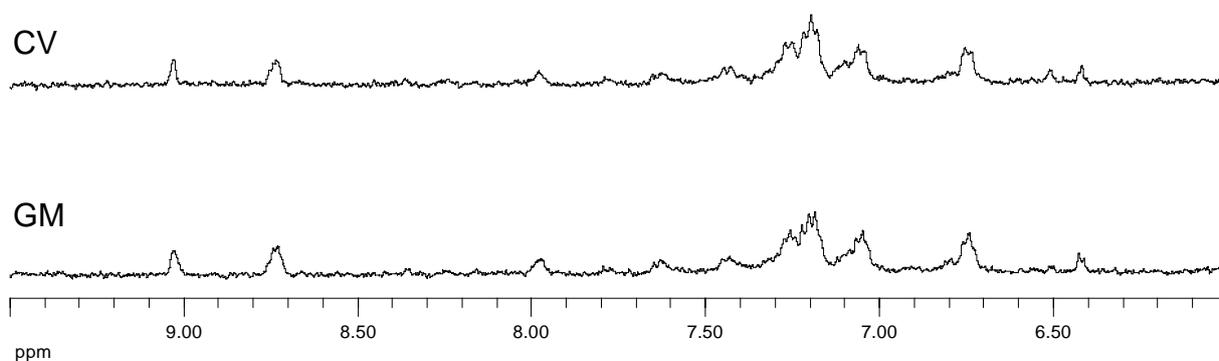


FIGURA 4.10 (Continuação) – Ampliação da região de  $\delta$  9,5 a 6,0 ppm.

Pouca, ou quase nenhuma diferença foi observada em qualquer uma das comparações. Desta forma, fez-se necessário a aplicação de análises estatísticas multivariadas, tais como a análise por componentes principais na exploração dos espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$ .

Seria esperado que na região de  $\delta$  9 a 6 ppm dos espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  fosse rica em informações químicas sobre as amostras de soja em estudo. Nesta, pode ser encontrado sinais de importantes metabólitos secundários,

como dos aminoácidos aromáticos (tirosina, fenilalanina e triptofato) e das isoflavonas, produtos metabólicos resultantes da via do ácido chiquimico e, portanto diretamente influenciados pela modificação genética da soja RR. Porém, a figura 4.10 mostrou sinais com baixa relação sinal/ruído, mesmo com 512 acúmulos.

Com o objetivo de observar mais sinais, foi utilizado uma seqüência de pulsos para a excitação seletiva somente desta região. No entanto, apesar de aumentar significativamente a sensibilidade das medidas, a utilização desta seqüência mostrou os sinais alargados referentes a moléculas de alta massa molecular (Figura 4.11), uma vez que esta seqüência não possui o filtro de  $T_2$ . Inviabilizando assim, a tentativa de observar um número maior de sinais nesta região dos espectros. Várias tentativas de inserção do bloco do filtro de  $T_2$  nesta seqüência foram realizadas, no entanto, todas sem sucesso. O desenvolvimento de uma seqüência de pulso para a excitação seletiva com o filtro de  $T_2$  seria muito interessante.

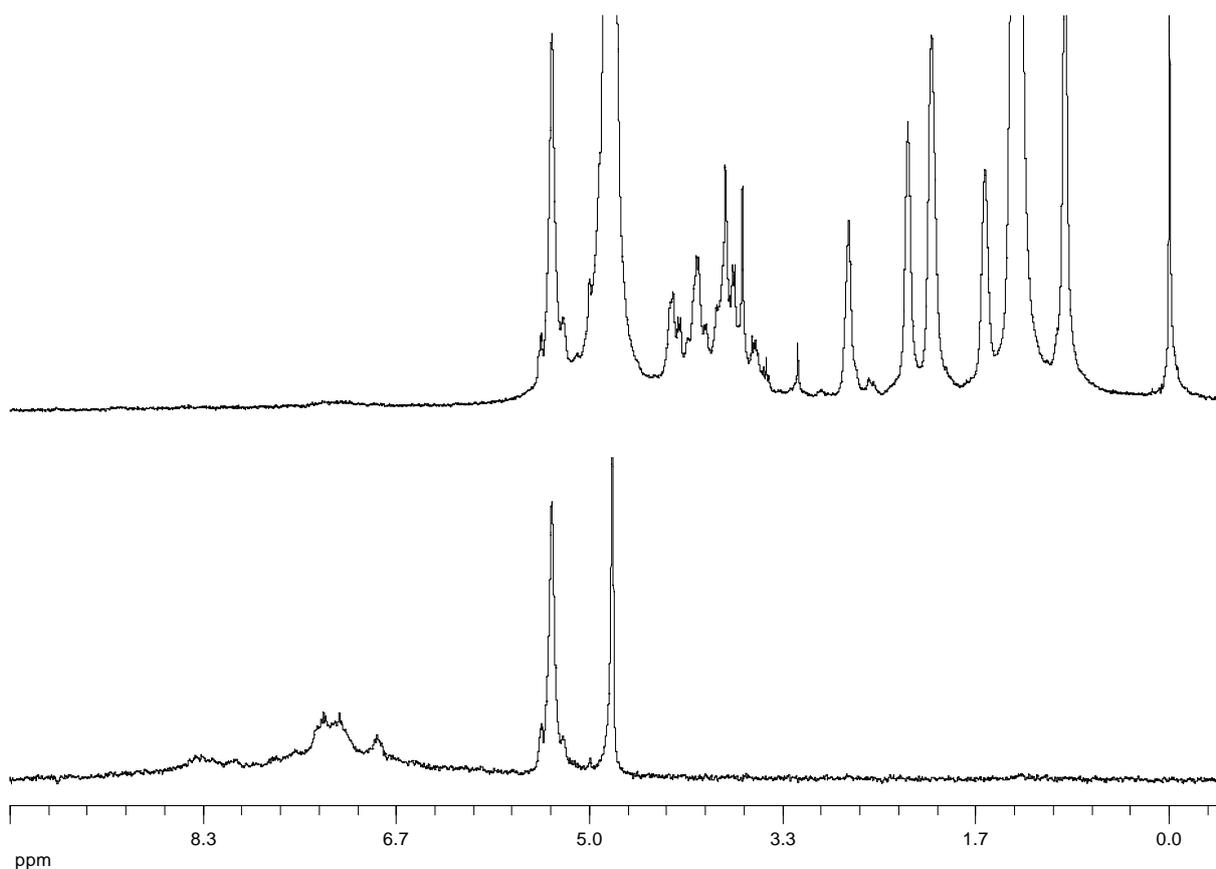


FIGURA 4.11 – Comparação entre espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  adquiridos através da excitação de todas as freqüências (Superior) e somente com excitação seletiva dos sinais de alta freqüência (região de  $\delta$  9,0 a 6,0 ppm) (Inferior). Ambos os espectros foram adquiridos com oito varreduras.

#### 4.4.2 – Análise visual dos espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ das folhas

A análise visual dos espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  de folhas de soja de diferentes cultivares já permite notar pequenas diferenças entre os espectros (Figura 4.12). A figura 4.13 mostra a comparação entre espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  de folhas de plântulas de soja obtidas com sementes de uma mesma cultivar, mas de diferentes origens, em que também pode ser notado algumas diferenças visuais entre os espectros.

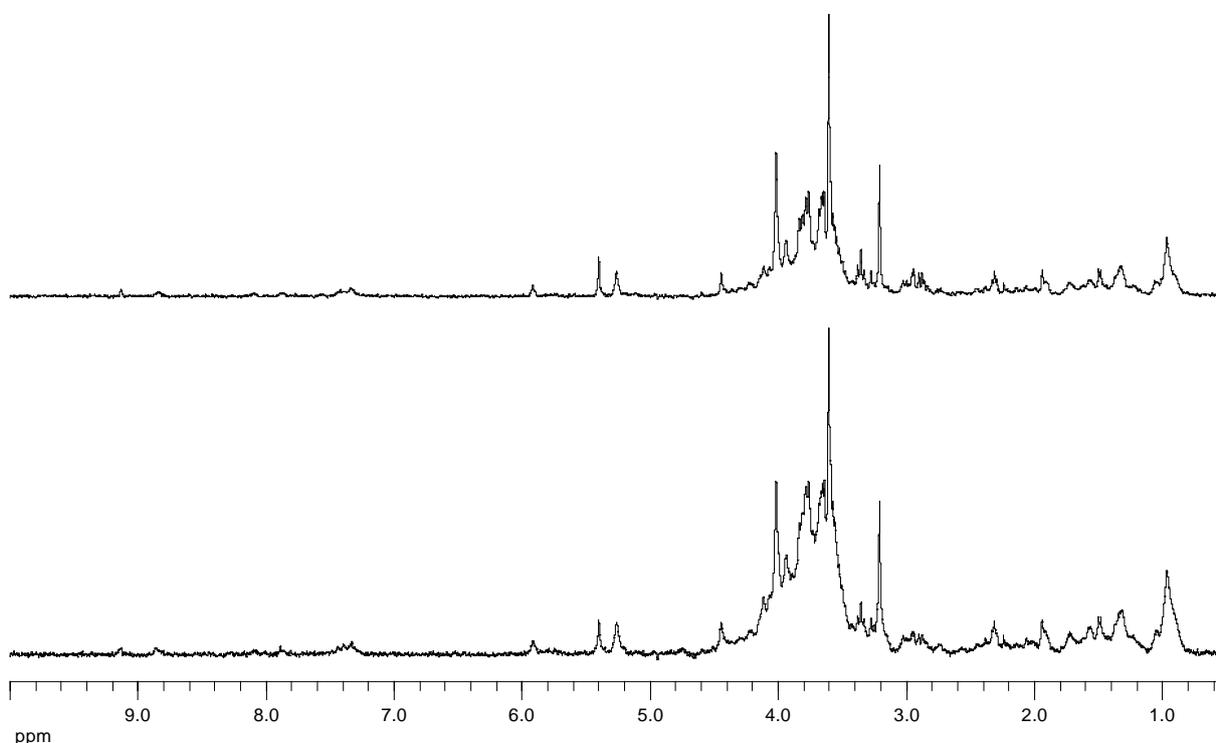


FIGURA 4.12 – Comparação entre espectros de RMN HR-MAS  $^1\text{H}$  de folhas de diferentes cultivares de soja.

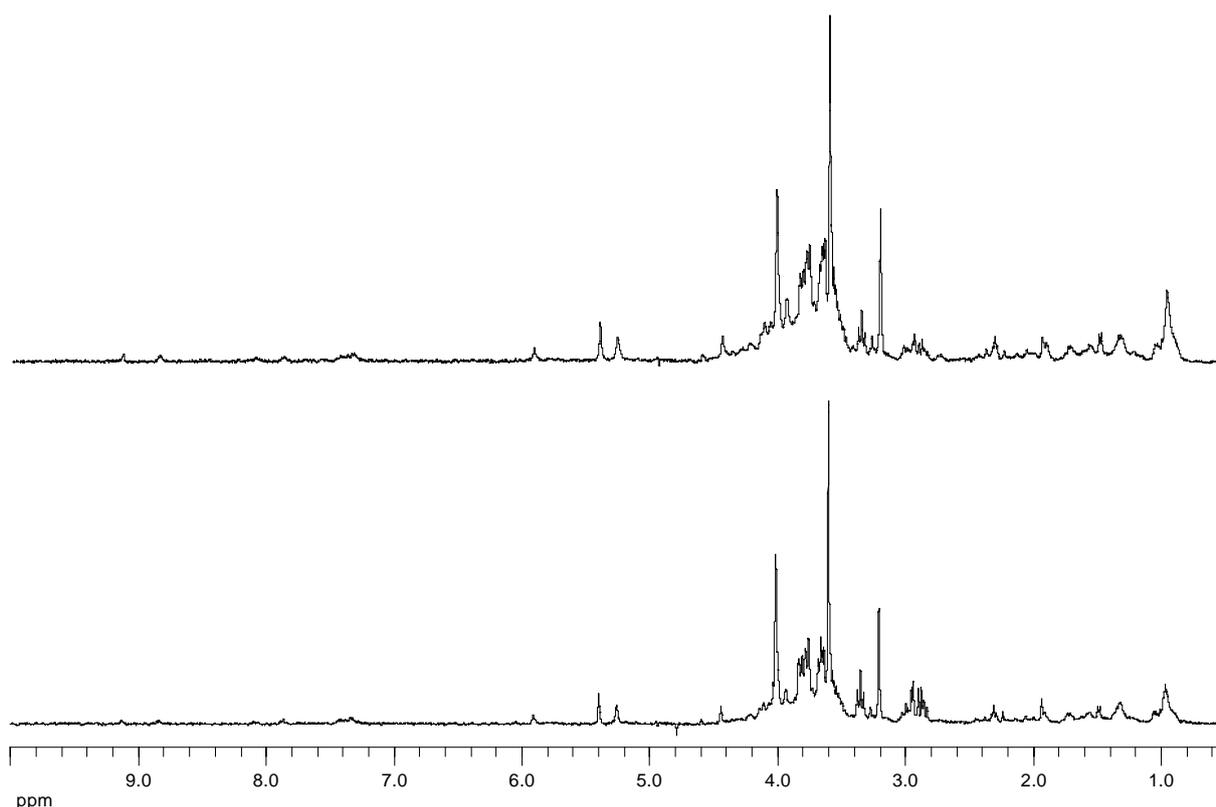


FIGURA 4.13 – Comparação entre espectros de RMN HR-MAS  $^1\text{H}$  de folhas de uma mesma cultivar de soja, porém obtida com sementes de diferentes regiões produtoras.

#### 4.5 – Reprodutibilidade das medidas de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$

Para realizar as análises quimiométricas é necessário que as medidas sejam coletadas replicatas. Assim, é importante que as medidas sejam o mais reprodutíveis quanto possível.

Há duas grandes dificuldades na obtenção de medidas reprodutíveis usando-se a sonda de HR-MAS. A primeira é que não há formas convenientes de colocar sempre a mesma quantidade de amostra dentro do rotor, sendo que o mesmo ocorre para a quantidade de solvente deuterado. Mesmo que fosse adicionado a mesma quantidade de amostra, o controle é perdido no momento da inserção do espaçador esférico, uma vez que o excesso de amostra é eliminado. Neste processo, pode sair mais solvente que amostra e vice versa. As diferenças no empacotamento também ocasionam dificuldades no ajuste da homogeneidade do campo magnético. Desta forma, a reprodutibilidade das medidas exige um trabalho delicado e cauteloso.

A outra dificuldade deve-se a manutenção do giro da amostra a altas velocidades, a qual faz com que os efeitos de alargamento de linha sejam minimizados. Isso exige, uma fonte de ar comprimido estável, com grande capacidade de vazão e de alta pressão, o que por sua vez exige um sistema de produção de ar comprimido de alto desempenho ou o uso de N<sub>2</sub> gasoso. Qualquer alteração nestes parâmetros durante o experimento, acarreta em oscilações na velocidade de giro do rotor, comprometendo a reprodução da medida. Além disso, a sonda de HR-MAS exige que o ar utilizado seja isento de umidade, sendo necessário o emprego de sistemas para remoção da água na linha de ar comprimido. O cumprimento destas exigências tem sido bastante difícil, uma vez que o laboratório de RMN, não dispõe de um sistema adequado de fornecimento de ar comprimido.

Estes inconvenientes, acarretaram na difícil reprodutibilidade das medidas. Sendo assim, a aquisição de dados apenas triplicata, quando obtidos usando-se a sonda de HR-MAS, não é suficiente e, portanto, um número maior de repetições é necessário. Na figura 4.14 pode ser observado a baixa reprodutibilidade das medias de RMN HR-MAS de <sup>1</sup>H de amostras de sementes de soja. Desta forma, buscou-se obter o maior número de replicatas quanto possível. Com o aumento do número de replicatas, as medidas tendem cada vez mais a uma distribuição normal com menores intervalos de confiança, aumentando a precisão dos resultados e diminuindo a influência de erros experimentais nas análises quimiométricas. Na literatura, medidas apenas em triplicatas raramente tem sido observadas.

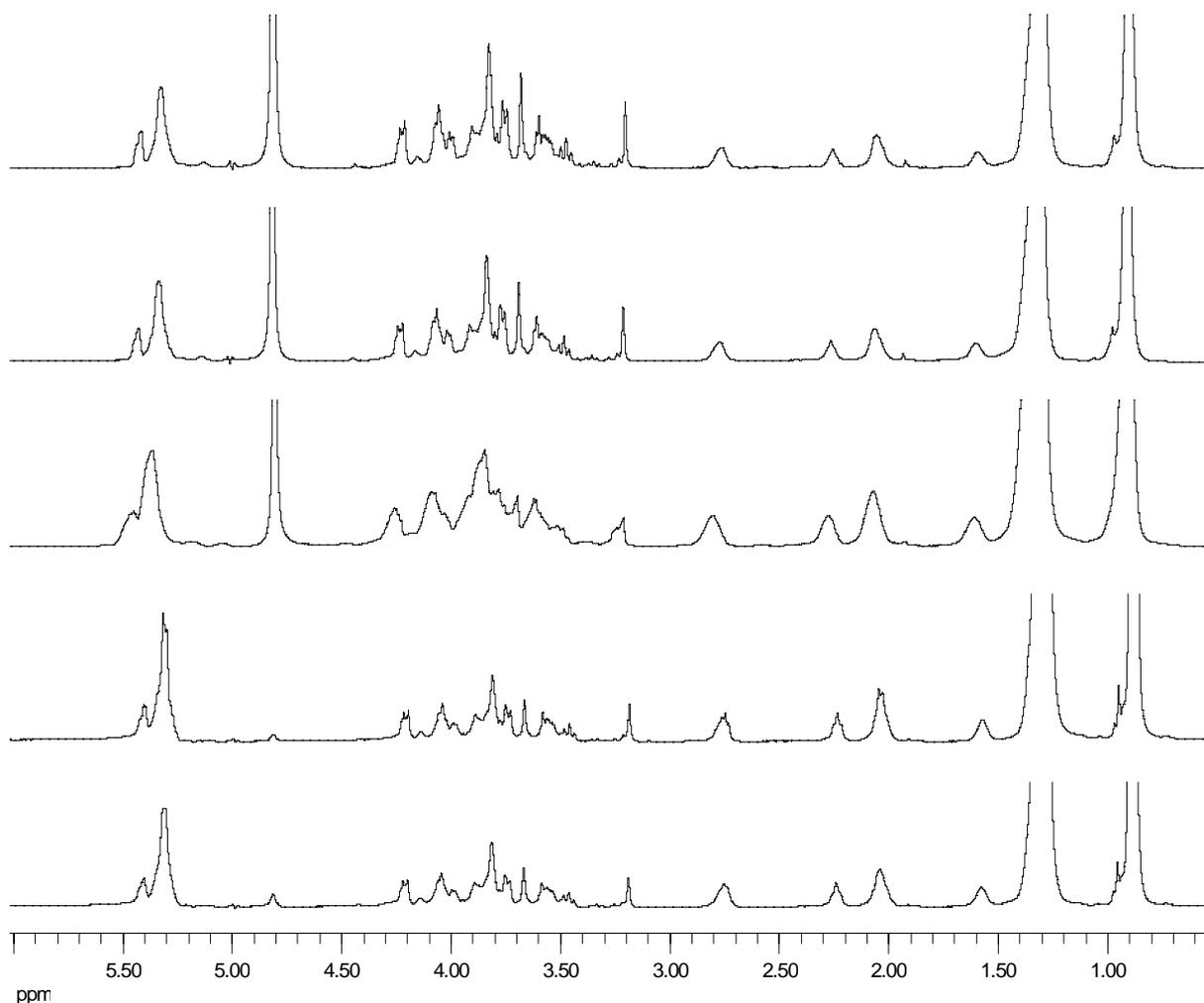


FIGURA 4.14 – Replicatas de espectros de RMN HR-MAS  $^1\text{H}$  adquiridos de sementes de uma mesma cultivar de soja.

Por outro lado, as medidas obtidas para folhas de plântulas de soja apresentaram uma maior reprodutibilidade de seus espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  (Figura 4.15). Este fato está relacionado às medidas de folhas terem sido realizados nas etapas finais deste trabalho, na qual havia uma maior experiência de trabalho com a técnica de RMN HR-MAS, tanto com relação a estabilidade do giro da amostra no ângulo mágico, quanto no preparo e empacotamento da amostra.

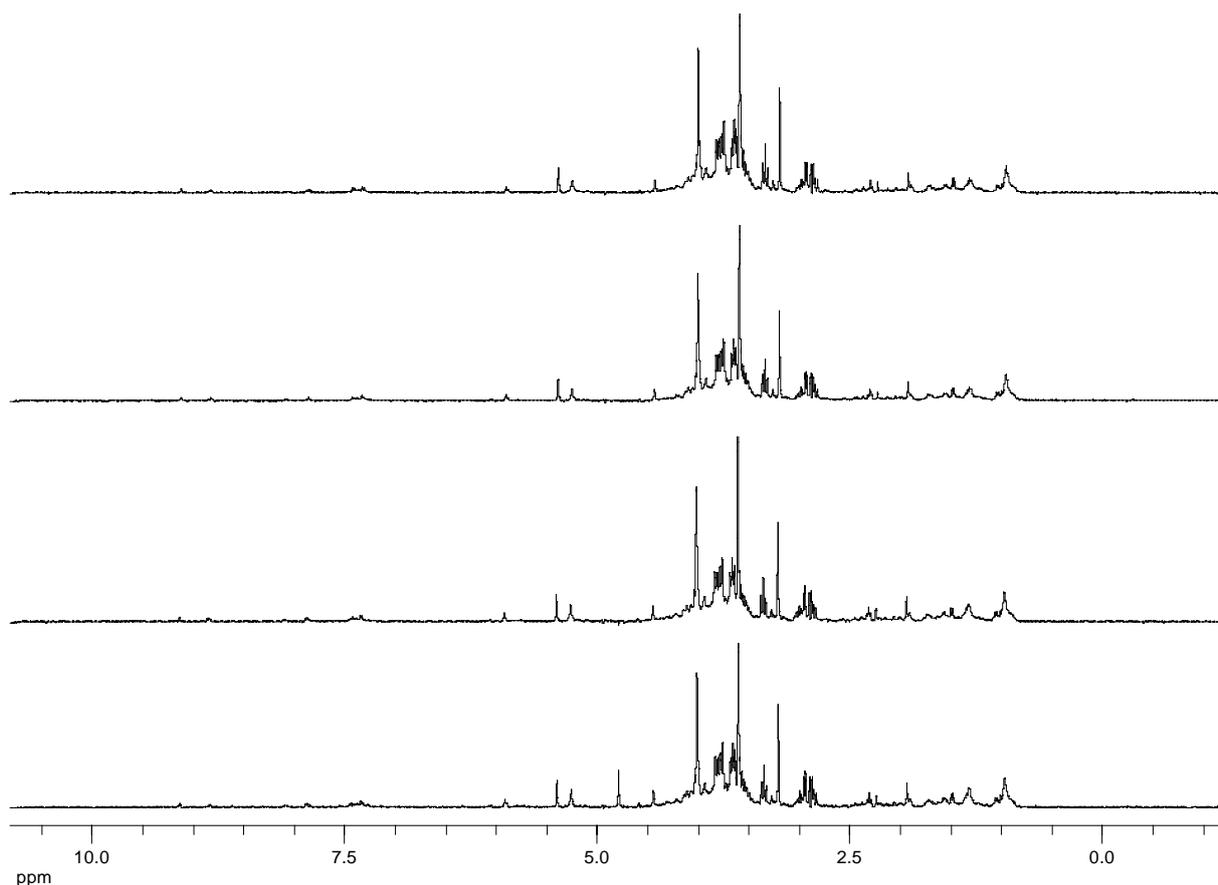


FIGURA 4.15 – Replicatas de espectros de RMN HR-MAS  $^1\text{H}$  adquiridos de folhas de uma mesma cultivar de soja.

Nas análises iniciais, os espectros foram obtidos apenas em triplicata para cada classe de amostras. Como conseqüência, as análises exploratórias destes conjuntos de dados não conseguiram discriminar as amostras em suas respectivas classes. É interessante mencionar que com o decorrer do desenvolvimento dos trabalhos foi se ganhando experiência e prática na obtenção das medidas as quais foram se tornando cada vez mais reprodutíveis.

#### 4.6 – Atribuição dos sinais nos espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$ de sementes de soja

Os espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  obtidos diretamente das sementes de soja, apresentaram sinais característicos de triacilgliceróis, uma vez que as sementes apresentam de 20 a 30 % de óleo. Os triacilgliceróis encontrados no óleo de soja são aqueles compostos por unidades de ácidos graxos esterificadas

a unidades glicerol, sendo os principais os insaturados, oleico, linoleico e linolênico e uma pequena parte de saturados (Figura 4.16) (Vigli e col., 2003; Knothe e Kenar, 2004).

Através da comparação com a literatura (Mannina e col., 2003; Sacchi e col., 1997; Vigli e col., 2003; Fauhl e col., 2000; Knothe e Kenar, 2004) os sinais dos triacilgliceróis foram reconhecidos. O sinal em  $\delta$  0,89 (A na figura 4.17) foi atribuído aos grupos metilas dos ésteres oleato, linoleato e todos os saturados. O sinal em  $\delta$  0,95 (B na figura 4.17) é referente ao grupo metila somente do éster linolenato. Este sinal apresenta-se um pouco mais desprotegido que os demais sinais dos grupos metilas, devido a proximidade deste a uma dupla ligação. O sinal em  $\delta$  1,30 (C na figura 4.17) foi atribuído a todos os grupos metilênicos, exceto os  $\alpha$  e  $\beta$  carbonílicos e  $\alpha$  olefínicos de todos os ésteres graxos. O sinal em  $\delta$  1,58 (D na figura 4.17) foi atribuído aos grupos metilênicos  $\beta$  carbonílicos, enquanto que, o sinal em  $\delta$  2,03 (E na figura 4.17) foi atribuído aos grupos metilênicos  $\alpha$  olefínicos, exceto aqueles entre olefinas. O sinal em  $\delta$  2,24 (F na figura 4.17) foi atribuído aos grupos metilênicos  $\alpha$  carbonílicos de todos os ésteres graxos. O sinal em  $\delta$  2,75 (G na figura 4.17) foi atribuído aos grupos metilênicos, localizados entre olefinas, dos ésteres linoleato e linolenato. O sinal em  $\delta$  5,32 (H na figura 4.17) foi atribuído a todos os hidrogênios olefínicos dos ésteres insaturados e também ao hidrogênio da posição  $\beta$  da unidade de glicerol. Os sinais referentes aos hidrogênios metilênicos da posição  $\alpha$  do glicerol não puderam ser atribuídos somente com base nos espectros de RMN HR-MAS de hidrogênio, pois estes estão na região de  $\delta$  4,50 a 3,50 ppm a qual apresentou alta sobreposição de sinais. A atribuição destes foi realizada com o auxílio de experimentos de COSY e 1D-NOE, discutido mais adiante neste trabalho. As atribuições estão resumidas na tabela 4.1. Os deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  obtidos *in situ*, apresentaram uma boa concordância com aqueles descritos na literatura, quando obtidos em solução de  $\text{CDCl}_3$  (Tabela 4.1). Esta concordância também pode ser observada na figura 4.4, em que se tem a comparação de um espectro de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  de sementes de soja com um espectro de óleo de soja.

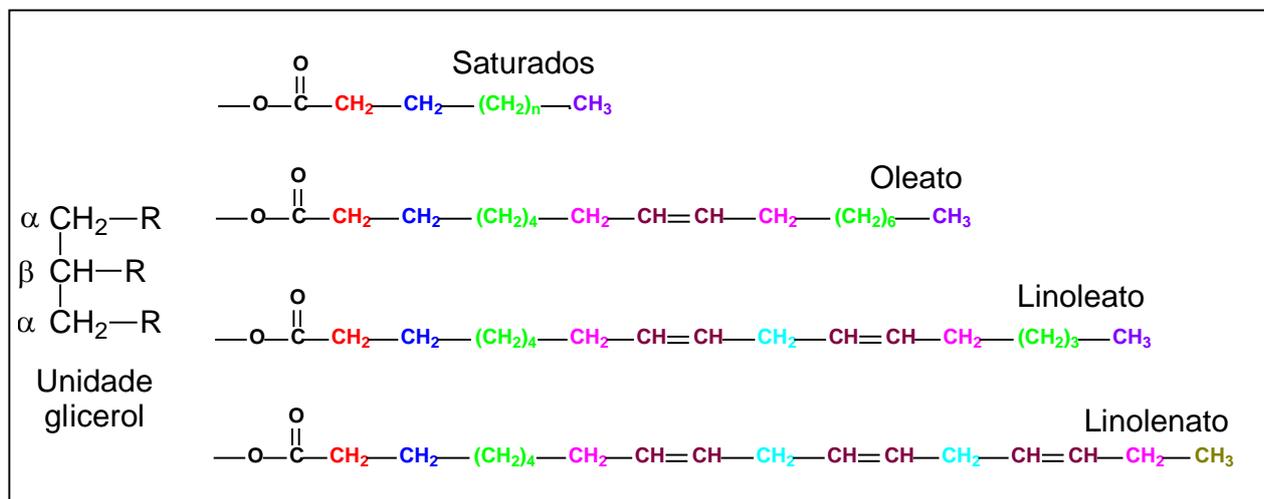


FIGURA 4.16 – Representação dos vários tipos de ésteres graxos e da unidade de glicerol, destacando os tipos de hidrogênio, em que R pode ser qualquer um dos ésteres. Esta figura pode ser analisada em conjunto com a tabela 4.1.

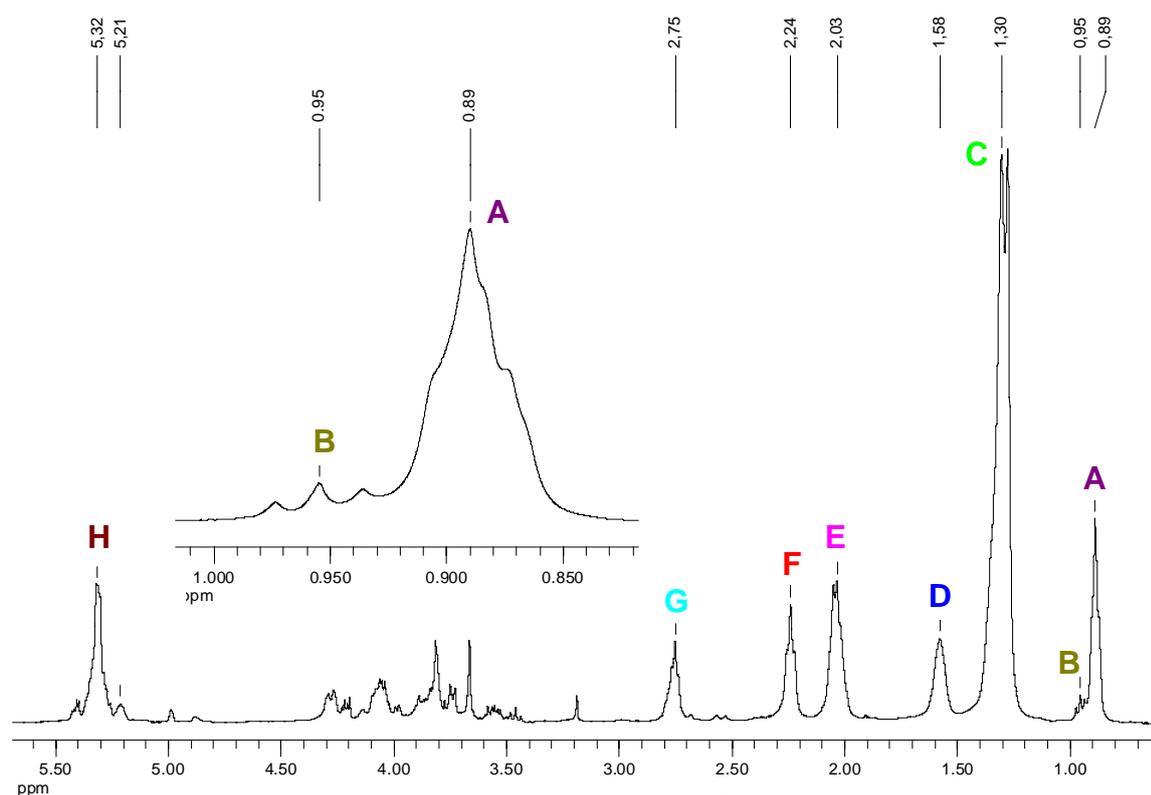


FIGURA 4.17 – Espectro de RMN HR-MAS de <sup>1</sup>H de sementes de soja. A figura inserida mostra a expansão em que o tripleto referente a metila do ácido linolênico pode ser observada.

TABELA 4.1 – Atribuição dos deslocamentos químicos de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  dos triacilgliceróis de sementes de soja.

Sinal	$\delta^a$ (ppm)	$\delta^b$ (ppm)	Hidrogênio	Descrição
A	0,89	0,85	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n$	Grupos metilas de todas as cadeias alquílicas, exceto do linolenato
B	0,95	0,95	$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$	Grupo metila do éster linolenato
C	1,30	1,20	$(\text{CH}_2)_n$	Grupos metilênicos de todas as cadeias alquílicas
D	1,58	1,60	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOR}$	Grupos metilênicos $\beta$ carbonilas de todas as cadeias alquílicas
E	2,03	2,02	$-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$	Grupos metilênicos $\alpha$ olefínicos dos ésteres insaturados
F	2,24	2,20	$-\text{CH}_2-\text{COOR}$	Grupos metilênicos $\alpha$ carbonilas de todas cadeias alquílicas
G	2,75	2,76	$-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$	Grupos metilênicos entre olefinas dos ésteres linoleato e linolenato
H	5,32	5,29	$-\text{CH}=\text{CH}-$	Grupos metílicos de todos os ésteres insaturados
$\beta$	5,21	5,15	$>\text{CH}-\text{OCOR}$	hidrogênio $\beta$ da unidade de glicerol
$\alpha$	4,28	4,25	$-\text{CH}_2-\text{OCOR}$	hidrogênios $\alpha$ da unidade de glicerol
	4,08	4,10		

<sup>a</sup> Valores referenciados pelo sinal do padrão interno de TMS- $d_4$  em  $\delta$  0,00 ppm.

<sup>b</sup> Valores retirados da literatura (Sacchi e col., 1997), obtidos em  $\text{CDCl}_3$  a 30 °C.

No entanto, a simples comparação não garante que estas atribuições estejam corretas, uma vez que as condições ambientais das amostras são totalmente diferentes, podendo os sinais estarem trocados. Desta forma, para confirmar a atribuição dos triacilgliceróis foi adquirido um experimento de gCOSY.

Neste experimento foi observado uma única correlação do sinal em  $\delta$  2,24 com o sinal em  $\delta$  1,58 (Figura 4.18). Este último por sua vez, além da correlação já mencionada apresentou uma outra correlação com o sinal em  $\delta$  1,30 confirmando a atribuição destes sinais. Já o sinal em  $\delta$  1,30 apresentou correlações adicionais com os sinais das metilas terminais em  $\delta$  0,89 referentes aos grupos metilas dos ésteres, oleato, linoleato e de cadeia saturada, além da correlação com o sinal em  $\delta$  2,03 referente aos grupos metilênicos  $\alpha$  olefínicos (Figura 4.18). O sinal em  $\delta$  2,03 por sua vez mostrou uma correlação adicional com o sinal em  $\delta$  5,32 referente aos hidrogênios olefínicos de todos os ésteres insaturados. Também foi observado a correlação característica deste com o sinal da metila terminal em  $\delta$  0,95

do éster linolenato (Figura 4.18, ampliação superior). Foi verificada também uma correlação do sinal dos hidrogênios olefínicos com o sinal em  $\delta$  2,75 referentes aos grupos metilênicos localizados entre grupos olefínicos existentes somente nos ésteres linoleato e linolenato.

Através do experimento de *g*COSY foi possível também atribuir os deslocamentos químicos dos hidrogênios da unidade de glicerol, pela correlação do sinal em  $\delta$  5,21 referente ao hidrogênio  $\beta$  com os sinais em aproximadamente  $\delta$  4,28 e 4,08 referentes aos dois hidrogênios  $\alpha$  (Figura 4.18, ampliação inferior). Estas atribuições foram confirmadas pela realização de um experimento de *g*NOE, unidimensional, em que o sinal em  $\delta$  5,21 foi irradiado, sendo observado nOe nos sinais em  $\delta$  4,28 e 4,08 (Figura 4.19). Assim, pode-se realizar a atribuição completa de todos os deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  dos triacilgliceróis, no seu ambiente natural (*in situ*) e na ausência de solventes. Os dados estão resumidos na tabela 4.1. Sacco e *col.* (1998) descrevem o assinalamento *in situ* de sinais de triacilgliceróis, no caso de amostras de trigo por meio da técnica de HR-MAS, encontrando valores sempre mais protegidos que os observados em nossos estudos. Porém, naquele trabalho não há evidências de que os espectros foram calibrados em relação a um padrão interno, como em nosso trabalho. Além disso, os autores não descrevem a atribuição do sinal referente ao grupo metila do éster linolenato e nem dos hidrogênios da unidade de glicerol. Outra questão é a de que Sacco e *col.* (1998) ao contrário de nosso trabalho, utilizaram o experimento de TOCSY para confirmar a atribuição dos sinais de  $^1\text{H}$ . No entanto, o experimento de COSY é o que extrair maiores informações estruturais, revelando as conectividades ponto a ponto.

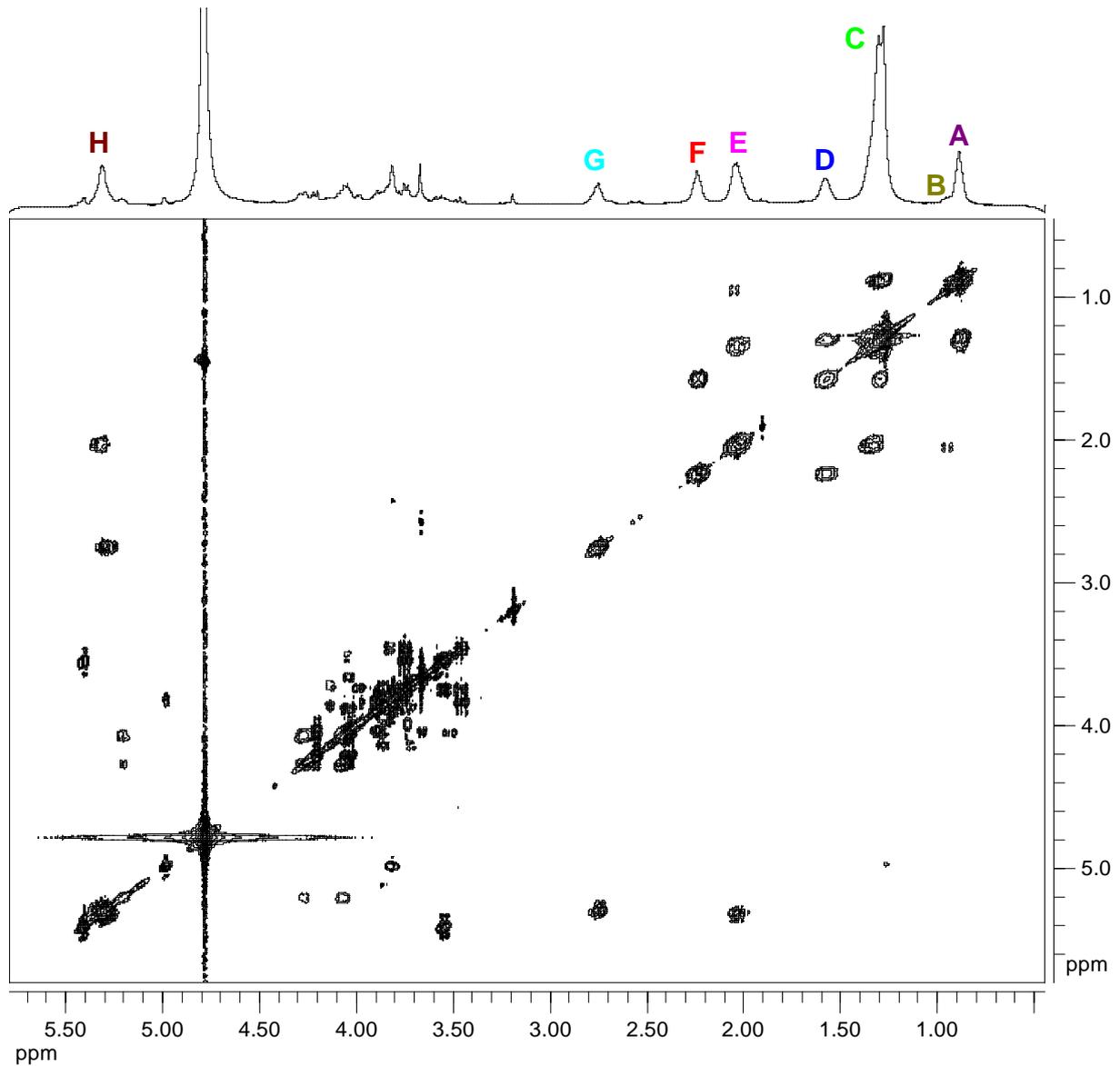


FIGURA 4.18 – Correlações  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  *in situ* observadas no experimento de gCOSY, adquirido na sonda de HR-MAS para amostras de sementes de soja.

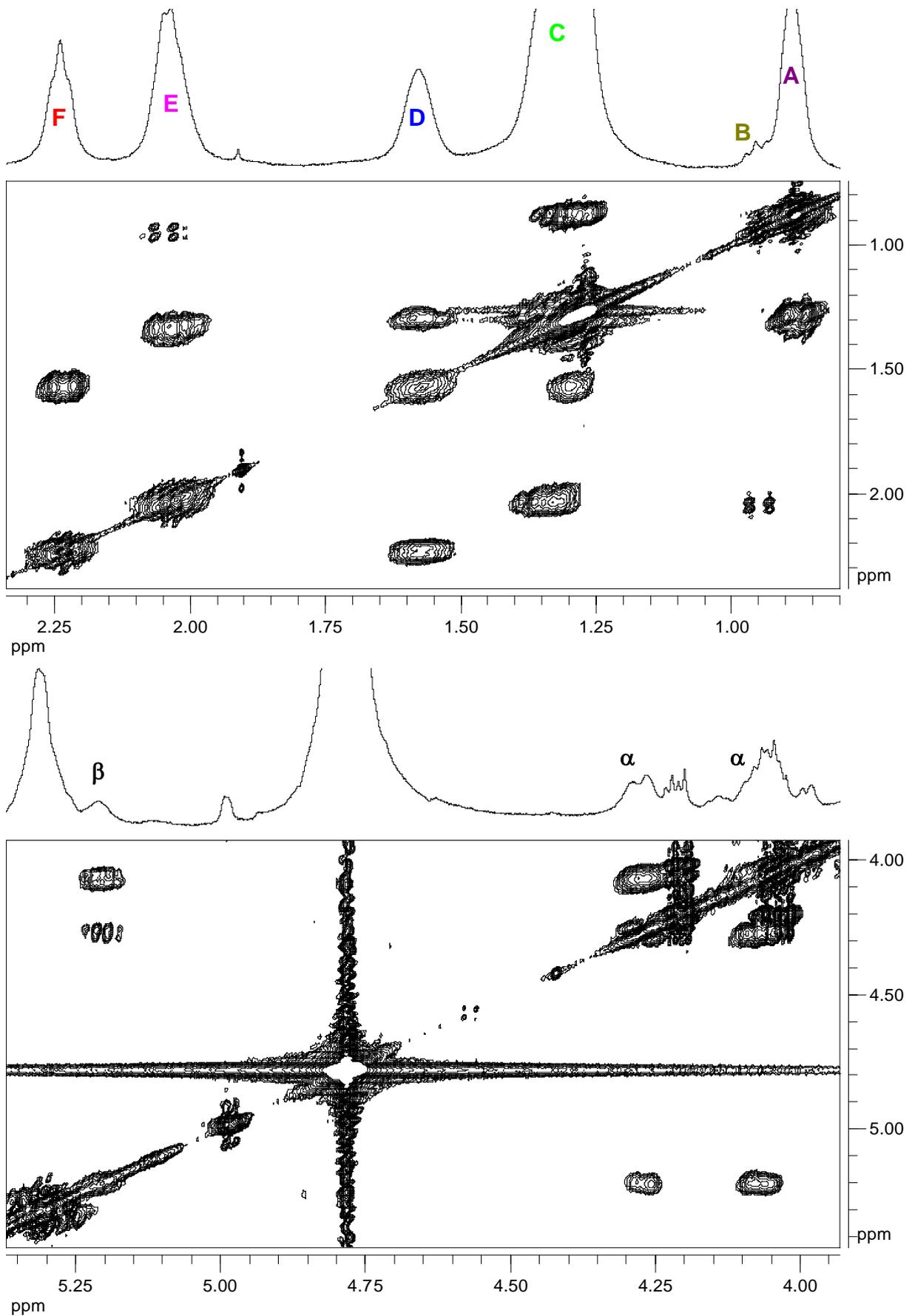


FIGURA 4.18 (Ampliações) – Correlações  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  *in situ* observadas no experimento de gCOSY, adquiridos na sonda de HR-MAS para amostras de sementes de soja.

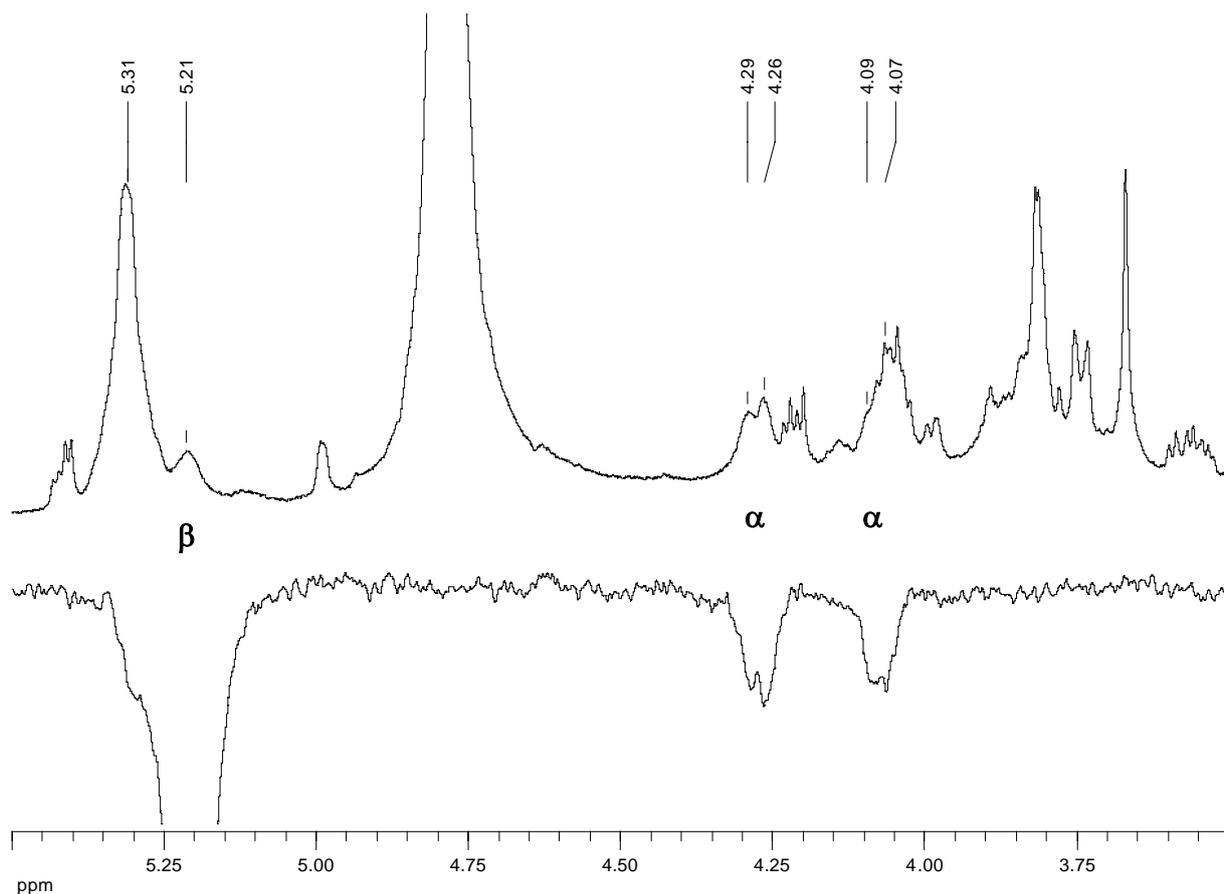


FIGURA 4.19 – Experimento de HR-MAS 1D-gNOE (Inferior) em que o hidrogênio em  $\delta$  5,21 foi irradiado comparado com um espectro de hidrogênio (Superior) de uma amostra de semente de soja, destacando-se a região entre 5,5 a 3,5 ppm.

Através da aquisição de experimentos de *g*HSQC e *g*HMBC adquiridos diretamente de uma amostra de sementes de soja foi possível obter os deslocamentos químicos de RMN HR-MAS de  $^{13}\text{C}$  *in situ* dos triacilgliceróis.

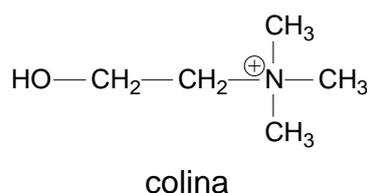
No experimento de *g*HSQC, os sinais em  $\delta$  0,85 e 0,95 referente às metilas terminais dos ésteres graxos mostraram correlações  $^1J_{\text{CH}}$  com  $^{13}\text{C}$  em  $\delta$  16,8 (Figura 4.20). Enquanto que, no experimento de *g*HMBC, estes sinais mostraram correlações  $^{\text{LR}}J_{\text{CH}}$  em  $\delta$  25,6 e 34,6 (Figura 4.21). O sinal em  $\delta$  1,30 referente a grupos metilênicos, exceto aqueles  $\alpha$  e  $\beta$  carbonilas e  $\alpha$  olefinas, mostraram correlações  $^1J_{\text{CH}}$  em  $\delta$  25,6, 32,5 e 34,6 e  $^{\text{LR}}J_{\text{CH}}$  em  $\delta$  16,8, 25,6, 32,5 e 34,6. O sinal em  $\delta$  1,58 referente a grupos metilênicos  $\beta$  carbonilas mostrou correlação  $^1J_{\text{CH}}$  em  $\delta$  27,7, enquanto que a  $^{\text{LR}}J_{\text{CH}}$  apresentou correlações em  $\delta$  32,5 e 36,6. O sinal em  $\delta$  2,24 referente a grupos metilênicos  $\alpha$  carbonila, apresentou correlação  $^1J_{\text{CH}}$  em  $\delta$  36,6, além das correlações  $^{\text{LR}}J_{\text{CH}}$  em  $\delta$  27,7, 32,5 e 174,5, confirmando-se assim as

atribuições de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para estes grupos (Figura 4.21). O sinal em  $\delta$  2,03, referente a grupos metilênicos  $\alpha$  olefinas, mostrou correlação  $^1J_{\text{CH}}$  em  $\delta$  29,9 (Figura 4.20), enquanto que a  $^{\text{LR}}J_{\text{CH}}$  em  $\delta$  35,5, 34,6, 130,4 e 132,4, sendo que a correlação com o sinal em  $\delta$  130,4 foi menos intensa que a correlação em  $\delta$  132,4, permitindo atribuir os deslocamentos químicos dos diferentes tipos de carbonos olefínicos nas cadeias alquílicas dos ésteres graxos (Tabela 4.2). Já o sinal em  $\delta$  2,75, referente aos grupos metilênicos localizados entre olefinas, mostrou correlação  $^1J_{\text{CH}}$  em  $\delta$  28,4 (Figura 4.20) e  $^{\text{LR}}J_{\text{CH}}$  apenas correlações em  $\delta$  130,4 e 132,4 referentes aos carbonos olefínicos, porém neste caso a correlação mais intensa foi observada com o sinal em  $\delta$  130,4 e menos intensa com o sinal em  $\delta$  132,4, o que esta de acordo com as posições destes grupos nas moléculas (Figura 4.21 e 4.22). O sinal em  $\delta$  5,32, referente aos hidrogênios olefínicos, apresentou correlações  $^1J_{\text{CH}}$  em  $\delta$  130,4 e 132,4 e  $^{\text{LR}}J_{\text{CH}}$  em  $\delta$  28,4 e 29,9, ou seja somente com os carbonos  $\alpha$  olefínicos. As correlações  $^{\text{LR}}J_{\text{CH}}$  com os sinais em  $\delta$  130,4 e 132,4, esperadas no experimento de *g*HMBC, não foram observadas. O hidrogênio  $\beta$  da unidade de glicerol em  $\delta$  5,21 apresentou uma correlação  $^1J_{\text{CH}}$  em  $\delta$  71,8, enquanto que ambos os hidrogênios  $\alpha$  em  $\delta$  4,08 e 4,28 mostraram correlação com o mesmo sinal em  $\delta$  64,7 (Figura 4.20), revelando os deslocamentos químicos de RMN HR-MAS de  $^{13}\text{C}$  da unidade de glicerol dos triacilgliceróis. Já no experimento de *g*HMBC, foi possível identificar correlações  $^{\text{LR}}J_{\text{CH}}$  dos hidrogênios  $\alpha$  com os carbonos em  $\delta$  71,8 e 174,5 ppm, confirmando a esterificação dos ácidos graxos à unidade de glicerol (Figura 4.21). Por outro lado, os sinais menos intensos, no espectro de hidrogênio, não apresentaram correlações no experimento de *g*HMBC, devido ao tempo de aquisição utilizado não ter sido suficiente.

Estes resultados colaboraram para confirmar a atribuição dos deslocamentos químicos de hidrogênio e acrescentar a correta atribuição de RMN HR-MAS de  $^{13}\text{C}$  *in situ*, que estão resumidos na tabela 4.2. Em geral todos os deslocamentos químicos de RMN de  $^{13}\text{C}$  obtido das amostras apresentaram valores mais desprotegidos que os descritos na literatura, em torno de 2,5 ppm, (Tabela 4.2). Sacco e *col.* (1998) descrevem os deslocamentos químicos de RMN de  $^{13}\text{C}$  *in situ*, obtidos através de correlações heteronucleares  $^1J_{\text{CH}}$ , como sendo os mesmos valores descritos para amostras em solução de  $\text{CDCl}_3$ . No entanto, como já foi mencionado, não há evidências de que tais experimentos tenham sido

referenciados. Além disso, no referido trabalho não foram realizados experimentos para observações de correlações heteronucleares  ${}^{\text{LR}}J_{\text{CH}}$ , o que possibilitaria a atribuição dos sinais das carbonilas, não obtidos no referido trabalho. Sendo assim, pelo nosso conhecimento é a primeira vez que se descreve a completa atribuição dos deslocamentos químicos de RMN de  ${}^1\text{H}$  e  ${}^{13}\text{C}$  *in situ* dos triacilgliceróis, especificamente em sementes de soja (*Glycine max* L.).

O singlete em  $\delta$  3,19 (Figura 4.17) mostrou correlação  ${}^1J_{\text{CH}}$  em  $\delta$  56,7 ppm (Figura 4.20), sendo que a mesma correlação a  ${}^{\text{LR}}J_{\text{CH}}$  foi observada (Figura 4.21), além daquela em  $\delta$  70,2 ppm. Estas informações nos levaram a concluir que estes dados são referentes a colina. Primeiro, por ter sido observado a mesma correlação  ${}^1\text{H}$ - ${}^{13}\text{C}$  tanto a  ${}^1J_{\text{CH}}$  quanto a  ${}^{\text{LR}}J_{\text{CH}}$ , característico da presença de grupos idênticos e também pela correlação  ${}^{\text{LR}}J_{\text{CH}}$  dos hidrogênios da metilas em  $\delta$  3,19 com um sinal de em  $\delta$  70,2 ppm, o qual está de acordo com o deslocamento químico esperado para o carbono metilênico ligado ao nitrogênio quaternário. Já os deslocamentos químicos dos hidrogênios metilênicos não puderam ser atribuídos, uma vez que os sinais esperados para estes estariam em torno de  $\delta$  4,0 e 3,8 ppm e, portanto, numa região bastante congestionada dos espectros de RMN HR-MAS de  ${}^1\text{H}$  das sementes de soja (Figura 4.17). Sendo assim, também não foi possível atribuir o deslocamento químico do carbono carbinólico da colina. Além disso, o deslocamento químico de RMN de  ${}^1\text{H}$  em  $\delta$  3,19, referentes aos grupos metilas ligados ao nitrogênio, está de acordo com o observado por Gil e *col.* (2000) em espectros de RMN HR-MAS de polpa de manga. Este sinal também está presente no trabalho de Sacco e *col.* (1998) para amostras de farinha de trigo. Inclusive pode ser observado uma correlação  ${}^1J_{\text{CH}}$  deste sinal com um carbono em torno de  $\delta$  54 ppm. No entanto os autores não atribuem estes dados a nenhum composto.



O sinal em  $\delta$  3,46 ppm (Figura 4.17), o qual aparentemente apresenta-se como um tripleto ( $J$  9,3 Hz) mostrou correlação  ${}^1J_{\text{CH}}$  em  $\delta$  71,9 ppm (Figura 4.20)

o que sugere, a princípio, um grupo carbinólico. Correlações  ${}^{\text{LR}}J_{\text{CH}}$  não foram observadas para este sinal. No experimento de *g*COSY o sinal em  $\delta$  3,46 ppm apresentou uma única correlação em  $\delta$  3,75 ppm (Figura 4.18), não sendo possível afirmar a multiplicidade deste último devido a alta sobreposição de sinais nesta região dos espectros de RMN de  ${}^1\text{H}$ . O sinal  $\delta$  3,75 ppm por sua vez apresentou correlação  ${}^1J_{\text{CH}}$  em  $\delta$  75,4 ppm (Figura 4.20) e  ${}^{\text{LR}}J_{\text{CH}}$  em  $\delta$  71,9 ppm (Figura 4.21), revelando a presença de outro grupo carbinólico e confirmando que ambos os sinais de RMN de  ${}^1\text{H}$  em  $\delta$  3,46 e 3,75 ppm e de  ${}^{13}\text{C}$  em  $\delta$  75,4 e 71,9 ppm são referentes a mesma unidade molecular, não sendo possível estabelecer uma provável estrutura.

Gil e *col.* (2000) em estudos com amostras vegetais atribuíram o sinal em  $\delta$  3,46 ppm como sendo referente a hidrogênios metínicos, com exceção do anomérico, de unidades de  $\beta$ -galactose e/ou  $\beta$ -arabinose. No entanto, no referido trabalho, os autores observaram correlação deste sinal com outro sinal de hidrogênio em  $\delta$  4,57, o qual não foi observado em nossos experimentos, provavelmente por se tratar de sacarídeos diferentes. Nem se quer observou-se a presença do sinal em  $\delta$  4,57 nos espectros de RMN HR-MAS de  ${}^1\text{H}$  das amostras de sementes de soja. Além disso, nos espectros de RMN HR-MAS de  ${}^1\text{H}$  obtidos por Gil e *col.* (2000), este sinal não se apresenta como um tripleto perfeito, da mesma forma que é observado em nossos resultados e, portanto indicativo de se tratar do mesmo composto.

Ainda, o singlete em  $\delta$  3,68 mostrou correlações  ${}^1J_{\text{CH}}$  em  $\delta$  66,4 ppm (Figura 4.20) e  ${}^{\text{LR}}J_{\text{CH}}$  em  $\delta$  79,6 e 106,6. Já o sinal em  $\delta$  5,00 mostrou correlação  ${}^1J_{\text{CH}}$  em  $\delta$  101,2, enquanto que os sinais em  $\delta$  5,42 e 5,44 ppm apresentaram correlações  ${}^1J_{\text{CH}}$  com um mesmo sinal em  $\delta$  95,00 ppm (Figura 4.20) típicos de posições anoméricas de glucosídeos. No experimento de *g*HMBC foi observado somente correlações  ${}^{\text{LR}}J_{\text{CH}}$  para o sinal em  $\delta$  5,42 ppm em  $\delta$  75,6 e 106,8 ppm (Figura 4.21). Todas estas informações são características de unidades glucosídicas.

Muitas outras correlações foram observadas nos experimentos de *g*HSQC e *g*HMBC, porém estas apresentam alta sobreposição, não sendo possível extrair informações o suficientes para a atribuição de compostos presentes nas sementes de soja. (Figuras 4.20 e 4.21).

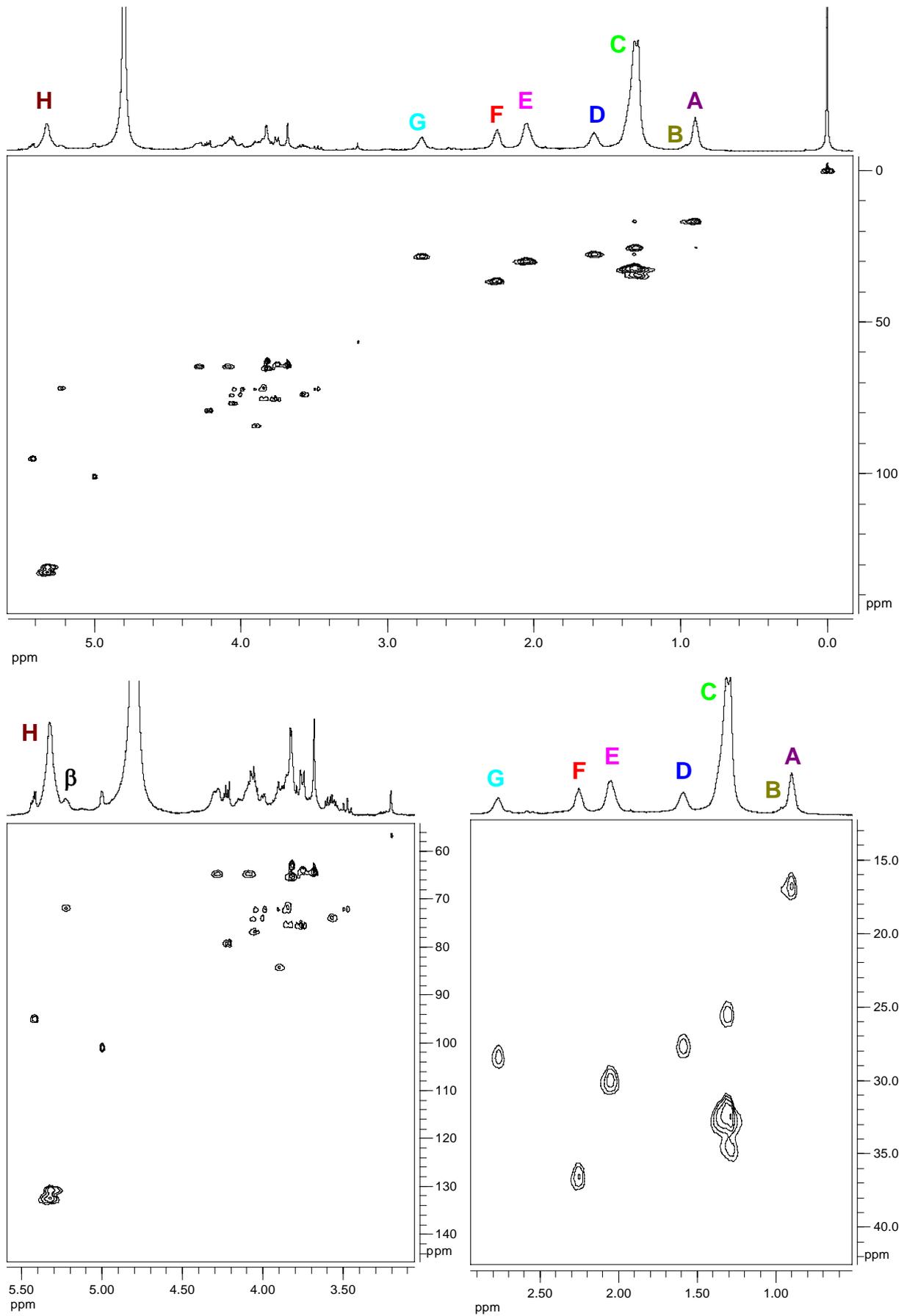


FIGURA 4.20 – Correlações  $^1\text{J } ^1\text{H}-^{13}\text{C}$ , observadas no experimento de gHSQC, adquiridos na sonda de HR-MAS para amostras de sementes de soja.

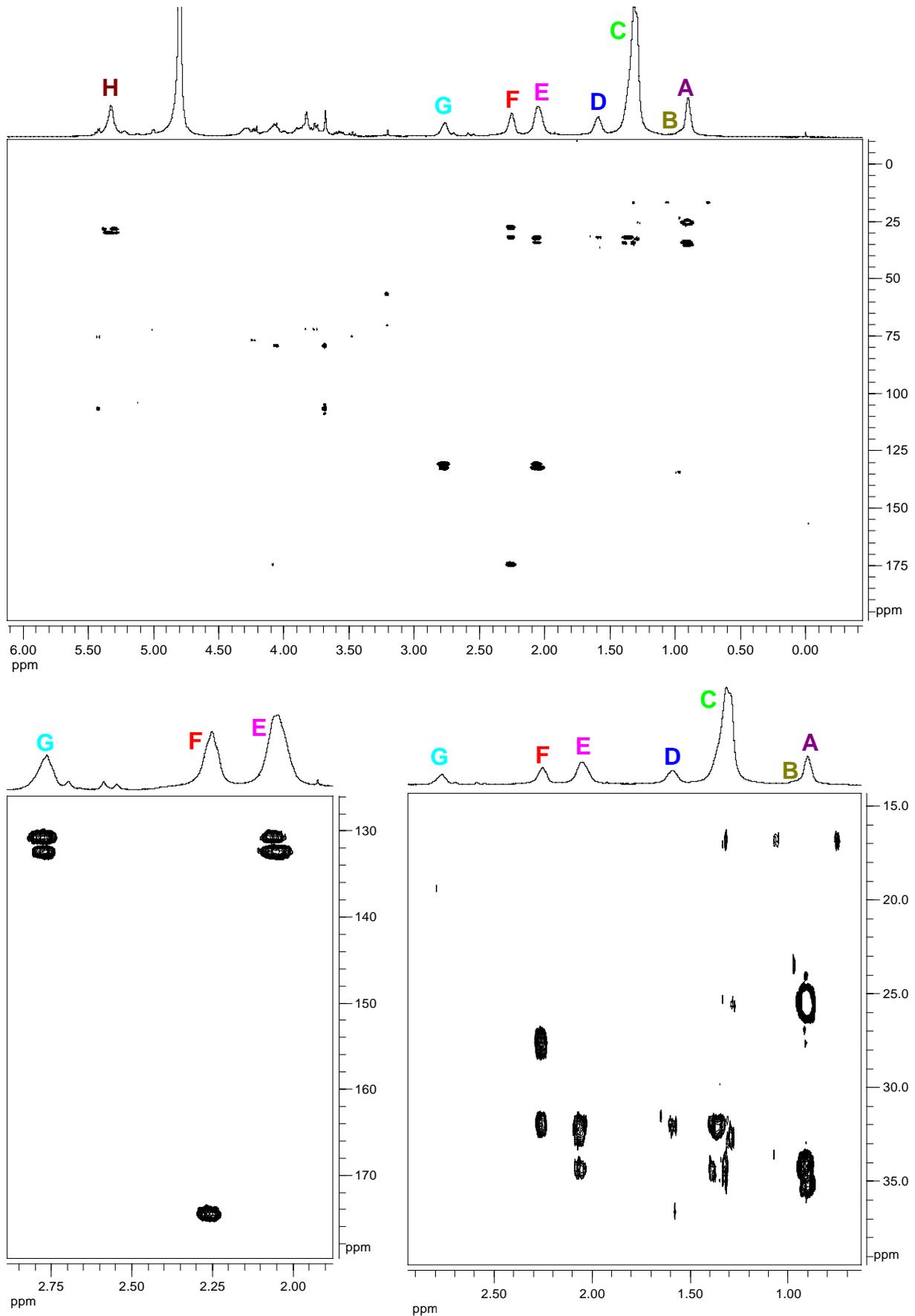


FIGURA 4.21 – Correlações  ${}^{\text{LR}}J \text{ } ^1\text{H}-{}^{13}\text{C}$ , observadas no experimento de gHMBC, adquirido na sonda de HR-MAS para amostras de sementes de soja.

TABELA 4.2 – Atribuição dos deslocamentos químicos de RMN HR-MAS de  $^{13}\text{C}$  dos triacilgliceróis de sementes de soja.

Carbono	$\delta^{13}\text{C}^a$	$\delta^{13}\text{C}^b$	Descrição
$\text{CH}_3\text{-(CH}_2)_n\text{-}$	16,8	~14,1	Metilas de todas os ésteres, exceto o linolenato
$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH=CH-}$	16,8	~14,3	Metila do éster linolenato
$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-(CH}_2)_n\text{-}$	25,6	~22,7	Penúltimas metilenas de todos os ésteres, exceto o linolenato
$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-(CH}_2)_n\text{-}$	34,6	~31,6	Antepenúltimas metilenas de todos os ésteres, exceto o linolenato
$\text{-(CH}_2)_n\text{-}$	32,5	~29,5	Demais metilenas para todos os ésteres
$\text{-CH}_2\text{-CH=CH-CH}_2\text{-}$	29,9	~27,2	Metilenas $\alpha$ olefinas de todos os ésteres insaturados
$\text{-CH=CH-CH}_2\text{-CH=CH-}$	28,4	~25,8	Metilenas entre olefinas dos ésteres linoleato e linolenato
$\text{-CH=CH-CH}_2\text{-CH=CH-}$	132,4	~130,0	Metinas externas de todos os ésteres insaturados
$\text{-CH=CH-CH}_2\text{-CH=CH-}$	130,4	~128,0	Metinas internas dos ésteres linoleato e linolenato
$\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOR}$	27,7	~24,8	Metilenas $\beta$ carbonilas
$\text{-CH}_2\text{-COOR}$	36,6	~34,0	Metilenas $\alpha$ carbonilas
$\text{R-COOR}$	174,5	~172,5	Carbonilas de todos os ésteres
$\text{>CH-OCOR}$	71,8	~68,8	Carbono da pos. $\beta$ da unidade de glicerol
$\text{-CH}_2\text{-OCOR}$	64,7	~62,0	Carbonos da pos. $\alpha$ da unidade de glicerol

<sup>a</sup> Valores em relação ao sinal da referência interna de TMS- $d_4$  em  $\delta$  0,0 ppm.

<sup>b</sup> Valores extraídos da literatura (Saschi e col., 1997; Shaw e col., 1997), em  $\text{CDCl}_3$ . O sinal (-) indica que há variações na literatura.

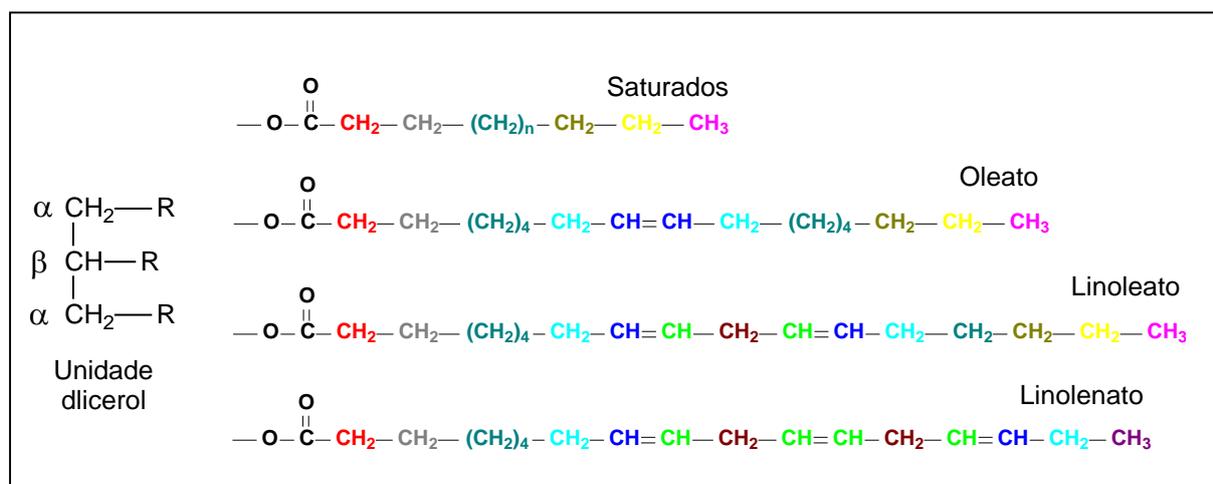


FIGURA 4.22 – Representação dos vários tipos de ésteres graxos e da unidade de glicerol, destacando os tipos de carbono, em que R pode ser qualquer um dos ésteres graxos.

#### 4.7 – Ajustes dos espectros de RMN HR-MAS de $^1\text{H}$

O principal problema enfrentado nas análises quimiométricas de dados espectroscópicos, deve-se as variações na linha de base dos espectros. Para uma análise estatística a linha de base dos espectros deve ser a mesma para todos os conjuntos de dados. Caso a linha de base apresente oscilações entre as amostras, as variáveis também apresentarão diferenças que não são reais podendo conduzir a interpretação de resultados equivocados.

No caso da RMN há ainda um fator adicional que é a fase dos espectros, que se não for adequadamente corrigida acarretará em alterações nas variáveis (intensidade dos sinais de RMN) que não serão devidas a alterações na composição química das amostras, mas somente pela diferença na fase dos espectros. Estes problemas estão demonstrados na figura 4.23 A e B. Desta forma, para proceder as análises quimiométricas é necessário que antes todos os espectros sejam adequadamente ajustados (Figura 4.23, C), para um adequado cálculo das variáveis (*Buckets*), dependente somente das variações na composição química das amostras e a nenhum outro fator. Inclui-se aqui também a calibração de todos os espectros em relação a um sinal de referência. Neste trabalho, o sinal das metilas do sal de TMSP- $d_4$  foi utilizado como referência em  $\delta$  0,00 ppm. Estes ajustes são conhecidos como pré-processamento dos dados.

Um terceiro fator causador de alterações nas variáveis de dados de RMN é a observação de pequenas variações nos deslocamentos químicos dos espectros (*drifts*), porém suficientes para influenciar as análises quimiométricas (Brereton 2002). Estas alterações são provocadas por efeitos ambientais como a temperatura e a concentração da amostra em os espectros foram coletados. Este efeito não foi significativo neste trabalho, sendo contornado pela conversão dos espectros em *buckets* que será discutido mais adiante.

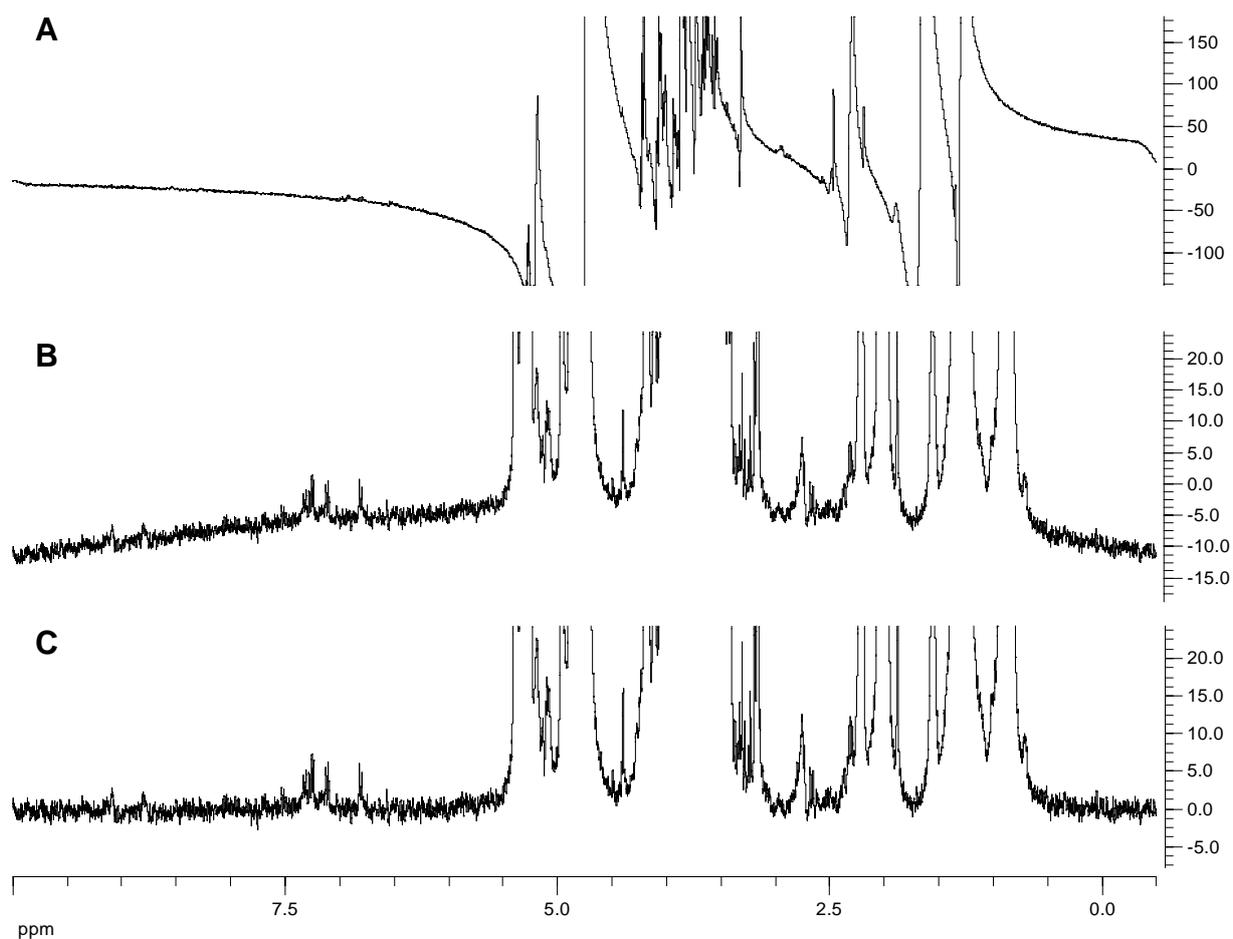


FIGURA 4.23 – Espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$ , sem ajuste da fase e linha de base (A), somente com a fase ajustada (B) e finalmente com a fase e a linha de base ajustadas (C).

Para demonstrar a necessidade de correção, tanto da fase quanto da linha de base dos espectros antes de se proceder nas análises quimiométricas, um conjunto de dados de amostras de sementes de soja referente a duas cultivares foi utilizado.

Primeiramente, o conjunto de dados foi submetido a análise quimiométrica por PCA, em que o único pré-processamento foi a calibração dos espectros. Como resultado, foi observado apenas uma discriminação parcial entre as duas classes de amostras (Figura 4.24). Por outro lado, corrigindo-se a fase e a linha de base dos espectros e submetendo-os novamente a análise exploratória por PCA, foi possível discriminar as amostras de acordo com a cultivar, como pode ser observado na figura 4.25.

A calibração dos espectros é um processo facilmente realizado. No entanto, a correção da fase e da linha de base dos espectros são processos

bastante trabalhosos e que exigem muita atenção se o objetivo for realizar o mesmo ajuste para todos os espectros. Lembrando-se que o número de amostras e de replicatas é grande. Ao encontro da necessidade de suprir este problema tem sido introduzido no programa AMIX<sup>®</sup>, desenvolvido pela Bruker, especialmente para realizar análises quimiométricas de dados de RMN, uma ferramenta de integração dos sinais para cálculo dos *buckets*, chamada de modo especial de integração. O uso deste método de integração dos sinais dispensa a necessidade de quaisquer ajustes de fase e/ou da linha de base dos espectros RMN. Portanto, os espectros podem ser submetidos diretamente às análises quimiométricas, tais como eles foram adquiridos (Figura 4.23 A), necessitando apenas calibrá-los. Na figura 4.26 tem-se o resultado da análise exploratória por PCA, em que utilizou-se o modo especial de integração. Podemos observar que a discriminação entre as classes é muito semelhante à aquela obtida na figura 4.25 em que os espectros foram submetidos a correção manual de fase e linha de base. Usar o modo especial de integração possui o mesmo efeito que realizar um bom ajuste de fase e da linha de base dos espectros, com a vantagem de o procedimento ser idêntico para todos os espectros, não sendo mais subjetivo (Manual do AMIX, 2004; Spraul e col., 2005). Dispensa-se assim, a necessidade de ajustes manuais dos dados, ganhando-se agilidade nas análises quimiométricas.

A intensidade dos sinais ou dos *buckets* também foram padronizadas em relação a intensidade total de cada espectro. Este tipo de ajuste faz com que as diferenças nas quantidades de amostra não sejam fatores que contribuam para influenciar os resultados. Sendo assim, não há necessidade de fixar a quantidade de amostra analisada. Este pré-processamento é extremamente útil para as análises quimiométricas de espectros de RMN HR-MAS, uma vez que não há como adicionar sempre a mesma quantidade de amostra no rotor da sonda de HR-MAS.

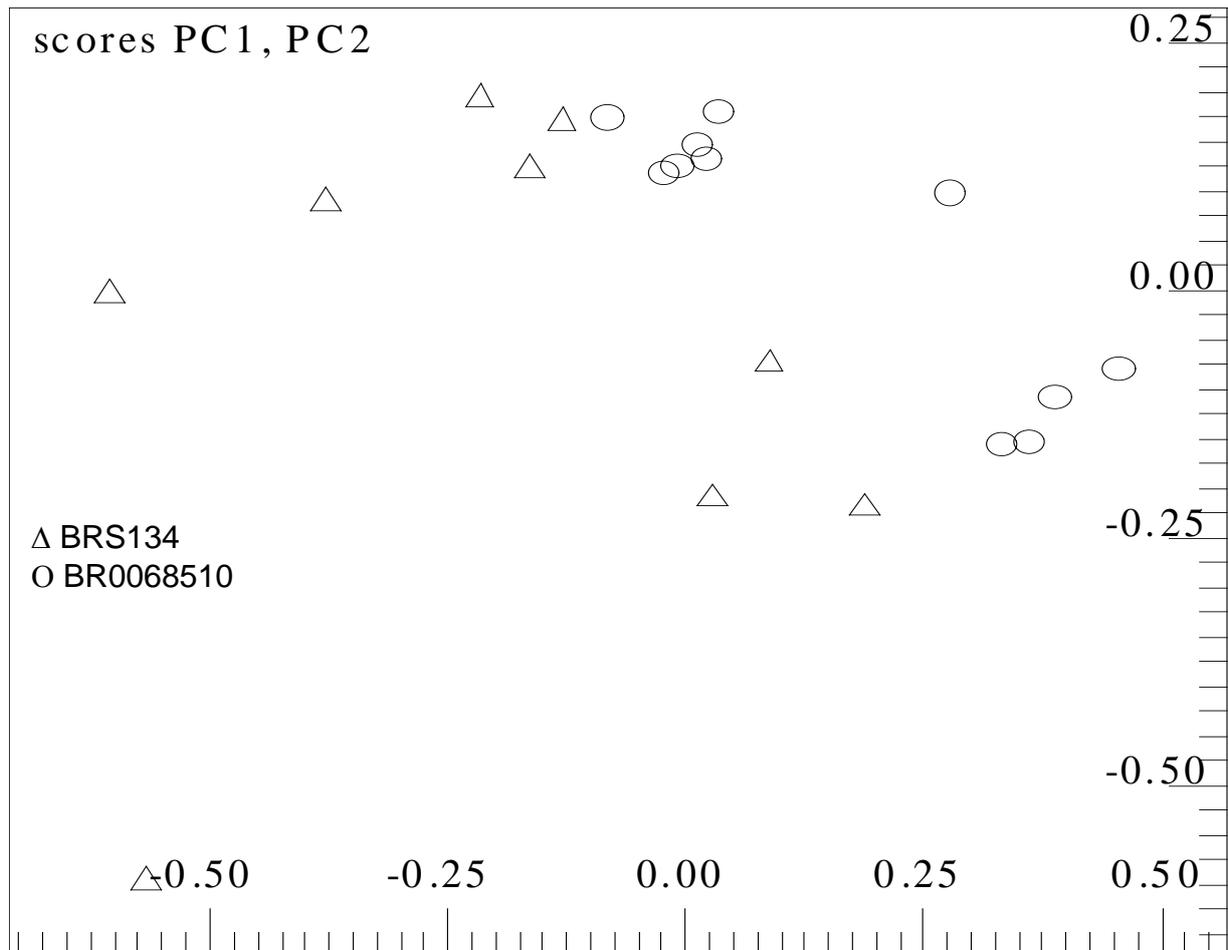


FIGURA 4.24 – Gráfico de escores da análise por PCA de um conjunto de espectros de RMN de  $^1\text{H}$  sem correção de fase e linha de base, referente às amostras de sementes de soja de duas cultivares. As percentagens de informações obtidas foram de 65% em PC1 e de 29% em PC2, total de 99,2%.

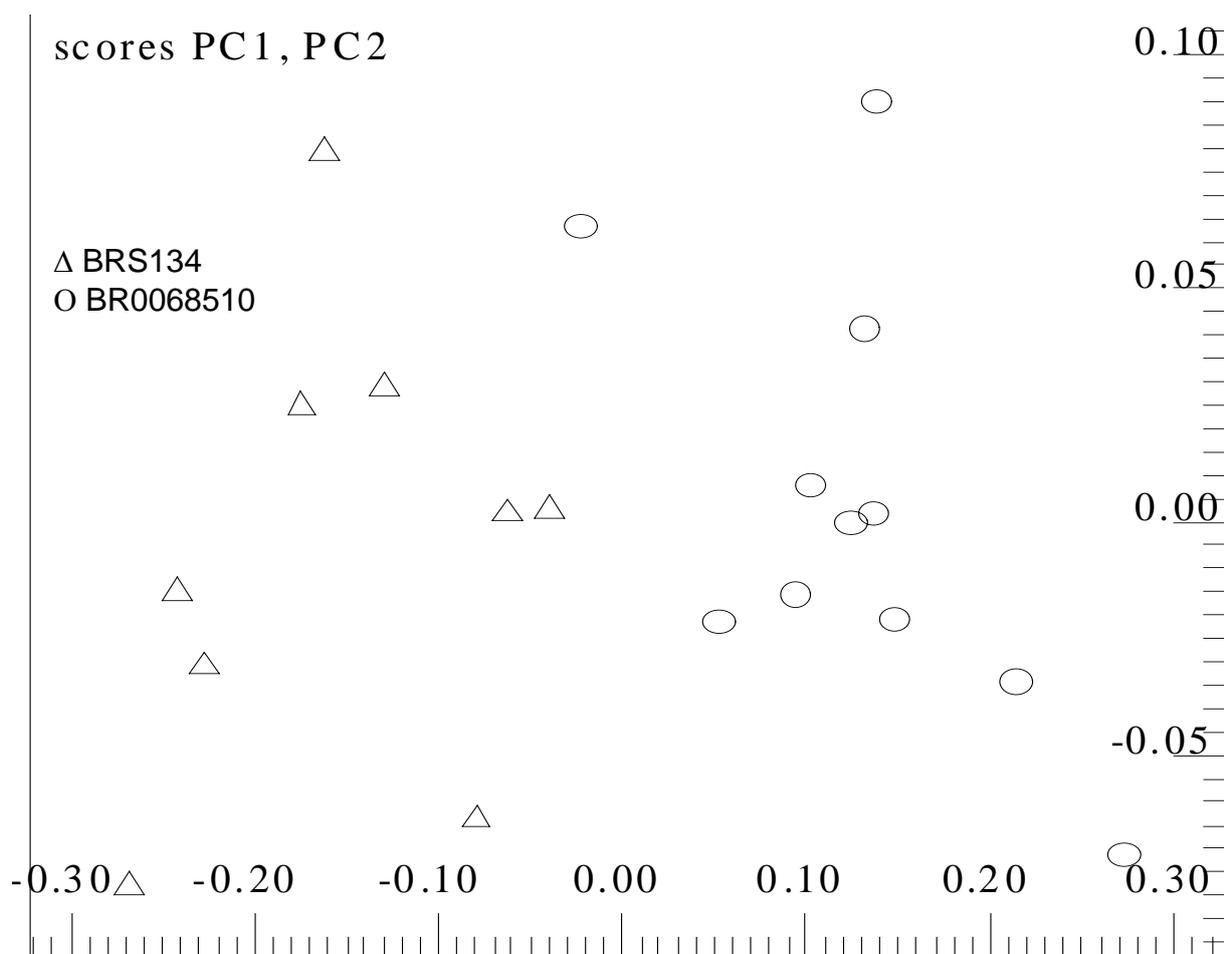


FIGURA 4.25 – Gráfico de escores da análise por PCA de um conjunto de espectros de RMN de  $^1\text{H}$  com correção de fase e linha de base, referente às amostras de sementes de soja de duas cultivares. As percentagens de informações obtidas foram de 91% em PC1 e de 7% em PC2, total de 99,5%.

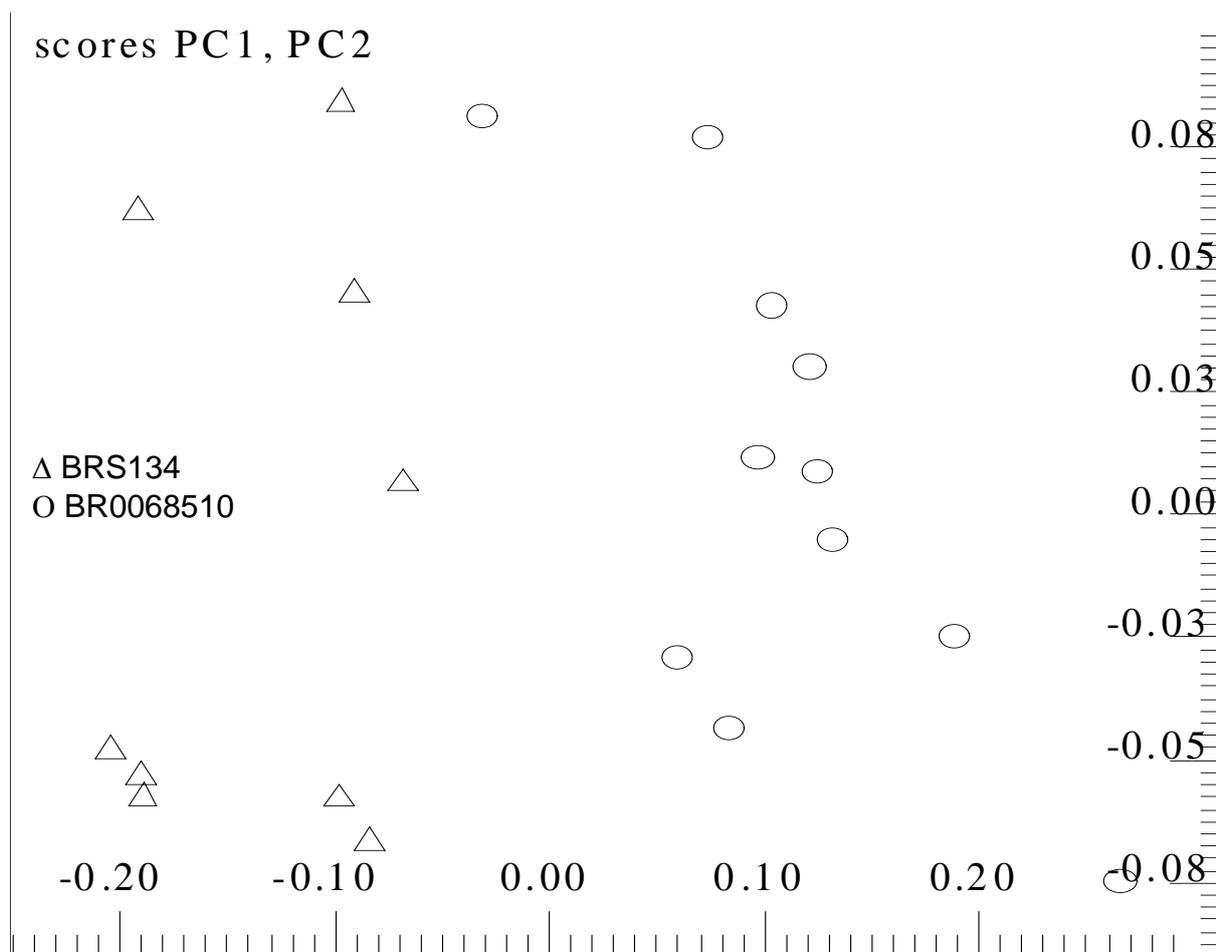


FIGURA 4.26 – Gráfico de escores da análise por PCA de um conjunto de espectros de RMN de  $^1\text{H}$  sem correção de fase e linha de base, porém utilizando o modo especial de integração dos sinais do programa AMIX<sup>®</sup> para cálculo dos *buckets*, referentes às amostras de sementes de soja de duas cultivares. As percentagens de informações obtidas foram de 78,5% em PC1 e de 11% em PC2, total de 97,2%.

## 4.8 – Pré-processamento dos dados

### 4.8.1 – Avaliação do tamanho dos *buckets* (Variáveis)

Há várias formas de se determinar as variáveis de entrada nas análises quimiométricas. Uma delas seria utilizar os sinais dos espectros de RMN, porém é extremamente difícil de se definir os sinais e as variações destes em espectros de amostras complexas, devido grande sobreposição de sinais, principalmente nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ . Por outro lado, para espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  esta opção já pode ser considerada, uma vez que praticamente não há sobreposição de sinais em tais espectros. Outra forma, seria utilizar os pontos usados na construção dos espectros de RMN. Assim um espectro adquirido com 64K pontos teria 64K variáveis de entrada nas análises quimiométricas (Figura 4.27). No entanto, utilizar os próprios pontos como variáveis apresenta alguns inconvenientes, entre eles a grande número variáveis, o qual não é suportado pela maioria dos programas desenvolvidos e necessidade de vários pontos para representa um único sinal dos espectros. Além disso, os pontos estão muito mais suscetíveis às variações nos deslocamentos químicos dos sinais nos espectros, causadas por efeitos de concentração da amostra, empacotamento, alterações na temperatura e homogeneidade do campo magnético aplicado. Assim, um determinado ponto não representará sempre o mesmo sinal em todas as medidas. Já para espectros de massas, por exemplo, a utilização de pontos como variáveis representa uma boa opção, uma vez que um dado ponto representará sempre o mesmo  $m/z$ .

Desta forma, o mais adequado seria calcular a média entre alguns pontos para reduzir o número de variáveis e com isso minimizar os efeitos das variações nos deslocamentos químicos e, conseqüentemente, aumentar a reprodutibilidade e a representabilidade. Neste sentido, o programa computacional AMIX<sup>®</sup> determina as variáveis dividindo o espectro em intervalos chamados de *buckets* em que o tamanho destes é definido pelo analista (Manual do AMIX, 2004). A figura 4.28 ilustra um espectro de RMN de  $^1\text{H}$  transformado em *buckets*.

Sendo assim, nesta etapa do trabalho foi avaliado a influência do tamanho dos *buckets* nas análises exploratórias, com auxílio de dois conjuntos de dados. Foram testados *buckets* com tamanhos de 0,5; 0,1; 0,05 e 0,01 ppm. Nestes ensaios, todos os espectros de utilizados sofreram uma multiplicação

exponencial Laurezentina dos FIDs por um fator de 1 Hz. A influência deste fator na resolução das discriminações nas análises exploratórias será discutida no item subsequente deste trabalho.

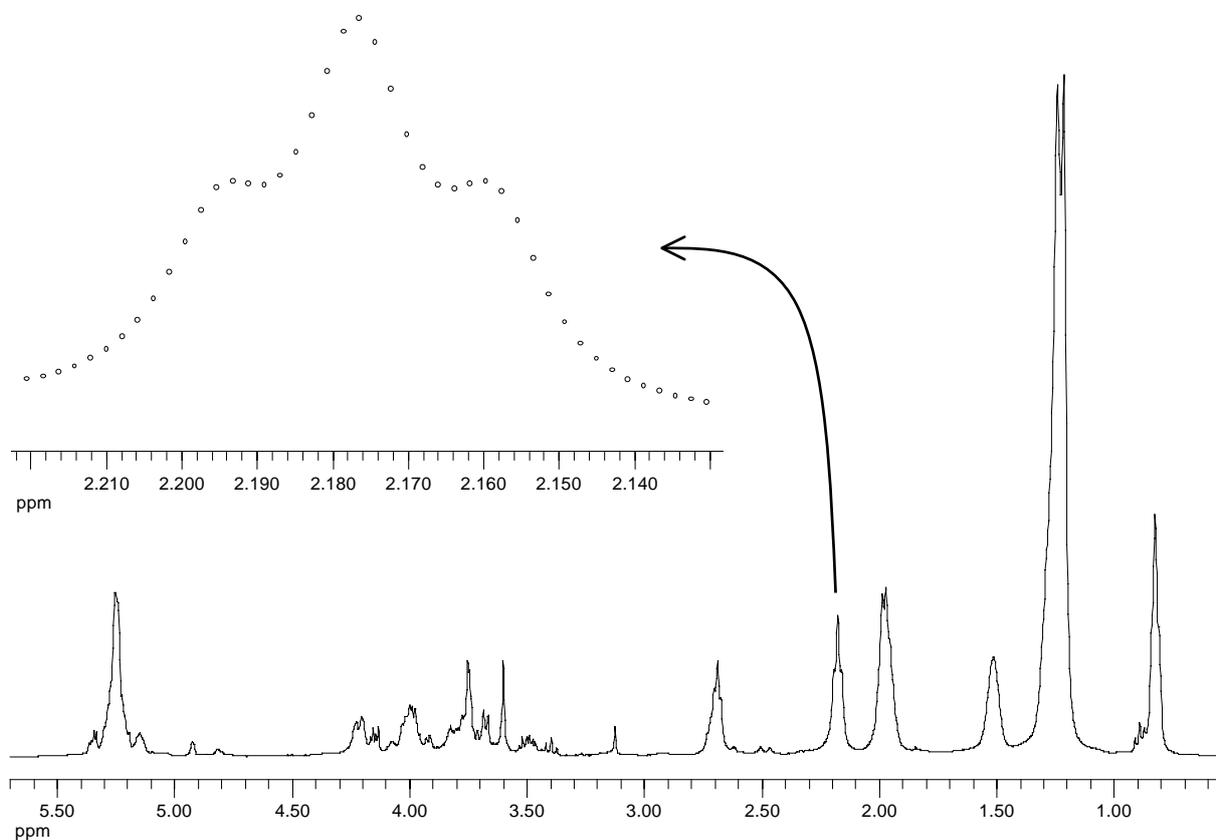


FIGURA 4.27 – Espectro de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  representado em pontos, os quais podem ser visualizados na expansão do sinal em  $\delta$  2,17 ppm.

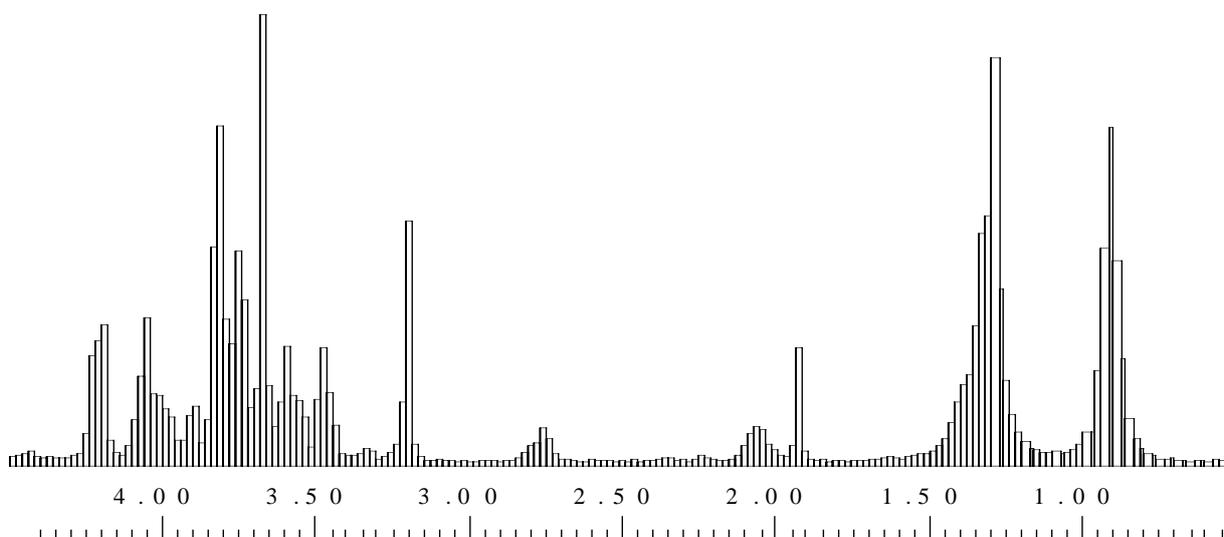


FIGURA 4.28 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  transformado em *buckets*, região de 4,5 a 0,5 ppm.

Empregando-se um conjunto de dados contendo amostras de diferentes cultivares de soja, mas de mesma origem geográfica, a análise quimiométrica não foi capaz de discriminar muito bem as classes, quando o tamanho dos *buckets* foi ajustado para 0,5 ppm (Figura 4.29). Reduzindo-se para 0,1 ppm houve uma melhora na separação entre as classes (Figura 4.30), sendo que, a melhor distinção foi observada quando os *buckets* foram reduzidos para 0,05 ppm (Figura 4.31). Reduzindo-se ainda mais o tamanho dos *buckets* (0,01) não refletiu no aumento da resolução (Figura 4.32).

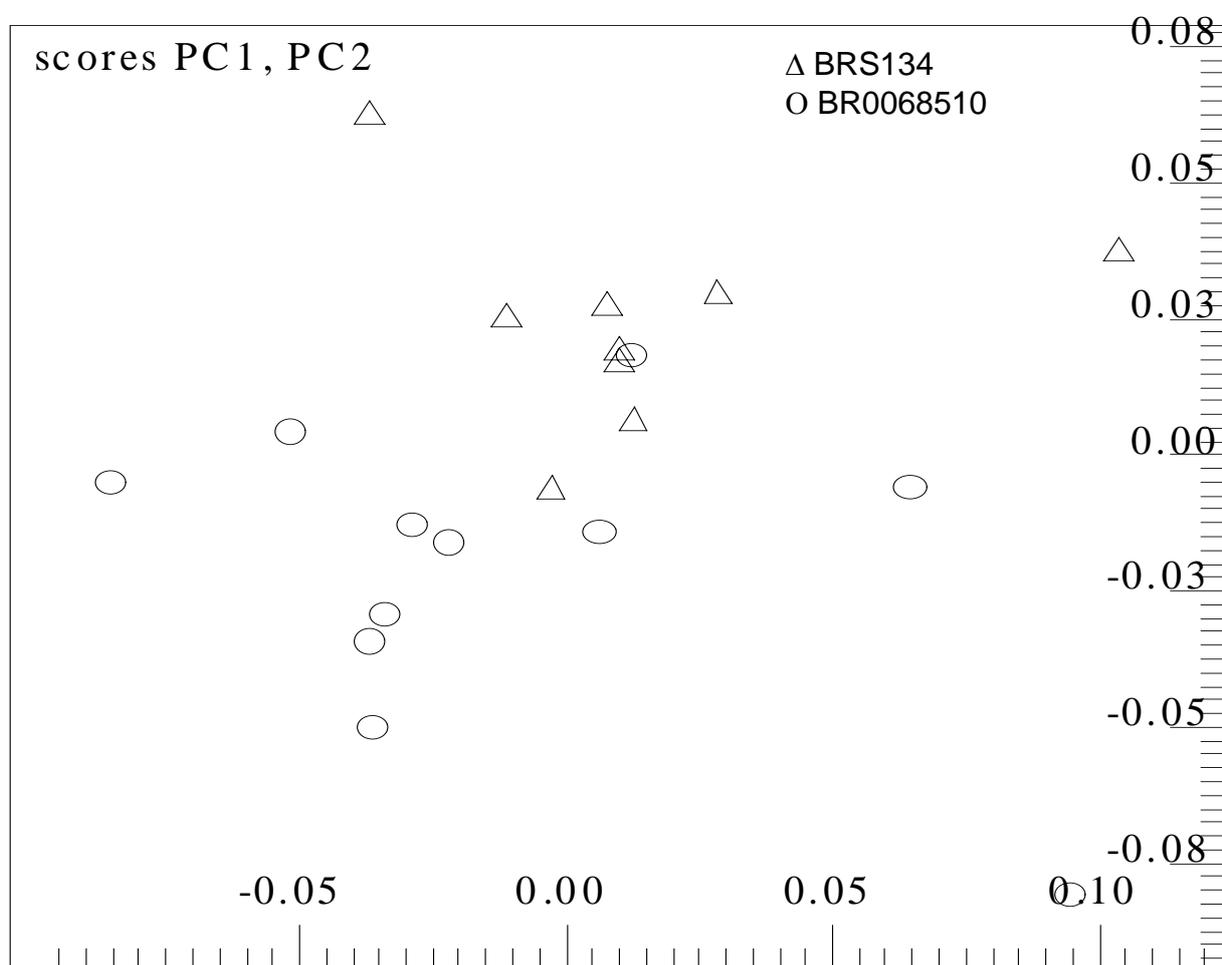


FIGURA 4.29 – Gráfico de escores mostrando a discriminação entre amostras de sementes de soja de diferentes cultivares, utilizando-se *buckets* de 0,5 ppm e LB de 1 Hz. As percentagens de informações obtidas foram de 57% em PC1 e de 28% em PC2.

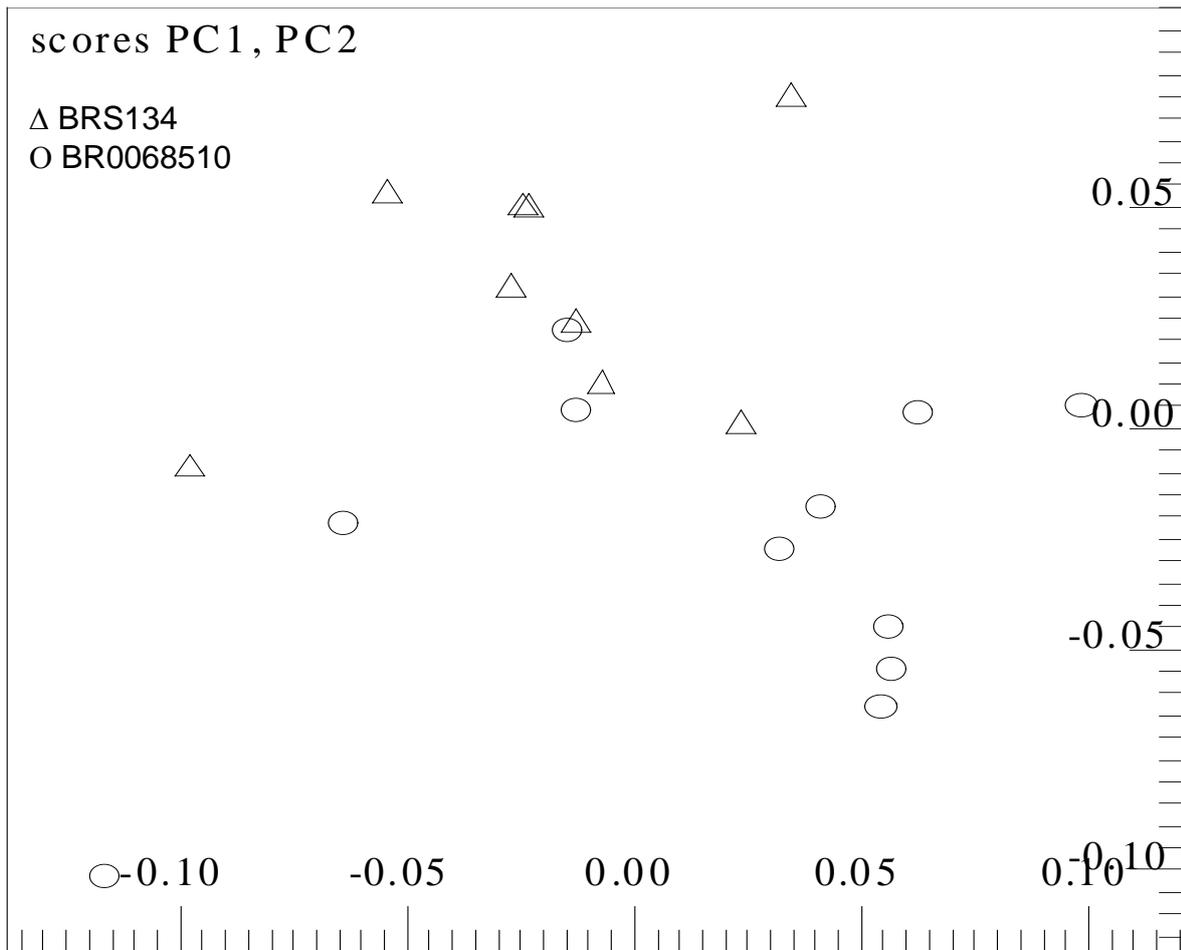


FIGURA 4.30 – Gráfico de escores mostrando a discriminação entre amostras de sementes de soja de diferentes cultivares, utilizando-se *buckets* de 0,1 ppm e LB de 1 Hz. As percentagens de informações obtidas foram de 48% em PC1 e de 29,5% em PC2.

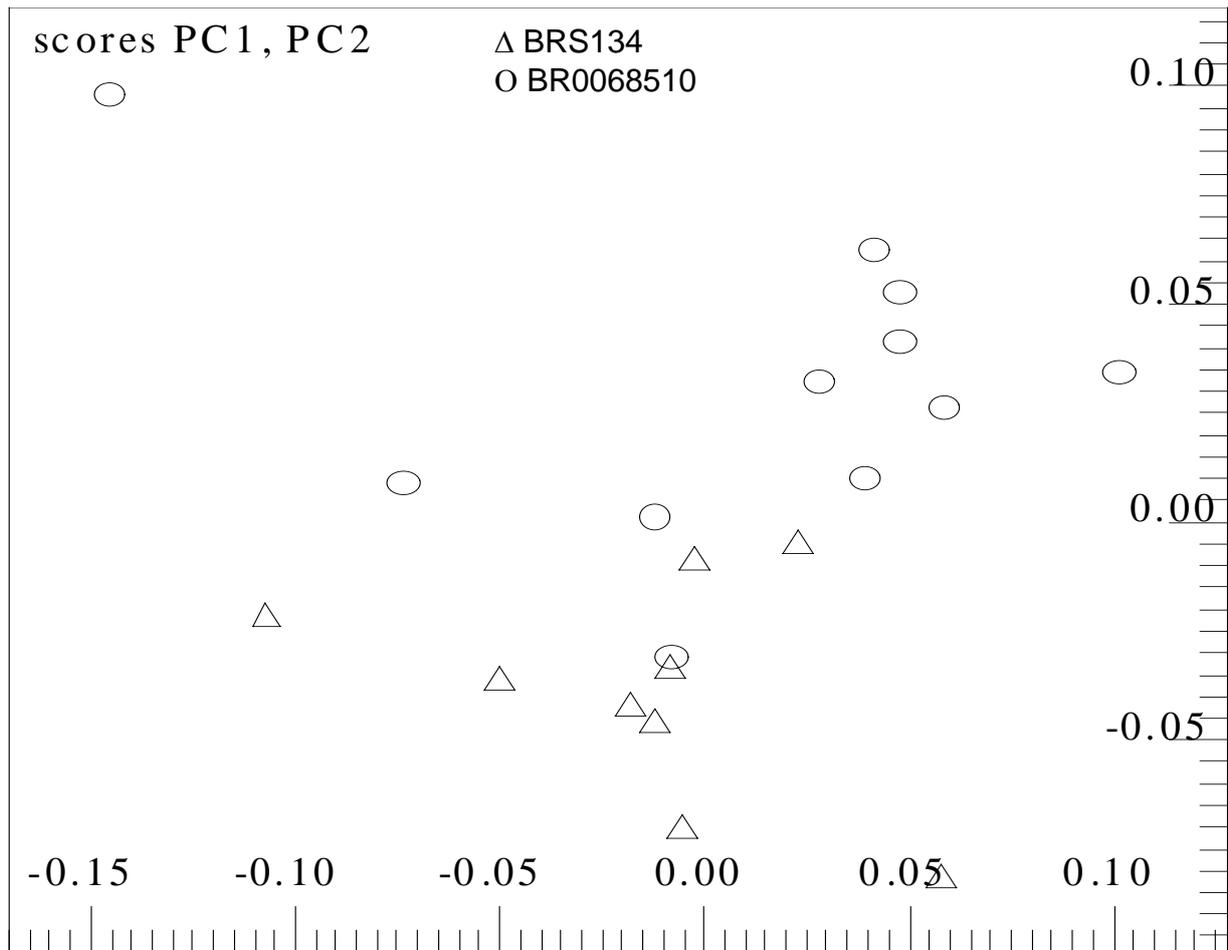


FIGURA 4.31 – Gráfico de escores mostrando a discriminação entre amostras de sementes de soja de diferentes cultivares, utilizando-se *buckets* de 0,05 ppm e LB d 1 Hz. As percentagens de informações obtidas foram de 43% em PC1 e de 26% em PC2.

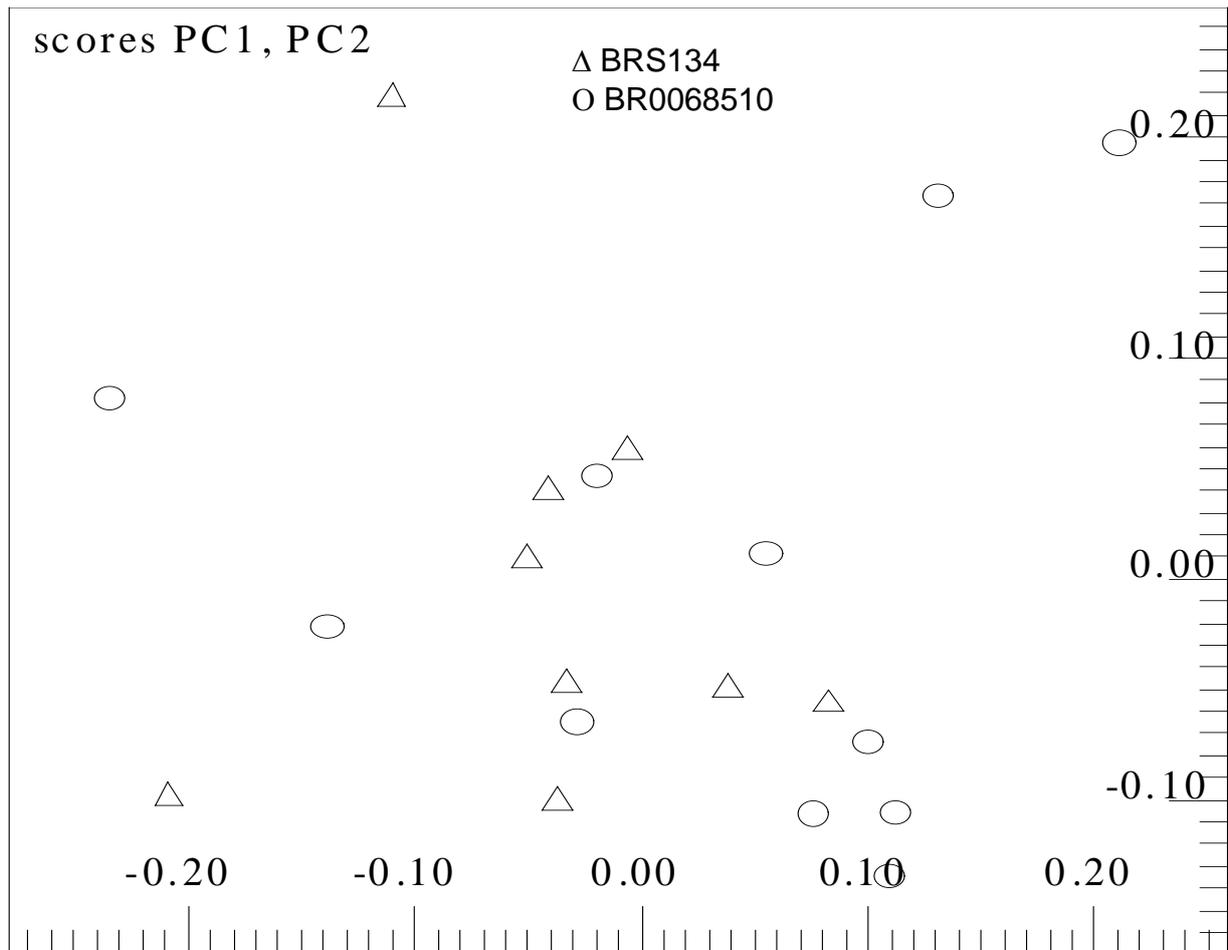


FIGURA 4.32 – Gráfico de escores mostrando a discriminação entre amostras de sementes de soja de diferentes cultivares, utilizando-se *buckets* de 0,01 ppm e LB de 1 Hz. As percentagens de informações obtidas foram de 34% em PC1 e de 28,5% em PC2.

Resultado semelhante foi observado na separação de classes para um conjunto de amostras referentes a uma mesma cultivar de soja, mas provenientes de diferentes regiões produtoras. A pior resolução também foi obtida com os *buckets* maiores, sendo que a medida que o tamanho dos mesmos foi sendo reduzida a resolução na discriminação foi melhorando até ( Figuras de 4.33 a 4.36).

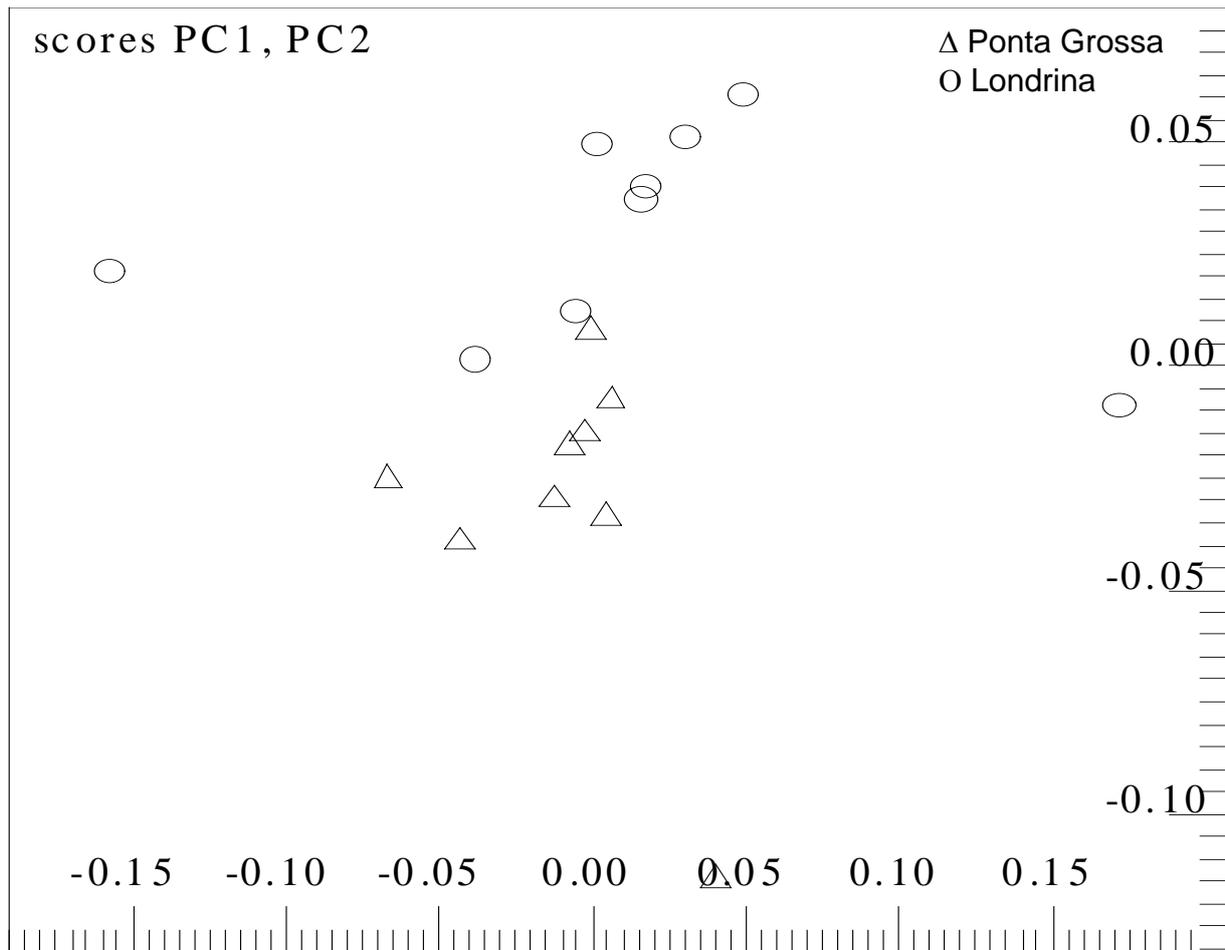


FIGURA 4.33 – Gráfico de escores mostrando a discriminação entre amostras de sementes de soja da cultivar BRS134 proveniente de diferentes regiões produtoras, utilizando-se *buckets* de 0,5 ppm e LB de 1 Hz. As percentagens de informações obtidas foram de 63% em PC1 e de 28% em PC2.

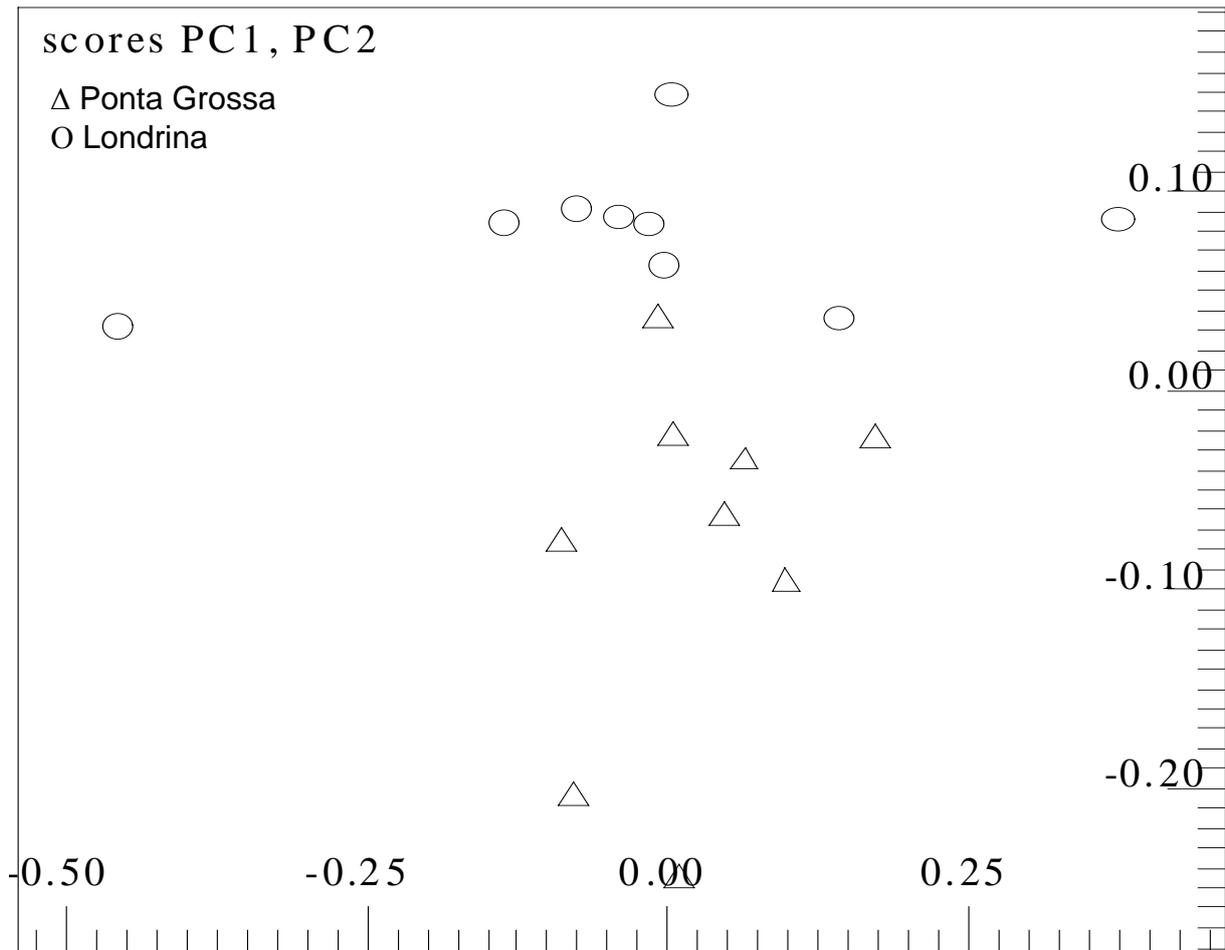


FIGURA 4.34 – Gráfico de escores mostrando a discriminação entre amostras de sementes de soja da cultivar BRS134 proveniente de diferentes regiões produtoras, utilizando-se *buckets* de 0,1 ppm e LB de 1 Hz. As percentagens de informações obtidas foram de 49% em PC1 e de 20% em PC2.

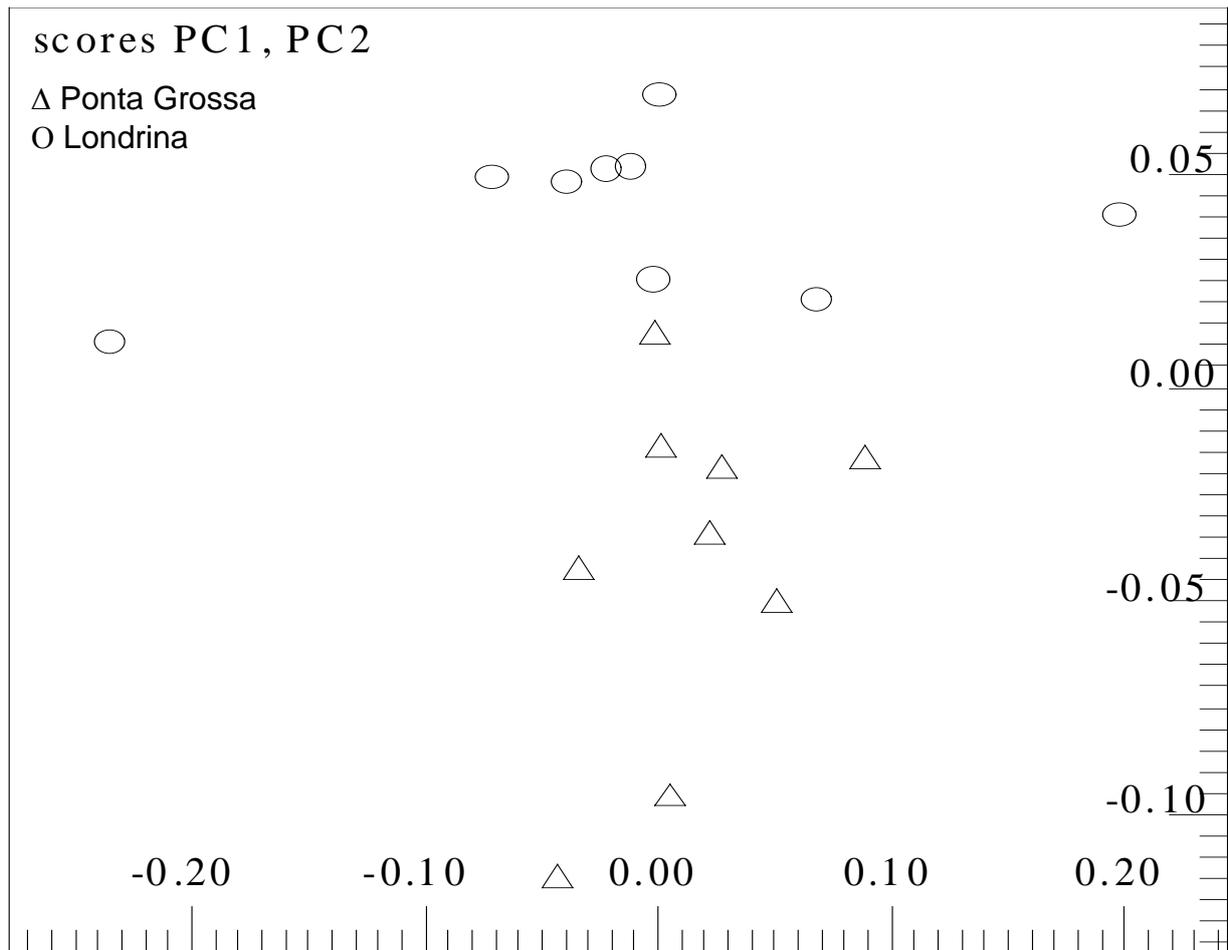


FIGURA 4.35 – Gráfico de escores mostrando a discriminação entre amostras de sementes de soja da cultivar BRS134 proveniente de diferentes regiões produtoras, utilizando-se *buckets* de 0,05 ppm e LB de 1 Hz. As percentagens de informações obtidas foram de 55% em PC1 e de 21% em PC2.

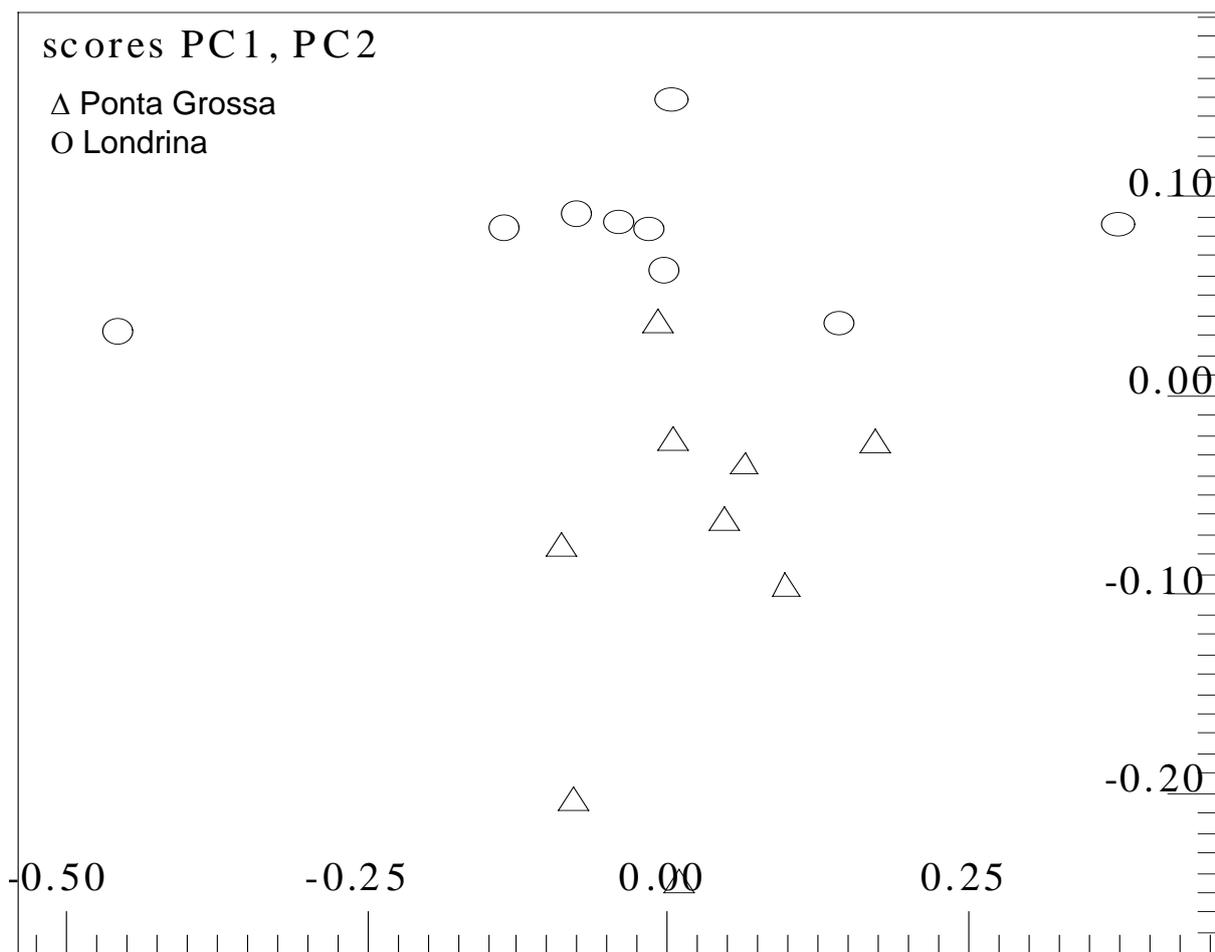


FIGURA 4.36 – Gráfico de escores mostrando a discriminação entre amostras de sementes de soja da cultivar BRS134 proveniente de diferentes regiões produtoras, utilizando-se *buckets* de 0,01 ppm e LB de 1 Hz. As percentagens de informações obtidas foram de 49% em PC1 e de 20% em PC2.

O tamanho dos *buckets* está diretamente relacionado à largura dos sinais e à sobreposição dos mesmos nos espectros de RMN. O emprego de *buckets* pequenos é útil para distinguir sinais muito próximos nos espectros. Porém, se forem excessivamente pequenos, haverá vários *buckets* para representar um mesmo sinal, e portanto desnecessário, ou seja, não há ganho em informação como tem sido observado para o conjunto de amostras de diferentes regiões (Figuras 4.35 e 4.36). Pelo contrário, o uso de *buckets* muito pequenos pode acarretar em uma perda de resolução na separação de classes como tem sido observado para o conjunto de amostras de diferentes cultivares (Figura 4.32). Por outro lado, se os *buckets* forem suficientemente grandes os sinais próximos no espectro de RMN estarão sendo considerados como uma única variável e, conseqüentemente, desperdiçando-se informações. Por exemplo, se ajustarmos o tamanho dos *buckets* para 0,2 ppm não

estariamos considerando o sinal do éster linolenato como uma variável distinta (Sinal B na figura 4.17) e sim uma variável representando todos os grupos metilas dos ésteres graxos e, conseqüentemente, menos informações. Na figura 4.37 podemos visualizar claramente a influência dos diferentes tamanhos de *buckets* em um espectro de RMN de  $^1\text{H}$ . Assim, o tamanho dos *buckets* deve ser considerado ainda mais em espectros que apresentam alta sobreposição de sinais. Vimos nos dois casos abordados aqui que o aumento excessivo no tamanho dos *buckets* resulta em perda de resolução nas separações. Desta forma, *buckets* de 0,05 ppm e em alguns casos de 0,01 ppm foram utilizados na construção das variáveis de entrada na maioria das análises estatísticas realizadas neste trabalho.

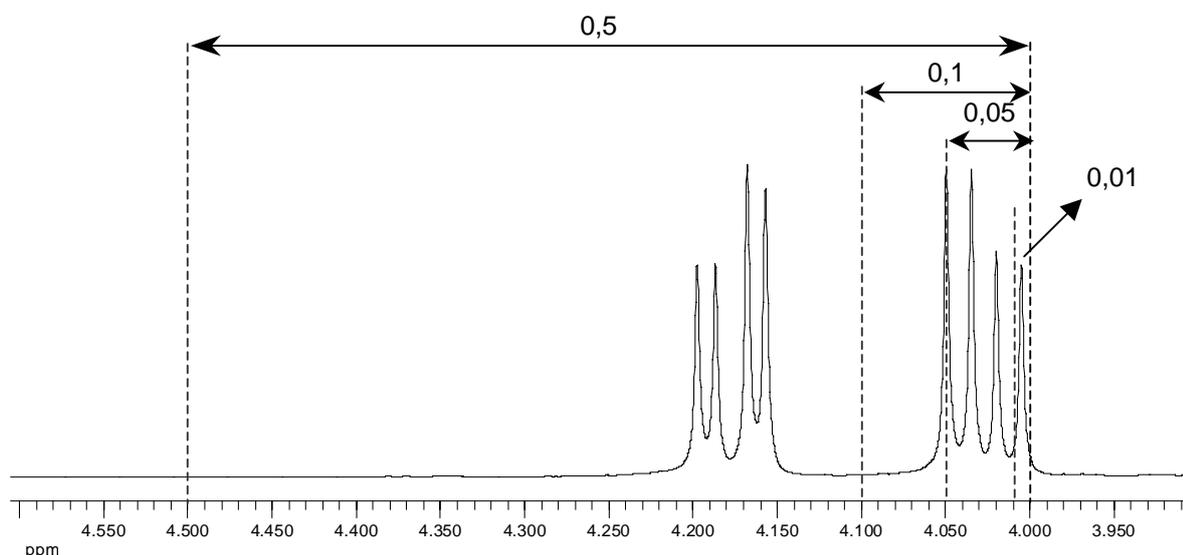


FIGURA 4.37 – Representação dos tamanhos de *buckets* em ppm sobre um espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de uma amostra de óleo de soja, mostrando os sinais referentes aos hidrogênios metilênicos ( $\alpha$ ) da unidade de glicerol.

#### 4.8.2 – Avaliação do alisamento dos sinais

Outro parâmetro de pré-processamento, importante e que foi avaliado é o alisamento dos sinais nos espectros de RMN realizado por uma multiplicação exponencial dos FIDs, antes de proceder a transformada de Fourier dos mesmos. As funções mais utilizadas no alisamento dos sinais são a Laurezentiana (LB) e Gaussina (GB), no entanto, outras funções também podem ser empregadas. Neste processo, um fator de multiplicação, dado em Hz, é escolhido pelo analista.

A multiplicação exponencial dos FIDs por valores pequenos, resulta em aumento na resolução dos sinais nos espectros de RMN, porém com, conseqüente perda de relação sinal/ruído. Já o oposto ocorre com valores maiores. Desta forma se for utilizado um fator muito pequeno, estaremos desprezando as informações referentes aos sinais de menor intensidade nos espectros, o que pode não é interessante para as análises quimiométricas. Porém estaremos aumentando a quantidade de informações provenientes dos sinais de maior intensidade. Ao contrário, o emprego de fatores maiores acarreta em perda de informações dos sinais intensos e ganho por parte dos sinais menores. Assim, é importante avaliar qual tipo de sinais é mais importante para caracterizar os conjuntos de amostras e, com isso, qual a função matemática, bem como o fator de multiplicação que resultem em melhores resultados nas análises quimiométricas.

Assim foi checado qual fator de multiplicação exponencial dos FIDs por uma função Laurezentiana (LB) resultaria em melhores separações de classes nas análises exploratórias por PCA, utilizando-se dois conjuntos de amostras, o primeiro referente a diferentes cultivares e o segundo de uma mesma cultivar, mas de diferentes origens. A função Gaussina não foi empregada para multiplicação dos FIDs, uma vez que, sua utilização causa grande perda de relação sinal/ruído e resolução suficiente já é obtida com função Laurezentiana.

A análise exploratória por PCA de espectros em que os FIDs foram multiplicados exponencialmente por uma função Laurezentiana com fator de 2 Hz não apresentou uma boa discriminação entre as cultivares de soja (Figura 4.38). No entanto, quando os sinais dos espectros foram alisados pela multiplicação exponencial dos FIDs por um fator de 1 Hz, houve uma significativa melhora na resolução da discriminação entre as classes (Figura 4.39). A utilização um fator de 0,3 Hz resultou em perda na capacidade discriminatória das análises quimiométricas

(Figura 4.40). Duarte e col. (2004) tem obtido resultados diferentes com a mesma matriz de dados, porém usando diferentes fatores de LB.

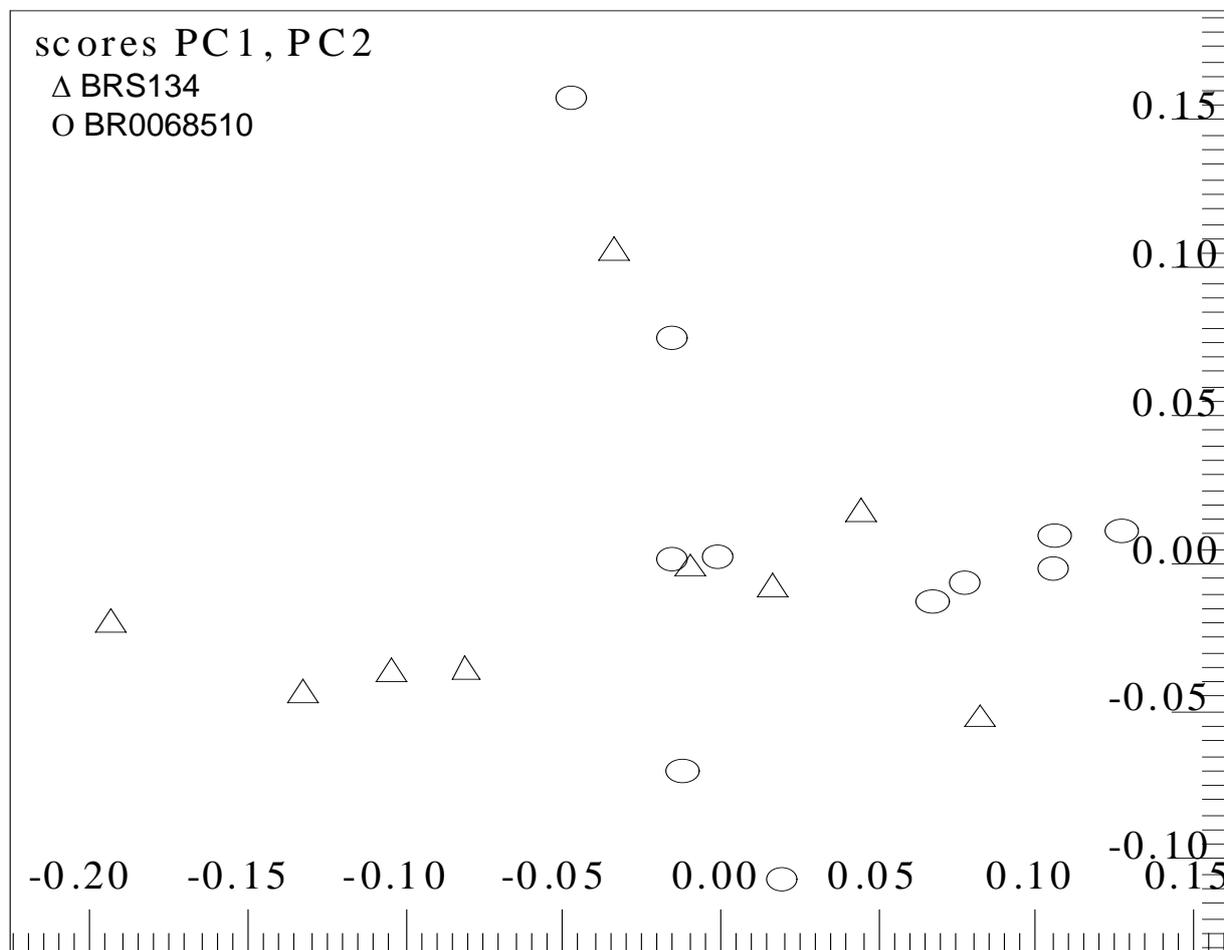


FIGURA 4.38 – Gráfico de escores mostrando a discriminação entre amostras de sementes de soja de diferentes cultivares, em que os espectros sofreram uma multiplicação exponencial Laurezentina dos FIDs por um fator de 2 Hz, utilizando-se *buckets* de 0,05 ppm. As percentagens de informações obtidas foram de 50,5% em PC1, de 25% em PC2 e um total de 94,5%.

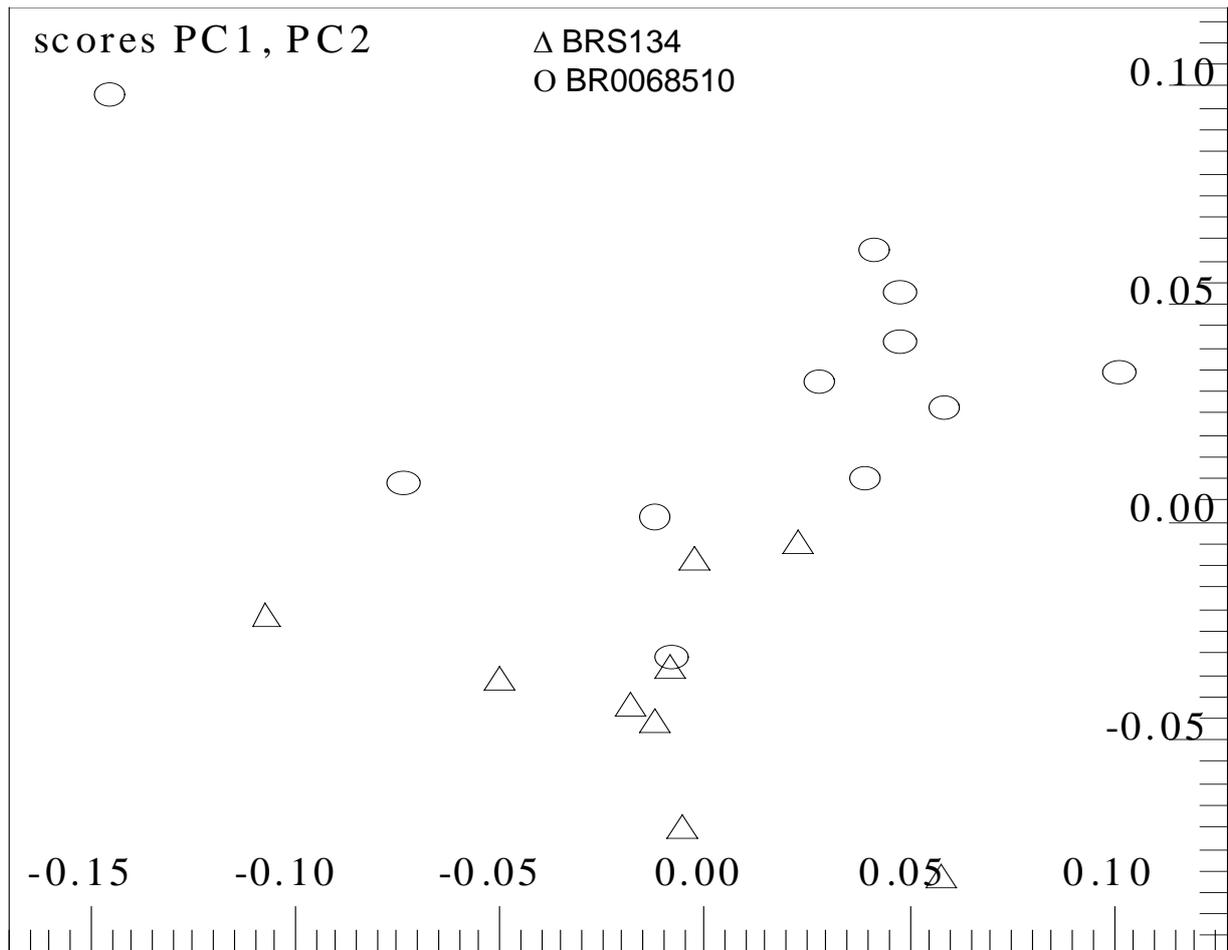


FIGURA 4.39 – Gráfico de escores mostrando a discriminação entre amostras de sementes de soja de diferentes cultivares, em que os espectros sofreram uma multiplicação exponencial Laurezentina dos FIDs por um fator de 1 Hz, utilizando-se *buckets* de 0,05 ppm. As percentagens de informações obtidas foram de 43% em PC1, de 26% em PC2 e um total de 95%.

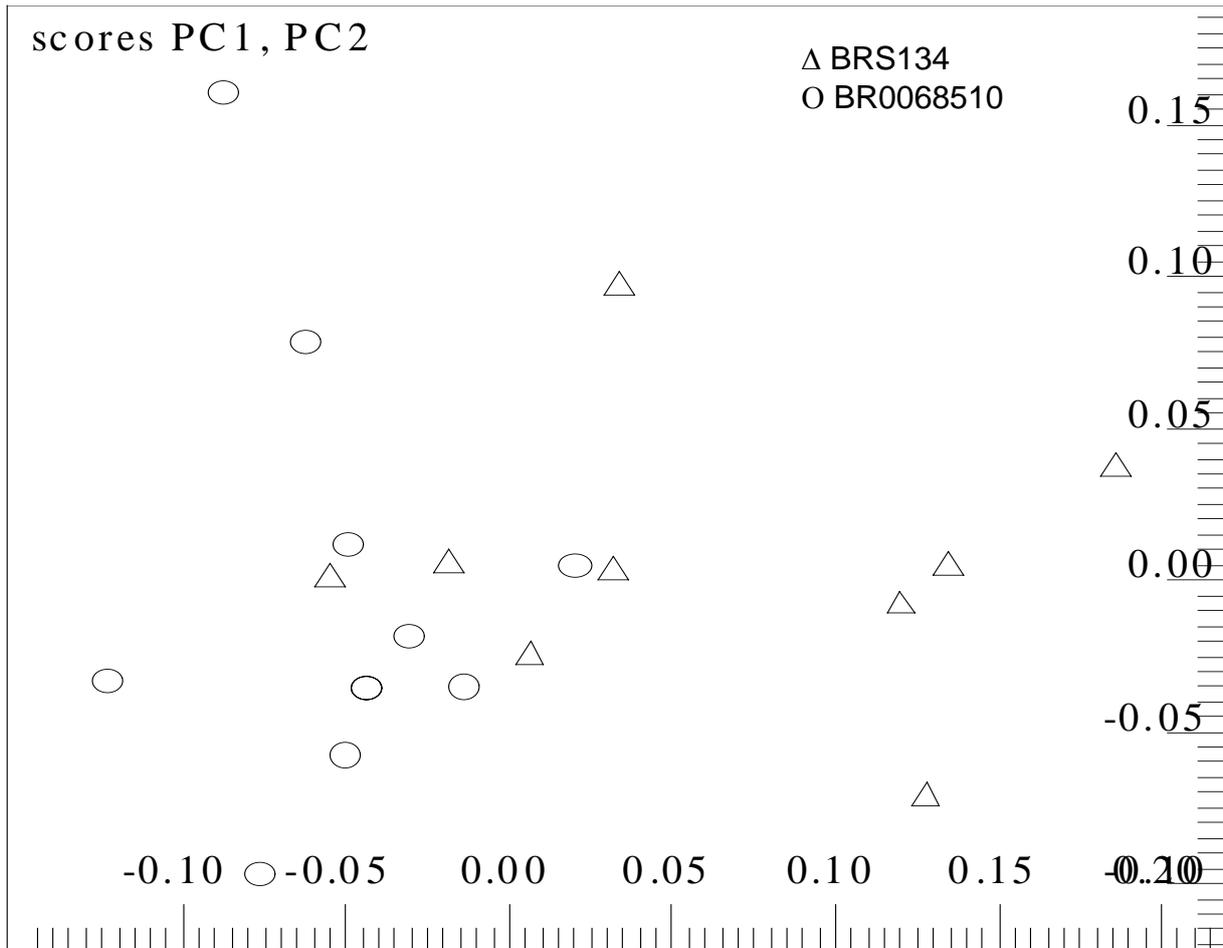


FIGURA 4.40 – Gráfico de escores mostrando a discriminação entre amostras de sementes de soja de diferentes cultivares, em que os espectros sofreram uma multiplicação exponencial Laurezentina dos FIDs por um fator de 0,3 Hz, utilizando-se *buckets* de 0,05 ppm. As percentagens de informações obtidas foram de 51% em PC1, de 26% em PC2 e um total de 95%.

Para confirmar o resultado anteriormente observado foi utilizado outro conjunto de dados com amostras de sementes de soja de diferentes regiões. Novamente, a análise exploratória por PCA de espectros processados com LB de 2 Hz não apresentou discriminação entre as amostras de diferentes regiões produtoras (Figura 4.41). O melhor resultado foi obtido quando os espectros foram multiplicados por um fator de 1 Hz (Figura 4.42), uma vez que, a análise dos espectros processados com LB de 0,3 Hz mostrou uma sobreposição entre as classes (Figura 4.43). A discriminação entre as classes, usando-se espectros alisados com LB de 0,3 Hz somente pode ser obtida em PC1 *versus* PC3 (Figura 4.44). Nas demais análises as melhores separações foram obtidas sempre em PC1 *versus* PC2.

Desta forma, podemos concluir que é mais importante o ganho na resolução dos sinais dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  do que o aumento na relação sinal/ruído. Em outras palavras, os sinais de maior intensidade nos espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  de amostras de grãos de soja, são os mais importantes para a discriminação entre as amostras.

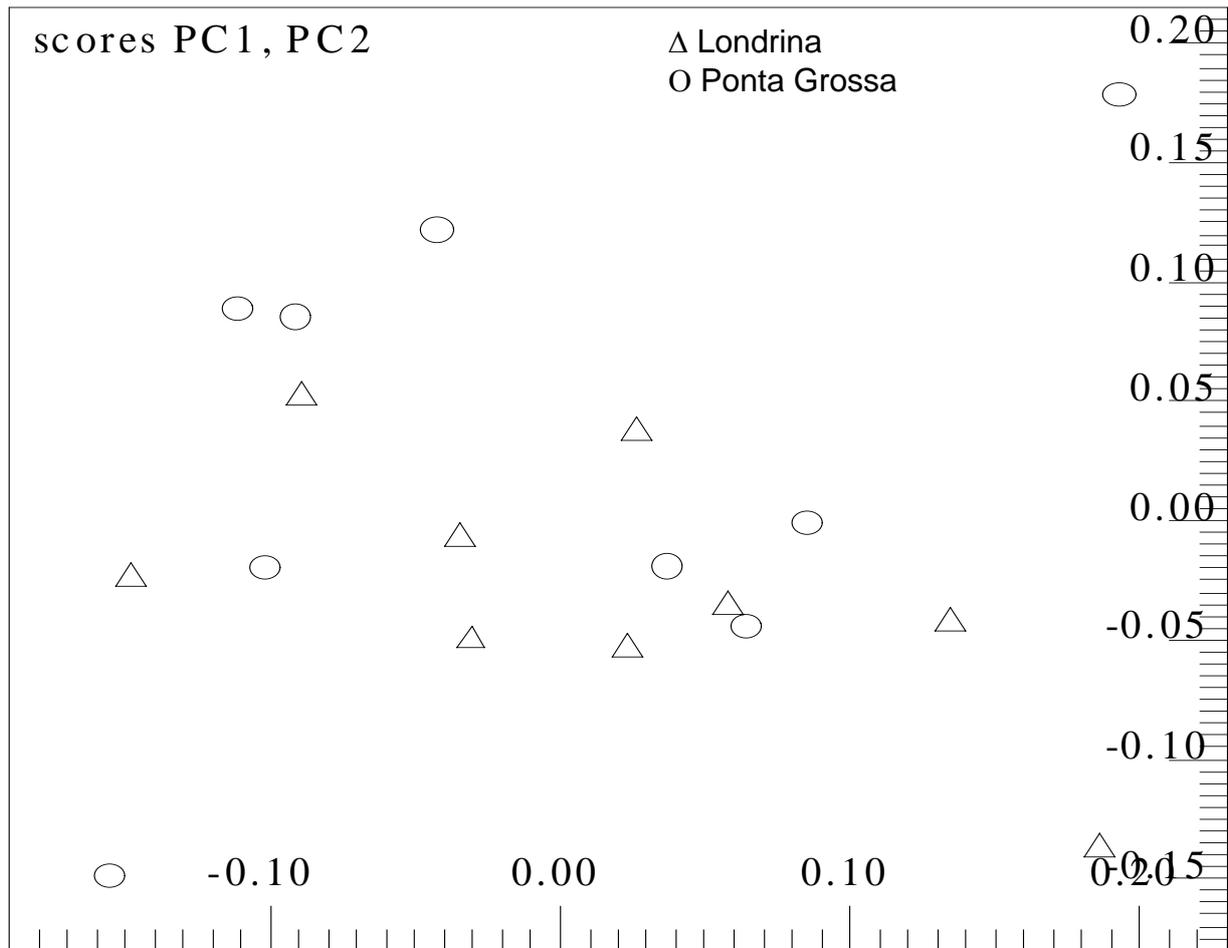


FIGURA 4.41 – Gráfico de escores, mostrando a discriminação entre amostras de sementes de soja da cultivar BRS 134, proveniente de diferentes regiões, em que os espectros sofreram uma multiplicação exponencial Laurezentina dos FIDs por um fator de 2 Hz, utilizando-se *buckets* de 0,05 ppm. As percentagens de informações obtidas foram de 49% em PC1, de 30% em PC2 e um total de 96%.

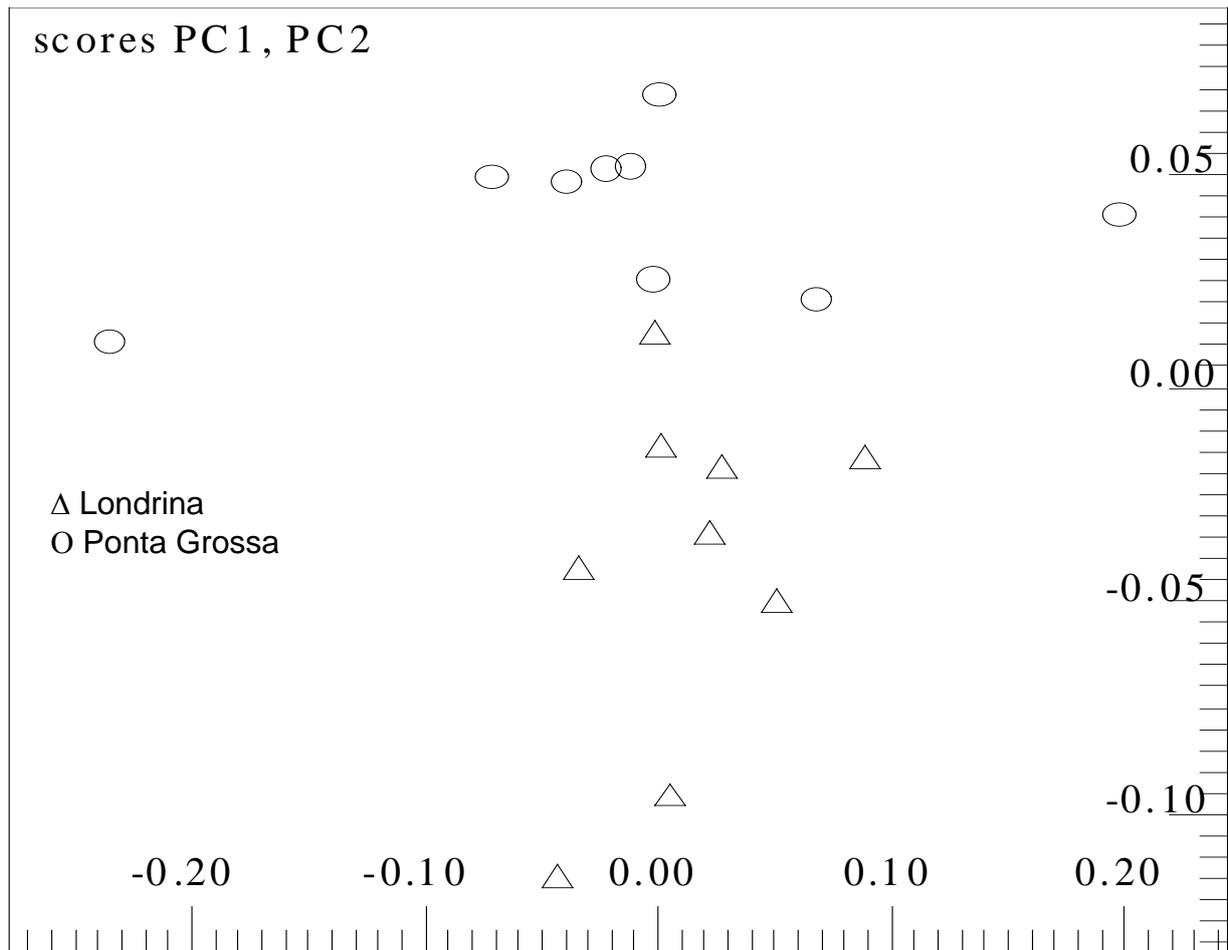


FIGURA 4.42 – Gráfico de escores, mostrando a discriminação entre amostras de sementes de soja da cultivar BRS 134, proveniente de diferentes regiões, em que os espectros sofreram uma multiplicação exponencial Laurezentina dos FIDs por um fator de 1 Hz, utilizando-se *buckets* de 0,05 ppm. As percentagens de informações obtidas foram de 55% em PC1, de 21% em PC2 e um total de 95%.

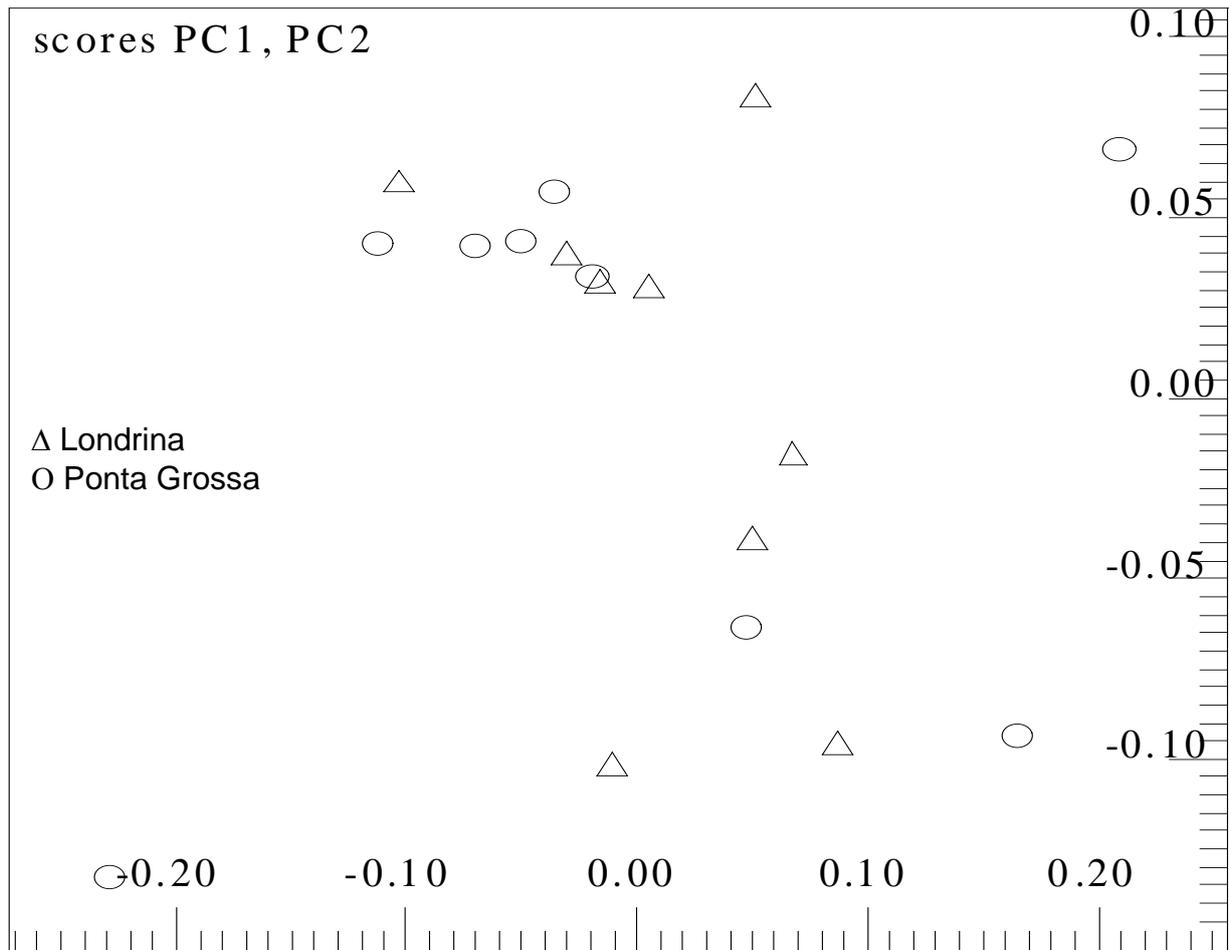


FIGURA 4.43 – Gráfico de escores, mostrando a discriminação entre amostras de sementes de soja da cultivar BRS 134, proveniente de duas diferentes regiões, em que os espectros sofreram uma multiplicação exponencial Laurezentina dos FIDs por um fator de 0,3 Hz, utilizando-se *buckets* de 0,05 ppm. As percentagens de informações obtidas foram de 54% em PC1, de 24,5% em PC2 e um total de 95%.

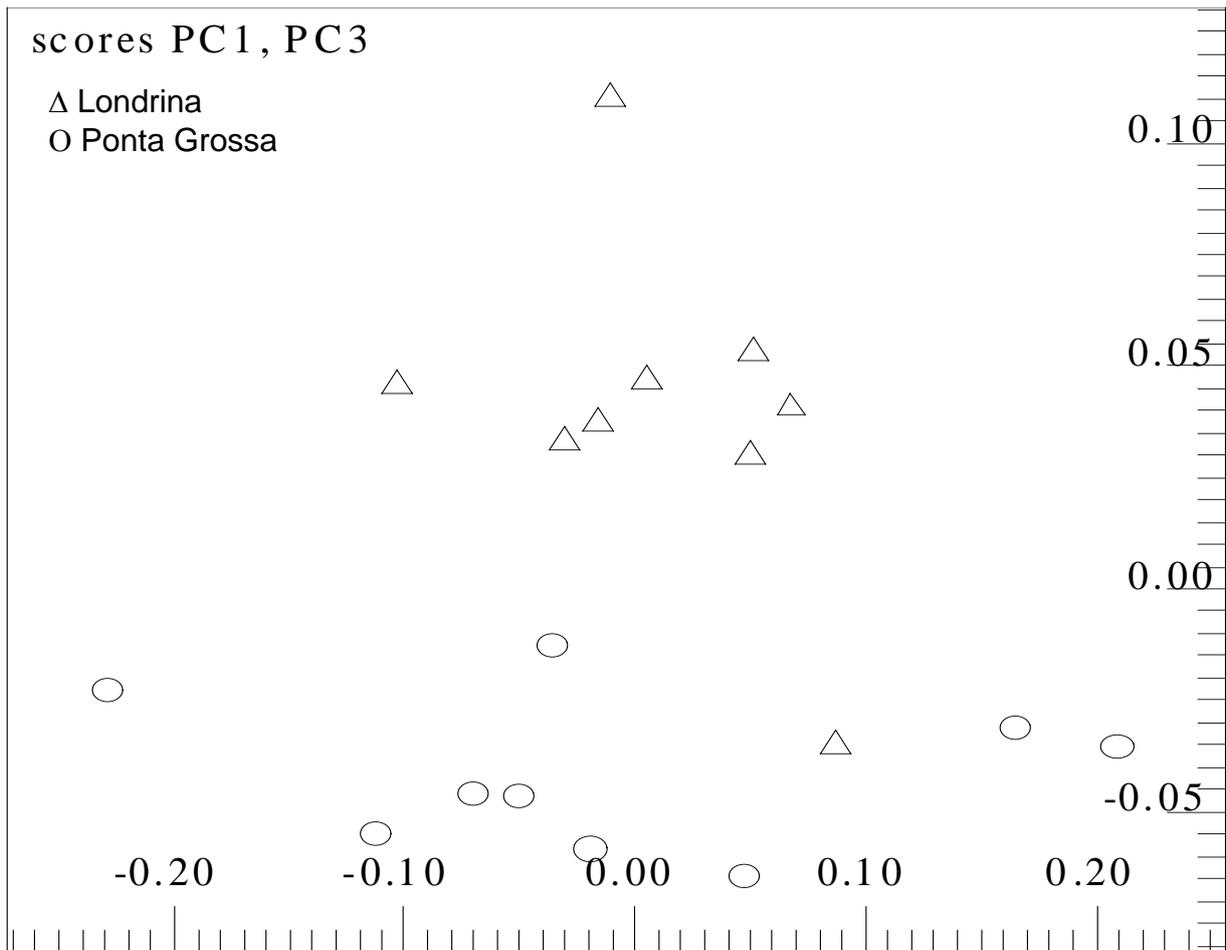


FIGURA 4.44 – Gráfico de escores, mostrando a discriminação entre amostras de sementes de soja da cultivar BRS 134, proveniente de duas diferentes regiões, em que os espectros sofreram uma multiplicação exponencial Laurezentina dos FIDs por um fator de 0,3 Hz, utilizando-se *buckets* de 0,05 ppm. As percentagens de informações obtidas foram de 54% em PC1, de 13% em PC3 e um total de 95%.

### 4.8.3 – Avaliação em conjunto do alisamento dos sinais e tamanho dos *buckets*

Temos demonstrado anteriormente que as melhores discriminações foram obtidas com *buckets* de 0,05 ppm (Item 4.8) e com fator de multiplicação exponencial de 1 Hz (Item 4.9), respectivamente. No entanto, o ganho na resolução pela diminuição do fator de multiplicação pode ser desprezado com o uso de *buckets* grandes. Desta forma, ambos o fator de multiplicação dos FIDs e o tamanho dos *buckets* tem de ser avaliados em conjunto, a fim de obter os melhores resultados pela análise quimiométrica. Para isso, o mesmo conjunto de dados referente à amostras de diferentes cultivares utilizado anteriormente foi empregado, em que os espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  foram processados com LB de 0,3 Hz e divididos em *buckets* de 0,01 ppm cada. A análise por PCA deste conjunto de amostras não apresentou uma boa discriminação (Figura 4.45). Também não foram obtidos bons resultados quando empregou-se LB de 0,3 Hz e *buckets* de 0,05 ppm (Figura 4.40), sendo o melhor resultado obtido quando aumentou-se o fator de multiplicação para 1 Hz e mantendo-se o tamanho dos *buckets* em 0,05 ppm (Figura 4.39), já que um aumento ainda maior no fator de multiplicação (2 Hz) causou perda de poder discriminante (Figura 4.38).

Para o conjunto de amostra de uma mesma cultivar mas de regiões diferentes, usando-se LB de 0,3 Hz e *buckets* de 0,01 ppm a análise por PCA (Figura 4.46) resultou em uma discriminação semelhante a obtida com LB de 1 Hz e *buckets* de 0,05 ppm (Figura 4.42). Demonstrando-se assim, que há uma coerência do aumento da resolução do sinais nos espectros de RMN com o emprego de *buckets* menores, como era de ser esperado. Já o aumento ou diminuição do fator de multiplicação além de 1 Hz, mantendo-se o tamanho dos *buckets* fixo em 0,05 ppm também resulta em perda de resolução nas análises exploratórias (Figuras 4.41 a 4.43).

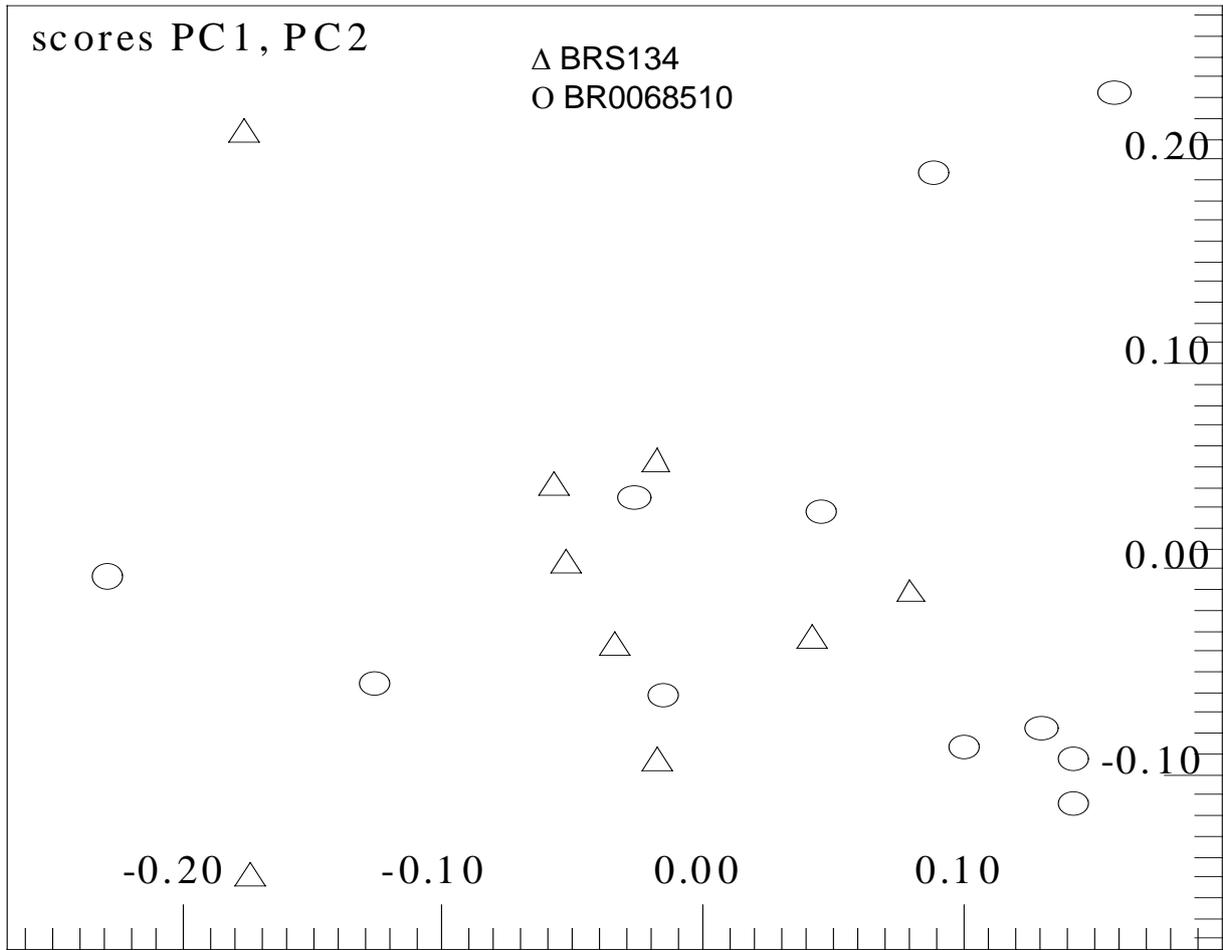


FIGURA 4.45 – Gráfico de escores mostrando a discriminação entre amostras de sementes de soja de diferentes cultivares em que os espectros sofreram uma multiplicação exponencial dos FIDs por um fator de 0,3 Hz, utilizando-se *buckets* de 0,01 ppm. As percentagens de informações obtidas foram de 32,5% em PC1, de 28,5% em PC2 e um total de 91,5%.

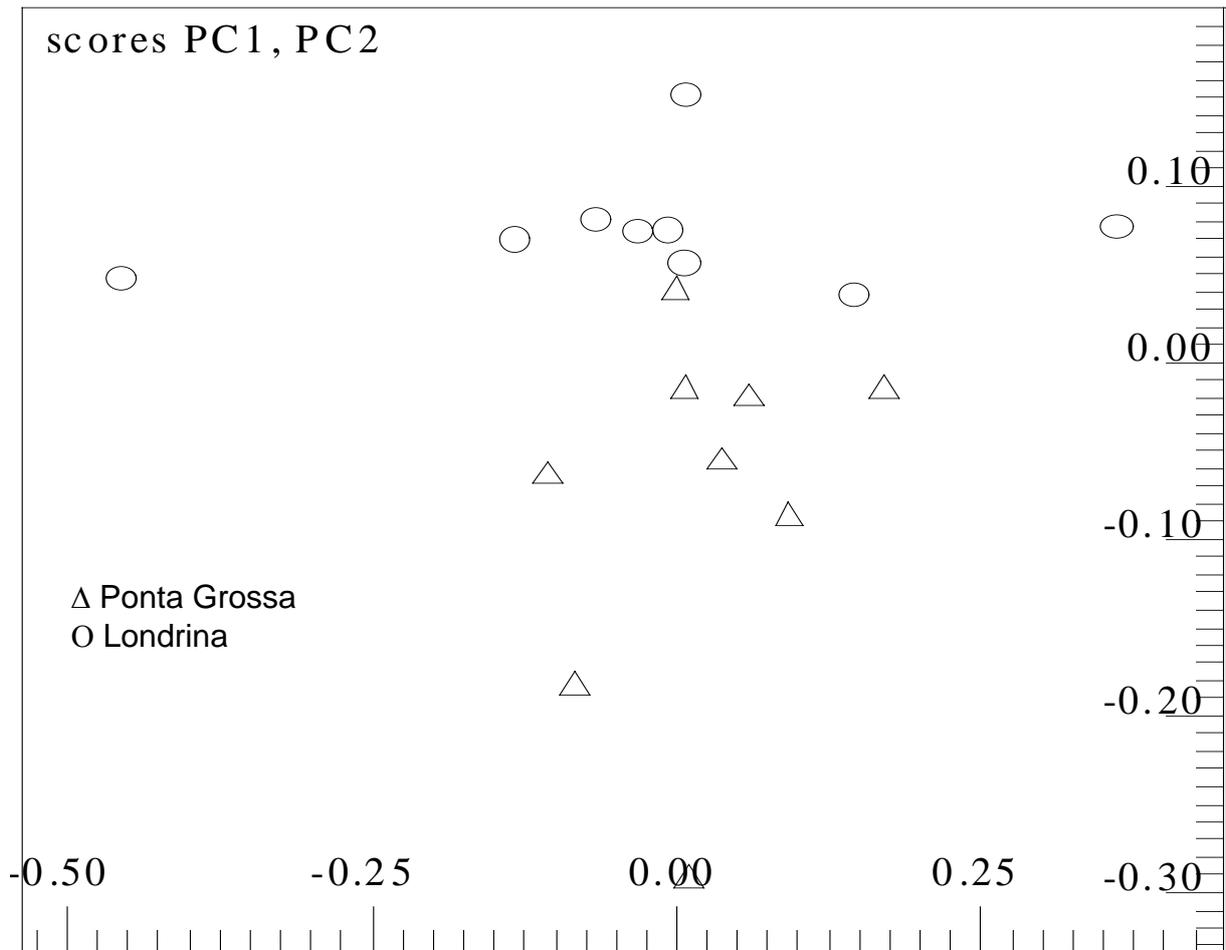


FIGURA 4.46 – Gráfico de escores mostrando a discriminação entre amostras de sementes de soja de diferentes regiões em que os espectros sofreram uma multiplicação exponencial dos FIDs por um fator de 0,3 Hz, utilizando-se *buckets* de 0,01 ppm. As percentagens de informações obtidas foram de 46,5% em PC1, de 20,3% em PC2 e total de 89,3%.

#### 4.9 – Comparação das análises quimiométricas de espectros obtidos com e sem o filtro de $T_2$

A seqüência de pulsos CPMG (Filtro de  $T_2$ ) possibilitou melhorar a resolução dos espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$ , além de possibilitar a observação de um maior número de sinais em comparação com os espectros obtidos com a seqüência *zg*, como foi mostrado anteriormente. Esperar-se-ia então que o emprego destes espectros resultasse em melhores discriminações, já que possuem maior número de informações químicas. No entanto, o emprego do filtro de  $T_2$  precisa avaliar com cuidado, uma vez que os sinais eliminados pelo mesmo podem ser importantes para caracterizar as amostras. Assim, foram adquiridos espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$ , com ambas as seqüências de pulsos para os mesmos conjuntos de amostras e submetidos a análise quimiométrica por PCA.

No primeiro caso utilizou-se um conjunto de amostras de uma mesma cultivar de soja, mas de diferentes origens geográficas. O resultado da análise por PCA dos espectros, obtidos sem o uso do filtro de  $T_2$ , foi uma discriminação inferior (Figura 4.47) daquela obtida para os espectros adquiridos com o filtro de  $T_2$  (Figura 4.48). Confirmando que mais informações químicas naqueles espectros obtidos com a seqüência CPMG.

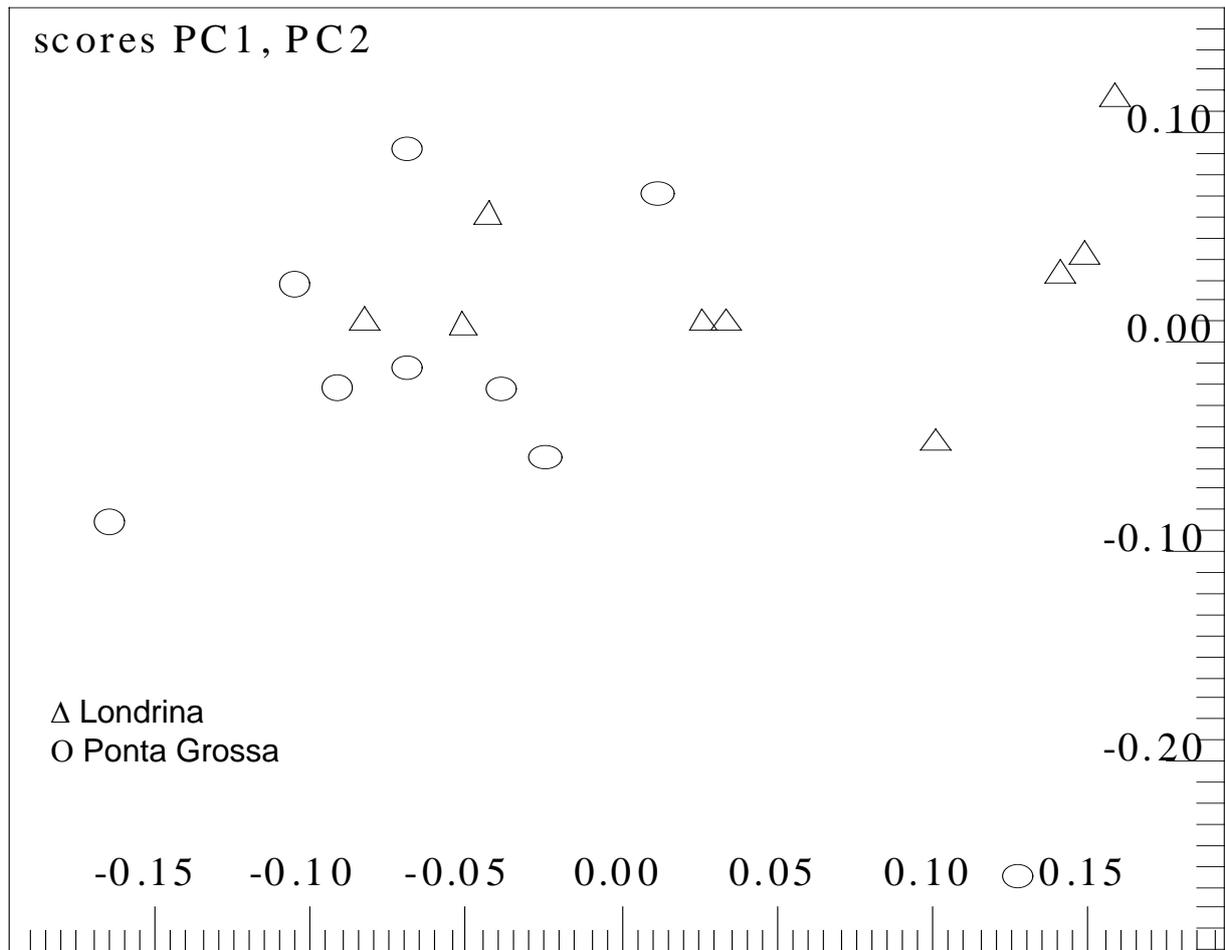


FIGURA 4.47 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  adquiridos sem o uso do filtro de  $T_2$ , mostrando a discriminação entre amostras de sementes de soja da cultivar BRS 134 proveniente de diferentes regiões. As percentagens de informações obtidas foram de 56% em PC1, de 34% em PC2 e um total de 98,4%.

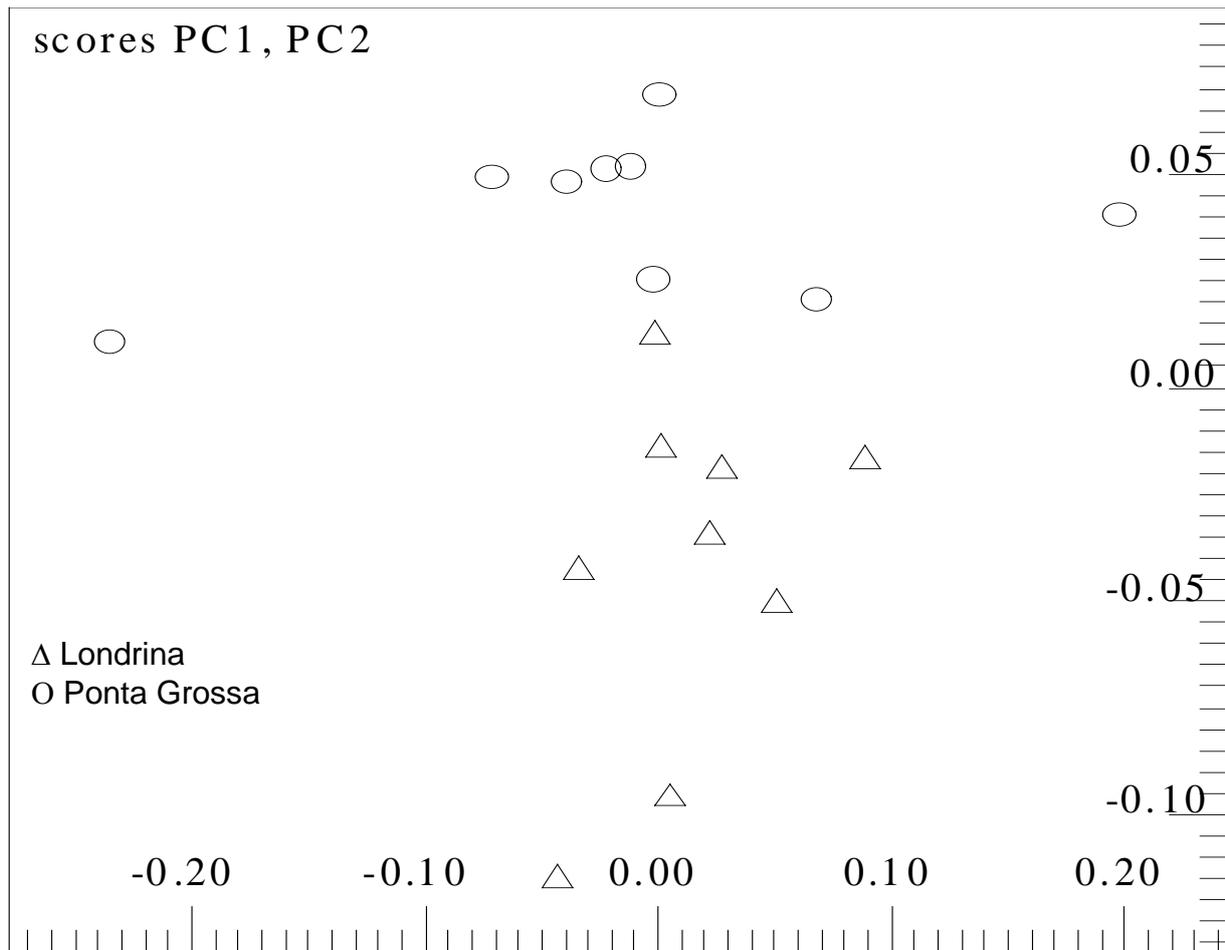


FIGURA 4.48 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  adquiridos com o emprego do filtro de  $T_2$ , mostrando a discriminação entre amostras de sementes de soja da cultivar BRS 134 proveniente de diferentes regiões. As percentagens de informações obtidas foram de 55% em PC1, de 21% em PC2 e um total de 95%.

Já para amostras de soja de diferentes cultivares, a discriminação na análise por PCA foi obtida independente da seqüência de pulsos utilizada para a aquisição dos espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$ , como pode ser observado nas figuras 4.49 e 4.50. Sendo que, a discriminação melhor resolvida quando foi usado os espectros sem o filtro de  $T_2$ . Este resultado é explicado pela análise dos gráficos de influências das variáveis, os quais demonstram que as variáveis de maior importância para a discriminação estão presentes em ambos os espectros, adquiridos com ambas as seqüências. Portanto, pode-se concluir que os sinais eliminadas pelo filtro de  $T_2$ , não são responsáveis pela discriminação entre as cultivares BRS134 e BR0068510. O mesmo foi observado nas demais análises.

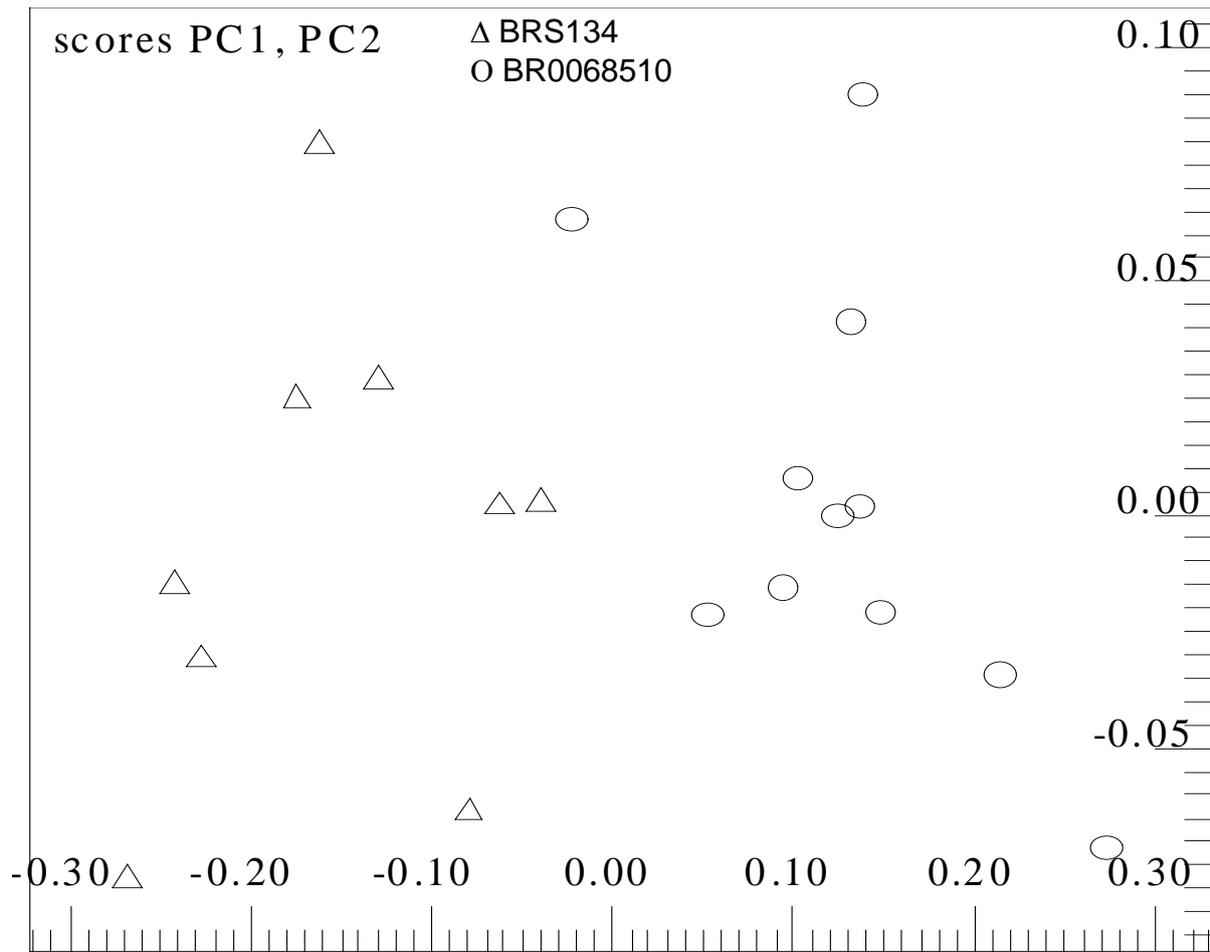


FIGURA 4.49 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  adquiridos sem o emprego do filtro de  $T_2$ , mostrando a discriminação entre amostras de sementes de soja de diferentes cultivares. As percentagens de informações obtidas foram de 91% em PC1, de 7% em PC2 e um total de 99,5%.

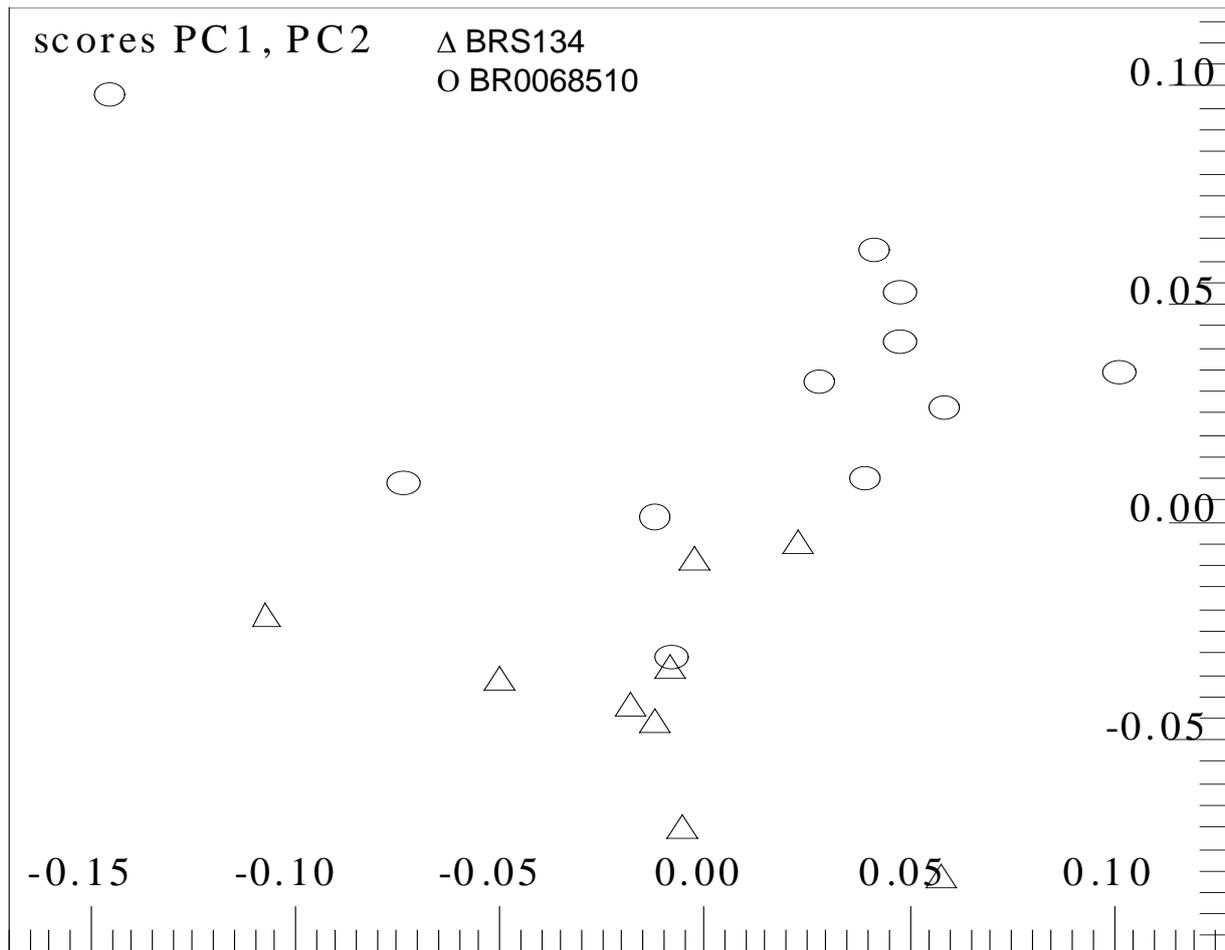
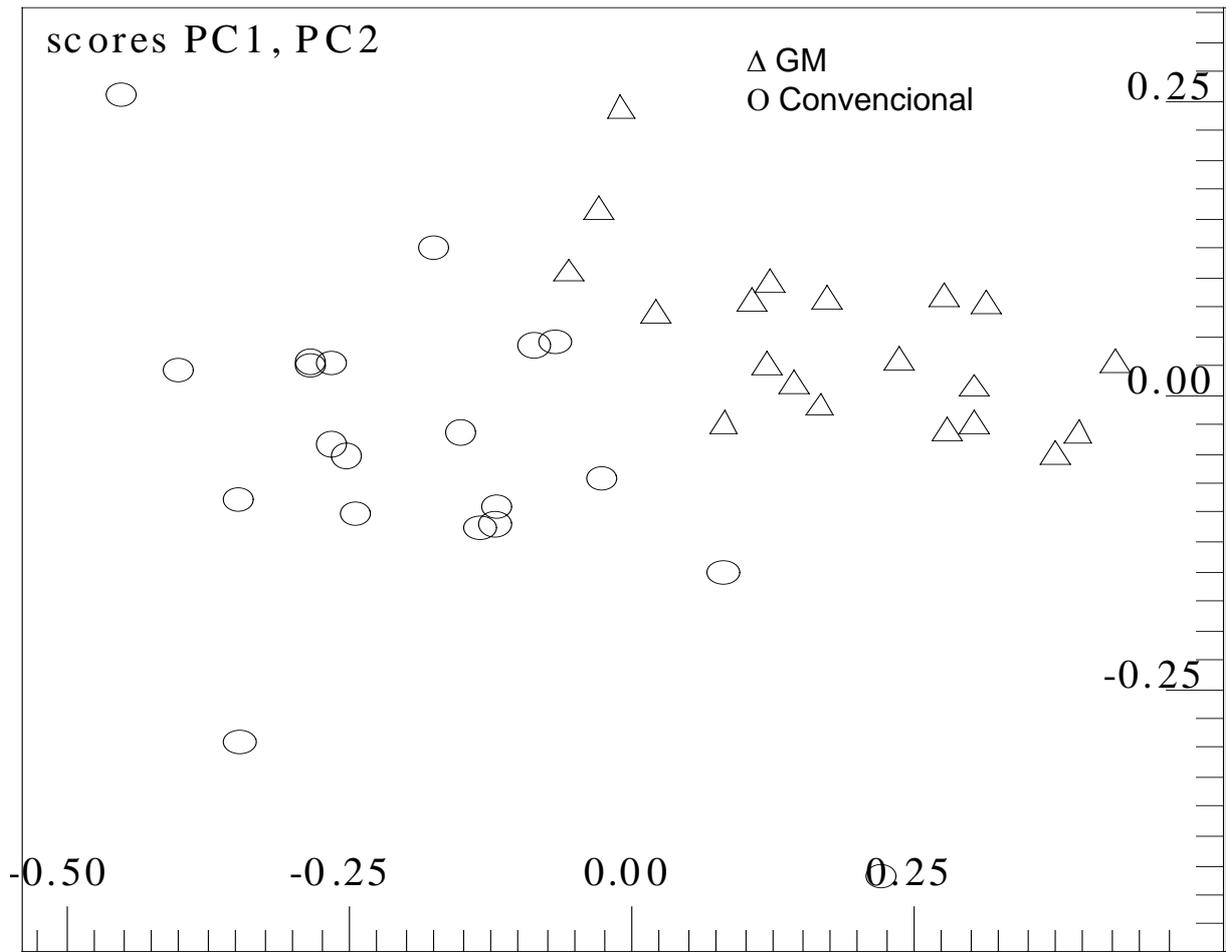


FIGURA 4.50 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  adquiridos com o emprego do filtro de  $T_2$ , mostrando a discriminação entre amostras de sementes de soja de diferentes cultivares. As percentagens de informações obtidas foram de 43% em PC1, de 26% em PC2 e um total de 95%.

Para um conjunto de dados contendo amostras de soja GM e CV a melhor discriminação foi obtida empregando-se espectros adquiridos com o filtro de  $T_2$  do que aqueles em que o mesmo não foi utilizado (Figuras 4.51 e 4.52, respectivamente). A análise do gráfico de influências revelou que alguns sinais dos responsáveis por pela discriminação estão em uma região de alto congestionamento nos espectro de  $^1\text{H}$  e ainda com a presença de sinais alargados, provavelmente de polissacarídeos. Desta forma, o filtro de  $T_2$  permitiu aumentar a influência destes sinais e, conseqüentemente, uma melhora na discriminação. Em geral as melhores discriminações tem sido obtidas com espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  adquiridos com a seqüência de pulsos CPMG.



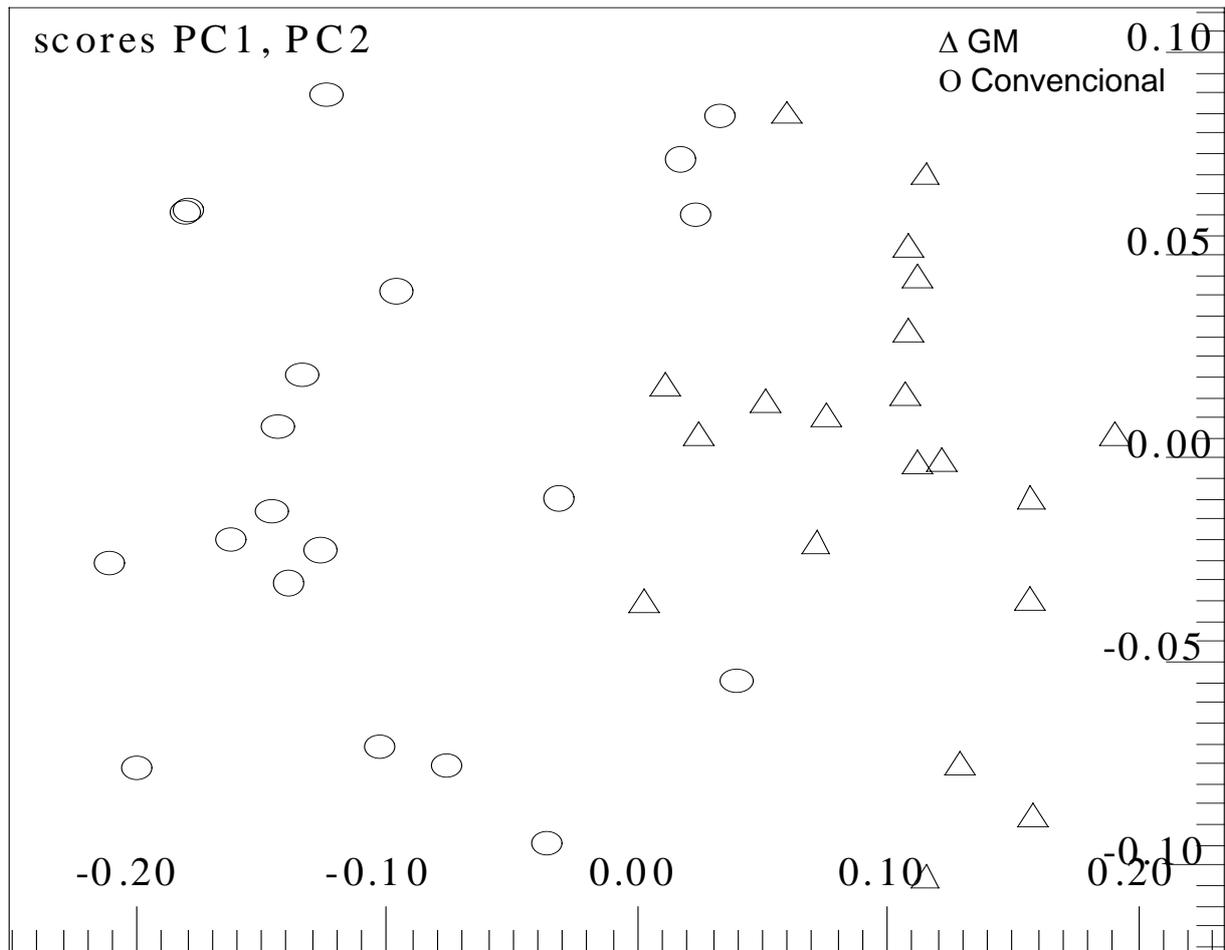


FIGURA 4.52 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  adquiridos sem o emprego do filtro de  $T_2$ , mostrando a discriminação entre amostras de sementes GM e CV da cultivar BRS133. As percentagens de informações obtidas foram de 66,5% em PC1, de 13% em PC2 e um total de 87,5%.

#### 4.10 – Avaliação do número de varreduras e da região responsável pela discriminação

Os primeiros espectros de RMN HR-MAS dos grãos de soja foram adquiridos com 512 varreduras (NS), com o objetivo de observar sinais na região de  $\delta$  10 a 6 ppm dos espectros e também porque acreditava-se que as diferenças entre os espécimens, principalmente entre GM e CV estariam nesta região.

A análise exploratória destes dados utilizando todo o espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , ou seja, todos os sinais (variáveis) presentes na região entre  $\delta$  9,5 a 0,5 ppm, com exceção apenas da região referente ao sinal da água ( $\delta$  5,0-4,5 ppm) mostrou que era possível discriminar as amostras distintas e agrupar as semelhantes. Por exemplo, entre diferentes cultivares de soja (Figura 4.53). No entanto, a análise do gráfico de influências, revelou que apenas alguns dos sinais presentes na região de  $\delta$  9,5 a 5,0 ppm haviam contribuído para que ocorresse a discriminação entre os cultivares (Figura 4.54).

A maioria dos sinais que efetivamente foram responsáveis pela discriminação eram todos sinais relativamente intensos e presentes na região de  $\delta$  4,5 a 0,5 ppm nos espectros. É importante lembrar que as análises exploratórias foram realizadas com os dados autoescalados, e sendo assim, todos os sinais (variáveis) dos espectros, sejam eles mais ou menos intensos possuem a mesma importância para a análise.

Para comprovar este resultado, a análise por PCA foi repetida para o mesmo conjunto, porém utilizando-se somente a região de  $\delta$  4,5 a 0,5 ppm dos espectros. Se olharmos novamente na figura 4.54 veremos que há algumas variáveis (sinais ou *buckets*) acima de  $\delta$  5,0 ppm que também contribuíram para a discriminação. Porém, estas variáveis são referentes aos hidrogênios olefínicos e do hidrogênio da posição  $\beta$  da unidade de glicerol da composição de triacilgliceróis das amostras. Sendo assim, também há representantes da composição de triacilgliceróis na região de  $\delta$  4,5 a 0,5 ppm dos espectros e a exclusão destas variáveis não deveria afetar a discriminação. Portanto, não é necessário usar os sinais acima de  $\delta$  4,5 ppm, simplificando a metodologia, uma vez que também não é mais necessário excluir a região referente ao sinal da água dos espectros. O resultado da análise por PCA, utilizando-se somente a região de  $\delta$  4,5 a 0,5 ppm (Figura 4.55), mostra que não há diferença alguma daquela obtida quando todo o espectro foi utilizado.

Não havendo a necessidade de se utilizar região de  $\delta$  9,5 a 4,5 ppm nas análises quimiométricas, conseqüentemente, também não há mais a necessidade de se utilizar um grande número varreduras na aquisição dos espectros. Sendo assim, o número de varreduras nos experimentos subsequentes foram reduzidos para 128 e/ou 64, o que possibilitou reduzir significativamente o tempo de aquisição, e com isso, aumentar o número de replicatas. Para se ter um noção, um espectro de RMN de  $^1\text{H}$  adquirido com NS de 512, TD de 64K, janela espectral de 10 ppm e D1 de um segundo demora uma hora e doze minutos. A figura 4.56 mostra um exemplo de análise exploratória com sucesso de um conjunto de dados em que os espectros foram adquiridos apenas com 64 varreduras e com um número maior de replicatas.

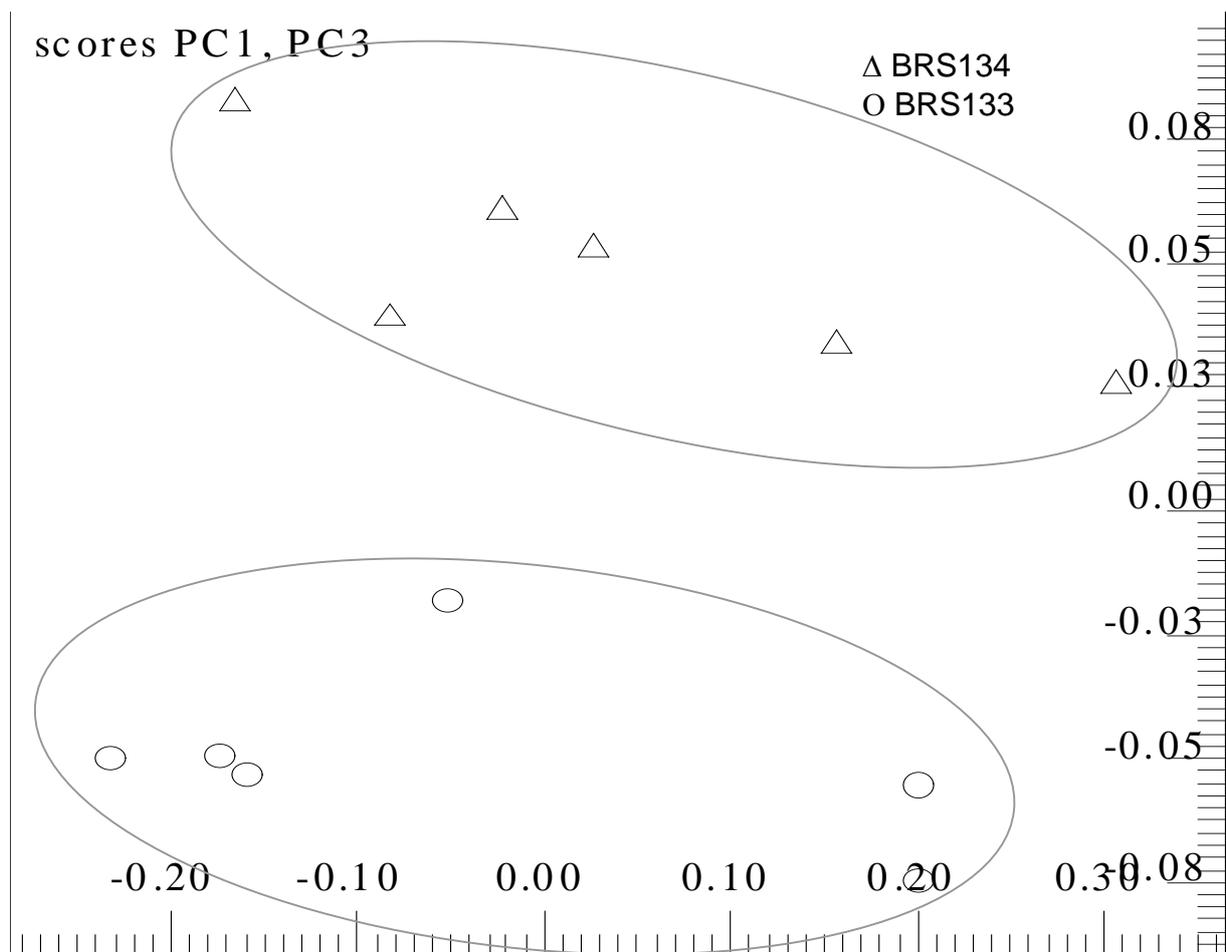


FIGURA 4.53 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$ , adquiridos com 512 varreduras e utilizando-se todo o espectro (9,5-0,5 ppm) na análise, mostrando a discriminação entre amostras de sementes de diferentes cultivares. As percentagens de informações obtidas foram de 61,3% em PC1, de 6% em PC3 e um total de 98%.

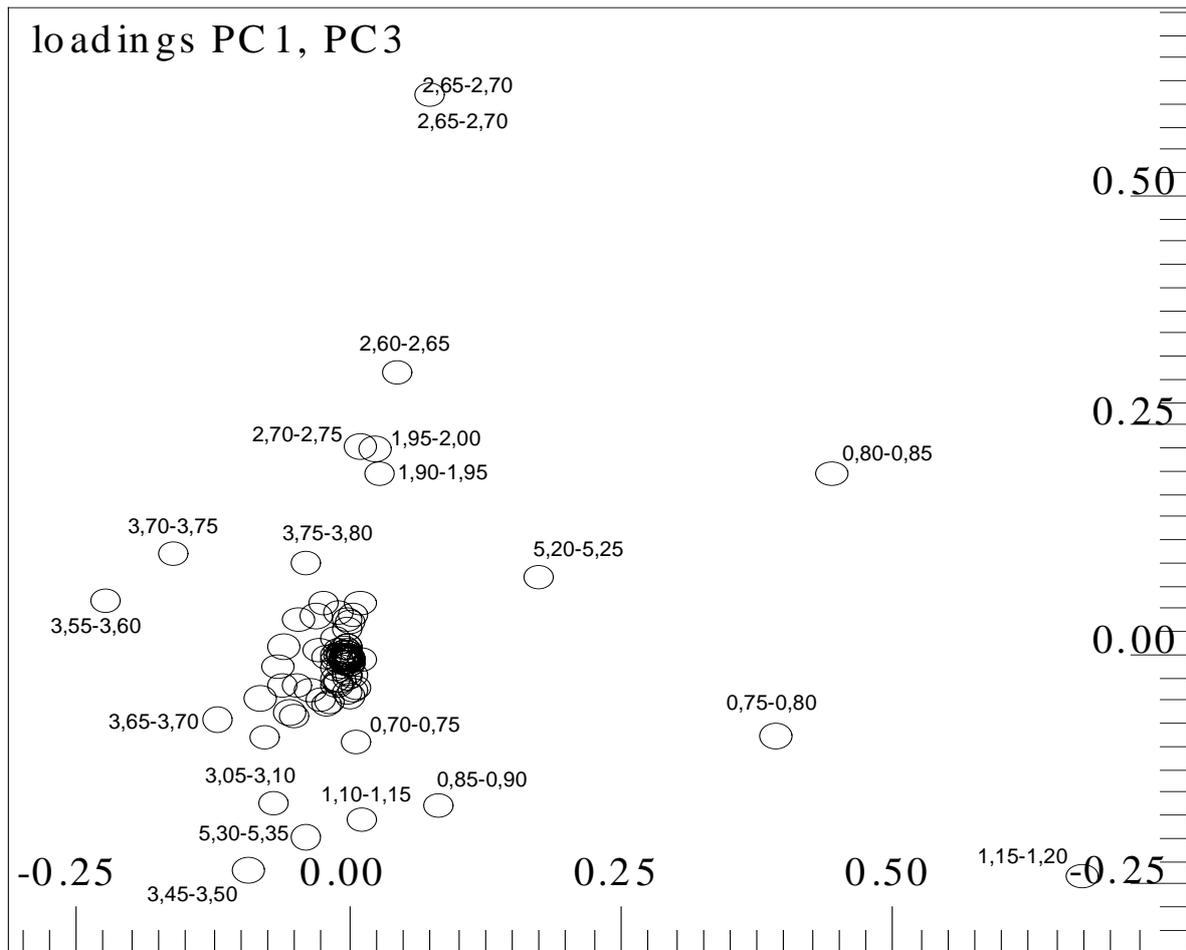


FIGURA 4.54 – Gráfico de influências (*Loadings*) referente ao gráfico de escores de PC1 x PC3 da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$ , adquiridos com 512 varreduras e utilizando-se todo o espectro (9,5 a 0,5 ppm) na análise, mostrando as variáveis que mais contribuíram para a discriminação entre cultivares.

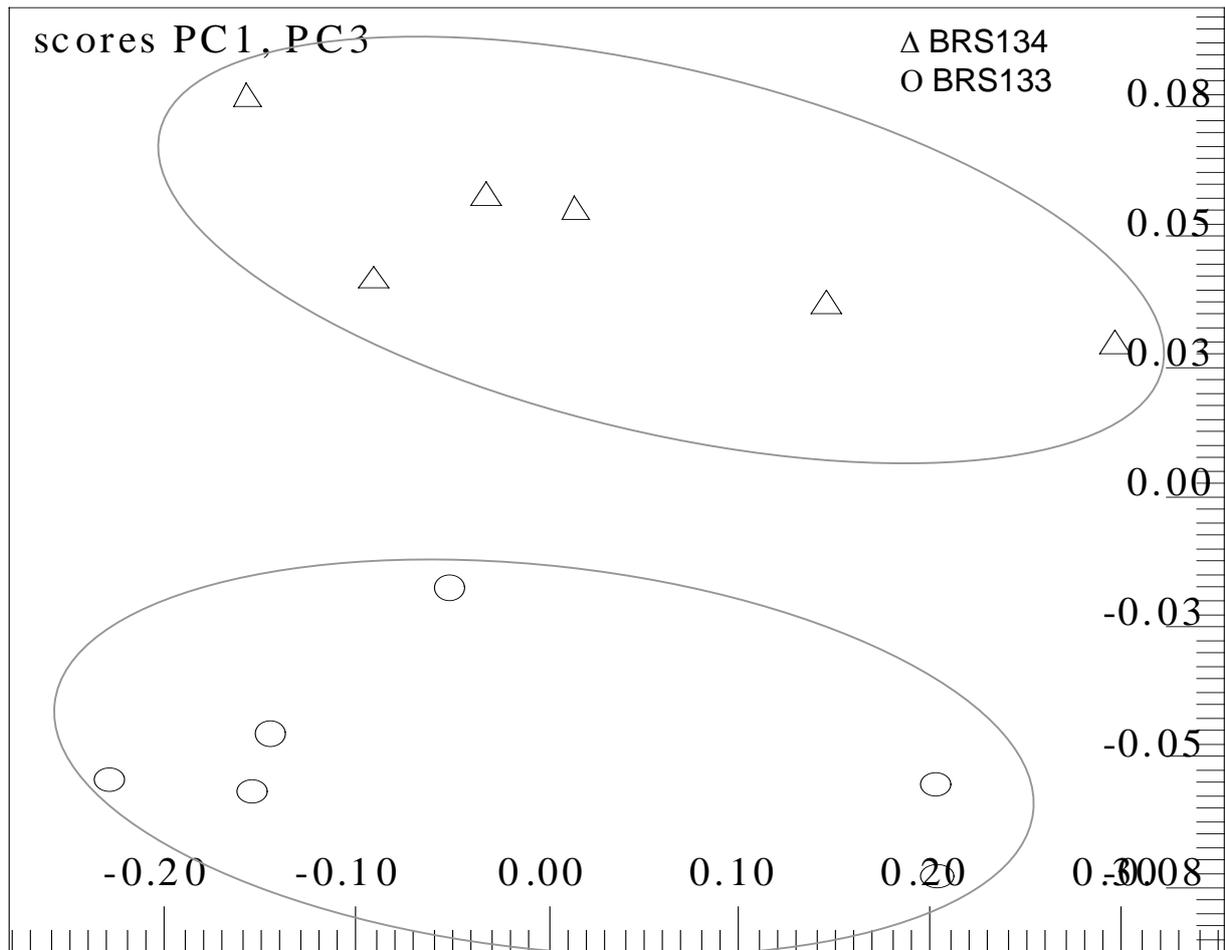


FIGURA 4.55 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$ , adquiridos com 512 varreduras e utilizando-se somente a região de 4,5 a 0,5 ppm dos espectros na análise, mostrando a discriminação entre amostras de sementes de diferentes cultivares. As percentagens de informações obtidas foram de 60,5% em PC1, de 6% em PC3 e um total de 98%.

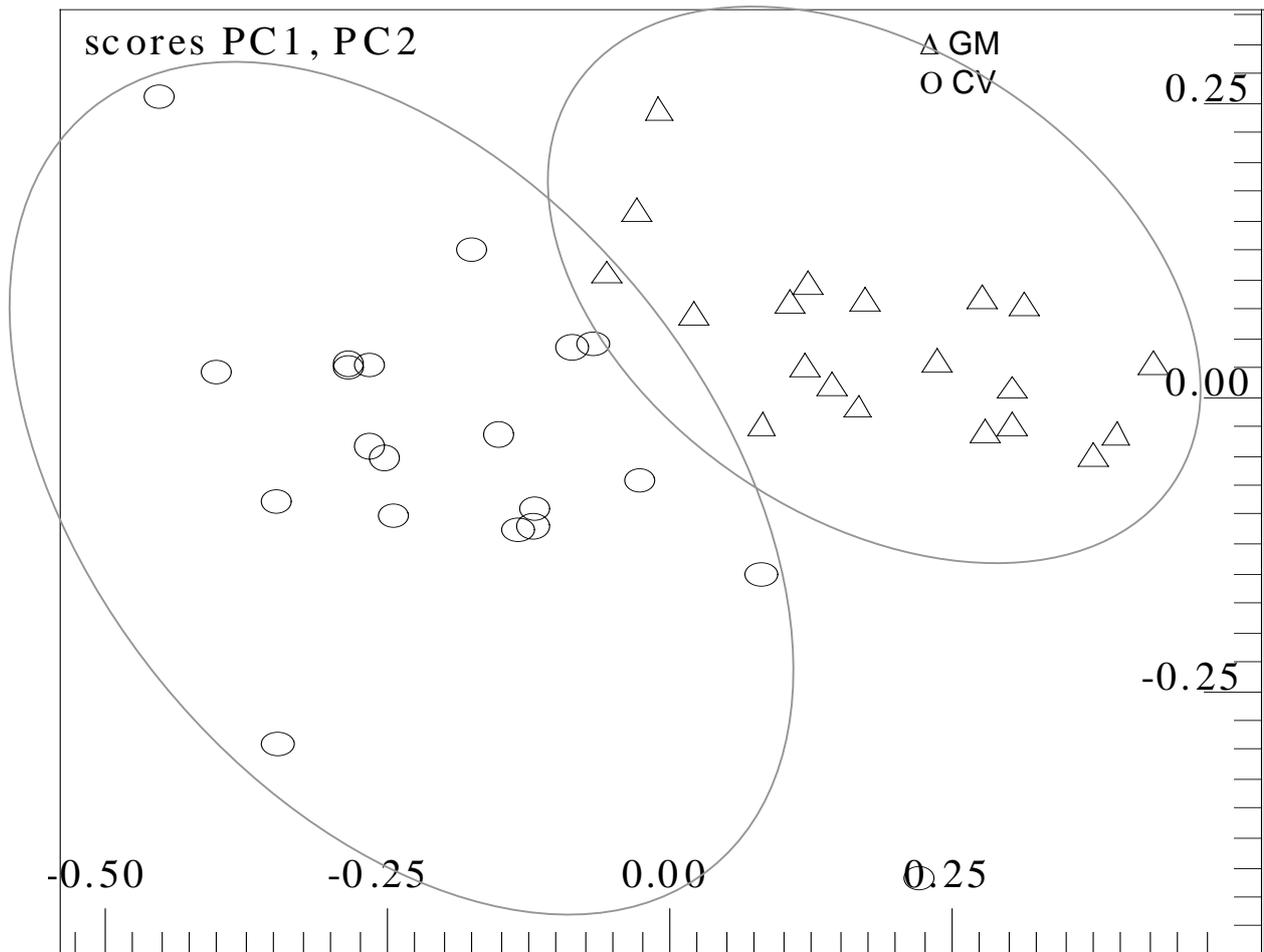


FIGURA 4.56 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$ , adquiridos com 64 varreduras e utilizando-se somente a região de 4,5 a 0,5 ppm dos espectros na análise, mostrando a discriminação entre amostras de sementes de espécimens GM e CV da cultivar BRS133. As percentagens de informações obtidas foram de 63% em PC1, de 15,5% em PC2 e um total de 90,1%.

## 4.11 – Validação da metodologia

### 4.11.1 – Análise da robustez

Resultados de medidas analíticas podem apresentar variações de acordo com o equipamento utilizado, tempo entre a realização das medidas e analista que efetuou as medidas, entre outros. Estas variações não são reais, mas influências devido a desvios experimentais, podendo gerar falsos positivos. Desta forma, verificou-se se as análises quimiométricas seriam influenciadas por estes fatores, tal como as outras técnicas analíticas. Para tanto, utilizou-se dois conjuntos de dados para verificar a influência do analista e da data em que foram adquiridas as amostras.

No primeiro caso, espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , de uma mesma amostra de soja, foram adquiridos em diferentes dias pelo mesmo analista. A análise por PCA discriminou as amostras de acordo com a data em que os espectros foram adquiridos (Figura 4.57). Repetindo-se o experimento utilizando-se amostras de uma outra cultivar de soja, o mesmo resultado foi obtido (Figura 4.58). Por outro lado, quando todos os espectros foram adquiridos no mesmo dia e pelo mesmo analista, a análise por PCA não mostrou a formação de grupos (Figura 4.59).

Os espectros de RMN HR-MAS, uma mesma amostra, adquiridos por diferentes analistas em um mesmo dia, quando submetidos a análises quimiométrica foram discriminados em dois grupos de acordo com o analista (Figuras 4.60 e 4.61). O processo de aquisição dos espectros envolveu desde o empacotamento do rotor até a aquisição do espectro. Além disso, os dados foram adquiridos de uma forma alternada entre os analistas, para eliminar a influência do tempo.

Para checar se o filtro de  $T_2$ , utilizado na aquisição dos espectros, estaria funcionando de forma diferente em função de diferenças no preparo de amostra pelos diferentes analistas, as análises por PCA também foram realizadas utilizando-se espectros adquiridos sem o emprego do filtro de  $T_2$ . No entanto, o mesmo resultado foi obtido para todas as comparações (Figura 4.62).

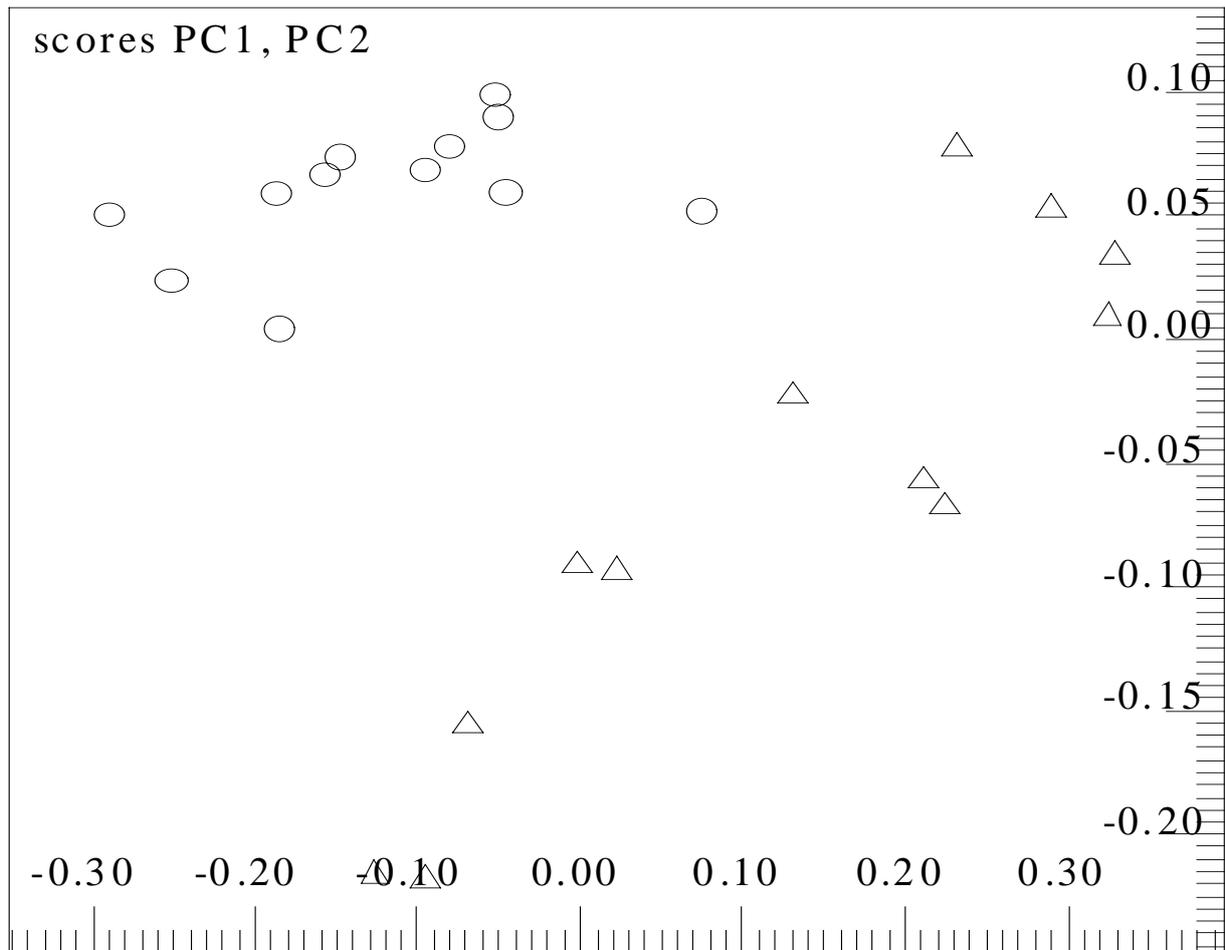


FIGURA 4.57 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  de sementes de uma mesma cultivar de soja (BRS133), mostrando a discriminação pela data de aquisição. As percentagens de informações obtidas foram de 72% em PC1, de 18,6% em PC2 e um total de 96,8%.

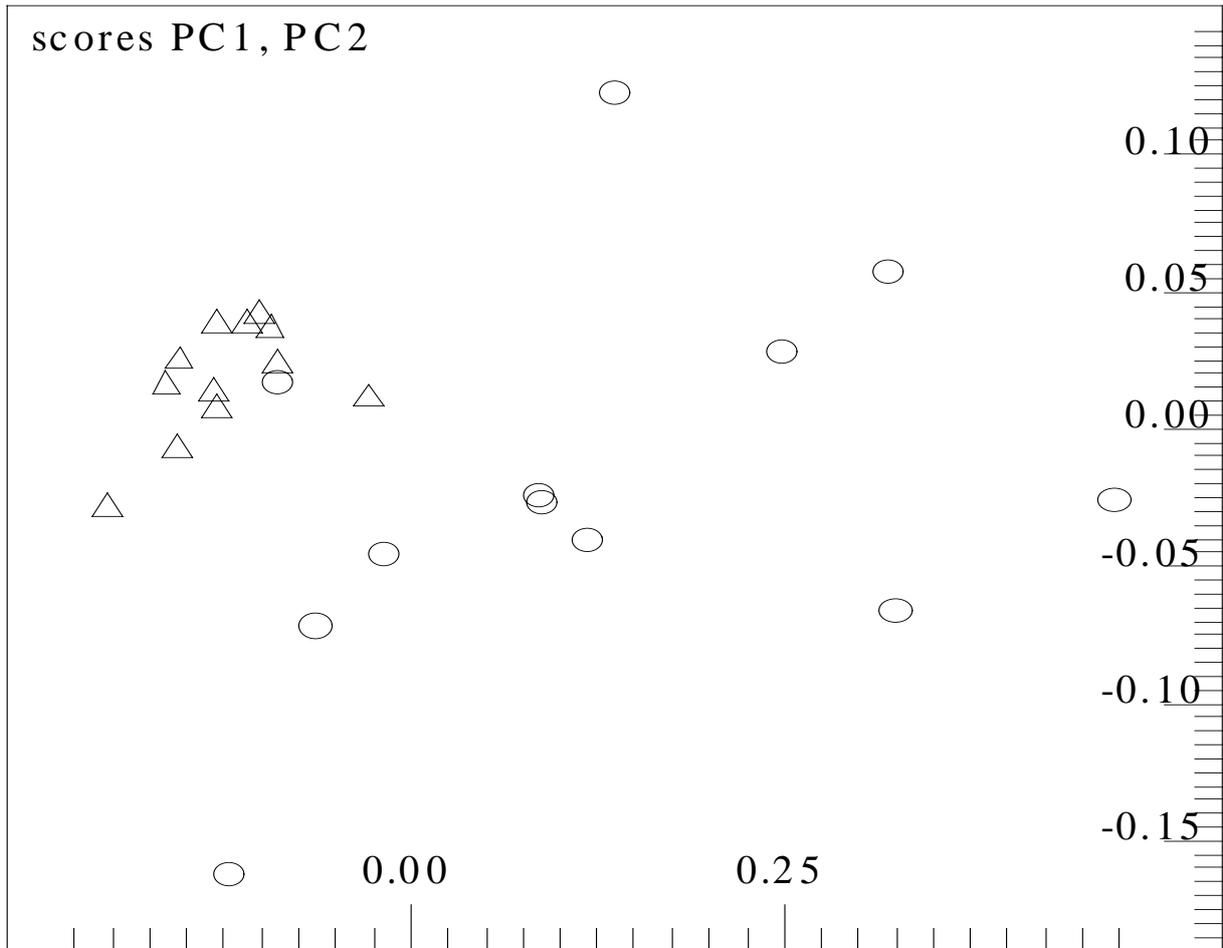


FIGURA 4.58 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  de sementes de uma mesma cultivar de soja (BRS134), mostrando a discriminação pela data de aquisição. As percentagens de informações obtidas foram de 83,2% em PC1, de 7,5% em PC2 e um total de 97,6%.

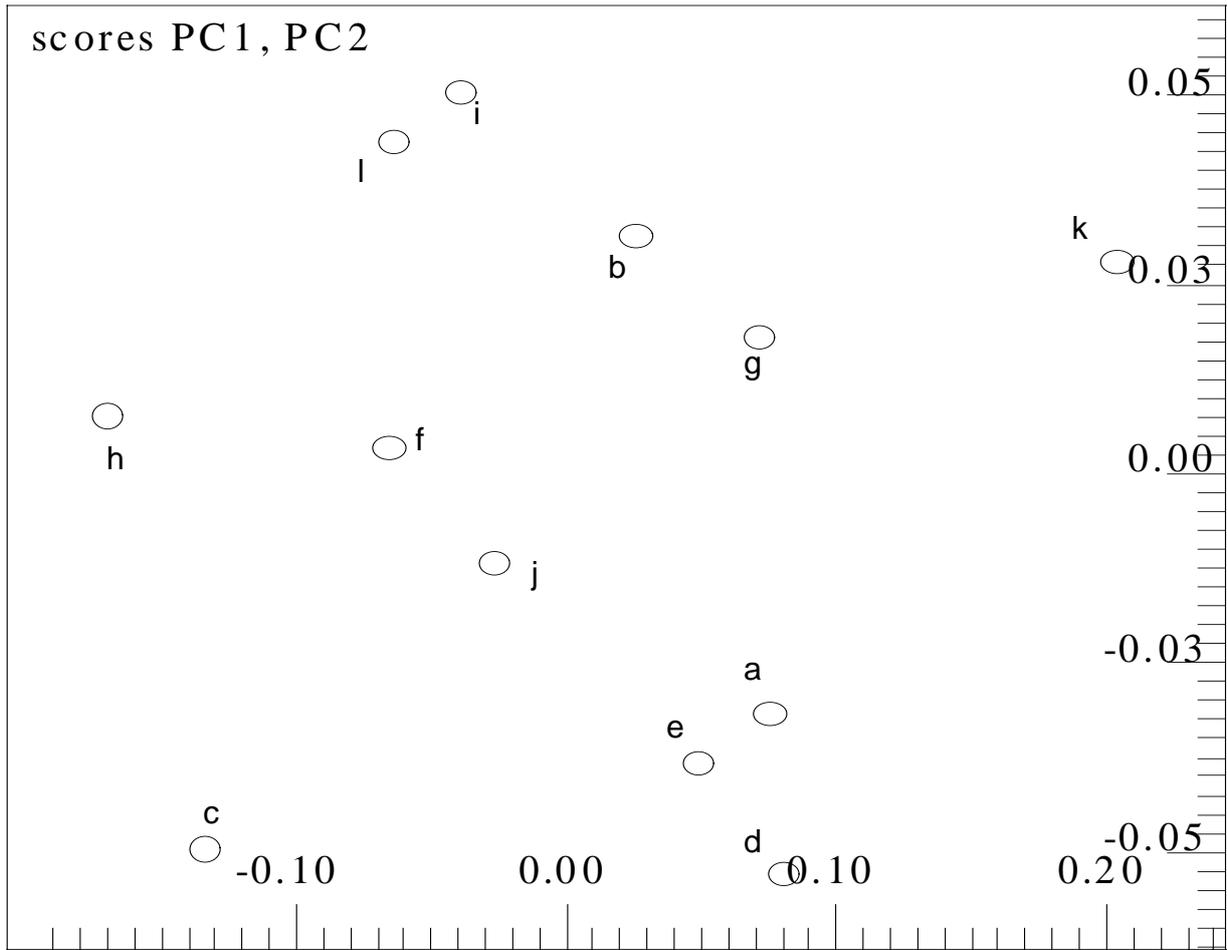


FIGURA 4.59 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  adquiridos no mesmo dia para sementes de uma mesma cultivar de soja, mostrando a distribuição aleatória das replicatas. As letras (a-l) significam a ordem de aquisição dos espectros.

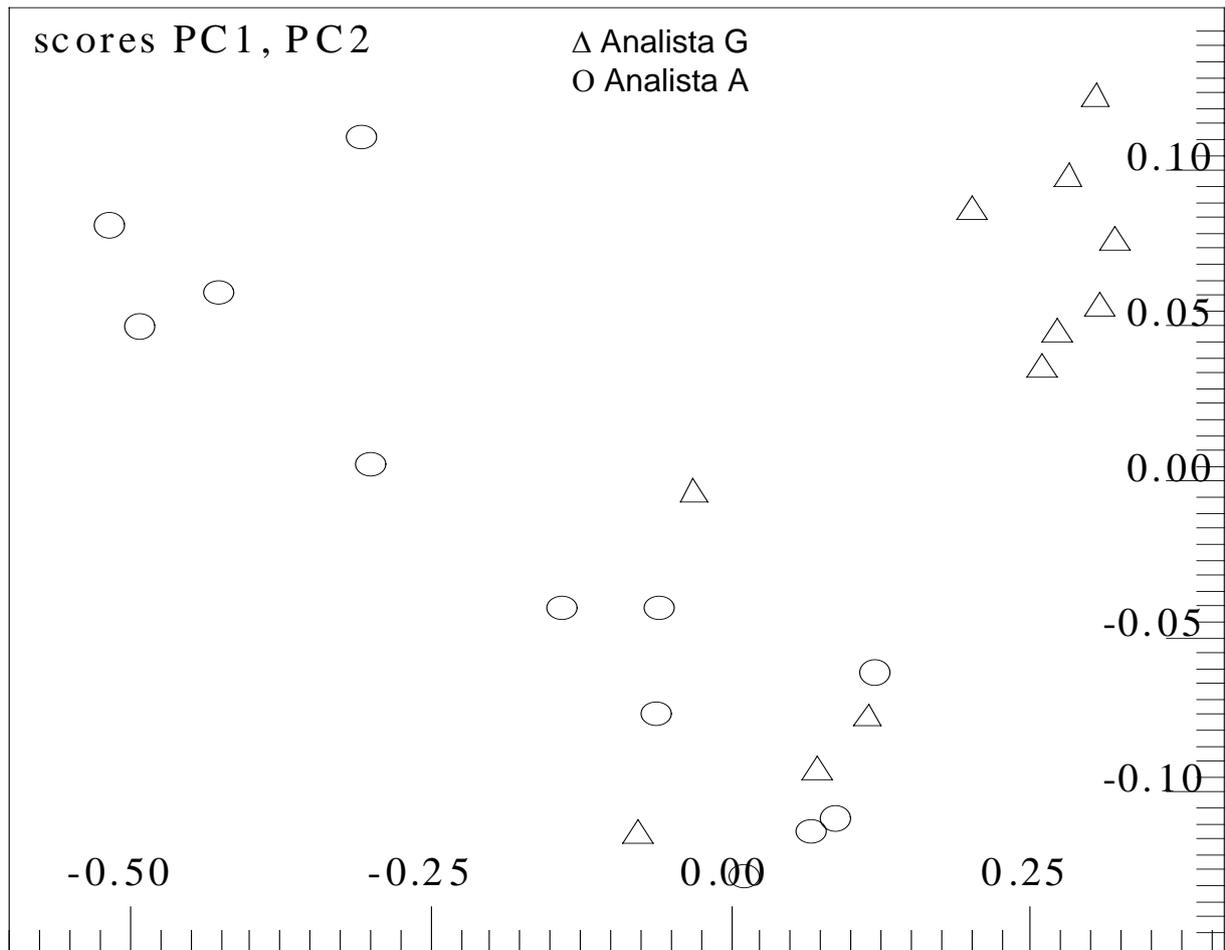


FIGURA 4.60 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  de sementes de uma mesma cultivar de soja (BRS133), mostrando a discriminação entre os analistas. As percentagens de informações obtidas foram de 81% em PC1, de 8% em PC2 e um total de 96,8%.

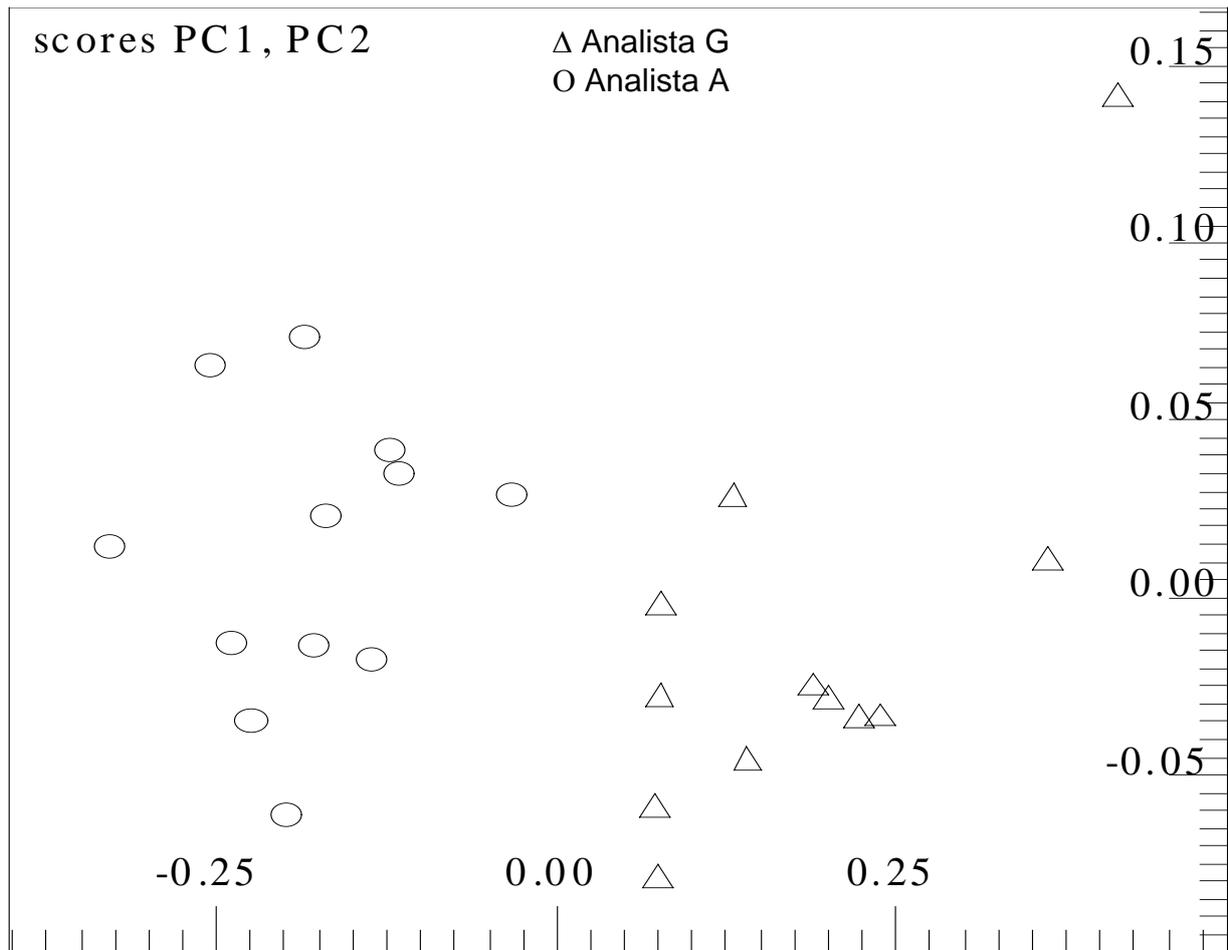


FIGURA 4.61 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  sementes de uma mesma cultivar de soja (BRS134), mostrando a discriminação entre os analistas. As percentagens de informações obtidas foram de 88,5% em PC1, de 5% em PC2 e um total de 97,8%.

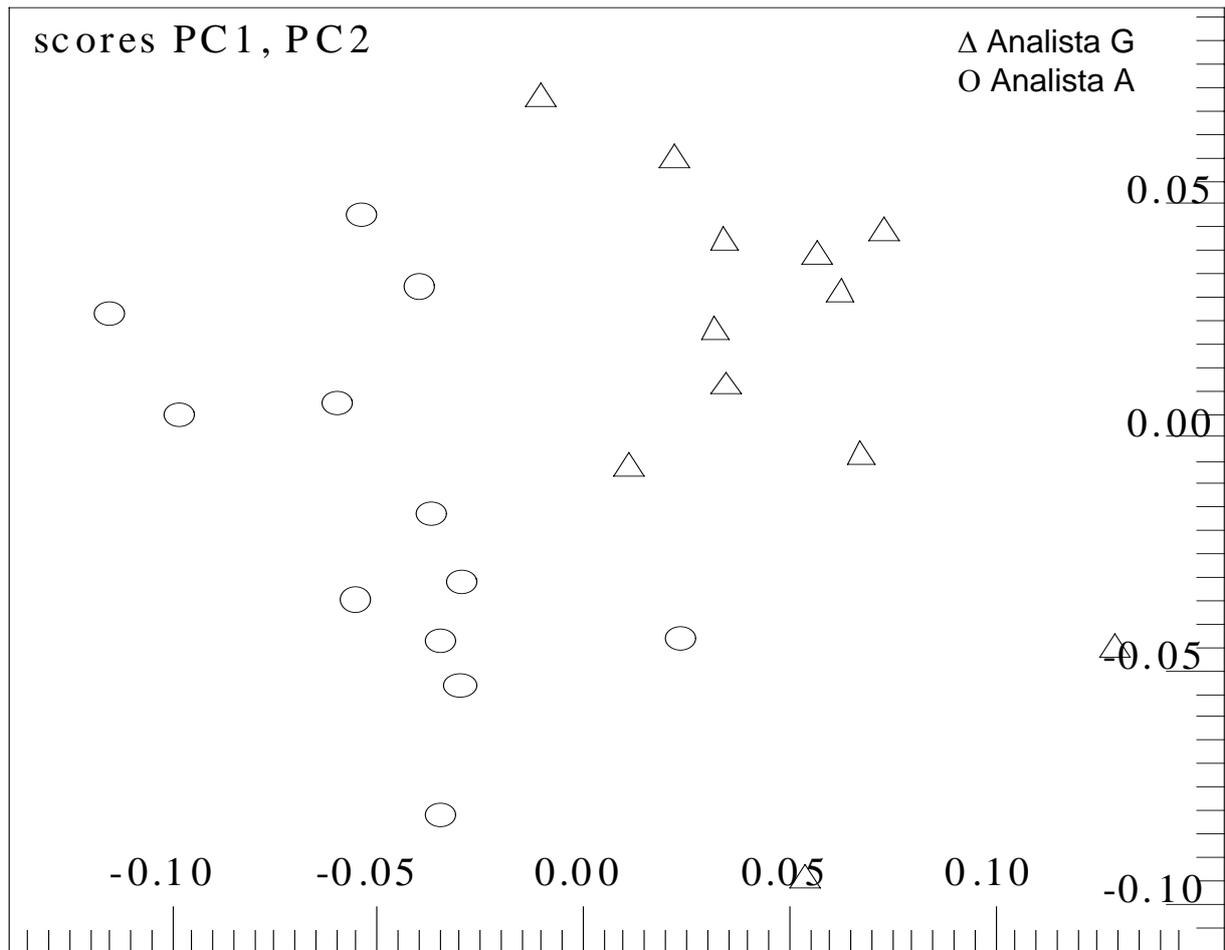


FIGURA 4.62 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  adquiridos sem o filtro de  $T_2$  de sementes de uma mesma cultivar de soja (BRS134), mostrando a discriminação entre os analistas. As percentagens de informações obtidas foram de 53,8% em PC1, de 30,8% em PC2 e um total de 95,1%.

Estes resultados indicaram que as diferenças ambientais são significativas e que a aquisição dos dados deve sofrer as menores variações possíveis. Acredita-se que as diferenças observadas sejam devidas principalmente a variações ocorridas no preparo de amostra, bem como na temperatura e no campo magnético aplicado sobre as amostras, em que os espectros foram adquiridos. Neste sentido, todas as mediadas subsequentes, de cada conjunto de dados, foram coletadas no mesmo dia e pelo mesmo analista. Os dados obtidos em diferentes datas foram descartados.

#### 4.11.2 – Análise da reprodutibilidade

Outra questão que surgiu durante o desenvolvimento deste trabalho foi se as análises quimiométricas eram reprodutíveis e não discriminações ao acaso. Esta questão é reforçada ainda mais, devido haver poucos trabalhos na literatura que aplicam análises quimiométricas sobre espectros de RMN obtidos pela técnica de HR-MAS. Embora haja uma quantidade razoável de trabalhos que se utilizam de medidas obtidas para amostras em solução.

Para verificar a reprodutibilidade do método realizada a análise quimiométrica de três conjuntos de dados idênticos, referentes cultivar BRS 134 de diferentes regiões. Além disso, os espectros de RMN HR-MAS de hidrogênio foram adquiridos em diferentes datas.

A análise quimiométrica destes três conjuntos de dados, mostrou sempre a mesma discriminação em PC1 entre as amostras, como pode ser observado nas figuras 4.66, 4.67 e 4.68. Ainda, as amostras provenientes da região de Londrina sempre foram alocadas na região negativa de PC1 nos gráficos de escores, enquanto que, as amostras de Ponta Grossa, sempre foram alocadas na região positiva.

A reprodutibilidade do método também é confirmada pela análise dos gráficos de influências, uma vez que sempre as mesmas variáveis foram responsáveis em todas as três discriminações, como pode ser observado nas figuras 4.69 e 4.71.

Estas discriminações, demonstram portanto a reprodutibilidade das análises quimiométricas de espectros de RMN de  $^1\text{H}$  obtidos diretamente de amostras de grãos de soja.

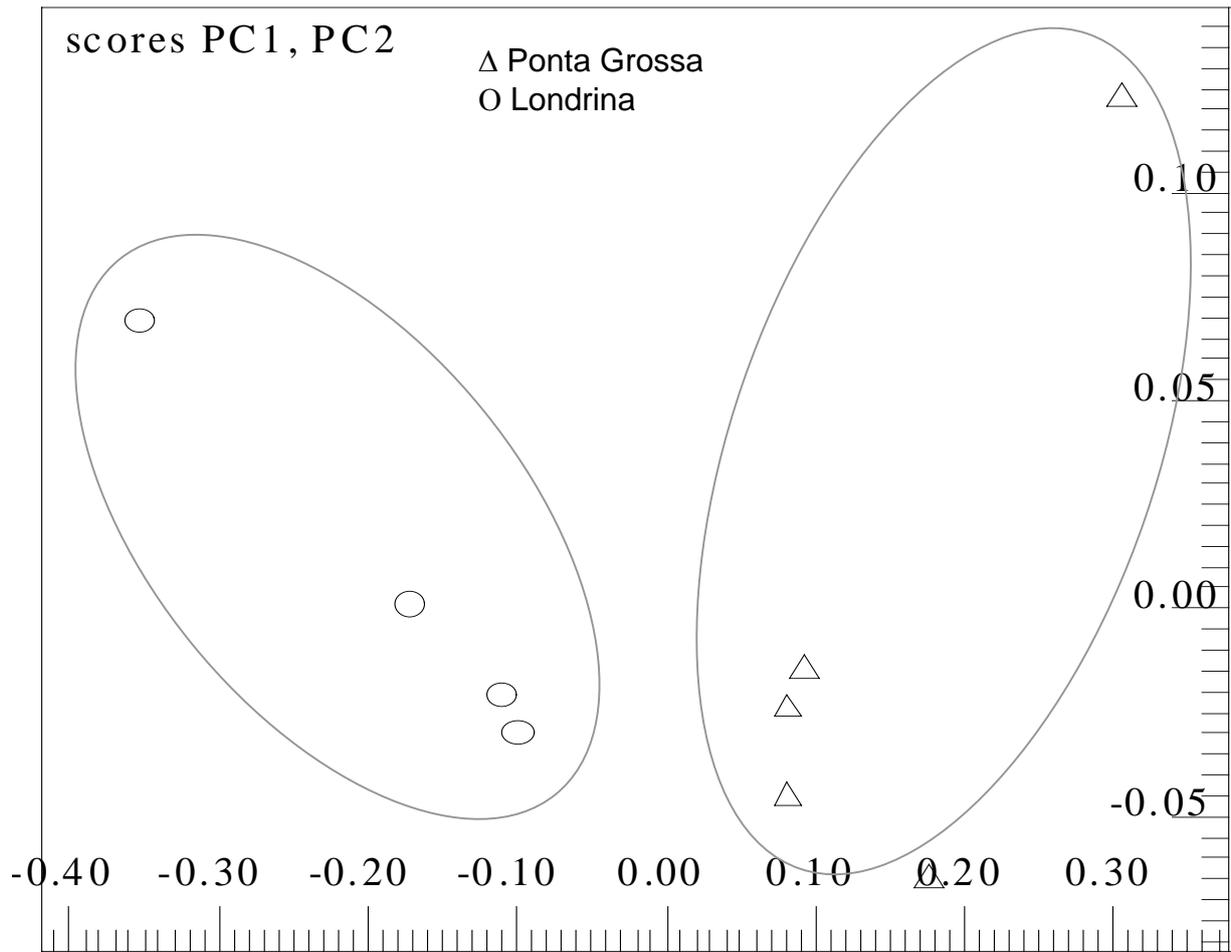


FIGURA 4.63 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  de sementes da cultivar de soja BRS 134 (conjunto 1), mostrando a discriminação entre as regiões produtoras. As percentagens de informações obtidas foram de 86,8% em PC1, de 7,6% em PC2 e um total de 98,6%.

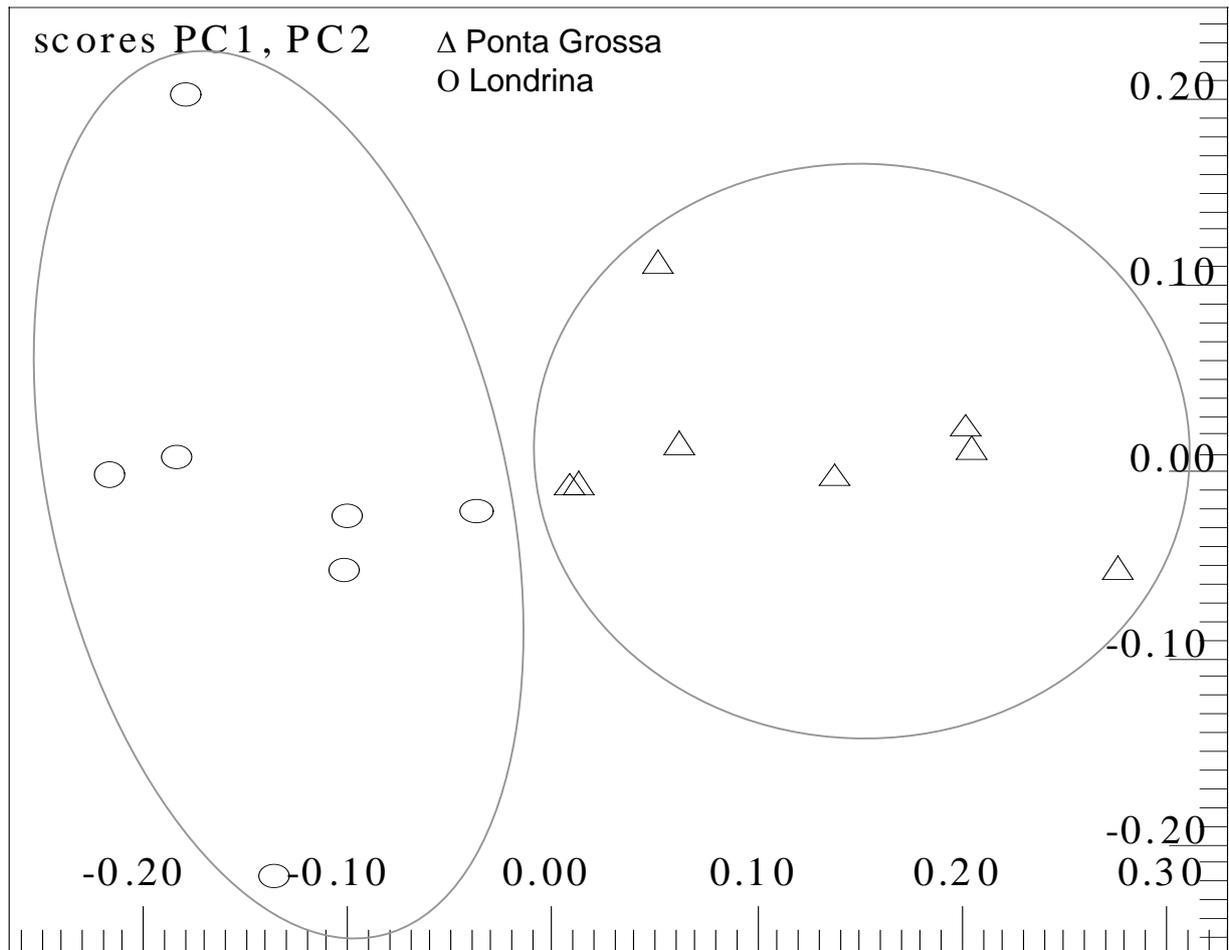


FIGURA 4.64 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  de sementes da cultivar de soja BRS 134 (conjunto 2), mostrando a discriminação entre as regiões produtoras. As percentagens de informações obtidas foram de 62,9% em PC1, de 20,1% em PC2 e um total de 93,7%.

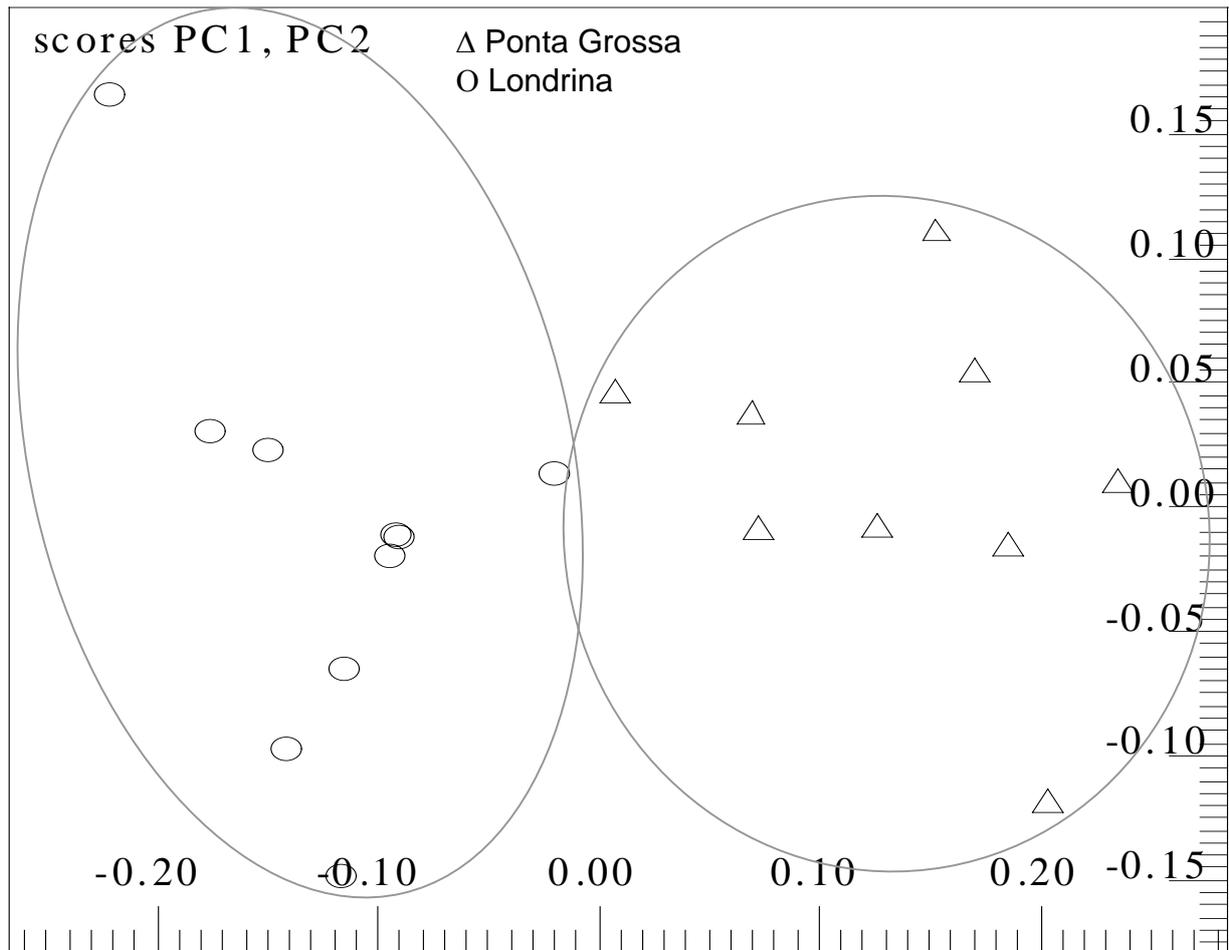
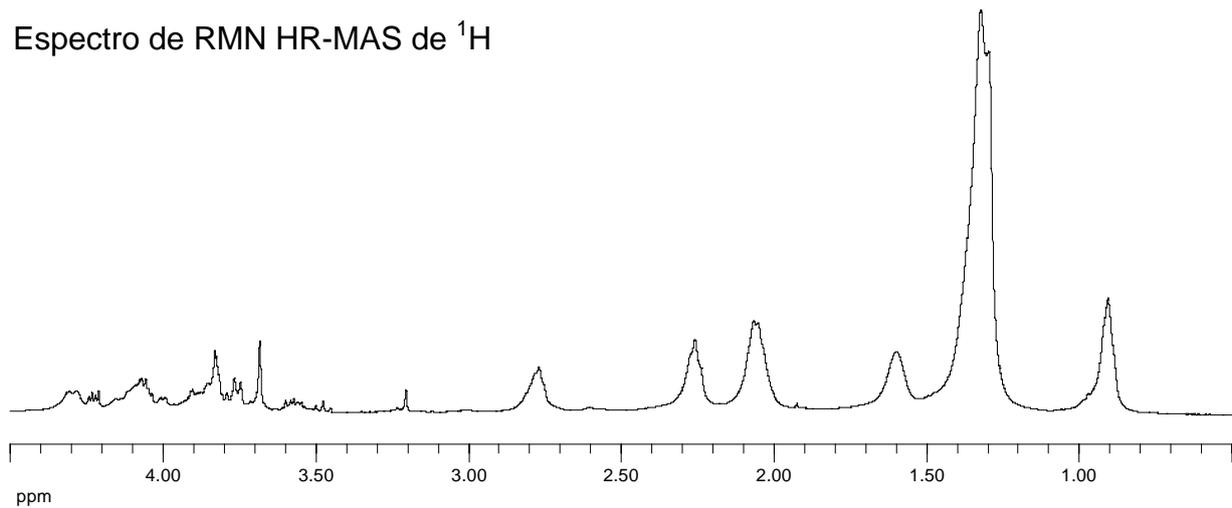
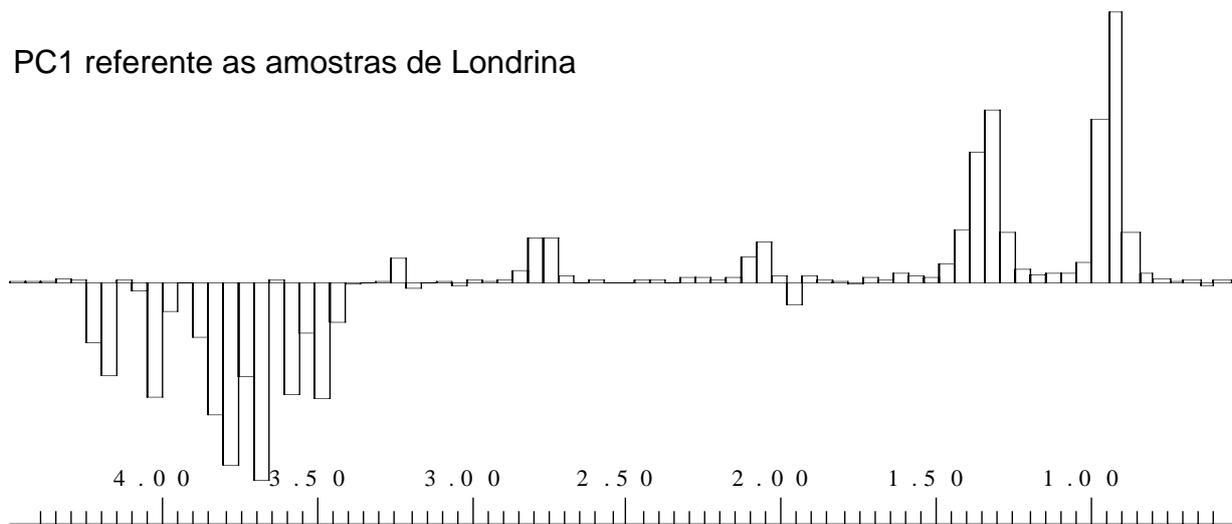


FIGURA 4.65 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  de sementes da cultivar de soja BRS 134 (conjunto 3), mostrando a discriminação entre as regiões produtoras. As percentagens de informações obtidas foram de 68,5% em PC1, de 17,5% em PC2 e um total de 94,4%.

Espectro de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$



PC1 referente as amostras de Londrina



PC1 referente as amostras de Ponta Grossa

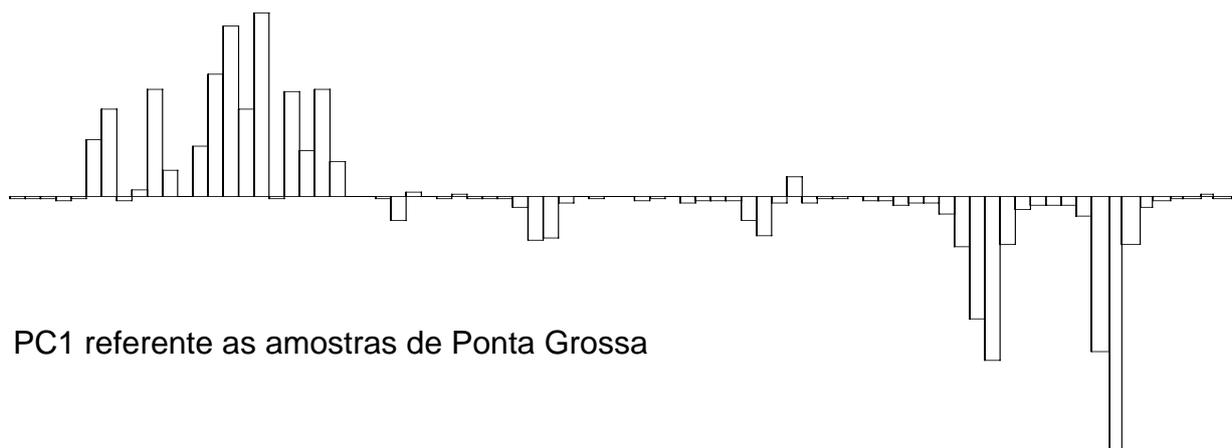
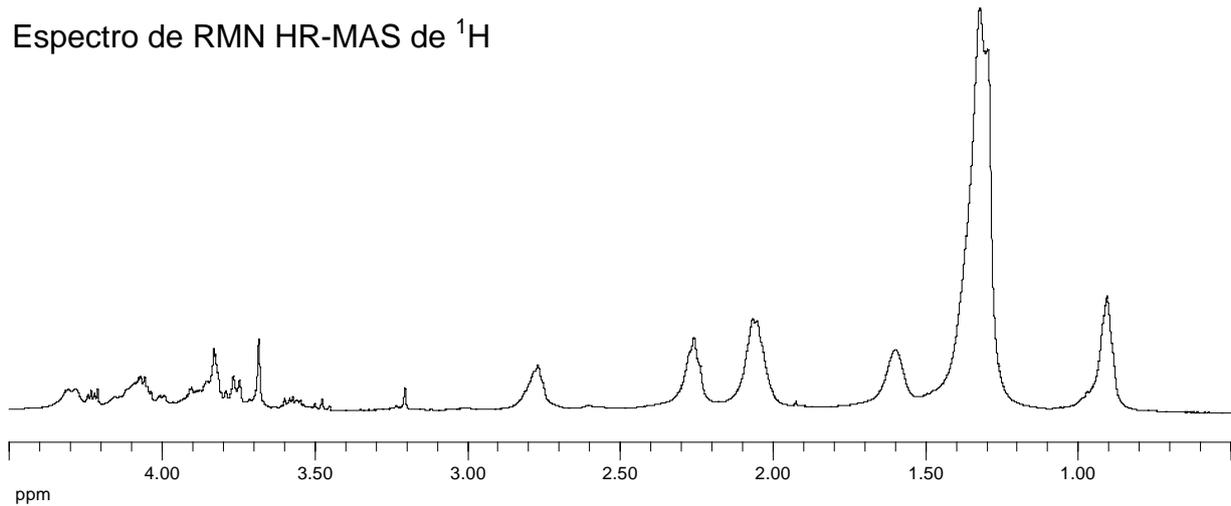
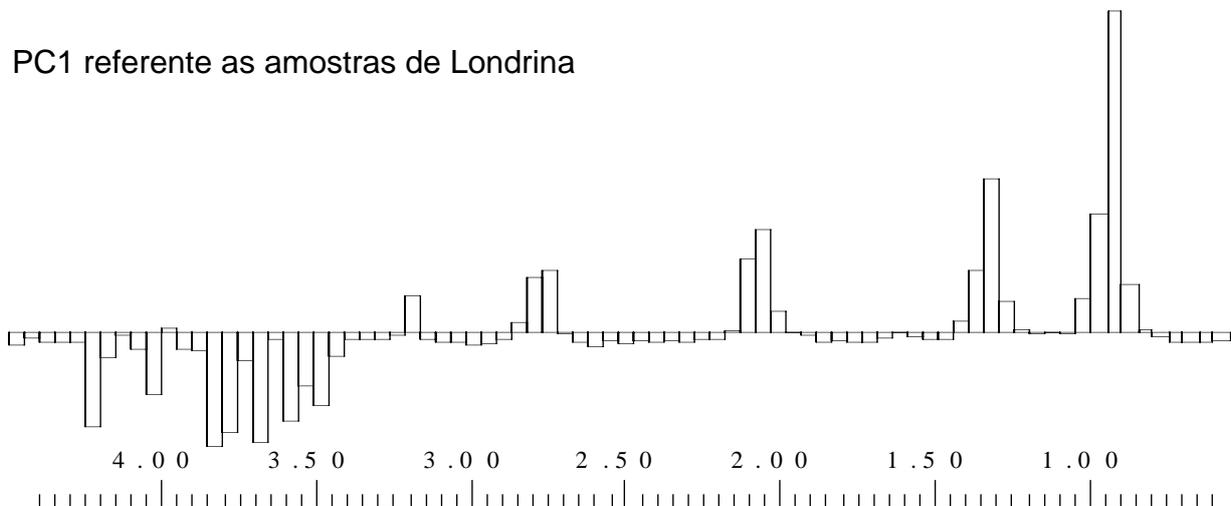


FIGURA 4.66 – Influências das variáveis em PC1 referente a discriminação por região da figura 4.63 (conjunto 1). Os *buckets* abaixo do plano significam menores teores das substâncias representadas pelos respectivos sinais no espectro de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  e o oposto para aqueles acima do plano.

Espectro de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$



PC1 referente as amostras de Londrina



PC1 referente as amostras de Ponta Grossa

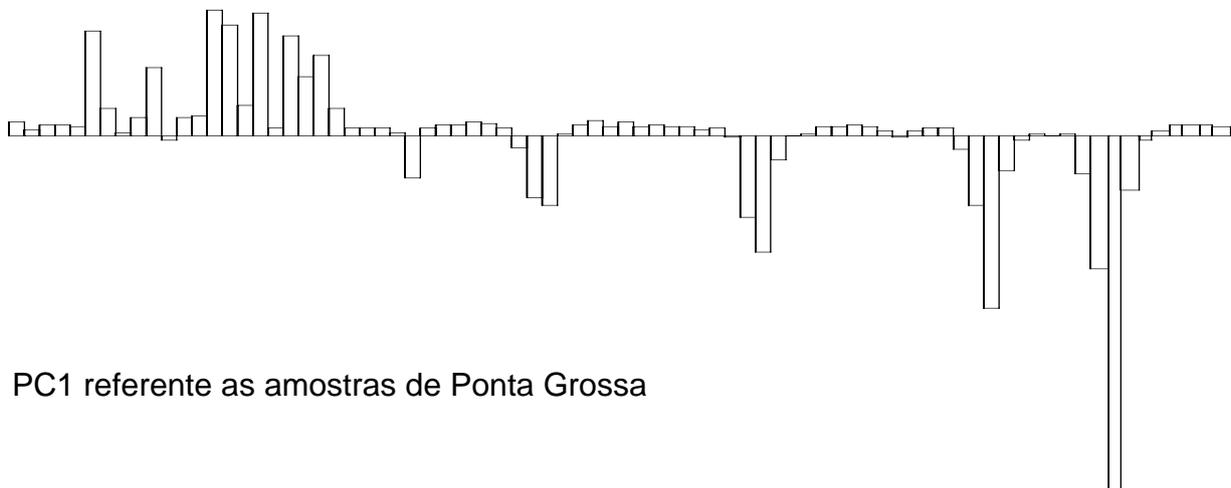


FIGURA 4.67 – Influências das variáveis em PC1 referente a discriminação por região da figura 4.65 (conjunto 3). Os *buckets* abaixo do plano significam menores teores das substâncias representadas pelos respectivos sinais no espectro de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  e o oposto para aqueles acima do plano.

## 4.12 – Análises quimiométricas das amostras de casa de vegetação

### 4.12.1 – Discriminação e avaliação das cultivares

Espectros de RMN HR-MAS, de grãos de soja, referente a quatro cultivares CV de soja (BRS 133, BRS 134, BRS 137 e EMBR 59), foram submetidos a análise quimiométrica, com o objetivo de verificar se era possível discrimina-las de acordo com a cultivar.

Na primeira etapa as cultivares foram analisadas aos pares. Assim, a análise por PCA discriminou as amostras da cultivar BRS 133 daquelas das cultivares BRS 134 (Figura 4.68), BRS 137 (Figura 4.69) e EMBR 59 (Figura 4.70). Da mesma forma, as amostras da cultivar BRS 134 foram discriminadas das amostras das cultivares BRS 137 (Figura 4.71) e EMBR 59 (Figura 4.72). Finalmente a cultivar BRS 137 também foi discriminada da EMBR 59, como mostra a figura 4.73.

Enquanto que, as discriminações entre a cultivar a EMBR 59 e qualquer uma das demais foram observadas em PC1 *versus* PC2 (Figuras 4.74, 4.76 e 4.77), as discriminações ocorridas entre as cultivares BRS somente puderam ser observadas nos gráficos de escores de PC1 *versus* PC3 (Figuras 4.72, 4.73 e 4.75). Estes resultados, demonstram que as cultivares BRS são mais semelhantes entre si e que a cultivar EMBR 59 apresenta características distintas destas. De fato, as cultivares BRS são resultantes de melhoramentos agrícolas consecutivos e, portanto são parentes mais próximos entre si e distantes da cultivar EMBR 59.

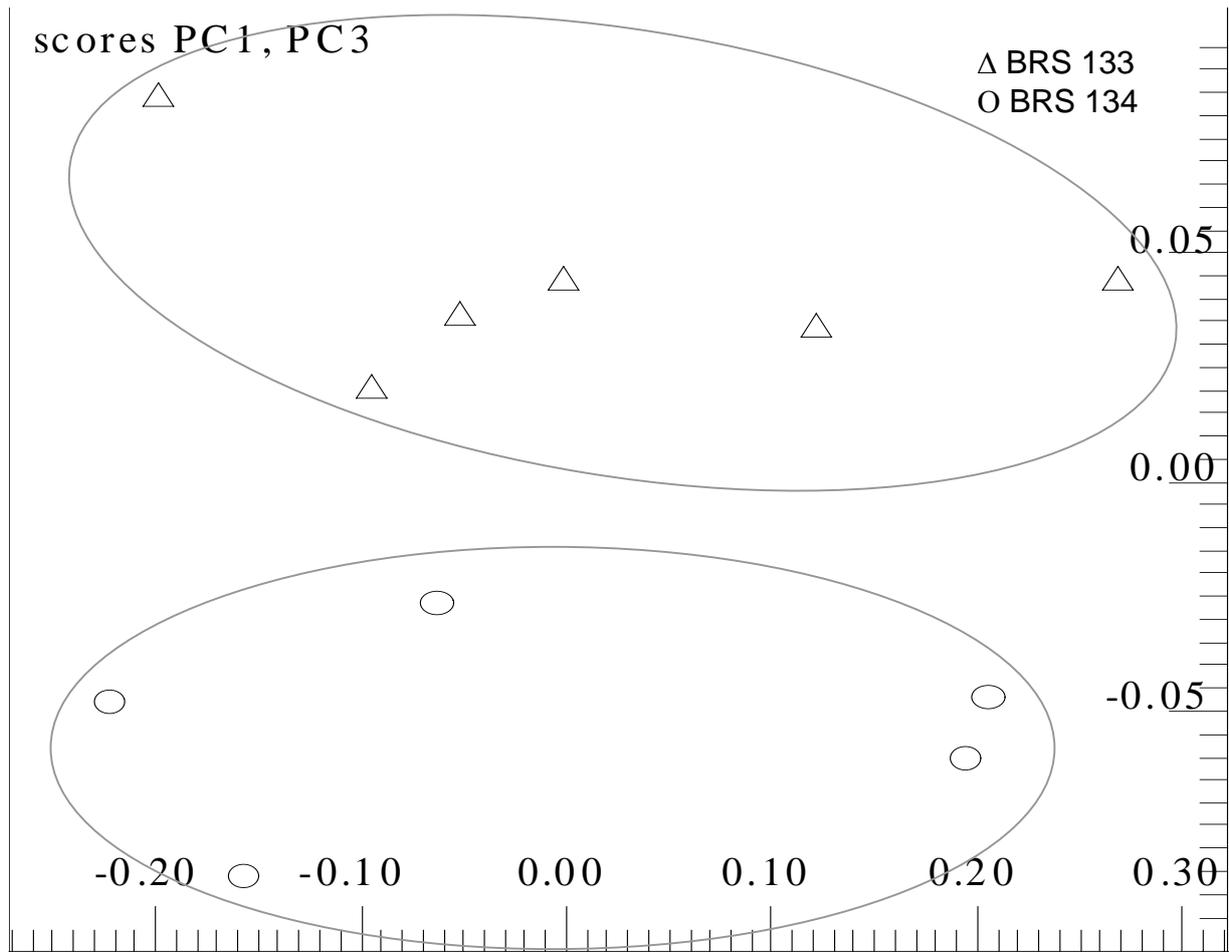


FIGURA 4.68 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  de sementes, mostrando a discriminação entre cultivar. As percentagens de informações obtidas foram de 63,1% em PC1, de 6,6% em PC3 e um total de 98,1%.

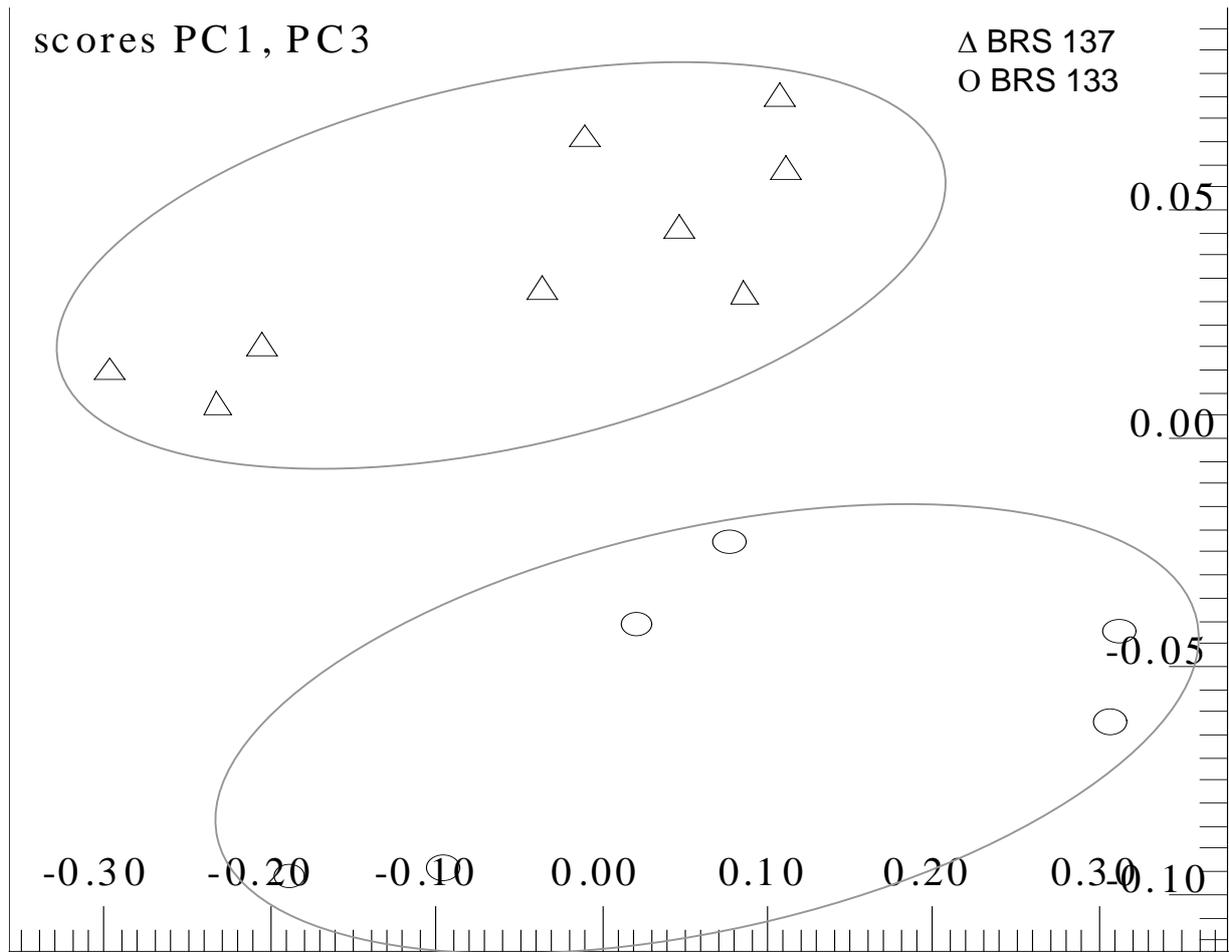


FIGURA 4.69 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  de sementes, mostrando a discriminação entre cultivar. As percentagens de informações obtidas foram de 55% em PC1, de 5,3% em PC3 e um total de 97,3%.

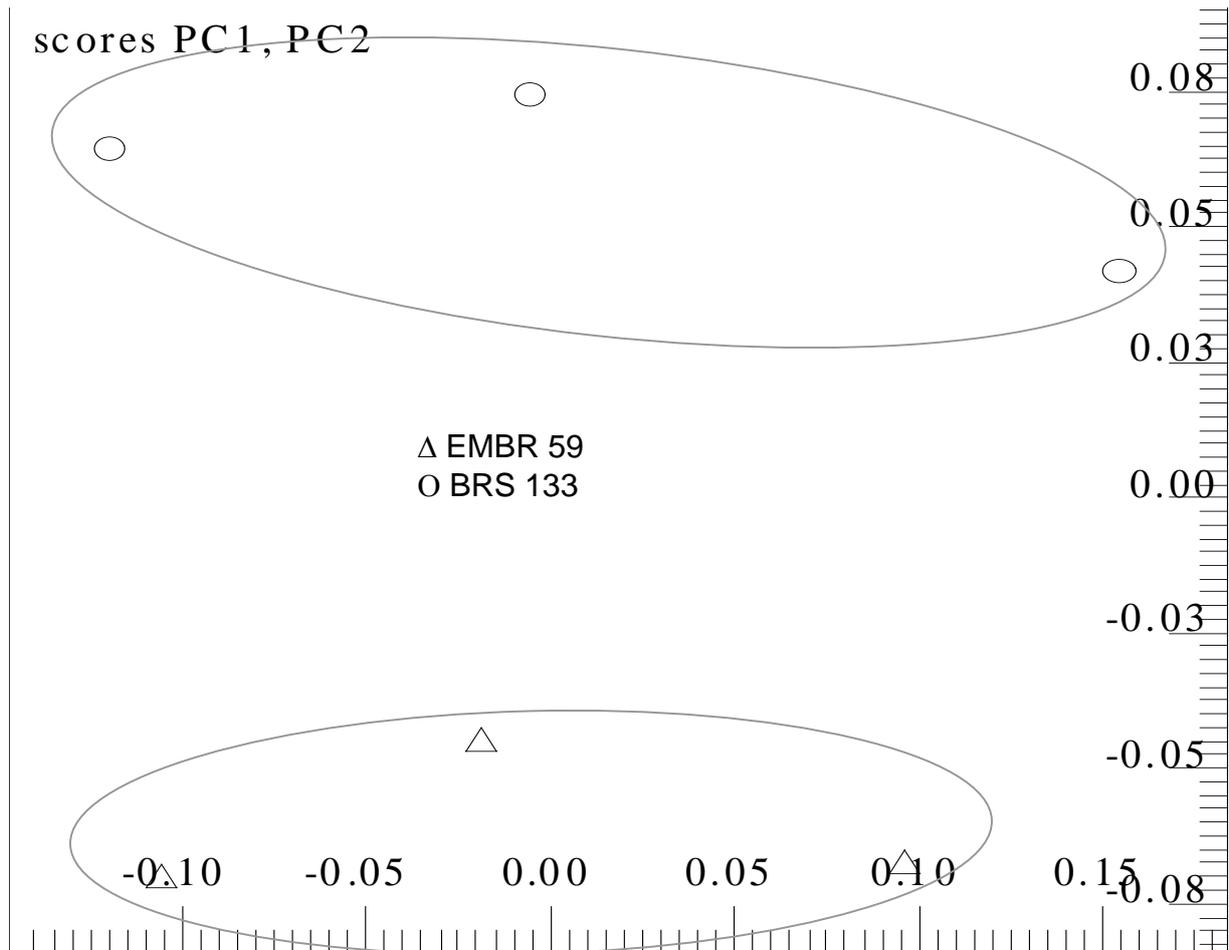


FIGURA 4.70 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  de sementes, mostrando a discriminação entre cultivar. As percentagens de informações obtidas foram de 67% em PC1, de 26,1% em PC2 e um total de 100%.

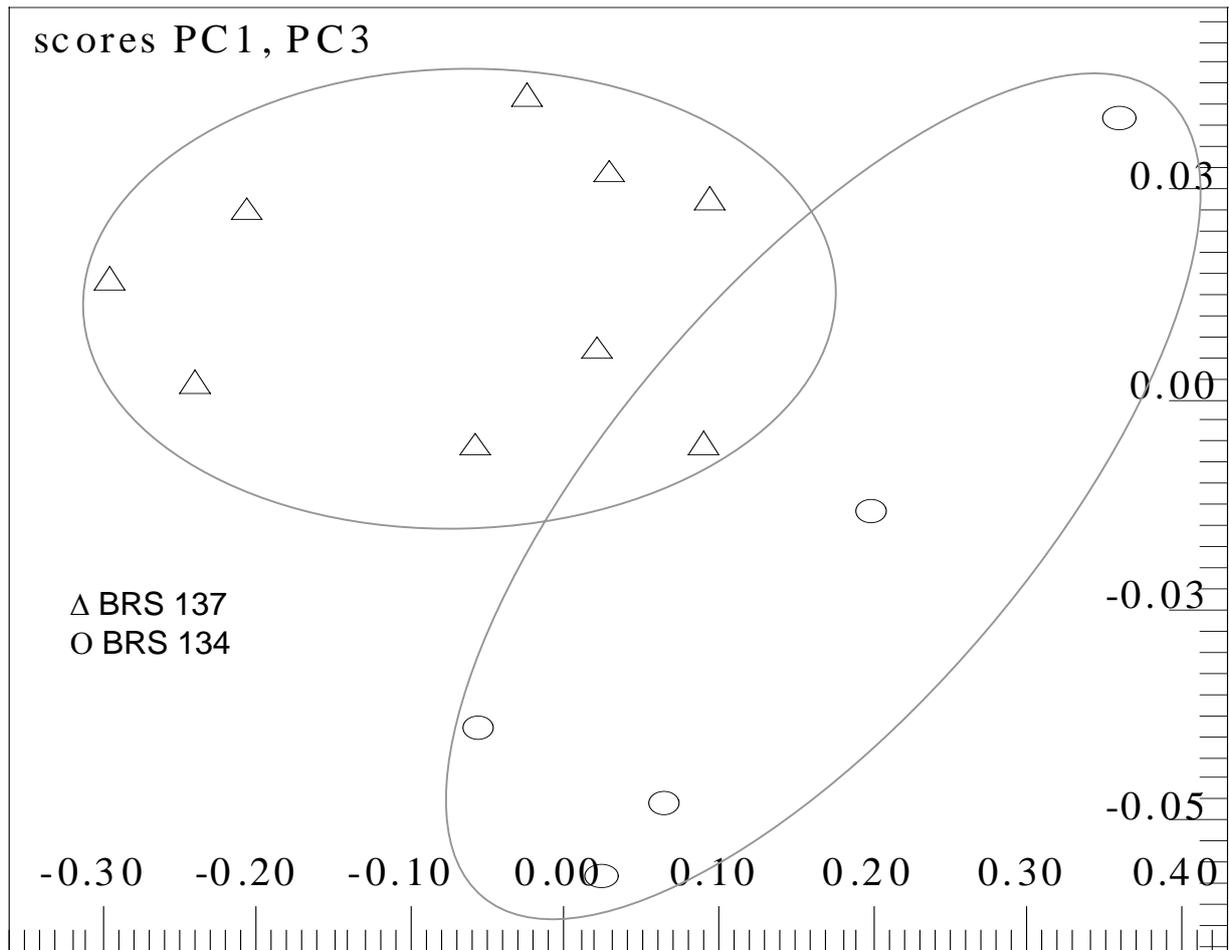


FIGURA 4.71 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  de sementes, mostrando a discriminação entre cultivar. As percentagens de informações obtidas foram de 66,4% em PC1, de 2% em PC3 e um total de 98,1%.

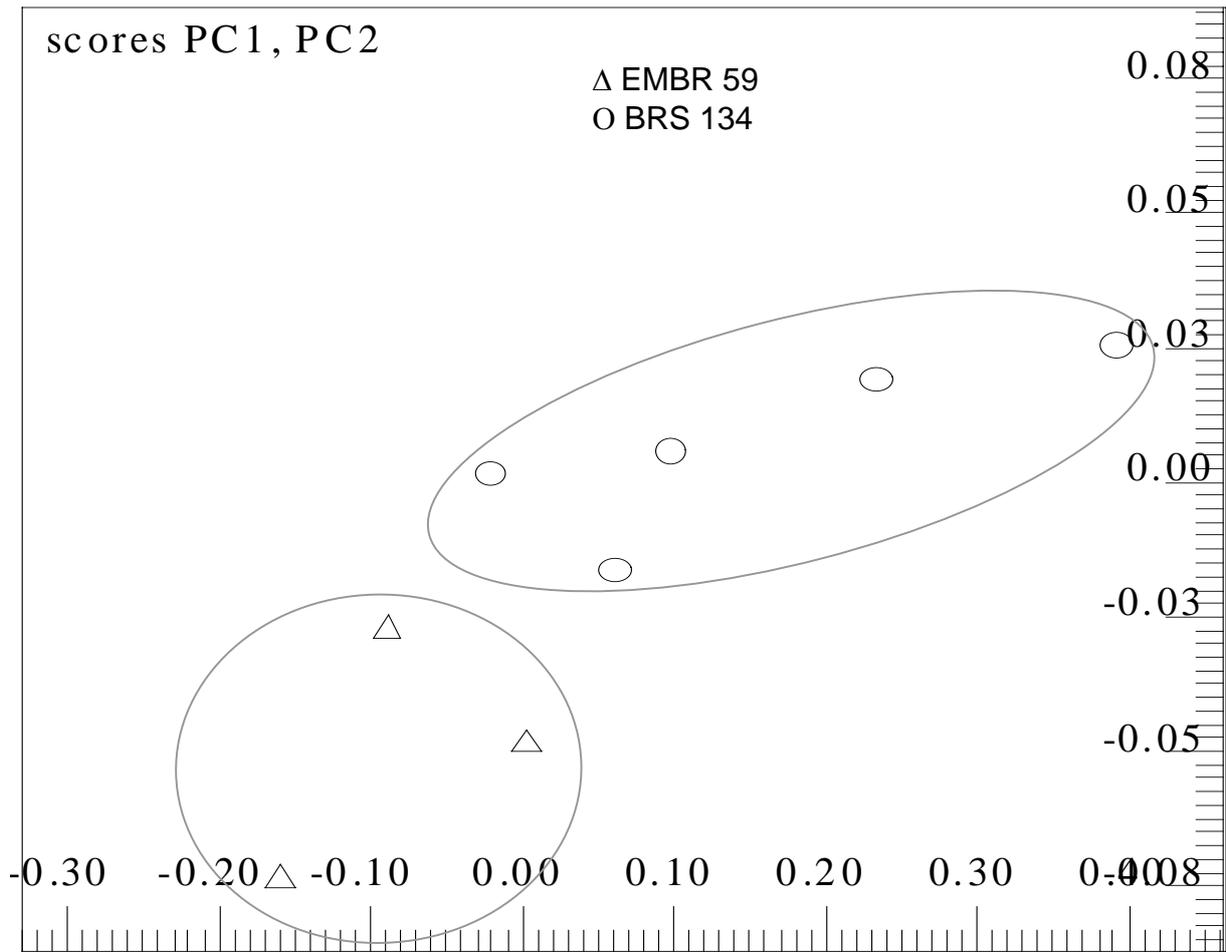


FIGURA 4.72 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  de sementes, mostrando a discriminação entre cultivar. As percentagens de informações obtidas foram de 92% em PC1, de 3,9% em PC2 e um total de 99,1%.

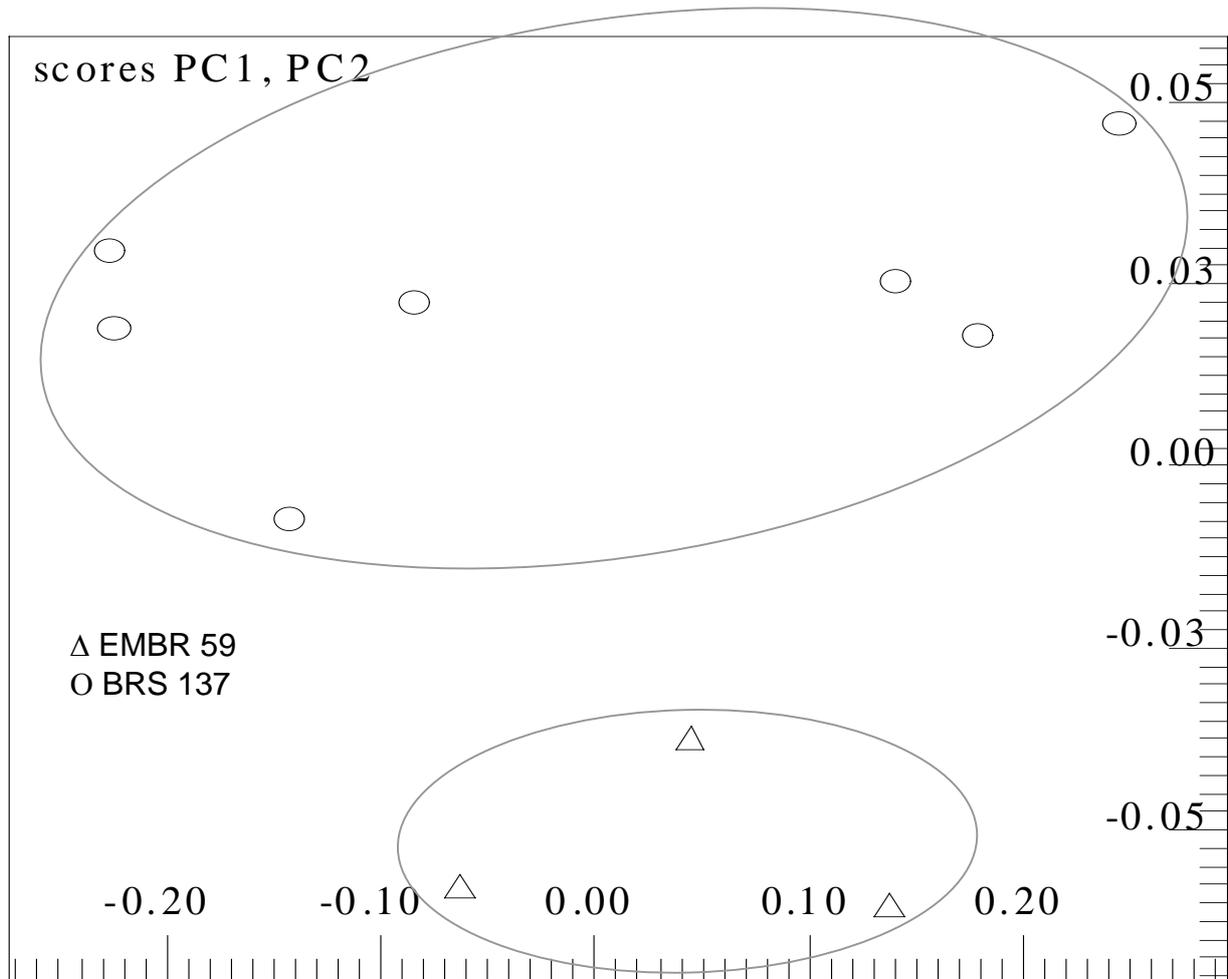


FIGURA 4.73 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  de sementes, mostrando a discriminação entre cultivar. As percentagens de informações obtidas foram de 90,6% em PC1, de 4,6% em PC2 e um total de 98,4%.

As análises dos gráficos de influências revelou que as cultivares diferem entre si principalmente na composição de triacilgliceróis. O gráficos de influências referentes à discriminação entre a cultivar BRS 133 e as demais, permitiu concluir que esta cultivar é mais pobre em ésteres graxos insaturados e mais rica em saturados do que todas as outras cultivares (Figura 4.74). Este fato é comprovado pelos valores negativos em PC3 dos *buckets* referentes aos sinais em  $\delta$  2,75 e 2,03 ppm, exclusivos das cadeias alquílicas insaturadas.

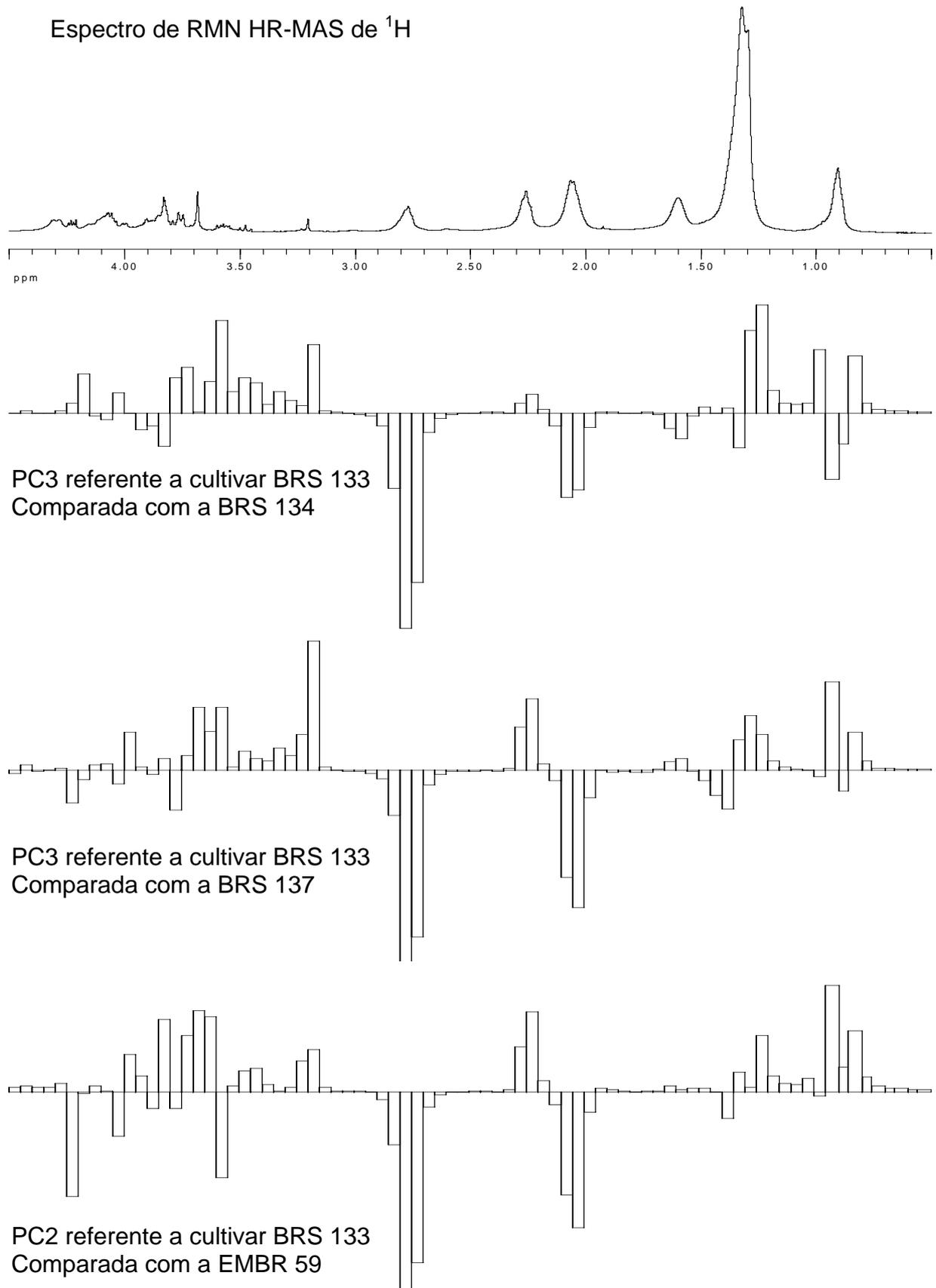


FIGURA 4.74 – Comparação das influências da cultivar BRS 133 com as demais.

Entre as cultivares BRS 134 e BRS 137 não foi possível identificar claramente as diferenças entre elas, devido ao fato destas serem bastante semelhantes entre si e por isso, os gráficos de influências foram completamente aleatórios. Além disso, a discriminação no gráficos de escores não foi muito evidente apenas em uma componente principal (Figura 4.71).

A análise dos gráficos de influências referentes à discriminação entre as cultivares BRS 134 e EMBR 59 também revelou uma maior complexidade das variáveis discriminatórias. O mesmo foi observado na discriminação entre os cultivares BRS 137 e EMBR 59 (Figura 4.75). Nestes casos, outros sinais é que influenciaram a discriminação.

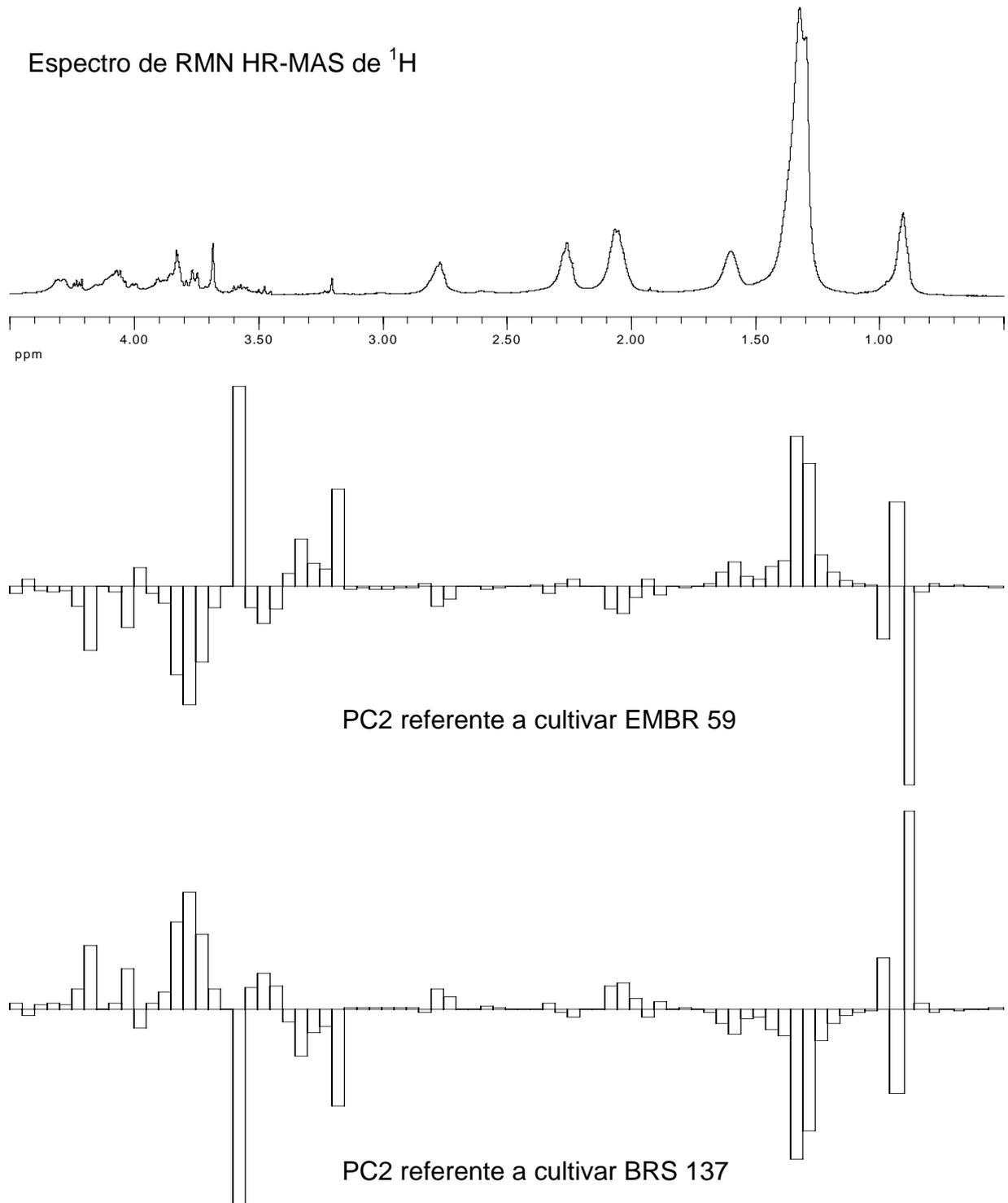


FIGURA 4.75 – Gráfico de influência em PC2, mostrando as variáveis que mais contribuíram para a discriminação entre as cultivares BRS 137 e EMBR 59.

Utilizando-se todas as amostras não foi possível agrupá-las em classes de acordo com a cultivar. No entanto, reduzindo-se o conjunto de dados para três cultivares, já foi possível distinguir as classes umas das outras (Figuras 4.80 e 4.83).

Na discriminação entre as cultivares BRS 133, BRS 134 e BRS 137, pode-se observar que a cultivar BRS 133 se distingue das outras duas, o que confirma os resultados anteriores, ou seja, as cultivares BRS 134 e BRS 137 são mais semelhantes entre si e a cultivar BRS 133 apresenta características distintas das demais (Figura 4.76).

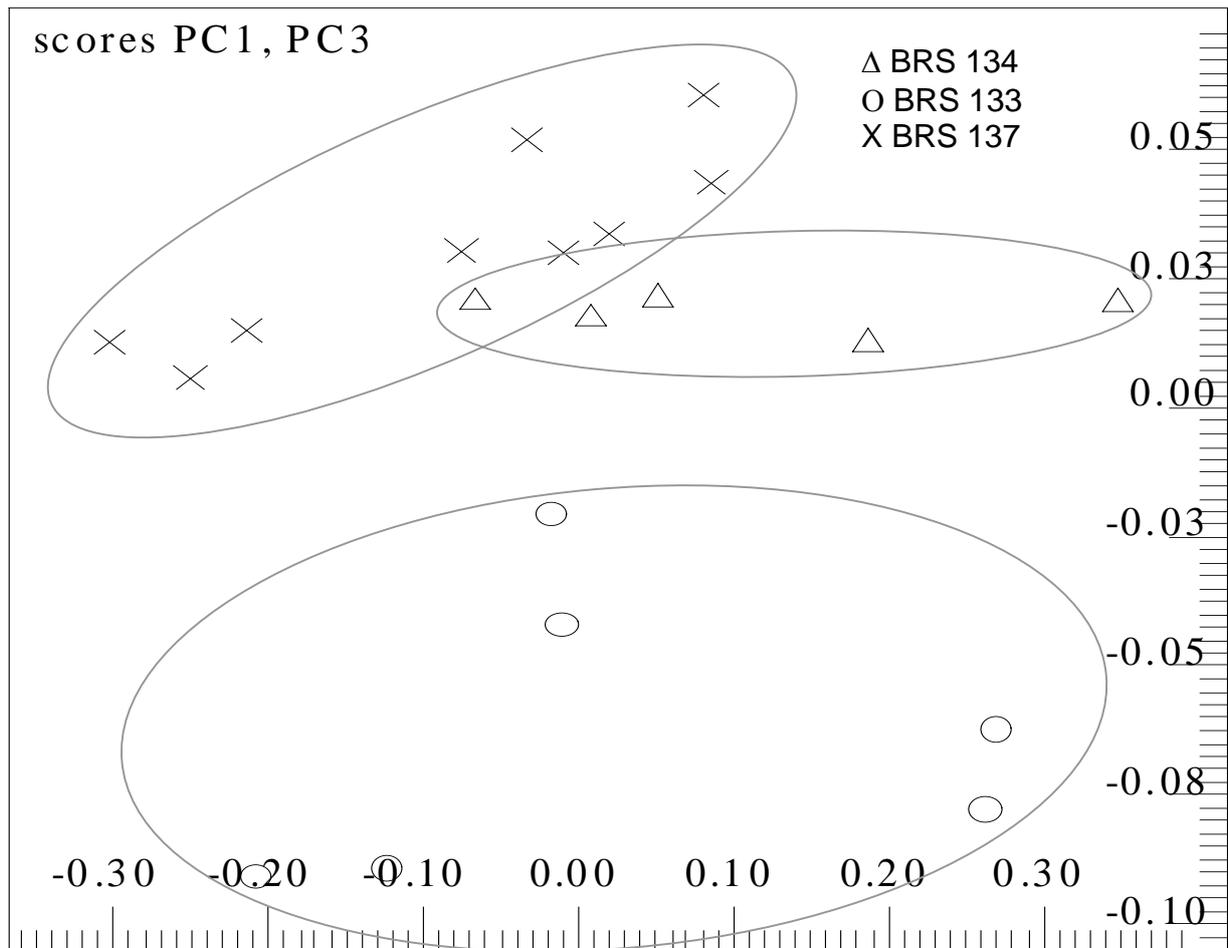


FIGURA 4.76 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  de sementes, mostrando a discriminação entre cultivar. As percentagens de informações obtidas foram de 61,2% em PC1, de 4,4% em PC3 e um total de 96,7%.

A análise por PCA das cultivares BRS 134, BRS 137 e EMBR 59, também confirmam a maior similaridade entre as amostras das cultivares BRS 134 e BRS 137, enquanto que, a cultivar EMBR 59 se diferente destas. Apesar disso, houve uma boa discriminação entre as três cultivares (Figura 4.77).

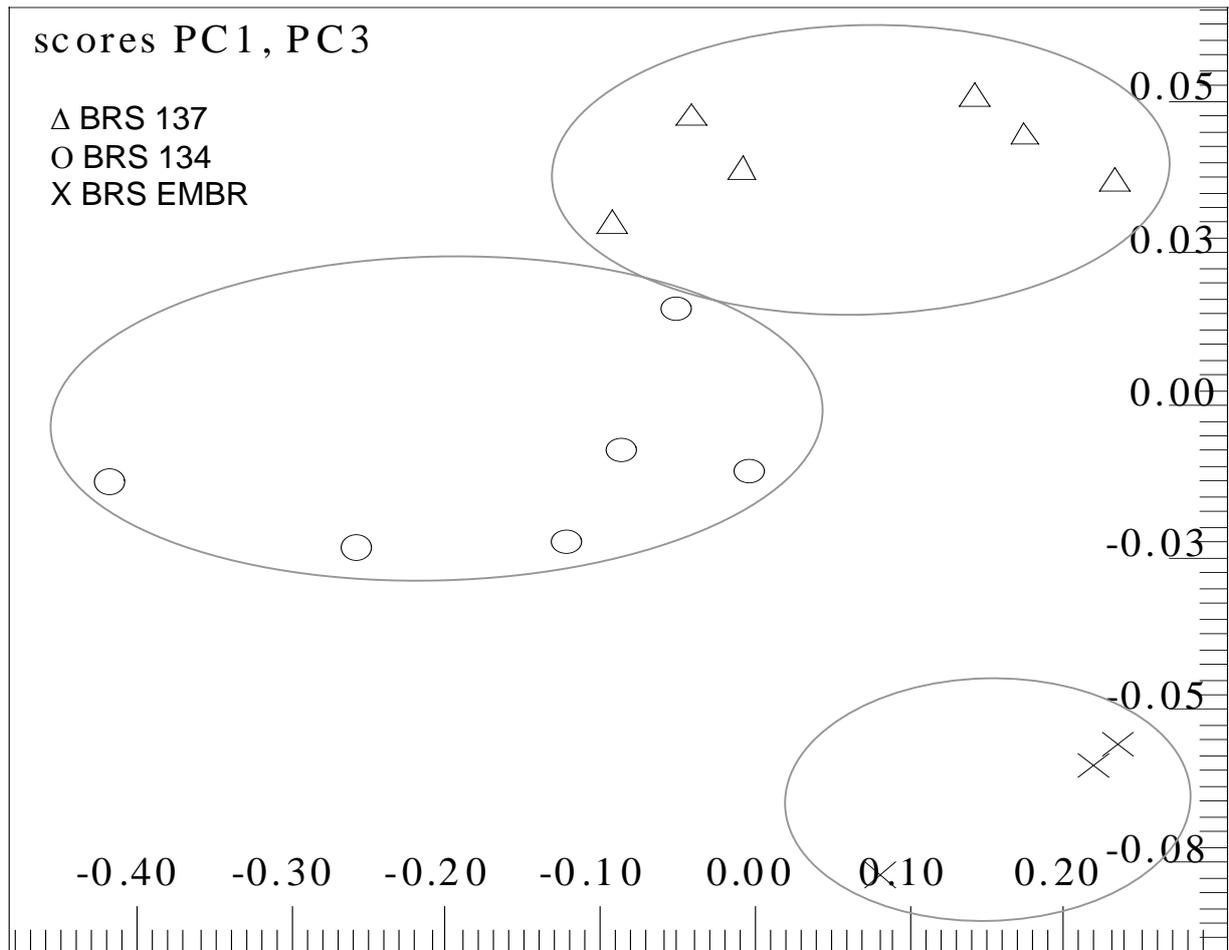


FIGURA 4.77 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  de sementes, mostrando a discriminação entre cultivar. As percentagens de informações obtidas foram de 77,7% em PC1, de 3,9% em PC3 e um total de 97,1%.

Diante destas informações, seria esperado que a análise por PCA de todas as cultivares, pelo menos mostrasse o agrupamento das cultivares BRS 134 e BRS 137, que por sua vez seriam distintas das outras duas. Exatamente o que é observado na figura 4.78.

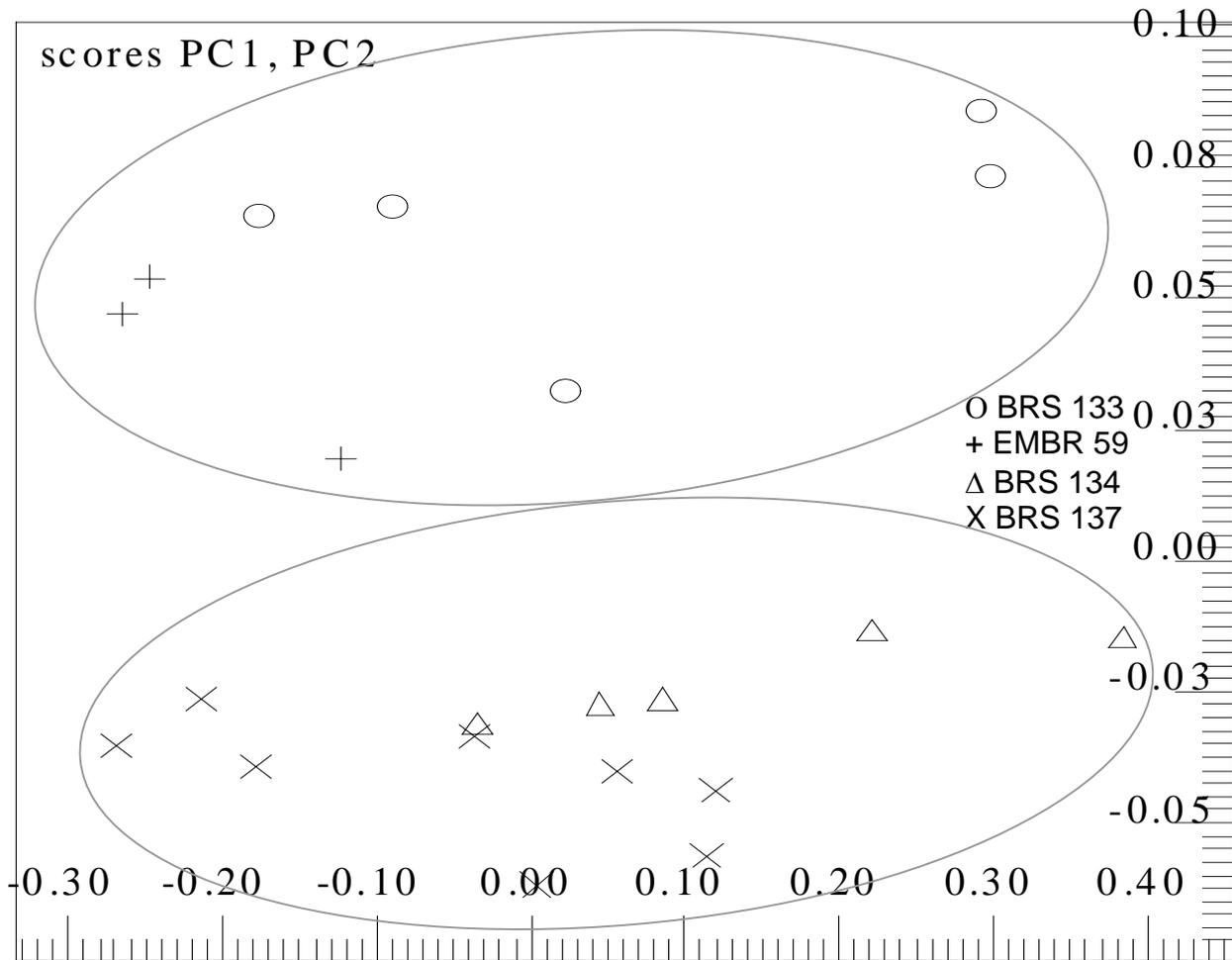


FIGURA 4.78 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  de sementes, mostrando a discriminação entre todas as cultivares. As percentagens de informações obtidas foram de 84,3% em PC1, de 6,2% em PC3 e um total de 96,1%.

Os gráficos de influências desta análise foram concordantes com aqueles referentes às discriminações aos pares, confirmando que as amostras superiores (BRS 133 e EMBR 59) possuem menor teor de cadeias alquilas insaturadas do que as amostras inferiores (BRS 134 e BRS 137) (Figura 4.79). No entanto, esta afirmação somente é válida para a cultivar BRS 133, uma vez que o número de representantes desta cultivar é maior.

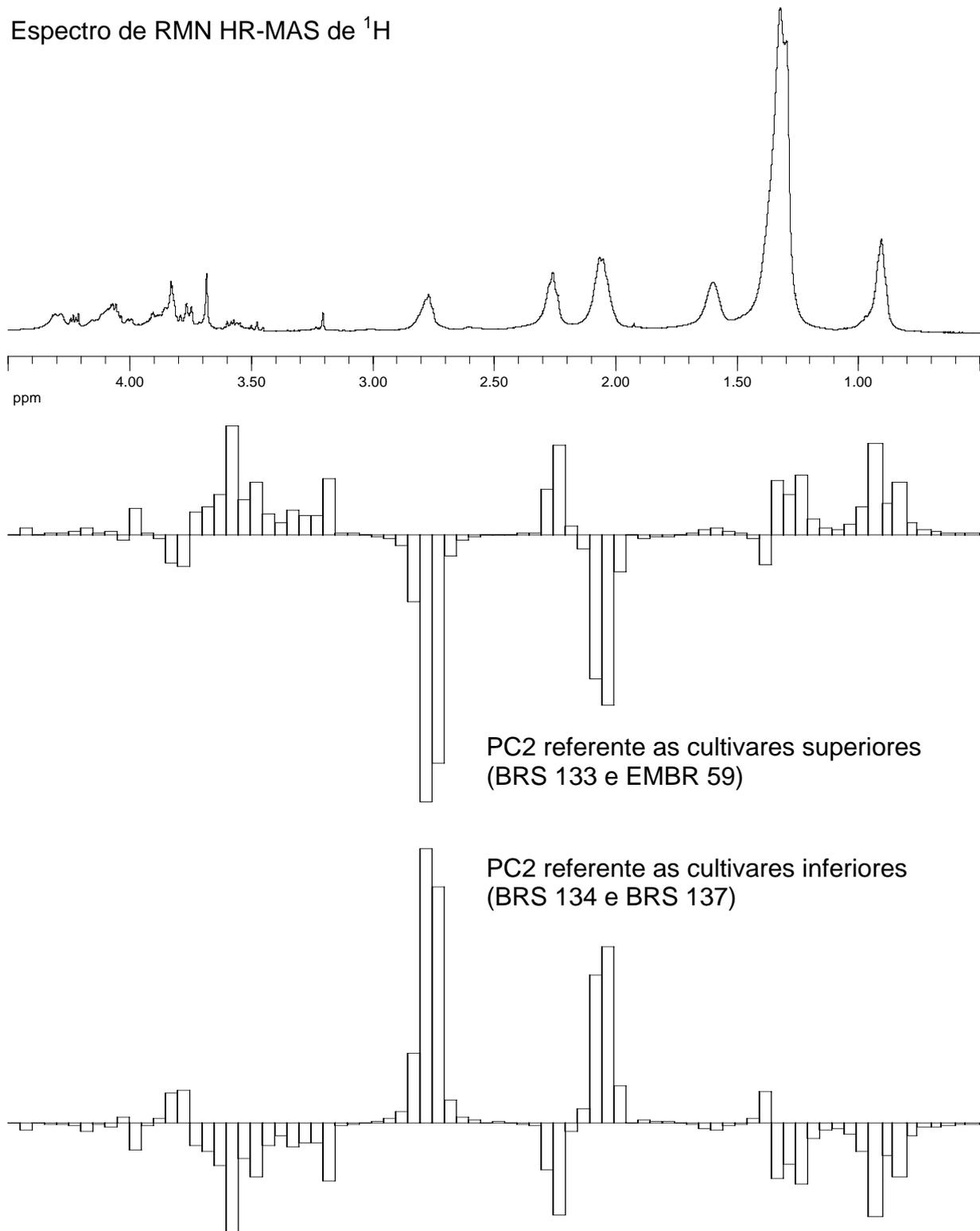
Espectro de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$ 

FIGURA 4.79 – Gráfico de influência em PC2, mostrando as variáveis que mais contribuíram para a discriminação entre todas as cultivares.

A discriminação entre as quatro cultivares somente foi obtida (Figura 4.80), quando utilizou-se espectros de RMN adquiridos em dias diferentes. Por isso,

este resultado não pode ser considerado a risca, pois foi demonstrado anteriormente que os resultados são influenciados pela data de aquisição. No entanto, a discriminação foi observada em PC3, enquanto que as discriminações pela data ocorreram em PC1.

Neste experimento, as cultivares EMBR 59, BRS 134 e BRS 133 foram separadas entre si em PC3 e estas da cultivar BRS 137 em PC1 (Figura 4.80). Nesta discriminação, mais uma vez é possível notar uma similaridade maior entre as cultivares BRS 134 e BRS 137, corroborando com as demais investigações. Além disso, nota-se claramente que a cultivar BRS 133 se distingue das demais pela sua característica peculiar já descrita. O mesmo ocorre para a cultivar EMBR 59, que por sua vez é um parente distante das outras três cultivares de soja (Figura 4.80).

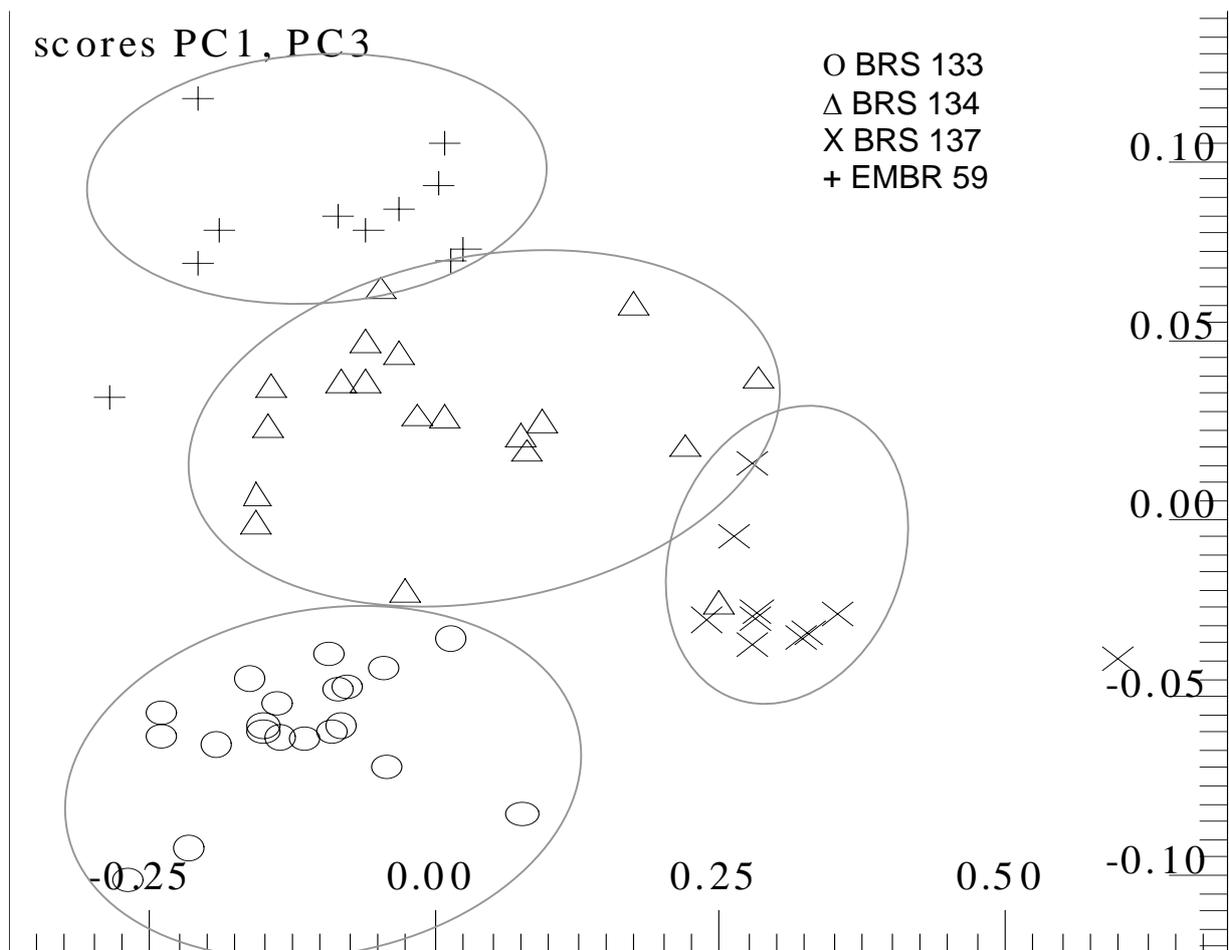


FIGURA 4.80 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  de sementes, mostrando a discriminação entre todas as cultivares. As percentagens de informações obtidas foram de 75,4% em PC1, de 6,5% em PC3 e um total de 94,6%.

#### 4.12.1.1 – Discriminação entre cultivares, utilizando espectros na região do infravermelho

Como o objetivo de comparar os resultados obtidos através da RMN com outra técnica, espectros na região do infravermelho (IV) das mesmas amostras, empregadas para a aquisição dos espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$ , obtidos pela moagem das sementes de soja, foram obtidos e submetidos a análise quimiométrica. A figura 4.81 mostra um típico espectro de IV obtido diretamente de uma amostra de grãos de soja.

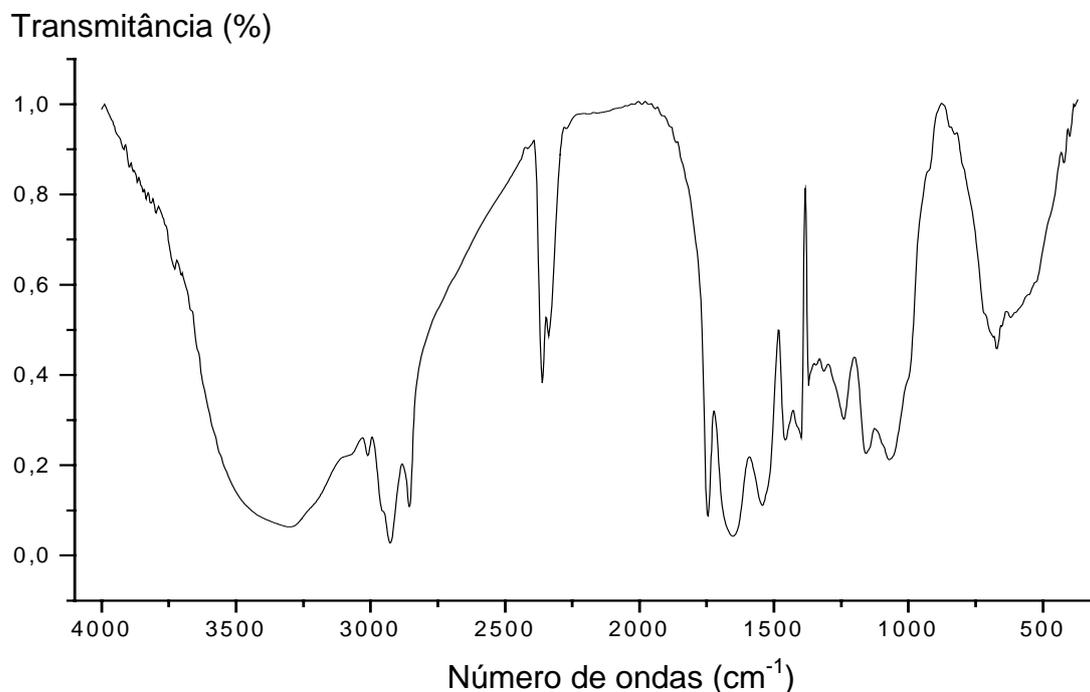


FIGURA 4.81 – Espectro representativo de IV obtido diretamente de uma amostra de sementes de soja.

Como nas medidas de RMN, as análises visuais dos espectros de IV não permitiu caracterizar um ou outro grupo de amostras (Figura 4.82). Sendo necessário, mais uma vez, o emprego da quimiometria.

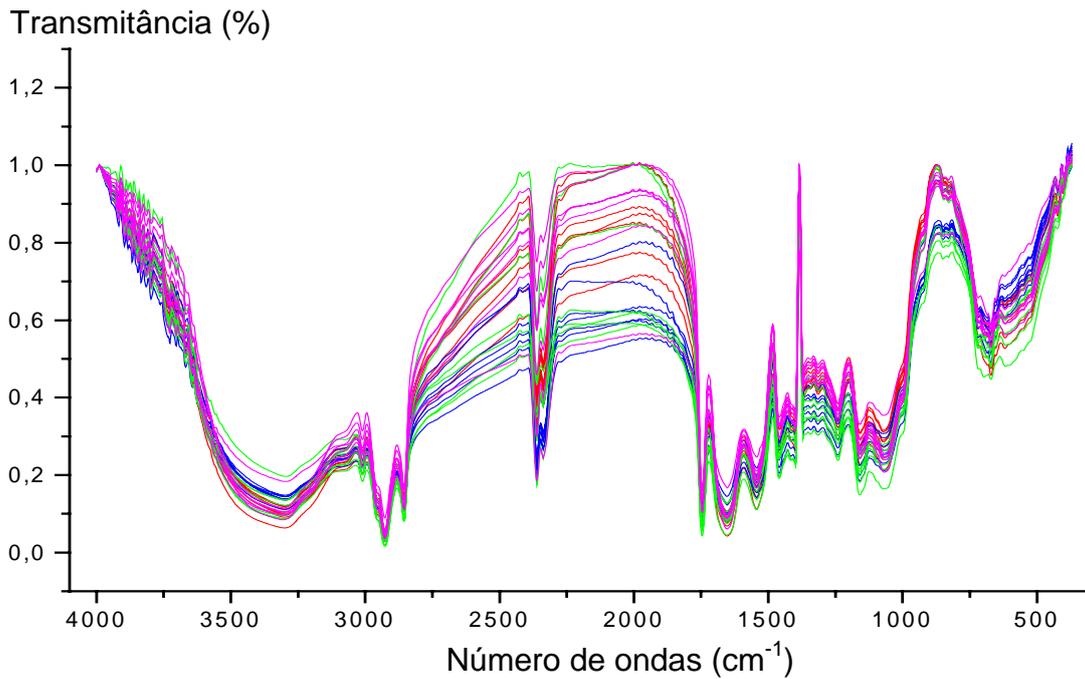


FIGURA 4.82 – Espectros de IV de todas as cultivares de soja, contendo sete replicatas para cada cultivar.

As análises quimiométricas, foram realizadas utilizando todas as variáveis (número de ondas) dos espectros de IV, com exceção daquelas na região de 1800 a 2800  $\text{cm}^{-1}$ . Esta região apresentou bastante oscilações entre as medidas, como pode ser observado na figura 4.82, provavelmente devido ao sinal do  $\text{CO}_2$  atmosférico em  $\bar{\nu}$  2350  $\text{cm}^{-1}$ . Além disso, este sinal não é referente a nenhum componente das amostras de soja, o que por si só implica na sua exclusão dos espectros prior às análises quimiométricas.

As melhores discriminações, nas análises exploratória dos espectros de IV foram, obtidas com os dados centrados na média pelo pré-processamento, ao passo que os dados RMN foram autoescalados. Nestas análises também houve a necessidade de remover algumas replicatas que apresentaram comportamento anômalo.

Os resultados obtidos, nas discriminações entre cultivares, foram muito semelhantes daqueles obtidos com os espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$ . Quando todas as quatro cultivares foram empregadas, a análise por PCA não permitiu discriminar as amostras da cultivar BRS 134 daquelas da BRS 137 (Figura 4.83), da mesma forma que quando utilizado os dados de RMN, confirmando a alta similaridade da composição química destas duas cultivares de soja. Além disso, não

houve uma boa discriminação entre as amostras das cultivares BRS 133 e EMBR 59 (Figura 4.83). No entanto, houve uma discriminação entre estes dois grupos, semelhante ao obtido com os dados da RMN (Figura 4.83).

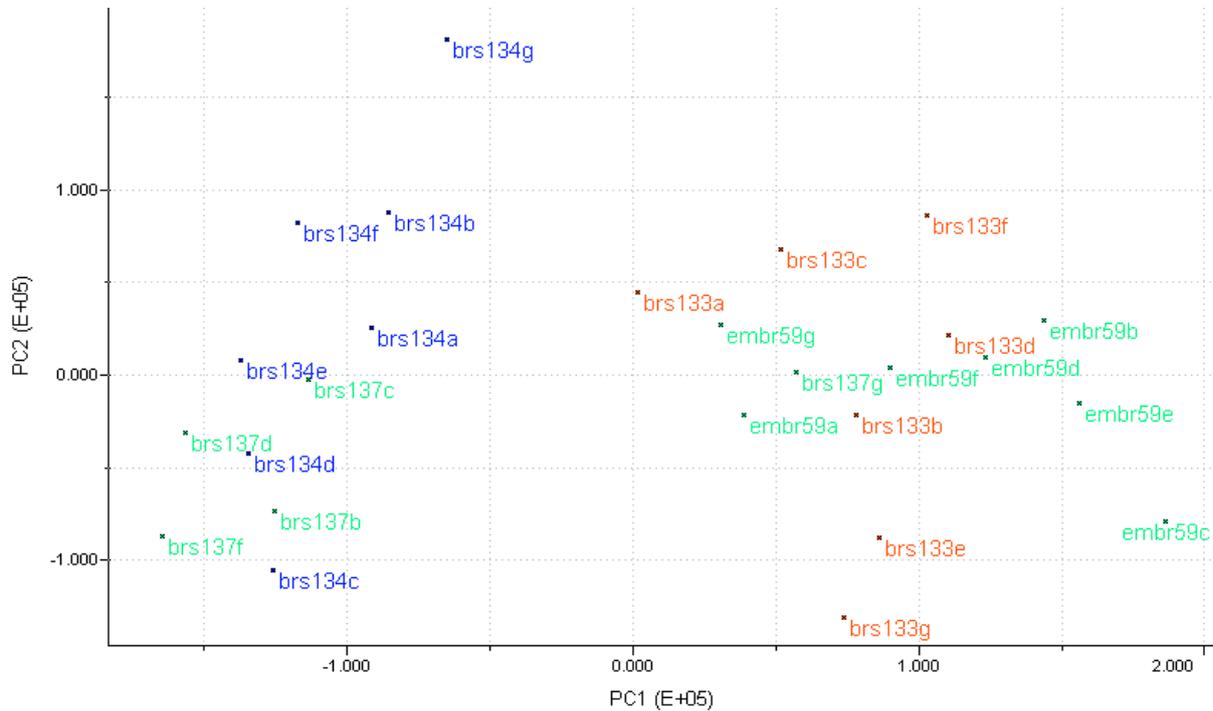


FIGURA 4.83 – Gráfico de escores referente a análise por PCA de espectros de IV de sementes de soja mostrando a discriminação entre as cultivares. As percentagens de informações obtidas foram de 55,0% em PC1, de 21,3% em PC2 e um total de 99,5%.

A análise por HCA mostrou um resultado muito semelhante aos obtidos por PCA, também evidenciando a formação de dois grandes grupos a um nível de similaridade de 0,5 (Figura 4.84). Um deles contendo as amostras das cultivares BRS 134 e BRS 137, enquanto que no outro, as amostras das cultivares BRS 133 e EMBR 59.

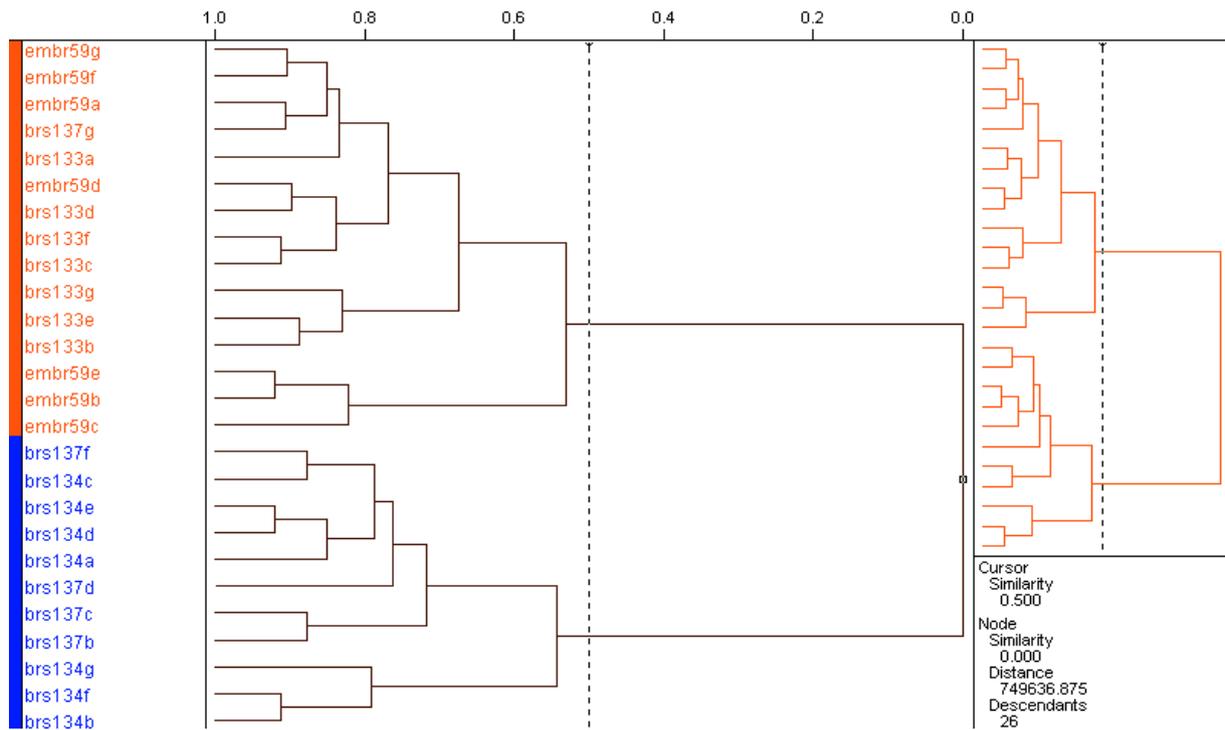


FIGURA 4.84 – Dendrograma referente a análise por HCA de espectros de IV de sementes de soja, mostrando a discriminação entre as cultivares, a um nível de similaridade de 0,5.

Diante destes resultados, realizou-se a análise exploratória por PCA somente das amostras das cultivares BRS 134 e BRS 137, a qual também não permitiu discriminar em qualquer componente principal as amostras, demonstrando mais uma vez e agora por outra técnica que estas duas cultivares de soja são muito semelhantes. A figura 4.85, mostra o resultado obtido de PC1 *versus* PC2. No entanto, no gráfico escores referente a análise por PCA dos dados de RMN é possível notar dois conjuntos de amostras, ainda que sobrepostos (Figura 4. 75).

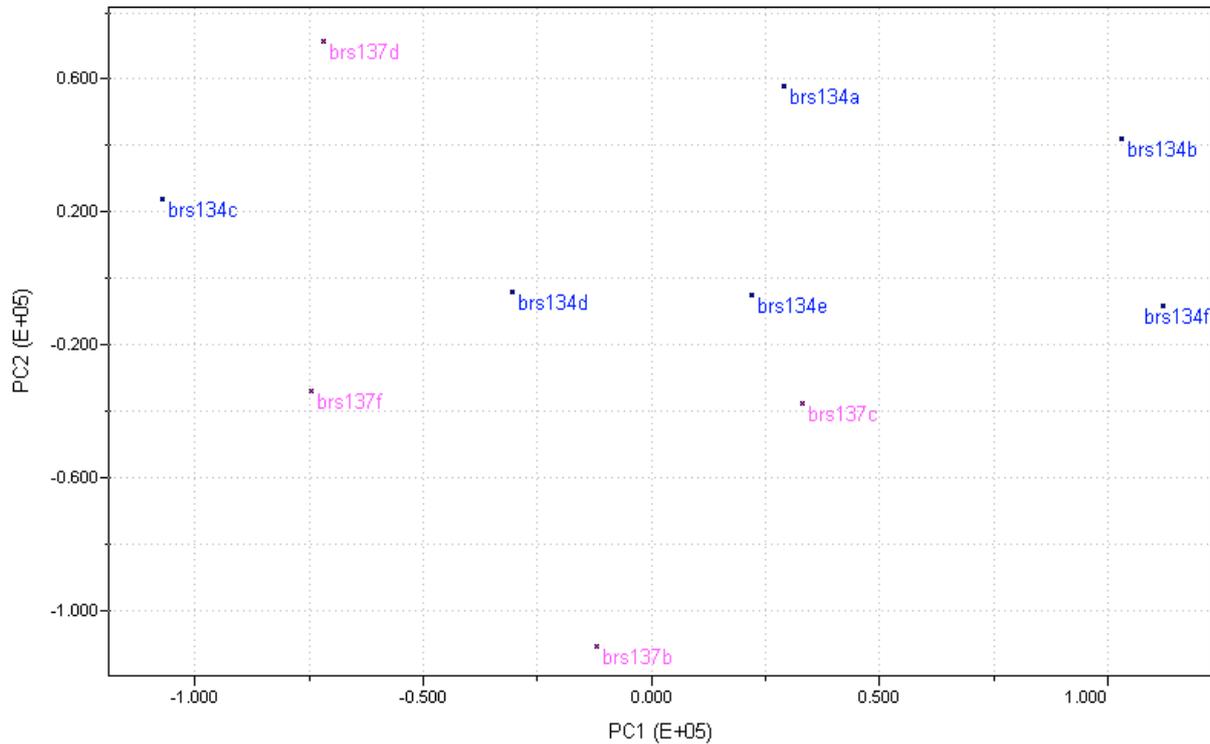


FIGURA 4.85 – Gráfico de escores referente a análise por PCA de espectros de IV de sementes de soja das cultivares BRS 134 e BRS 137. As percentagens de informações obtidas foram de 48,9% em PC1, de 25,9% em PC2 e um total de 100,0%.

Já as amostras das cultivares BRS 133 e EMBR 59, que haviam sido caracterizadas como um único grupo, puderam ser discriminadas, quando analisadas em separado (Figura 4.86). No entanto, a discriminação ocorreu em PC1 *versus* PC3, demonstrando que pela análise exploratória por PCA de espectros de IV, estas cultivares apresentam uma certa semelhança. Por outro lado, utilizando-se os dados de RMN estas duas cultivares foram bem discriminadas entre si (Figura 4.70). O mesmo ocorreu para as demais comparações entre cultivares aos pares. As amostras foram mais facilmente agrupadas de acordo com a cultivar (Figuras 4.87, a 4.90).

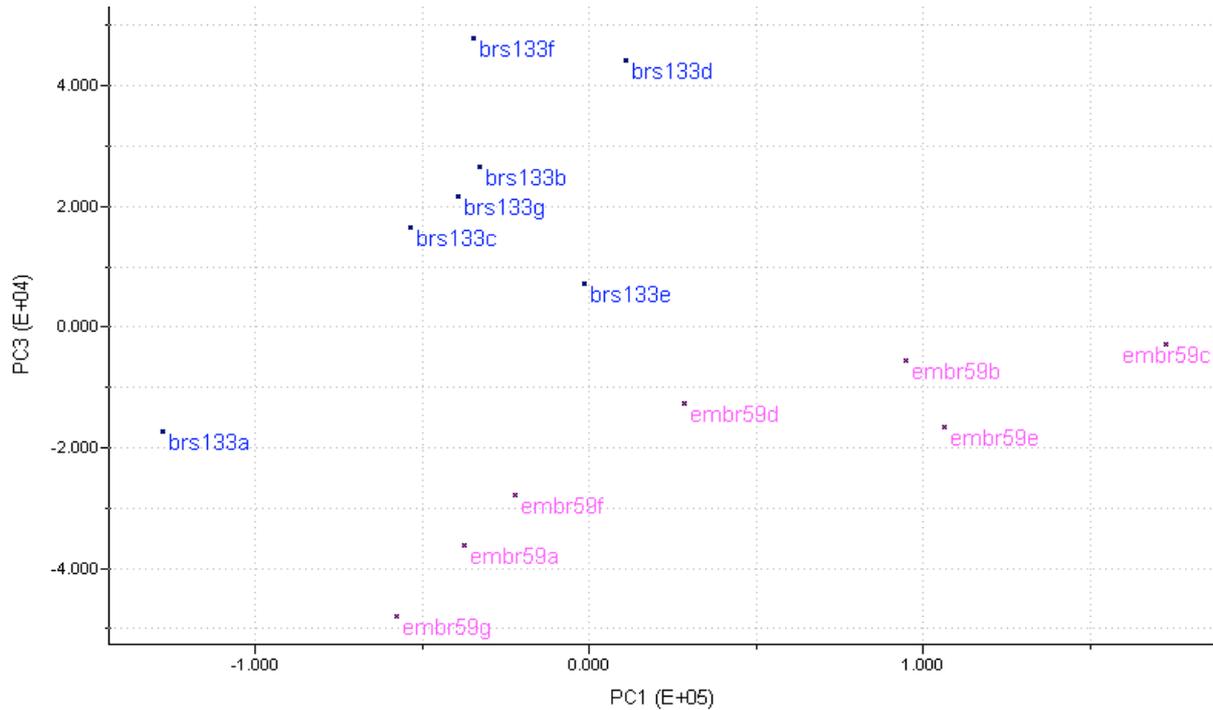


FIGURA 4.86 – Gráfico de escores referente a análise por PCA de espectros de IV de sementes de soja das cultivares BRS 133 e EMBR 59. As percentagens de informações obtidas foram de 50,8% em PC1, de 31,4% em PC2 e um total de 99,6%.

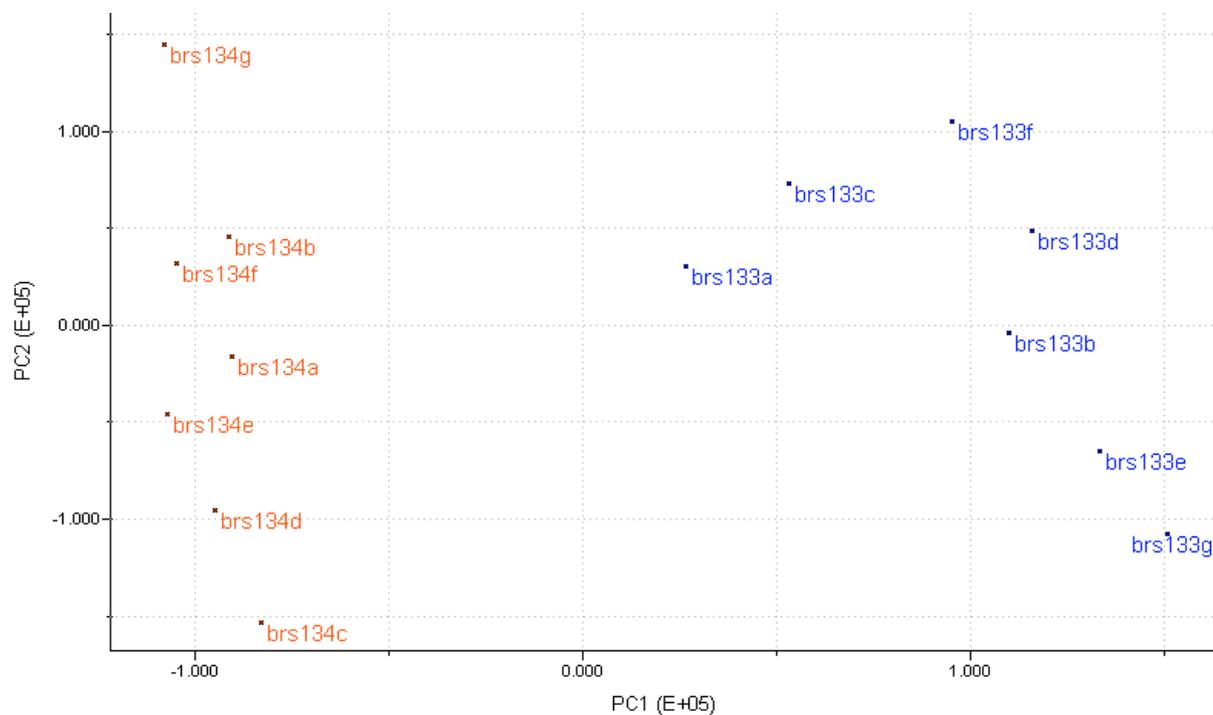


FIGURA 4.87 – Gráfico de escores referente a análise por PCA de espectros de IV de sementes de soja, mostrando a discriminação entre as cultivares BRS 133 e BRS 134. As percentagens de informações obtidas foram de 53,3% em PC1, de 34,7% em PC2 e um total de 99,8%.

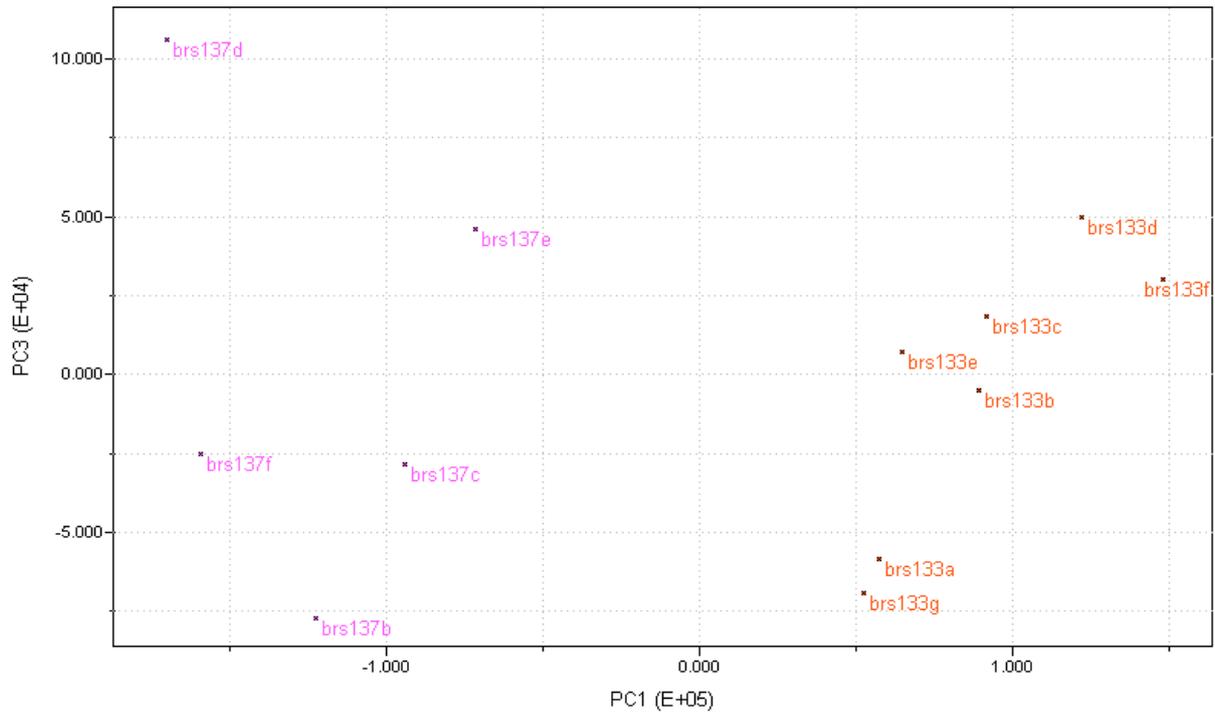


FIGURA 4.88 – Gráfico de escores referente a análise por PCA de espectros de IV de sementes de soja, mostrando a discriminação entre as cultivares BRS 133 e BRS 137. As percentagens de informações obtidas foram de 48,7% em PC1, de 10,9% em PC2 e um total de 99,9%.

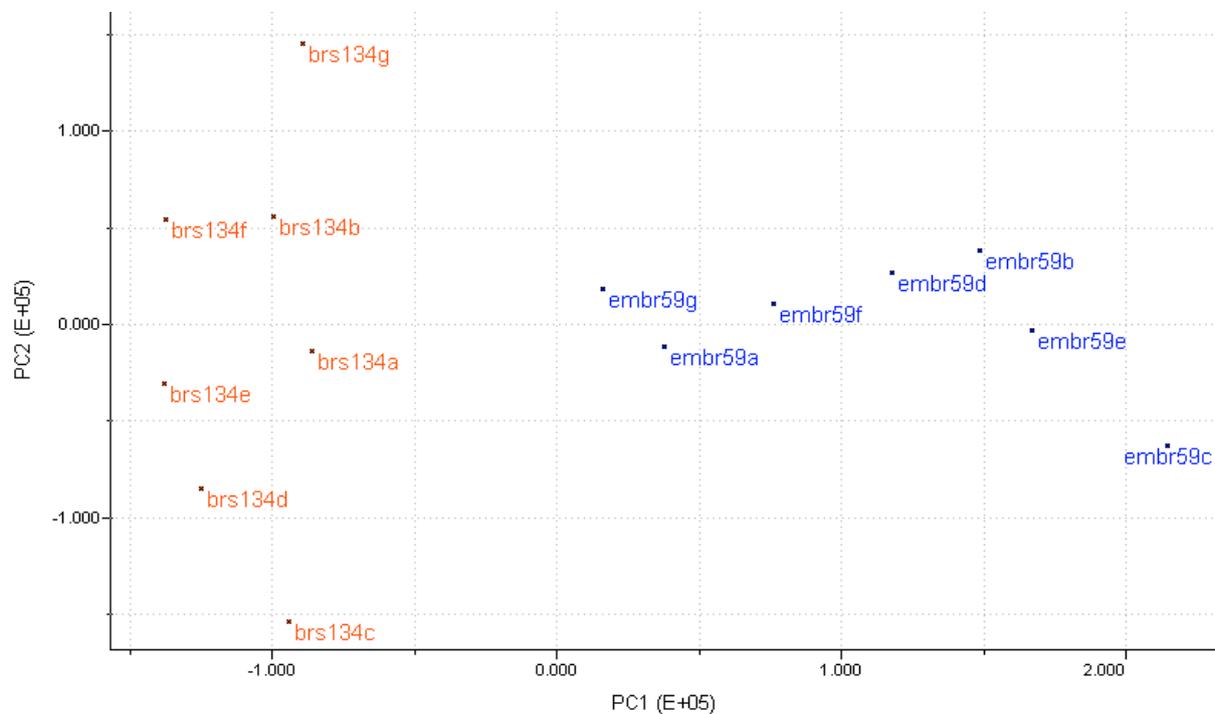


FIGURA 4.89 – Gráfico de escores referente a análise por PCA de espectros de IV de sementes de soja, mostrando a discriminação entre as cultivares BRS 134 e EMBR 59. As percentagens de informações obtidas foram de 65,5% em PC1, de 21,1% em PC2 e um total de 99,8%.

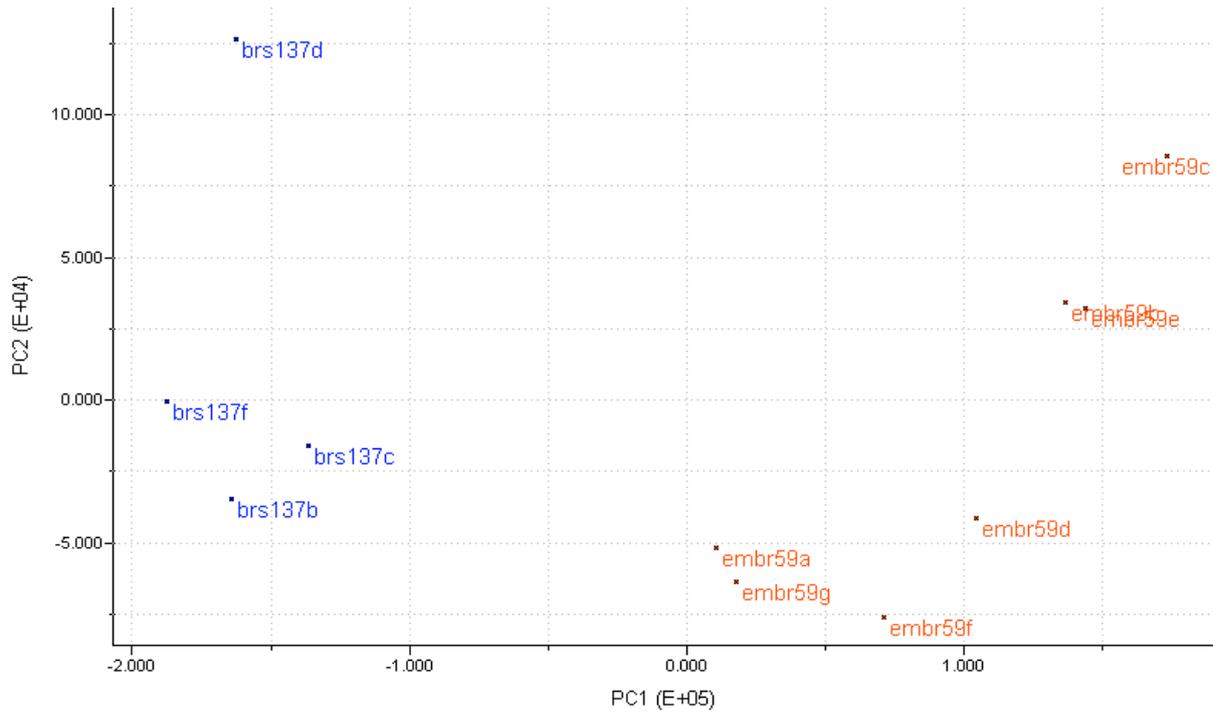


FIGURA 4.90 – Gráfico de escores referente a análise por PCA de espectros de IV de sementes de soja, mostrando a discriminação entre as cultivares BRS 137 e EMBR 59. As percentagens de informações obtidas foram de 71,24% em PC1, de 15,3% em PC2 e um total de 99,9%.

Análises exploratórias de dados de IV referentes a espécimens GM e CV não foram realizadas neste trabalho. No entanto, os resultados mostrados aqui para a discriminação entre cultivares, desperta o interesse em verificar se a análise quimiométrica de dados de IV é capaz de discriminar amostras de espécimens GM de seus respectivos espécimens CV. Ainda que, as medidas são facilmente obtidas e os equipamentos de IV são de menores custo do que os de RMN de alto campo.

#### 4.12.2 – Discriminação e avaliação dos espécimens GM e CV através de sementes de soja

Dos quatro pares de amostras CV e GM para cada cultivar de soja, obtidos sob idênticas condições de cultivo em casa de vegetação, foram adquiridos espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$ . Com o objetivo de eliminar as influências ambientais, os espectros de cada par de amostras foram adquiridos ao mesmo tempo de alternando-se as medidas entre GM e CV. Os conjuntos de dados resultantes foram então submetidos a análises quimiométricas.

A análise quimiométrica, por PCA, das amostras da cultivar BRS 133, permitiu discriminar em PC1 claramente as amostras GM de suas respectivas CV (Figura 4.91). A mesma discriminação foi obtida para as amostras da cultivar BRS 134 e EMBR 59 em que as discriminações também ocorreram em PC1 (Figuras 4.92 e 4.93). Como a discriminação entre os espécimens CV e GM ocorreu em PC1, ao contrário das discriminações entre cultivares que ocorrem em PC3 e em PC2, pode-se concluir que as amostras de espécimens GM apresentam uma maior diferença na composição química quando comparadas aos respectivos espécimens CV. Já as amostras de diferentes cultivares, inclusive entre as cultivares BRS e a cultivar EMBR, são quimicamente mais semelhantes entre si, do que qualquer par de espécimens CV e GM. Diante desta constatação, pode-se inferir que a modificação genética da soja é responsável por significativas alterações da composição química do novo espécimen.

Além de todas as discriminações, independente da cultivar terem ocorrido em PC1, as percentagens de informações também foram semelhante, tanto em PC1 quanto em PC2, demonstrando assim que os espécimens CV diferem daqueles GM pelo mesmo motivo, provavelmente devido as alterações químicas causadas pela modificação genética. Seria interessante analisar amostras de soja com outro tipo de modificação genética.

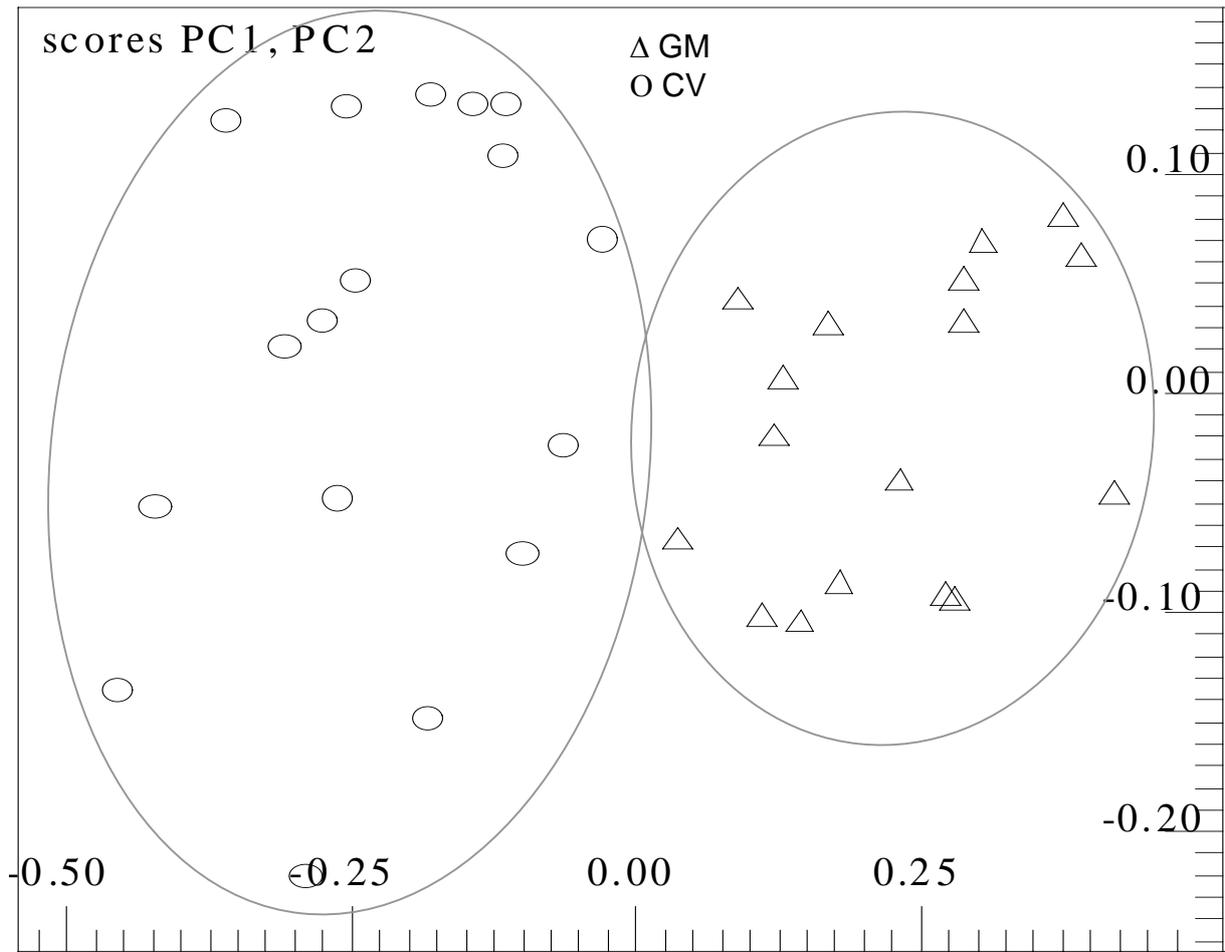


FIGURA 4.91 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  de sementes da cultivar de soja (BRS133), mostrando a discriminação entre os espécimens. As percentagens de informações obtidas foram de 74,7% em PC1, de 9,7% em PC2 e um total de 92,2%.

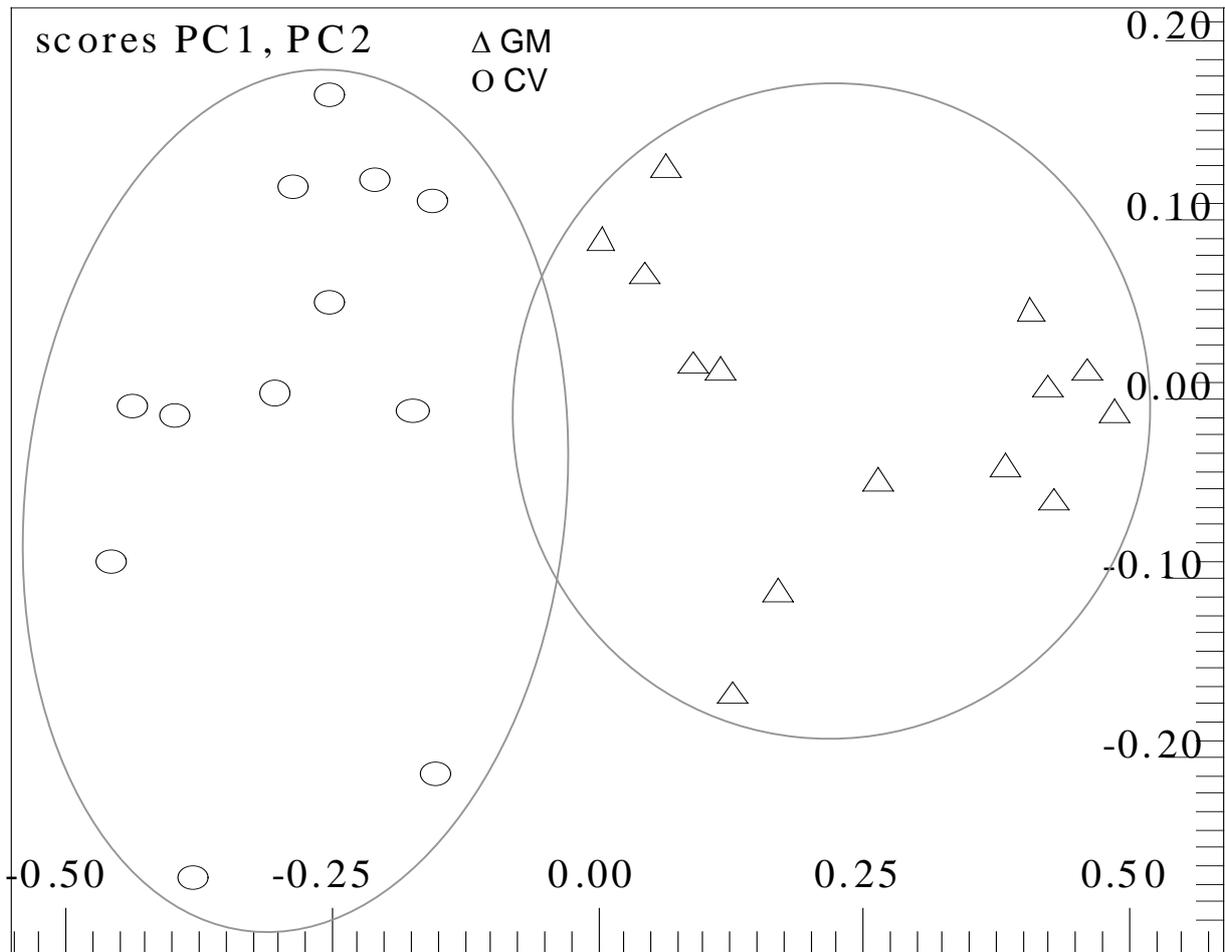


FIGURA 4.92 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  de sementes da cultivar de soja (BRS134), mostrando a discriminação entre os espécimens. As percentagens de informações obtidas foram de 76,2% em PC1, de 8,7% em PC2 e um total de 94,2%.

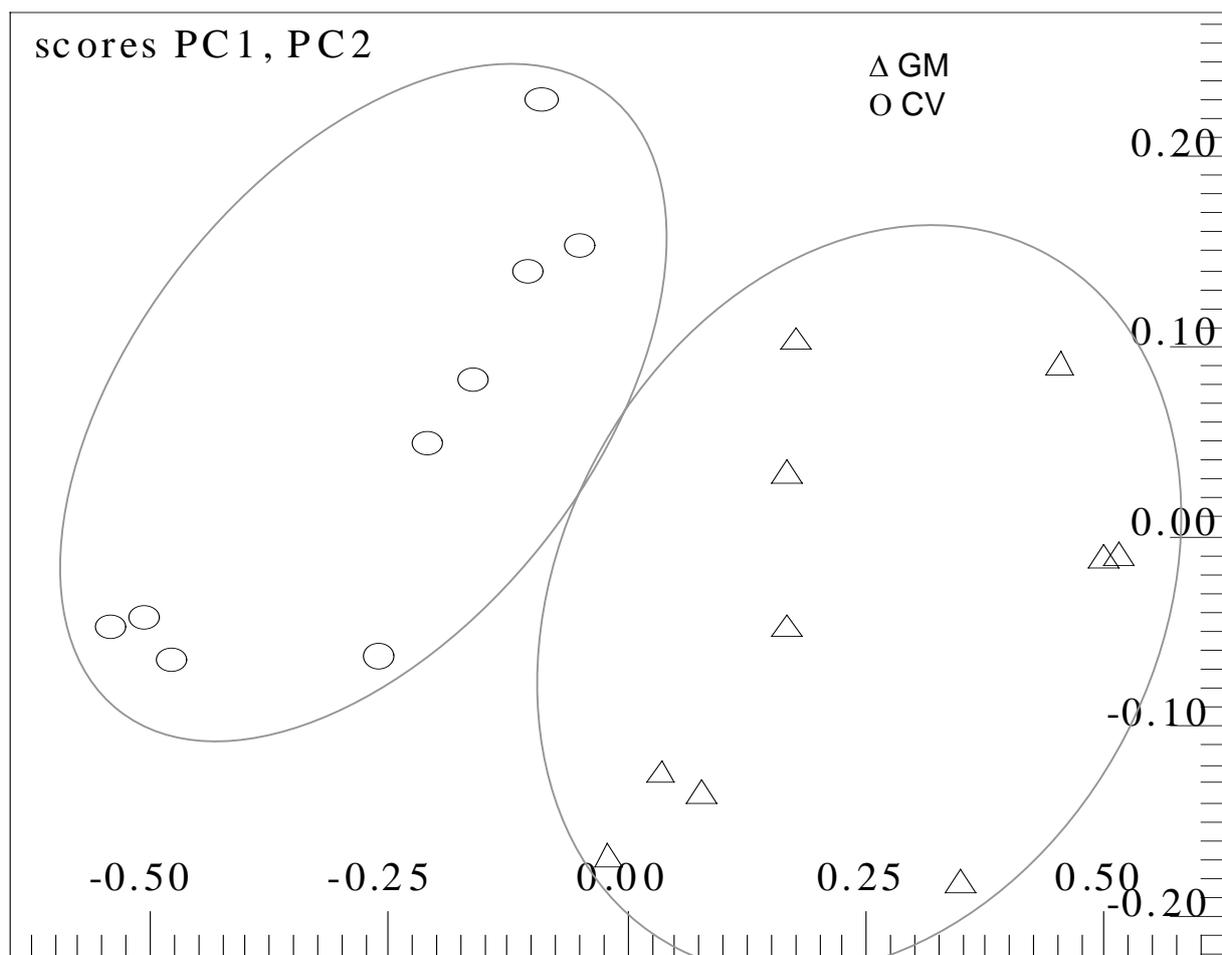


FIGURA 4.93 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  de sementes da cultivar de soja (EMBR 59), mostrando a discriminação entre os espécimens. As percentagens de informações obtidas foram de 77,1% em PC1, de 9,6% em PC2 e um total de 95,4%.

As diferenças na composição química entre os espécimens pode ser averiguada pelas análises dos respectivos gráficos de influências de cada discriminação. Estes revelaram que todos os espécimens CV diferem dos GM pelas mesmas características na composição química. A comparação do gráfico de influências com um espectro de RMN mostra que os sinais referente aos ésteres graxos insaturados tiveram grande contribuição na discriminação entre os espécimens (Figuras 4.94, 4.95 e 4.96). Já os sinais referentes a todos os ésteres graxos, bem como os sinais da unidade de glicerol não influenciaram na discriminação (Figura 4.94), demonstrando que há alterações somente nas cadeias alquilas insaturadas e não na quantidade total de triacilgliceróis. Além destes, os sinais na região de aminoácidos e/ou glicosídeos tiveram importante papel na discriminação. Não foram observadas diferenças na composição química para

compostos com sinais na região de  $\delta$  9,5 a 5,0 ppm dos espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  entre amostras GM e CV, ao menos para aqueles em que a técnica foi sensível.

Os gráficos de influências, revelaram também que os novos espécimens possuem um maior teor de ésteres graxos insaturados (Valores positivos em PC1) e menor teor de aminoácidos e/ou glicosídeos (Valores negativos em PC1), enquanto que o oposto ocorre para os espécimens CV (Figuras 4.94, 4.95 e 4.96). Observou-se também que o sinal em  $\delta$  3,19 ppm referente aos grupos metilas da colina influência fortemente a discriminação, e que esta substância está presente em menor quantidade nas amostras GM (Figuras 4.94, 4.95 e 4.96), sendo mais evidente para a cultivar BRS 133 (Figura 4.94). Também nota-se claramente que o sinal em  $\delta$  3,67 é uma variável de grande influência na discriminação e que a substância a qual este sinal representa está mais pronunciada nos espécimens CV (Valores positivos em PC1).

Portanto, a modificação genética, até o momento, tem conduzido a um padrão de alteração na composição química dos novos espécimens.

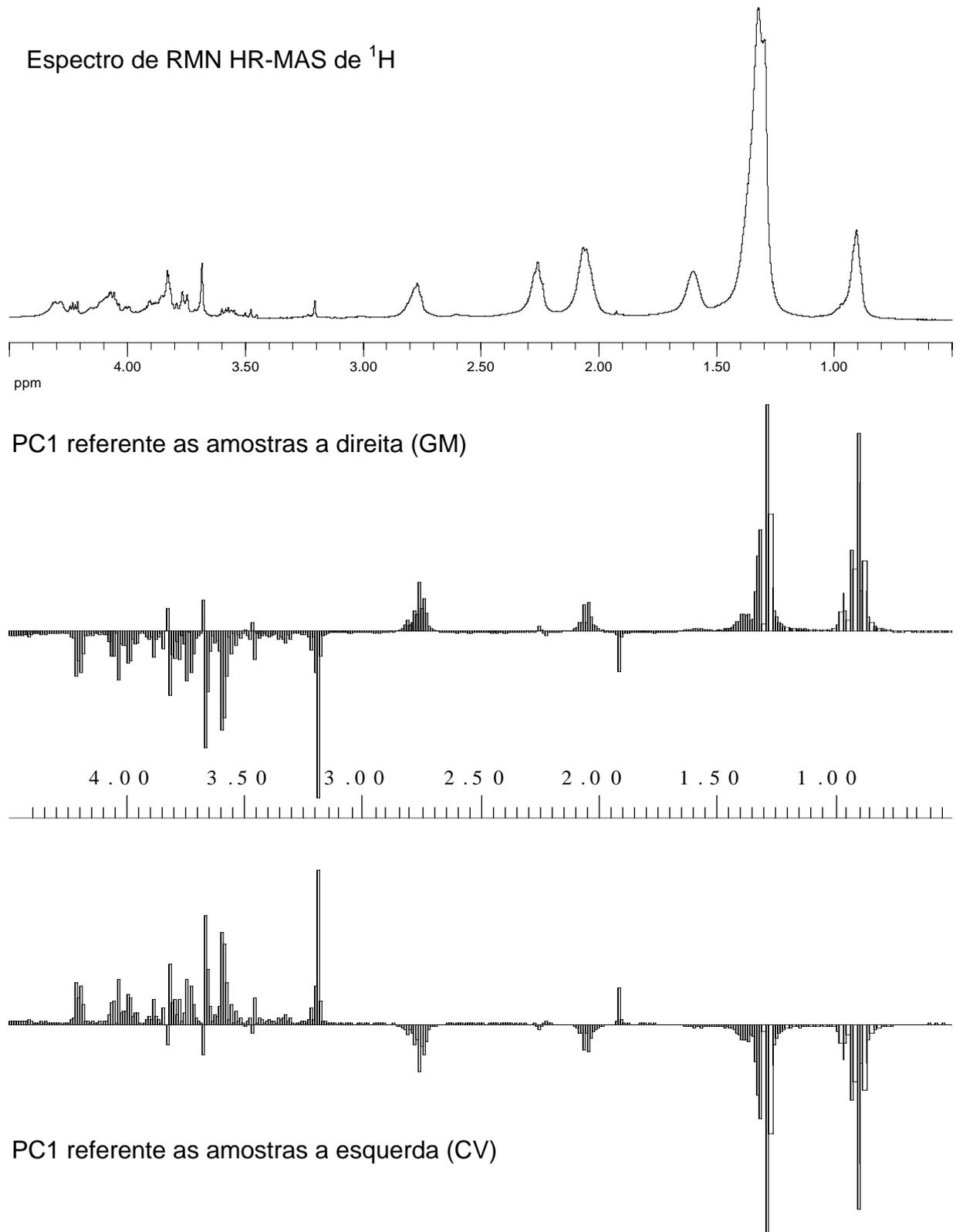
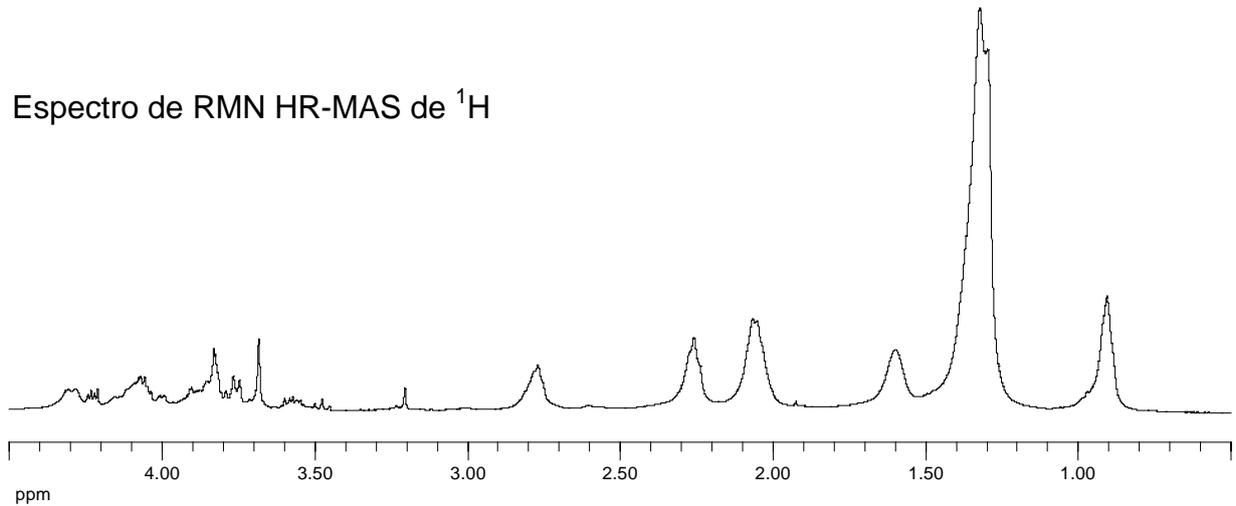
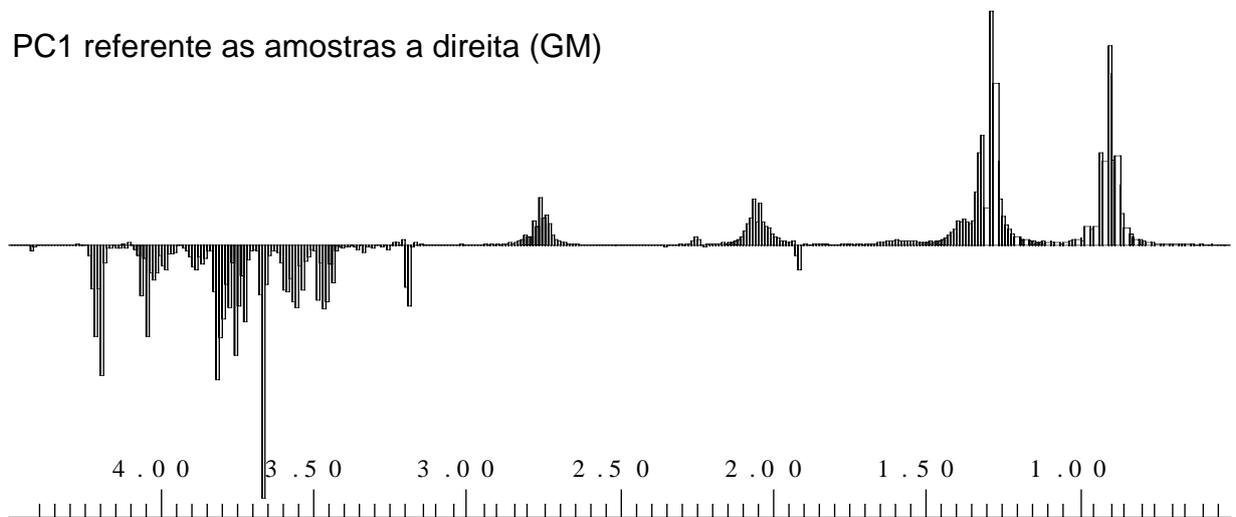


FIGURA 4.94 – Influências das variáveis em PC1 para a cultivar BRS 133. Os *buckets* abaixo do plano significam menores teores das substâncias representadas pelos respectivos sinais no espectro de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  e o oposto para os que estão acima do plano.

Espectro de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$



PC1 referente as amostras a direita (GM)



PC1 referente as amostras a esquerda (CV)

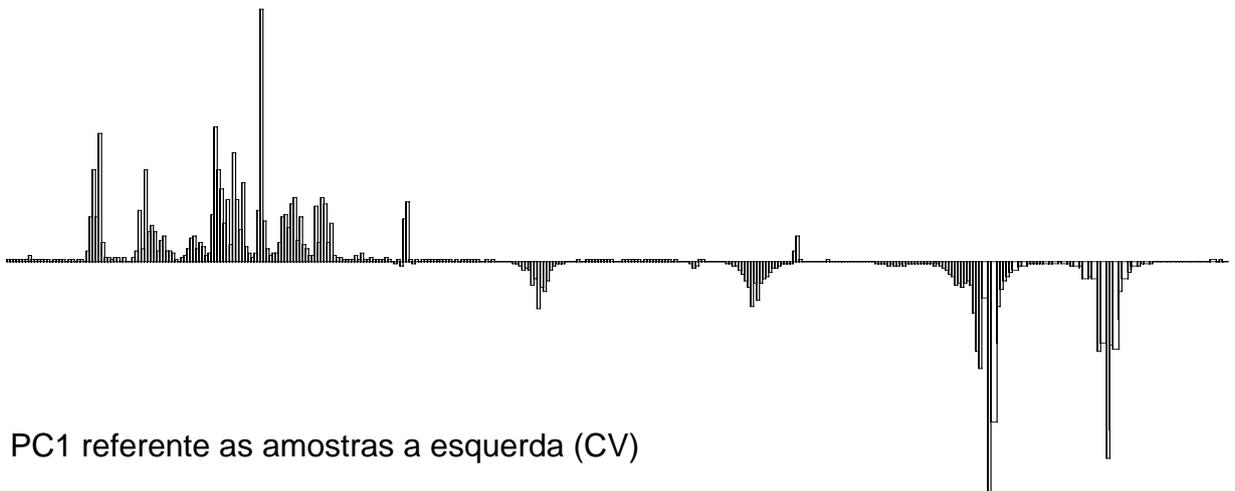


FIGURA 4.95 – Influências das variáveis em PC1 para a cultivar BRS 134. Os *buckets* abaixo do plano significam menores teores das substâncias representadas pelos respectivos sinais no espectro de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  e o inverso para aqueles acima do plano.

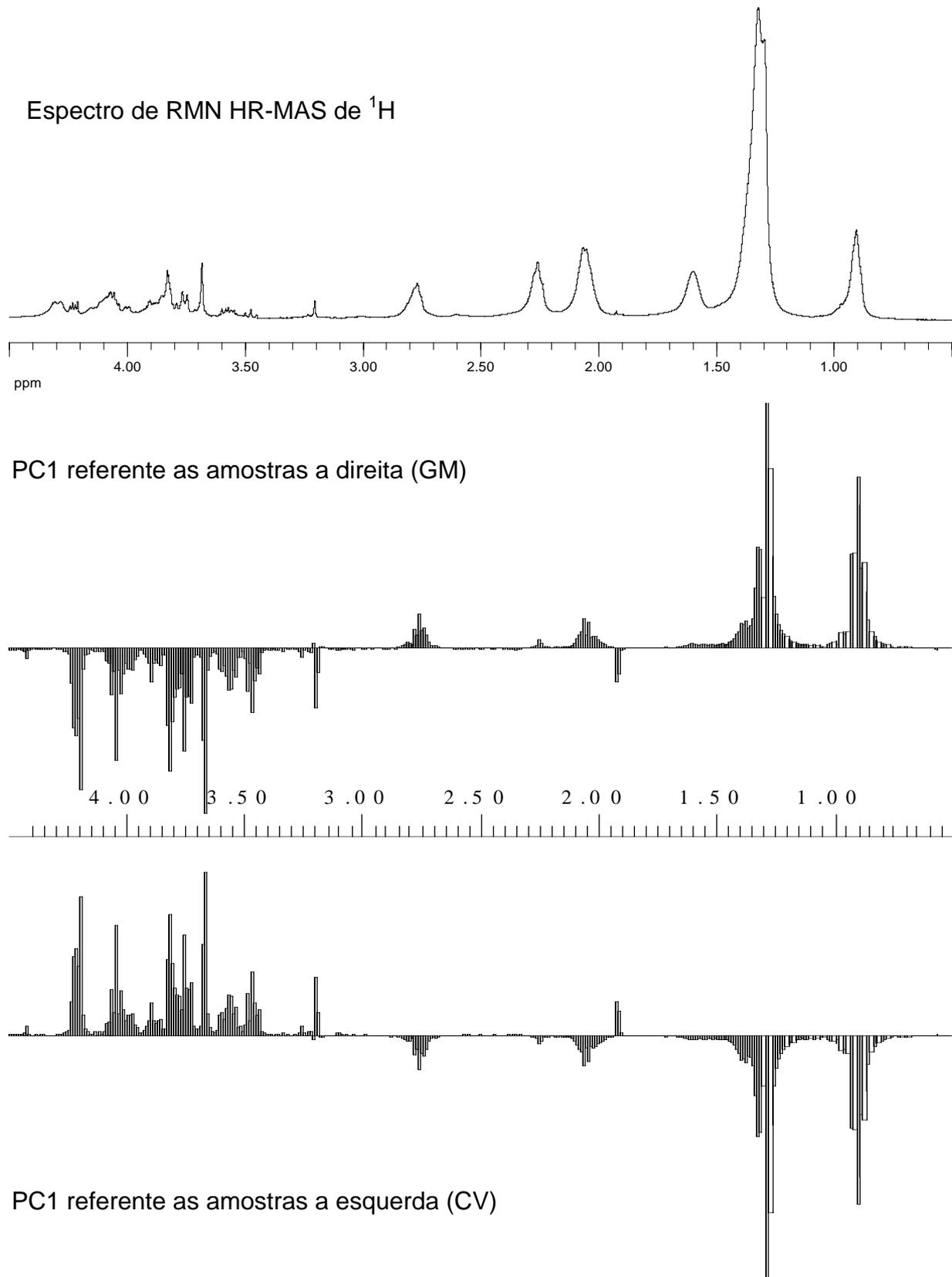


FIGURA 4.96 – Influências das variáveis em PC1 para a cultivar EMBR 59. Os *buckets* abaixo do plano significam menores teores das substâncias representadas pelos respectivos sinais no espectro de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  e o oposto para aqueles acima do plano.

Manetti *et al.* (2004) em seus estudos com espécies de milho GM para tolerar o herbicida glifosato, mesma modificação genética das soja RR, observaram que os espécimens GM apresentavam um menor teor de colina e aminoácidos. Já nos resultados obtidos por Taylor *et al.* (1999) em vários testes realizados com diferentes cultivares mostraram que as sementes de soja RR apresentaram níveis ligeiramente superiores de óleo e inferiores de carboidratos. Por outro lado, para os níveis de aminoácidos e proteínas Taylor *et al.* (1999) não observaram sequer diferenças mínimas entre os espécimens GM e CV de sementes de soja. Estes resultados estão de acordo com os obtidos neste trabalho.

Segundo Kruse *et al.* (2000) e Reddy *et al.* (2004) a inibição da enzima EPSPS, em plantas não GM, interfere no controle da entrada de carbono na via do ácido chiquímico, pelo aumento da atividade da enzima reguladora da rota, a 3-deoxi-D-arabino-heptulosoato-7-fosfato sintetase (DAHPS), que catalisa a reação da eritrose-4-fosfato com o fosfoenolpiruvato (Figura 1.2). Este fato deve-se ao inibidor alostérico da DAHPS, o arogenato, um produto metabólico formado posteriormente ao ácido corísmico na via do ácido chiquímico. Desta forma, com a interrupção da rota pela ação do glifosato, haverá uma redução da inibição da DAHPS pelo arogenato, resultando em altos acúmulos de ácido chiquímico. Este aumento na atividade da DAHPS, representa um forte dreno de carbono do ciclo de Calvin, pelo desvio da eritrose-4-fosfato, que seria empregada na regeneração da ribulose bifosfato do ciclo de Calvin. Outra consequência da inibição da via do ácido chiquímico é a interrupção da síntese de proteínas por esta via metabólica. O dreno de carbono do ciclo de Calvin e também o consumo excessivo de fosfoenolpiruvato podem resultar em uma diminuição na entrada de carbono pela via glicolítica, resultando também em uma redução geral da produção de vários metabólitos.

Os resultados obtidos neste estudo indicam um efeito oposto para a soja GM, provavelmente devido a presença da enzima EPSPS exógena, a qual pode estar interferindo parcialmente na atividade da enzima DAHPS, pela diminuição da atividade desta enzima. A comprovação do aumento da atividade da via metabólica, pela introdução de uma segunda enzima EPSPS pode ser evidenciada pelo aumento nos níveis das isoflavonas genisteína e daidezeína, que são produtos metabólicos da via do ácido chiquímico (Taylor *et al.*, 1999). Em nossos estudos os níveis de isoflavonas nas sementes de soja não puderam ser averiguados, devido a baixa sensibilidade da técnica de RMN.

No caso da cultivar BRS 137, a qual possui dois tipos de espécimens GM, a análise quimiométrica das amostras, discriminou também em PC1 os espécimens GM dos CV (Figura 4.97). Porém, não foi observada distinção entre os dois tipos espécimens GM, nem quando as amostras referentes aos espécimens GM foram analisados em separado.

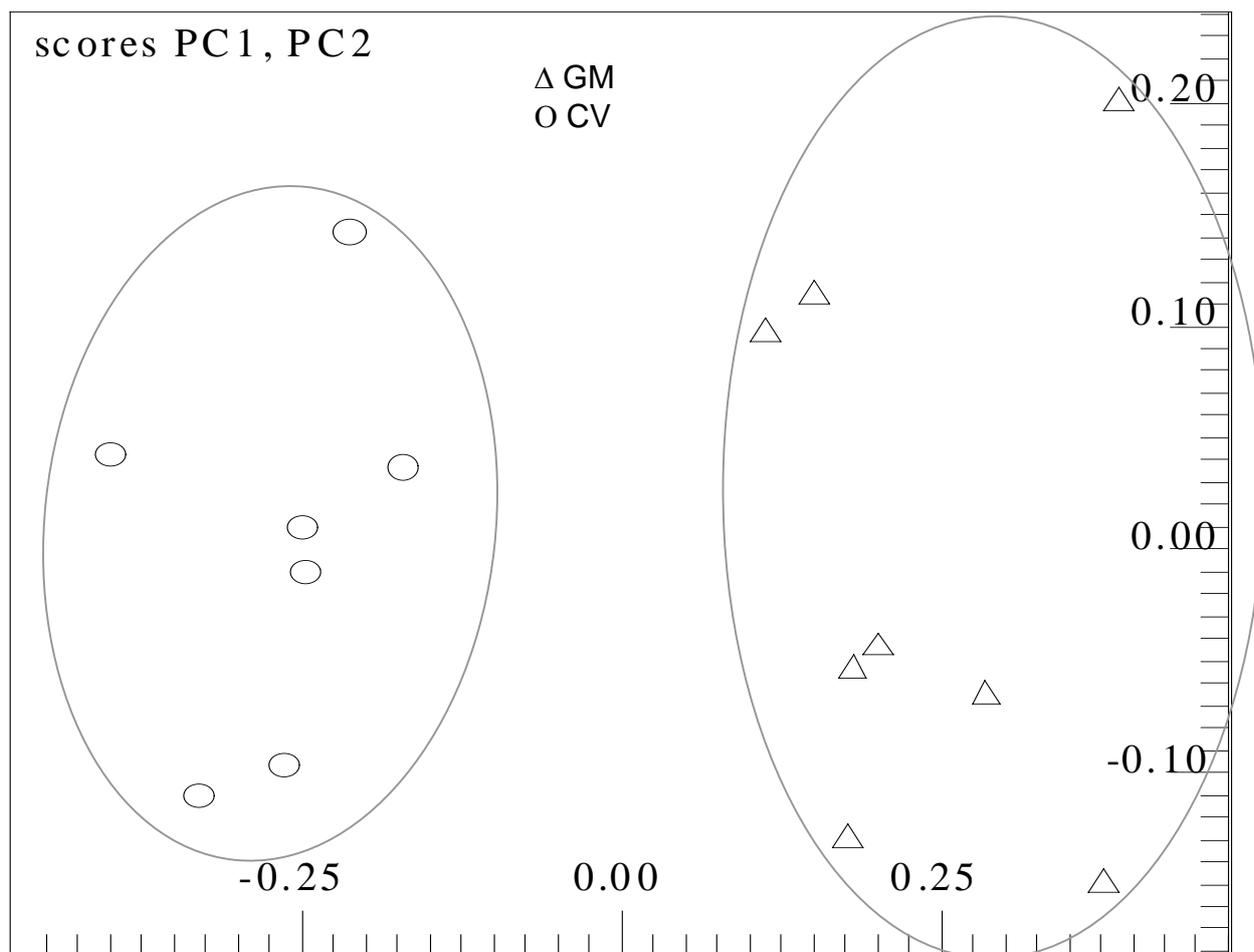


FIGURA 4.97 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  de sementes da cultivar de soja (BRS 137), mostrando a discriminação entre os espécimens. As percentagens de informações obtidas foram de 72,6% em PC1, de 16,6% em PC2 e um total de 94,8%.

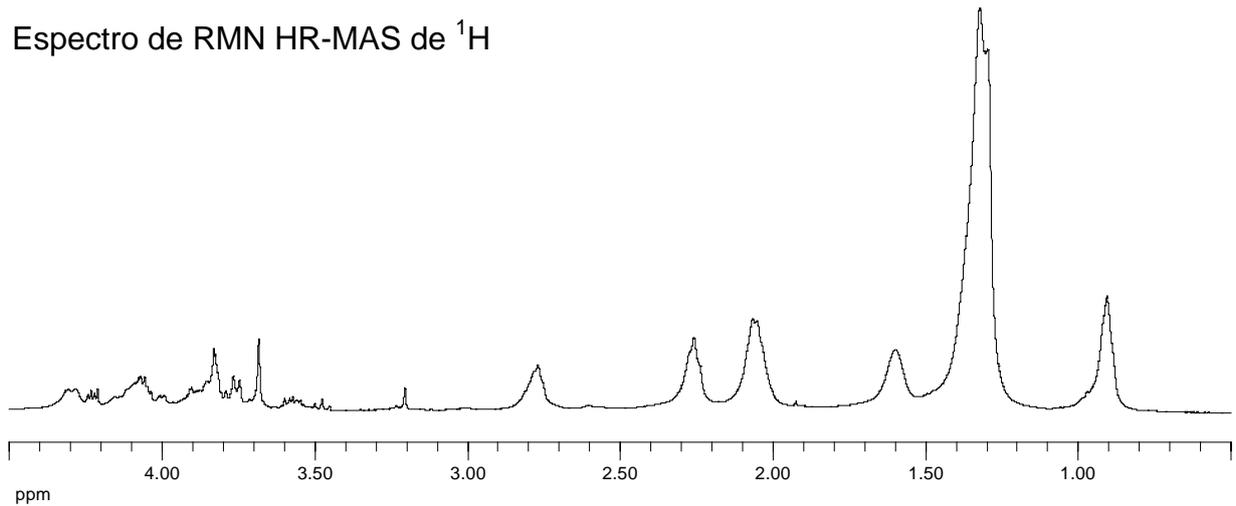
Os gráficos de influências referente a discriminação dos espécimens da cultivar BRS 137 mostraram um comportamento diferente daquele observado para as demais cultivares. Neste caso, os espécimens GM apresentaram menores níveis na composição de triacilgliceróis e maiores na composição de aminoácidos e/ou glicosídeos em relação as amostras CV (Figura 4.98). Além disso, ao contrário das

outras cultivares, foi observada pouca influência dos sinais referentes aos ésteres graxos insaturados (Figura 4.98). Desta forma, a modificação genética desta cultivar de soja tem causado um comportamento bastante diferente do observado para as demais cultivares, demonstrando que nem sempre o mesmo padrão de alteração química pode ser esperado para uma mesma modificação genética.

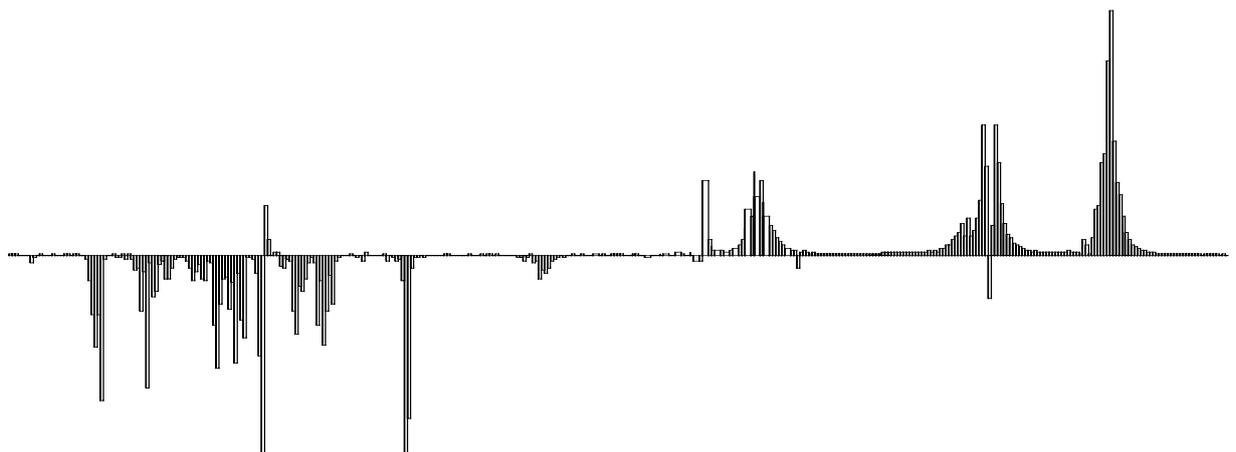
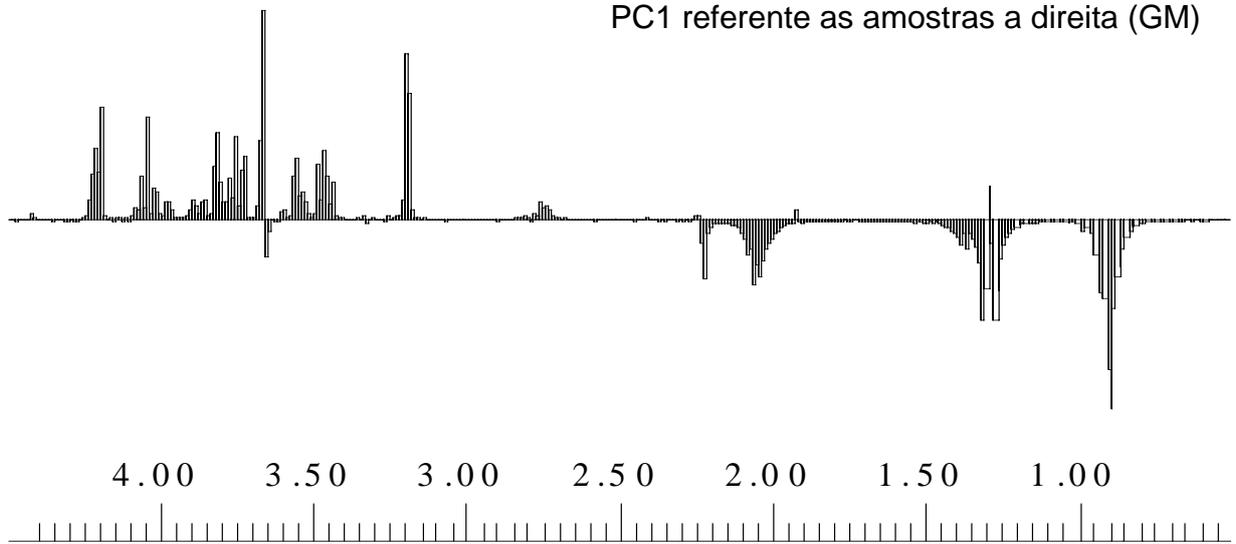
Devido ao comportamento diferenciado observado para a cultivar BRS 137, novas amostras para de todas as quatro cultivares, contento espécimens GM e CV, foram adquiridas, para verificar se as observações eram consistentes. Os resultados das análises quimiométricas destas repetições foram muito semelhantes aos já observados.

O comportamento anômalo das amostras GM desta cultivar em relação as demais está de acordo com observações agrônômicas, em que também tem sido observados comportamentos diferentes deste espécimen. Inclusive, a mesma modificação genética desta cultivar tem resultados em novos espécimens diferentes entre si. No entanto, a análise somente dos espécimens GM desta cultivar não permitiu avaliar as diferenças entre os mesmos, nem mesmo a discriminação entre eles.

Espectro de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$



PC1 referente as amostras a direita (GM)



PC1 referente as amostras a esquerda (CV)

FIGURA 4.98 – Influências das variáveis em PC1 para a cultivar BRS 137. Os *buckets* abaixo do plano significam menores teores das substâncias representadas pelos respectivos sinais no espectro de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  e o contrário para aqueles acima do plano.

Uma vez sendo possível discriminar facilmente as amostras de espécimens GM de seus respectivos espécimens CV, resolveu-se testar se a mesma discriminação era possível, independente da cultivar. Desta forma, foi realizada a exploração dos dados, utilizando-se todos os conjuntos de dados anteriores de espécimens GM e CV, mesmo que estes tenham sido adquiridos em épocas diferentes.

A análise quimiométrica destes dados mostrou uma tendência discriminatória em PC1 entre os espécimens, como pode ser observado na figura 4.99. Porém, foi necessário remover as amostras da cultivar BRS 137 desta análise, como já era previsto, devido a característica distinta desta cultivar, bem como de algumas amostras de comportamento anômalo.

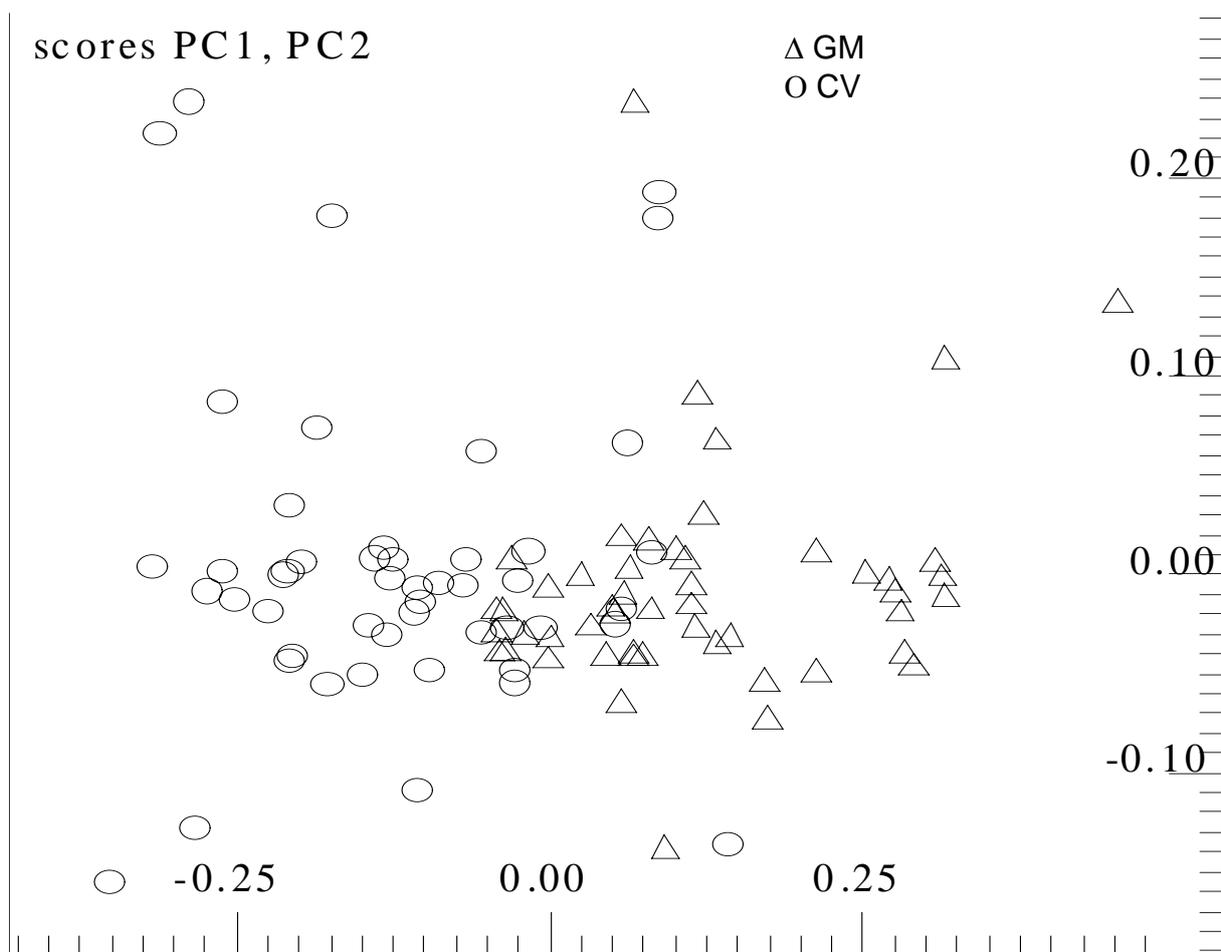


FIGURA 4.99 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  de as cultivares de soja, com exceção da BRS 137, mostrando a discriminação entre os espécimens CV e GM. As percentagens de informações obtidas foram de 70,9% em PC1, de 12,1% em PC2 e um total de 93,9%.

A discriminação entre espécimens, independente da cultivar foi obtida através da realização de um experimento, em que duas misturas foram preparadas. Uma contendo todas as amostras de espécimens GM e a outra as amostras de espécimens CV, tomando-se quantidades equivalentes de cada cultivar. Os espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  deste conjunto de dados foi então submetido a quimiometria.

Novamente, a análise exploratória por PCA agrupou, com sucesso, as amostras em duas classes distintas, como pode ser observado na figura 4.100. Este resultado já era esperado, uma vez que foi mais fácil discriminar as amostras entre GM e CV do que entre cultivares. No entanto, como também já era esperado, a discriminação foi menos resolvida entre as classes, quando comparado com as análises individuais. Este fato, deve-se, muito provavelmente, à cultivar BRS 137, apresentar comportamento das demais cultivares. Porém a quantidade de amostra desta cultivar presente na mistura prepara não foi suficiente para impossibilitar a discriminação. Além disso, a discriminação ocorreu em PC1, como nas discriminações individuais para cada cultivar, demonstrando a reprodutibilidade dos resultados e comprovando as características dos espécimens CV e GM.

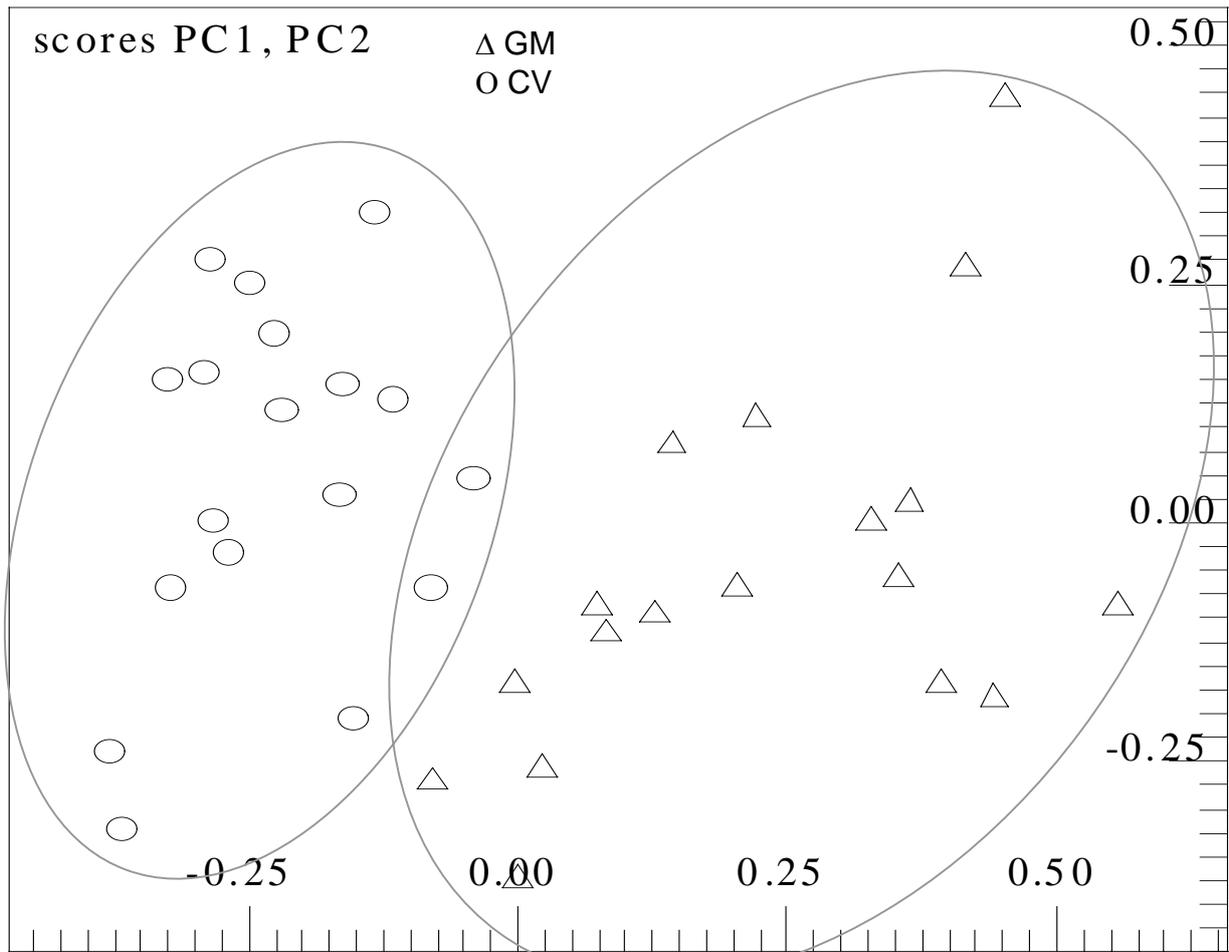


FIGURA 4.100 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  da mistura, mostrando a discriminação entre os espécimens CV e GM. As percentagens de informações obtidas foram de 51,7% em PC1, de 25,4% em PC2 e um total de 89,3%.

Os gráficos de influências para esta discriminação revelaram o mesmo comportamento observado anteriormente nas discriminações individuais entre GM e CV para as cultivares BRS 133, BRS 134 e EMBR9 (Figuras 4.94, 4.95 e 4.96), porém o sinal em  $\delta$  2,75 ppm teve menor influência na discriminação (Figura 4.101). Este resultado confirma que os novos espécimens possuem maiores níveis na de ésteres graxos insaturados e menores de aminoácidos e/ou glicosídeos, em relação aos espécimens CV. A única exceção a este padrão foi observada para os espécimens GM da cultivar BRS 137.

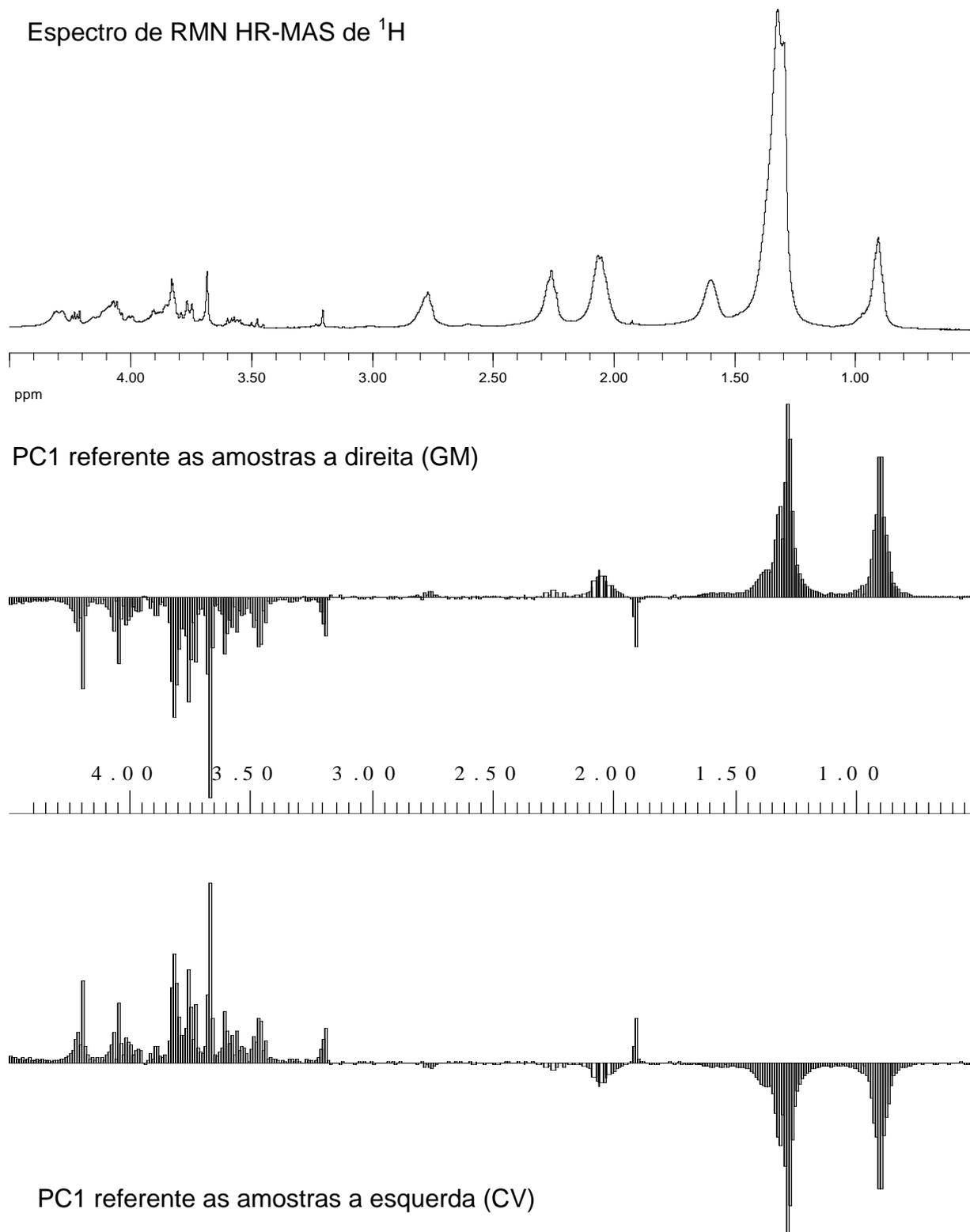


FIGURA 4.101 – Influências das variáveis em PC1 para a mistura. Os *buckets* abaixo do plano significam menores teores das substâncias representadas pelos respectivos sinais no espectro de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  e o contrário para aqueles acima do plano.

## 4.13 – Análises quimiométricas das amostras de campo

### 4.13.1 – Discriminação de amostras do Mato Grosso

Amostras de sementes de soja provenientes da região produtora de Campo Novo do Parecis, Estado de Mato Grosso, foram obtidas e submetidas ao estudo. A única informação válida a respeito destas sementes é de que se referiam a espécimens GM e CV, sendo que a cultivar das mesmas e o local exato de cultivo eram desconhecidos.

A análise exploratória por PCA discriminou, em PC2, as amostras em classes, agrupando as GM em uma e as CV em outra (Figura 4.102).

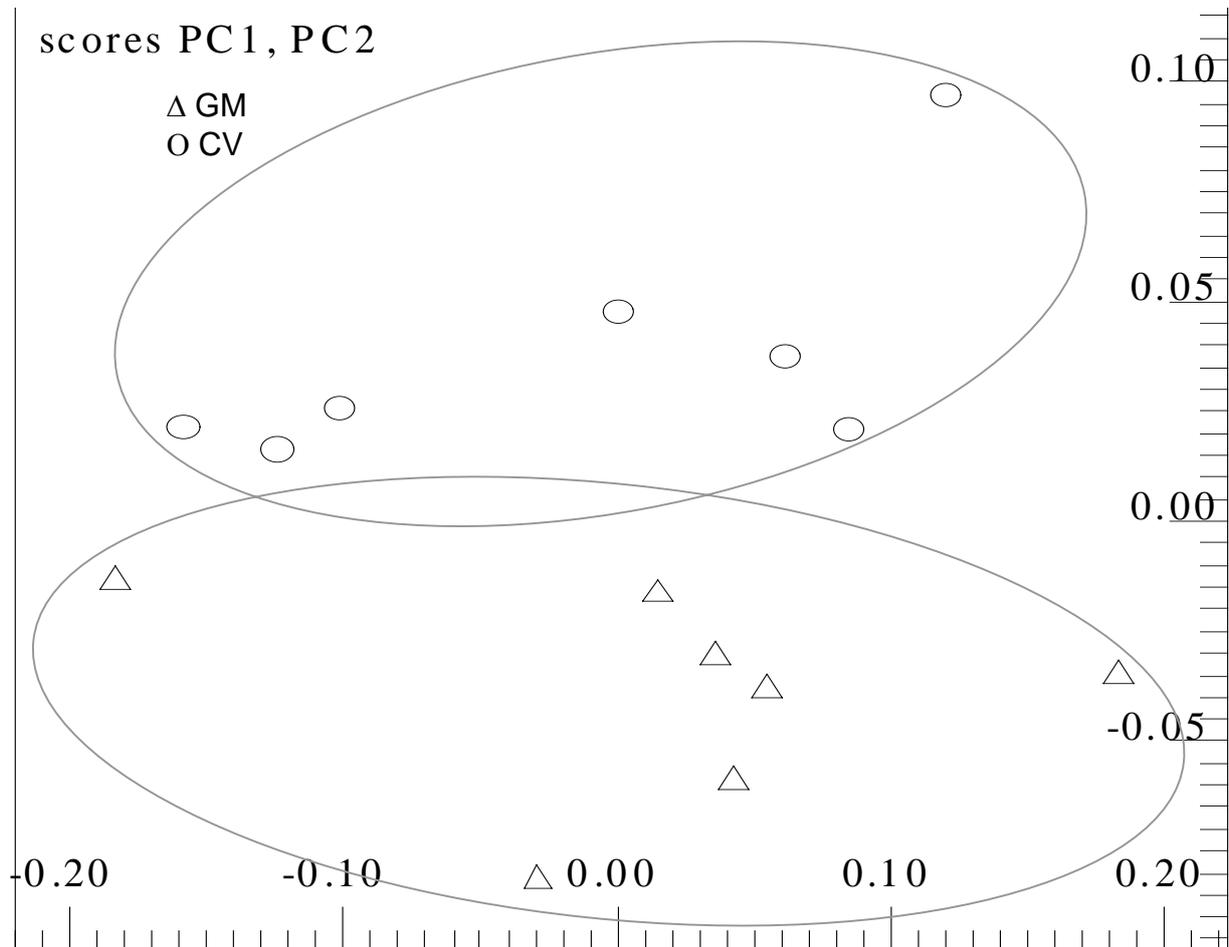


FIGURA 4.102 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  das amostras do Mato Grosso, mostrando a discriminação entre os espécimens CV e GM. As percentagens de informações obtidas foram de 66,6% em PC1, de 12,7% em PC2 e um total de 93,7%.

A análise dos gráficos de influências para esta discriminação mostrou comportamento diferente, não seguindo o padrão esperado entre espécimens GM e CV (Figura 4.103). Este fato deve-se muito à alteração genética não ser a única variável neste caso, pois muito provavelmente as amostras eram compostas por representantes de diversas cultivares.

As amostras apresentaram principalmente diferenças nos níveis das substâncias representadas pelos sinais em  $\delta$   $\sim$ 3,56,  $\sim$ 4,21,  $\sim$ 3,81 e  $\sim$ 1,27 (Figura 4.103). Sendo que as GM apresentaram maiores teores das substâncias representadas pelos sinais em  $\delta$  3,56, 4,21 e 1,27 e menor pelo sinal em  $\delta$  3,81, sendo que o oposto ocorre para as amostras CV (Figura 4.103). A produção de quantidades diferentes de óleo pelas cultivares, como já foi mostrado anteriormente, justifica o fato de os sinais de ésteres graxos não terem influenciados na discriminação entre GM e CV como na amostras de casa de vegetação.

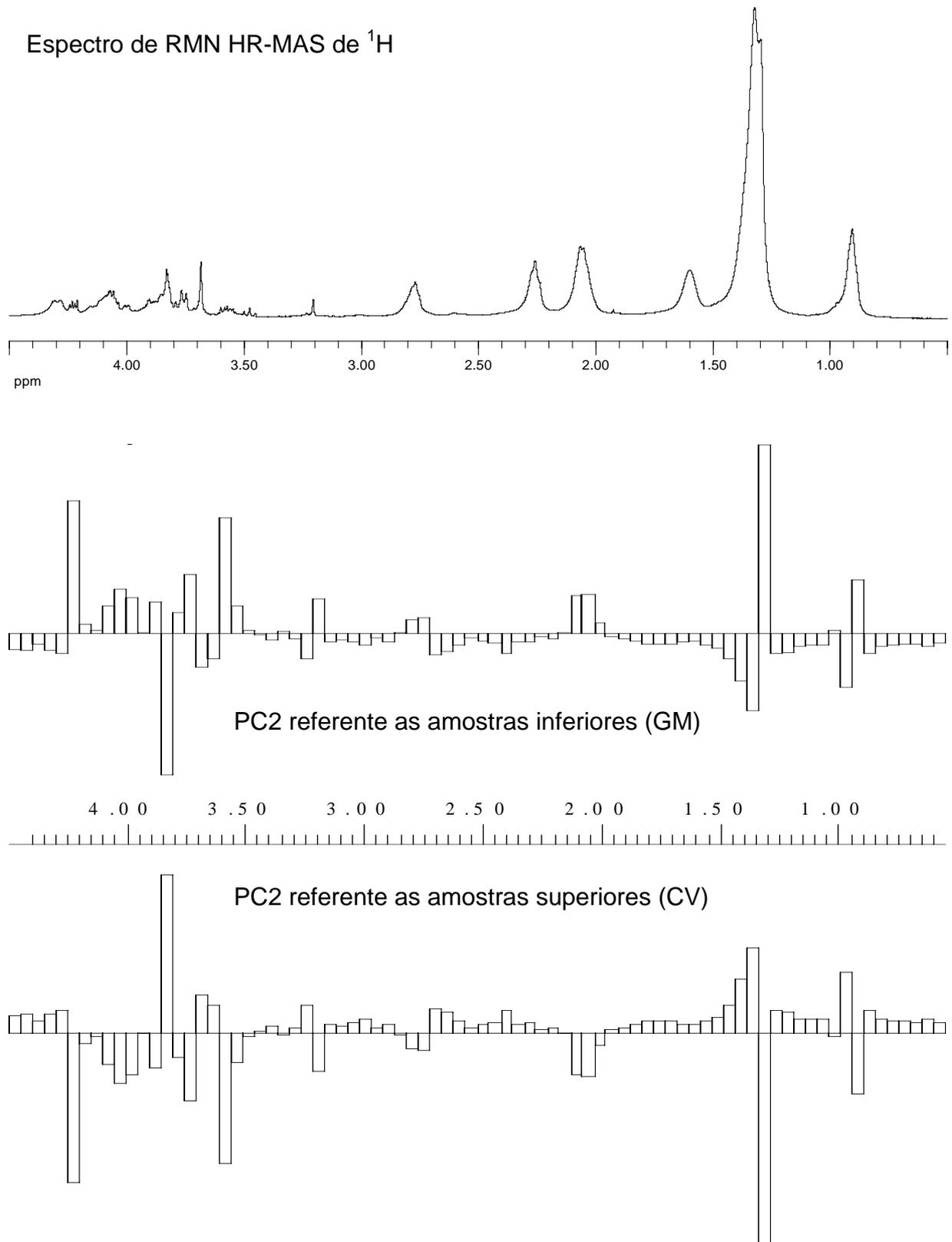


FIGURA 4.103 – Comparação dos gráficos de influências obtidos nas discriminações entre espécimens das amostras provenientes do Estado de Mato Grosso.

## 4.13.2 – Discriminação de amostras de Ponta Grossa e Londrina

### 4.13.2.1 – Discriminação por região

Amostras de sementes de soja, mesmas cultivares, produzidas em diferentes regiões foram submetidas as análises por RMN HR-MAS/Quimiometria. Utilizando-se para isso três pares de cultivares de soja que haviam sido produzidas nas tradicionais regiões produtoras de Londrina e Ponta Grossa, ambas no Estado do Paraná. A escolha desta regiões deveu-se ao fato destas apresentarem condições climáticas completamente diferentes.

Os espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  referentes a cultivar de soja BRS 134 permitiu que a quimiometria distinguisse as amostras de acordo com a região (Figura 4.104). Utilizando-se as amostras da cultivar BRS 230 o mesmo resultado foi obtido (Figura 4.105). Os gráficos de influências para estas duas discriminações revelou que quanto cultivadas na região de Ponta Grossa, produzem maiores níveis de triacilgliceróis (Figuras 4.106 e 4.107). Além disso, a análise destes gráficos permitiu inferir que as amostras da cultivar BRS 134 possuem um teor maior de ésteres graxos insaturados, quando esta é produzida em Ponta Grossa, devido aos valores positivos dos *buckets* referentes ao sinais em torno de  $\delta$  2,75 e 2,03 ppm, exclusivos de ésteres graxos insaturados (Figura 4.106). Por outro lado, a cultivar BRS 230 de Ponta Grossa não foi discriminada das de Londrina por *buckets* referentes a estes sinais, pois observou-se somente valores positivos de *buckets* referentes aos sinais em  $\delta$  0,89 e 1,30 ppm referentes a todos os ésteres graxos. Sendo assim, as amostras da cultivar BRS 230 de Ponta Grossa possuem um maior teor de triacilgliceróis (Figura 4.107).

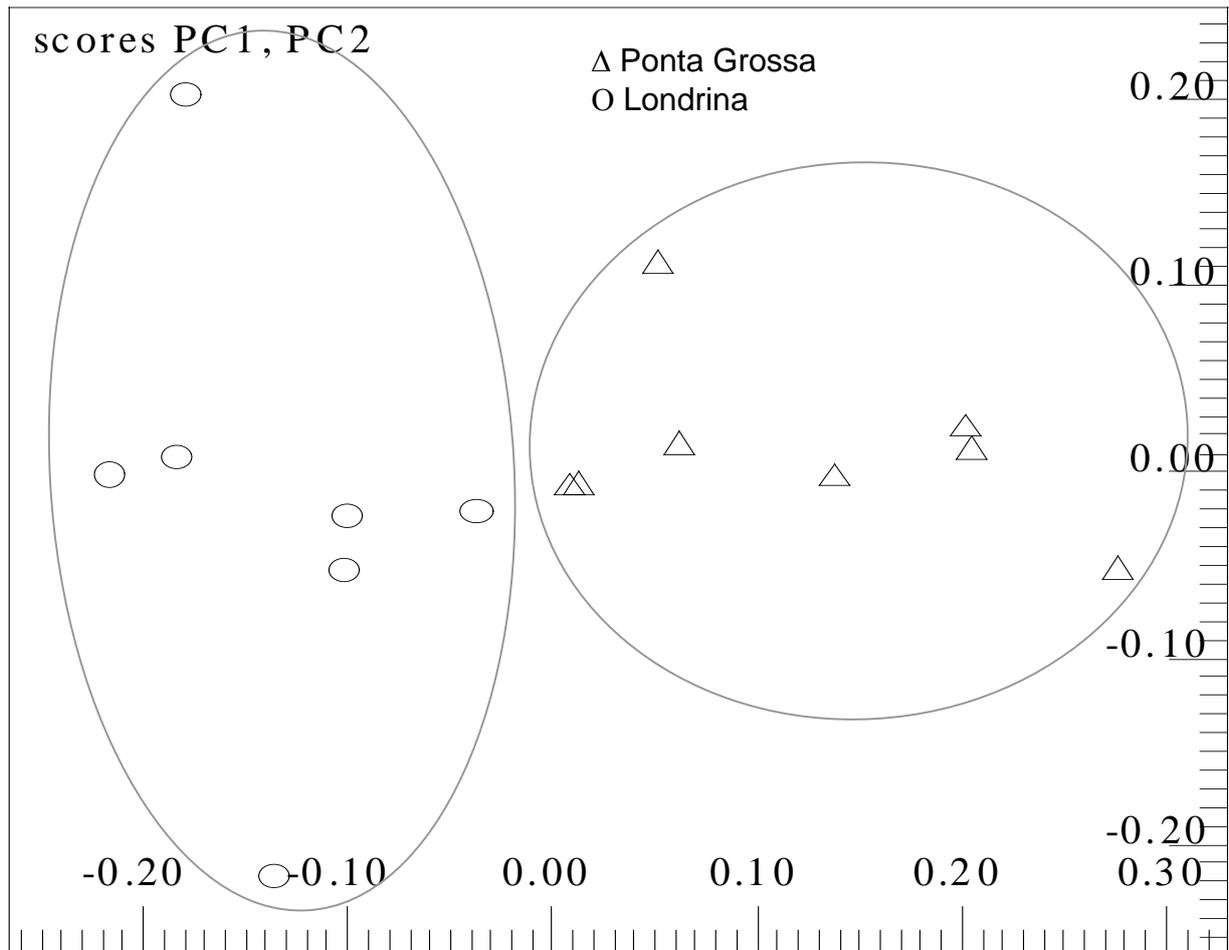


FIGURA 4.104 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  das amostras da cultivar BRS 134, mostrando a discriminação por região produtora. As percentagens de informações obtidas foram de 86,8% em PC1, de 7,6% em PC2 e um total de 98,6%.

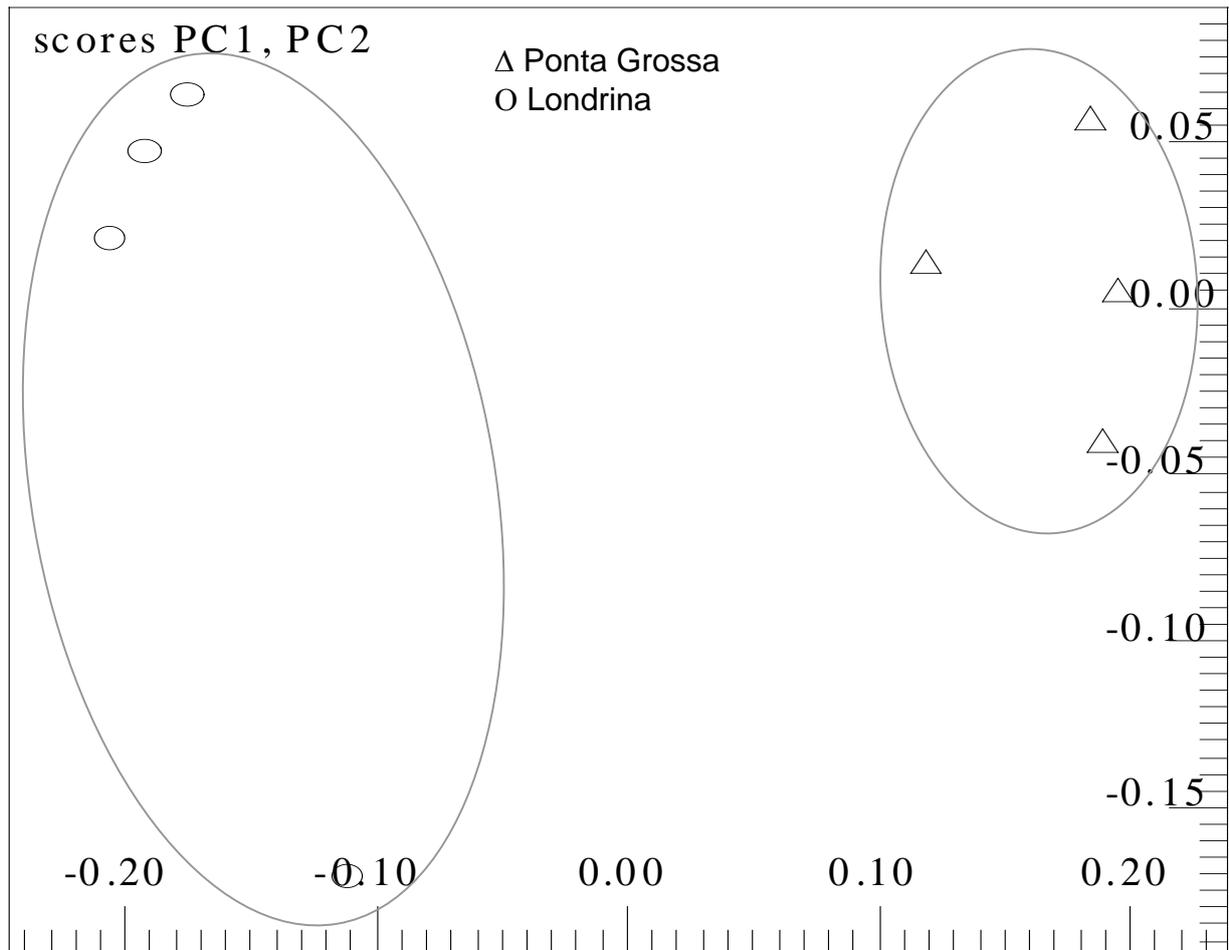


FIGURA 4.105 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  das amostras da cultivar BRS 230, mostrando a discriminação por região produtora. As percentagens de informações obtidas foram de 76,8% em PC1, de 12,8% em PC2 e um total de 98,1%.

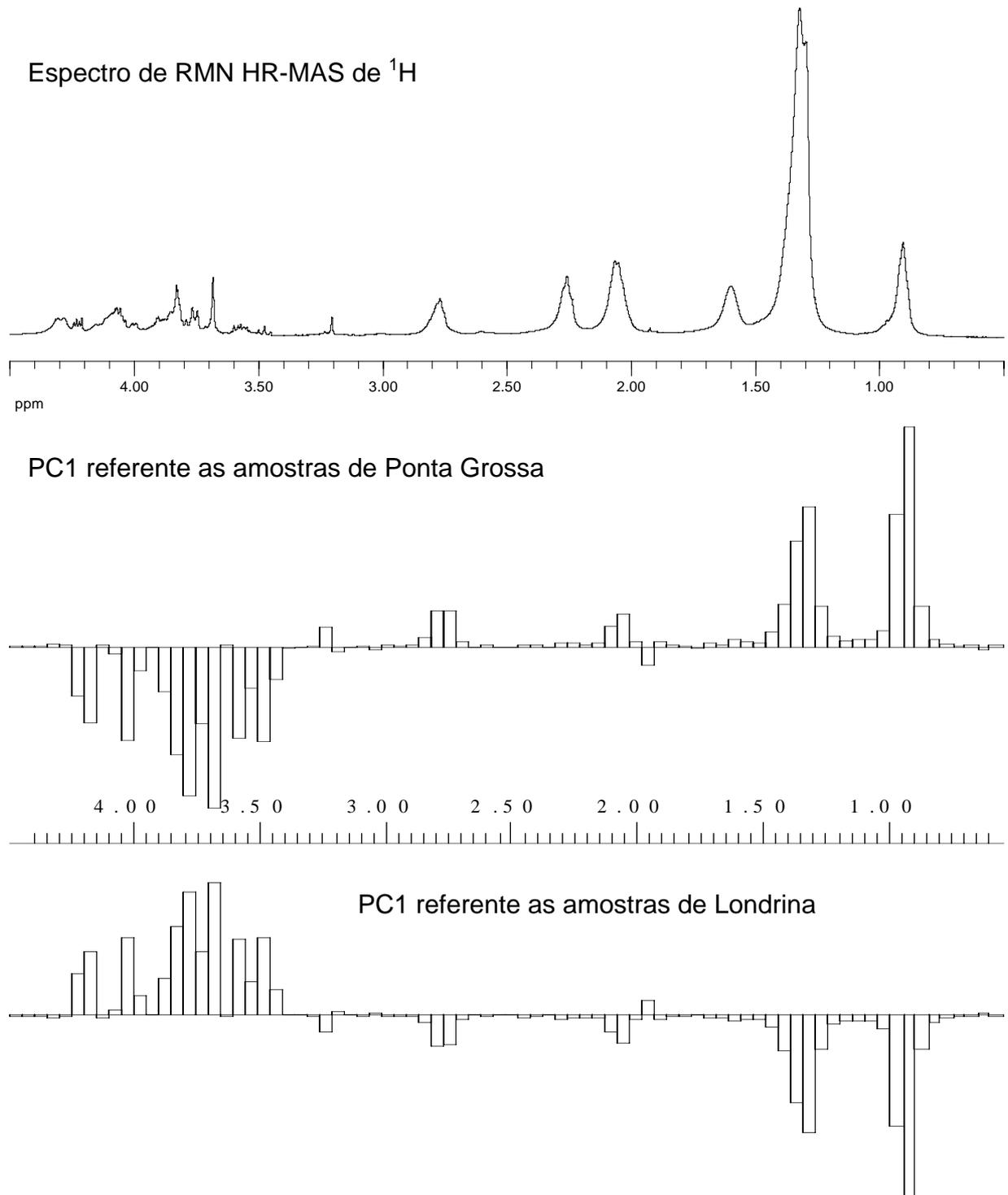


FIGURA 4.106 – Comparação dos gráficos de influências obtidos nas discriminações entre região para a cultivar BRS 134.

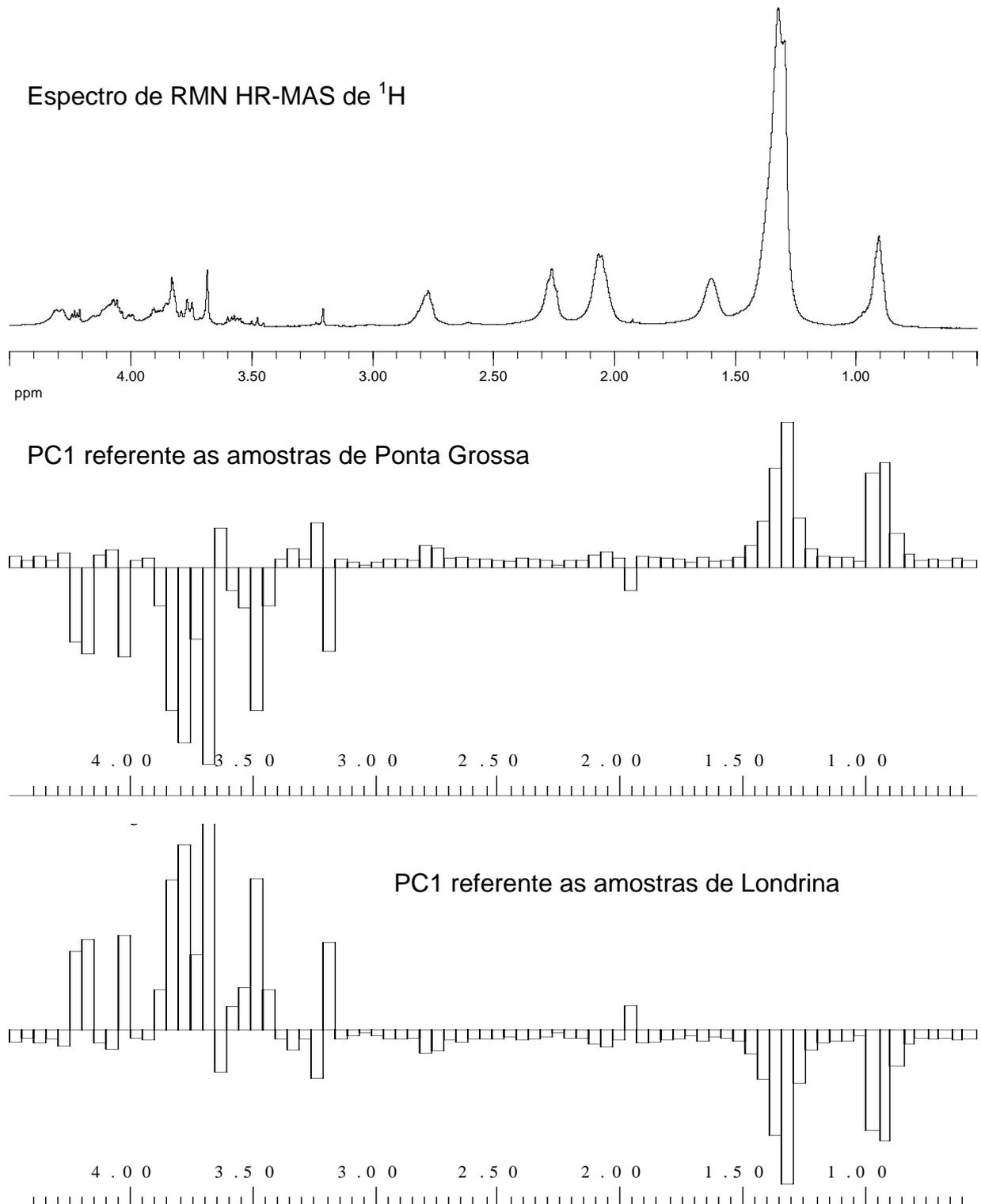


FIGURA 4.107 – Comparação dos gráficos de influências obtidos nas discriminações entre região para a cultivar BRS 230.

A análise quimiométrica dos espectros de RMN do terceiro conjunto de amostras referentes a cultivar BRS 247 também permitiu distinguir as amostras de acordo com a região produtora (Figura 4.108). Já os gráficos de influências não seguiram o padrão observado para as outras duas cultivares (Figura 4.109). Neste caso, a cultivar produziu a mesma quantidade de triacilgliceróis em ambas as regiões (Figura 4.109). A maior influência discriminatória foi referente aos sinais de aminoácidos e/ou glicosídeos (Figura 4.109). Além do que a separação para esta ocorreu apenas em PC3 (Figura 4.108), enquanto que nas outras a separação foi observada em PC1. Porém esta cultivar é referente ao espécimen GM, enquanto que, as outras eram compostas de espécimens CV. Demonstra-se assim que o espécimen GM pode apresentar um comportamento diferenciado.

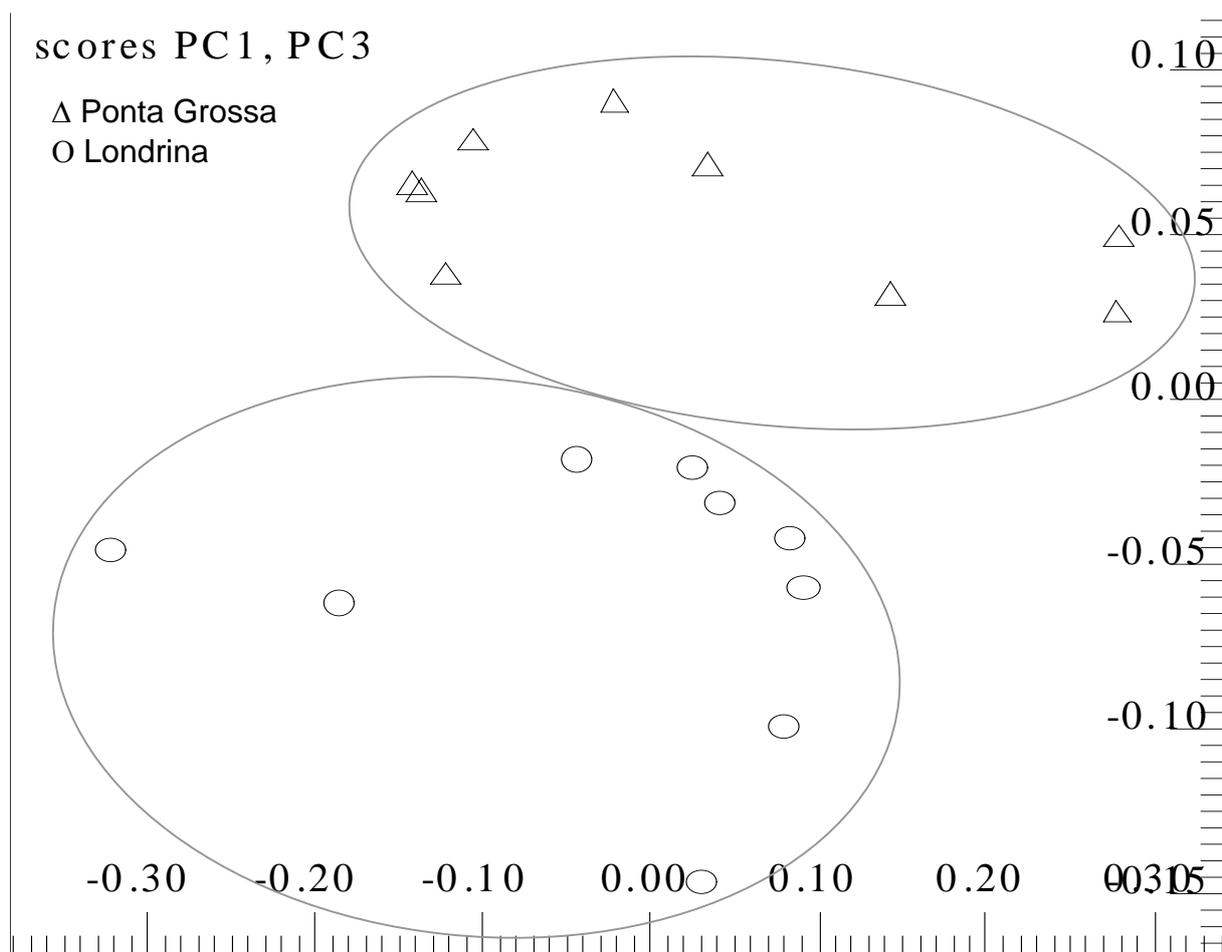


FIGURA 4.108 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  das amostras da cultivar BRS 247, mostrando a discriminação por região produtora. As percentagens de informações obtidas foram de 50,2% em PC1, de 9,5% em PC3 e um total de 91,3%.

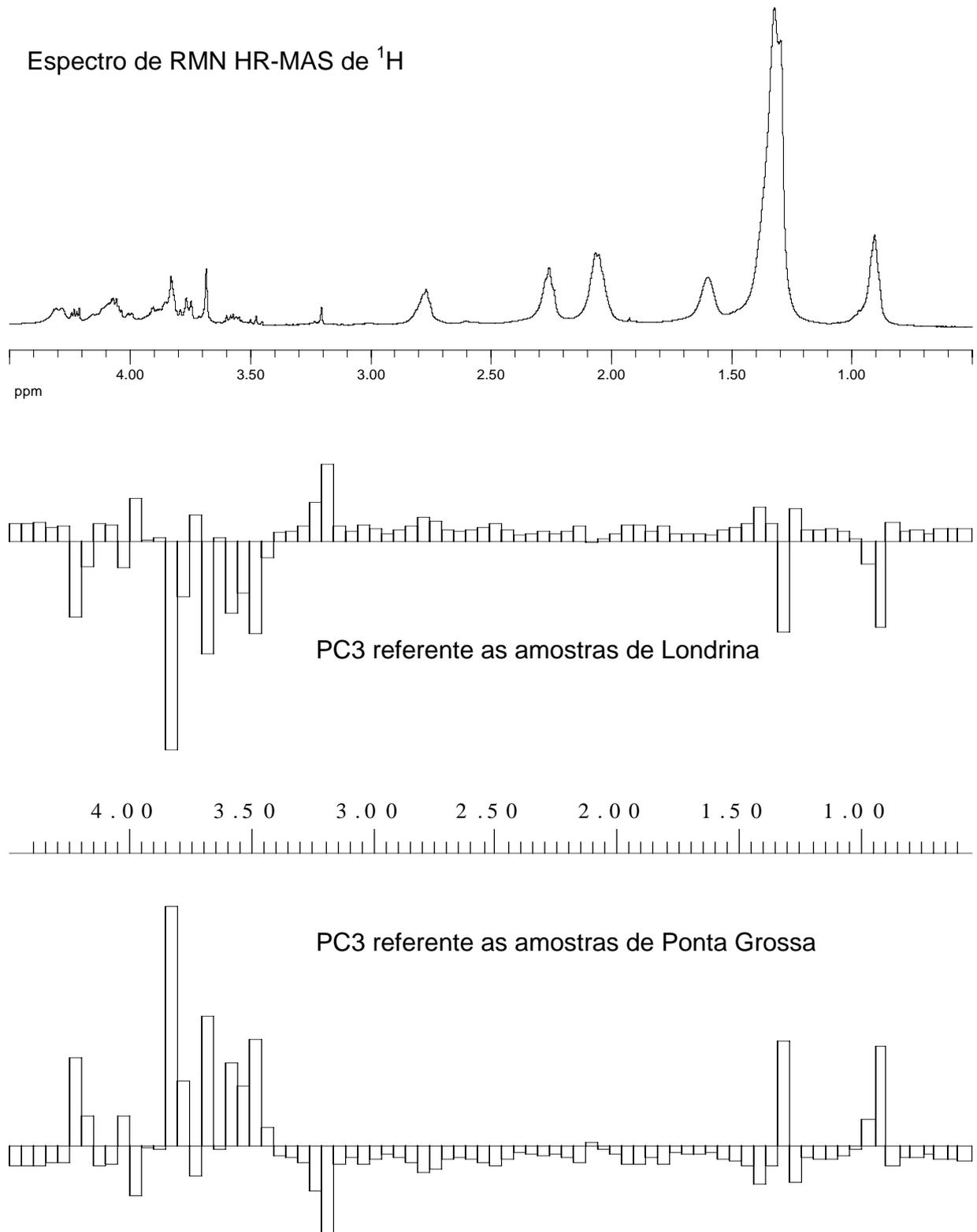


FIGURA 4.109 – Comparação dos gráficos de influências obtidos nas discriminações entre região para a cultivar BRS 247 GM.

#### 4.13.2.2 – Discriminação por região e cultivar

Uma vez que as amostras diferiram por região pelas mesmas características, avaliou-se conjuntamente as amostras produzidas em Londrina e aquelas em Ponta Grossa. Para isso, os espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  referente às duas cultivares CV de ambas as regiões foram utilizados na investigação. A análise quimiométrica deste conjunto de dados discriminou em PC1 as amostras de acordo com a região, independente da cultivar (Figura 4.110). Além da discriminação por região as amostras também foram discriminadas, agora em PC2, de acordo com a cultivar (Figura 4.110). Demonstrasse assim, que mesmas cultivares apresentam maiores diferenças quando cultivadas em locais diferentes, do que cultivares diferentes de uma mesma região.

Estes resultados indicam que a técnica de RMN HR-MAS tem grande potencial para ser aplicada em problemas, por exemplo na determinação da autenticidade de produtos agrícolas, como já vem sendo empregada a RMN tradicional. A vantagem da RMN HR-MAS é a possibilidade de obter todas as informações necessárias que permitam caracterizar um produto em um único espectro de hidrogênio adquirido de forma simples, rápida e diretamente do material vegetal, sem a necessidade de laboriosos processos de laboratório, consumidores de tempo e reagentes, e que ainda podem provocar alterações na composição original da amostra.

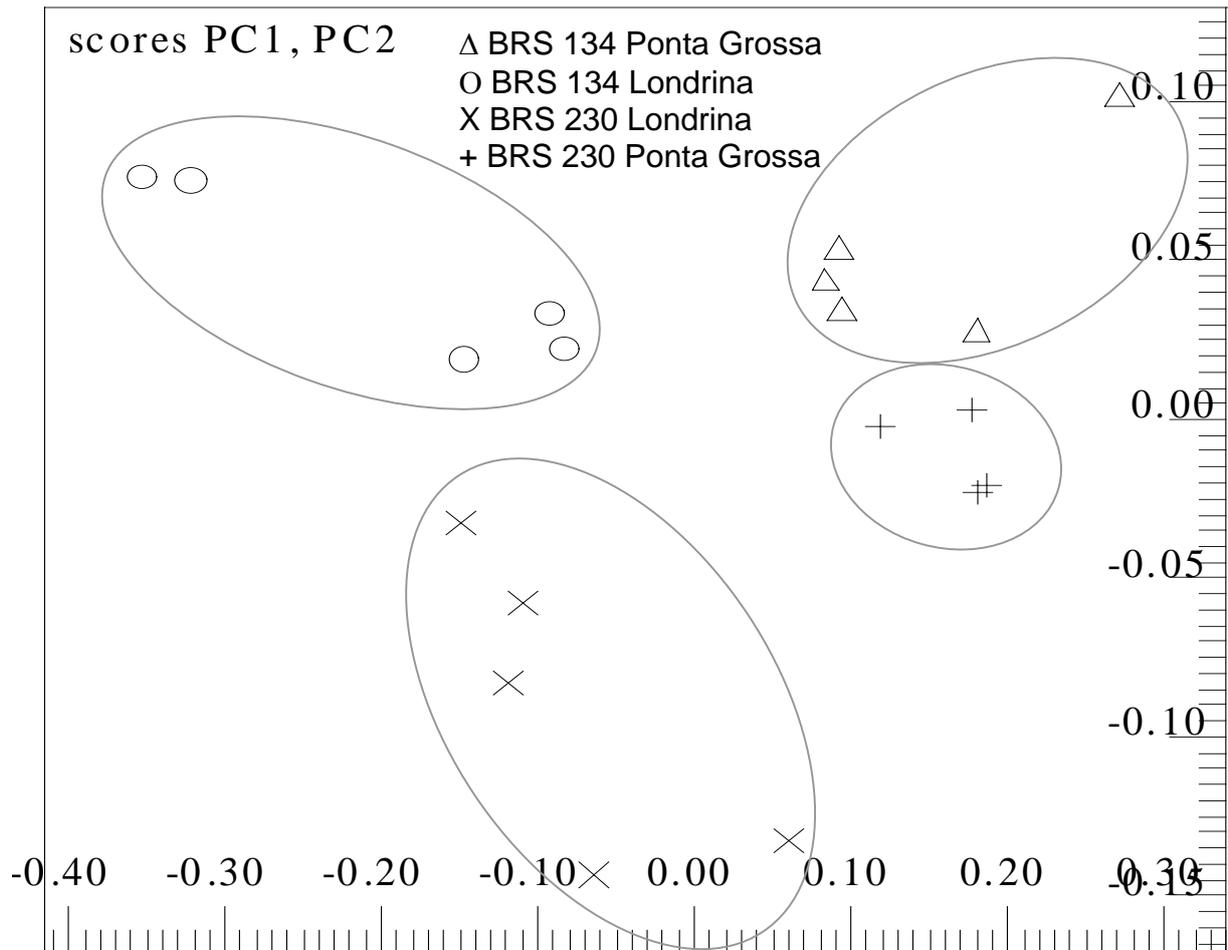


FIGURA 4.110 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  das amostras de soja, mostrando a discriminação por região produtora e por cultivar. As percentagens de informações obtidas foram de 72,7% em PC1, de 10,5% em PC2 e um total de 93,6%.

Removendo-se algumas amostras, consideradas anômalas por estarem distantes do centro do grupo, a discriminação foi melhor resolvida, podendo-se verificar claramente a distinção entre as amostras de Londrina e de Ponta Grossa em PC1 e a discriminação entre cultivares BRS 134 e BRS 230 em PC2 (Figura 4.11). Confirmando desta forma, como já era esperado, que as variáveis ambientais são responsáveis por maiores alterações na composição da planta, sendo até mais importante que a variação por cultivar. As influências para este novo gráfico de escores também indica que as amostras de Londrina possuem um maior teor de lipídeos (Figura 4.112).

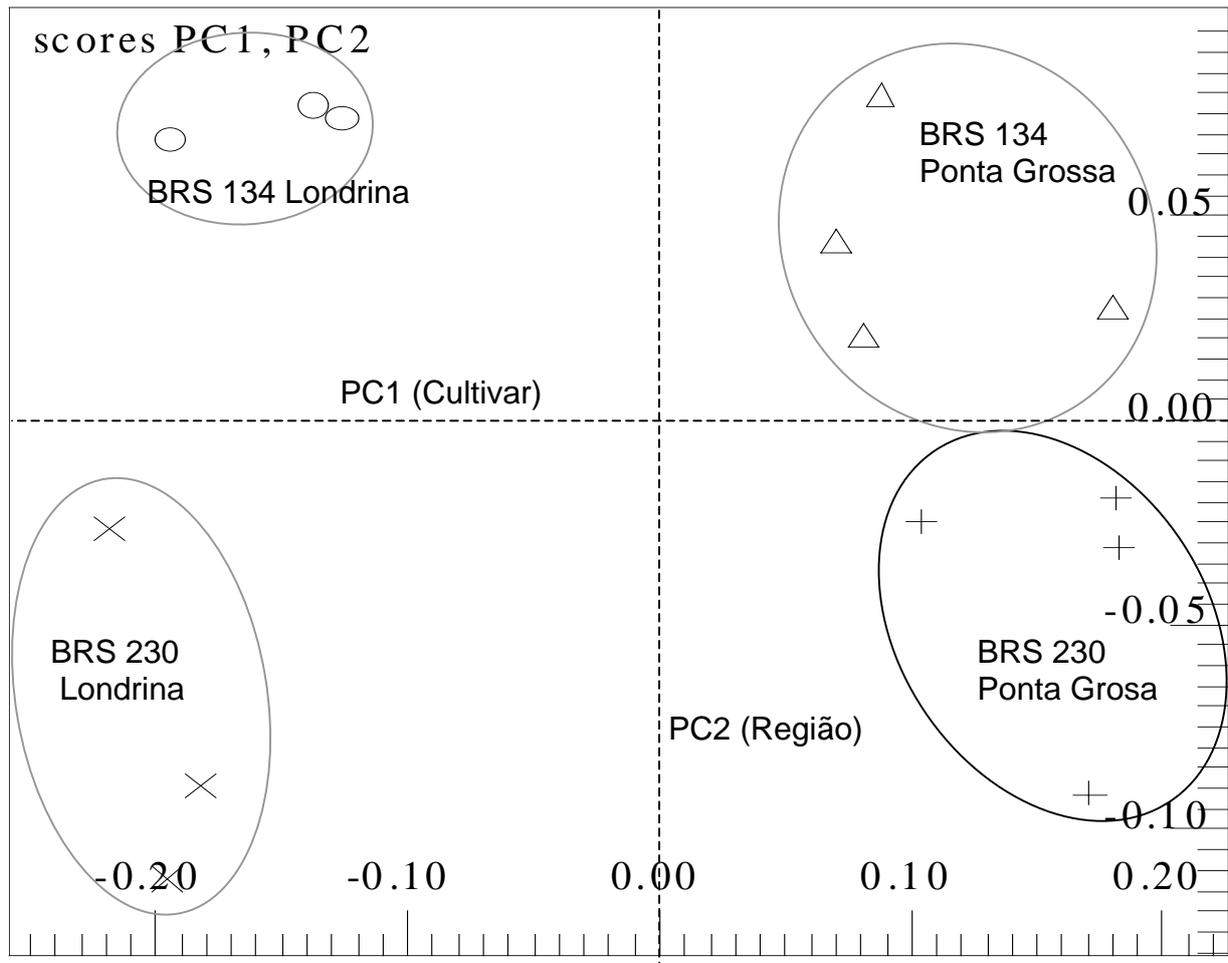


FIGURA 4.111 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  das amostras de soja, removendo-se as amostras anômalas, mostrando a discriminação por região produtora e por cultivar. As percentagens de informações obtidas foram de 74,3% em PC1, de 12,2% em PC2 e um total de 93,9%.

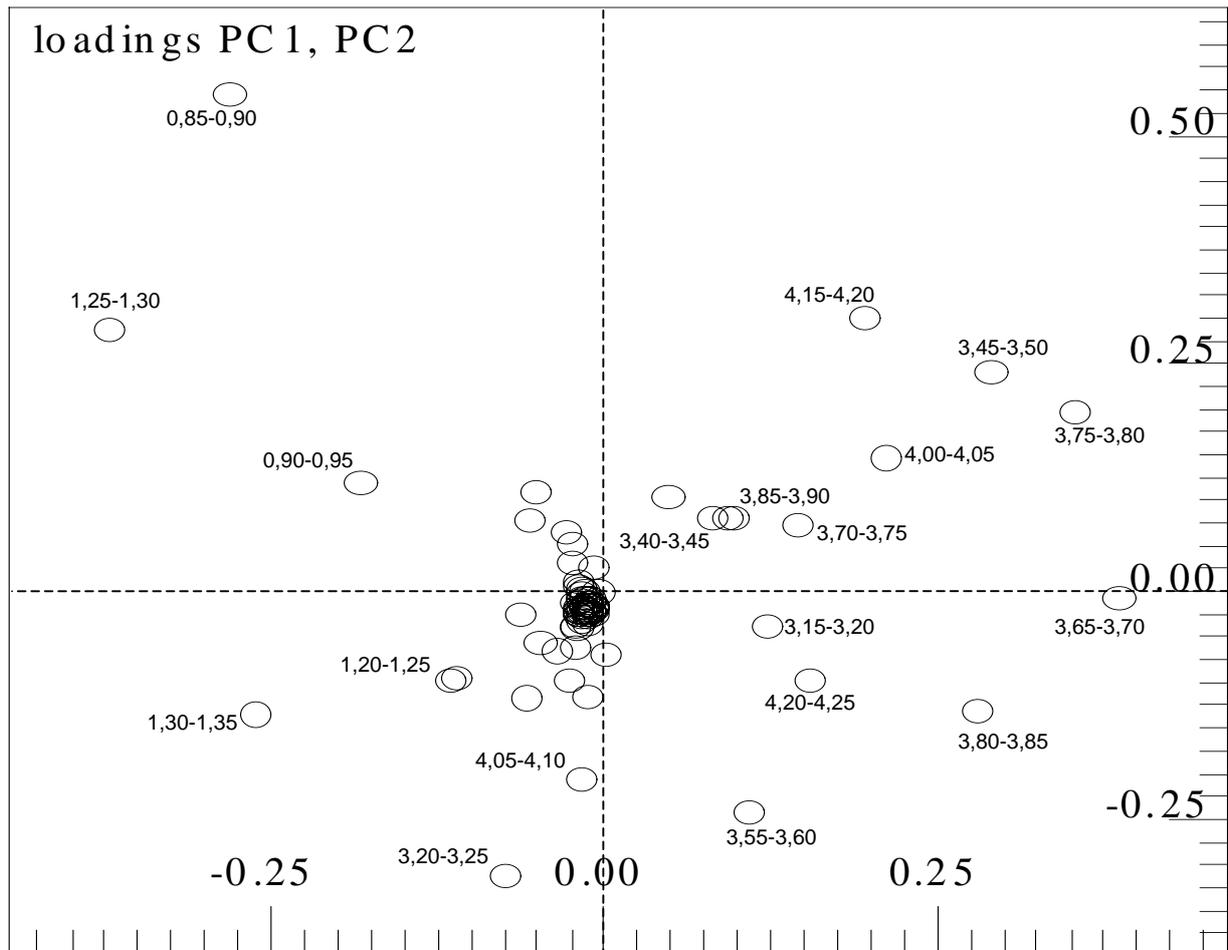


FIGURA 4.112 – Gráfico de influências referente ao gráfico de escores de PC1 x PC2 da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  de amostras de soja de diferentes cultivares e regiões produtoras, com remoção dos *outliers*, mostrando as variáveis que mais contribuíram para a discriminação.

O método exploratório por agrupamento hierárquicos também tem sido amplamente utilizado neste trabalho, apresentando resultados muito semelhantes aos obtidos por PCA. No entanto, o emprego de HCA na discriminação de amostras de diferentes cultivares e regiões, somente discriminou as amostras de acordo a região (Figura 4.113). Este resultado é compreendido uma vez que as amostras apresentam maiores diferenças quando produzidas em regiões diferentes, ainda mais no caso das regiões de Londrina e Ponta Grossa, que apresentam condições climáticas bastante diferentes.

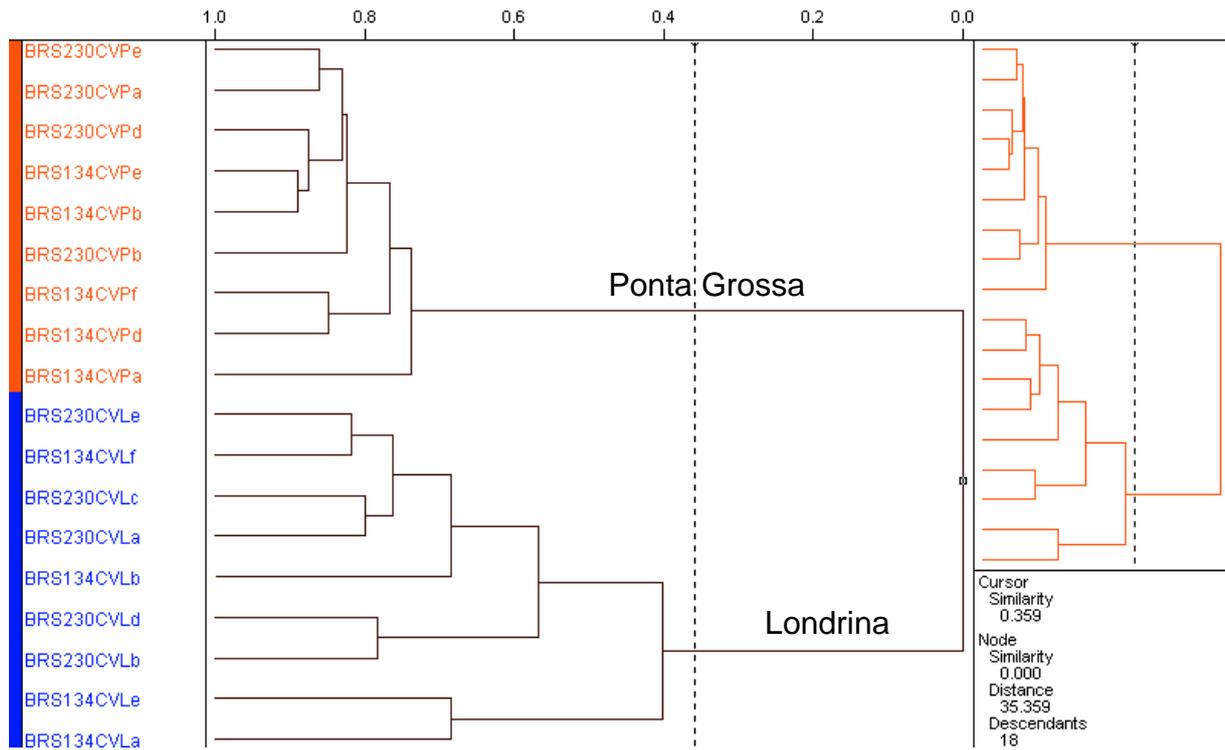


FIGURA 4.113 – Dendrograma referente a análise por HCA de espectros de RMN HR-MAS de <sup>1</sup>H das amostras de soja das cultivares BRS 134 e BRS 230, mostrando a discriminação por região produtora, a um nível de similaridade de 0,359.

Quando cultivares CV e GM (BRS 134 e BRS 247 GM) foram empregadas, não foi possível discriminar as amostras, seja de acordo com a cultivar ou região (Figura 4.114). Esta evidência se deve ao fato de se ter introduzido uma terceira variável que é a origem genética das amostras.

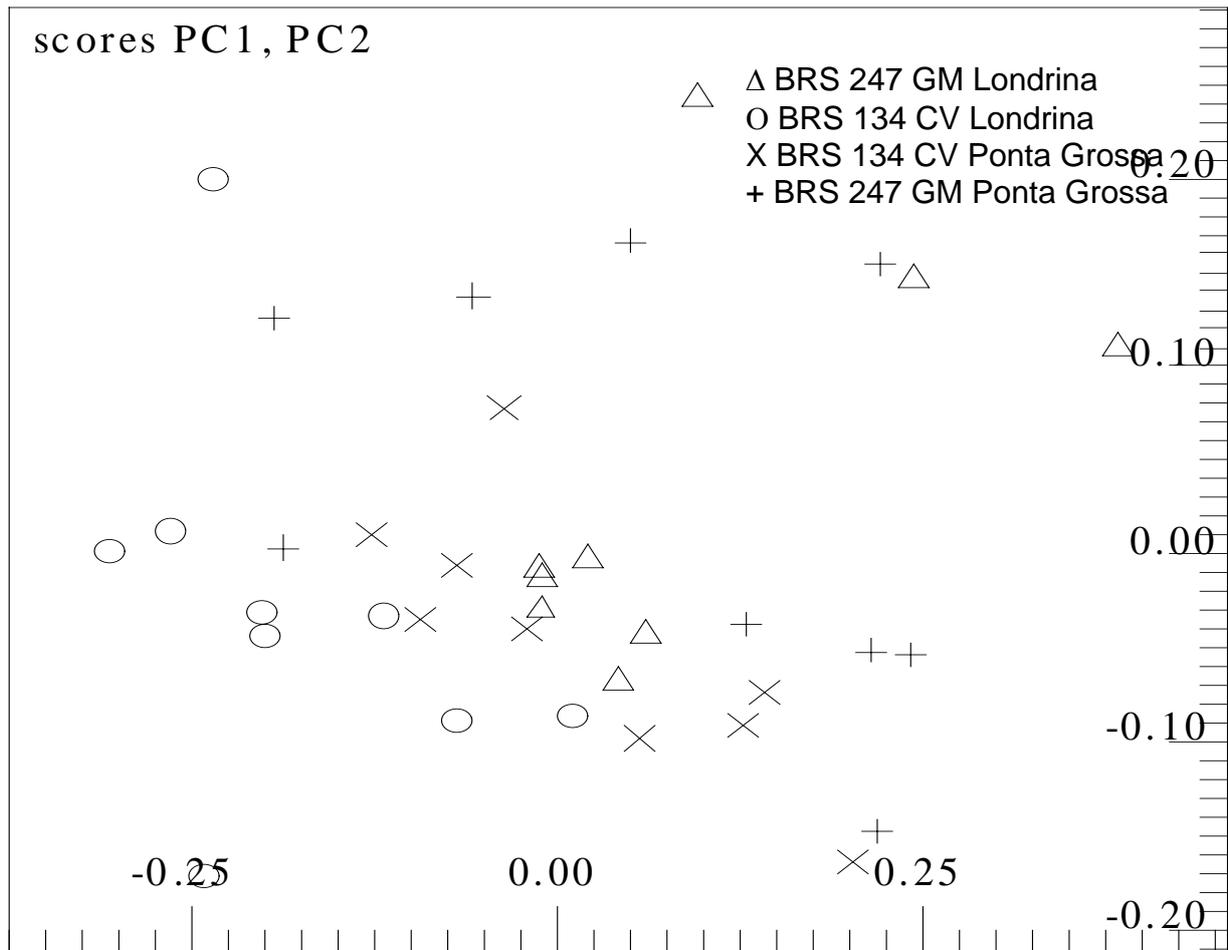


FIGURA 4.114 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  das amostras de soja, mostrando a discriminação por região produtora e por cultivar para amostras das cultivares BRS 134 CV e BRS 247 GM. As percentagens de informações obtidas foram de 53,8% em PC1, de 19,9% em PC2 e um total de 88,1%.

#### 4.13.2.3 – Discriminação por cultivar

O mesmo conjunto de dados utilizado nos itens anteriores referente às amostras CV foi reexaminado considerando-se apenas a variável cultivar. A análise multivariada dos espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  obtidos para as amostras de Londrina discriminou estas de acordo com a cultivar (Figura 4.115). Da mesma forma as amostras de Ponta grossa também foram discriminadas de acordo com a cultivar (Figura 4.116). Como no item anterior, as amostras foram discriminadas em PC1, mantendo-se a localização das amostras da cultivar BRS 134, sempre à esquerda em ambas as análises. Mostrando que a diferença entre as cultivares é a mesma, sejam estas cultivadas em Ponta Grossa ou Londrina, como mostra os

gráficos de influências (Figura 4.117) confirmando o que já havia sido inferido anteriormente. Além disso, claramente se observa que as sementes de soja da cultivar BRS 134 é possuem maiores quantidades de ésteres graxos insaturados, independente da região onde foram produzidas. Isso é demonstrado pelos valores positivos em PC1 do *buckets* em  $\delta$  ~2,75 e ~2,03 ppm, além dos em  $\delta$  ~1,30 e ~0,90 para ambas as discriminações (Figura 4.117).

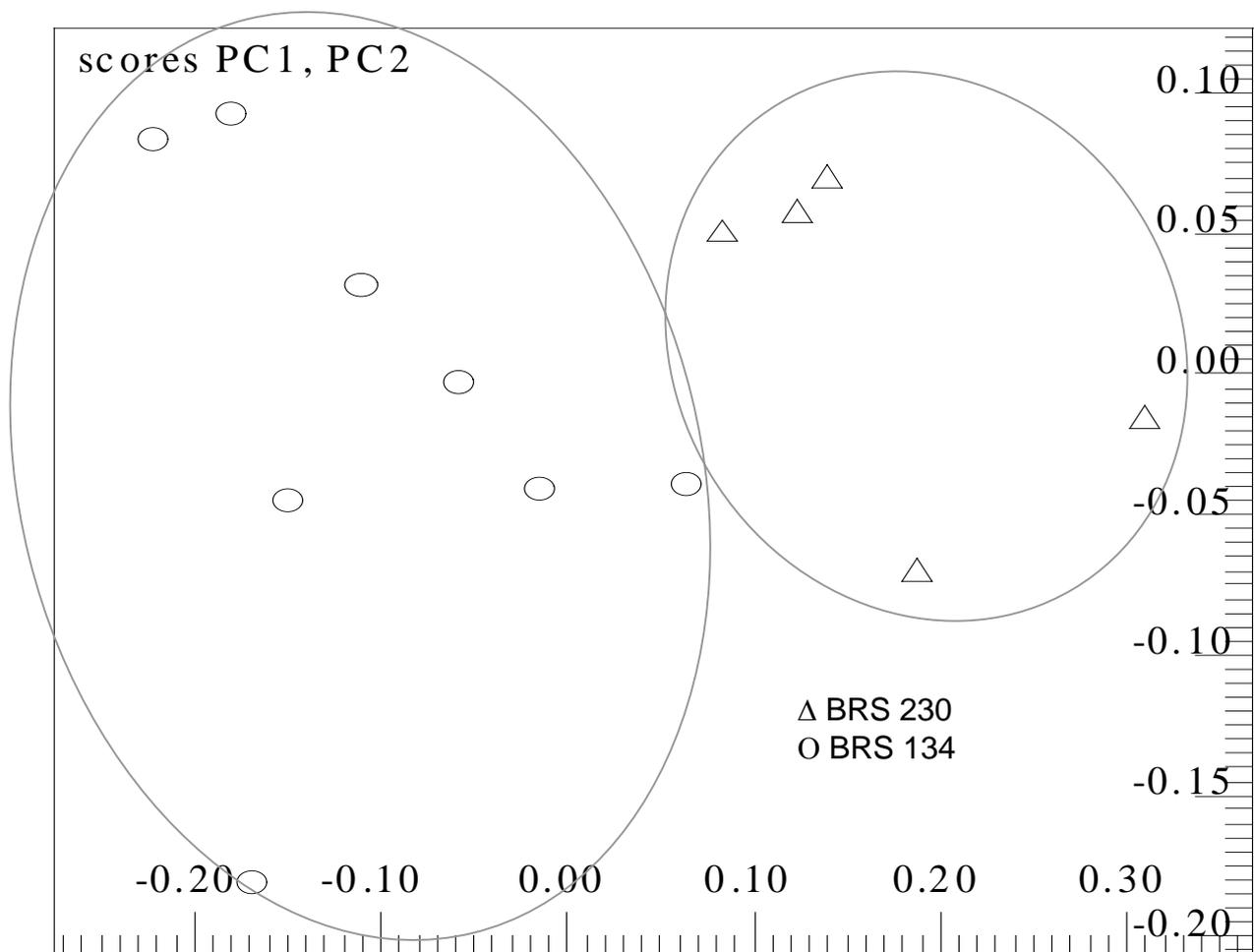


FIGURA 4.115 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  das amostras de campo de Londrina, mostrando a discriminação por cultivar. As porcentagens de informações obtidas foram de 66,2% em PC1, de 14,3% em PC2 e um total de 93,3%.

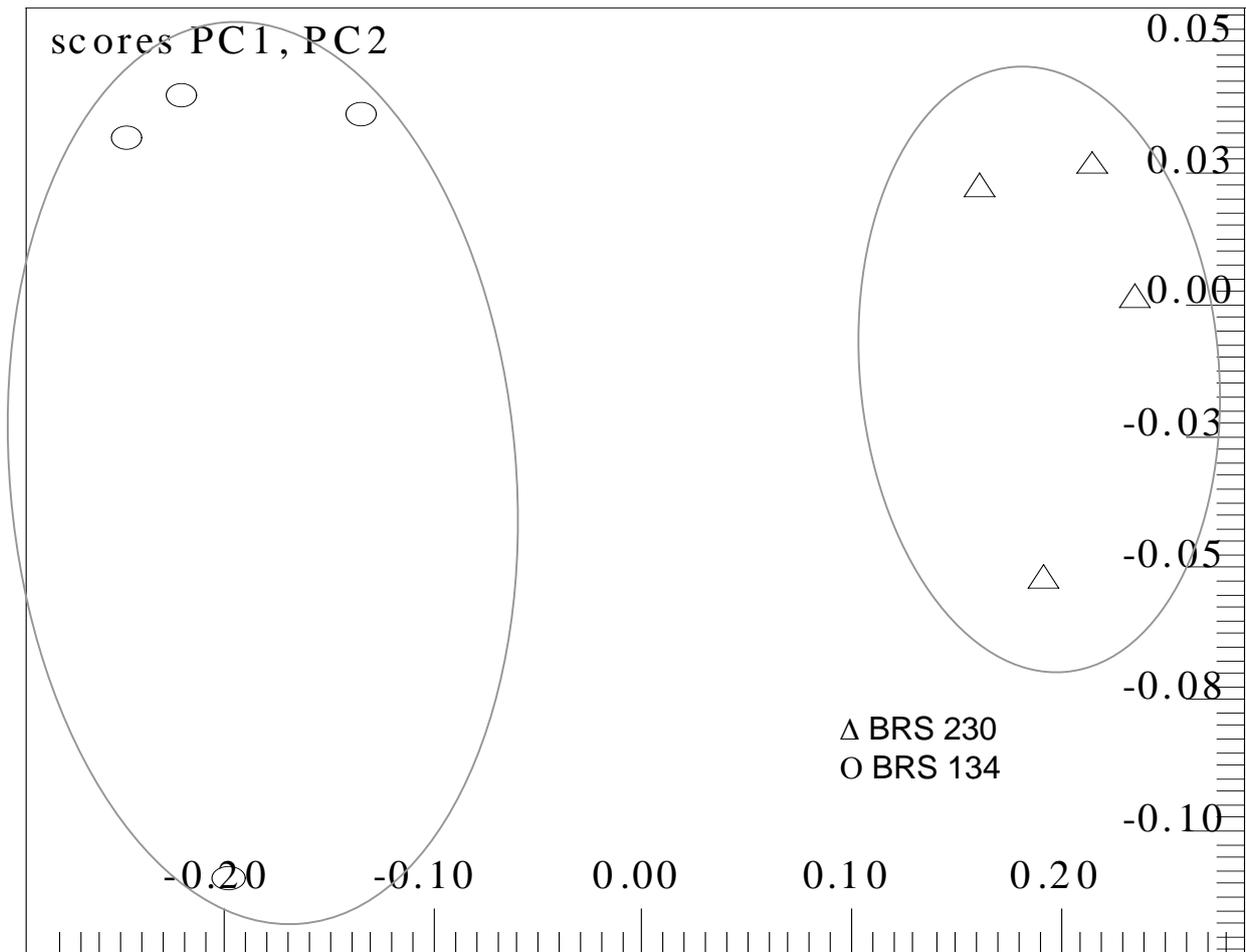


FIGURA 4.116 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  das amostras de campo de Ponta Grossa, mostrando a discriminação por cultivar. As percentagens de informações obtidas foram de 87,7% em PC1, de 5,2% em PC2 e um total de 98,1%.

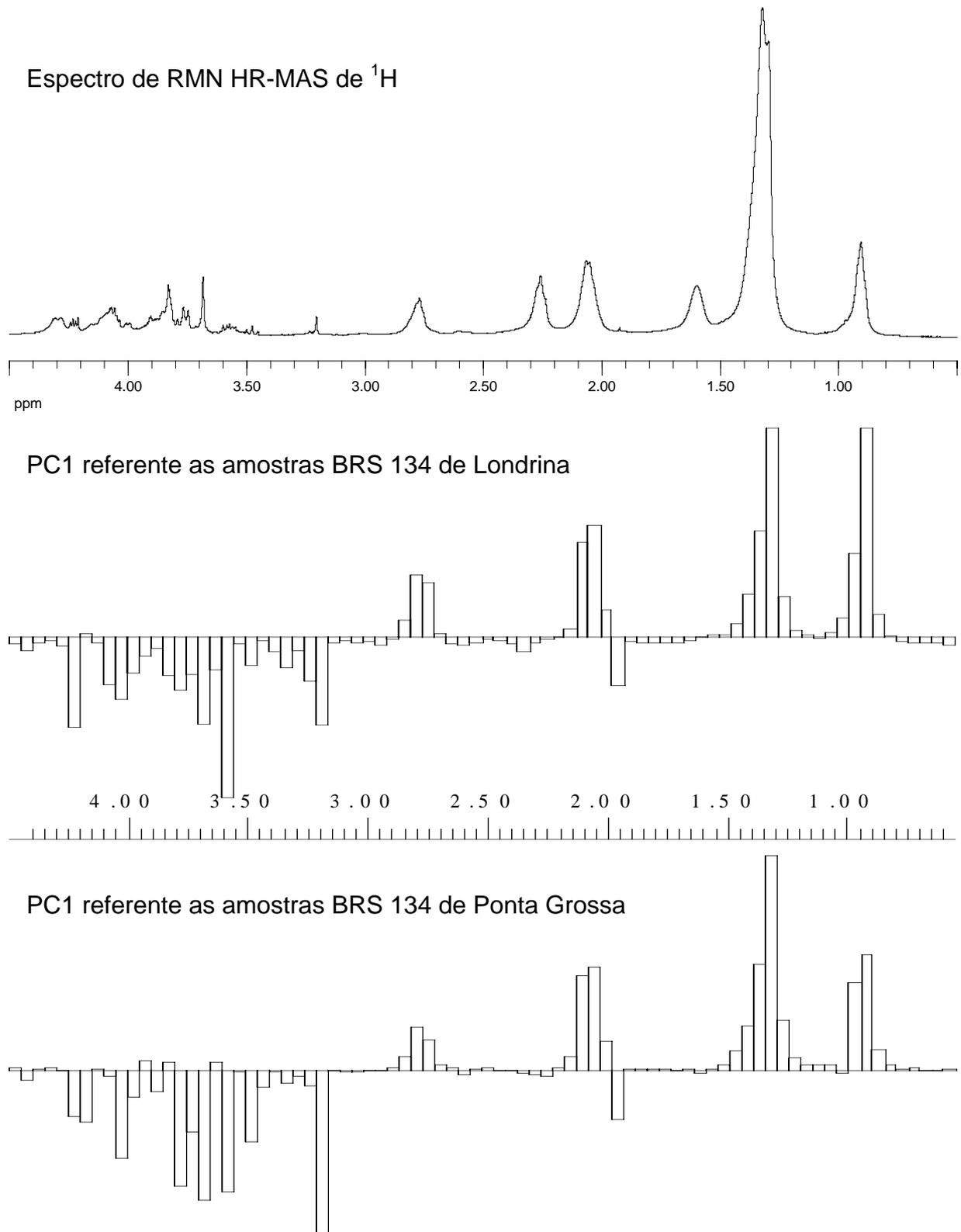


FIGURA 4.117 – Comparação dos gráficos de influências obtidos nas discriminações entre cultivares de Londrina e entre cultivares de Ponta Grossa.

#### 4.13.2.4 – Discriminação por cultivar através de folhas de plântulas de soja

Para realizar as análises multivariadas de espectros de RMN HR-MAS de amostras de folhas de soja, sementes de soja referentes a duas cultivares provenientes de ambas regiões de Ponta Grossa e Londrina foram plantadas em sistema semelhante ao utilizado para obtenção de mudas (Barison, 2000). Após quinze dias de crescimento, quando as plântulas apresentavam de três a quatro folhas, estas foram coletadas e submetidas a aquisição dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  diretamente das próprias folhas pela técnica de RMN HR-MAS. Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  resultantes foram então submetidos a análise quimiométrica, utilizando-se todo o espectro ( $\delta$  9,5 a 0,5 ppm) nas análises quimiométricas, com exceção do sinal da água ( $\delta$  5,0 a 4,5 ppm).

A análise quimiométrica dos espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  das folhas de plântulas de soja, resultantes da germinação de sementes de soja provenientes da região de Londrina, possibilitou discriminar as amostras de acordo com a cultivar (Figura 4.118). A discriminação obtida com os espectros de folhas foi bem mais resolvida, que as respectivas discriminações com espectros de sementes, demonstrando uma alta variação da composição química entre plântulas de diferentes cultivares.

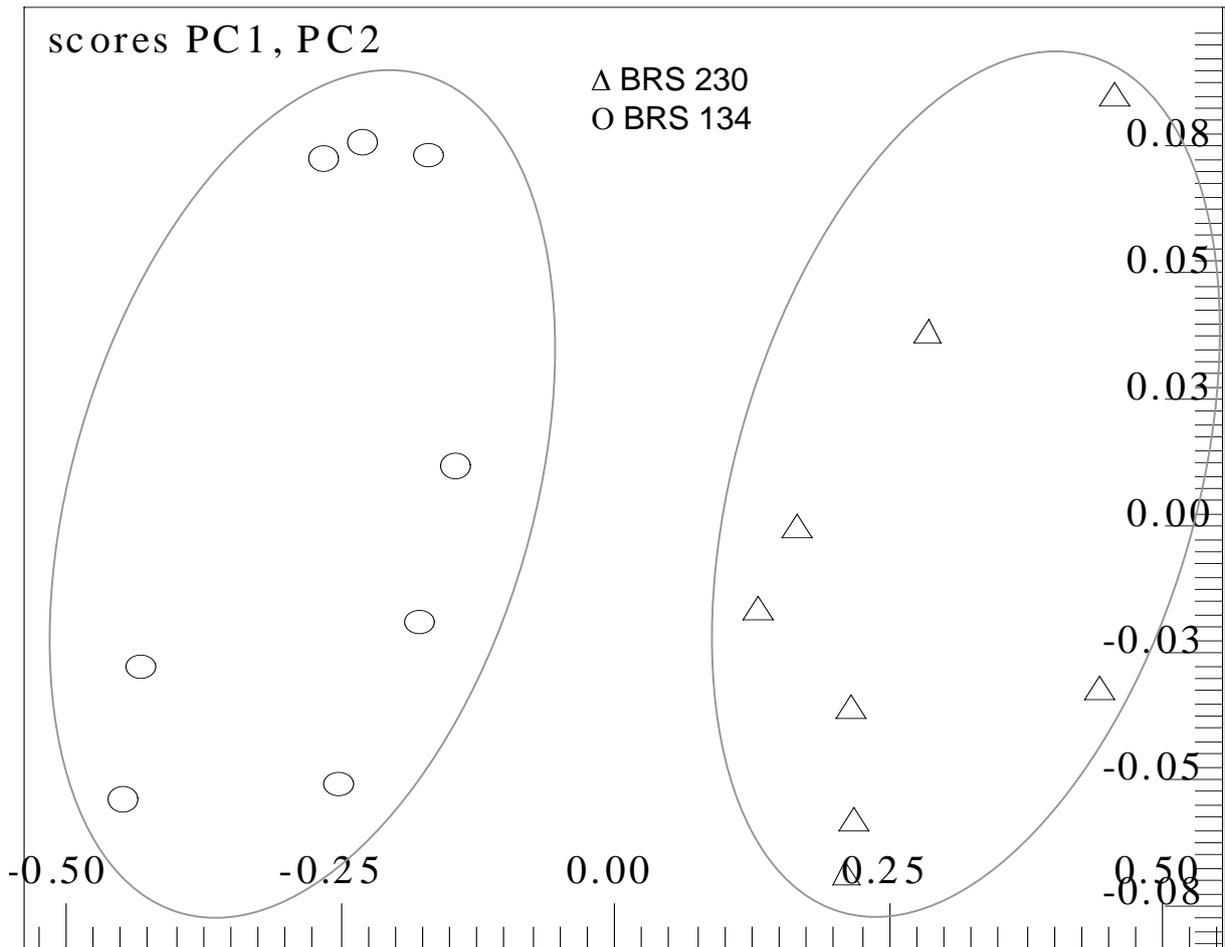


FIGURA 4.118 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  de folhas de plântulas de soja, obtidas pela germinação de sementes provenientes da região de Londrina/PR, mostrando a discriminação por cultivar. As percentagens de informações obtidas foram de 90,8% em PC1, de 2,6% em PC2 e um total de 96,4%.

A análise dos gráficos de influências referentes a discriminação por cultivar revelou que a discriminação foi fortemente influenciada pelos sinais em  $\delta$  4,02 e 3,61 ppm, pelo tripleto em  $\delta$  3,36 ppm e por sinais na região de  $\delta$  3,64 a 3,84 ppm. Em resumo, a discriminação foi influenciada por sinais de uma estreita faixa ( $\delta$  4,20 a 2,80 ppm) dos espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$ , apesar de haver sinais significativos em toda a extensão dos espectros (Figura 4.119). A cultivar BRS 230 apresentou maiores teores das substâncias representadas pelos sinais desta região, enquanto que, o oposto foi observado para a cultivar BRS 134 (Figura 4.119).

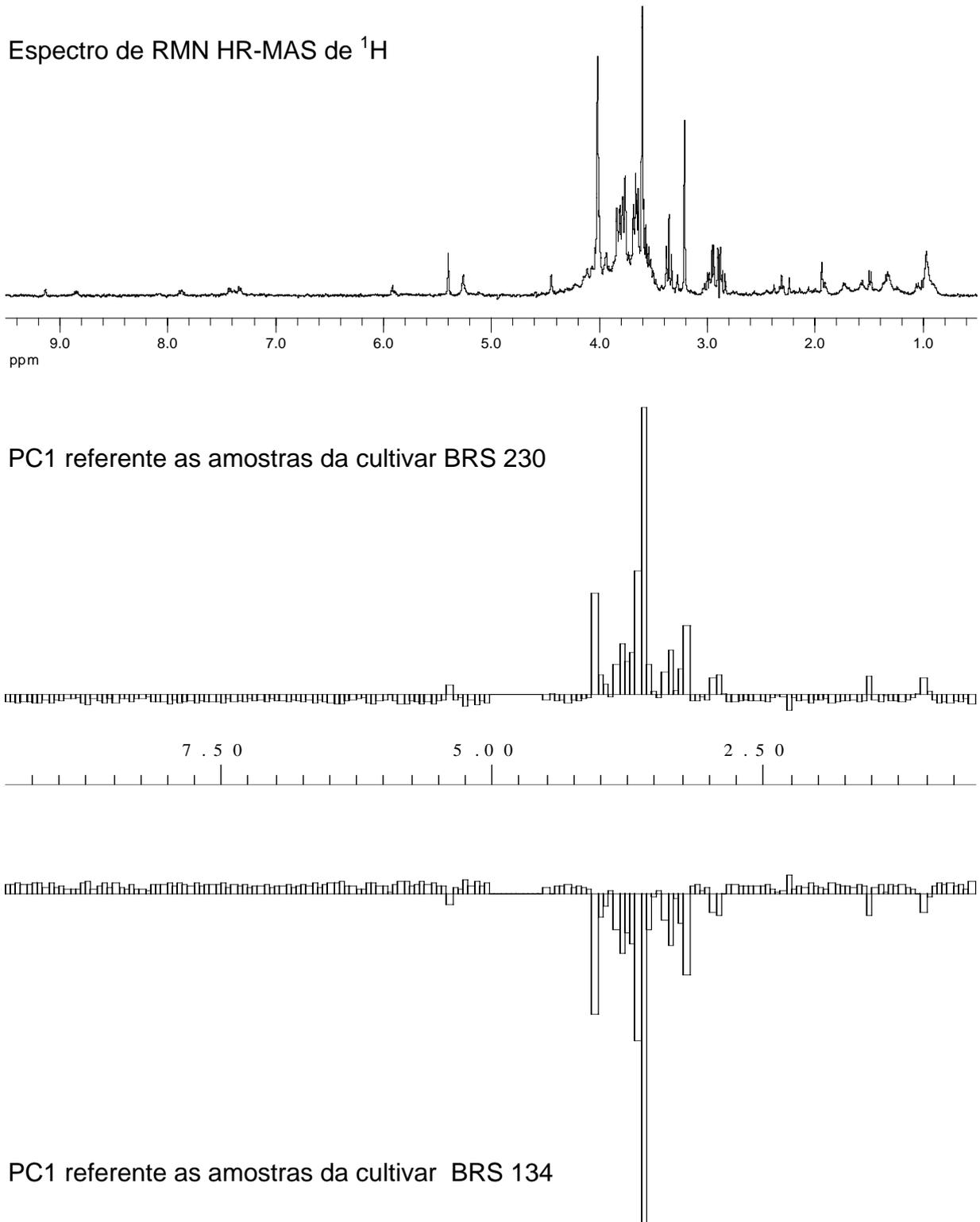


FIGURA 4.119 – Comparação dos gráficos de influências obtidos nas discriminações entre cultivares de Londrina, usando-se espectros de folhas, comprados com um espectro de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$ .

#### **4.13.2.5 – Discriminação por região através de folhas de plântulas de soja**

A análise quimiométrica também permitiu discriminar mais facilmente as amostras de soja de uma mesma cultivar, mas de diferentes origens geográficas, através de seus respectivos espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  das folhas (Figura 4.120). O fato interessante que deve ser destacado aqui é que somente as sementes de soja desta cultivar é que são realmente proveniente de diferentes regiões do país. As folhas por sua vez foram obtidas pela germinação destas sementes em idênticas condições ambientais. Este resultado demonstra que a soja preserva características do local de origem das sementes, o que pode ser muito interessante do ponto de vista agrônômico, como por exemplo, para a produção de sementes especiais que seriam utilizadas em futuros plantios e em regiões distintas. No entanto, este são apenas resultados preliminares, mas que merecem atenção.

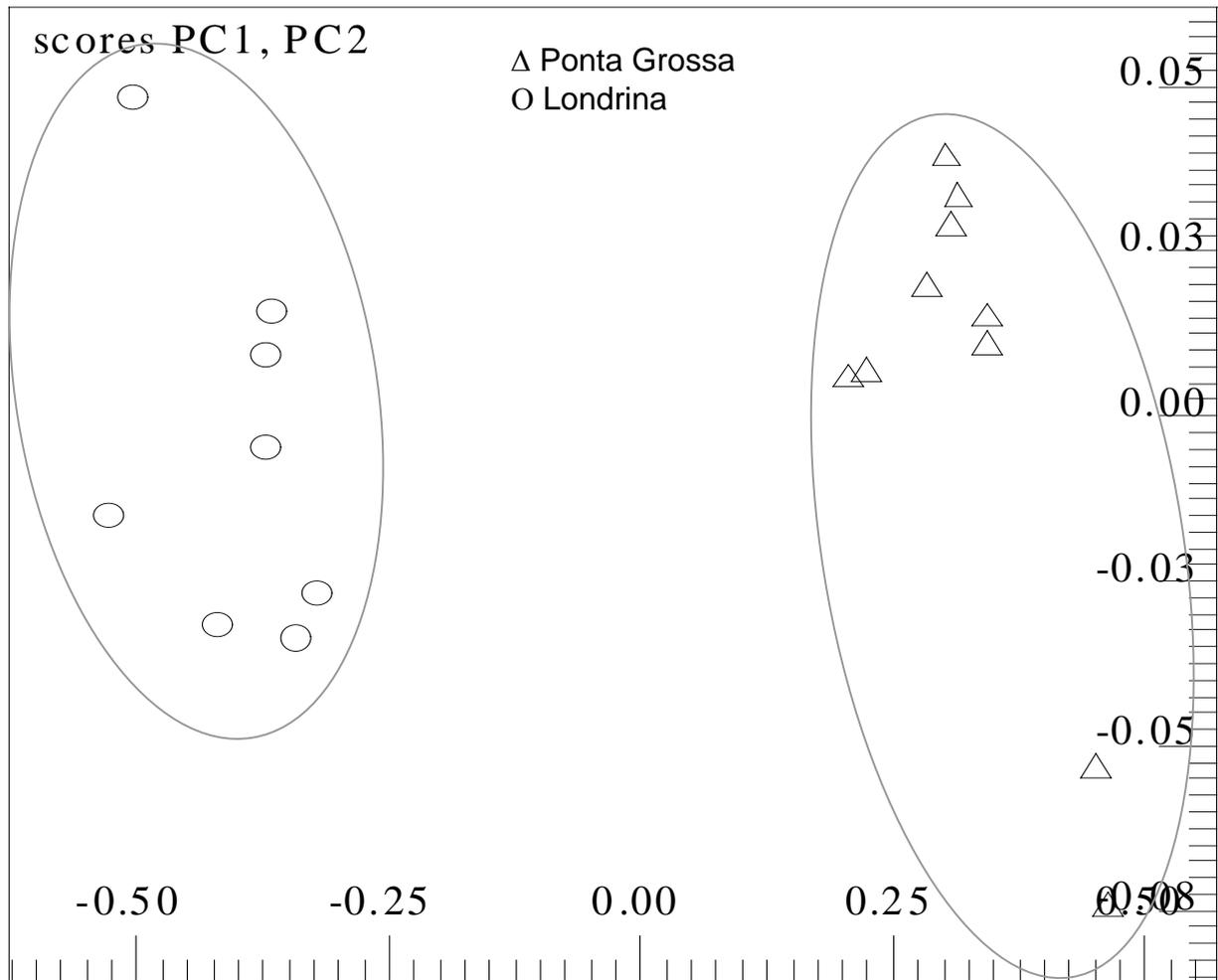
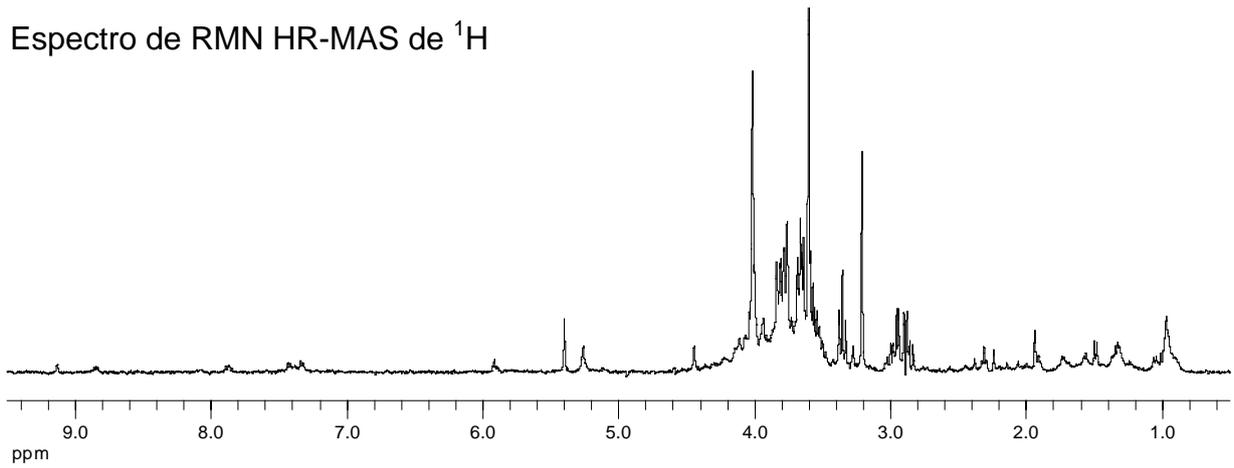


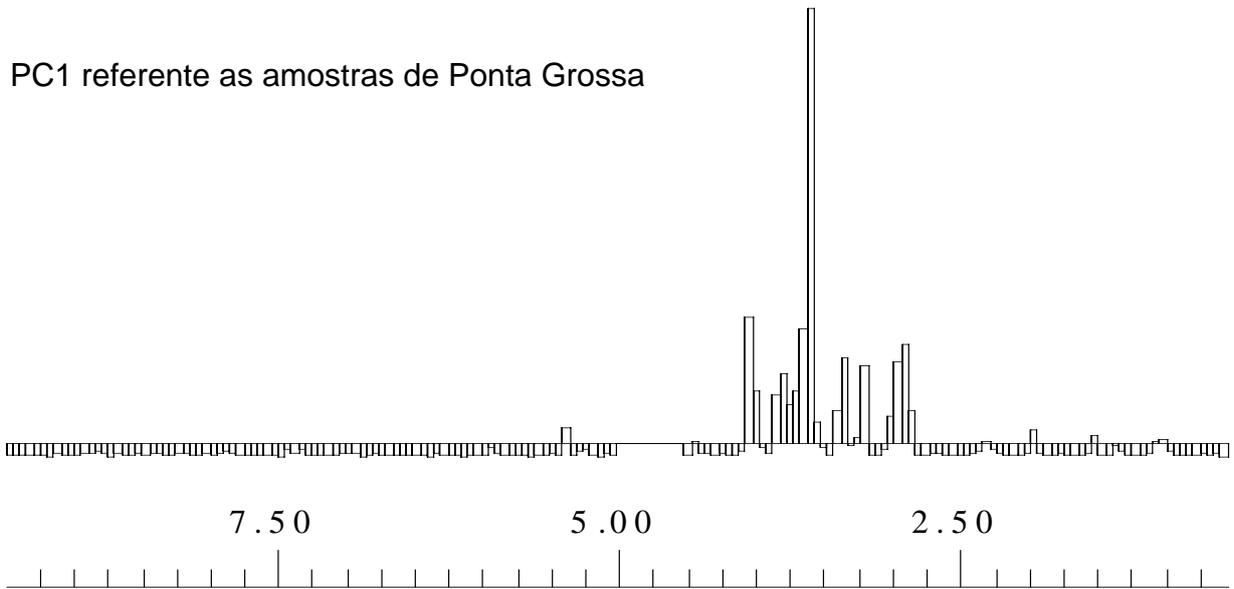
FIGURA 4.120 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  de folhas de plântulas de soja, mostrando a discriminação por região de origem das sementes para a cultivar BRS 230. As percentagens de informações obtidas foram de 97,7% em PC1, de 0,7% em PC2 e um total de 99,2%.

A análise dos gráficos de influências demonstrou que a mesma região dos espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  responsável pela discriminação das amostras de acordo com a cultivar, também é responsável pela discriminação entre região, havendo quase nenhuma influência dos sinais das demais regiões do espectro (Figura 4.121).

Espectro de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$



PC1 referente as amostras de Ponta Grossa



PC1 referente as amostras de Londrina

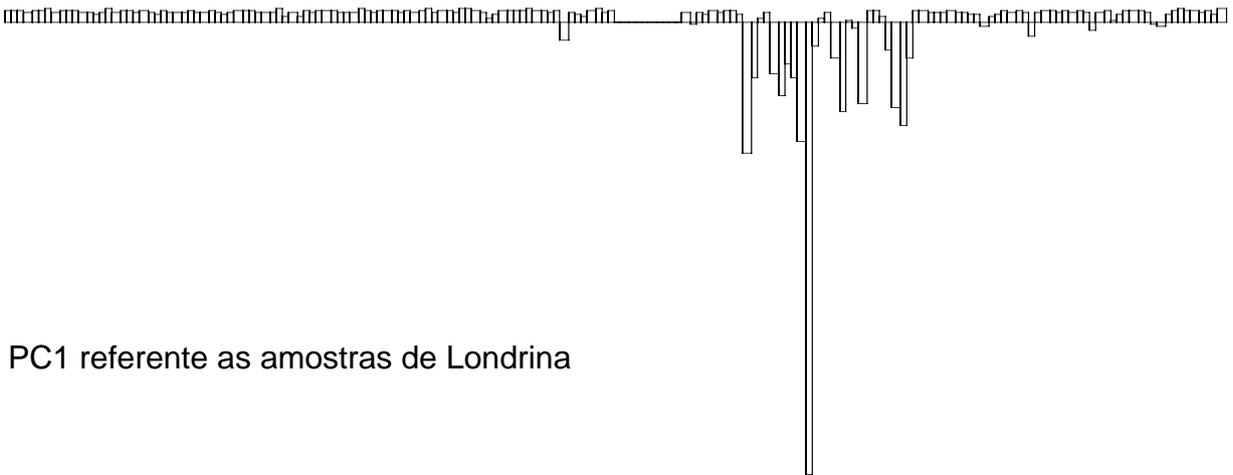


FIGURA 4.121 – Comparação dos gráficos de influências obtidos nas discriminações entre regiões, usando-se espectros de folhas.

#### **4.13.2.6 – Discriminação por região e cultivar através de folhas de plântulas de soja**

O mesmo conjunto de dados de espectros de RMN de folhas utilizados nos itens precedentes, em que as respectivas sementes utilizadas para obtenção das plântulas eram referentes a duas cultivares, sendo que uma delas de ambas as regiões e a outra somente da região de Londrina foi submetido a análise quimiométrica. A análise exploratória separou amostras de acordo com a região bem como de acordo com a cultivar (Figura 4.122). A discriminação por região foi obtida em PC1, enquanto que, a discriminação de acordo com a cultivar ocorreu em PC2. Resultado, portanto, idêntico a aquele obtido com as sementes de soja (Item 4.15.2.2).

De acordo com as observações anteriores, de que as amostras de sementes de soja diferem mais entre região do que entre cultivar, poderia se esperar que as amostras referentes a cultivar BRS 134 de Londrina ficassem alojadas mais próximas as amostras da cultivar BRS 230 também de Londrina, ou pelo menos que ficasse disposta entre as amostras da cultivar BRS 230 de Londrina e de Ponta Grossa. Este pressuposto é confirmado se considerarmos apenas a componente principal um (PC1) do gráfico de escores da figura 4.122. O gráfico de PC1 *versus* PC3 ilustra melhor ainda este resultado (Figura 4.123).

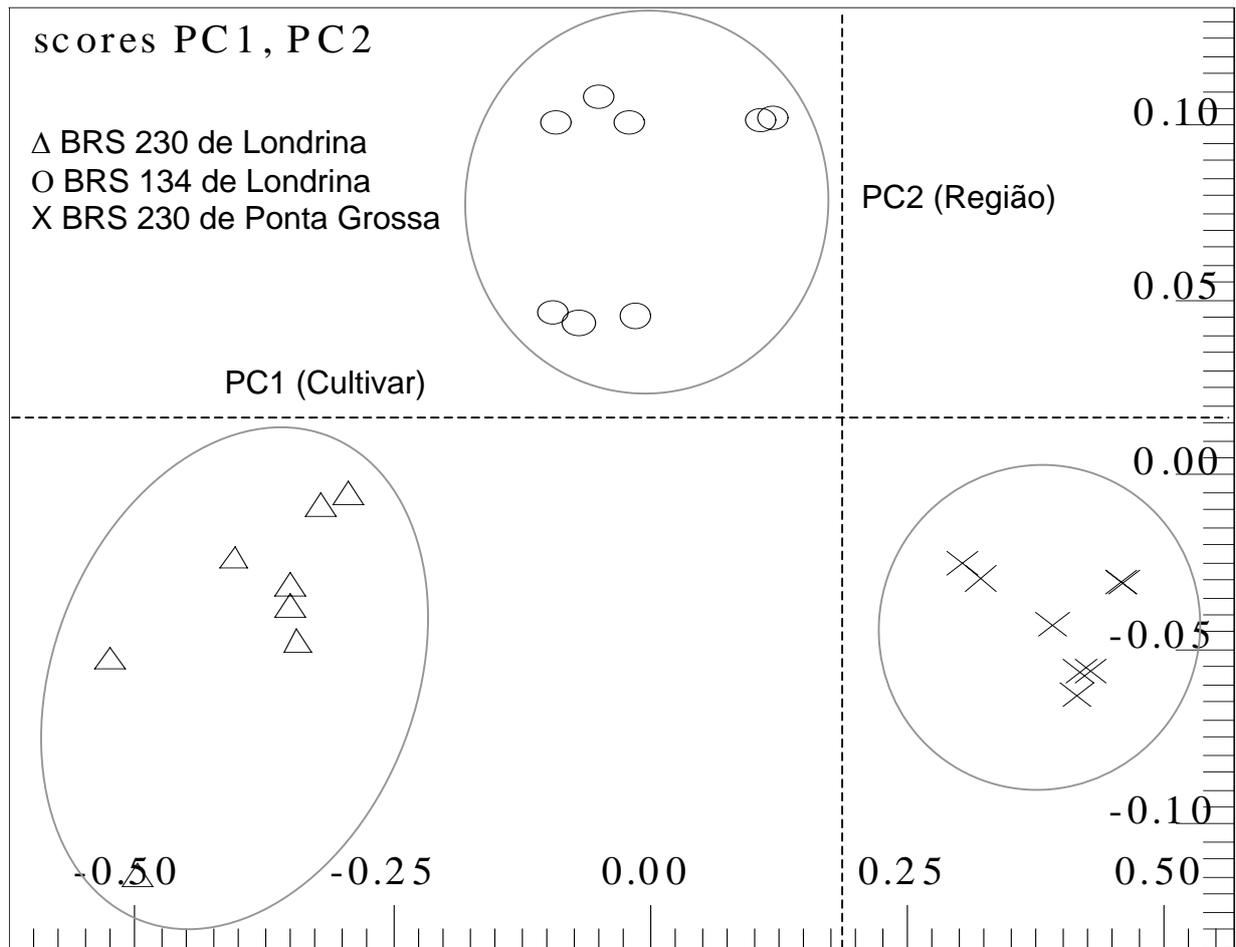


FIGURA 4.122 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  de folhas de plântulas de soja, mostrando a discriminação por cultivar e por região de origem das sementes. As percentagens de informações obtidas foram de 93,6% em PC1, de 3,5% em PC2 e um total de 98,3%.

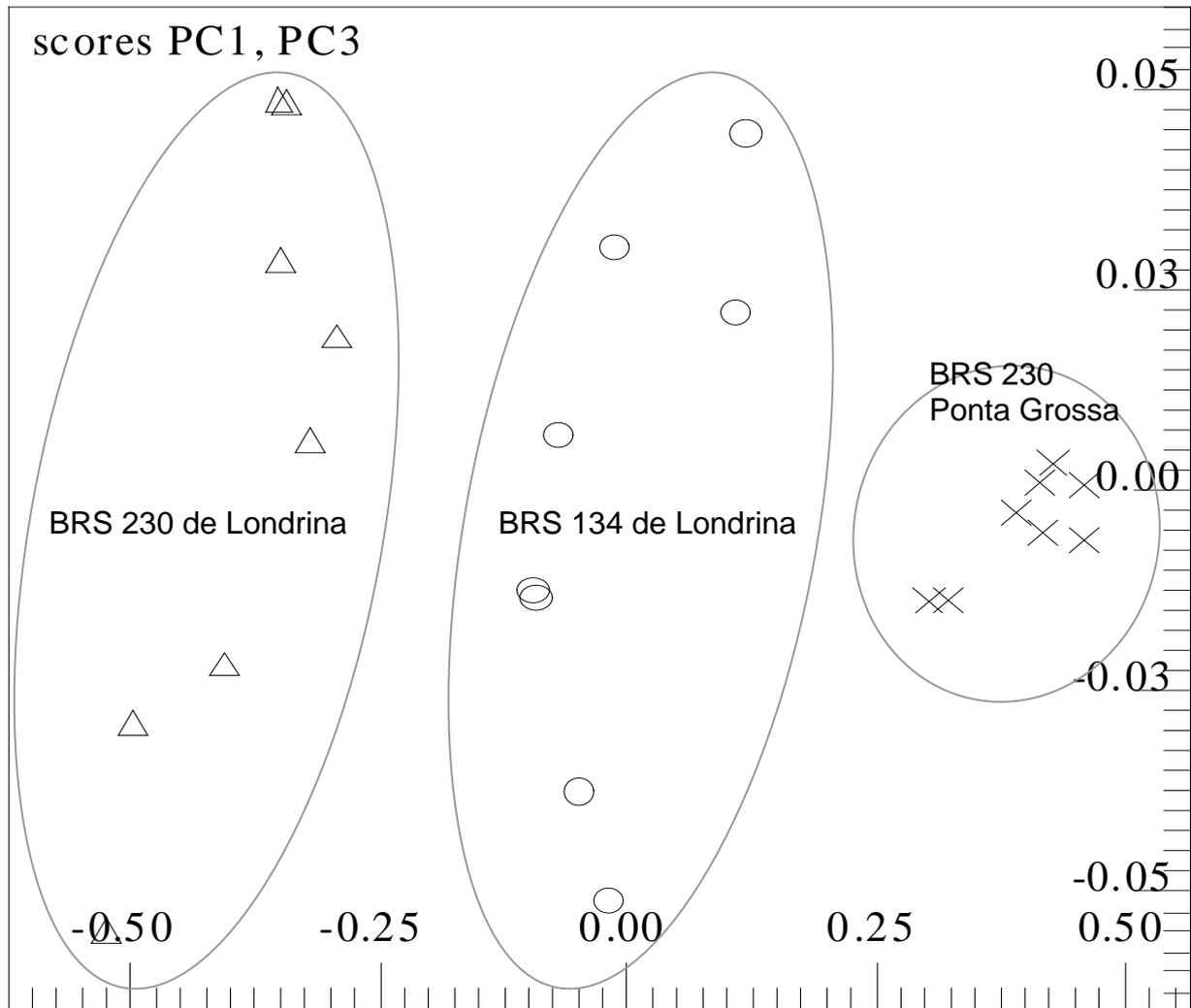
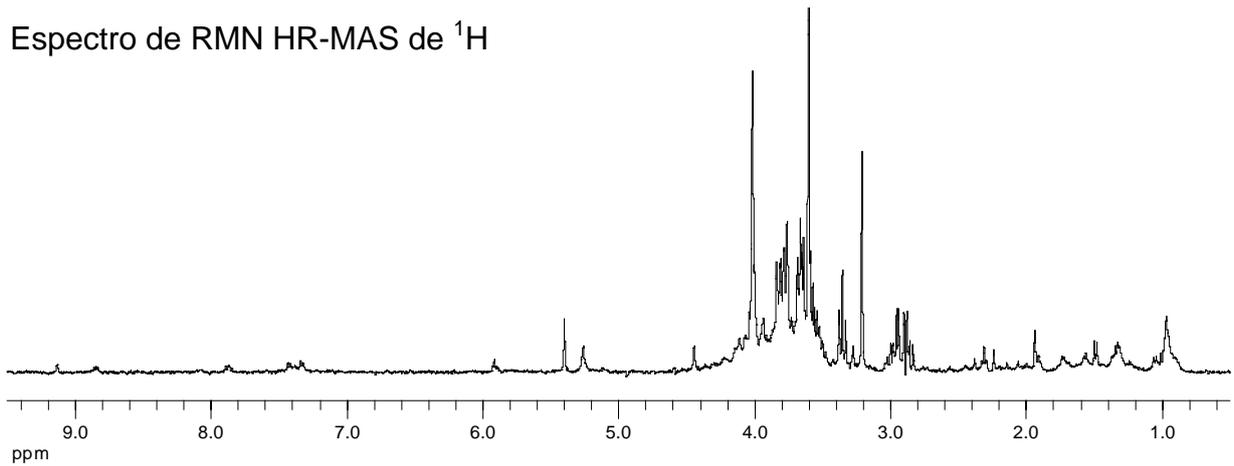


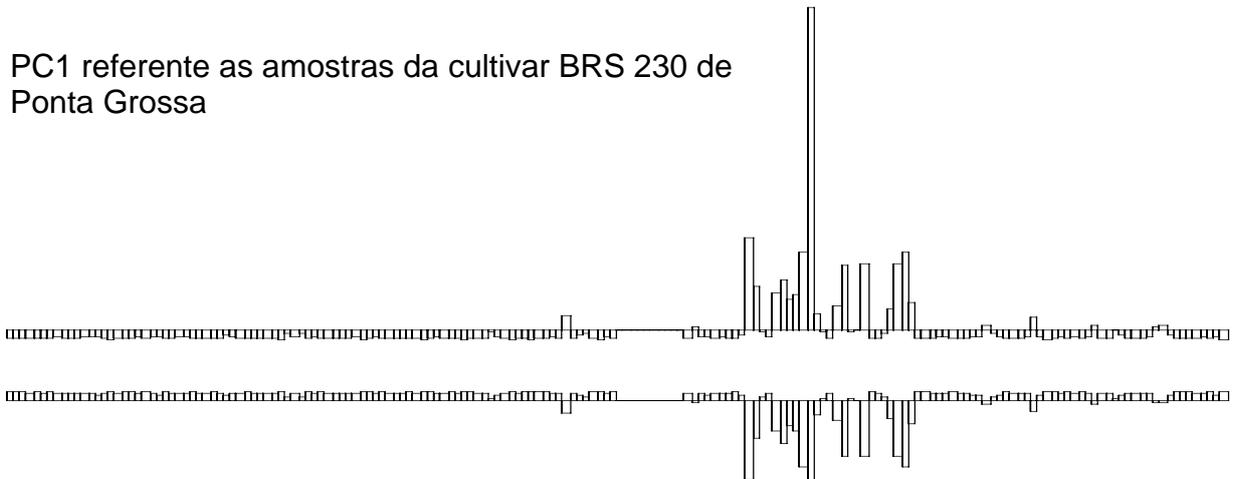
FIGURA 4.123 – Gráfico de escores da análise por PCA de espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  de folhas de plântulas de soja, mostrando a discriminação por cultivar e por região de origem das sementes. As percentagens de informações obtidas foram de 93,6% em PC1, de 0,7% em PC3 e um total de 98,3%.

A análise do gráficos de influência revelou que independente da cultivar, as amostras de Londrina apresentam menores teores das substâncias representadas pelos sinais da região de  $\delta$  4,2 a 2,8 ppm, quando comparadas com as amostras de Ponta Grossa (Figura 4.124). Caracterizando a influência da região de origem geográfica das sementes, na composição química das folhas de plântulas de soja.

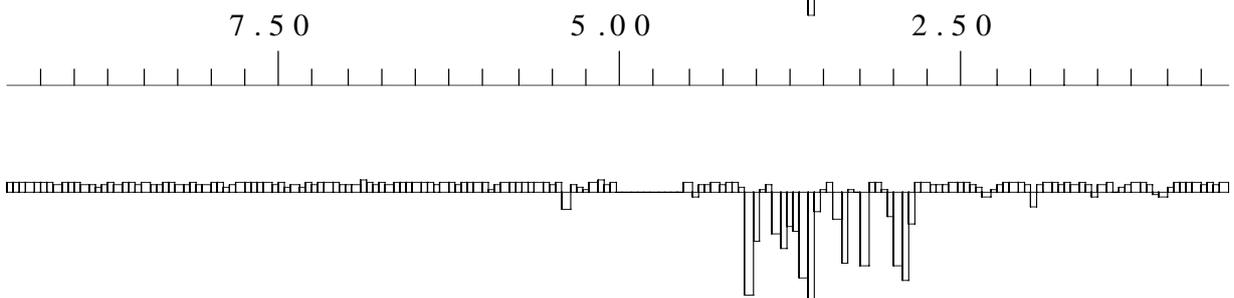
Espectro de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$



PC1 referente as amostras da cultivar BRS 230 de Ponta Grossa



PC1 referente as amostras da cultivar BRS 134 de Londrina



PC1 referente as amostras da cultivar BRS 230 de Londrina

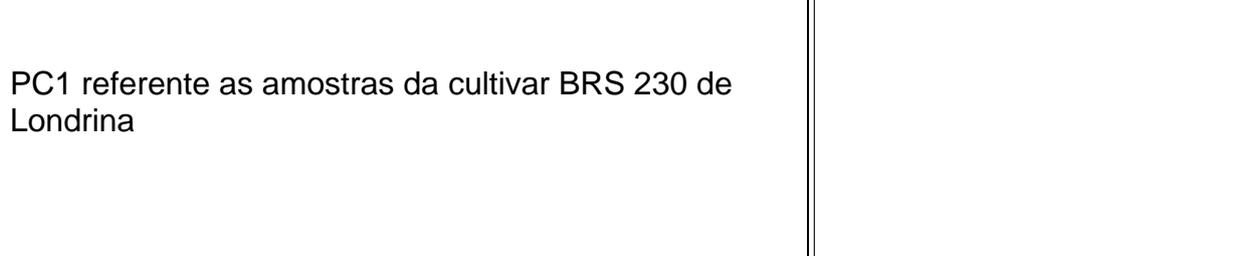


FIGURA 4.124 – Comparação dos gráficos de influências obtidos nas discriminações entre cultivar e região, usando-se espectros de folhas.

#### 4.14 – Análise do óleo de soja das amostras de campo

##### 4.14.1 – Quantificação do teor de óleo nas sementes das amostras de campo

A análise quimiométrica indicou alguns resultados sobre os teores de triacilgliceróis nas sementes de soja. Sendo assim, amostras de campo, ao menos das que haviam em grande quantidade, foram submetidas a extração do óleo com n-hexano através de um sistema do tipo Soxhlet, para confrontar com dados obtidos pelas análises quimiométricas dos espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  obtido diretamente das sementes de soja. A quantificação do teor de óleo de soja poderia ter sido realizada através de um espectrômetro de RMN de baixo campo. No entanto, não foi possível viabilizar estas análises durante o desenvolvimento deste trabalho.

Após a extração do óleo, espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  foram coletados do material resultante. Estes espectros evidenciaram o desaparecimento por completo somente dos sinais referentes aos triacilgliceróis (Figura 4.125). A figura 4.125 demonstra ainda que a técnica de RMN HR-MAS pode ser utilizada no monitoramento de processos de extração e/ou trabalhos similares.

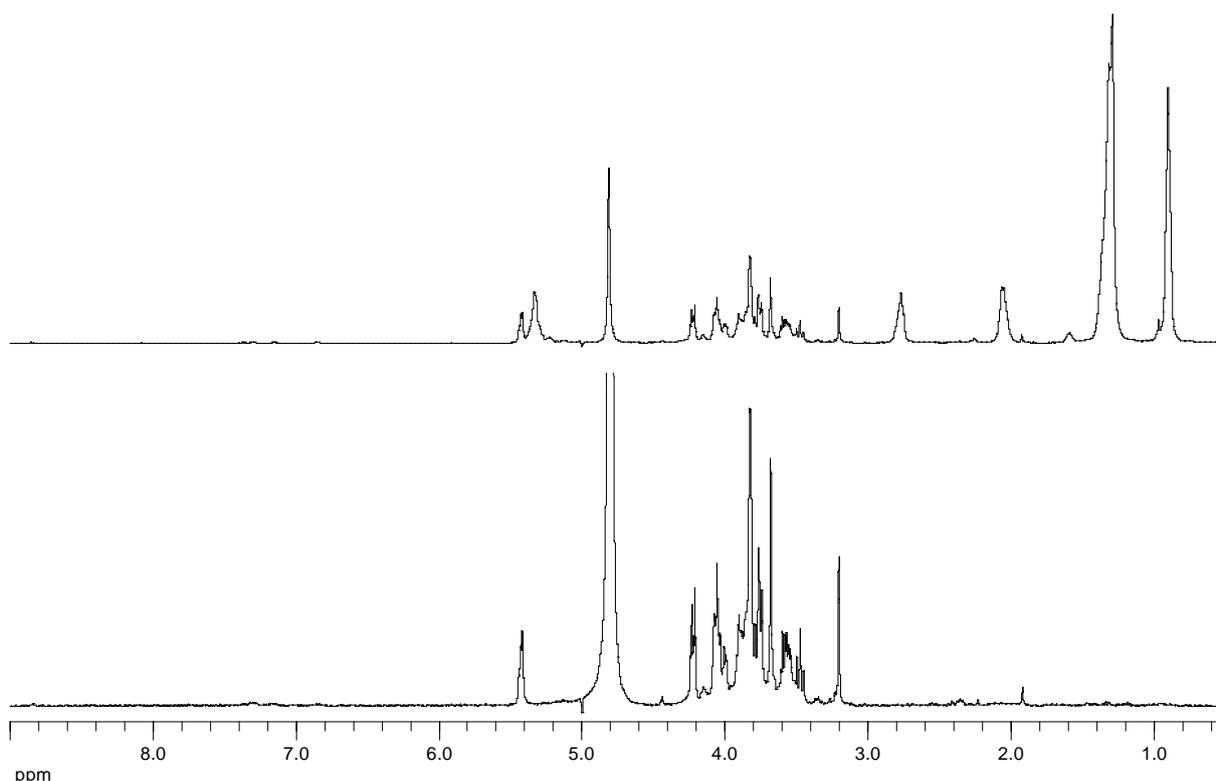


FIGURA 4.125 – Espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  antes (superior) e após (inferior) a extração do óleo de sementes de soja.

As quantidades de óleo extraído das sementes, revelaram que as amostras são muito semelhantes no teor do mesmo, demonstrando que a influência da região sobre a quantidade de óleo produzida pela soja é pequena. No entanto, notou-se que as amostras provenientes de Ponta Grossa possuem 1% a mais de óleo do que as amostras de Londrina (Figura 4.126), como havia sido previsto pela quimiometria, comprovando assim a eficiência da mesma. Estes resultados também demonstram a sensibilidade e a potencialidade da união da RMN com a quimiometria, as quais permitiriam detectar pequenas diferenças entre as amostras. Um por cento pode ser um número pequeno para a discriminação, mas em termos econômicos, uma diferença de 1%, significa 1088 litros de óleo a mais ou a menos em apenas 100 toneladas de soja. Somente no caso da cultivar BRS 247, a qual é composta de amostras GM, a quimiometria dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  não havia indicado diferenças entre as amostras das duas regiões e, no entanto, esta diferença existe (Tabela 4.3).

Comparando-se a quantidade de óleo entre os cultivares de uma mesma região, observou-se que a cultivar BRS 134 produz uma quantidade maior de óleo, quando comparada com a cultivar BRS 230 (Tabela 4.3), exatamente como havia sido previsto anteriormente pela quimiometria.

Tabela 4.3 – Teor de óleo das sementes de soja <sup>a</sup>.

<b>Cultivar</b>	<b>Origem</b>	<b>Quantidade (mg)</b>	<b>Quantidade (%)</b>
BRS 134 CV	Londrina	2,258	22,58
BRS 134 CV	Ponta Grossa	2,356	23,56
BRS 230 CV	Londrina	2,148	21,48
BRS 230 CV	Ponta Grossa	2,252	22,52
BRS 247 GM	Londrina	2,205	22,05
BRS 247 GM	Ponta Grossa	2,317	23,17

<sup>a</sup> Referente a extração de 10 gramas de sementes. CV = Convencional, GM = geneticamente modificada

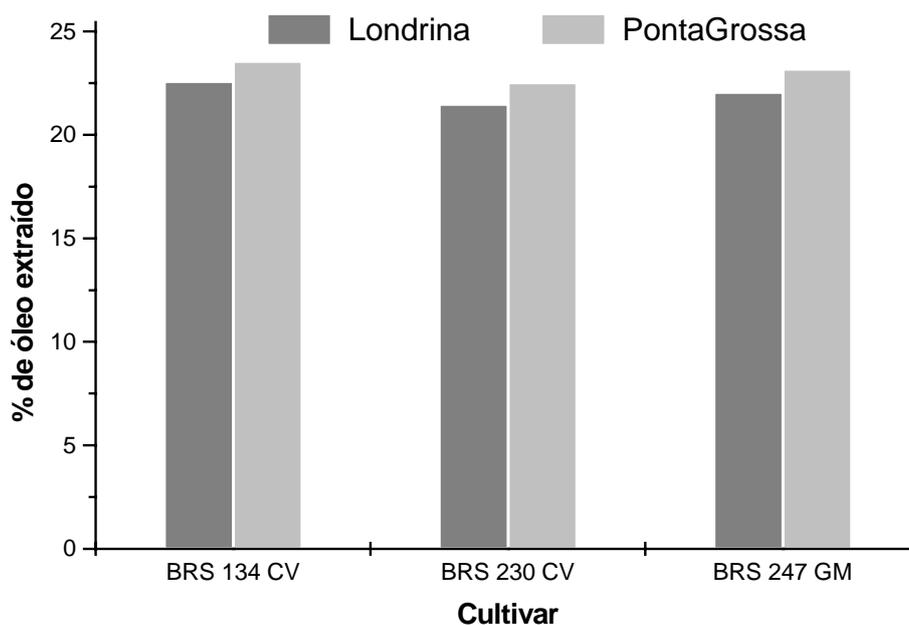


FIGURA 4.126 – Percentagem de óleo extraído das sementes de soja das amostras de Londrina e Ponta Grossa.

#### 4.14.2 – Desenvolvimento de um novo método para determinar a composição de ésteres graxos no óleo por meio de espectros de RMN de $^1\text{H}$

Durante o desenvolvimento dos trabalhos para determinação da composição do óleo da soja através da RMN para tradicional, para amostras em solução, verificou-se que havia uma forma mais simples e prática para determinar a composição de ésteres graxos no óleo de soja, a qual está descrita neste trabalho.

O óleo da soja e também de outras sementes oleaginosas é formado por ésteres de ácidos graxos saturados e insaturados, principalmente por estes últimos, esterificados a uma unidade comum, o glicerol. Os ácidos insaturados são o oleico, linoleico e linolênico, enquanto que, os ácidos saturados são principalmente o mirístico, palmítico e esteárico. Outros tipos são encontrados apenas em ínfimas proporções.

Na soja são encontrados predominantemente os ésteres insaturados oleato e linoleato, enquanto que, o éster linolenato é encontrado em pequena proporção. Dos ésteres graxos saturados é encontrado principalmente o palmitato ( $\text{C}_{16}$ ) e uma pequena proporção de estereato ( $\text{C}_{18}$ ) (Tabela 4.4).

TABELA 4.4 - Composição média dos ésteres graxos do óleo de soja <sup>a</sup>.

Éster graxo	Quantidade (%)
<i>Saturados</i>	
Palmitato (C <sub>16</sub> )	11,43 ± 0,23
Estereato (C <sub>18</sub> )	3,99 ± 0,27
<i>Insaturados</i>	
Oleato	22,44 ± 1,46
Linoleato	55,14 ± 1,17
Linolenato	5,56 ± 0,90
Outros	1,44 ± 0,25

<sup>a</sup> Composição média ± o desvio padrão, extraídos de Hidalgo e col. (2002).

Tradicionalmente a composição de triacilgliceróis é determinada através da cromatografia gasosa, inclusive este é o método padrão de referência. Este é um método destrutivo que necessita da derivatização da amostra (hidrólise e metilação) para posterior análise pela cromatografia gasosa, além de ser muito trabalhoso. Alternativamente aos métodos cromatográficos tem surgido as determinações com base em espectros quantitativos de RMN de <sup>13</sup>C (Mavromoustakos e col., 1997; Vlahov, 1997). Este método por sua vez tem sido bastante difundido pelo fato de que cada éster graxo apresenta pelo menos um sinal característico distinto dos demais nos espectros de RMN de <sup>13</sup>C. Mais recentemente, surgiram trabalhos na literatura demonstrando que também é possível a quantificação dos ésteres graxos através de simples espectros de RMN de <sup>1</sup>H (Sacchi e col., 1997; Knothe e col., 2004; Sacchi e col., 1997).

O uso de espectros de RMN de <sup>1</sup>H apresenta uma vantagem em relação aos de <sup>13</sup>C, uma vez que para a aquisição de espectros de <sup>13</sup>C quantitativos são necessários longos tempo de aquisição e de espera para que ocorra a relaxação dos spins. Por outro lado, os espectros de RMN de <sup>13</sup>C permitem que além da quantidade de cada éster graxo presente, também seja determinada a quantidade de cada éster graxo esterificado nas posições  $\alpha$  e  $\beta$  do glicerol, uma vez que cada éster graxo apresenta deslocamentos químicos de <sup>13</sup>C distintos quando estão esterificados na posição  $\alpha$  ou  $\beta$  (Mavromoustakos e col., 1997; Vlahov e col., 2002). Já a cromatografia possibilita determinar os tipos de triacilgliceróis existentes,

formados pelas diferentes combinações dos vários tipos de ésteres graxos nos três possíveis pontos de esterificação na unidade de glicerol (Hidalgo e *col.*, 2002).

As primeiras determinações, seja por RMN de  $^{13}\text{C}$  ou  $^1\text{H}$ , na literatura se baseiam na adição de uma quantidade conhecida de um padrão interno. Desta forma, o cálculo da quantidade de cada éster graxo é realizado pela integração de um sinal característico para cada éster graxo em relação ao padrão adicionado, de quantidade conhecida (Mavromoustakos e *col.*, 1997; Mavromoustakos e *col.*, 2000).

Os trabalhos atuais já não utilizam a adição de um padrão interno nas quantificações por RMN, bastando apenas realizar a integração relativa dos sinais de todos os tipos de ésteres graxos e com isso determinar a percentagem de cada um nas amostras de óleo (Vlahov e *col.*, 2003; Sacchi e *col.*, 1997; Knothe e *col.*, 2004). Sendo assim, não há mais a necessidade de adicionar quantidades precisas de amostras ou de solventes no tubo de RMN. A única exigência é de que o espectro seja adquirido quantitativamente, ou seja, que o tempo para a relaxação total dos spins entre os experimentos seja respeitado. Atualmente, a RMN é considerada a mais poderosa ferramenta já descrita para a análise de óleos vegetais (Mannina e *col.*, 2003). Inclusive o periódico científico "*Magnetic Resonance in Chemistry*" lançou em 1997 um volume especial somente sobre quantificação de óleos vegetais pela RMN.

De acordo com o método mais simples, descrito por Vigli e *col.* (2003), o conteúdo do éster graxo linolenato é medido relativamente ao conteúdo total de ésteres graxos através do tripleto característico em  $\delta$  0,98 ppm, o qual é referente somente ao grupo metila deste éster (sinal E na figura 4.127), em relação ao sinal em  $\delta$  0,85 ppm referente a todos os demais grupos metilas de todos os outros ésteres graxos (sinal F na figura 4.127), como segue:

$$\text{Linolenato} = E/E+F$$

Desta forma, o conteúdo dos demais ésteres, ou seja, de saturados, oleato e linoleato pode ser expresso da seguinte forma:

$$\text{Saturados} + \text{oleato} + \text{linoleato} = F/E+F$$

O conteúdo de éster linoleato pode ser determinado pela subtração do sinal em  $\delta \sim 2,74$  ppm (sinal A na figura 4.127) referente aos grupos metilênicos localizados entre olefinas dos ésteres linoleato e linolenato, pela quantidade de linolenato, ajustando-se as devidas proporções. Este ajuste é extremamente difícil de ser obtido e até mesmo de ser interpretado, inclusive há artigos na literatura que o descrevem de forma errônea.

$$\text{Linoleato} = 3A - 4E/2(E + F)$$

A quantidade de oleato pode ser determinada pela subtração do sinal em  $\delta 2,02$  ppm (sinal C na figura 4.127), referente aos grupos metilênicos  $\alpha$  olefínicos de todas as cadeias insaturadas dos ésteres oleato, linoleato e linolenato, das quantidades já determinadas de ésteres linoleato e linolenato.

$$\text{Oleato} = 3C/4(E+F) - [\text{linoleato}] - [\text{linolenato}]$$

Finalmente o conteúdo de ésteres graxos saturados pode ser obtido pela subtração do valor encontrado para a soma de ésteres oleato e linoleato.

$$\text{Saturados} = [F/(E+F)] - [\text{oleato}] - [\text{linoleato}]$$

No relato deste método por Vigli e *col.* (2003), a equação para saturados é descrita erroneamente, na qual a subtração é realizada de todos os ésteres graxos insaturados, inclusive o linolenato como é demonstrado a seguir:

$$\text{Saturados} = [F/(E+F)] - [\text{oleato}] - [\text{linoleato}] - [\text{linolenato}]$$

A subtração do éster linolenato não pode ser adicionada a esta equação, uma vez que o termo  $[F/(E + F)]$  não considera o conteúdo deste éster e, conseqüentemente, esta equação induz a um erro de aproximadamente 5% no teor de ésteres graxos saturados.

Ao invés deste método, o conteúdo de ésteres graxos saturados poderia ser obtido simplesmente pela subtração do sinal em  $\delta \sim 2,30$  ppm (sinal B na figura 4.127) referente a todos os grupos metilênicos  $\alpha$  carbonilas de todos os

ésteres graxos pelo sinal em  $\delta \sim 2,02$  ppm (sinal C na figura 4.127) referentes aos grupos metilêncos  $\alpha$  olefínicos das cadeias dos ésteres insaturados, ajustando-se apenas as proporções, como segue:

$$\text{Saturados} = B - C/2$$

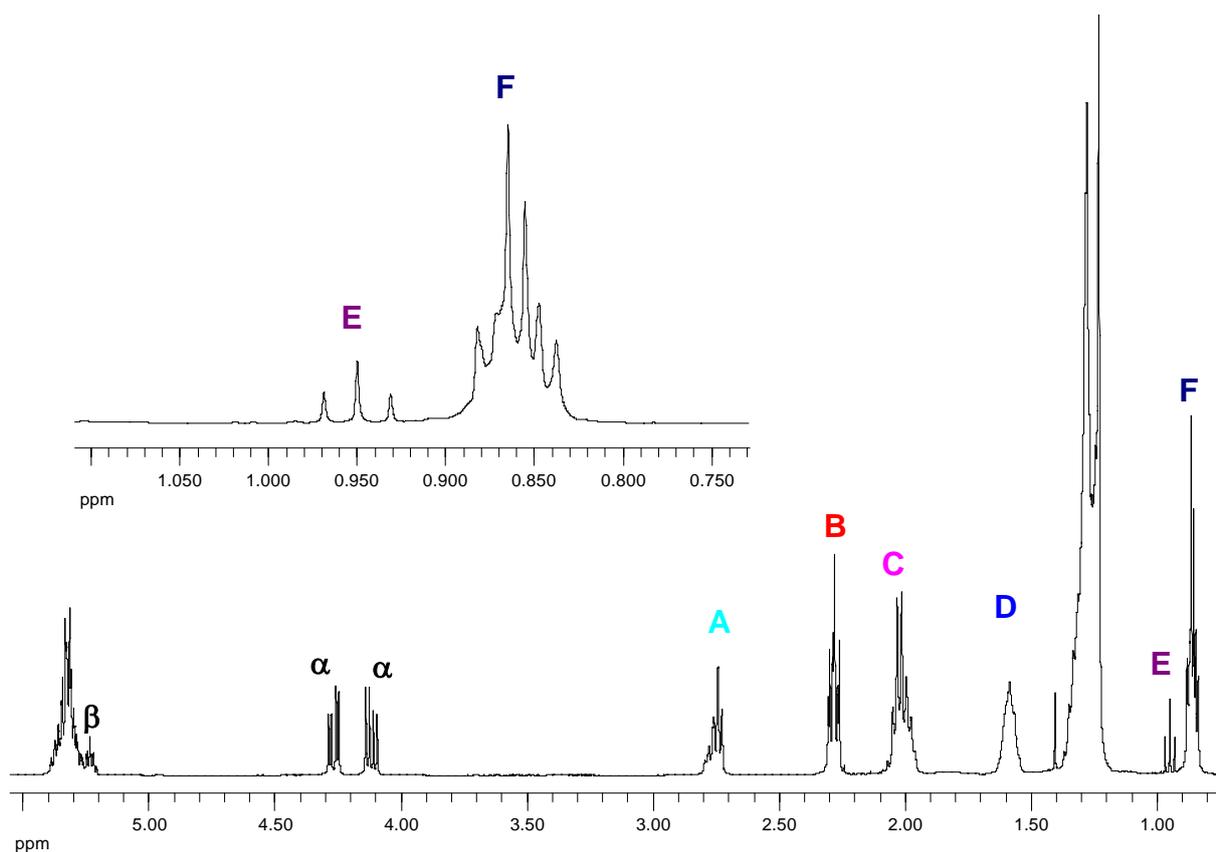


FIGURA 4.127 – Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de uma amostra de óleo de soja. O inserido é a ampliação da região de 1,1 a 0,6 ppm.

Sacchi e *col.* (1997) ao relatarem um método semelhante ao descrito até o momento, porém de mais difícil compreensão, também cometem erros ao descreverem as equações. Knothe e Kenar, (2004) descrevem outra forma de cálculo, no entanto, extremamente trabalhosa e com um grande número de operações a serem realizadas, o que aumenta a probabilidade de erros.

O método de cálculo desenvolvido neste trabalho se baseia no fato de que todas as cadeias alquílicas de todos os ésteres graxos estão esterificadas a uma unidade comum, a do glicerol. Sendo assim, basta medir a relação das áreas dos sinais característicos para cada éster graxo nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , em

relação a um mesmo sinal do glicerol. Este pode ser qualquer um dos dois sinais referentes aos hidrogênios das posições  $\alpha$  do glicerol, uma vez que, o sinal referente ao hidrogênio  $\beta$  apresenta sobreposição com os sinais referentes aos hidrogênios olefínicos das cadeias alquilas insaturadas (Figura 4.127).

Desta forma, o conteúdo de éster linolenato pode ser determinado através da relação entre as áreas do sinal do grupo metila em  $\delta$  0,98 ppm (sinal E na figura 4.127) com um dos sinais relativos aos hidrogênios  $\alpha$  do glicerol em  $\delta$  4,12 ou 4,27 ppm. A relação entre áreas destes sinais é de dois hidrogênios do glicerol para três hidrogênios do éster linolenato. Além disso, como o linolenato pode estar esterificado até três vezes à uma unidade de glicerol, a relação correta é de dois hidrogênios do glicerol para até nove hidrogênios do éster. Transformando esta relação para percentagem obteremos uma proporção de 22,222 % de hidrogênios do glicerol para 100 % de hidrogênios do éster linolênico. Portanto, calibrando-se a área de um dos sinais dos hidrogênios  $\alpha$  do glicerol para 22,222 o respectivo valor encontrado para a o sinal em  $\delta$  0,98 ppm (sinal E na figura 4.127) resultará diretamente no conteúdo de éster linolenato presente na amostra em percentagem (Figura 4.128).

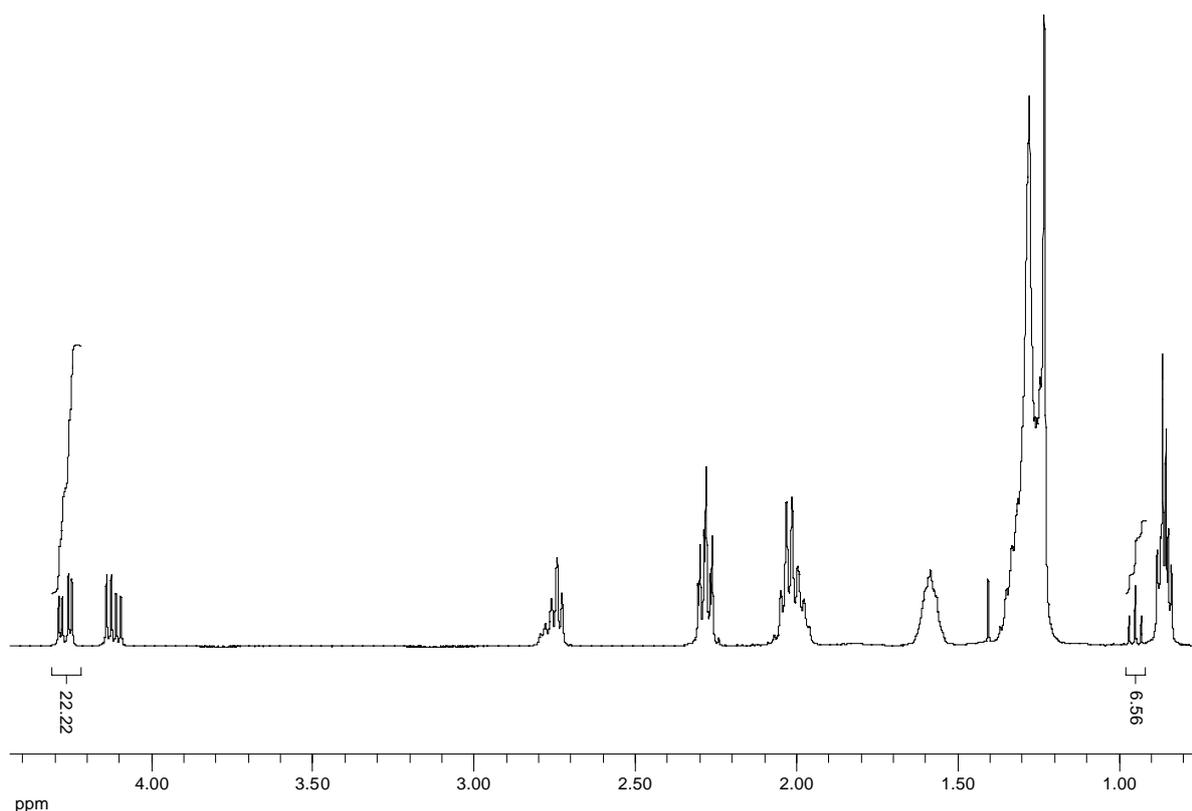


FIGURA 4.128 – Quantificação do éster linolenato, através do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do óleo de soja.

Para determinar o conteúdo de éster linoleato, basta calibrar agora o mesmo sinal dos hidrogênios  $\alpha$  do glicerol para 33,333 e então medir a área do sinal em  $\delta \sim 2,74$  ppm (sinal A na figura 4.127) referente aos hidrogênios localizados entre olefinas dos ésteres linoleato e linolenato. O valor de 33,333 se refere a relação de dois hidrogênios  $\alpha$  do glicerol para seis possíveis hidrogênios metilênicos, entre olefinas do éster linoleato, uma vez que este pode estar esterificado até três vezes ao glicerol, que convertida para percentagens é de 33,333 para 100. Assim a área relativa encontrada para o sinal em  $\delta \sim 2,74$  ppm será diretamente a percentagem dos ésteres linoleato e linolenato presentes na amostra (Figura 4.129). O conteúdo de éster linoleato é então determinado subtraindo-se de duas vezes o valor já encontrado para o éster linolenato, uma vez que a relação de hidrogênios metilênicos entre olefinas é de dois no éster linoleato para quatro no éster linolenato.

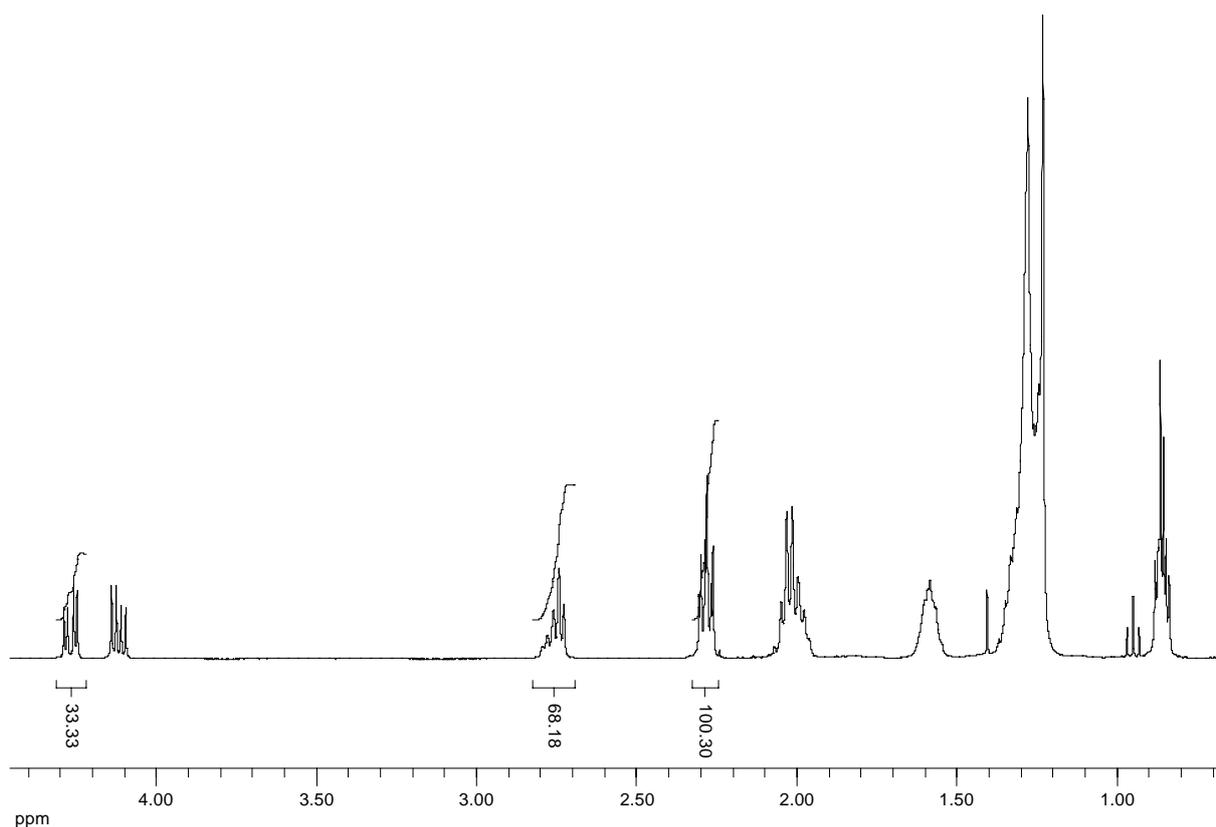


FIGURA 4.129 – Quantificação dos ésteres linoleato e saturados, através do espectro de RMN de <sup>1</sup>H do óleo de soja.

O conteúdo de éster oleato pode ser determinado através da relação de dois hidrogênios  $\alpha$  do glicerol para até 12 hidrogênios  $\alpha$  olefínicos das cadeias alquílicas de todos os ésteres insaturados, que convertida para percentagem é de 16,666 para 100. Portanto, nesta etapa, basta ajustar a área do mesmo sinal dos hidrogênios  $\alpha$  do glicerol para 16,666 e medir a área relativa do sinal em  $\delta \sim 2,02$  ppm (sinal C na figura 4.127) (Figura 4.130). O valor encontrado será referente ao conteúdo total de ésteres graxos insaturados. A percentagem de éster oleato na amostra é obtida pela subtração do conteúdo de ésteres linoleato e linolenato anteriormente determinados.

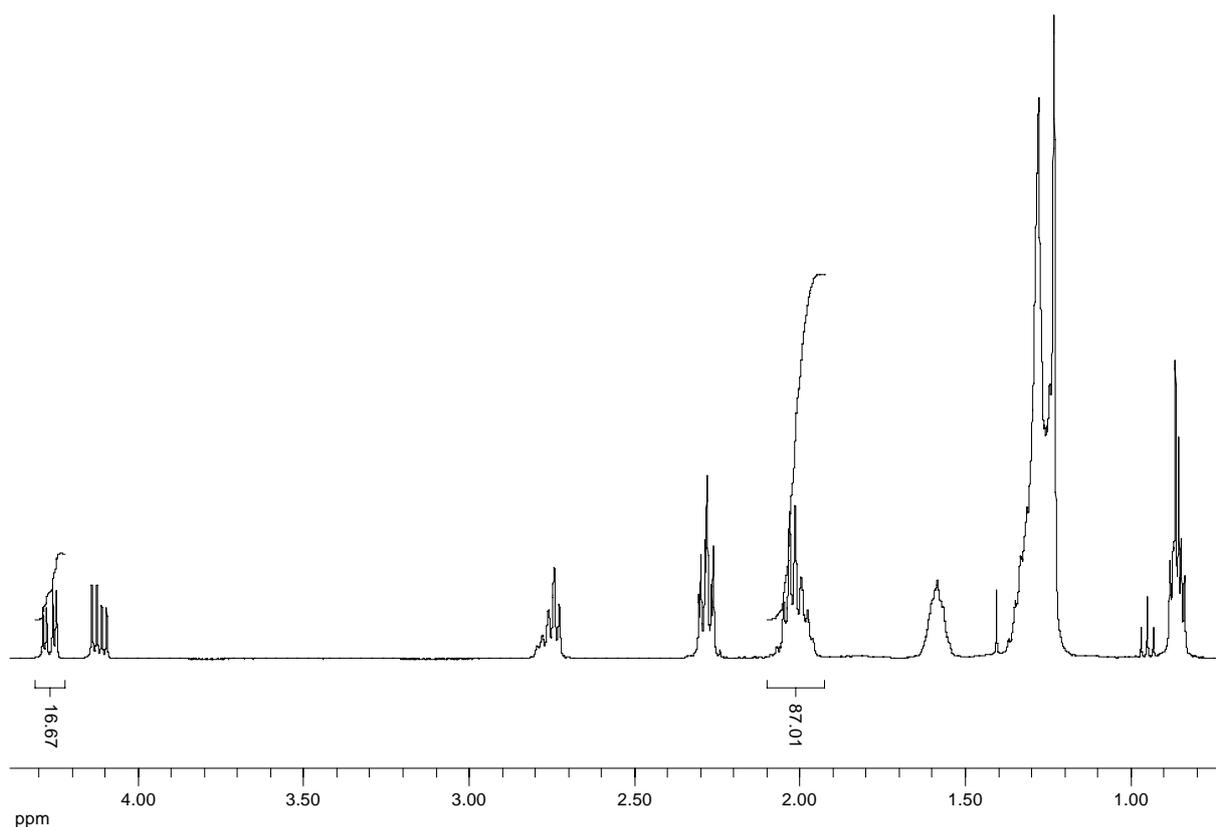


FIGURA 4.130 – Quantificação do éster oleato, através do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do óleo de soja.

Finalmente o conteúdo de ésteres saturados pode ser determinado através da relação de dois hidrogênios  $\alpha$  do glicerol para seis hidrogênios  $\alpha$  carbonilas de qualquer éster graxo esterificado ao glicerol, que em termos de percentagens é de 33,333 para 100. O mesmo que utilizado no cálculo do éster linoleato (Figura 4.129). Assim, basta somente integrar relativamente ao valor de 33,333 o sinal em  $\delta \sim 2,28$  ppm referente aos hidrogênios  $\alpha$  carbonilas (sinal B na figura 4.127). O valor encontrado será referente a quantidade total de ésteres graxos, o qual deverá ser de 100% ou muito próximo a este valor e serve de referência para validar o método. O mesmo raciocínio pode ser feito usando-se o sinal em  $\delta \sim 1,59$  (sinal D na figura 4.127) referente aos hidrogênios  $\beta$  carbonilas de todos os ésteres graxos, e com isso, possibilitar que se faça uma média dos valores encontrados para os sinais, diminuindo os erros referentes a integração dos mesmos. O conteúdo de ésteres graxos saturados é então obtido pela subtração do valor encontrado, para qualquer um destes sinais, pelo conteúdo já obtido de ésteres oleato, linoleato e linolenato. O conteúdo de ésteres graxos saturados pode ser determinado também assumindo-se o valor de 100 % para o conteúdo total,

descontando-se os valores encontrados para os ésteres insaturados. No entanto, este modo não estaria considerando o erro da integração dos sinais.

O método de cálculo descrito aqui se baseia em simples comparações das áreas relativas dos sinais sem necessidade de elaboração de equações complexas, as quais induzem facilmente a erros como já tem sido observado na literatura. A única exigência é de que a relação entre os hidrogênios da unidade do de glicerol com os das cadeias alquílicas para cada éster graxo seja corretamente estabelecida.

A tabela 4.5 mostra os resultados do conteúdo de cada éster graxo obtidos por ambos os métodos da literatura e o desenvolvido neste trabalho, para uma mesma amostra de óleo de soja. Comparando-se os resultados obtidos por ambas as formas observa-se que não há diferenças estatisticamente significativas. Sendo assim, o método proposto aqui pode ser empregado na quantificação de ésteres graxos em amostras de óleos.

Tabela 4.5 - Composição de ésteres graxos de uma amostra de óleo de soja obtido por diferentes métodos de cálculo (%).

<b>Éster graxos</b>	<b>Método Literatura <sup>a</sup></b>	<b>Método Desenvolvido</b>
Oleato	21,88	21,96
Lionoleato	56,45	56,68
Linolenato	6,09	6,12
Saturados	15,58	15,65

<sup>a</sup> Usando metodologia descrita por Vigli e col. (2003).

O método descrito neste trabalho somente apresentará resultados incorretos se nas amostras de óleo houverem, além de triacilgliceróis, di e monoacilgliceróis. Estes últimos apresentam sinais de hidrogênios  $\alpha$  de suas unidades de glicerol em deslocamentos químicos distintos (Sacchi e col., 1997) e, por isso, não estariam sendo considerados nos cálculos. No entanto, a quantidade destes acilgliceróis em óleos vegetais é muito pequena e a contribuição destes é menor que o erro de integração dos sinais (Vigli e col., 2003). Na soja a contribuição destes não passa de 1% (Vigli e col., 2003). A figura 4.131 mostra um espectro de

RMN de  $^1\text{H}$  e a sua ampliação para a região dos sinais dos hidrogênios  $\alpha$  do glicerol em que se pode observar a predominância dos sinais de triacilgliceróis.

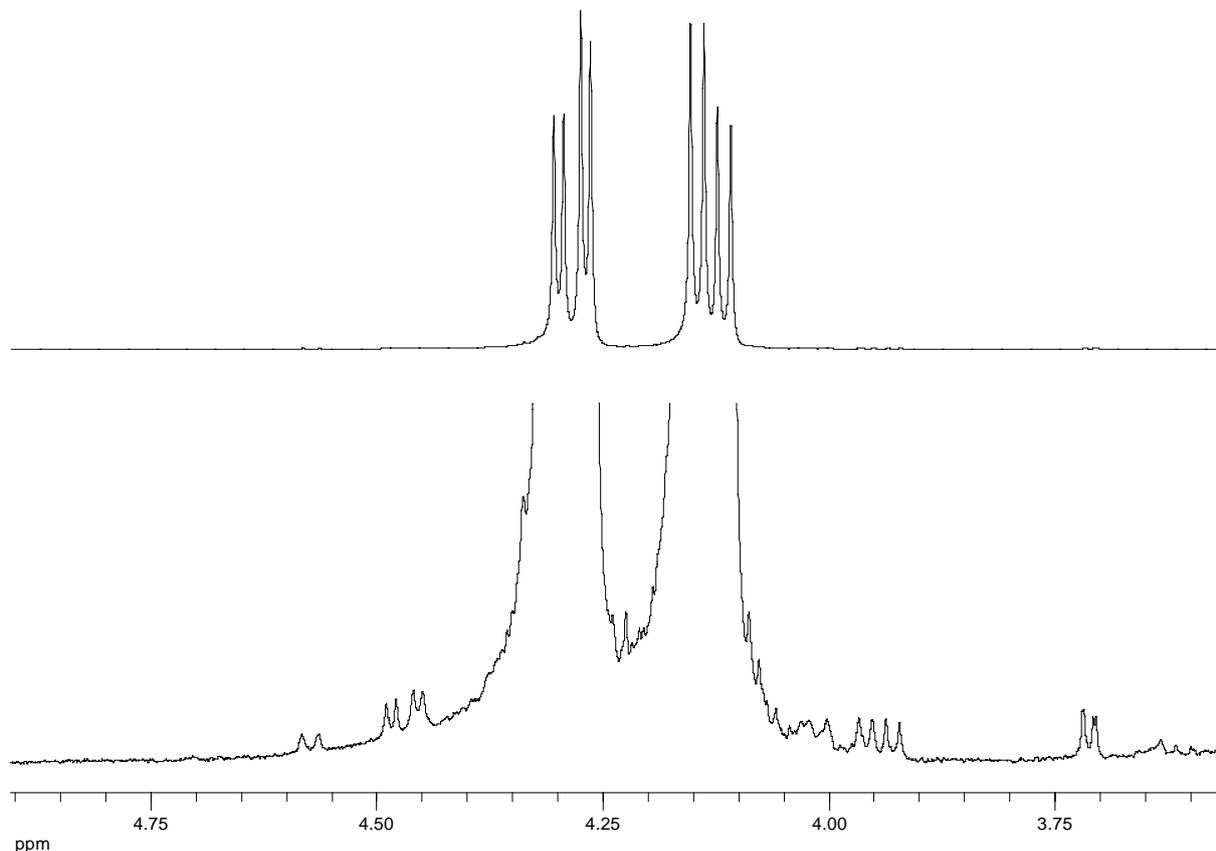


FIGURA 4.131 – Ampliações de um espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de uma amostra de óleo para mostrar os sinais dos hidrogênios  $\alpha$  das unidades de glicerol.

Uma questão interessante que foi levantada durante o desenvolvimento deste trabalho foi a quantificação dos ésteres graxos utilizando espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  adquiridos diretamente das próprias sementes de soja, ou até mesmo de outras sementes oleosas, dispensando assim a necessidade de extração do óleo. No entanto, esta possibilidade não foi ainda testada.

#### 4.14.3 – Determinação da composição de ésteres graxos do óleo extraído das sementes de soja

Utilizando-se o método anteriormente descrito, o conteúdo de ésteres graxos do óleo extraído das amostras de campo de Londrina e Ponta Grossa foi determinado (Tabela 4.6).

TABELA 4.6 – Composição dos triacilgliceróis do óleo das sementes de soja.

Éster graxo	Cultivar/Origem					
	BRS 134 CV		BRS 230 CV		BRS 247 GM	
	Londrina	P. Grossa	Londrina	P. Grossa	Londrina	P. Grossa
Oleato	21,27	21,35	19,66	22,74	20,84	22,54
Linoleato	56,71	59,40	58,24	57,24	57,55	56,17
Linolenato	6,16	6,51	5,25	6,66	6,21	6,20
<i>Insaturados</i>	84,14	87,26	83,15	86,64	84,60	84,91
Saturados	15,56	13,19	16,99	13,16	15,57	15,30

De um modo geral as cultivares apresentaram maiores teores de ésteres graxos insaturados que saturados, quando estas são cultivadas na região de Ponta Grossa (Figura 4.132). Para a cultivar BRS 134, a maior contribuição de ésteres insaturados foi referente ao linoleato (Figura 4.133), enquanto que para a BRS 230 referentes ao oleato e linolenato (Figura 4.134). Demonstra-se assim, que a maior quantidade óleo nas amostras de Ponta Grossa (Tabela 4.3), devesse aos ésteres graxos insaturados, confirmando as indicações das análises quimiométricas dos espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  das sementes de soja (Item 4.15.2.1).

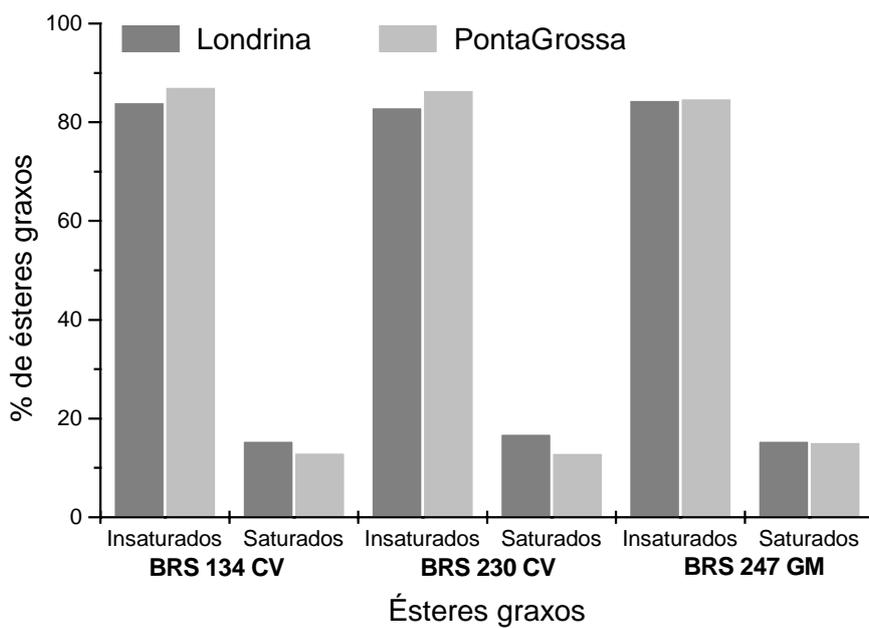


FIGURA 4.132 – Comparação da produção de ésteres graxos entre as amostras das regiões de Londrina e Ponta Grossa.

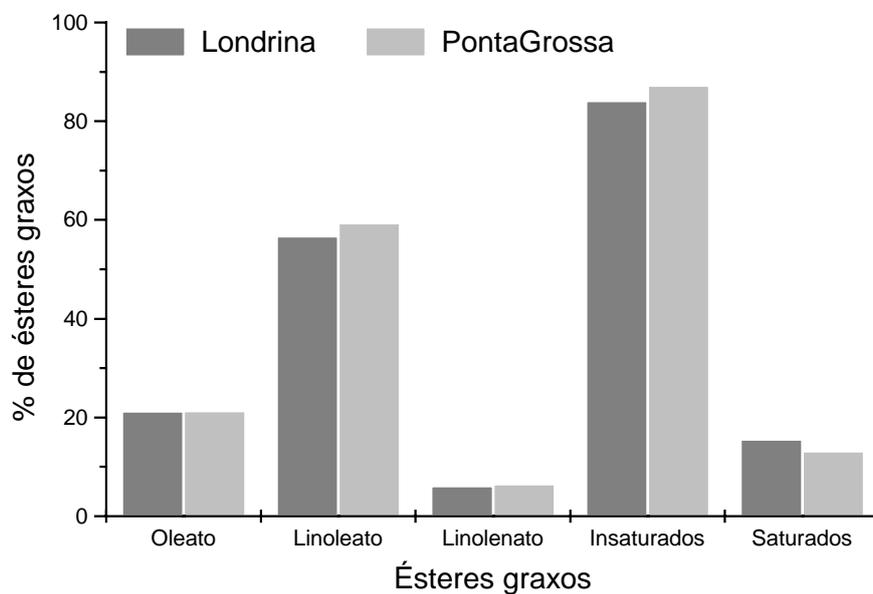


FIGURA 4.133 – Percentagem de ésteres graxos para as amostras da cultivar de soja BRS 134 CV.

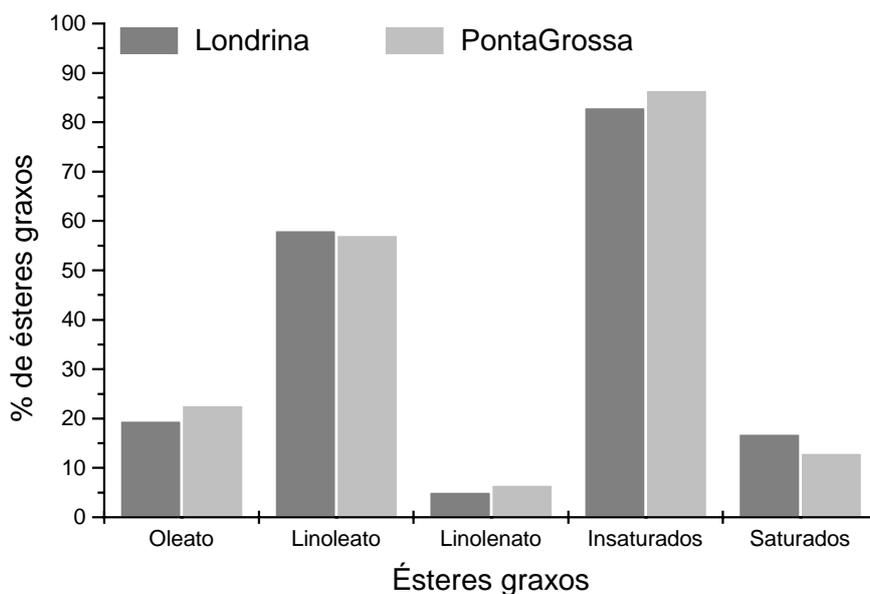


FIGURA 4.134 – Percentagem de ésteres graxos para as amostras da cultivar de soja BRS 230 CV.

As amostras da cultivar BRS 247 apresentaram teores muito semelhantes de ésteres graxos saturados e insaturados em ambas as regiões de cultivo (Figura 4.132 e Tabela 4.6). Estes resultados, estão plenamente de acordo com a análise dos gráficos de influências, resultantes da discriminação das amostras desta cultivar de acordo com a região, a qual não havia indicado diferenças na composição de triacilgliceróis.

Os resultados das análises quimiométricas para discriminação das amostras de acordo com a cultivar, indicaram que a cultivar BRS 134 havia produzido um maior teor de ésteres graxos insaturados independente da região (Item 4.15.2.3). Os resultados da análise do óleo extraído das sementes também apontaram um maior teor de ésteres insaturados para as amostras da cultivar BRS 134 em ambas as regiões, com exceção da BRS 247 GM (Figura 4.135). No entanto, a diferença observada é pequena e a análise quimiométrica pode ter sido influenciada também pelo maior conteúdo total de óleo apresentado pela cultivar BRS 134 (Tabela 4.3).

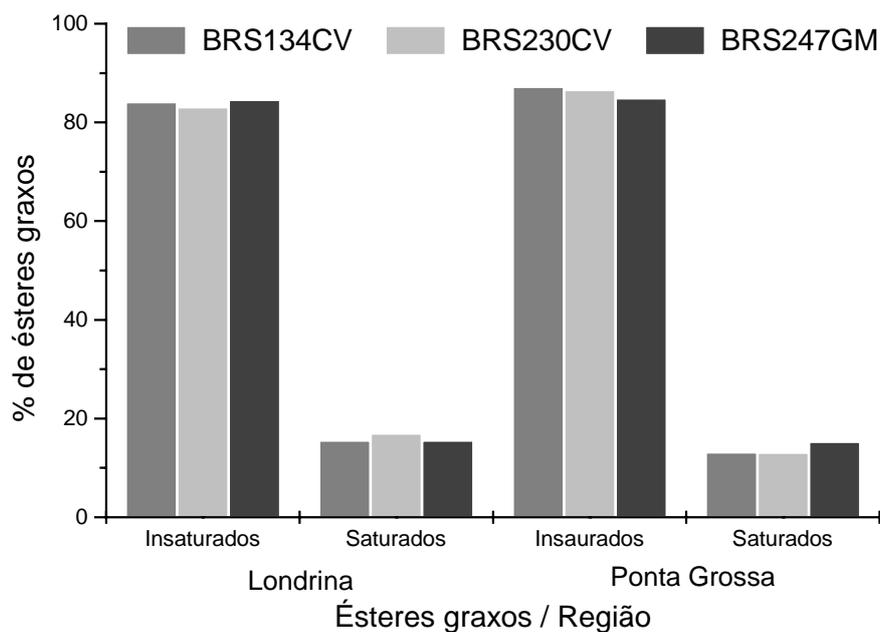


FIGURA 4.135 – Comparação da produção de ésteres graxos entre cultivares de uma mesma região.

Em geral os resultados obtidos aqui demonstram uma íntima relação com os dados obtidos pelas análises quimiométricas realizadas sobre os espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$ , demonstrando assim, a potencialidade da união destas duas ferramentas. Infelizmente, devido a pequena quantidade de material não foi possível fazer estes estudos com os pares de amostras GM e CV.

## 4.15 – Construção e emprego de modelos de classificação

### 4.15.1 – Análise de amostras de casa de vegetação de diferentes cultivares

Vários resultados das análises exploratórias referentes às amostras de casa de vegetação foram utilizados para construção de modelos de classificação (Item 4.14.1). Será discutido aqui a construção e a aplicação de um destes modelos que representa os demais. Sendo assim, o resultado em que foi possível discriminar as quatro cultivares de soja foi utilizado para a construção de um modelo pelo método do k-ésimo vizinho mais próximo (KNN).

O modelo construído apresentou apenas um erro considerando-se até dois vizinhos. No entanto, o número de erros aumenta significativamente com o incremento do número de vizinhos (Figura 4.136).

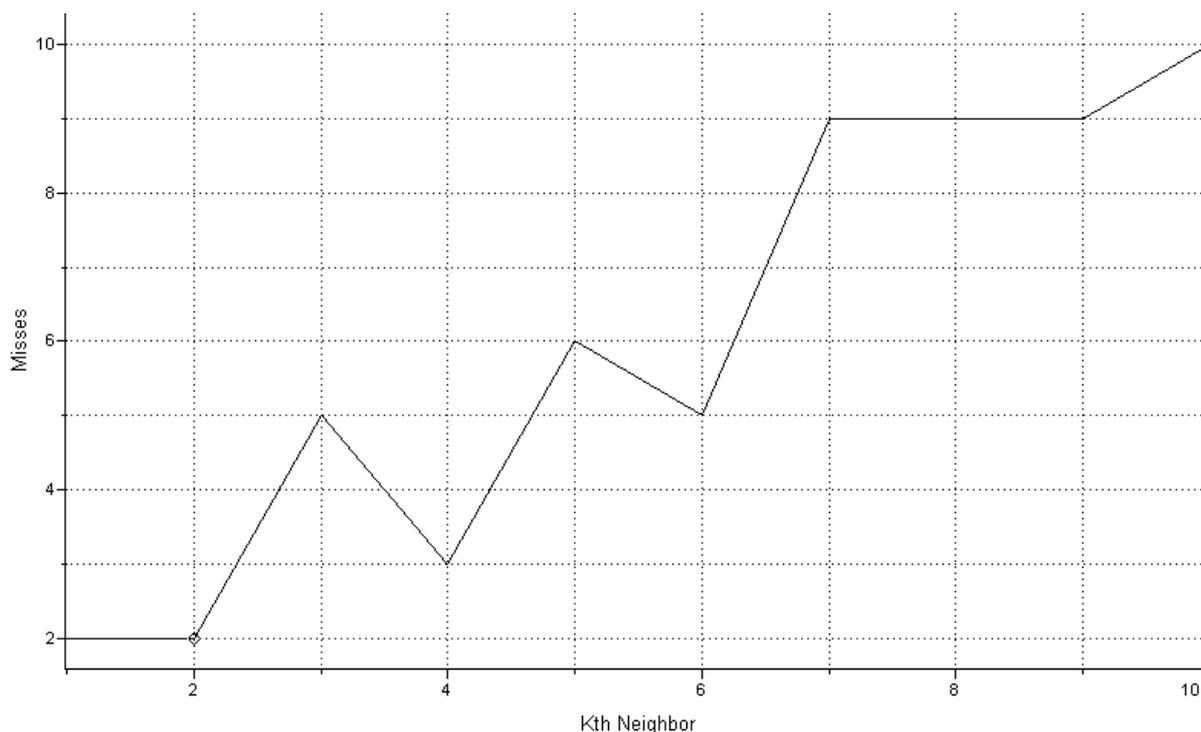


FIGURA 4.136 – Modelo de classificação obtidos com as amostras das quatro diferentes cultivares de soja.

A habilidade de previsão deste modelo foi então testada sobre novos espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$ , obtidos para cada uma das quatro cultivares de

soja. O resultado obtido foi surpreendente, uma vez que seria esperado um certo número de previsões erradas, e no entanto, somente um erro foi observado (Tabela 4.7).

TABELA 4.7 – Classificação das amostras de diferentes cultivares de soja.

<b>Cultivar</b>	<b>Classificação</b>
BRS 133a	1
BRS 133b	1
BRS 133c	1
BRS 134a	2
BRS 134b	2
BRS 134c	2
BRS 137a	3
BRS 137b	3
BRS 137c	3
EMBR 59a	4
EMBR 59b	2
EMBR 59c	4

Classe 1 = BRS 133, Classe 2 = BRS 134, Classe 3 = BRS 137 e Classe 4 = EMBR 59

#### 4.15.2 – Análise de amostras GM e CV de casa de vegetação

O resultado da análise exploratória das amostras formadas pela mistura de espécimens CV e GM das quatro cultivares de soja, obtidas em casa de vegetação (Item 4.15.2), foi utilizado para a construção de um modelo de classificação pelo método KNN. Este modelo não apresentou erros considerando-se até dois vizinhos. Aumentando-se para até oito vizinhos, apenas um erro é observado, mostrando ser um bom modelo (Figura 4.137).

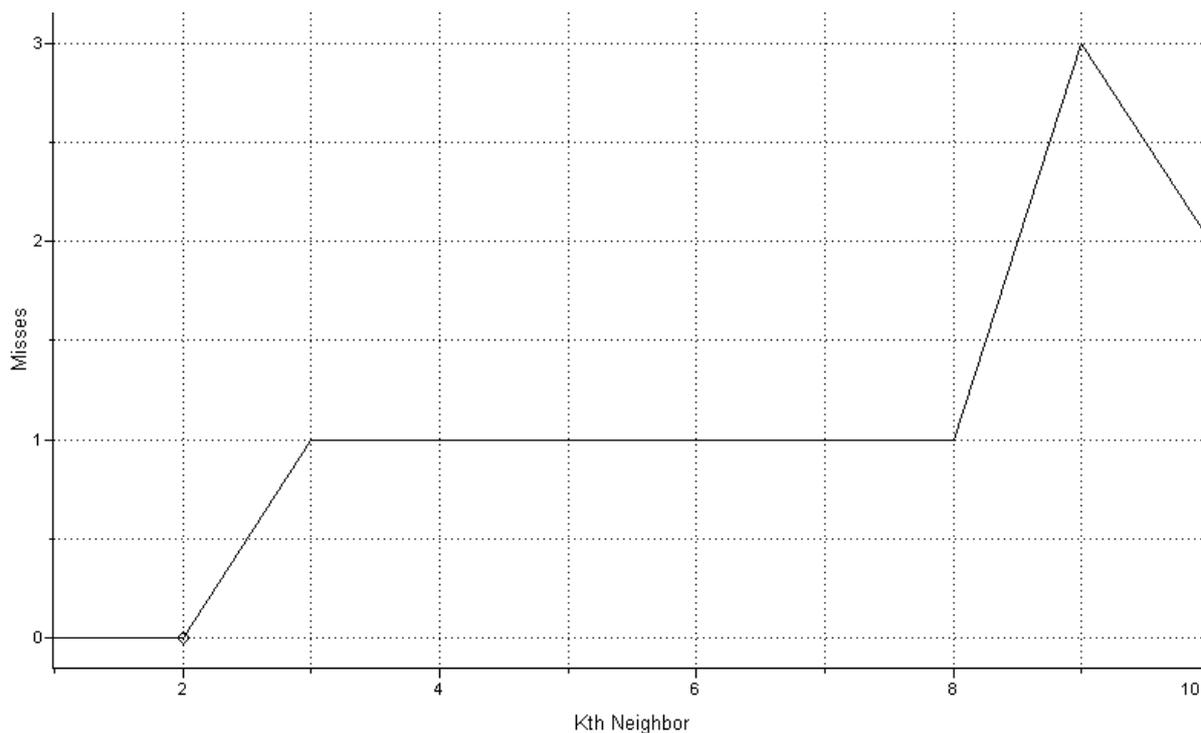


FIGURA 4.137 – Modelo de classificação obtidos com as amostras formadas pela mistura de espécimes GM e CV de todas as cultivares.

Este modelo foi então utilizado para prever a origem de algumas amostras, desconhecidas para o modelo, de acordo com a origem genética. Para isso, novos espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  foram adquiridos, bem como aqueles já obtidos anteriormente, foram utilizados no teste do modelo.

O modelo foi capaz de prever, com sucesso, as amostras de acordo com GM ou CV. Apenas um erro foi observado (Tabela 4.8).

TABELA 4.8 – Classificação das amostras em mistura em GM e CV.

<b>Código</b>	<b>Classificação</b>
Mistura CVa	1
Mistura CVb	1
Mistura CVc	1
Mistura CVd	1
Mistura CVe	2
Mistura GMa	2
Mistura GMb	2
Mistura GMc	2
Mistura GMd	2
Mistura GMe	2

Classe 1 = CV, Classe 2 = GM

Este modelo também foi utilizado para classificar amostras, desconhecidas para o mesmo, em GM ou CV para cada cultivar de soja. Como resultado, as amostras da cultivar BRS 133, BRS 134 e EMBR 59 foram corretamente classificadas (Tabela 4.9). Apenas uma das amostras CV referente a cultivar EMBR 59 foi incorretamente classificada como sendo GM. No entanto, as amostras referentes a cultivar BRS 137 foram todas classificadas como sendo GM (Tabela 4.9). Devemos lembrar que as amostras GM desta cultivar apresentam comportamento químico diferenciado das demais amostras GM (Item 4.14.2), e por isso, era esperado que a classificação das amostras desta cultivar fosse mais difícil. Neste caso, um modelo de classificação contendo apenas amostras da cultivar BRS 137 deveria ser empregado para a previsão de amostras da mesma cultivar.

TABELA 4.9 - Classificação das amostras desconhecidas em GM e CV para cada cultivar de soja.

<b>Código</b>	<b>Classificação</b>
<b>Cultivar BRS 133</b>	
BRS133CVa	1
BRS133CVb	1
BRS133CVc	1
BRS133GMa	2
BRS133GMb	2
BRS133GMc	2
<b>Cultivar BRS 134</b>	
BRS134CVa	1
BRS134CVb	1
BRS134CVc	1
BRS134GMa	2
BRS134GMb	2
BRS134GMc	2
<b>Cultivar EMBR 59</b>	
EMBR59CVa	1
EMBR59CVb	2
EMBR59CVc	1
EMBR59GMa	2
EMBR59GMb	2
EMBR59GMc	2
<b>Cultivar BRS 137</b>	
BRS137CVa	2
BRS137CVb	2
BRS137CVc	2
BRS137GMa	2
BRS137GMb	2
BRS137GMc	2

Classe 1 = CV, Classe 2 = GM

Quando o mesmo modelo foi testado frente a amostras de campo provenientes do Estado de Mato Grosso, este não foi eficiente em prever corretamente a origem das amostras. Praticamente todas as amostras foram classificadas como sendo GM (Tabela 4.10).

TABELA 4.10 - Classificação das amostras desconhecidas em GM e CV para as amostras de campo do Estado de Mato Grosso.

<b>Código</b>	<b>Classificação</b>
<b>Cultivar BRS 133</b>	
CNP CVa	2
CNP CVb	2
CNP CVc	2
CNP CVd	2
CNP CVe	2
CNP CVf	2
CNP CVg	2
CNP GMa	2
CNP GMb	2
CNP GMc	1
CNP GMd	2
CNP GMf	2
CNP GMg	2

Classe 1 = CV, Classe 2 = GM

O mesmo resultado é observado quando usou-se o modelo para classificar amostras de campo referentes as regiões de Londrina e de Ponta Grossa (Tabela 4.11). Mais uma vez a maioria das amostras são classificadas como sendo GM.

TABELA 4.11 - Classificação das amostras desconhecidas em GM e CV para as amostras de campo das regiões de Londrina e Ponta Grossa.

<b>Código</b>	<b>Classificação</b>
<b>Cultivar BRS 133</b>	
BRS134CVLa	2
BRS134CVLb	2
BRS134CVLc	2
BRS134CVLd	2
BRS134CVPa	1
BRS134CVPb	2
BRS134CVPc	2
BRS134CVPd	2
BRS230CVLa	2
BRS230CVLb	2
BRS230CVLc	2
BRS230CVLd	2
BRS230CVPa	2
BRS230CVPb	1
BRS230CVPc	2
BRS230CVPd	1
BRS247GMLa	2
BRS247GMLb	2
BRS247GMLc	2
BRS247GMLd	2
BRS247GMPa	2
BRS247GMPb	2
BRS247GMPc	2
BRS247GMPd	1

Classe 1 = CV, Classe 2 = GM

A incapacidade do modelo classificar corretamente as amostras de campo se deve ao fato do mesmo ter sido construído a partir de amostras provenientes de casa de vegetação, as quais apresentam características diferentes das amostras de campo. Para a previsão de amostras de campo, seria necessário a

construção de um modelo também a partir de amostras de campo, o que não foi possível realizar neste trabalho.

#### 4.15.3 – Análise de amostras de campo de diferentes cultivares e regiões

Modelos de classificação pelos métodos de KNN e SIMCA, foram construídos, a partir dos resultados das análises exploratórias de amostras das cultivares BRS 134 e BRS 230, das regiões de Londrina e Ponta Grossa.

O modelo construído pelo método KNN para considerar somente a região produtora, apresentou poucos erros (Figura 4.138). Já o modelo para prever tanto a cultivar quanto a região apresentou muitos erros e não foi considerado.

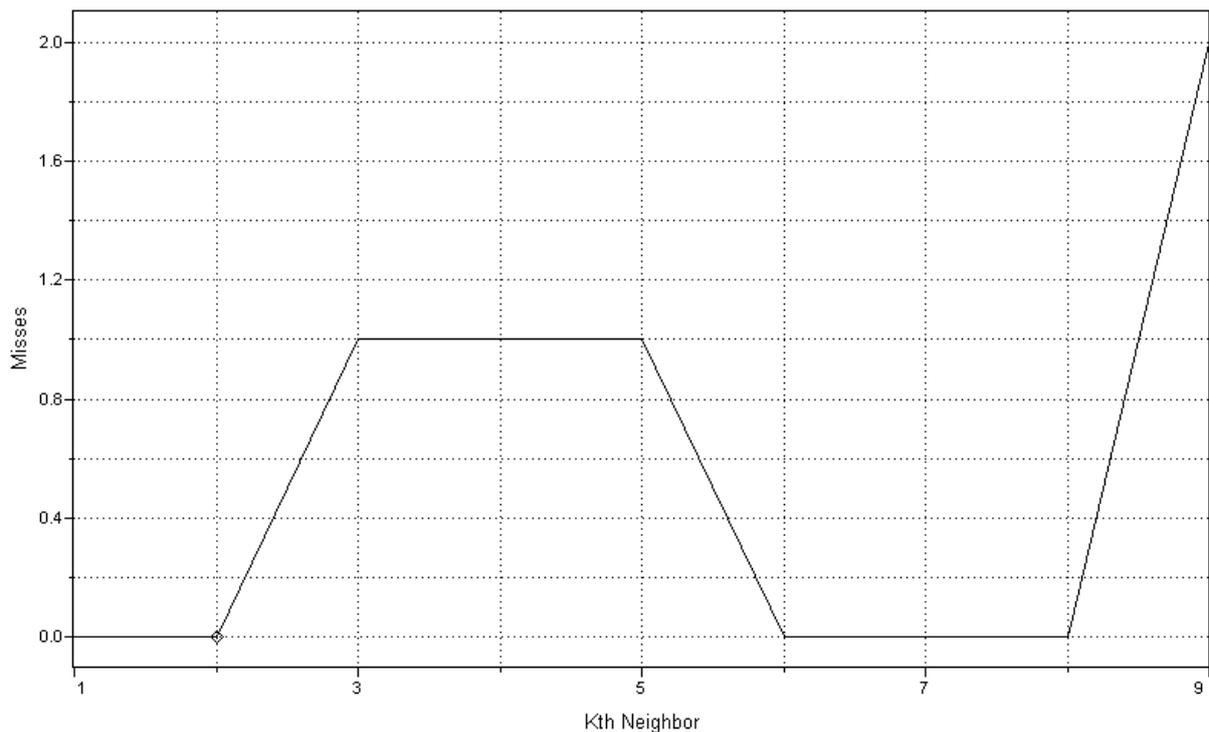


FIGURA 4.138 – Modelo de classificação obtido com as amostras das cultivares BRS 134 e BRS 230 provenientes de ambas regiões de Londrina e Ponta Grossa.

Este modelo foi capaz de prever, com grande sucesso, a origem de amostras desconhecidas para o mesmo, inclusive de cultivares de soja que não foram utilizadas na construção do modelo. Poucas predições incorretas foram

observadas (Tabela 4.12). É importante ressaltar aqui, que os espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  das amostras utilizadas na construção dos modelos, com raras exceções, não foram adquiridos na mesma data que os das amostras utilizadas para testar os modelos de classificação. Demonstra-se assim, o potencial da técnica para a determinação da origem de amostras, extremamente desejável em processos de controle de qualidade.

TABELA 4.12 – Predição de amostras desconhecidas de acordo com regiões de Londrina e Ponta Grossa.

<b>Cultivar</b>	<b>Região</b>	<b>Classificação</b>
BR0068510CVPa	Ponta Grossa	2
BR0068510CVPb	Ponta Grossa	2
BR0068510CVPc	Ponta Grossa	2
BR0068510CVPd	Ponta Grossa	2
BRS134CVLa	Londrina	1
BRS134CVLb	Londrina	1
BRS134CVLc	Londrina	1
BRS134CVLd	Londrina	1
BRS134CVPa	Ponta Grossa	2
BRS134CVPb	Ponta Grossa	2
BRS134CVPc	Ponta Grossa	1
BRS134CVPd	Ponta Grossa	1
BRS230CVLa	Londrina	1
BRS230CVLb	Londrina	1
BRS230CVLc	Londrina	1
BRS230CVLd	Londrina	1
BRS230CVPa	Ponta Grossa	2
BRS230CVPb	Ponta Grossa	2
BRS230CVPc	Ponta Grossa	2
BRS230CVPd	Ponta Grossa	1

Classe 1 = Londrina, Classe 2 = Ponta Grossa

O modelo construído pelo método SIMCA foi obtido também com os dados autoescalados, definindo-se um limite de confiança de 90%. Além disso, neste caso foram utilizados postos iguais a cinco para as duas classes referentes às duas regiões produtoras de soja, uma vez que até estes postos foram obtidos em torno de 90% de informação para ambas as classes (Tabela 4.13).

TABELA 4.13 – Posto para as classes do modelo SIMCA.

<b>Comp. Principal</b>	<b>Variância</b>	<b>Porcentagem</b>	<b>Acumulada</b>
<i>Classe 1 = Londrina</i>			
PC1	372.81140	46.60143	46.60143
PC2	168.62039	21.07755	67.67897
PC3	85.80666	10.72583	78.40480
PC4	77.92130	9.74016	88.14496
PC5	34.78976	4.34872	92.49368
PC6	20.78044	2.59756	95.09124
PC7	16.17556	2.02194	97.11318
<i>Classe 2 = Ponta Grossa</i>			
PC1	417.41953	52.17744	52.17744
PC2	96.12128	12.01516	64.19260
PC3	81.42137	10.17767	74.37027
PC4	63.70387	7.96298	82.33325
PC5	37.64473	4.70559	87.03884
PC6	36.84976	4.60622	91.64506
PC7	20.65388	2.58173	94.22679

Após a remoção de algumas amostras com comportamento anômalo as classes mostraram pouco ou nenhum resíduo. Apesar do modelo apresentar um baixo resíduo intraclasse o resíduo entre as classes foi pequeno (Tabela 4.14). Além disso, a distância entre as classes foi pequena, caracterizando um baixo poder de modelagem (Tabela 4.14).

TABELA 4.14 – Resíduos e distâncias intra e interclasses observados para o modelo SIMCA com 90% de confiança.

<b>Resíduo entre as classes</b>		
	Classe 1	Classe 2
Classe 1	0.40017	1.67160
Classe 2	0.80019	0.55673
<b>Distância entre as classes</b>		
	Classe 1	Classe 2
Classe 1	0.00000	1.70303
Classe 2	1.70303	0.00000

A predição de amostras desconhecidas utilizando-se o modelo SIMCA não teve sucesso. A maioria das amostras foram incorretamente classificadas como pertencentes a nenhuma das duas classes, tanto para a melhor classificação quanto para uma classificação seguinte (Tabela 4.15).

TABELA 4.15 - Predição das amostras desconhecidas pelo método SIMCA de acordo com a região.

Cultivar	Região	Classificação	
		Melhor	Próxima
BR0068510CVPa	Ponta Grossa	1	0
BR0068510CVPb	Ponta Grossa	0	0
BR0068510CVPc	Ponta Grossa	2	0
BR0068510CVPd	Ponta Grossa	2	0
BRS134CVLa	Londrina	0	0
BRS134CVLb	Londrina	0	0
BRS134CVLc	Londrina	0	0
BRS134CVLd	Londrina	0	0
BRS134CVPa	Ponta Grossa	0	0
BRS134CVPb	Ponta Grossa	0	0
BRS134CVPc	Ponta Grossa	0	0
BRS134CVPd	Ponta Grossa	0	0
BRS230CVLa	Londrina	1	0
BRS230CVLb	Londrina	1	0
BRS230CVLc	Londrina	1	0
BRS230CVLd	Londrina	1	0
BRS230CVPa	Ponta Grossa	2	1
BRS230CVPb	Ponta Grossa	2	1
BRS230CVPc	Ponta Grossa	2	1
BRS230CVPd	Ponta Grossa	1	0

Classe 1 = Londrina, Classe 2 = Ponta Grossa e Classe 0 = Nenhuma

As demais previsões realizadas por modelos de classificação construídos pelo método SIMCA também não apresentaram resultados satisfatórios e não serão mostrados neste trabalho.

Os resultados obtidos pelo método SIMCA são perfeitamente aceitáveis, uma vez que a construção de bons modelos pelo método SIMCA requer que um grande número de replicatas de amostras seja adquirido. Geralmente 200 ou mais replicatas e não inferior a 100 são necessárias (Manual do AMIX, 2004). A aquisição de um grande conjunto de dados, seria interessante para a elaboração um

método de classificação, pelo modelo SIMCA, para prever se amostras de sementes de soja são ou não GM.

# *Conclusões*

## 5 – CONCLUSÕES

A análise quimiométrica de simples espectros de RMN de  $^1\text{H}$  adquiridos diretamente de grãos de soja, através da técnica de HR-MAS, permitiu discriminar amostras de sementes de soja de acordo com a cultivar, origem geográfica e ainda em espécimens GM e CV. Idênticos resultados, foram obtidos com espectros na região do infravermelho, adquiridos das mesmas amostras. Da mesma forma, espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  adquiridos diretamente de folhas de plântulas de soja possibilitou a distinção entre as classes. Além disso, as análises quimiométricas permitiram determinar as diferenças, na composição química, entre as classes de amostras das sementes de soja, sem necessidade nenhuma de pré-tratamento de amostra. Algumas destas diferenças foram confirmadas através de análises tradicionais do óleo extraído das sementes de soja. Portanto, a RMN HR-MAS aliada a quimiometria, é uma ferramenta de grande potencial, para a determinação da equivalência substancial de espécimens GM. Tendo como objetivo verificar as conseqüências causadas pelas modificações genéticas, principalmente os efeitos não intencionais, que não foram os objetivos destas modificações.

No caso das amostras de soja analisadas, o método revelou que os espécimens geneticamente modificados produzem um maior teor de ésteres graxos insaturados em detrimento ao teor de aminoácidos e/ou glicosídeos. Neste contexto, também foi possível determinar as diferenças na composição química das sementes de acordo com as cultivares e regiões onde foram produzidas. Além disso, a RMN HR-MAS em conjunto com a quimiometria permitiu verificar que uma das cultivares de soja GM, não seguiu o mesmo padrão de alteração na composição química, que as demais cultivares GM para tolerar o herbicida glifosato. Esta observação deve receber maior atenção, antes da recomendação desta cultivar para plantio com fins comerciais.

Através de modelos de classificação, construídos a partir dos dados de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$ , foi possível prever a cultivar, origem geográfica e até mesmo a origem genética, em alguns casos, de amostras desconhecidas. Demonstrando a potencialidade de aplicação do método na rastreabilidade e certificação da origem de alimentos. Fator importante para agregação de valor no comércio internacional. No caso de OGMs, o principal atrativo, é que o método independente do tipo de

modificação genética, podendo ser empregado no reconhecimento de qualquer OGM.

O emprego da seqüência de pulos CPMG possibilitou aumentar a resolução dos espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  e com isso um maior número de informações, o que foi importante para que a quimiometria pudesse distinguir melhor as classes de amostras. Além da seqüência de pulsos, uma série de outros parâmetros, como o número de varreduras para a aquisição dos espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$ , número de replicaís necessárias, transformações e pré-processamentos foram avaliados para a otimização dos experimentos.

Além disso, neste trabalho foi encontrado uma nova forma, mais simples, para se calcular a composição de triacilgliceróis em óleos vegetais, através de espectros de RMN de  $^1\text{H}$  do óleo.

Finalmente, como perspectivas, a continuação deste trabalho visa o estudo de outras cultivares e amostras de campo GM, com a finalidade de aumentar o banco de dados, bem como o estudo de outras modificações genéticas da soja é até de outras espécies. Além disso, estudar as conseqüências, da aplicação do herbicida nas plantas, sobre a composição química das sementes de soja, um aspecto importante para a equivalência substancial.

## *Referências bibliográficas*

## 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAM, T. M.; ALAM, M. K. Chemometrics analysis of nuclear magnetic resonance spectroscopy data. *Spectroscopy*, **16**: 19, 2001.
- ALBERTI, E.; HUMPFER, E.; SPRAUL, M.; GILBERT, S. M.; TATHAM, A. S.; SHEWRY, P. R.; GIL, A. M. A high resolution  $^1\text{H}$  magic angle spinning NMR study of a High-M-r subunit of wheat gluten. *Biopolymers*, **58**: 33, 2001.
- BAILEY, N. J. C.; OVEN, M.; HOLMES, E.; NICHOLSON, J. K.; ZENK, M. H. Metabolomic analysis of the consequences of cadmium exposure in *Silene cucubalus* cell cultures via  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy and chemometrics. *Phytochemistry*, **62**: 851, 2003.
- BARISON, A. *Indução de fitoalexinas em cotilédones de soja*. Dissertação de Mestrado: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2000.
- BEEBE, K.; PELL, R.; SEAHOLTS, N. B. Chemometric: A practical guide. Ed. John Wiley & Sons, New York, 1998.
- 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  $^1\text{H}$  spectra of apple juices: discrimination between apple varieties. *Food Chemistry*, **61**: 207, 1998.
- BELTON, P. S.; DELGADILHO, I.; GIL, A. M.; CASUSCELLI, F.; COLQUHOUN, I. J.; DENIS, M. J.; SPRAUL, M. High field proton NMR studies of apple juices. *Magnetic Resonance in Chemistry*, **35**: S2, 1997.
- BELTON, P. S.; DELGADILHO, I.; HOLMES, E.; NICHOLLS, A.; NICHOLSON, J. K.; SPRAUL, M. Use of high field  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy for the analysis of liquid foods. *Journal of Agricultural and Food Science*, **44**: 1483, 1996.
- BEVILAQUA, G. A. P.; BONATO, E. R.; ROMAN, E. S. Identificação de soja tolerante a glifosato através do teste de germinação. *Revista Brasileira de Herbicidas*, **1**: 261, 2000.
- BOLLARD, M. E.; GARROD, S.; HOLMES, E.; LINDON, J. C.; HUMPFER, E.; SPRAUL, M. High-resolution  $^1\text{H}$  and  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  magic angle spinning NMR spectroscopy of rat liver. *Magnetic Resonance in Medicine*, **44**: 201, 2000.
- BRERETON, R. G. CHEMOMETRICS: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant, John Wiley & Sons 2002.
- BRESCIA, M. A.; Di MARTINO, G.; FARES, C.; Di FONZO, N.; PLATINI, C.; GHELLI, S.; RENIERO, F.; SACCO, A.; Characterisation of Italian Durum Wheat Semolina by Means of Chemical Analytical and Spectroscopy Determinations. *Cereal Chemistry*, **79**: 239, 2002a.

- BRESCIA, M. A.; CALDAROLA, V.; De GIGLIO, A.; BENEDETTI, D.; FANIZZI, F. P.; SACCO, A. Characterisation of geographical origin of Italian red wines based on traditional and nuclear magnetic resonance spectrometric determinations. *Analytica Chimica ACTA*, **458**: 177, 2002b.
- BROBERG A, KENNE L. Use of high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance spectroscopy for *in situ* studies of low-molecular-mass compounds in red algae. *Analytical Biochemistry*, **284**: 367, 2000.
- BROBERG, A.; KENNE, L.; PEDERSEN, M. In-situ identification of major metabolites in the red alga *Gracilariopsis lemaneiformis* using high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Planta*, **206**: 300, 1998.
- BUHR, T.; SATO, S.; EBRAHIM, F.; XING, A.; ZHU, Y.; MATHIESEN, M.; SCHWEIGER, B.; KINNEY, A.; STASWICK, P.; CLEMENTE, T. Ribozyme termination of RNA transcripts down-regulate seed fatty acid genes in transgenic soybean. *The plant Journal*, **30**: 155, 2002.
- CELLINI, F.; CHESSON, A.; COLQUHOUN, I.; CONSTABLE, A.; DAVIES, H. V.; Engel, K. H.; GATEHOUSE, A. M. R.; KÄRENLAMPI, S.; KOK, E. J.; LEGUAY, J. J.; LEHESRANTA, S.; NOTEBORN, H. P. J. M.; PEDERSEN, J.; SMITH, M. Unintended Effects and their Detection in Genetically Modified Crops. *Food and Chemical Toxicology*, **42**: 1089, 2004.
- CHARLTON, A. J.; FARRINGTON, W. H. H.; BRERETON, P. Application of  $^1\text{H}$  NMR and multivariate statistics for screening complex mixtures: quality control and authenticity of instant coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**: 3098, 2002.
- CHENG, L. L.; LEAN, C. L.; BOGDANOVA, A.; WRIGHT, S. C.; ACKERMAN, J. L.; BRADY, T. J.; GARRIDO, L. Enhanced resolution of proton NMR spectra of malignant lymph nodes using magic-angle spinning. *Magnetic Resonance in Medicine*, **36**: 653, 1996.
- CHOI, H. K.; CHOI, Y. H.; VERBENE, M.; LEFEBER, A. W. M.; ERKELENS, C.; VERPOORTE, R. Metabolic fingerprinting of wild type and transgenic tobacco plants by  $^1\text{H}$  NMR and multivariate analysis technique. *Phytochemistry*, **65**: 857, 2004.
- CLARIDGE, T. D. W. *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*. Ed. Pergamon, Amsterdam, 1999.
- CTNBio - Comissão Técnica Nacional de Biossegurança: [www.ctnbio.gov.br](http://www.ctnbio.gov.br), 2004.
- CONNER, J. A.; JACOBS, J. M. E. Genetic engineering of crops as potential source of genetic hazard in the human diet. *Mutation Research*, **443**: 223, 1999.
- CropBiotech Net. Global status of GM crops: [www.isaaa.org](http://www.isaaa.org), 2003.

- DUARTE, I. F.; BARROS, A.; ALMEIDA, C.; SPRAUL, M.; GIL, A. M. Multivariate analysis of NMR and FTIR data as potential tool for the quality control of beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**: 1031, 2004.
- DUARTE, I.; BARROS, A.; BELTON, P. S.; RIGHELATO, R.; SPRAUL, M.; HAMPFER, E.; GIL, A. M. High resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate analysis for the characterisation of beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**: 2475, 2002.
- DUKE, S. O.; RIMANDO, A. M.; PACE, P. F.; REDDY, K. N.; SMEDA, R. J. Isoflavone, glyphosate, and aminomethylphosphonic acid levels in seeds of glyphosate-treated, glyphosate-resistant soybean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**: 340, 2003.
- EADS, T. M.; BRYANT, R. G. High-resolution proton NMR spectroscopy of milk, orange juice and apple juice with efficient suppression of the water peak. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **34**: 834, 1986.
- EMBRAPA. Recomendações técnicas para a cultura de soja na região central do Brasil 1999/2000. *Circular Técnica*, Londrina 1999.
- ENTRANSFOOD: an European network safety assessment of genetically modified food crops. ENTRANSFOOD is subsidised by the European Commission in the 5<sup>th</sup> framework programme and co-ordinated by RIKILT - Institute of Food Safety; [www.entransfood.com](http://www.entransfood.com), 2005.
- FAUHL, C.; RENIERO, F.; GUILLOU, C. <sup>1</sup>H NMR as a tool for the analysis of mixtures of virgin olive oil with oils of different botanical origin. *Magnetic Resonance in Chemistry*, **38**: 436, 2000.
- FORVEILLE, L.; VERCAUTEREN, J.; RUTLEDGE, D. N. Multivariate statistical analysis of two-dimensional NMR data to differentiate grapevine cultivars and clones. *Food Chemistry*, **57**: 441, 1996.
- FUNGUETTO, C. I.; TILLMANN, M. A. A.; VILLELA, F. A.; DODE, L. B. Detecção de sementes de soja geneticamente modificada tolerante ao herbicida glifosato. *Revista Brasileira de Sementes*, **26**: 130, 2004.
- GARROD, S.; HOLMES, E.; HUMPFER, E.; SPRAUL, M. HR-MAS: a new tool for semisolid samples. *Bruker Report*, **146**: 18, 1998.
- GARROD, S.; HUMPFER, E.; CONNOR, S. C.; CONNELLY, J. C.; SPRAUL, M. NICHOLSON, J. K. HOLMES, E. High-resolution <sup>1</sup>H NMR and magic angle spinning NMR spectroscopic investigation of the biochemical effects of 2-bromoethanamine in intact renal and hepatic tissues. *Magnetic Resonance in Medicine*, **45**: 781, 2001.
- GASKELL, G.; BAUER, M. W.; DURANT, J.; ALLUM, N. C. Worlds apart? The reception of genetically modified foods in Europe and the U. S. *Science*, **285**: 384, 1999.

- GAVAGHAN, C. L.; HOLMES, E.; LENZ, E.; WILSON, I. D.; NICHOLSON, J. K. An NMR-based metabonomic approach to investigate the biochemical consequences of genetic strain differences: application to the C57BL10J and Alpk : ApfCD mouse. *FEBS Letters*, **484**: 169, 2000 .
- GIL, A. M.; ALBERTI, E.; TATHAM, A. S. BELTON, P. S.; HUMPFER, E.; SPRAUL, M. A magic angle spinning NMR study of the wheat storage protein omega-gliadins. *Magnetic Resonance in Chemistry*, **35**: S101, 1997.
- GIL, A. M.; DUARTE, I. F.; DELGADILHO, I.; COLQUHOUN I. J.; CASUSCELLI, F.; HUMPFER E.; SPRAUL, M. Study of the Compositional changes of Mango during Ripening by Use of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**: 1524, 2000.
- HALL, R.; BEALE, M.; FIEHN, O.; HARDY, N.; SUMNER, L.; BINO, R. Plant metabolomics as the missing link in functional genomics strategies. *Plant Cell*, **14**: 1437, 2002.
- HIDALGO, F. J.; GÓMEZ, G.; NAVARRO, J. L.; ZAMORA, R. Oil stability prediction by high-resolution <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**: 5825, 2002.
- HOLMES, E.; FOXALL, P. J. D.; NICHOLSON, J. K. NEILD, G. H.; BROWN, S. M.; BEDDELL, C. R.; SWEATMAN, B. C.; RAHR, E.; LINDON, J. C.; SPRAUL, M.; NEIDIG, P. Automatic data reduction and pattern-recognition methods for analysis of <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectra of human urine from normal and pathological sates. *Analytical Biochemistry*, **220**: 284, 1994.
- HOLMES, E.; NICHOLL, A. W.; LINDON, J. C.; CONNOR, S. C.; CONOLLELLY, J. C.; HASELDON, J. N.; DAMMENT, S. J. P.; SPRAUL, M.; NEIDIG, P.; NICHOLSON, J. K. Chemometric methods for toxicity classification based on NMR spectra of biofluids. *Chemical Research Toxicology*, **13**: 471, 2000.
- HURST, C. D.; KNIGHT, A.; BRUCE, I. J. PCR detection of genetically modified soya and maize in foodstuffs. *Molecular Breeding*, **5**: 579, 1999.
- JACCAUD, E.; HOHNE, M.; MEYER, R. Assessment of screening methods for the identification of genetically modified potatoes in raw materials and finished products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**: 550, 2003.
- JAMES, D.; SCHMIDT, A.; WALL, E.; GREEN, M.; MASRI, S. Reliable detection and identification of genetically modified maize, soybean and canola by multiplex PCR analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**: 5829, 2003.
- KAISER, C. R. RMN 2D: Detecção inversa e gradiente de campo na determinação estrutural de compostos orgânicos. *Química Nova*, **23**: 231, 2000.
- KNOTHE, G.; KENAR, J. A. Determination of the fatty acid profile by <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **106**: 88, 2004.

- KLETER, G. A.; KUIPER, H. A. GM crops – is there a food safety issue? *Pesticide Outlook*, **13**: 25, 2002.
- KÖNIG, A.; COCKBURN, A.; CREVEL, R. W. R.; DEBRUYNE, E.; GRAFSTROEM, R.; HAMMERLING, U.; KIMBER, I.; KNUDSEN, I.; KUIPER, H. A.; PEIJNENBURG, A. A. C. M.; PENNINKS, A. H.; POULSEN, M.; SCHAUZU, M.; WAL, J.M. Assessment of the safety of foods derived from genetically modified (GM) crops. *Food and Chemical Toxicology*, **42**: 1047, 2004.
- KOVACS, H.; LOSS, S.; MAREK, D.; MOSKAU, D.; SCHETT, O. CryoProbe News. *Spin Report*, **20**: 152, 2003.
- KOWALSKI, B. R.; BENDER, C. F. Pattern recognition a powerful approach to interpreting chemical data. *Journal of the American Chemical Society*, **94**: 5632, 1972a.
- KOWALSKI, B. R.; BENDER, C. F. The k-nearest neighbour classification rule (Pattern recognition) applied to nuclear magnetic resonance spectral interpretation. *Analytical Chemistry*, **44**: 1405, 1972b.
- KRAINER, E.; STARK, R. E. NAIDER, F.; ALAGRAMAN, K.; BECKER, J. M. Direct observation of cell wall glucans in whole cells of *Saccharomyces cerevisiae* by magic-angle spinning  $^{13}\text{C}$  NMR. *Biopolymers*, **34**: 1627, 1994.
- KRUZE, N. D.; TREZZI, M. M.; VIDAL, R. A. Herbívidas inibidores da EPSPS: revisão de literatura. *Revista Brasileira de Herbícidas*, **1**: 139, 2000.
- KUIPER, H. A.; KLETER, G. A.; NOTEBORN, H. P. J. M.; KOK, E. J. Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods. *The Plant Journal*, **27**: 503, 2001.
- KUIPER, H. A.; KLETER, G. A.; NOTEBORN, H. P. J. M.; KOK, E. J. Substantial equivalence – an appropriate paradigm for the safety assessment of genetically modified foods? *Toxicology*, **181-182**: 427, 2002.
- Le GALL, G.; COLQUHOUN I. J.; DAVIS, A. L.; COLLINS, G. J.; VERHOEYEN, M. E. Metabolite profiling of tomato (*Lycopersicon esculentum*) using  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy as a tool to detect potential unintended effects following a genetic modification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**: 2447, 2003.
- Le GALL, G.; PUAUAD, M.; COLQUHOUN, I. J. Discrimination between orange juice and pulp wash by  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy: Identification of marker compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**: 580, 2001.
- LILGE, C. G.; TILLMANN, M. A. A.; VILLELA, F. A.; DODE, L. B. Identificação de sementes de arroz transformado geneticamente resistente ao herbicida glifosinato de amônio. *Revista Brasileira de Sementes*, **25**: 87, 2003.

- LIPP, M.; BLUTH, A.; EYQUEM, F.; KRUSE, L.; SCHIMMEL, H.; Van Den EED, G.; ANKLAM, E. Validation of a method based on polymerase chain reaction for the detection of genetically modified organisms in various processed foodstuffs. *European Food Research Technology*, **212**: 497, 2001.
- MANETTI, C.; BIANCHETTI, C.; BIZZARRI, M.; CASCIANI, L.; CASTRO, C.; D'ASCENZO, G.; DELFINI, M.; Di COCCO, M. E.; LAGANÁ, A.; MICCHELI, A.; MOTTO, M.; CONTI, F. NMR-based metabonomic study of transgenic maize. *Phytochemistry*, **65**: 3187, 2004.
- MANN, J. *Chemical aspects of biosynthesis*. Oxford Chemistry Primer, Oxford, 1994.
- MANNINA, L.; PATUMI, M.; PROIETTI, N.; BASSI, D.; SEGRE, A. L. Geographical characterisation of Italian extra virgin olive oils using high-field  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**: 2687, 2001.
- MANNINA, L.; SOBOLEV, A. P.; SEGRE, A. Olive oil as seen by NMR and chemometrics. *Spectroscopy Europe*, **115**: 6, 2003.
- Manual do programa AMIX<sup>®</sup> de análises quimiométricas. Bruker Biospin, Karlsruhe, 2004.
- MAVROMOUSTAKOS, T.; ZERVOU, M.; BONAS, G.; KOLOCOURIS, A.; PETRAKIS, P. A novel analytical method to detect adulteration of virgin olive oil by other oils. *Journal of the American Oil Chemistry Society*, **77**: 405, 2000.
- MAVROMOUSTAKOS, T.; ZERVOU, M.; THEODOROPOULOU, E.; BONAS, G.; DAY, M.; HELMIS, A.  $^{13}\text{C}$  NMR analysis of the triacylglycerol composition of Greek virgin olive oils. *Magnetic Resonance in Chemistry*, **35**: S3, 1997.
- MIDDLETON, D. A.; BREDLEY, D. P.; CONNOR, S. C.; MULLINS, P. G.; REID, D. G. The effects of sample freezing of proton magic angle spinning NMR spectra of biological tissue. *Magnetic Resonance in Medicine*, **40**: 166, 1998.
- MILLIS, K.; WEYBRIGTH, P.; CAMPBELL, N.; FLETCHER, J. A.; FLETCHER, C. D.; CORY, D. G.; SINGER, S. Classification of human liposarcoma and lipoma using ex vivo proton NMR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Medicine*, **41**: 257, 1999.
- MIRAGLIA, M.; BERDAL, K. G.; BRERA, C.; CORBISIER, P.; HOLST-JENSEN, A.; KOK, E. J.; MARVIN, H. J. P.; SCHIMMEL, H.; RENTSCH, J.; VAN RIE, J. P. F.; ZAGON, J. Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain. *Food and Chemical Toxicology*, **42**: 1157, 2004.
- MOKA, D.; VORREUTHER, R.; SCHICHA, H.; SPRAUL, M.; HUMPFER, E.; LIPINSKI, M.; FOXALL, P. J. D.; NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C. Magic angle spinning proton nuclear magnetic resonance spectroscopic analysis of intact kidney tissue samples. *Analytical Communications*, **34**: 107, 1997.
- Monsanto Company: [www.monsanto.com](http://www.monsanto.com), 2004.

- NI, Q. W.; EADS, T. M. Liquid –phase composition of intact fruit tissue measured by high-resolution proton NMR. *Journal of Agricultural and Food Science*, **41**: 1026, 1993a.
- NI, Q. W.; EADS, T. M. Analysis by proton NMR of changes in liquid-phase and solid-phase components during ripening of banana. *Journal of Agricultural and Food Science*, **41**: 1035, 1993b.
- NI, Q. W.; Eads, T. M. Low-speed magic angle spinning Carbon 13 NMR of fruit tissue. *Journal of Agricultural and Food Science*, **40**: 1507, 1992.
- NICHOLSON, J. K.; WINLSON, I. D. High-resolution proton magnetic-resonance spectroscopy of biological-fluids. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, **21**: 449, 1989.
- NOTEBORN, H. P. J. M.; Lomen, A.; Van Der JAGT, R. C.; Chemical fingerprint for the evaluation of unintended secondary metabolic changes in transgenic foods crops. *Journal of Biotechnology*, **77**: 103, 2000.
- OBERT, J. C.; RIDLEY, W. P.; SCHNEIDER, R. W.; RIORDAN, S. G.; NEMETH, M. A.; TRUJILLO, W. A.; BREEZE, M. L.; SORBET, R. ASTWOOD, J. D. The composition of grain and forage from glyphosate tolerant wheat MON 71800 is equivalent to that of conventional wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**: 1375, 2004.
- OTT, K. H.; ARANÍBAR, N.; SINGH, B.; STOCKTON, G. W. Metabonomics classifies pathways affected by bioactive compounds. Artificial neural network classification of NMR spectra of plant extracts. *Phytochemistry*, **62**: 971, 2003.
- PADGETTE, S. R.; TAYLOR, N. B.; NIDA, D. L.; BAILEY, M. R.; MacDONALD, J.; HOLDEN, L. R.; FUCHS, R. L. The composition of glyphosate-tolerant soybean seeds is equivalent to that of conventional soybeans. *Journal of Nutrition*, **126**: 702, 1996.
- PEANO, C.; SAMSON, M. C.; PALMIERI, L.; GULLI, M.; MARMIROLI, N. Qualitative and quantitative evaluation of the genomic DNA extracted from GMO and non-GMO foodstuffs with for different extraction methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**: 6962, 2004.
- PERLAK, F. J.; STONE, T. B.; MUSKOPF, Y. M.; PETERSEN, L. J.; PARKER, G. B.; MCPHERSON, S. A.; WYMAN, J.; LOVE, S.; REED, G.; BIEVER, D.; FISHOFF, D. A. Genetically improved potatoes: protection from damage by colorado potato beetles. *Plant Molecular Biology*, **22**: 313, 1993.
- RAAMSDONK, L. M.; TEUSINK, B.; BROADHURST, D.; ZHANG, N.; HAYES, A.; WALSH, M. C.; BERDEN, J. A.; BRINDLE, K. M.; KELL, D. B.; ROWLAND, J. J.; WESTERHOFF, H. V.; VAN DAN, K.; OLIVER, S. G. A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations. *Natural Biotechnology*, **19**: 45, 2001.

- REDDY, K. N.; RIMANDO, A. M.; DUKE, S. O. Aminomethylphosphonic acid, a metabolite of glyphosate, causes injury in glyphosate-treated, glyphosate-resistant soybean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**: 5139, 2004.
- RHO, J. K.; LEE, T.; JUNG, S.; KIM, T.; PARK, Y.; KIM, Y. Qualitative and quantitative PCR methods for detection of three lines of genetically modified potatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**: 3269, 2004.
- ROBERTS, T. R.; HUTSON, D. H.; LEE, P. W.; NICHOLLS, P. H. Metabolic pathways of agrochemicals, Part 1: *Herbicides and plant growth regulations*. The Royal Society of Chemistry, Londres, 1998.
- RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. IAPAR: *Guia de herbicidas*, Londrina, 1995.
- ROTT, M. E.; LAWRENCE, T. S. WALL, E. M.; GREEN, M. J. Detection and quantification of Roundup Ready soy in foods by conventional and real-time polymerase chain reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**: 5223, 2004.
- SACCHI, R.; ADDEO, F.; PAOLILLO, L.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR of virgin olive oil: A overview. *Magnetic Resonance in Chemistry*, **35**: S133, 1997.
- SACCHI, R.; PATUMI, M.; FONTANAZZA, G.; BARONE, P.; FIORDIPONTI, P.; MANNINA, L.; ROSSI, E.; SEGRE, A. L. A high-field  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance study of the minor components in virgin olive oils. *Journal of the American Oil Chemical Society*, **73**: 747, 1996.
- SACCO, A.; BOLSI, I. N.; MASSINI, R.; SPRAUL, M. HUMPFER E.; GHELLI, S. Preliminary Investigation on the Characterisation of Durum Wheat Flours Coming from Some Areas of South Italy by Means of  $^1\text{H}$  High-Resolution Magic Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**: 4242, 1998.
- SANDERS, J. K. M.; HUNTER, B. K. *Modern NMR spectroscopy: A guide for chemistry*, Ed. Oxford University Press, Oxford, 1987.
- SAYER, B. G.; PRESTON, C. M. A carbon 13 magic angle spinning nuclear magnetic resonance study of the germination of conifer seed. *Seed Science Technology*, **24**: 321, 1996.
- SEVENCOLORS: [www.sevencolors.org](http://www.sevencolors.org).
- SHAW, A. D.; Di CAMILLO, A.; VLAHOV, G.; JONES, A. BIANCHI, G.; ROWLAND, J.; KELL, D. B. Discrimination of the variety and region of origin of extra virgin olive oils using  $^{13}\text{C}$  NMR and multivariate calibration with variable reduction. *Analytica Chimica ACTA*, **348**: 357, 1997.
- SPRAUL, M; HUMPFER, S.; KELLER, S.; SCHÄFER, H. The analysis of beverages by NMR-based statistics. *Spin Report*, **154/155**: 26, 2005.

- SPRAUL, M.; STEFFAN, B. New NMR tools for the analysis of natural products. *Bruker Report*, **22**: 148, 2000.
- SUMNER, L. W.; MENDES, P.; DIXON, R. A. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochemistry*, **62**: 817, 2003.
- TACKE, E.; SALAMINI, F.; ROHDE, W. Genetic engineering of potato from broad-spectrum protection against virus infection. *Natural Biotechnology*, **14**: 1597, 1996.
- TAYLOR, N. B.; FUCHS, R. L.; McDONALD, J.; SHARIFF, A. R.; PADGETTE, S. R. Compositional analysis of glyphosate-tolerant soybeans treated with glyphosate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**: 4469, 1999.
- TILLMANN, M. A. A.; WEST, S. H. Identification of genetically modified soybean (*Glycine max* L. Merr.) seeds resistant to glifosate. *Scientia Agricola*, **61**: 336, 2004.
- VAITILINGOM, M.; PIJNENBURG, H.; GENDRE, F.; BRINGNON, P. Real-time quantitative PCR detection of genetically modified Maximizer maize and Roundup Ready soybean in some representative foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**: 5261, 1999.
- VIGLI, G.; PHILIPPDIS, A.; SPYROS, A. DAIS, P. Classification of edible oils by employing  $^{31}\text{P}$  and  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy in combination with multivariate statistical analysis. A proposal for the detection of seed oils adulteration in virgin olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**: 5715, 2003.
- VLAHOV, G. Quantitative  $^{13}\text{C}$  NMR method using the DEPT pulse sequence for the detection of olive oil adulteration with soybean oil. *Magnetic Resonance in Chemistry*, **35**: S8, 1997.
- VLAHOV, G.; CHEPKWONY, P. K.; NDALUT, P. K.  $^{13}\text{C}$  NMR characterisation of triacylglycerols of *Moringa oleifera* seed oil: An "Oleic-Vaccenic Acid" oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**: 970, 2002.
- VLAHOV, G.; Del RE, P.; SIMONE, N. Determination of geographical origin of olive oils using  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy. I – Classification of olive oils of the Puglia region with denomination of protected origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**: 5612, 2003.
- VOGELS, J. T. W. E.; TERWEL, R.; TAS, A. C.; Van Den BERG, F.; DUCKEL, F.; Van Der GREEF, J. Detection of adulteration in orange juice by a new screening method using proton NMR spectroscopy in combination with pattern recognition techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **44**: 175, 1996.
- VOLLENHOFER, S.; BURG, K.; SCHIMIDT, J.; KROATH, H. Genetically modified organisms in food-screening and specific detection by polymerase chain reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**: 5038, 1999.

- WARD, J. L.; HARRIS, C.; LEWIS, J.; BEALE, M. H. Assessment of  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy and multivariate analysis as a technique for metabolite fingerprinting of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*, **62**: 949, 2003.
- WEYBRIGTH, P.; MILLINS K.; CAMPBELL, N.; CORY, D. G.; SINGER, S. Gradient, high-resolution, magic angle spinning  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy of intact cells. *Magnetic Resonance in Medicine*, **39**: 337, 1998.
- YANG, L.; PAN, A.; JIA, J.; DING, J.; CHEN, J.; CHENG, H.; ZHANG, C.; ZHANG, D. Validation of a tomato-specific gene, LAT52, used as an endogenous reference gene in qualitative and real-time quantitative PCR detection of transgenic tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**: 183, 2005.
- ZAMORA, R.; GÓMEZ, G.; HIDALGO, F. J. Classification of vegetable oils by high-resolution  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy using chromatographically obtained oil fraction. *Journal of the American Oil Chemical Society*, **79**: 267, 2002.