

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

**“EMPREGO DA RMN ALIADA À QUIMIOMETRIA  
NO CONTROLE DE QUALIDADE DE SUCO DE  
LARANJA”**

**Clayton Rodrigues de Oliveira\***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA, área de concentração: QUÍMICA GERAL.

**Orientador: Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira**

**\* bolsista CAPES**

**São Carlos - SP  
2012**

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

O48er Oliveira, Clayton Rodrigues de.  
Emprego da RMN aliada à quimiometria no controle de  
qualidade de suco de laranja / Clayton Rodrigues de  
Oliveira. -- São Carlos : UFSCar, 2013.  
86 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São  
Carlos, 2012.

1. Química quantitativa. 2. Ressonância magnética  
nuclear. 3. Quimiometria. 4. Suco de laranja. I. Título.

CDD: 547.35 (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 Mestrado Acadêmico**

---

*Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de dissertação de Mestrado Acadêmico do candidato Clayton Rodrigues de Oliveira, realizada em 30 de março de 2012:*



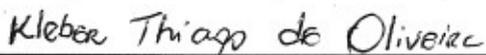
---

Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira



---

Prof. Dr. Andersson Barison



---

Prof. Dr. Kleber Thiago de Oliveira

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho em especial aos meus pais, Nicomedes e Maria Raimunda, a minha irmã Thuanni e seu esposo Elismar, e a todos meus familiares e amigos por estarem sempre comigo nos momentos importantes da minha vida.*

## EPÍGRAFE

***“Temos o destino que merecemos. O nosso destino está de acordo com os nossos méritos”.***

***Albert Einstein***

## **AGRADECIMENTOS**

*A Deus, por todo dia me abençoar, ampliar meus horizontes e iluminar minha vida.*

*A meus pais Nicomedes e Maria Raimunda, minha irmã Thuanni e minha avó Adelina, por todo amor, carinho, força e dedicação em todos os momentos da minha vida.*

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

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

*Aos companheiros do laboratório de RMN: Chicão, Claudimar, Daniele, Darlene, Edu, Elenilson, Katyúscia, Lorena, Luiz, Lyege, Nazish, Sergio, Sheraz e Tatiane pela amizade, discussões, aprendizado e colaborações.*

*Aos técnicos do laboratório de RMN, Dona Lú e Sr. Paulo pela amizade, ensinamentos e descontrações.*

*Aos companheiros Cidão, Dougão, Israel Cívico, Jamão, Japa, Leila, Marcio S. e P. Henrique pela amizade, sugestões e críticas durante a realização deste trabalho.*

*A todos meus familiares, que sempre apostaram, apoiaram e sempre estiveram do meu lado nas minhas decisões, além da alegria que sentem em todas as minhas conquistas.*

*A todos os amigos de Morro Agudo de Goiás, Anápolis e São Carlos, por estarem ao meu lado em todos os momentos mais importantes da minha vida.*

*As funcionárias da secretaria da pós-graduação Ariane, Cristina e Luciani pelo atendimento atencioso.*

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

*A CAPES pela bolsa concedida.*

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\delta$	Deslocamento químico
apk0.noe	Algoritmo para correção automática de fase e linha de base em experimentos com efeito nuclear Overhauser
aq	Tempo de aquisição
$B_0$	Campo magnético externo
$B_1$	Campo magnético gerado pelo pulso de radiofrequência
C1	Suco comercial 01
C2	Suco comercial 02
C3	Suco comercial 03
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-EPS-RMN	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência combinado com Extrator de Fase Sólida acoplada à Ressonância Magnética Nuclear
CLAE-RMN	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Ressonância Magnética Nuclear
CLAE-RMN-EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Ressonância Magnética Nuclear e Espectrometria de Massas
d1	Tempo de espera entre cada aquisição
d8	Tempo de mistura
DMP	Dimetilprolina
EM	Espectrometria de massas
FT-IR	Espectroscopia na região do infravermelho utilizando Transformada de Fourier
GABA	Ácido gama-aminobutírico
gCOSY	<i>gradient – Correlation Spectroscopy</i>
gHMBC	<i>gradient – Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
gHSQC	<i>gradient - Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
GLX	Ácido Galacturônico
lb	Fator de multiplicação exponencial aplicada no FID

## ***Lista de Abreviaturas***

---

<b>N1</b>	Suco natural da laranja pêra Rio
<b>N2</b>	Suco natural da laranja Bahia
<b>N3</b>	Suco natural da laranja murcote
<b>N4</b>	Suco natural da laranja lima
<b>N5</b>	Suco natural da laranja lima da Pérsia
<b>ns</b>	Número de promediações
<b>p0</b>	Duração do pulso de radiofrequência para um dado ângulo específico
<b>p1</b>	Duração do pulso de radiofrequência – Pulso de 90°
<b>PC</b>	<i>Principal Component</i> – Componente Principal
<b>PCA</b>	<i>Principal Component Analysis</i> – Análise de Componentes Principais
<b>PCR</b>	<i>Principal Regression Components</i> – Regressão por Componentes Principais
<b>pldb9</b>	Atenuação do pulso de pré-saturação em Decibéis
<b>PLS</b>	<i>Partial Least Squares Regression</i> – Regressão por Mínimos Quadrados Parciais
<b>rf</b>	Irradiação por radiofrequência
<b>RMN</b>	Ressonância Magnética Nuclear
<b>RMSECal</b>	<i>Root Mean Square Error of Calibration</i> – Erro Quadrático Médio de Calibração
<b>RMSEVal</b>	<i>Root Mean Square Error of Validation</i> – Erro Quadrático Médio de Validação
<b>SECal</b>	<i>Standard Error of Calibration</i> – Erro Padrão de Calibração
<b>SEVal</b>	<i>Standard Error of Validation</i> – Erro Padrão de Validação
<b>si</b>	Número de pontos utilizados no processamento dos espectros
<b>SNIF-NMR</b>	<i>Site Specific Natural Isotopic Fractionation studied by Nuclear Magnetic Resonance</i>
<b>swh</b>	Janela espectral em Hertz
<b>td</b>	Número de pontos utilizados na aquisição do espectro
<b>TMSP-d4</b>	Trimetilsililpropionato de sódio

---

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 3.1.</b> Informações das amostras comerciais de suco de laranja descritas pelos fabricantes.....	21
<b>Tabela 3.2.</b> Códigos, lotes e períodos de análises para as amostras comerciais de suco de laranja.....	22
<b>Tabela 3.3.</b> Espécies e nomes populares das amostras de laranjas analisadas.....	23
<b>Tabela 3.4.</b> Códigos, lotes e períodos de análises para as amostras naturais de suco de laranja.....	23
<b>Tabela 3.5.</b> Parâmetro de referência <i>versus</i> variáveis medidas utilizadas na calibração univariada.....	27
<b>Tabela 4.1.1.</b> Metabólitos caracterizados nas amostras de suco de laranja.....	32
<b>Tabela 4.2.2.1.</b> Quantificação relativa (área do metabólito/área do TMSP-d <sub>4</sub> ) dos metabólitos presentes nas amostras de suco de laranja comercial..	57
<b>Tabela 4.2.2.2.</b> Quantificação relativa (área do metabólito/área do TMSP-d <sub>4</sub> ) dos metabólitos presentes nas amostras de suco de laranja natural.....	66
<b>Tabela 4.3.1.</b> Valores médios da concentração de etanol e da intensidade máxima do sinal.....	68
<b>Tabela 4.3.2.</b> Valores médios das concentrações de etanol utilizados para a construção dos modelos PCR e PLS.....	71
<b>Tabela 4.3.3.</b> Parâmetros obtidos nas calibrações multivariadas e univariada.....	72
<b>Tabela 4.3.4.</b> Valores absolutos para as concentrações de etanol presentes nas amostras comerciais e naturais de suco de laranja.....	74

---

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1.1.5.1.</b> Esquema reacional simplificado para a primeira etapa da fermentação alcoólica.....	6
<b>Figura 1.1.5.2.</b> Esquema reacional para fermentação acética ou segunda etapa da reação alcoólica.....	6
<b>Figura 1.1.5.3.</b> Esquema reacional para a enzima pectinesterase.....	7
<b>Figura 1.1.5.4.</b> Esquema reacional para a oxidação da vitamina C (ácido ascórbico).....	8
<b>Figura 1.2.2.1.</b> Estrutura química da dimetilprolina e florina .....	11
<b>Figura 1.2.3.1.</b> Representação esquemática da sequência de pulsos de pré-saturação com irradiação do sinal do solvente durante o tempo de espera.....	12
<b>Figura 1.2.3.2.</b> Representação esquemática da sequência de pulsos ZGCPPR.....	13
<b>Figura 1.2.3.3.</b> Representação esquemática da sequência de pulsos NOESYGPPR1D.....	14
<b>Figura 1.3.1.1.</b> Pontos de dados do sistema de coordenadas (x,y,z) original <b>(a)</b> , projeção dos pontos de dados em duas componentes principais (PC1 – PC2) <b>(b)</b> e contribuição de cada variável original nas PC's representadas (PC1 – PC2) <b>(c)</b> .....	16
<b>Figura 1.3.2.1.</b> Representação das matrizes utilizadas em uma calibração multivariada.....	17
<b>Figura 4.1.1.</b> Espectro típico de RMN de <sup>1</sup> H de uma amostra de suco de laranja.....	28

## ***Lista de Figuras***

---

<b>Figura 4.1.2.</b> Visão expandida de um espectro típico de RMN de $^1\text{H}$ de uma amostra de suco de laranja.....	29
<b>Figura 4.1.3.</b> Visão geral do mapa de correlações $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ de uma amostra de suco de laranja pêra Rio.....	30
<b>Figura 4.1.4.</b> Visão expandida do mapa de correlações $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ de uma amostra de suco de laranja pêra Rio.....	30
<b>Figura 4.1.5.</b> Visão geral do mapa de correlações $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a uma ligação da amostra de suco de laranja comercial 02.....	31
<b>Figura 4.1.6.</b> Visão geral do mapa de correlações $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a longa distância da amostra de suco de laranja comercial 02.....	31
<b>Figura 4.2.1.1.</b> Gráfico de linhas dos dados de RMN de $^1\text{H}$ para os grupos de suco de laranja comercial e natural, analisados pelo método <b>A</b> por PCA.....	42
<b>Figura 4.2.1.2.</b> Gráfico de escores PC2 (28%) <i>versus</i> PC3 (9%) das amostras de suco de laranja do grupo comercial e natural, analisados pelo método <b>A</b> .....	43
<b>Figura 4.2.1.3.</b> Gráfico de pesos das componentes principais dois (02) e três (03) das amostras de suco de laranja comercial e natural destacando-se as variáveis de maior importância na separação do método <b>A</b> .....	44
<b>Figura 4.2.1.4.</b> Gráfico de linhas dos dados de RMN de $^1\text{H}$ para os grupos de suco de laranja comercial e natural, analisados pelo método <b>B</b> por PCA.....	45
<b>Figura 4.2.1.5.</b> Gráfico de escores PC1 (55%) <i>versus</i> PC3 (9%) das amostras de suco de laranja do grupo comercial e natural, analisados pelo método <b>B</b> .....	46
<b>Figura 4.2.1.6.</b> Gráfico de pesos das componentes principais um (01) e três (03) das amostras de suco de laranja comercial e natural destacando-se as variáveis de maior importância na separação do método <b>B</b> .....	48

## ***Lista de Figuras***

---

<b>Figura 4.2.2.1.</b> Gráfico de escores PC1 (79%) <i>versus</i> PC2 (11%) das amostras de suco de laranja do grupo comercial analisados pelo método <b>A</b> .....	50
<b>Figura 4.2.2.2.</b> Gráfico de pesos das componentes principais um (01) e dois (02) das amostras de suco de laranja comercial destacando-se as variáveis de maior importância na separação do método <b>A</b> .....	52
<b>Figura 4.2.2.3.</b> Gráfico de escores PC1 (68%) <i>versus</i> PC2 (10%) das amostras de suco de laranja do grupo comercial analisados pelo método <b>B</b> .....	53
<b>Figura 4.2.2.4.</b> Gráfico de pesos das componentes principais um (01) e dois (02) das amostras de suco de laranja comercial destacando-se as variáveis de maior importância na separação do método <b>B</b> .....	55
<b>Figura 4.2.2.5.</b> Gráficos de quantificação relativa para os ácidos: fórmico, succínico, pirúvico, acético e láctico para as amostras de suco de laranja comercial.....	58
<b>Figura 4.2.2.6.</b> Gráfico de escores PC1 (70%) <i>versus</i> PC2 (22%) das amostras de suco de laranja do grupo natural analisadas pelo método <b>A</b> ....	59
<b>Figura 4.2.2.7.</b> Gráfico de pesos das componentes principais um (01) e dois (02) das amostras de suco de laranja natural destacando-se as variáveis de maior importância na separação do método <b>A</b> .....	61
<b>Figura 4.2.2.8.</b> Gráfico de escores PC1 (59%) <i>versus</i> PC2 (17%) das amostras de suco de laranja do grupo natural analisadas pelo método <b>B</b> ....	62
<b>Figura 4.2.2.9.</b> Gráfico de pesos das componentes principais um (01) e dois (02) das amostras de suco de laranja natural destacando-se as variáveis de maior importância na separação do método <b>B</b> .....	64
<b>Figura 4.2.2.10.</b> Gráficos de quantificação relativa para os ácidos: fórmico, fúmarico, succínico, pirúvico, acético e láctico para as amostras de suco de laranja natural.....	67
<b>Figura 4.3.1.</b> Curva de calibração univariada para o etanol.....	69

**Lista de Figuras**

---

<b>Figura 4.3.2.</b> Variáveis referentes ao grupo CH <sub>3</sub> do etanol, com multiplicidade de um tripleto, usadas para a construção dos modelos PCR e PLS das amostras de referências de suco de laranja.....	70
<b>Figura 4.3.3.</b> Curva de regressão para o modelo PCR.....	71
<b>Figura 4.3.4.</b> Curva de regressão para o modelo PLS.....	72
<b>Figura 4.3.5.</b> Gráfico de quantificação do etanol para as amostras de suco de laranja comercial.....	75
<b>Figura 4.3.6.</b> Gráfico de quantificação do etanol para as amostras de suco de laranja natural.....	76
<b>Esquema 3.1.</b> Codificação detalhada das amostras comerciais e naturais de suco de laranja.....	24

## RESUMO

EMPREGO DA RMN ALIADA À QUIMIOMETRIA NO CONTROLE DE QUALIDADE DE SUCO DE LARANJA. O suco de laranja é o mais apreciado mundialmente, principalmente por causa do seu sabor agradável e por ser uma fonte rica em nutrientes. Atualmente, o Brasil é o maior produtor e exportador mundial de suco de laranja, além de gerar divisas da ordem de bilhões de dólares por ano. Com isso, o objetivo desse trabalho foi a aplicação da RMN de  $^1\text{H}$ , aliada à quimiometria, para traçar um perfil dos constituintes químicos existentes nos sucos comerciais e compará-los com os sucos naturais das principais variedades de *Citrus sinensis* cultivadas no Brasil e ofertadas no mercado local. Também foi avaliado o grau de alteração e a concentração dos constituintes químicos oriundos dessa variação nas amostras de sucos comerciais e naturais em diferentes condições de armazenamento. Portanto, foram estudadas três (3) amostras de sucos comerciais e cinco variedades de sucos naturais das laranjas pêra Rio (*C. sinensis* (L.) Osbeck), Bahia (*C. sinensis* (L.) Osbeck), murcote (*C. grandis* (L.) Osbeck), lima (*C. aurantifolia*) e lima da Pérsia (*C. aurantifolia*). As técnicas de RMN de  $^1\text{H}$  e 2D mostraram-se uma importante ferramenta na caracterização e quantificação relativa dos principais metabólitos provenientes da alteração das amostras de sucos de laranjas naturais e comerciais estudadas. Essas técnicas utilizadas possibilitaram caracterizar vinte e sete (27) metabólitos presentes nas amostras de suco de laranjas estudadas. Os resultados obtidos para a quantificação absoluta do etanol e a relativa para os ácidos: fórmico, fúmarico, láctico, acético, pirúvico e succínico indicam que esses metabólitos são provenientes de alterações ocorridas no suco de laranja durante o período e o tipo de armazenamento. Além disso, foi possível discriminar suco de laranja comercial e natural através dos metabólitos majoritários e minoritários presentes no suco por análise de componentes principais (PCA).

---

## ABSTRACT

QUALITY CONTROL IN ORANGE JUICE USING NMR AND CHEMOMETRICS. Fresh orange juice is widely appreciated all over the world for its pleasant flavor and because it is a great source of nutrients. Currently, Brazil leads the world in the production and export of orange juice, generating billions of dollars each year. Therefore, the purpose of this paper is to describe the application of  $^1\text{H}$  NMR in combination with chemometrics in order to characterize the chemical properties of commercial juices and to compare them with natural juices from the main types of *Citrus sinensis* cultivated in Brazil and bought in the local market. Moreover, the degree of alteration and the variation in concentrations of derived chemical constituents of commercial and natural juices in different storage conditions were evaluated. Hence, three (3) samples of commercial juices and five (5) types of natural juices extracted from pêra Rio oranges (*C. sinensis* (L.) Osbeck), Bahia oranges (*C. sinensis* (L.) Osbeck), murcote oranges (*C. grandis* (L.) Osbeck), lima oranges (*C. aurantifolia*), and lima da Pérsia oranges (*C. aurantifolia*) were studied. The 2D and  $^1\text{H}$  NMR techniques had proved to be an important tool for characterization and relative quantification of the main metabolites that are found in the alteration of natural and commercial orange juice samples of this study. The application of these techniques has allowed the characterization of twenty seven (27) metabolites present in orange juice samples examined herein. The results showed that the absolute quantification of ethanol and the relative quantification for formic, fumaric, lactic, acetic, pyruvic, and succinic acids indicate that these compounds changes in the orange juice occurred during the storage period and conditions. Furthermore, principal components analysis (PCA) was used to classify commercial and natural orange juice through quantification of major and minor metabolites present in juices.

---

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	vi
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	ix
<b>RESUMO</b> .....	xiii
<b>ABSTRACT</b> .....	xiv
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1. A laranja.....	1
1.1.1. A história da laranja.....	1
1.1.2. Classificação dos citros.....	2
1.1.3. Tipos de suco de laranja.....	2
1.1.4. A importância do suco de laranja na economia brasileira.....	3
1.1.5. Degradação em suco de laranja.....	5
a) Fatores microbiológicos.....	5
b) Fatores enzimáticos.....	7
c) Fatores químicos.....	7
1.2. Ressonância Magnética Nuclear – RMN.....	8
1.2.1. A RMN em análise de misturas complexas.....	9
1.2.2. Análise de suco de frutas via RMN .....	10
1.2.3. Supressão do sinal da água.....	12
1.3. Quimiometria aplicada à RMN de <sup>1</sup> H.....	15
1.3.1. Análise de Componentes Principais (PCA).....	16
1.3.2. Regressão multivariada.....	17
a) Regressão por Componentes Principais (PCR).....	18
b) Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS).....	18
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	20
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	21

**Sumário**

---

3.1. Amostras de suco de laranja.....	21
3.1.1. Suco comercial de laranja.....	21
3.1.2. Suco de laranja natural.....	22
3.2. Codificação das amostras.....	24
3.3. Preparo da solução tampão.....	24
3.4. Preparo das amostras de suco de laranja comercial e natural.....	24
3.5. Obtenção dos espectros de RMN de <sup>1</sup> H.....	25
3.6. Obtenção dos espectros de bidimensionais.....	25
3.7. Análises quimiométricas.....	26
3.7.1. Análises por Componentes Principais (PCA).....	26
3.7.2. Calibração multivariada e univariada.....	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1. Perfil dos metabólitos nas amostras de suco de laranja.....	28
4.2. Análise multivariada dos dados.....	42
4.2.1. Distinção entre suco de laranja comercial e natural.....	42
4.2.2. Degradação e quantificação do suco de laranja comercial e natural..	48
4.2.2.1. Suco de laranja comercial.....	49
4.2.2.2. Suco de laranja natural.....	59
4.3. Calibração Multivariada.....	68
5. CONCLUSÕES.....	77
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. A laranja**

#### **1.1.1. A história da laranja**

Vários relatos indicam que a laranja é nativa da Ásia, conhecida por volta de 4.000 anos atrás, proveniente das regiões que incluem a Índia, a China, o Butão, a Birmânia e a Malásia, e que eram utilizados para fins ornamentais e alimentícios<sup>1,2</sup>. O comércio e as guerras entre as nações foram os responsáveis pela expansão do cultivo dos citros, de modo que, foi introduzida no norte da África e daí para o sul da Europa levada pelos Árabes durante a Idade Média<sup>1,3</sup>. Por outro lado, por volta dos anos de 1500, mudas de laranjeiras e outras plantas cítricas foram trazidas para o continente americano na expedição de Cristóvão Colombo<sup>3</sup>. Assim, a laranja espalhou-se pelo mundo sofrendo mutações e dando origem a novas variedades de frutos e, conseqüentemente, algumas características tais como: cor, sabor, aroma e o tamanho dos frutos foram sofrendo alterações no decorrer desse período<sup>4</sup>.

No século XIX e XX, conduzidos pela Europa e depois pelos Estados Unidos, experimentos e pesquisas foram desenvolvidos para aprimorar o melhoramento do aspecto visual (cor, textura, tamanho, etc.) e sabor dos frutos, bem como o aprimoramento genético para obtenção de árvores mais resistentes às doenças e alterações climáticas<sup>4,5</sup>. As novas variedades de cítricos como os citranges, tangelos, orangelos e limequants são produtos de manipulações genéticas realizadas nos EUA<sup>5</sup>.

Atualmente, um dos ramos mais avançados da ciência agrônômica no mundo é a citricultura, cujo desenvolvimento esteve associado a diversos eventos: desenvolvimento da biologia nos séculos XVIII, XIX e XX, desenvolvimento da agronomia nos últimos cem anos, expansão do comércio internacional e crescimento do consumo do século XX<sup>5</sup>.

## **Introdução**

---

### **1.1.2. Classificação dos citros**

Os citros apresentam uma taxonomia muito complexa, com relação ao número de espécies que constituem o gênero *Citrus* e gêneros correlacionados. Vários sistemas de taxonomia têm sido propostos e, todavia esses sistemas se diferem quanto ao número de espécies que compõem os vários gêneros. Essa complexidade é oriunda de mutações e hibridações sofridas ao longo do tempo, contudo, através da embriologia nucelar as características das espécies ancestrais são preservadas<sup>6</sup>.

Os estudos de variabilidade genética e de morfologia são utilizados para a caracterização de diferentes espécies de citros. Segundo Barret e Rhodes<sup>7</sup> estudando a morfologia dessas plantas, sugeriram em 1976 a existência de três (3) grandes grupos de importância em *Citrus*: o grupo *C. grandis* (L.) Osbeck, o grupo de *Citrus medica* L (*C. medica* L., *C. aurantifolia* L. e *C. limon* Burm.f.) e o grupo de *Citrus reticulata* Blanco (*C. reticulata* Blanco, *C. sinensis* L. Osbeck, *C. paradisi* Marcf., *C. aurantium* L. e *C. jambhiri* Lush.).

Outros pesquisadores como Sawazaki *et al.*<sup>8</sup> discriminaram dez (10) espécies de citros mediante o polimorfismo enzimático, através da variabilidade genética das espécies estudadas. Por outro lado, Oliveira *et al.*<sup>9</sup> utilizaram uma população de noventa e quatro híbridos para avaliar a diversidade genética entre a tangerina 'cravo' e a laranja 'pêra' através de marcadores moleculares RAPD.

De acordo com Lopes *et al.*<sup>10</sup> o grupo de plantas do gênero *Citrus* e outros gêneros afins (*Fortunella* e *Poncirus*) ou híbridos da família Rutaceae são representados na grande maioria, por laranjas (*Citrus sinensis*), tangerinas (*Citrus reticulata* e *Citrus deliciosa*), limões (*Citrus limon*), limas ácidas como o Tahiti (*Citrus latifolia*) e o Galego (*Citrus aurantiifolia*), e doces como a lima da Pérsia (*Citrus limettioides*), pomelo (*Citrus paradisi*), cidra (*Citrus medica*), laranja-azeda (*Citrus aurantium*) e toranjas (*Citrus grandis*).

### **1.1.3. Tipos de suco de laranja**

De acordo como o Decreto nº 6.871, de 04 de junho de 2009, que regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, define o suco de laranja como: bebida não fermentada, não concentrada e não diluída obtida da laranja madura e

## **Introdução**

---

sã, por processamento tecnológico, submetida a tratamento para assegurar a sua apresentação e conservação até o momento do consumo. Não pode conter substâncias estranhas à fruta, excetuadas as previstas na legislação específica. É proibida a adição de aromas e corantes artificiais<sup>11</sup>.

No entanto, suco de laranja comercial industrial pode ser apresentado ao consumidor de três maneiras distintas: integral, concentrado e reconstituído. O suco de laranja integral não contém adição de açúcares, é encontrado em sua concentração natural, todavia o suco concentrado é parcialmente desidratado em um processo de remoção da água natural contida no suco. O suco de laranja reconstituído é fabricado a partir do suco concentrado e diluído em água potável em sua formulação, mas deve atender aos mesmos parâmetros de qualidade do suco integral<sup>3,12</sup>.

Outra modalidade de suco são os néctares e refrescos. O néctar é constituído basicamente por suco de laranja e açúcar, entretanto a bebida deve conter acima de 30 % de suco de laranja para ser chamada de néctar. O mesmo acontece para o refresco que em sua composição é muito semelhante ao néctar. Porém para o mercado externo, principalmente a Europa, para ter o nome de néctar uma bebida de laranja deve conter no mínimo 50 % de suco de laranja, enquanto que, para os refrescos o limite mínimo aceitável são os mesmos 30% de suco exigido ao néctar de laranja<sup>12,13</sup>.

### **1.1.4. A importância do suco de laranja na economia brasileira**

A citricultura se destacou em vários estados do Brasil, porém foi a partir da década de 1920 que se criou o primeiro núcleo citrícola nacional nos arredores de Nova Iguaçu no estado do Rio de Janeiro. Esse núcleo foi responsável em realizar as primeiras exportações de laranja para a Argentina, Inglaterra e outros países europeus, além de abastecer os mercados internos do Rio de Janeiro e São Paulo. Após a retração da cafeicultura no final da década de 1910 e durante a década de 1920, a laranja foi migrando para o interior paulista onde se estabeleceu como uma opção para substituir o café. Estabelecida à importância econômica da citricultura no estado de São Paulo, houve um crescimento mais de dez vezes na produção de laranja entre os anos de 1920 e 1940<sup>3</sup>.

## **Introdução**

---

Por isso, com o intuito de evitar o desperdício da laranja, o governo do estado de São Paulo montou a primeira indústria de suco de laranja não concentrado durante a segunda guerra mundial, para evitar o desperdício das safras e visando abastecer o mercado local. Porém, este empreendimento fracassou devido, principalmente, à falta de consumidores<sup>14</sup>.

Em 1962, a produção brasileira de suco de laranja tomou um novo impulso, devido à geada ocorrida no estado da Flórida, onde cerca de 13 milhões de árvores adultas tiveram que ser destruídas, e esse fato contribuiu para a inserção do Brasil no mercado mundial. Neste mesmo ano, o Brasil se tornou um dos grandes exportadores para o mercado interno dos Estados Unidos e da Europa, preenchendo uma lacuna deixada pelos americanos<sup>14,15</sup>.

A primeira indústria de suco de laranja voltada para a exportação foi criada em 1963, em um período denominado “modernização conservadora” da agricultura. Os incentivos às exportações, isenções tributárias e crédito rural subsidiado foram as principais características deste período de 1965 a 1979. Na década de 80, a citricultura brasileira continuou seu processo de expansão, apesar da crise financeira mundial e as condições climáticas não favoráveis na Flórida, maior produtor dos Estados Unidos, proporcionando ao Brasil o primeiro lugar dentre os produtores mundiais de citros<sup>15</sup>.

Atualmente, o Brasil é o maior produtor e exportador de suco de laranja do mundo, detendo 53% da produção mundial e exportando aproximadamente 98% dessa produção. Portanto, 2,6 em cada 5 copos de suco de laranja consumidos no mundo são produzidos no Brasil<sup>3</sup>.

Os maiores produtores de suco de laranja estão localizados no estado de São Paulo e nos municípios da região do triângulo mineiro, por isso a região é chamada de Cinturão Citrícola (*Citrus Belt*). Com área total plantada equivalente a 837,00 mil hectares e 160 milhões de árvores de laranja em 2010, a citricultura envolve direta e indiretamente aproximadamente cerca de 230 mil empregos, gerando uma massa salarial de R\$ 676 milhões. Em 2009, o PIB para este setor citrícola gerou U\$ 6,5 bilhões, divididos em U\$ 4,39 bilhões para o mercado interno e U\$ 2,15 para o mercado externo<sup>3,14,16</sup>.

De acordo com a Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos, até novembro de 2011 foram produzidas aproximadamente 19 toneladas de suco não concentrado convertido em suco de laranja concentrado e congelado, 106

## ***Introdução***

---

toneladas de suco de laranja não concentrado e 120 toneladas de suco concentrado e congelado. Se compararmos com o mesmo período de 2010, houve um crescimento de aproximadamente 26% na produção de suco laranja concentrado e congelado, mostrando a importância desse produto para o setor citrícola, cujo principal destino de exportação é a Europa<sup>3,14</sup>.

### **1.1.5. Degradação do suco de laranja**

A qualidade do suco de laranja é influenciada basicamente por fatores microbiológicos, enzimáticos e reações químicas que comprometem suas características nutricionais e organolépticas. No conjunto, esses fatores somados às condições de armazenamento e integridade do produto irão influenciar no tempo útil para o seu uso pelo consumidor<sup>17,18</sup>.

#### **a) Fatores microbiológicos**

O suco de laranja é uma bebida ácida e, portanto, sua deterioração de natureza microbiológica está associada à proliferação de leveduras, bactérias lácticas e fungos que lhe conferem sabor e odor indesejáveis<sup>19</sup>.

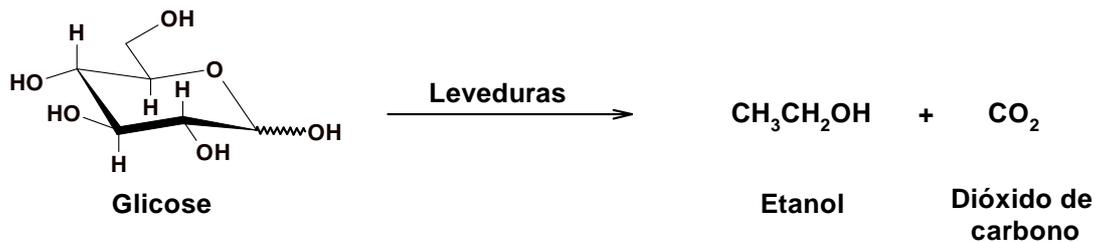
A deterioração microbiana no suco de laranja limita-se aos microrganismos tolerantes ao meio ácido, com predomínio de bactérias lácticas, leveduras e fungos. As bactérias produtoras do ácido láctico, como as *Lactobacillus* e *Leuconostoc*, são microaerófilas, toleram baixo pH e, apresentam resistência térmica muito baixa, sendo geralmente destruídas quando submetidas ao tratamento térmico<sup>20</sup>.

Uma das causas mais comuns na deterioração dos sucos de frutas é a degradação por leveduras, devido à elevada resistência ao meio ácido e capacidade da maioria das leveduras se desenvolverem anaerobicamente, além de apresentarem maior resistência térmica que as bactérias e a maioria dos fungos. A produção de etanol, dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e acetaldeído são indicadores da sua multiplicação, mas também pode manifestar-se pela formação de películas e floculação que diminuem a turvação dos sucos<sup>18</sup>.

O suco de laranja é constituído por uma elevada concentração de açúcares, tais como: sacarose, frutose,  $\alpha$ -glucose,  $\beta$ -glucose e outros tipos em

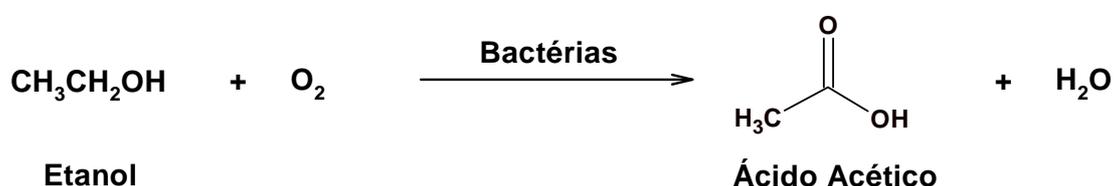
## Introdução

baixas concentrações. A presença de leveduras, por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, propicia a fermentação alcoólica dessas substâncias, que acontece em um processo anaeróbico cuja equação simplificada está representada na **Figura 1.1.5.1**. Além do etanol e dióxido de carbono gerado no processo da fermentação alcoólica, ainda existem outros produtos secundários provenientes da fermentação como glicerol, ácido succínico, etc<sup>21</sup>.



**Figura 1.1.5.1.** Esquema reacional simplificado para a primeira etapa da fermentação alcoólica.

Na segunda etapa da fermentação alcoólica, conhecida também como fermentação acética, o etanol é oxidado a ácido acético por bactérias acéticas em meio aeróbio. As principais espécies de bactérias responsáveis pela oxidação são do gênero *Acetobacter*: *A. aceti orleanensis*, *A. aceti xilinum* e *A. aceti liquefaciens*<sup>21</sup>. A reação pode ser resumida no esquema da **Figura 1.1.5.2**.



**Figura 1.1.5.2.** Esquema reacional para fermentação acética ou segunda etapa da reação alcoólica.

## ***Introdução***

---

### **b) Fatores enzimáticos**

O suco de laranja possui em sua composição enzimas, principalmente a pectinesterases, que apresenta o máximo de atividade em pH 7,0 – 7,5, sendo esse um grande motivo de atenção na etapa de processamento das frutas cítricas, além de causar instabilidade como perda de gelificação e opacidade no suco não-pasteurizado e em concentrados congelados. Se a concentração original de pectinesterases for elevada no suco ou no concentrado haverá a formação de um gel semi-rígido<sup>17</sup>.

A enzima pectinesterase acelera a hidrólise das ligações éstermetílicas na molécula de pectina formando ácido péctico e metanol. A **Figura 1.1.5.3.** mostra a reação geral para enzima pectinesterase.



**Figura 1.1.5.3.** Esquema reacional para a enzima pectinesterase.

Vários estudos são relatados apresentando a inativação das enzimas pectinesterases em diferentes processos de pasteurização, valores de pH, tipos de suco de laranja e tratamentos térmicos<sup>22-26</sup>. De acordo com VERSTEEG *et al.* 27, existem diferentes formas de pectinesterases em frutas cítricas, por exemplo, nas variedades de laranja Navel foram encontradas três formas de pectinesterases responsáveis por 95% da atividade enzimática, além de apresentarem resistência térmica diferente das enzimas encontradas em outros tipos de suco de laranja.

### **c) Fatores químicos**

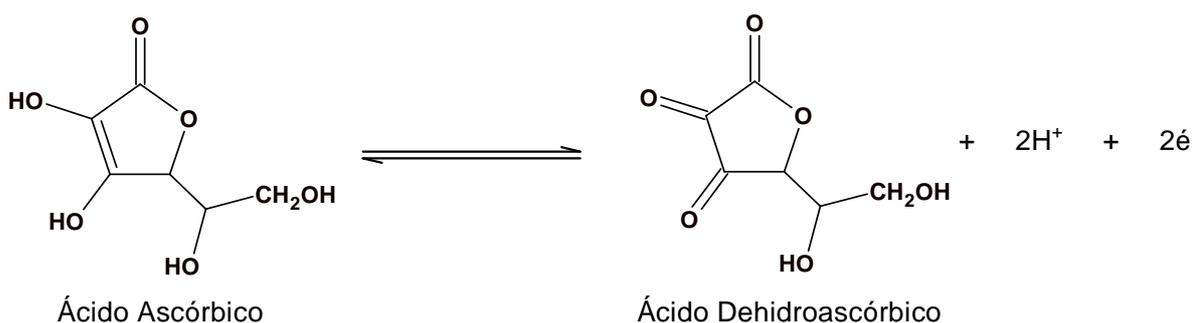
Os fatores químicos que influenciam normalmente na qualidade do suco de laranja normalmente são de natureza oxidativas. A oxidação ocorre com a vitamina C (ácido ascórbico) e com os compostos responsáveis pelo sabor e aroma do suco (açúcares, ácidos, sais minerais, vitaminas e pigmentos), alterando as características sensoriais e nutricionais do produto. Essas reações oxidativas estão relacionadas com as condições utilizadas no tratamento térmico, da presença de

## Introdução

oxigênio, do tipo de embalagens utilizadas, da relação tempo/temperatura de estocagem e influência de luz no produto<sup>17</sup>.

Um dos nutrientes mais afetados durante o processamento de suco de frutas cítricas e hortaliças é a vitamina C (ácido ascórbico), pois esta é utilizada como um indicativo da qualidade nutricional e até mesmo para verificar a conservação dos alimentos<sup>28</sup>.

A vitamina C (ácido ascórbico) está envolvida em inúmeras reações que ocorrem no organismo humano, sendo responsável, por exemplo, pela manutenção e síntese do colágeno, adsorção de ferro no intestino, poder atuar na prevenção do câncer, além de participar da síntese de importantes neurotransmissores, etc<sup>28,29</sup>. O ácido ascórbico é encontrado na forma reduzida e, nesse estado é um composto biologicamente ativo, porém muito instável e facilmente oxidável a ácido dehidroascórbico<sup>29</sup> (**Figura 1.1.5.4.**).



**Figura 1.1.5.4.** Esquema reacional para a oxidação da vitamina C (ácido ascórbico).

## 1.2. Ressonância Magnética Nuclear - RMN

Tradicionalmente, a espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) havia sido compreendida apenas como uma ferramenta para a verificação de estruturas e para analisar a pureza de substâncias<sup>30</sup>. O uso da RMN começou a ser apreciada na área da química, principalmente pelos químicos orgânicos, a partir de 1950, quando Proctor e Yu<sup>31</sup> alunos de Felix Bloch, introduziram o conceito de deslocamento químico, contribuindo assim para elucidação estrutural de compostos orgânicos. Mesmo assim, o interesse principal dos químicos orgânicos é a

## **Introdução**

---

elucidação estrutural de moléculas complexas, para isso a RMN é uma ferramenta indispensável, contudo, o seu uso como técnica analítica expandiu-se apenas nos últimos 20 anos<sup>32</sup>.

Conduzida pelas necessidades do emergente campo de domínio metabólico/metabonômico, a RMN expandiu rapidamente nos últimos anos nas áreas de aplicações em análises de misturas e de triagens. Esses desenvolvimentos foram facilitados graças ao desenvolvimento tecnológico de rápidos trocadores de amostras (tubos de amostras e métodos de injeção de fluxo), integrado ao preparo de amostras e a melhoria em geral da qualidade dos espectrômetros digitais<sup>30,33</sup>.

A velocidade com que os espectros podem ser obtidos possibilita examinar várias amostras em pouco tempo, muitas vezes com a mínima preparação da amostra e com excelente reprodutibilidade da técnica. Além de ser uma técnica não destrutiva, a RMN pode detectar um grande número de compostos simultaneamente em uma única medida experimental<sup>33,34</sup>. Contudo, vale ressaltar que a espectroscopia de RMN não é uma técnica sensível como a Espectroscopia na região do Ultravioleta (UV) e do infravermelho (IV) e Espectrometria de Massas (EM), apesar de todo avanço tecnológicos da área.

### **1.2.1. A RMN em análise de misturas complexas**

Para a análise de misturas complexas, técnicas de alta resolução como espectroscopia de RMN e Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR) têm-se mostrado atraentes por fornecer informações qualitativas e quantitativas de grande variedade de espécies químicas em um único experimento, além de outras técnicas como a CLAE e EM<sup>34</sup>. Contudo, a espectroscopia de RMN de <sup>1</sup>H tem demonstrado ser uma ferramenta muito atrativa em análises de misturas complexas como fluídos biológicos, bebidas, produtos alimentícios, etc<sup>30,34-38</sup>.

Vários trabalhos têm sido reportados na literatura envolvendo as técnicas de RMN em análise de misturas complexas. Em 2009, Boffo<sup>39</sup> verificou as diferenças químicas relacionadas à autenticidade em amostras de méis e aguardentes utilizando as técnicas de RMN de <sup>1</sup>H e a SNIF-NMR (*Site Specific Natural Isotopic Fractionation studied by Nuclear Magnetic Resonance*) aliada a métodos quimiométricos. Outras matrizes de misturas complexas como estudos sobre a origem geográfica de vinhos<sup>40</sup>, controle de qualidade de óleos de oliva<sup>41</sup>,

## **Introdução**

---

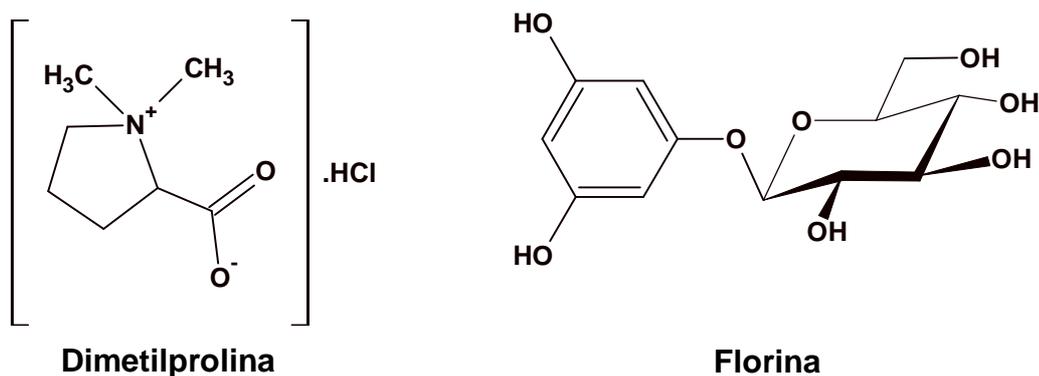
cafés<sup>42,43</sup>, tomates<sup>44</sup> e cerveja<sup>34</sup> tem sido estudadas pelas técnicas de RMN aliada a métodos quimiométricos.

Recentemente, as técnicas hífenadas como a **CLAE-RMN** (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Ressonância Magnética Nuclear), **CLAE-RMN-EM** (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Ressonância Magnética Nuclear e Espectrometria de Massas) e **CLAE-EPS-RMN** (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência combinado com Extração por Fase Sólida acoplada à Ressonância Magnética Nuclear), têm sido utilizadas para analisar e identificar compostos químicos individualmente e em misturas complexas<sup>30,45-47</sup>.

### **1.2.2. Análise de suco de frutas via RMN**

Trabalhos envolvendo a utilização da RMN de <sup>1</sup>H na qual se consegue discriminar, a partir de espectros de RMN de <sup>1</sup>H e utilizando-se quimiometria e diferentes tratamentos estatísticos dos dados (método *EWZS - Evolving Window Zone Selection*), sucos produzidos a partir de laranja (*Citrus sinensis*), *grapefruit* (*Citrus paradisi*) e da mistura entre eles, tem sido relatado na literatura<sup>48</sup>. A quantificação dos ácidos málicos, cítricos e aspártico em sucos de: laranja, maçã, apricot, kiwi, pêra, morango e abacaxi, e em pH específicos onde não ocorre sobreposição dos sinais desse compostos, também tem sido motivo de investigação e comparado com os métodos enzimáticos<sup>49</sup>.

Possíveis produtos de adulteração e/ou contaminação têm sido detectados utilizando-se técnicas de RMN e algumas vezes em conjunto com outras técnicas. Por exemplo, a adulteração em concentrados de suco de laranja com a adição da água de lavagem dos frutos pode ser detectada no espectro de RMN de <sup>1</sup>H e quimiometria através da substância dimetilprolina (DMP)<sup>50</sup>. Da mesma maneira, a substância Florina (3,5-dihidroxifenil-β-D-glucopiranosídeo) isolada via CLAE da casca de laranja (*Citrus sinensis*) e caracterizada via RMN, foi detectada em diferentes concentrações em sucos comerciais provenientes da Espanha e do Brasil<sup>51</sup>. A **Figura 1.2.2.1.** mostra a estrutura química da dimetilprolina e da florina indicadas como possíveis marcadores da adulteração em suco de laranja.



**Figura 1.2.2.1.** Estrutura química da Dimetilprolina e Florina.

Outra técnica muito utilizada principalmente pela comunidade europeia para a detecção de fraudes em sucos de laranja concentrado, e que relata o quanto o preparo da amostra influi nessa análise, é a SNIF-NMR<sup>52</sup>. Hoje, a técnica SNIF-NMR é uma exigência como uma das técnicas que faz parte do conjunto de análises para certificação do produto suco de laranja a ser comercializado na Europa. Trabalho de colaboração com pesquisadores do centro de Norwich, onde se utilizou a técnica de SNIF-NMR, que está baseada na relação isotópica natural de  $^2\text{H}/^1\text{H}$  a partir dos sítios isotópicos do etanol produzido a partir da fermentação do suco; também foi utilizada a técnica de EM medindo a relação isotópica  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  e  $^{17}\text{O}/^{16}\text{O}$ , para verificar adição indevida de açúcares e água de lavagem dos frutos, respectivamente, no suco de laranja<sup>53-55</sup>.

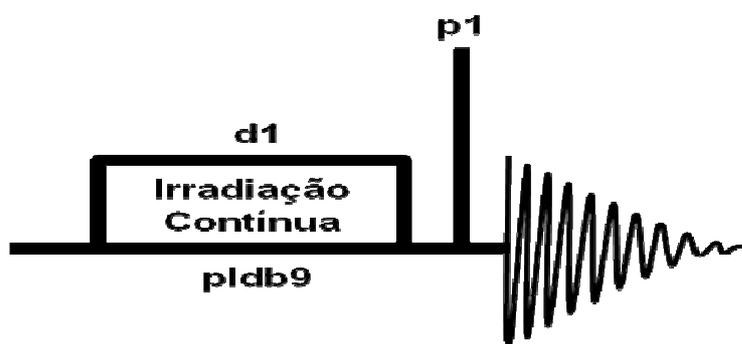
Como a concentração de ácido cítrico é uma das determinações para se avaliar a qualidade do suco, falsificações com adição intencional de ácido cítrico sintético podem ser “desmascaradas” utilizando não só a técnica SNIF-NMR (através da relação isotópica  $^2\text{H}/^1\text{H}$ ) como a EM (através da relação isotópica  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ), onde os autores propõem essa metodologia como uma análise rotineira a ser adotada no protocolo para o controle de qualidade<sup>56</sup>.

## Introdução

### 1.2.3. Supressão do sinal da água

A supressão do sinal do solvente é necessária quando se utilizam soluções aquosas ou amostras que são constituídas por água (H<sub>2</sub>O/HDO), como é o caso das amostras de suco de laranja. Nessas situações a quantidade de água é muito superior à das outras substâncias presentes na amostra. Isto pode gerar várias dificuldades, por exemplo, alguns sinais que se encontram próximos ou sobrepostos ao sinal da água, ou núcleos que trocam quimicamente com a água, poderão ter seus sinais comprometidos pela supressão. Além disso, a falta de homogeneidade do campo magnético externo ( $B_0$ ) e local (*shimming*), do campo magnético gerado pelo pulso de radiofrequência ( $B_1$ ), e as imperfeições no pulso podem diminuir a seletividade e o grau de supressão de uma determinada sequência<sup>57</sup>.

A supressão do sinal da água pode ser realizada de várias maneiras dependendo da sequência de pulsos empregada. Várias técnicas diferentes foram desenvolvidas para suprimir o sinal da água no espectro de RMN de <sup>1</sup>H. O método de pré-saturação geralmente é o mais utilizado para observar os sinais da amostra em soluções aquosas. Essa técnica consiste em aplicar uma irradiação de radiofrequência ( $\nu$ ) contínua e fraca na frequência do sinal do solvente durante o tempo de espera ( $d_1$ ) e antes que seja aplicado o pulso de observação ( $p_1$ )<sup>32,58</sup>. A **Figura 1.2.3.1.** ilustra graficamente a sequência de pulsos de pré-saturação descrita anteriormente.



**Figura 1.2.3.1.** Representação esquemática da sequência de pulsos de pré-saturação com irradiação do sinal do solvente durante o tempo de espera<sup>59</sup>.

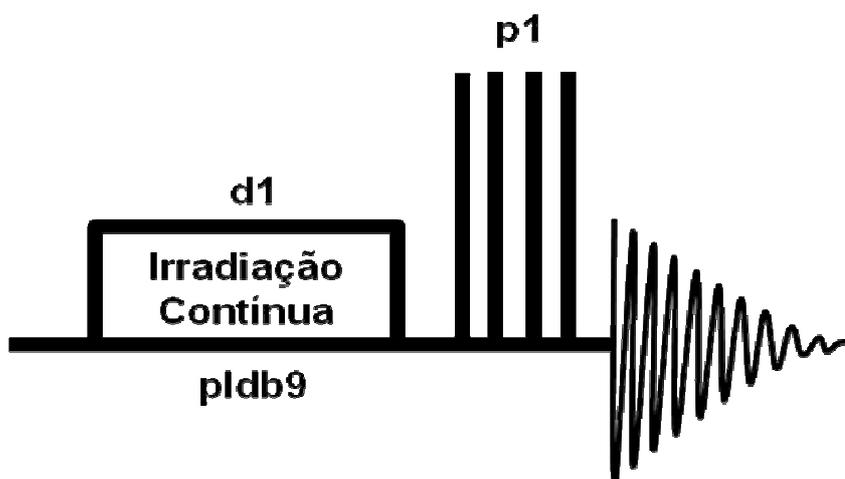
A sequência de pulsos zgpr (denominação Bruker), apresentada na **Figura 1.2.3.1.** é o experimento de pré-saturação mais simples e um dos mais utilizados para uma visão geral do espectro. Após a aplicação de uma potência  $\nu$

## Introdução

---

fraca e contínua durante o tempo de espera ( $d1$ ) com aproximadamente uns 2 s, um pulso de curta duração ( $p1$ ), aproximadamente  $10\ \mu\text{s}$ , é aplicado na frequência de ressonância dos hidrogênios que não foram pré-saturados, o qual transfere as magnetizações para o plano  $xy$ . O sinal é detectado rapidamente e apenas um pequeno resíduo do sinal da água e/ou HDO é observado no espectro.

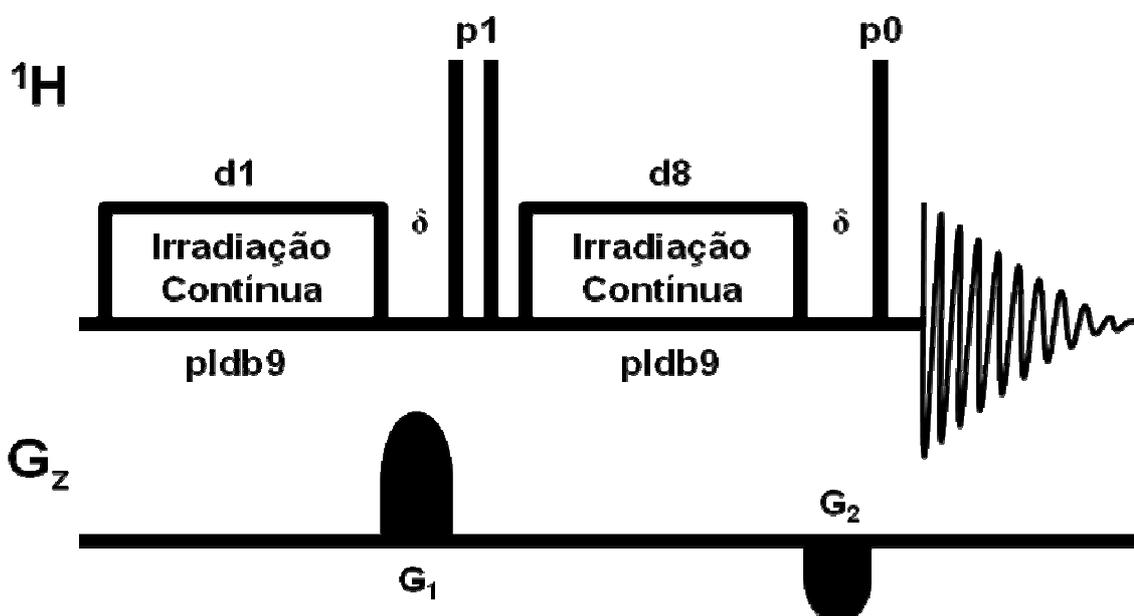
Outras duas sequências de pulsos muito utilizadas para a pré-saturação do sinal da água são:  $zgcppr$  e  $noesygppr-1D$  (denominação Bruker). A sequência de pulso  $zgcppr$  (**Figura 1.2.3.2**) é muito semelhante à sequência  $zgpr$ , contudo ela difere na segunda parte do experimento, onde se aplica um pulso composto para auxiliar na pré-saturação. O pulso composto é um conjunto de pulsos de  $90^\circ$ , todos com a mesma duração, porém com fases diferentes. Como vantagem, a sequência de pulso de  $zgcppr$ , tem uma tolerância maior dos erros causados pela não homogeneidade de  $B_1$  ou precisão na frequência de ressonância de irradiação. Por isso, um sinal residual da água e/ou do HDO também é observado no espectro, porém mais fino e, os hidrogênios das substâncias químicas com deslocamento químico próximo podem ser observados.



**Figura 1.2.3.2.** Representação esquemática da sequência de pulsos  $zgcppr$ <sup>59</sup>.

## Introdução

Da mesma maneira que as sequências de pulsos zgpr e zgcppr, a sequência de pulsos noesygppr-1D é utilizada também para suprimir o sinal da água e/ou do HDO pela aplicação de uma potência  $rf$  fraca e contínua durante o tempo de espera (d1) e o tempo de mistura (d8). Após o tempo de espera (d1) aproximadamente de 2 s, dois pulsos de curta duração (p1) conectados em série, aproximadamente  $10 \mu\text{s}$ , são aplicados na frequência de ressonância dos hidrogênios que não foram pré-saturados, transferindo a magnetização do eixo positivo de  $z$  para o eixo negativo de  $z$ . Na sequência, para minimizar interferências do sinal do solvente, a pré-saturação do sinal dos hidrogênios da água e/ou do HDO é feita durante todo o tempo de mistura (d8). Finalmente, um pulso de  $90^\circ$  é aplicado para transferir as magnetizações para o plano  $xy$  onde o sinal será detectado. Além disso, são aplicados dois pulsos de gradientes ( $G_1$  e  $G_2$ ) após os dois períodos de pré-saturação (d1 e d8). Estes pulsos de gradientes são ferramentas adicionais para suprimir eficientemente o sinal intenso da água e/ou do HDO em experimentos de RMN. A **Figura 1.2.3.3.** ilustra graficamente a sequência de pulsos noesygppr-1D descrita anteriormente.



**Figura 1.2.3.3.** Representação esquemática da sequência de pulsos noesygppr-1D<sup>59</sup>.

### 1.3. Quimiometria aplicada à RMN de $^1\text{H}$

O suco de laranja é uma matriz muito complexa e a sua composição pode variar em função das variedades das laranjas utilizadas (*blends*), dos fatores de sazonalidade e regionalidade, dos processos de produção, das condições de armazenamento, estocagem, etc. Um método que pode ser empregado na análise dos diferentes produtos comerciais é a RMN de  $^1\text{H}$ , tornando possível em uma única medida a observação de todas as substâncias presentes; levando-se em consideração o limite de detecção da técnica e a possibilidade de sobreposição dos sinais. No entanto, frente a um número muito grande de espectros, tanto pelo número de replicatas como pelo número de amostras, a comparação visual para a sua discriminação torna-se bastante trabalhosa devido ao elevado número de informações neles contidos.

O uso de programas estatísticos nos permite distinguir com clareza as sutilezas tanto em relação à variação dos constituintes químicos quanto à sua quantidade<sup>60</sup>. A quimiometria é constituída de métodos matemáticos e estatísticos que decompõem dados multivariados complexos em dados simples e de mais fácil interpretação, isso permite uma melhor compreensão das informações presentes em um banco de dados<sup>61</sup>. O método espectroscópico utilizado nesse trabalho foi a RMN de  $^1\text{H}$ , o qual forneceu um vetor de dados contendo 65.536 variáveis para cada amostra. Em vista disso, foram adotados os métodos quimiométricos de análise exploratória e a calibração multivariada para o tratamento desses dados.

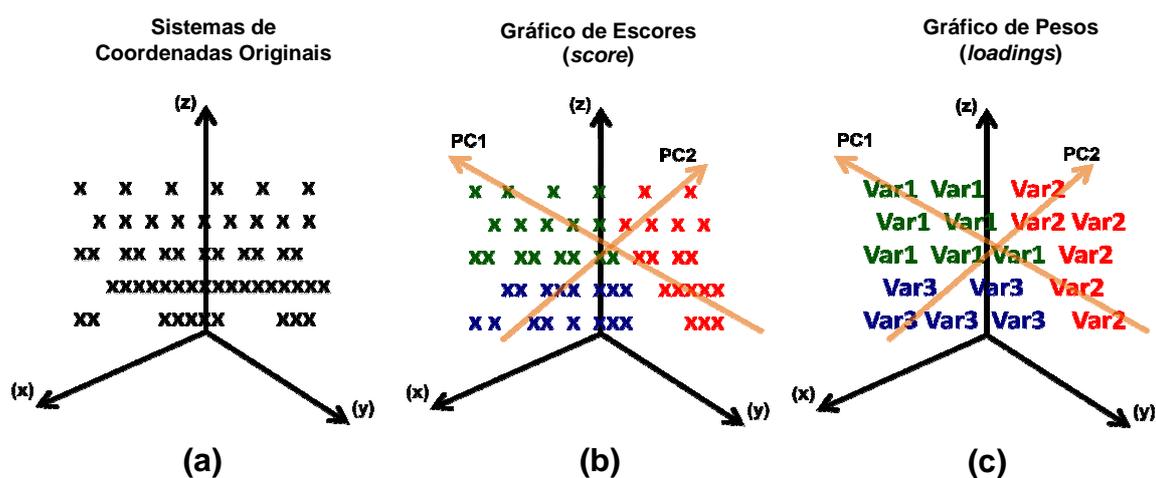
A análise exploratória é utilizada primeiramente para fazer uma avaliação inicial dos dados e revelar quais amostras são semelhantes ou diferentes entre si através da visualização de agrupamentos<sup>32</sup>, enquanto que, a principal tarefa da calibração multivariada é estabelecer uma relação entre os espectros e os parâmetros de referência para todas as amostras em um determinado conjunto de dados<sup>60</sup>. Dentre as diferentes técnicas quimiométricas exploratórias e de calibração multivariada descritas na literatura as que foram utilizadas neste trabalho foram: Análise de Componentes Principais (PCA, *Principal Components Analysis*), Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS, *Partial Least Squares Regression*) e Regressão por Componentes Principais (PCR, *Principal Regression Components*).

## Introdução

### 1.3.1. Análise de Componentes Principais (PCA)

A PCA é um procedimento matemático aplicado aos dados (nesse caso aos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ) para gerar novas variáveis latentes (PC's, *Principal Components*) as quais são ortogonais e, portanto, não correlacionadas entre si. O objetivo principal da PCA é expressar as principais informações contidas nas variáveis iniciais em um menor número de variáveis possíveis, descrevendo as principais variações da matriz de dados. Cada componente gerada (cada variável nova) é uma combinação linear das medições originais, de modo que a primeira componente principal se oriente na direção máxima da variância possível do banco de dados, que e por sua vez, cada componente sucessiva possua maior variância que a próxima (com a condição de serem ortogonais entre si), até que todas PC's do banco de dados sejam descritas.

Na PCA os dados são projetados a partir do sistema de coordenadas original para um novo sistema de PC's, gráficos de escores (*scores*), onde cada eixo é uma componente principal e cada amostra possui um valor determinado em cada PC de acordo com o processo de combinação linear. A **Figura 1.3.1.1. (a)** apresenta um gráfico hipotético definido pelas componentes principais PC1 e PC2. O gráfico de pesos, apresentado pela **Figura 1.3.1.1. (b)**, indica a contribuição de cada variável original de acordo com a PC representada.

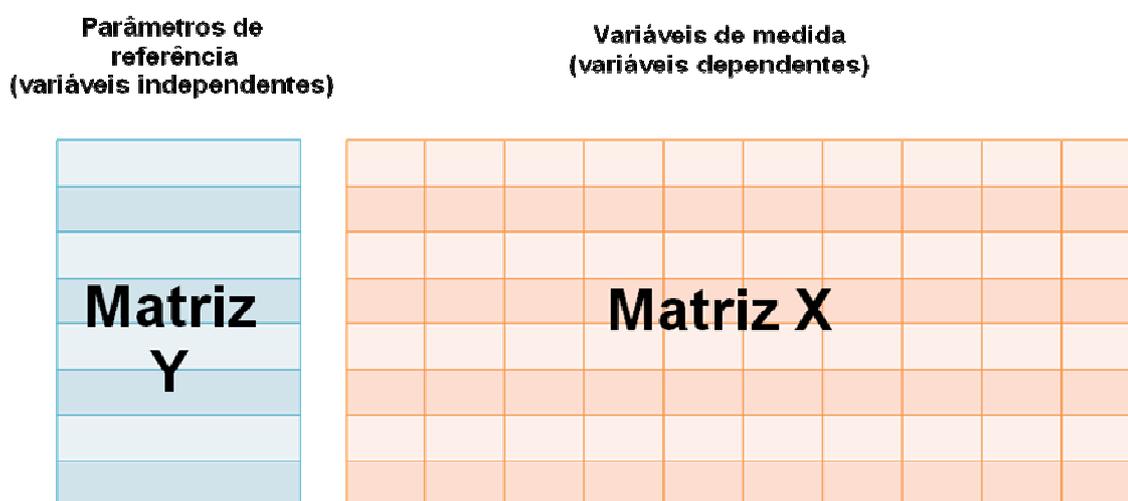


**Figura 1.2.3.1.** Pontos de dados do sistema de coordenadas (x,y,z) original (a), projeção dos pontos de dados em duas componentes principais (PC1 – PC2) (b) e contribuição de cada variável original nas PC's representadas (PC1 – PC2) (c).

**1.3.2. Regressão multivariada**

O uso de diferentes medidas espectroscópicas possibilitam determinar o teor de um ou mais constituintes presentes em uma mistura através dos métodos de calibração. As vantagens que esses métodos propiciam é permitir o estudo com várias espécies simultaneamente, não importando se há existência ou ausência de diferenças relevantes entre elas, muito menos a existência de correlações entre os dados<sup>43</sup>. Dentre os vários métodos de calibração multivariada existentes, os dois métodos de calibração frequentemente usados são PCR e PLS, que variam essencialmente na forma de decompor a matriz de dados.

A principal função da calibração multivariada é construir uma relação entre as variáveis de medida (variáveis dependentes, **X**), neste caso os espectros de RMN de <sup>1</sup>H, com os parâmetros de referências (variáveis independentes, **Y**) para todas as amostras pertencentes do banco de dados (**Figura 1.3.2.1.**). A finalidade desta relação é encontrar concentrações desconhecidas dos espectros analisados e interpretar a relação entre a variável de medida e os valores de referências encontrados<sup>62</sup>.



**Figura 1.3.2.1.** Representação das matrizes utilizadas em uma calibração multivariada. Cada linha da Matriz Y é constituída por cada parâmetro de referência (por exemplo, concentração de um determinado analito) e em cada linha da Matriz X é constituída por uma variável de medida (por exemplo, espectro de RMN de <sup>1</sup>H).

## **Introdução**

---

De maneira sucinta, o processo de calibração multivariada consiste em duas etapas. A primeira etapa, conhecida como validação dos dados, está associada em aperfeiçoar os parâmetros de processamento e transformação das variáveis de medida, buscando uma melhor descrição dos valores de referência. Uma vez ajustado o modelo de calibração a partir dos dados originais, o modelo está habilitado em prever concentrações em amostras desconhecidas (segunda etapa).

### **a) Regressão por Componentes Principais (PCR)**

A decomposição da matriz de dados das variáveis de medida em uma primeira etapa é realizada de maneira semelhante à análise por PCA, seguida de uma etapa de regressão múltipla inversa relacionando os escores dessa matriz com a propriedade de interesse. Supondo que cada amostra contenha  $n$  analitos, teremos  $n$  variáveis  $y_1, y_2, \dots, y_n$  referentes à concentração. Essas informações permitem definir um vetor de concentração  $\mathbf{y}$  ( $\mathbf{y} = y_1, y_2, \dots, y_n$ ) que descreve a concentração de cada um dos  $n$  componentes da amostra.

O espectro de  $^1\text{H}$  de cada amostra é dado por  $k$  variáveis. Assim, cada amostra é definida por um vetor  $\mathbf{x}$  que contém  $k$  variáveis independentes ( $x_1, x_2, \dots, x_k$ ). Dessa maneira, se constroem um conjunto de calibração com  $m$  amostras, onde o mesmo pode ser descrito por meio de uma matriz de dados: uma matriz  $\mathbf{X}$ , a qual contém os dados espectrais (de dimensão  $m \times k$ ) e uma matriz  $\mathbf{Y}$  contendo os valores da concentração do analito (de dimensão  $n \times k$ ). Logo, a matriz  $\mathbf{X}$  passa por uma etapa de decomposição em PC's, que posteriormente é escolhido o número de PC's ideal para descrever a matriz  $\mathbf{X}$ . A matriz  $\mathbf{Y}$  é então relacionada com os scores obtidos da matriz  $\mathbf{X}$  num processo de interação entre as duas matrizes<sup>63</sup>.

### **b) Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS)**

Na etapa em que se realiza a decomposição da matriz de dados das variáveis de medida (matriz  $\mathbf{X}$ ), as informações extraídas são passadas para a matriz dos valores de referências (matriz  $\mathbf{Y}$ ) e vice-versa, onde essas informações são feitas simultaneamente por meio iterativo. Isso acontece no PLS devido às informações sobre os valores de referências serem incluídas durante o cálculo dos scores e loadings.

## **Introdução**

---

Para decompor a matriz  $\mathbf{X}$ , as técnicas de análise fatorial são utilizadas para obter matrizes menores, por exemplo,  $\mathbf{X} = \mathbf{M}_1 + \mathbf{M}_2 + \dots + \mathbf{M}_a + \mathbf{E}$ , onde  $\mathbf{M}_i$  são as componentes principais ou variáveis latentes, com dimensões 1, 2, 3..., a, onde  $a$  representa o número de fatores (componentes principais ou variáveis latentes) selecionados para truncar a igualdade. A matriz de resíduos é representada pelo termo  $\mathbf{E}$  que está relacionado ao número de fatores. A matriz  $\mathbf{Y}$  é decomposta de maneira análoga, para que, finalmente possa determinar-se a correlação entre as variáveis latentes usando os componentes das matrizes menores<sup>64</sup>.

## 2. OBJETIVOS

Os principais objetivos desse trabalho são:

- 1) Utilizar a RMN de  $^1\text{H}$  para avaliar o processo de degradação de sucos comerciais e naturais em diversas situações. Para amostras comerciais após a abertura do frasco, em condições de refrigeração e sem ela, e após o prazo de vencimento do produto. Para os sucos naturais de laranja pêra Rio, laranja Bahia, laranja murcote, laranja lima e laranja lima da Pérsia, em condições de refrigeração e sem ela.
- 2) Quantificar via RMN de  $^1\text{H}$  o conteúdo de etanol, quando presente, em sucos tanto comercial quanto natural.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Amostras de suco de laranja

Durante a realização desse trabalho três (3) amostras comerciais de fabricantes diferentes e cinco (5) amostras naturais de suco de laranja foram analisadas. Todas as amostras foram coletadas no mercado local e da cidade de São Carlos – SP.

##### 3.1.1. Suco comercial de laranja (néctar)

Para cada variedade de suco comercial foram selecionadas quatro (4) amostras do mesmo lote, data de envasamento e validade descrita pelo fabricante do produto. Na tabela 3.1. estão descritos esses dados.

**Tabela 3.1.** Informações das amostras comerciais de suco de laranja descritas pelos fabricantes.

Amostras	Data de Envasamento	Data de Validade
Suco comercial 01 (Fabricante 01)	28/02/2011	28/08/2011
Suco comercial 02 (Fabricante 02)	Não consta	07/08/2011
Suco comercial 03 (Fabricante 3)	12/04/2011	12/10/2011

As amostras de cada fabricante de suco comercial foram divididas em quatro condições de armazenamento (lotes) diferentes: A, B, C e D.

As amostras do lote A foram abertas e obtidos os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  imediatamente. O líquido restante foi mantido a 14 °C e a cada 24 horas foram retiradas alíquotas e obtidos os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  durante um período quinze (15) dias de análises.

Para o lote C, procedeu-se da mesma maneira que o lote A, exceto que o material foi mantido a 24°C (temperatura interna do laboratório).

## **Materiais e Métodos**

Os lotes B e D foram mantidos intactos a 14°C e 24°C respectivamente. Contudo, ao expirar a data de vencimento dos produtos descritos pelos fabricantes foram obtidos os espectros de RMN de  $^1\text{H}$ . Na **Tabela 3.2.** estão descritos os códigos, as condições de armazenamento (lotes) e os períodos de análises para as amostras comerciais de suco de laranja.

**Tabela 3.2.** Códigos, condições de armazenamento (lotes) e períodos de análises para as amostras comerciais de suco de laranja.

<b>Amostras</b>	<b>Códigos</b>	<b>Lotes</b>	<b>Período de Análises (dias)</b>
Suco comercial 01	C1	A	0*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 15
		B	0*
		C	0*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 15
		D	0*
Suco comercial 02	C2	A	0*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 15
		B	0*
		C	0*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 15
		D	0*
Suco comercial 03	C3	A	0*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 15
		B	0*
		C	0*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 15
		D	0*

\* Período em que foram iniciadas as análises de RMN de  $^1\text{H}$ .

### **3.1.2. Suco de laranja natural**

As espécies/variedades de laranjas que foram obtidos os sucos naturais estudados nesse trabalho estão descritos na **Tabela 3.3.**

**Materiais e Métodos****Tabela 3.3.** Espécies e nomes populares das amostras de laranjas analisadas.

<b>Espécies</b>	<b>Nomes populares</b>
<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck spp.	Laranja pêra Rio
<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck spp.	Laranja Bahia
<i>Citrus grandis</i> (L.) Osbeck	Laranja murcote
<i>Citrus aurantifolia</i>	Laranja lima
<i>Citrus limettioides</i>	Laranja lima da Pérsia

Na etapa de seleção e coleta foram observadas as semelhanças de tamanho e a aparência na maturidade dos frutos. Os sucos naturais de laranja foram obtidos através de um espremedor de frutas, em seguida, divididos em duas condições de armazenamento (lotes): A e C. As amostras do lote A foram mantidas a 14 °C e a cada intervalo de tempo foram obtidos os espectros de RMN de <sup>1</sup>H durante o período de vinte e quatro horas de análises. Para o lote C, procedeu-se da mesma maneira que o lote A, exceto que o material foi mantido a 24 °C. A **Tabela 3.4.** a seguir mostra a descrição das condições de armazenamento (lotes) e o tempo que foram realizadas as análises para as amostras de suco natural de laranja.

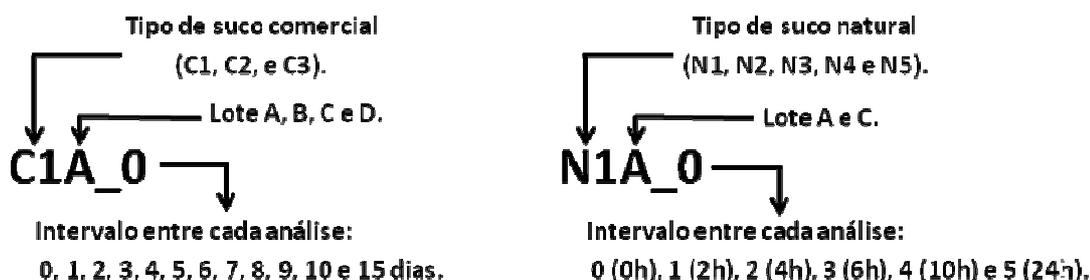
**Tabela 3.4.** Códigos, condições de armazenamento (lotes) e períodos de análises para as amostras naturais de suco de laranja.

<b>Amostras</b>	<b>Códigos</b>	<b>Lotes</b>	<b>Período de Análises (horas)</b>
Laranja pêra Rio	N1	A	0*, 2, 4, 6, 10 e 24.
		C	
Laranja Bahia	N2	A	0*, 2, 4, 6, 10 e 24.
		C	
Laranja murcote	N3	A	0*, 2, 4, 6, 10 e 24.
		C	
Laranja lima	N4	A	0*, 2, 4, 6, 10 e 24.
		C	
Laranja lima da Pérsia	N5	A	0*, 2, 4, 6, 10 e 24.
		C	

\* Período em que foram iniciadas as análises de RMN de <sup>1</sup>H.

**3.2. Codificação das amostras**

As amostras estudadas neste trabalho foram codificadas de acordo com o tipo de suco, os lotes a que foram distribuídas e o período de análise. O **Esquema 3.1.** apresenta detalhes dos códigos das amostras comerciais e naturais de suco de laranja.



**Esquema 3.1.** Codificação detalhada das amostras comerciais e naturais de suco de laranja.

### 3.2. Preparo da solução tampão

Foi preparada uma solução tampão de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1M (diidrogênio fosfato de potássio) em  $\text{D}_2\text{O}$ , pH 1,8, conteúdo 3,0% TMSP- $\text{d}_4$  (2,2,3,3- $\text{d}_4$ -(3-trimetilsililpronionato de sódio) e 2 mM de  $\text{NaN}_3$  (azida de sódio). A solução tampão foi preparada dissolvendo-se 3,4 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 3,25 mg de  $\text{NaN}_3$  em 20 mL de  $\text{D}_2\text{O}$ . Foram dissolvidos separadamente 750 mg de TMSP- $\text{d}_4$  em 2 mL de  $\text{D}_2\text{O}$  utilizando uma cuba de ultra-som. Juntou-se a solução de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e TMSP- $\text{d}_4$  e adicionou-se quantidade suficiente de DCI (ácido clorídrico deuterado) de modo a obter pH 1,8. Por fim, completou-se o volume da solução para 25 mL.

### 3.3. Preparo das amostras de suco de laranja comercial e natural

As amostras comerciais e naturais de suco de laranja foram centrifugadas, à temperatura ambiente, por 10 minutos a 10.000 rpm para remoção de resíduos sólidos. O processo de centrifugação separou a amostra em duas frações bem definidas. Foram retirados 1000  $\mu\text{L}$  do sobrenadante e filtrou-se em membrana 0.45  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Uma alíquota de 720  $\mu\text{L}$  do filtrado de suco de

## ***Materiais e Métodos***

---

laranja foi misturada com 80  $\mu\text{L}$  de solução tampão. Quando necessário, o pH das amostras foi ajustado para  $3,0 \pm 0,1$  adicionando quantidade suficiente de KOH 4M ou HCl 4M. Uma alíquota de 600  $\mu\text{L}$  da amostra de suco de laranja, assim preparado, foi colocada em um tubo de RMN de 5 mm de diâmetro externo.

### **3.5. Obtenção dos experimentos de RMN de $^1\text{H}$**

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  foram adquiridos em um espectrômetro Bruker Avance III “*Nanobay*” de 9,4 Tesla (400,15 MHz para a frequência do hidrogênio), localizado no Laboratório de RMN do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar. As medidas foram realizadas em triplicatas (para maior confiabilidade do método), utilizando um Smart probe<sup>®</sup> de 5 mm de diâmetro interno e bobinas geradoras de gradiente de campo na coordenada z.

Todos os espectros foram adquiridos utilizando a sequência de pulso de pré-saturação do solvente noesygppr-1D (denominação Bruker) para suprimir o sinal da água e mantida a temperatura de 300K. Os espectros foram adquiridos com 128 promediações (ns), largura espectral de 12.019 Hz (swh), tempo de espera entre cada aquisição de 4 s (d1), tempo de aquisição entre cada varredura de 2,73 s (aq) com 65.536 pontos durante a aquisição (td), atenuação do pulso de presaturação de 43,00 dB (pldb9). A duração do pulso de  $90^\circ$  foi 10,30  $\mu\text{s}$  (p1) e o tempo de mistura utilizado foi 10 ms (d8). Para o processamento desses dados foram utilizados 65.536 pontos (si), efetuando multiplicação exponencial (lb = 0,3 Hz) e correção automática de fase e linha de base (apk0.noe).

### **3.6. Obtenção dos espectros de bidimensionais**

Para a caracterização dos compostos foram utilizados os experimentos bidimensionais com gradiente de campo (*g*COSY  $45^\circ$ , *g*HSQC e *g*HMBC), empregando as sequências de pulsos *cosygpprpf*, *hsqcetgp* e *hmbcgpplndqf* (denominação Bruker).

Os experimentos bidimensionais de *g*COSY  $45^\circ$ , *g*HSQC e *g*HMBC foram realizados com largura espectral (swh) em F2 de 4.464 Hz, 4.464 Hz e 18.029

## ***Materiais e Métodos***

---

Hz, em F1 de 4.464 Hz, 20.161 Hz e 36.049 Hz, número de promediações (ns) igual 32, 64 e 90, respectivamente.

Os parâmetros a seguir foram os mesmos para as medidas de *g*COSY 45°, *g*HSQC, *g*HMBC: tempos de espera entre cada aquisição de 2 s (d1), com 256 pontos durante a aquisição (td) em F1 e 4.096 pontos durante a aquisição em F2, no processamento foram utilizados 1.024 pontos (si) em F1 e 4.096 pontos em F2.

### **3.7. Análises quimiométricas**

As análises multivariadas dos dados foram realizadas utilizando os programas The Unscrambler® v. 9.7 (CAMO SOFTWARE AS) e Matlab® v. 7.9.

Para a construção da matriz dos dados de RMN de <sup>1</sup>H foram utilizados os valores médios das triplicatas. As regiões referentes ao sinal residual da água, do TMSP-d<sub>4</sub> e os ruídos presentes nas laterais dos espectros (região sem sinal) foram removidas, originando uma nova matriz de dados (matriz final) contendo 20.770 variáveis. Na matriz final todas as amostras referem-se às linhas e os deslocamentos químicos referem-se às colunas.

#### **3.7.1. Análises por Componentes Principais (PCA)**

Para as análises de PCA todos os dados da matriz final foram pré-processados realizando uma correção automática na linha de base. Na etapa em que foram consideradas todas as variáveis contidas na matriz final, os dados foram centrados na média e na etapa em que foram selecionadas manualmente as variáveis os dados foram autoescalados.

#### **3.7.2. Calibração multivariada e univariada**

Na calibração multivariada treze (13) amostras foram utilizadas para calibração e as mesmas amostras foram utilizadas no conjunto de validação. Inicialmente foi realizada uma análise exploratória dos dados empregando análise de componentes principais (PCA). Isto permitiu aperfeiçoar os parâmetros de pré-processamento e transformação que foram aplicados no desenvolvimento dos modelos PCR e PLS. A escolha do número de componentes principais (PCs) na construção dos modelos fora baseada em alguns parâmetros estatísticos,

## ***Materiais e Métodos***

---

principalmente nos baixos valores de SECal (*Standard Error of Calibration*), SEVal (*Standard Error of Validation*), RMSECal (*Root Mean Square Error of Calibration*) e RMSEVal (*Root Mean Square Error of Validation*). O método de validação cruzada foi utilizado para avaliar os modelos PCR e PLS.

Para calibração univariada foram utilizadas dez (10) amostras no conjunto de calibração. O parâmetro de referência utilizado foi a concentração do analito em função da intensidade máxima do sinal de interesse no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , as quais são denominadas variáveis medidas conforme descrito na **Tabela 3.5**.

**Tabela 3.5.** Parâmetro de referência *versus* variáveis medidas utilizadas na calibração univariada.

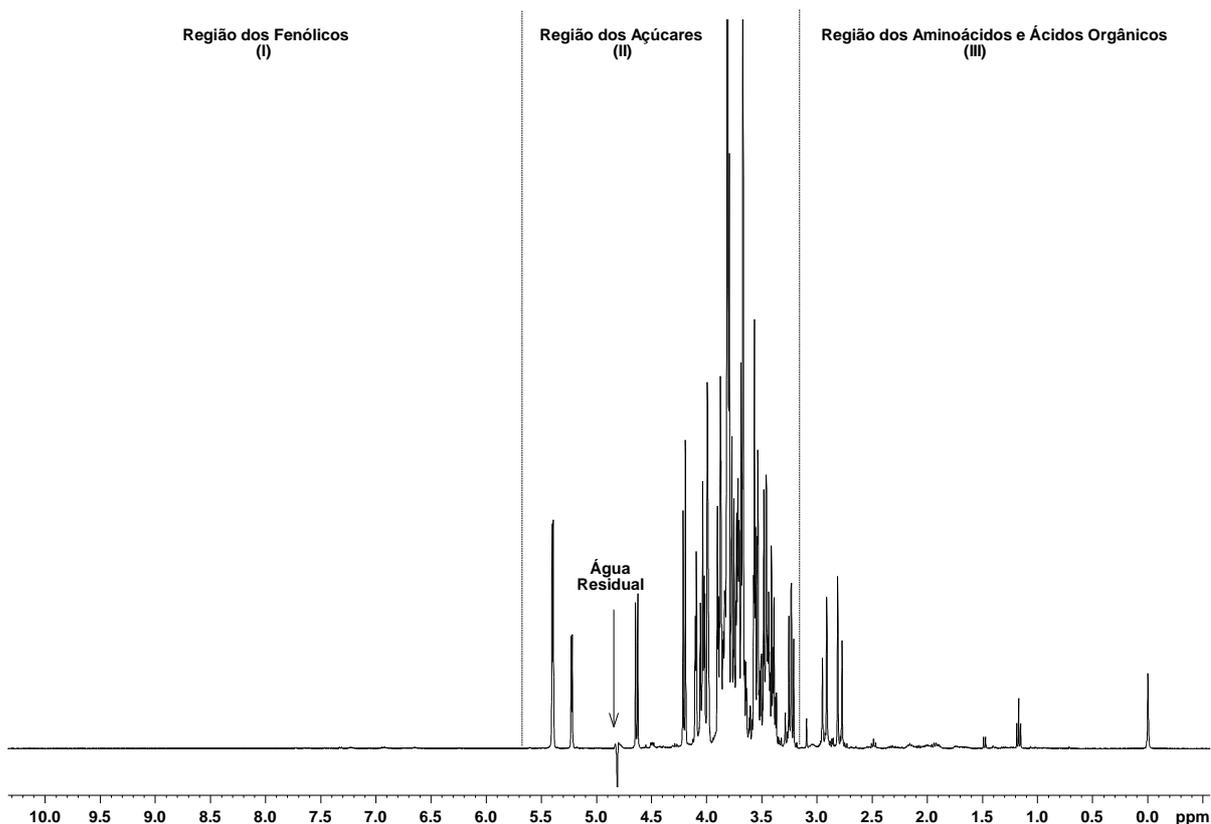
<b>Parâmetro de referência</b>	<b>Variáveis medidas</b>
Concentração de etanol (g/L)	Intensidade máxima do sinal da metila do etanol

---

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

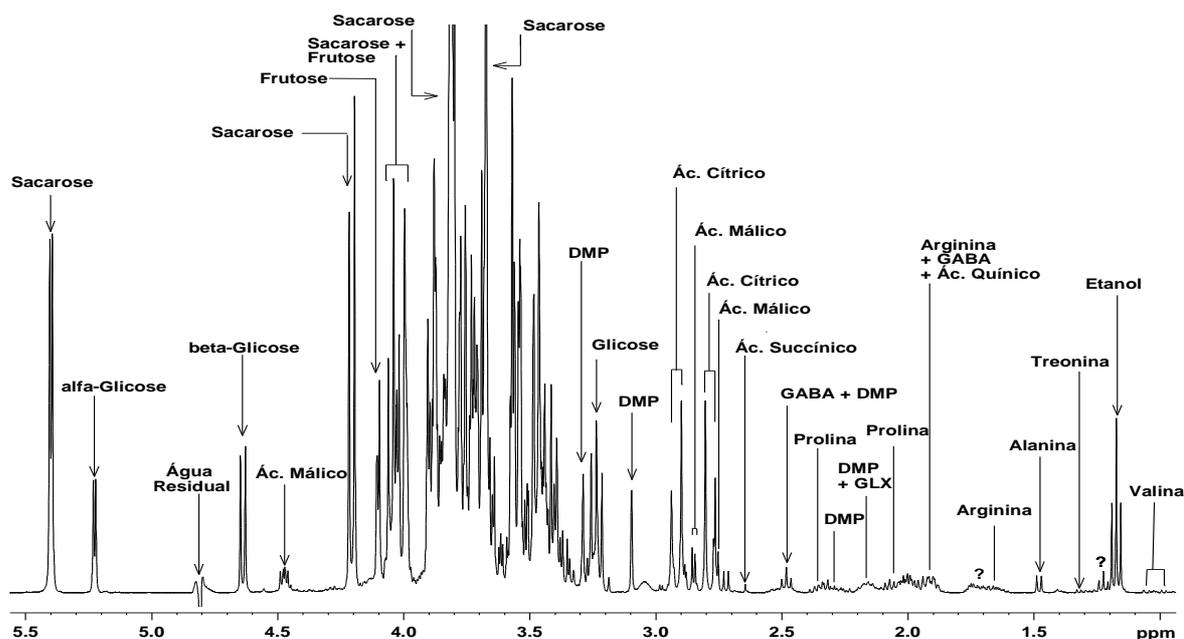
### 4.1. Perfil dos metabólito nas amostras de suco de laranja

Um espectro típico de RMN de  $^1\text{H}$  e uma visão expandida de uma amostra de suco de laranja são apresentados na **Figura 4.1.1.** e **4.1.2.**



**Figura 4.1.1.** Espectro típico de RMN de  $^1\text{H}$  de uma amostra de suco de laranja.

## Resultados e Discussões



**Figura 4.1.2.** Visão expandida de um espectro típico de RMN de  $^1\text{H}$  de uma amostra de suco de laranja usando a sequência de pulsos *noesygppr1d* (denominação Bruker).

Foram caracterizados 27 metabólitos presentes nas amostras de suco de laranja. As atribuições dos metabólitos foram realizadas baseando-se em dados da literatura<sup>33,44,51,65,66</sup> e através da análise dos espectros bidimensionais *g*COSY 45° (**Figuras 4.1.3. e 4.1.4.**), *g*HSQC (**Figura 4.1.5.**) e *g*HMBC (**Figura 4.1.6.**). Na **Tabela 4.1.1.** estão sumarizadas as informações dos metabólitos caracterizados nas amostras de suco de laranja comercial 02 e suco natural da laranja pêra Rio com seus respectivos deslocamentos químicos.

Conforme pode ser observado na **Figura 4.1.2.** a sacarose,  $\alpha$ -glicose,  $\beta$ -glicose, frutose, ácido cítrico e etanol são os metabólitos em maiores quantidades nas amostras de suco de laranja, concordado com as informações descritas na literatura<sup>49</sup>. Os hidrogênios de aminoácidos e ácidos orgânicos são característicos e encontrados nas regiões de 0,9-3,0 ppm, onde foi possível caracterizar 15 metabólitos do total de 27, enquanto, os hidrogênios dos açúcares são característicos nas regiões de 3,0-6,0 ppm e acima de 6,0 ppm são característicos de compostos fenólicos.

## Resultados e Discussões

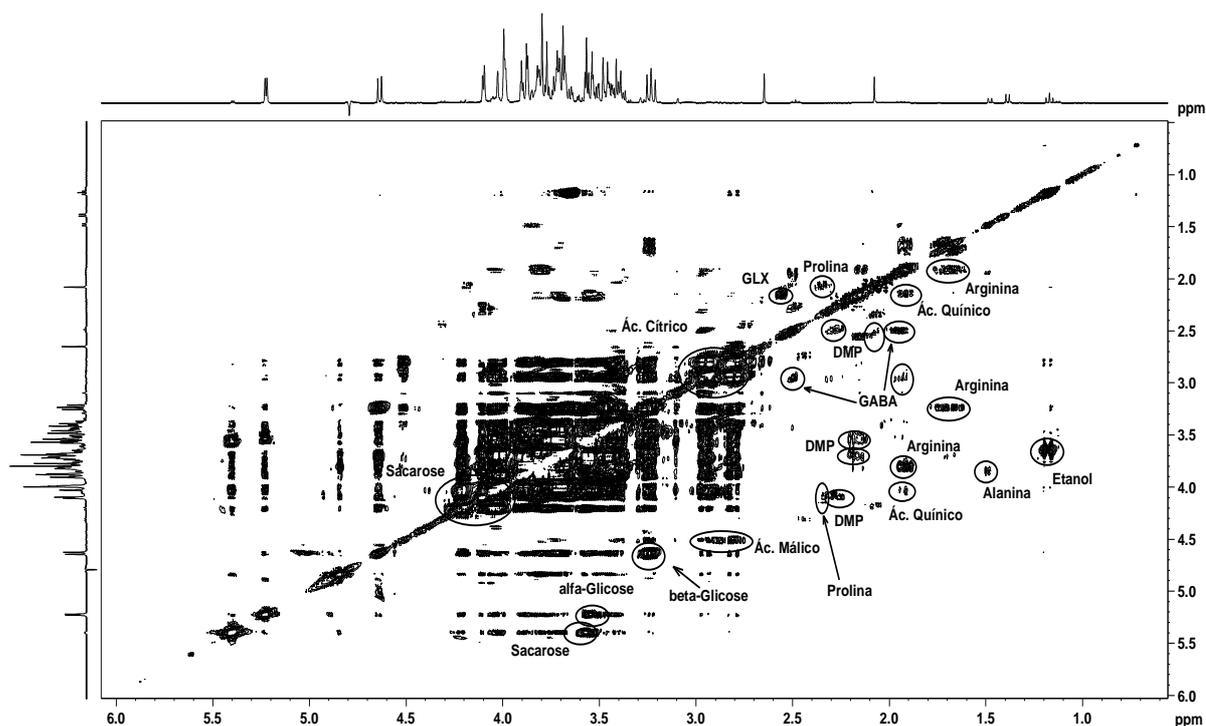


Figura 4.1.3. Visão geral do mapa de correlação  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ( $g\text{COSY } 45^\circ$ ) de uma amostra de suco de laranja pêra Rio.

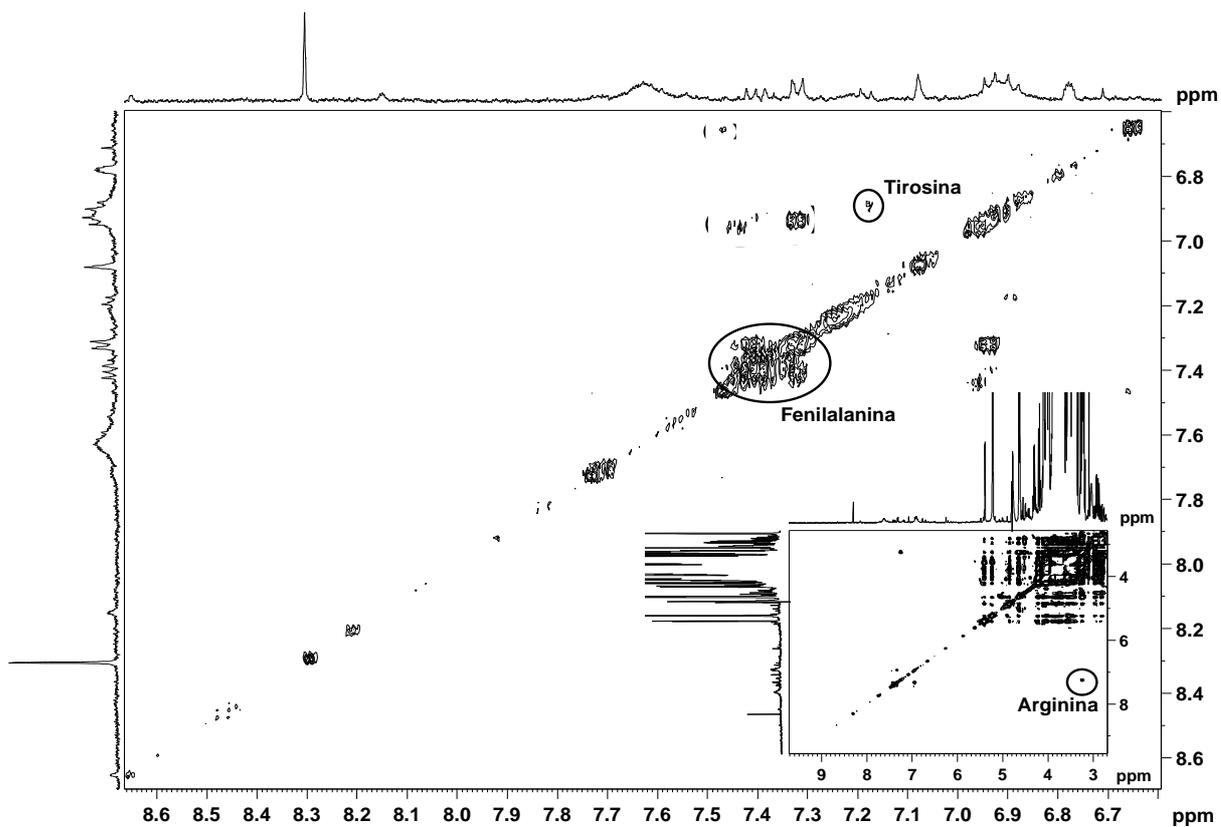
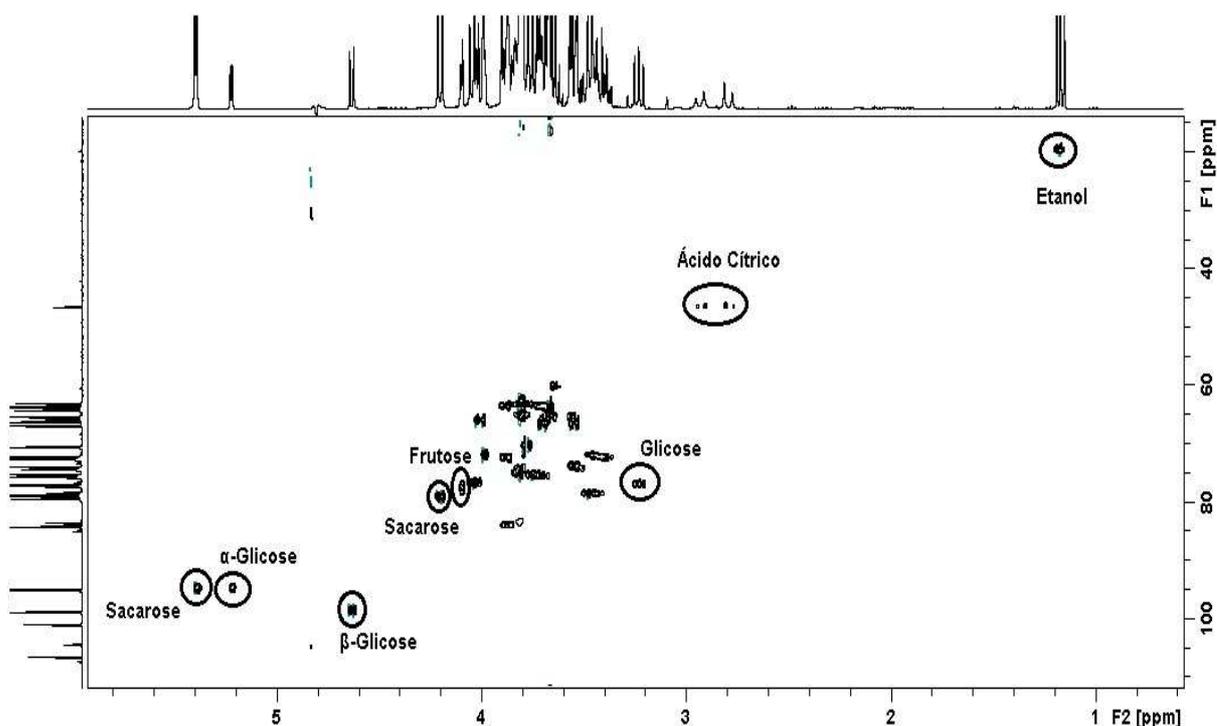
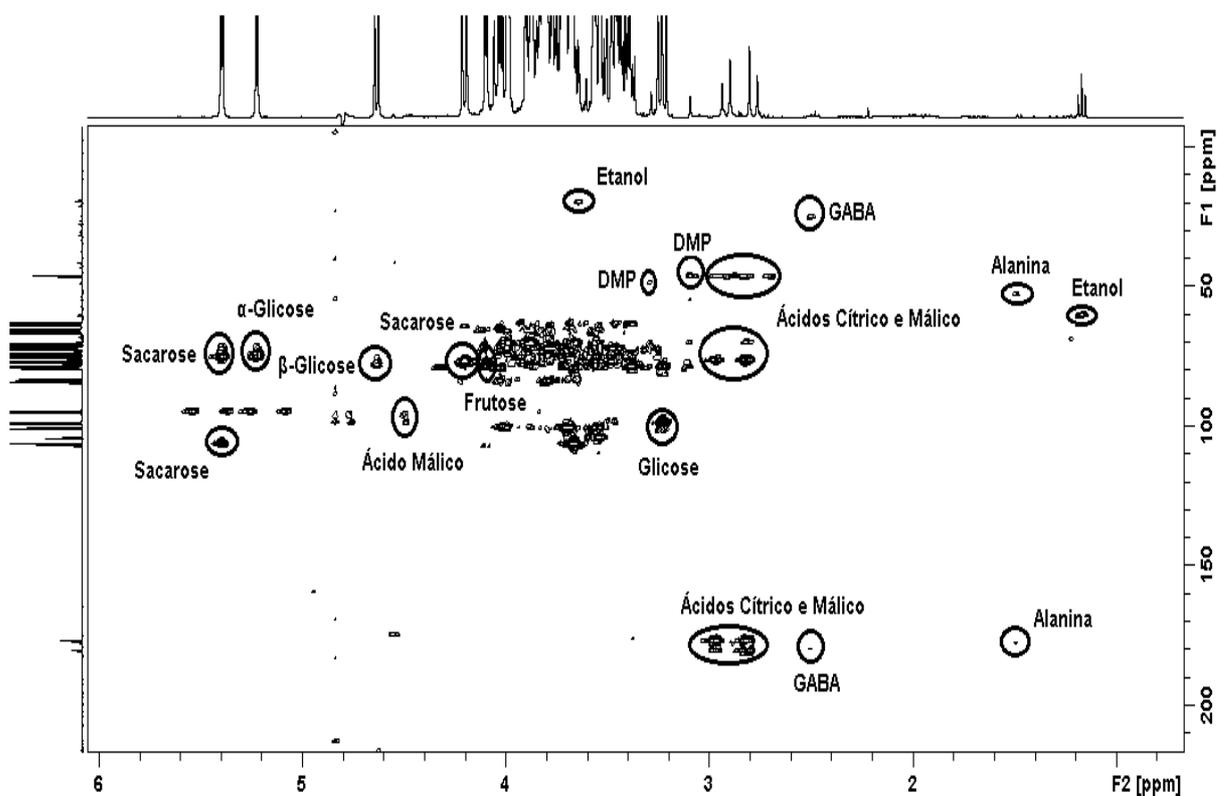


Figura 4.1.4. Visão expandida do mapa de correlação  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ( $g\text{COSY } 45^\circ$ ) de uma amostra de suco de laranja pêra Rio.

## Resultados e Discussões



**Figura 4.1.5.** Visão geral do mapa de correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a uma ligação (gHSQC) da amostra de suco de laranja comercial 02.



**Figura 4.1.6.** Visão geral do mapa de correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a longa distância (gHMBC) da amostra de suco de laranja comercial 02.

**Resultados e Discussões****Tabela 4.1.1.** Metabólitos caracterizados nas amostras de suco de laranja.

Código	Metabólitos	$\delta^1\text{H}$ ppm (multiplicidade, J Hz)	gCOSY	gHSQC ( $\delta^{13}\text{C}$ ppm)	gHMBC ( $\delta^{13}\text{C}$ ppm)
1	Valina	0,98 (d, 7,00)	--	19,7	32,0
		1,03 (d, 7,00)	--	20,8	32,0
2	Etanol	1,17 (t, 7,20)	3,65	19,8	60,5
		3,65 (q, 7,20)	1,17	--	19,8
3	Treonina	1,32 (d, 6,50)	--	22,3	68,7
4	Ácido Lático	1,39 (d, 7,00)	--	22,5	72,6
5	Alanina	1,48 (d, 7,20)	3,84	18,9	53,1; 177,7
		3,84 (q, 7,20)	1,48	--	--
6	Arginina	1,60 – 1,78 (m)	$\frac{1,88 - 1,94}{3,24 - 3,28}$	26,9	43,5
		1,88 – 1,94 (m)	$\frac{1,60 - 1,78}{3,78 - 3,80}$	--	--
		3,24 – 3,28 (m)	$\frac{1,60 - 1,78}{7,20 - 7,25}$	--	26,9
		3,78 – 3,80 (m)	1,88 – 1,94	--	30,6
		7,20 – 7,25 (m)	3,24 – 3,28	--	--
7	Ácido $\gamma$ -aminobutírico (GABA)	1,93-1,95 (m)	$\frac{2,46-2,51}{3,00-3,04}$	25,3	33,9; 41,7
		2,46-2,51 (m)	$\frac{1,93-1,95}{3,00-3,04}$	33,9	25,3; 41,7; 180,2
		3,00 -3,04 (m)	$\frac{1,93-1,95}{2,46-2,51}$	--	--
8	Ácido Quínico	1,87 – 1,89 (m)	2,10 – 2,13	43,4	--

**Resultados e Discussões**

			4,04 – 4,06		
		2,10 – 2,13 (m)	1,87 – 1,89	43,4	--
		4,04 – 4,06 (m)	1,87 – 1,89	--	--
9	Ácido Acético	2,07 (s)	--	23,4	--
		2,02 – 2,05 (m)	$\frac{2,32 - 2,34}{4,14 - 4,15}$	--	26,8; 177,0
10	Prolina	2,32 – 2,34 (m)	$\frac{2,02 - 2,05}{4,14 - 4,15}$	--	26,8
		4,14 – 4,15 (m)	$\frac{2,02 - 2,05}{2,32 - 2,34}$	--	--
		2,13-2,19 (m)	$\frac{2,46-2,51}{3,52-3,55}$ $\frac{3,69-3,72}{3,69-3,72}$	--	--
		2,27-2,30 (m)	$\frac{2,46-2,51}{4,06-4,09}$	--	--
11	Dimetilprolina (DMP)	2,46-2,51 (m)	$\frac{2,13- 2,19}{2,27-2,30}$	--	--
		3,09 (sl)	--	48,8	54,9; 70,3
		3,29 (sl)	--	54,9	48,8; 70,3
		3,52-3,55 (m)	2,13-2,19	--	--
		3,69-3,72 (m)	2,13-2,19	--	--
		4,06-4,09 (m)	2,13-2,19	--	--
12	Ácido Galacturónico (GLX)	2,11 – 2,20 (m)	2,51 – 2,56	--	--
		2,51 – 2,56 (m)	2,11 – 2,20	--	--
13	Ácido Pirúvico	2,21 (s)	--	27,9	--
14	Ácido Succínico	2,65 (s)	--	32,2	--

**Resultados e Discussões**

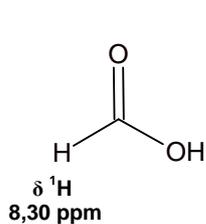
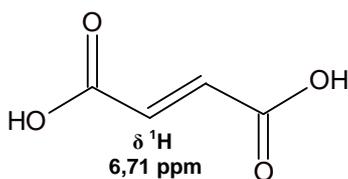
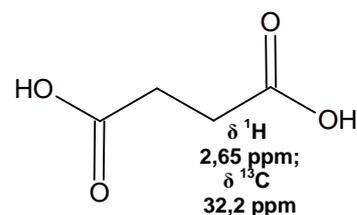
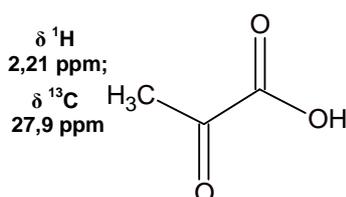
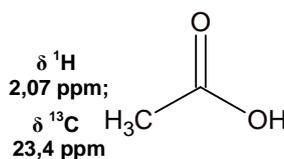
15	Ácido Málico	2,76 (d, 7,30)	4,47	--	--
		2,86 (d, 4,50)	4,47	--	70,3; 177,7
		4,47 (dd, 4,50; 7,30)	2,76 2,86	--	--
16	Ácido Cítrico	2,80 (d, 15,60)	2,94	46,5	46,5; 76,8; 176,9; 180,3
		2,94 (d, 15,60)	2,80	46,5	46,5; 76,8; 176,9; 180,3
17	$\beta$ -Glicose	3,23 (dd, 7,80; 10,70)	4,63	77,2	78,7; 98,8
		4,63 (d, 7,80)	3,23	98,8	77,2; 78,7
18	$\alpha$ -Glicose	3,52 – 3,55 (m)	5,23	74,3	75,6
		5,23 (d, 3,90)	3,52 – 3,55	95,0	74,3; 75,6
19	Sacarose	3,56 (d, 3,90)	5,40	73,9	--
		4,04 (t, 8,70; 8,70)	4,20	77,2	--
		4,20 (d, 8,70)	4,04	79,4	64,0; 65,3; 77,2; 84,3
		5,40 (d, 3,90)	3,56	95,0	72,3; 75,4 106,2
20	Frutose	3,97 – 4,00 (m)	--	72,2	--
		4,10 (m)	--	78,0	65,3; 72,2; 77,2; 106,2
21	Florina	6,15 (m)	--	--	--
		6,21 (m)	--	--	--
22	Ácido Fúmarico	6,71 (s)	--	--	--
23	Tirosina	6,89 (m)	7,18	--	--
		7,18 (m)	6,89	--	--
24	Fenilalanina	7,32 (m)	7,41	--	--
		7,41 (m)	7,32	--	--
25	5-Hidroximetilfurfural	7,52 – 7,56 (m)	--	--	--
26	Ácido Fórmico	8,30 (s)	--	--	--
27	Histidina	8,63 – 8,66 (m)	--	--	--

**Resultados e Discussões**

28	Desconhecido	9,00 – 910 (m)	--	--	--
----	--------------	----------------	----	----	----

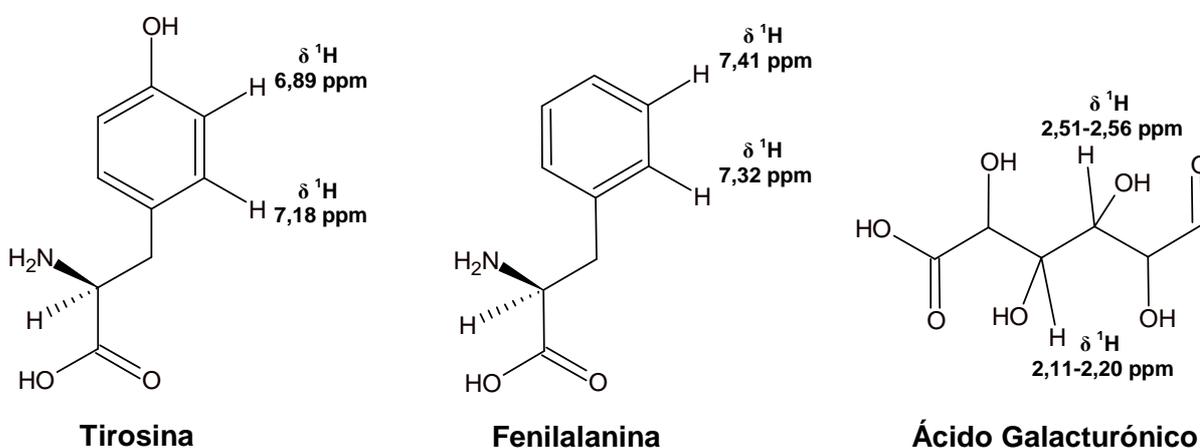
s-sinpleto, sl-sinpleto largo, d-dupletto, dd-duplo dupletto, t-tripletto, q-quartetto, m-multipletto.

Os metabólitos: ácido fórmico ( $\delta$   $^1\text{H}$  8,30 ppm), ácido fúmarico ( $\delta$   $^1\text{H}$  6,71 ppm), ácido succínico ( $\delta$   $^1\text{H}$  2,65 ppm), ácido pirúvico ( $\delta$   $^1\text{H}$  2,21 ppm) e ácido acético ( $\delta$   $^1\text{H}$  2,07 ppm) apresentaram apenas um sinal no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , um sinpleto, conseqüentemente seus sinais não apresentaram correlações no gCOSY 45°. A presença desses sinais no gHSQC foi detectada apenas para os ácidos: succínico, pirúvico e acético, enquanto que para o ácido fórmico e ácido fúmarico esses sinais não foram possíveis de serem detectadas no gHSQC e gHMBC, portanto a caracterização desses sinais foram baseadas apenas em dados da literatura<sup>32,66</sup>.

**Ácido Fórmico****Ácido Fúmarico****Ácido Succínico****Ácido Pirúvico****Ácido Acético**

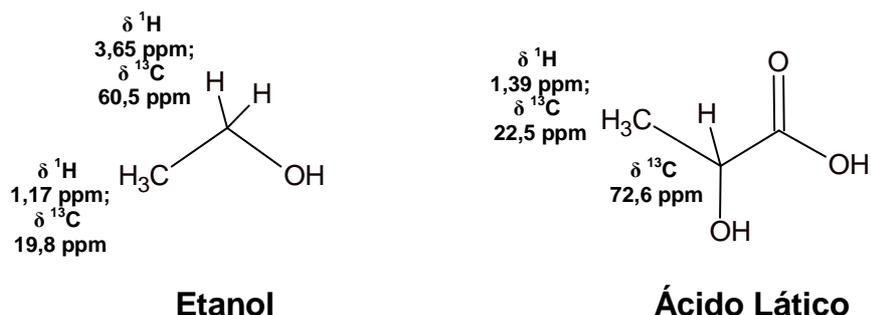
## Resultados e Discussões

A presença da tirosina, fenilalanina e ácido galacturônico não puderam ser confirmados através da análise dos espectros de *g*HSQC e *g*HMBC, porém os metabólitos foram caracterizados através da análise do espectro de *g*COSY 45° e através dos dados da literatura<sup>66,67</sup>. O acoplamento entre os hidrogênios do anel aromático da tirosina (acoplamento dos H's 7,18 e 6,89 ppm) e da fenilalanina (acoplamento dos H's 7,41 e 7,32 ppm) são apresentados na **Figura 4.1.4.**, enquanto que o acoplamento dos hidrogênios do grupo CH presentes no ácido galacturônico (acoplamento dos H's 2,51-2,56 ppm e 2,11-2,20 ppm) é apresentado na **Figura 4.1.3.**



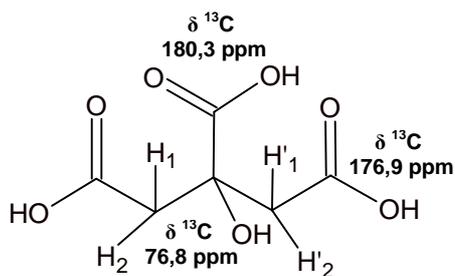
O sinal característico do etanol, um grupo CH<sub>3</sub> com multiplicidade de um tripleto em 1,17 ppm acoplado com um grupo CH<sub>2</sub> com multiplicidade de um quarteto em 3,65 ppm foi confirmada no espectro de *g*COSY 45°. O sinal característico do etanol em 1,17 ppm acoplado a uma ligação com o carbono em 19,8 ppm e a duas ligações com o carbono em 60,5 ppm foram confirmados nos espectros de *g*HSQC e *g*HMBC, respectivamente. Assim, o acoplamento do hidrogênio em 3,65 ppm a duas ligações com o carbono em 19,8 ppm foi observado também no espectro de *g*HMBC. O sinal característico do grupo CH<sub>3</sub> do ácido láctico em 1,39 ppm, multiplicidade de um duplete, acoplado com um grupo CH em 4,12 ppm, não foi possível ser observada no espectro de *g*COSY 45°, contudo o acoplamento a uma ligação com o carbono em 22,5 ppm e a duas ligações com o carbono em 72,6 ppm foram observadas nos espectros de *g*HSQC e *g*HMBC, respectivamente.

## Resultados e Discussões



O ácido cítrico apresenta dois sinais intensos no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , dupletos em 2,80 ppm e 2,94 ppm, os quais apresentaram correlacionados no espectro de  $g\text{COSY } 45^\circ$ . Também foi possível observar o acoplamento desses hidrogênios com o carbono a uma ligação (46,5 ppm) no espectro de  $g\text{HSQC}$  e a longa distância (76,8 ppm, 176,9 ppm e 180,3 ppm) no espectro de  $g\text{HMBC}$ . O ácido málico apresenta três sinais característico no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , um duplo duplete em 4,47 ppm e dois dupletos em 2,86 ppm e 2,76 ppm, o acoplamento desses sinais foram observadas no espectro de  $g\text{COSY } 45^\circ$ , porém apenas o acoplamento a longa distância do hidrogênio em 2,86 ppm com os carbonos em 70,3 ppm e 177,7 ppm foram observadas no espectro de  $g\text{HMBC}$ . O acoplamento dos sinais dos H's do ácido quínico em 1,87-189 ppm, 2,10-2,13 ppm e 4,04-4,06 ppm puderam ser confirmadas no espectro de  $g\text{COSY } 45^\circ$ , todavia foram observados apenas os acoplamentos a uma ligação dos H's em 1,87-189 ppm e 2,10-2,13 ppm com o carbono em 43,4 ppm no espectro de  $g\text{HSQC}$ .

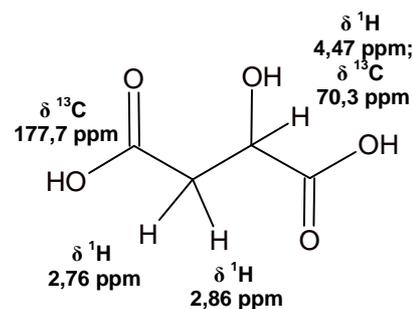
## Resultados e Discussões



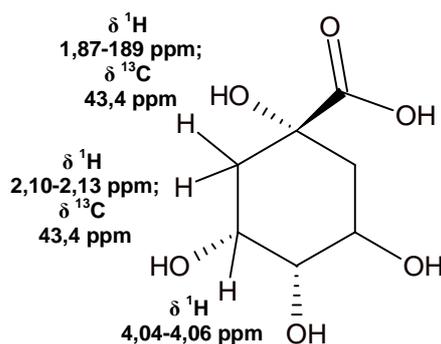
$\delta^1\text{H}$   $\text{H}_1, \text{H}'_1 = 2,80$  ppm  $\delta^{13}\text{C}$  46,5 ppm

$\delta^1\text{H}$   $\text{H}_2, \text{H}'_2 = 2,94$  ppm  $\delta^{13}\text{C}$  46,5 ppm

### Ácido Cítrico



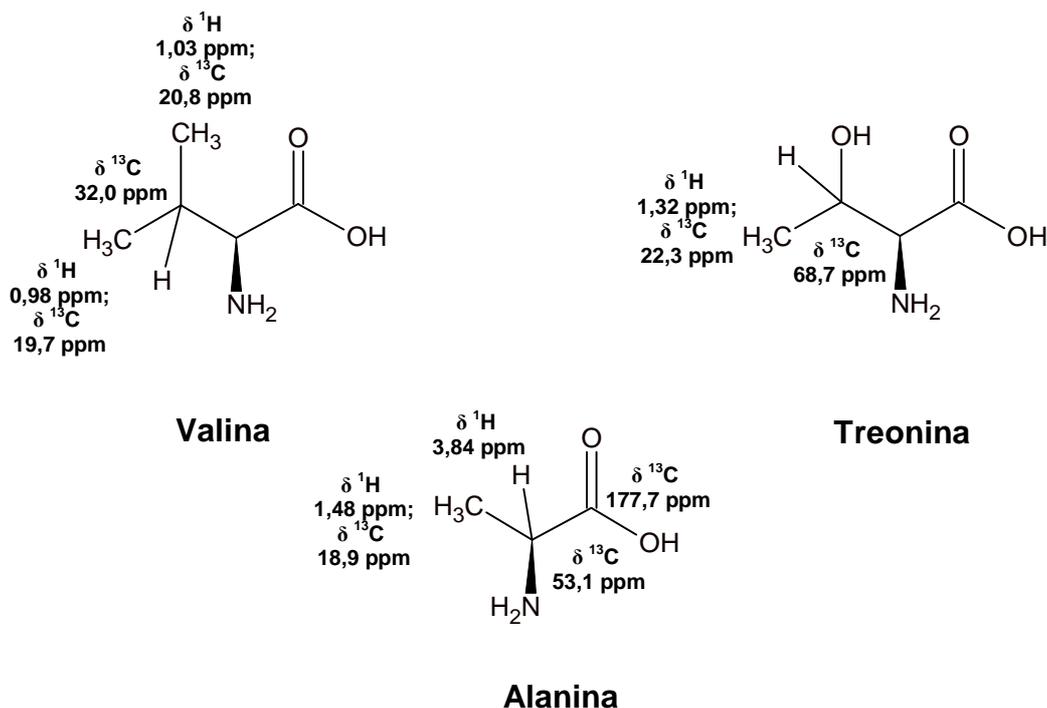
### Ácido Málico



### Ácido Quínico

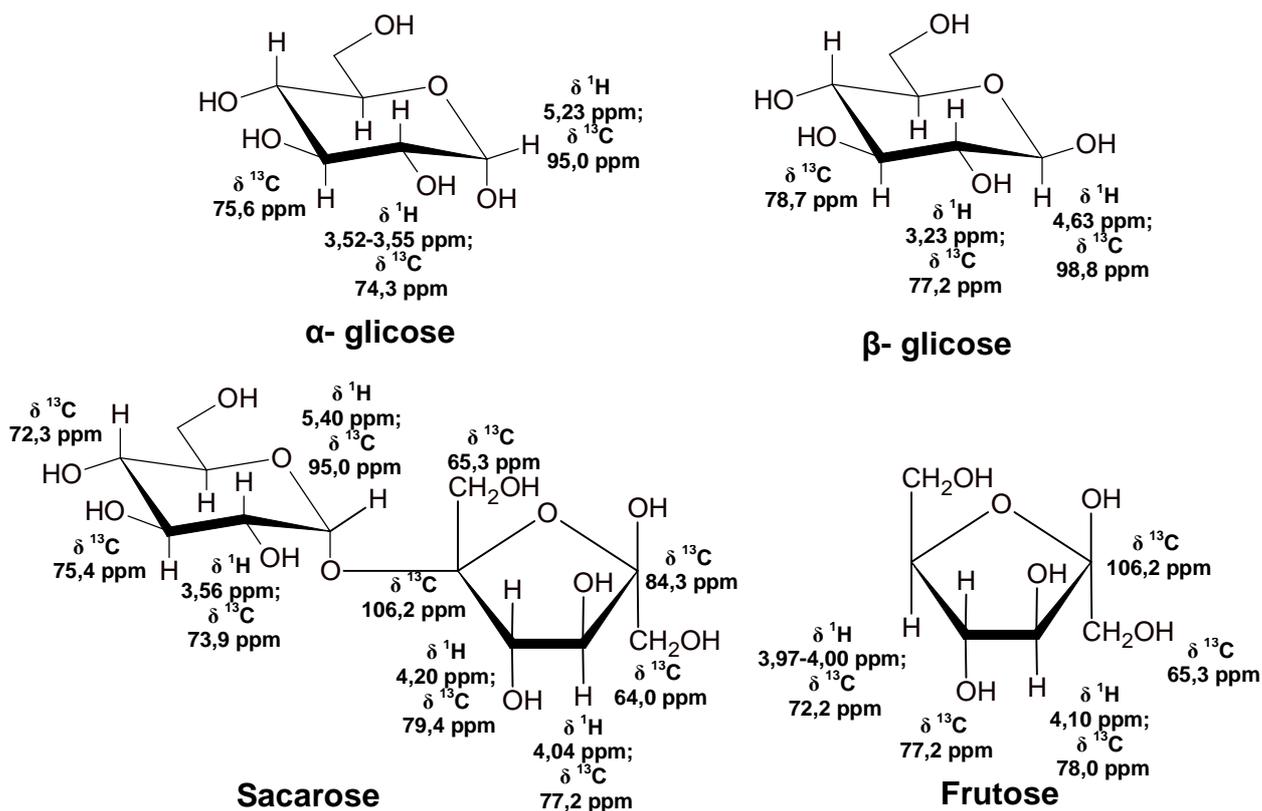
Os aminoácidos valina, treonina e alanina apresentaram sinais característicos no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , os grupos  $\text{CH}_3$  presentes nesses metabólitos com multiplicidade de um duplete em 0,98 e 1,03 ppm (valina), 1,32 ppm (treonina) e 1,48 ppm (alanina) acoplado com um grupo  $\text{CH}$  em 3,59; 3,57 e 3,84 ppm, respectivamente, porém foi possível observar esses acoplamentos apenas para a alanina no espectro de  $g\text{COSY}$  45°. Foram observados os acoplamentos dos hidrogênios em 0,98 e 1,03 ppm da valina a uma ligação com os carbonos em 19,7 e 20,8 ppm no espectro de  $g\text{HSQC}$  e a duas ligações com o carbono em 32,0 ppm no espectro de  $g\text{HMBC}$ . Da mesma maneira, foi observado o acoplamento a uma ligação do hidrogênio em 1,32 ppm da treonina com o carbono em 22,3 ppm e a duas ligações com o carbono em 68,7 ppm. Assim, o hidrogênio em 1,48 ppm da alanina acopla a uma ligação com o carbono em 18,3 ppm e com os carbonos a longa distância em 53,1 e 177,7 ppm.

## Resultados e Discussões

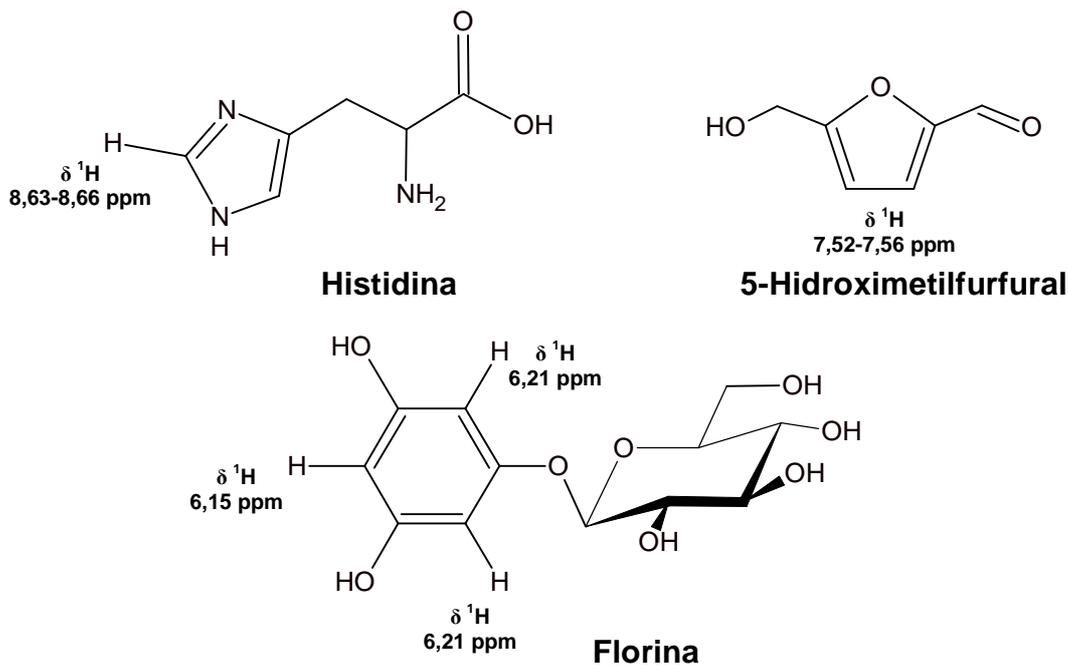


Os principais carboidratos encontrados no suco de laranja são: sacarose, frutose,  $\alpha$ - glicose e a  $\beta$ -glicose. A sacarose é um dissacarídeo formado por uma molécula de glicose e uma molécula de frutose, enquanto que a frutose,  $\alpha$ - glicose e a  $\beta$ -glicose são monossacarídeos. Esses carboidratos são facilmente encontrados em suco de frutas e como características principais apresentam sabores adocicados. A sacarose apresenta um sinal característico no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , um duplete em 5,40 ppm, é o sinal correspondente ao hidrogênio ligado ao carbono anomérico da ligação entre a molécula de glicose e frutose. Igualmente, a  $\alpha$ - glicose e a  $\beta$ -glicose apresentam hidrogênios anoméricos, com multiplicidades de dupletos, em 5,23 e 4,63 ppm no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , respectivamente. A frutose foi caracterizada através dos sinais em 4,10 e 3,97-4,00 ppm, o acoplamento desses hidrogênios a uma ligação com os carbonos, em 72,2 e 78,0 ppm, no espectro de gHSQC foram observadas. Assim, no espectro de gHMBC o hidrogênio em 4,10 ppm mostrou acoplamento com os carbonos a longa distância em 65,5; 76,8; 83,1 e 107,2 ppm. Do mesmo modo, foram observados vários acoplamentos no espectro de gCOSY 45°, gHSQC e gHMBC para os carboidratos sacarose,  $\alpha$ - glicose e a  $\beta$ -glicose. Estas informações estão resumidas na **Tabela 4.1.1**.

## Resultados e Discussões

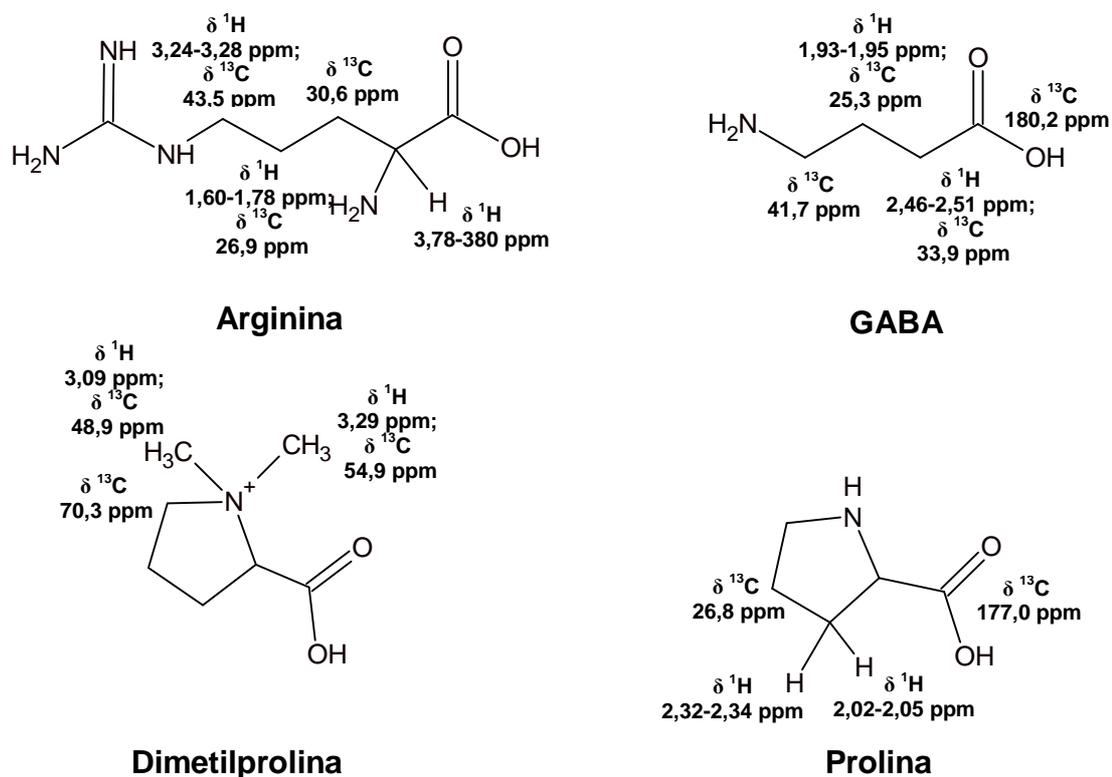


Os metabólitos histidina (8,63-8,66 ppm), 5-hidroximetilfurfural (7,52-7,56 ppm) e florina (6,21-6,15 ppm) não foram detectados nos espectros bi-dimensionais e portanto caracterização desses compostos foram realizadas baseando-se apenas nos dados da literatura<sup>32,51,52</sup>.



## Resultados e Discussões

As correlações homonucleares  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  para os metabólitos arginina, ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), prolina e dimetilprolina (DMP) são apresentadas na **Figura 4.1.3**. O acoplamento do sinal da arginina em 1,60-1,78 ppm com um carbono a uma ligação em 26,9 ppm foi observada no experimento de *g*HSQC e, no espectro de *g*HMBC foi observado o acoplamento a longa distância dos H's, 3,24-3,28 e 3,78-3,80 ppm, com os carbonos em 26,9 e 30,6 ppm, respectivamente. Para o composto DMP foram observados os acoplamentos dos grupos  $\text{CH}_3$  em 3,09 e 3,29 ppm, com multiplicidade de singleto largo para ambos, diretamente ligados com os carbonos em 48,8 e 54,9 ppm e a longa distância com os carbonos em 48,8; 54,9 e 70,3 ppm no espectro de *g*HMBC. Para o aminoácido prolina, foram observados as correlações a longa distância do sinal dos hidrogênios em 2,02-2,05 e 2,32-2,34 ppm com os carbonos em 26,8 e 177,8 ppm. O metabólito GABA apresentou correlações, dos H's em 1,93-1,95 e 2,46-2,51 ppm, diretas com os carbonos em 25,3 e 33,9 ppm e a longa distância com os carbonos em 25,3; 33,9; 41,7 e 180,2 ppm.

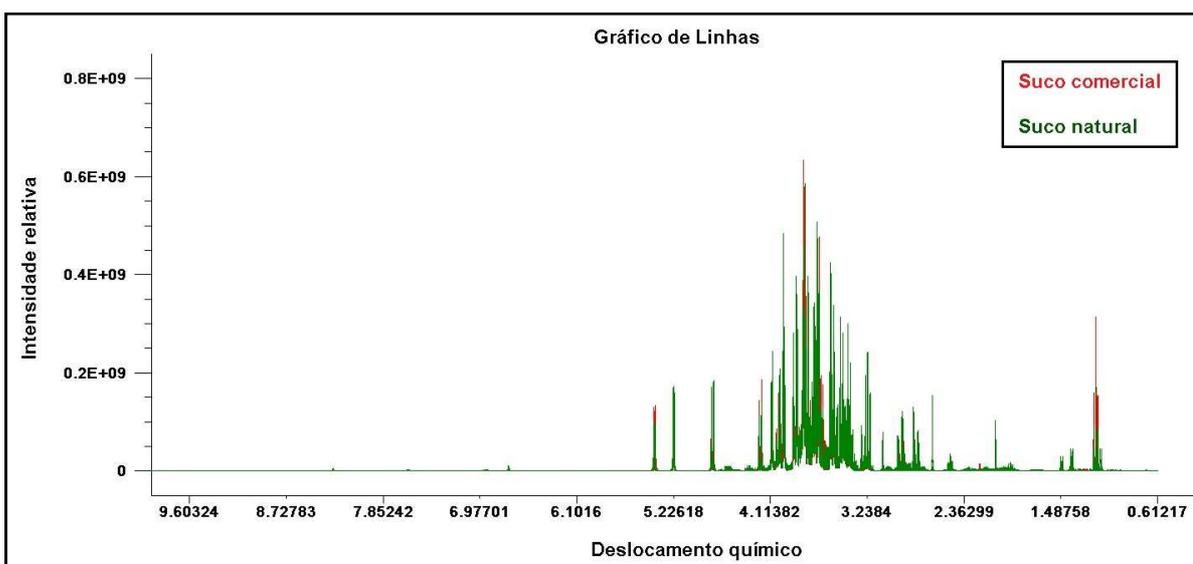


## 4.2. Análise multivariada dos dados

### 4.2.1. Distinção entre suco de laranja comercial e natural

As amostras de suco de laranja foram divididas em dois grupos: suco comercial e natural. Com o intuito de verificar uma possível distinção entre esses grupos fez-se o uso da análise exploratória dos dados utilizando PCA. Essa análise permite a visualização de grupos formados por amostras que apresentam as mesmas características, ou seja, os grupos são formados por amostras com o mesmo perfil metabólico. Para obter a distinção entre os grupos de suco de laranja comercial e natural por PCA foram testados dois métodos: o primeiro foi utilizar todas as variáveis contidas na matriz de dados (**A**) e o segundo foi selecionar manualmente as variáveis contidas na matriz de dados (**B**).

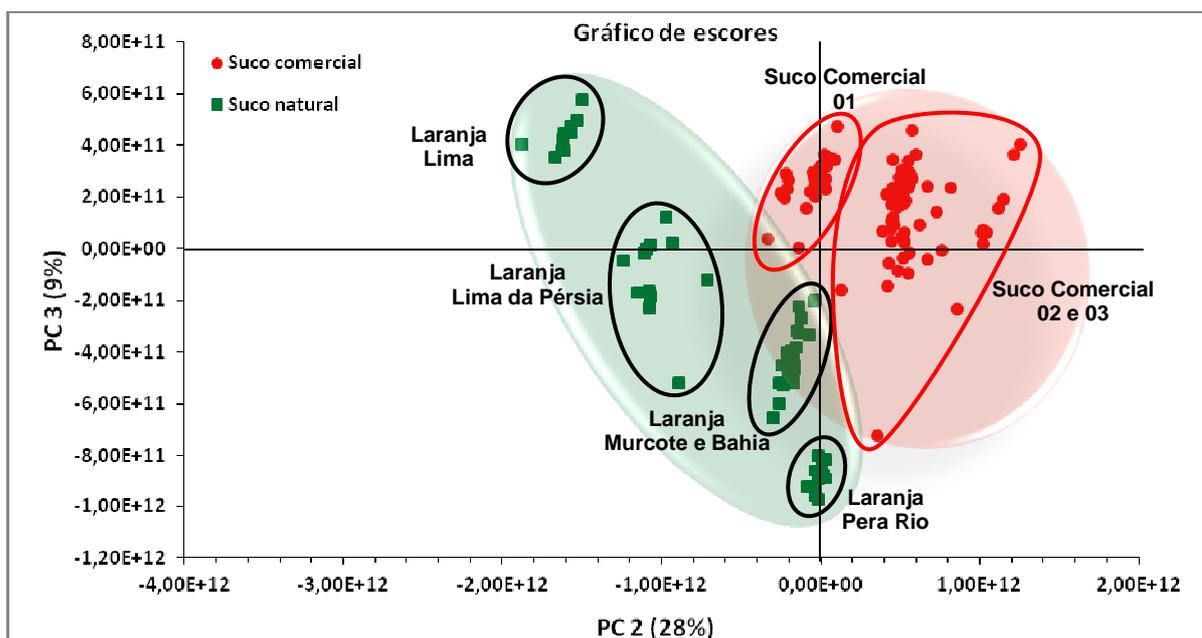
No método **A**, a matriz de dados gerada possui 136 amostras (linhas) por 20767 variáveis (colunas), após a exclusão das variáveis referentes ao sinal residual da água, do TMS $P$ - $d_4$  e os ruídos presentes nas laterais dos espectros. A **Figura 4.2.1.1.** mostra o gráfico de linhas para todas as variáveis após as exclusões e pré-processamento das variáveis (correção da linha de base e dados centrados na média).



**Figura 4.2.1.1.** Gráfico de linhas dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  para os grupos de suco de laranja comercial e natural, analisados pelo método **A** por PCA.

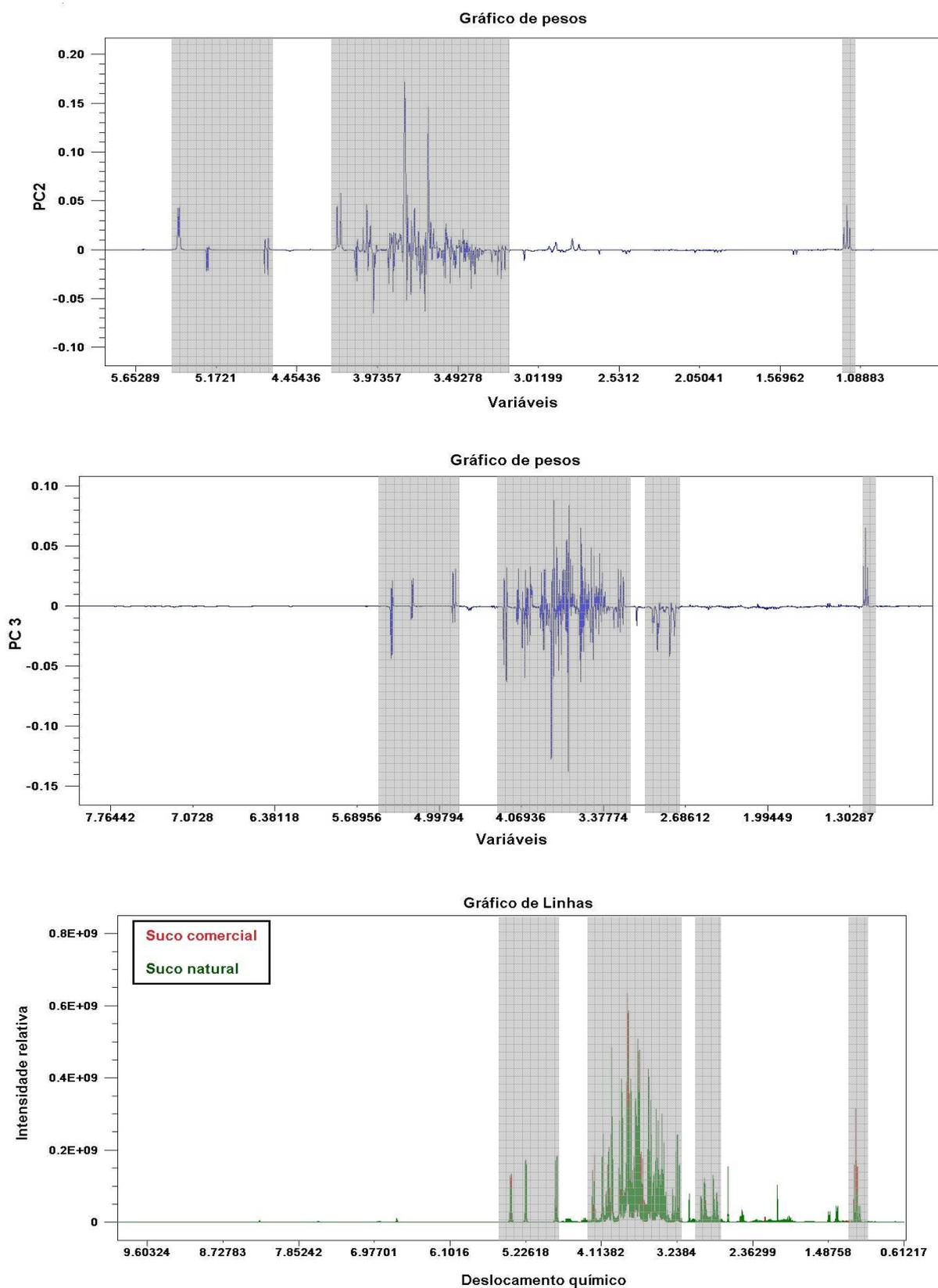
## Resultados e Discussões

A **Figura 4.2.1.2.** apresenta o gráfico de escores das amostras dos grupos de suco de laranja comercial e natural, analisados pelo método **A**. Conforme pode ser observado existe uma forte tendência entre as amostras dos grupos de suco de laranja comercial e natural em se agruparem. Dentro do grupo de suco de laranja natural é possível observar uma tendência de separação entre os cinco (5) tipos de sucos estudados, ocorrendo apenas à sobreposição entre as variedades de suco de laranja murcote e Bahia. No suco de laranja comercial também ocorre essa tendência de separação entre os sucos comerciais estudados, onde o suco comercial 01 apresenta-se separado dos demais, enquanto que o suco comercial 02 e 03 apresentam-se sobrepostos. A soma dos valores obtidos para as três primeiras componentes principais [PC1 (54%), PC2 (28%) e PC3 (9%)] apresentou explicação de 91% do total da variância do banco de dados. A componente principal dois (PC2) foi responsável por essa separação, sendo que os valores positivos de PC2 atuaram com maior influência no grupo de suco comercial e os valores negativos atuaram com maior influência no grupo de suco natural.



**Figura 4.2.1.2.** Gráfico de escores PC2 (28%) versus PC3 (9%) das amostras de suco de laranja do grupo comercial e natural, analisados pelo método **A**.

O gráfico de pesos das amostras de suco de laranja comercial e natural é mostrado na **Figura 4.2.1.3.** A figura apresenta os valores para as componentes principais dois (02) e três (03) e as variáveis destacadas em cinza representam os principais metabólitos responsáveis pela separação.

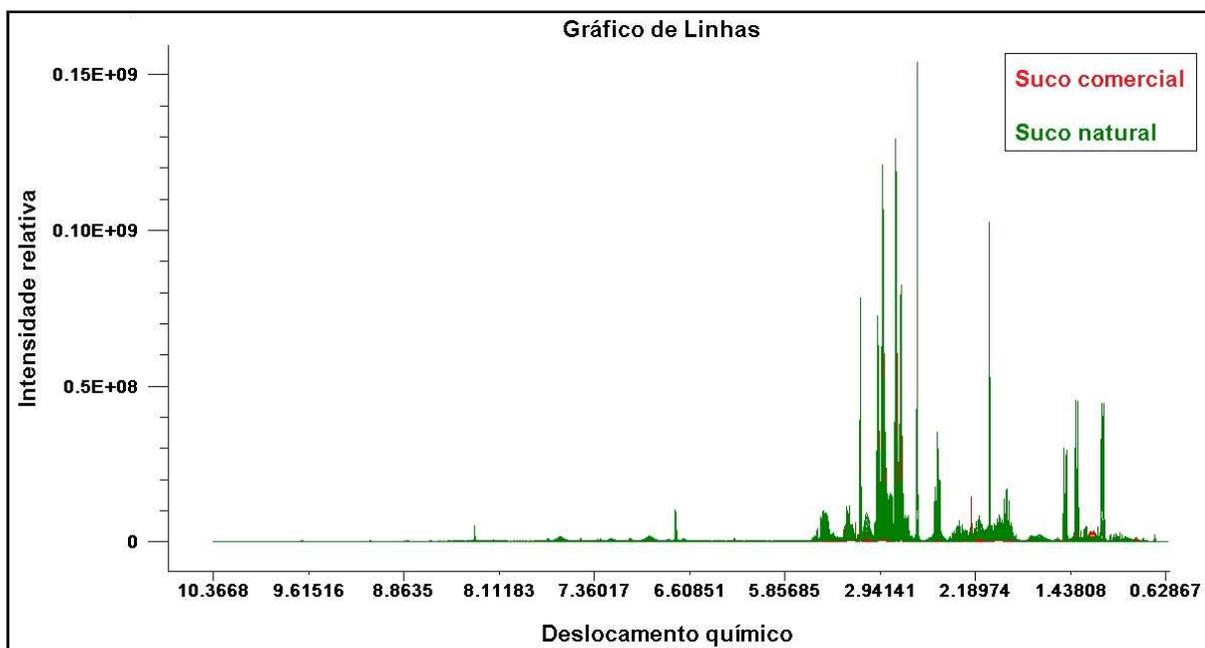
**Resultados e Discussões**

**Figura 4.2.1.3.** Gráfico de pesos das componentes principais dois (02) e três (03) das amostras de suco de laranja comercial e natural destacando-se as variáveis de maior importância na separação do método **A**.

## Resultados e Discussões

De acordo com **Figura 4.2.1.3.** os metabólitos que mais favoreceram para a discriminação obtida foram os sinais referentes à sacarose (5,40 e 4,20 ppm),  $\alpha$ -glicose (5,23 ppm),  $\beta$ -glicose (4,63 ppm), frutose (3,97 ppm), ácido cítrico (2,94 e 2,80 ppm) e o etanol (1,17 ppm). A discriminação das amostras dos grupos de suco de laranja comercial e natural pelo método **A** foram explicadas basicamente pelos metabólitos majoritários presentes no suco de laranja.

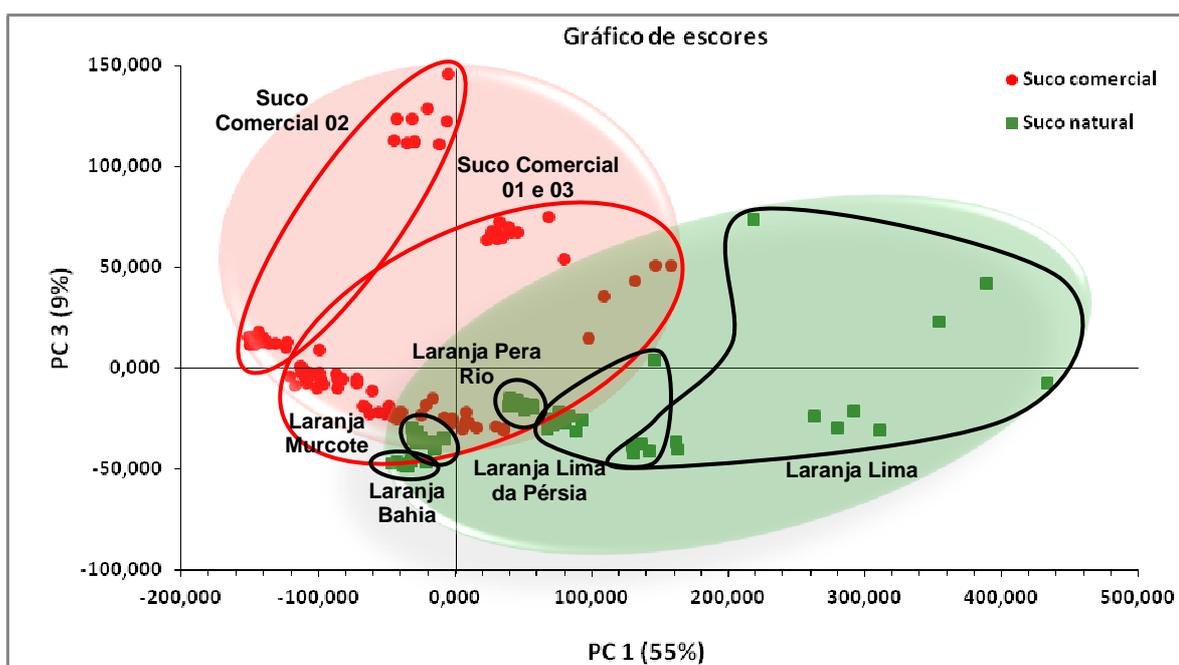
Com a finalidade de se verificar a influência dos metabólitos minoritários presente no suco de laranja foi utilizado o método **B**. Para esse método, uma nova matriz de dados passou a ser constituída por 136 amostras (linhas) por 16437 variáveis (colunas), após a exclusão das variáveis referentes ao sinal residual da água, do TMS $P$ - $d_4$ , dos ruídos presentes nas laterais dos espectros e os sinais referentes aos açúcares (sacarose,  $\alpha$ -glicose,  $\beta$ -glicose, frutose) e etanol. A **Figura 4.2.1.4.** mostra o gráfico de linhas para todas as variáveis após as exclusões e pré-processamento das variáveis (correção da linha de base e dados autoescalados).



**Figura 4.2.1.4.** Gráfico de linhas dos dados de RMN de  $^1H$  para os grupos de suco de laranja comercial e natural, analisados pelo método **B** por PCA.

## Resultados e Discussões

A **Figura 4.2.1.5.** apresenta o gráfico de escores das amostras dos grupos de suco de laranja comercial e natural, analisados pelo método **B**. A soma dos valores obtidos para as três primeiras componentes principais [PC1 (55%), PC2 (12%) e PC3 (9%)] apresentou uma explicação de 76% do total da variância do banco de dados. Conforme pode ser observado existe tendência de agrupamento entre as amostras dos grupos de suco de laranja comercial e natural. Apesar de não haver uma separação clara, as amostras do grupo de suco de laranja natural têm tendência em se agruparem nos valores positivos da componente principal um (PC1) e nos valores negativos da componente principal três (PC3). Contudo, as amostras do grupo de suco de laranja comercial têm tendência em se agruparem nos valores positivos da componente principal três (PC3) e nos valores negativos da componente principal um (PC1). Dentro dessa tendência de separação dos grupos de suco de laranja é possível observar a separação no grupo de suco de laranja comercial 02 das demais amostras de suco de laranja comercial 01 e 03 que apresentam sobrepostas. Para as amostras de suco de laranja natural é possível observar uma tendência de separação entre os cinco (5) tipos de sucos estudados, ocorrendo apenas uma pequena sobreposição entre as variedades de suco de laranja Lima da Pérsia e Lima.

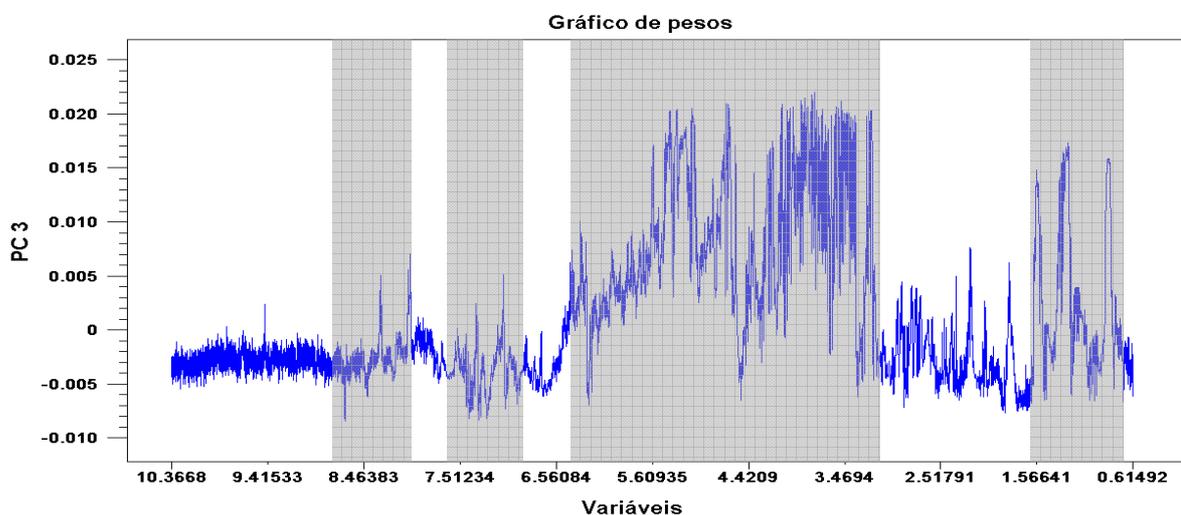
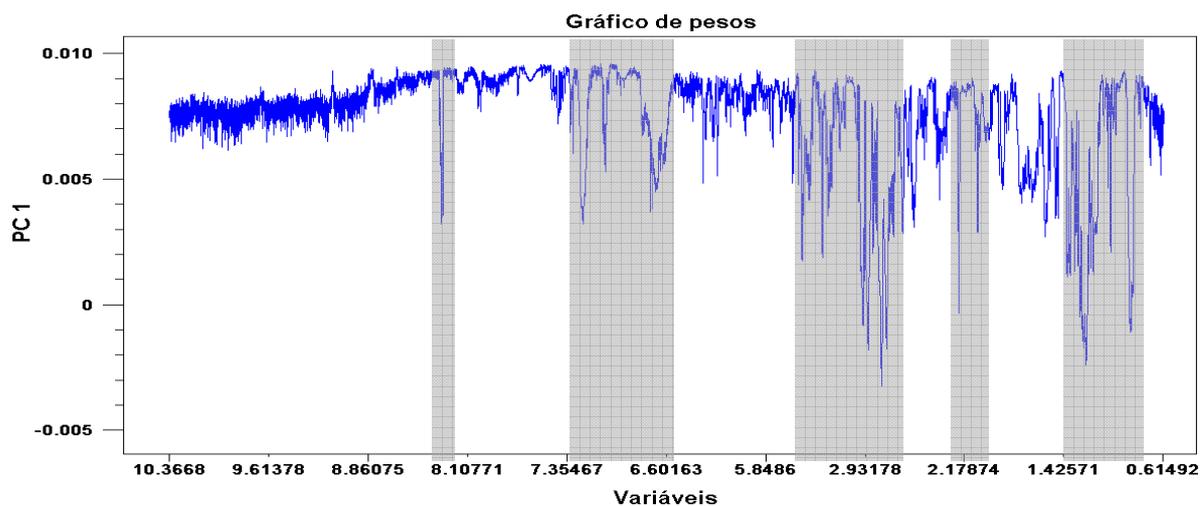


**Figura 4.2.1.5.** Gráfico de escores PC1 (55%) versus PC3 (9%) das amostras de suco de laranja do grupo comercial e natural, analisados pelo método **B**.

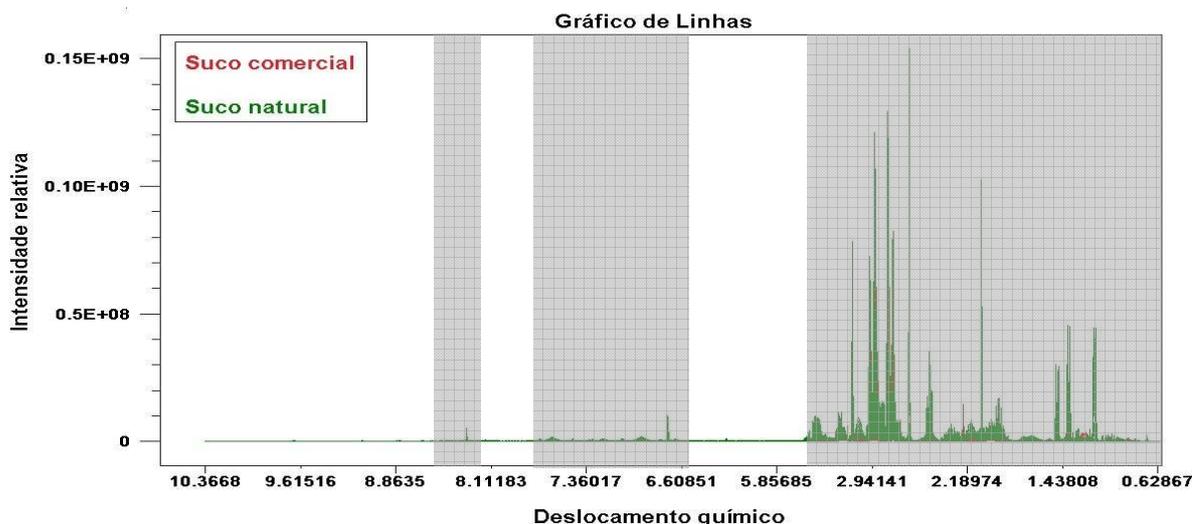
## Resultados e Discussões

---

O gráfico de pesos para as amostras dos grupos de suco de laranja comercial e natural é apresentado na **Figura 4.2.1.6**. Nesse caso a figura apresenta os valores para as componentes principais um (01) e três (03) e as principais variáveis responsáveis pela separação foram destacadas em cinza.



## Resultados e Discussões



**Figura 4.2.1.6.** Gráfico de pesos das componentes principais um (01) e três (03) das amostras de suco de laranja comercial e natural destacando-se as variáveis de maior importância na separação do método **B**.

De acordo com a **Figura 4.2.1.6.** os metabólitos que têm maior tendência em separar as amostras do grupo de suco natural são os sinais referentes à histidina (8,63 - 8,66 ppm), ácido fórmico (8,30 ppm), fenilalanina (7,41 e 7,32 ppm), tirosina (7,18 e 6,89 ppm), florina (6,21 ppm), DMP (3,29 e 3,09 ppm), ácido málico (4,47 ppm), ácido acético (2,07 ppm) e arginina (1,60 – 1,78 ppm). Enquanto que, para as amostras do grupo de suco comercial os sinais referentes ao ácido pirúvico (2,21 ppm) e ácido láctico (1,39 ppm) são os que mais influenciam na separação do grupo.

### 4.2.2. Degradação e quantificação do suco de laranja comercial e natural

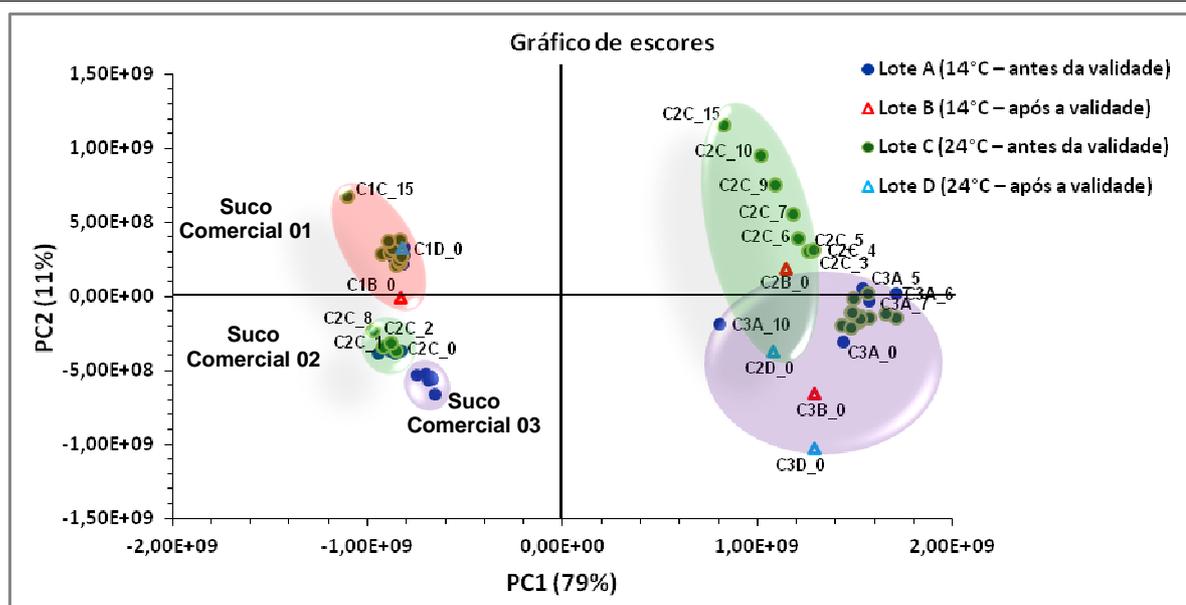
Com a finalidade de verificar a influência da temperatura de armazenamento no processo de degradação das amostras de suco de laranja comercial e natural, uma nova análise de PCA foi realizada separadamente para cada grupo de suco de laranja. Deste modo, adotaram-se os métodos **A** e **B** descritos no **item 4.2.1.** para verificar o processo de degradação no suco de laranja.

**4.2.2.1 Suco de laranja comercial**

A nova matriz de dados passou a ser constituída por 76 linhas (76 amostras de suco de laranja comercial) e a mesma quantidade de colunas apresentadas pelo método **A** (20767 variáveis). A **Figura 4.2.2.1.** apresenta o gráfico de escores desta análise e a soma dos valores obtidos para as duas primeiras componentes principais [PC1 (79%) e PC2 (11%)] apresentaram uma explicação de 80% do total da variância do banco de dados.

Na **Figura 4.2.2.1.** observa-se a formação de grupos para as amostras de suco comercial 01, 02 e 03. Pode-se visualizar que as amostras de suco comercial 01 estão todas agrupadas nos valores negativos da primeira componente principal e nos valores positivos da segunda componente principal, mostrando que as temperaturas de armazenamento (14 °C e 24 °C) tiveram pouca influência no processo de degradação, tanto antes quanto depois de expirar a validade do produto, no entanto apenas as amostras C1C\_15 e a amostra C1B\_0 apresentaram tendências de desagruparem do restante das amostras do grupo, indicando uma possível alteração dessas amostras. De acordo com o gráfico de pesos (**Figura 4.2.2.2.**) as variáveis referentes aos metabólitos: sacarose,  $\alpha$ -glicose,  $\beta$ -glicose, frutose e etanol foram responsáveis pela tendência em separação das amostras C1C\_15 e C1B\_0 das demais amostras do grupo. Com isso, as possíveis alterações desses metabólitos podem estar associadas ao processo de degradação dos carboidratos, a qual propicia a formação de etanol e dióxido de carbono gerado no processo da fermentação alcoólica.

## Resultados e Discussões



**Figura 4.2.2.1.** Gráfico de escores PC1 (79%) versus PC2 (11%) das amostras de suco de laranja do grupo comercial analisados pelo método A.

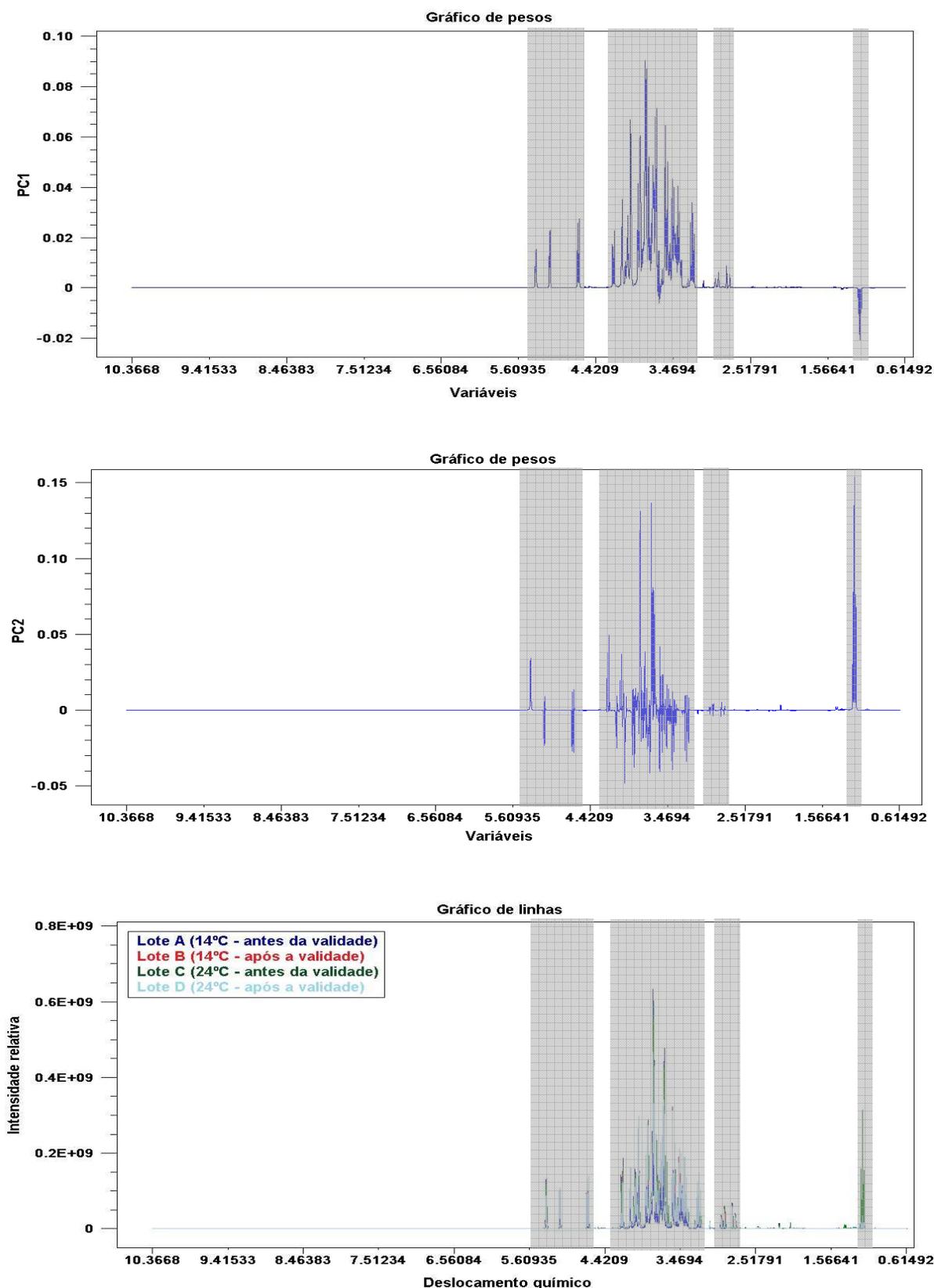
As amostras de suco comercial 02 foram separadas em dois grupos bem definidos. De acordo com o gráfico de escores da **Figura 4.2.2.1.**, as amostras refrigeradas a 14 °C estão todas agrupadas nos valores negativos da primeira componente principal, indicando que as amostras não sofreram alterações durante o período de análise. As amostras refrigeradas a 24 °C tiveram uma separação em dois grupos, sendo que os valores positivos da primeira componente principal influenciaram as amostras analisadas a partir do terceiro dia de armazenamento, e os valores negativos da primeira componente principal influenciaram as amostras C2C\_0, C2C\_1, C2C\_2 e C2C\_8. Logo, a separação observada pode estar associada à temperatura em que as amostras desse grupo foram armazenadas. Desse modo, as amostras C2B\_0 e C2D\_0, tiveram uma forte tendência em se agruparem com as amostras refrigeradas a 24 °C nos valores positivos da primeira componente principal.

Da mesma maneira, as amostras de suco comercial 03 foram separadas em dois grupos bem definidos. Todas as amostras refrigeradas a 24 °C e as amostras C3A\_0, C3A\_5, C3A\_6, C3A\_7 e C3A\_10 refrigeradas a 14 °C estão agrupadas nos valores positivo da primeira componente principal, enquanto que, o restante das amostras refrigeradas a 14 °C agruparam-se nos valores negativos da primeira componente principal.

## ***Resultados e Discussões***

---

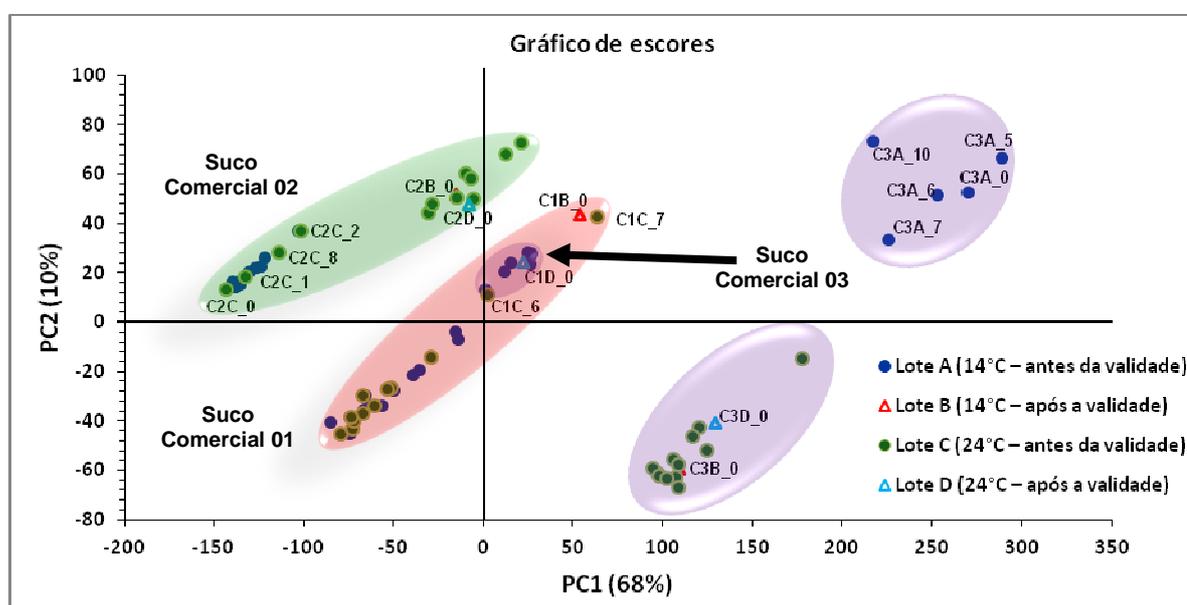
O gráfico de pesos para as amostras de suco comercial é apresentado na **Figura 4.2.2.2**. Nesse caso a figura apresenta os valores para as duas primeiras componentes principais e as variáveis destacadas em cinza foram às principais responsáveis pela separação. Nota-se que para a primeira e segunda componente principal os sinais referentes à sacarose (5,40 e 4,20 ppm),  $\alpha$ -glicose (5,23 ppm),  $\beta$ -glicose (4,63 ppm), frutose (3,97 ppm), ácido cítrico (2,94 e 2,80 ppm) e o etanol (1,17 ppm) tiveram maior influência na separação dos grupos das amostras de suco comercial 02 e 03. Os metabólitos responsáveis pelas alterações observadas nas amostras de suco comercial 02 e 03 são os mesmos metabólitos das amostras C1C e C1B de suco comercial 01, com a exceção do ácido cítrico. Assim as alterações desses metabólitos também podem estar associadas ao processo de degradação dos carboidratos propiciando o processo da fermentação alcoólica. Além disso, as alterações observadas para o ácido cítrico indicam que as características nutricionais desses sucos podem estar sendo modificadas, devido à natureza oxidativa desse metabólito.

**Resultados e Discussões**

**Figura 4.2.2.2.** Gráfico de pesos das componentes principais um (01) e dois (02) das amostras de suco de laranja comercial destacando-se as variáveis de maior importância na separação do método **A**.

## Resultados e Discussões

Para avaliar a influência da temperatura de armazenamento sob os metabólitos minoritários presentes nas amostras de suco de laranja comercial foi empregada a análise pelo método **B**. A nova matriz de dados gerada nesta análise é constituída pelo mesmo número de linhas que a matriz gerada no método **A** (76 amostras de suco de laranja comercial), porém difere na quantidade de colunas (16437 variáveis). A **Figura 4.2.2.3.** apresenta o gráfico de escores desta análise e as somas dos valores obtidos para as duas primeiras componentes principais [PC1 (68%) e PC2 (10%)] apresentaram uma explicação de 78% do total da variância do banco de dados.



**Figura 4.2.2.3.** Gráfico de escores PC1 (68%) versus PC2 (10%) das amostras de suco de laranja do grupo comercial analisados pelo método **B**.

De acordo com a **Figura 4.2.2.3.** observa-se que não houve a formação de grupos para as amostras de suco comercial 01 e 02, contudo as amostras de suco comercial 03 estão distribuídas em três grupos bem definidos. As amostras de suco comercial 01, refrigeradas a 14 °C e 24 °C analisadas antes do período de validade agruparam-se nos valores negativos da primeira e segunda componente principal, porém as amostras C1C\_6 e C1C\_7 desse grupo e as amostras C1B\_0 e C1D\_0 analisadas após o prazo de validade, apresentaram

## **Resultados e Discussões**

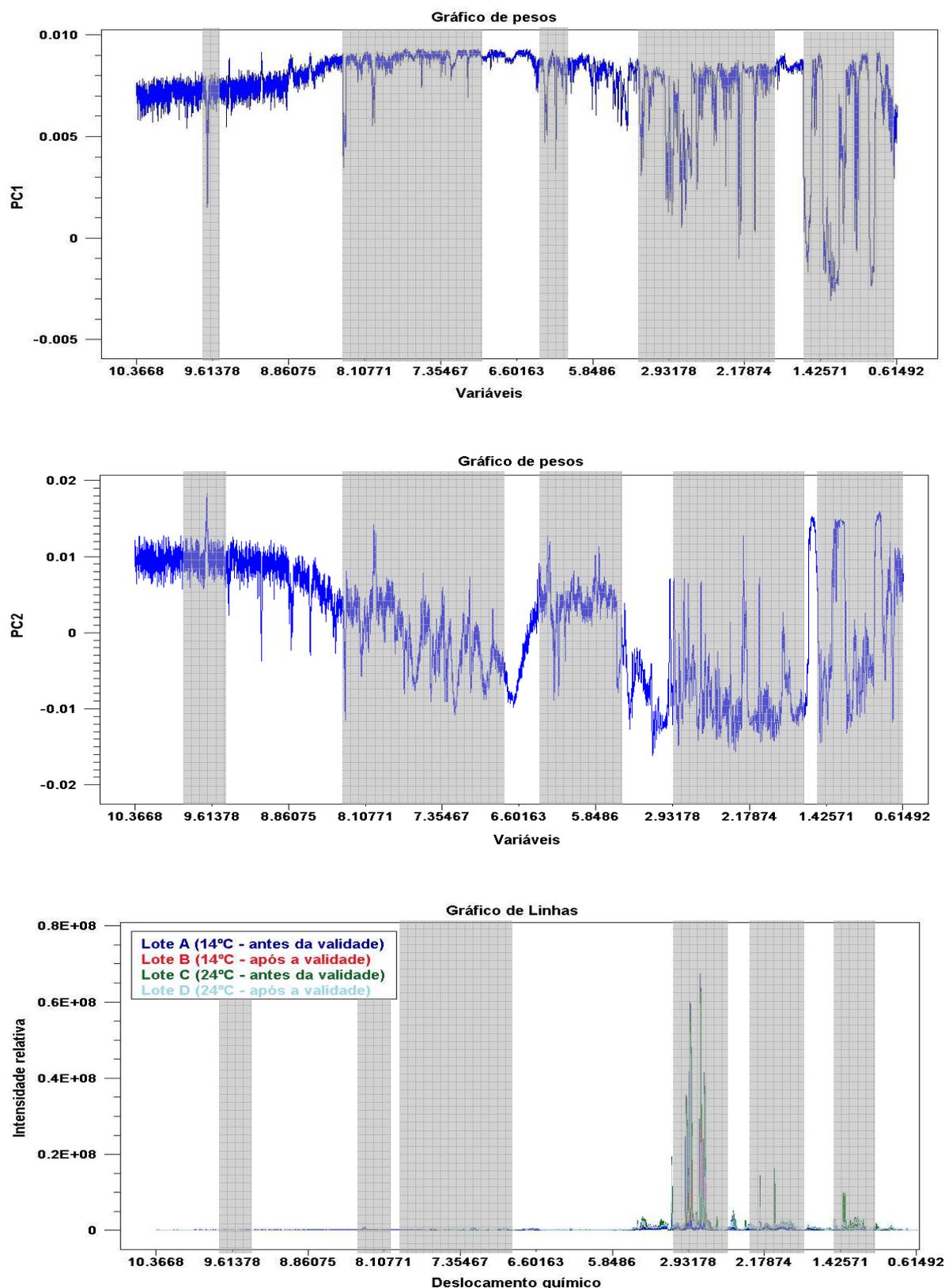
---

tendência em se agruparem nos valores positivos da primeira e segunda componente principal.

As amostras de suco comercial 02 tiveram uma tendência semelhante de agrupamento quando comparadas às amostras de suco comercial 01. Os valores negativos da primeira componente principal influenciaram no agrupamento de todas as amostras refrigeradas a 14 °C e as amostras C2C\_0, C2C\_1, C2C\_2 e C2C\_8 refrigeradas a 24 °C analisadas antes do período de validade. Porém, o restante das amostras refrigeradas a 24 °C e as amostras C2B\_0 e C2D\_0 analisadas após o prazo de validade tiveram uma forte tendência em se agruparem nos valores positivos da primeira componente principal.

Os grupos de amostras de suco comercial 03 estão todos agrupados nos valores positivos da primeira componente principal, contudo as amostras refrigeradas a 24 °C analisadas antes da validade e as amostras C3B\_0 e C3D\_0 analisadas após a validade do suco de laranja, apresentaram uma forte tendência em agruparem-se nos valores negativos da segunda componente principal. As amostras refrigeradas a 14 °C analisadas antes da validade tiveram uma separação em dois grupos, sendo que as amostras C1A\_0, C1A\_5, C1A\_6, C1A\_7 e C1A\_10 tendem em separar das demais amostras do grupo (indicadas pela seta no gráfico de escores da **Figura 4.2.2.3.**) ao longo do eixo positivo da primeira componente principal.

O gráfico de pesos (**Figura 4.2.2.4.**) apresenta as regiões dos espectros que mais contribuíram para as separações discutidas anteriormente. A figura apresenta os valores para as duas primeiras componentes principais e as variáveis destacadas pela cor cinza foram às responsáveis pelas separações.

**Resultados e Discussões**

**Figura 4.2.2.4.** Gráfico de pesos das componentes principais um (01) e dois (02) das amostras de suco de laranja comercial destacando-se as variáveis de maior importância na separação do método **B**.

## **Resultados e Discussões**

---

De acordo com o gráfico de pesos da **Figura 4.2.2.4.** os metabólitos que mais contribuíram para a separação obtida foram a hidroximetilfurfural (7,52 – 7,56 ppm), os sinais referentes aos ácidos fórmico (8,30 ppm), málico (4,47 e 2,86 ppm; 2,76 ppm), cítrico (2,94 e 2,80ppm), succínico (2,65 ppm), pirúvico (2,21 ppm), acético (2,07 ppm), láctico (1,39 ppm) e o sinal do metabólito 28 (9,00 – 9,10 ppm) que não foi identificado.

Como a finalidade de se verificar o grau de alteração e as concentrações dos constituintes químicos oriundos da variação nas amostras de sucos comerciais em diferentes condições de armazenamento, foi realizada uma quantificação relativa para os sinais dos ácidos fórmico (8,30 ppm), succínico (2,65 ppm), pirúvico (2,21 ppm), acético (2,07 ppm) e láctico (1,39 ppm). A escolha da quantificação desses metabólitos foi fundamentada na importância que as variáveis deles representaram para a separação dos grupos na análise de PCA.

A **Tabela 4.2.2.1.** e os gráficos da **Figura 4.2.2.5** apresentam as quantificações relativa para os metabólitos citados anteriormente. As considerações feitas a seguir foram baseadas apenas nos valores médios dos metabólitos observados nas amostras comerciais de suco de laranja, devido à quantidade de amostras não serem o suficiente para fornecer informações significativas em uma análise estatística univariada.

De acordo com a **Tabela 4.2.2.1.**, as amostras C1C e C2C de sucos comerciais tiveram as quantidades dos ácidos: succínico, pirúvico e acético aumentadas após o período de quinze dias de armazenamento a 24 °C antes da validade. Do mesmo modo, a quantidade de ácido láctico presente nas amostras C2C e C3C tiveram suas concentrações aumentadas nestes lotes.

A amostra C1A refrigerada a 14 °C analisada antes do período de validade apresentou um aumento de aproximadamente quatro (4) vezes para o ácido láctico produzido após quinze dias de armazenamento. Logo, as amostras C2A e C3A deste mesmo lote, não apresentaram alterações significativas para os metabólitos quantificados.

As amostras de suco comerciais analisadas após o período de validade apresentaram alterações diferentes para cada tipo de suco comercial. Foi observado o aumento da concentração do ácido pirúvico em cinco (5) vezes e treze (13) vezes para as amostras C1B e C1D mantidas sob refrigeração de 14 °C e 24°C, respectivamente, quando comparadas com as amostras C1A e C1C. No entanto, as

## Resultados e Discussões

amostras C3B e C3D, apresentaram aumento das concentrações dos ácidos fórmico, succínico e pirúvico, enquanto que para a amostra C2D refrigerada a 24 °C houve apenas um leve aumento na concentração de ácido láctico. Assim, essas alterações observadas nas concentrações dos ácidos: fórmico, succínico, pirúvico, acético e láctico para as amostras de sucos comerciais 01, 02 e 03 concordam com os resultados obtidos na **Figura 4.2.2.3**.

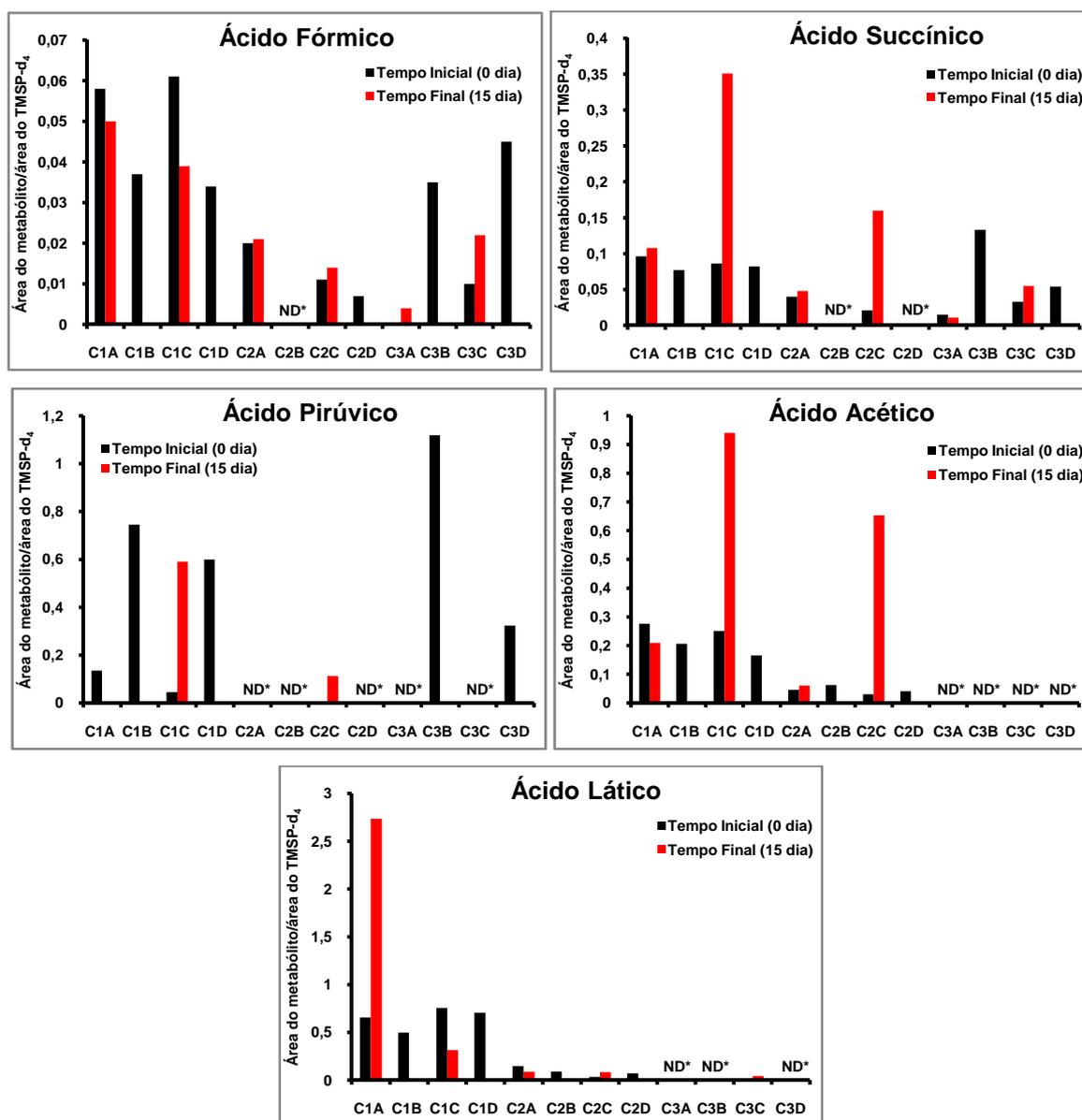
**Tabela 4.2.2.1.** Quantificação relativa (área do metabólito/área do TMSP-d<sub>4</sub>) dos metabólitos presentes nas amostras de suco de laranja comercial.

Tempo (dias)	Ácido Fórmico		Ácido Succínico		Ácido Pirúvico		Ácido Acético		Ácido Láctico	
	0	15	0	15	0	15	0	15	0	15
<b>C1A</b>	0,058	0,050	0,096	0,108	0,135	ND	0,276	0,209	0,657	2,733
<b>C1B</b>	0,037	--	0,077	--	0,745	--	0,206	--	0,498	--
<b>C1C</b>	0,061	0,039	0,086	0,351	0,045	0,591	0,251	0,941	0,756	0,316
<b>C1D</b>	0,034	--	0,082	--	0,599	--	0,165	--	0,707	--
<b>C2A</b>	0,020	0,021	0,040	0,048	ND	ND	0,046	0,060	0,147	0,087
<b>C2B</b>	ND	--	ND	--	ND	--	0,062	--	0,092	--
<b>C2C</b>	0,011	0,014	0,021	0,160	ND	0,113	0,030	0,654	0,033	0,085
<b>C2D</b>	0,007	--	ND	--	ND	--	0,041	--	0,072	--
<b>C3A</b>	ND	0,004	0,015	0,011	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>C3B</b>	0,035	--	0,133	--	1,119	--	ND	--	ND	--
<b>C3C</b>	0,010	0,022	0,033	0,055	ND	ND	ND	ND	ND	0,045
<b>C3D</b>	0,045	--	0,054	--	0,324	--	ND	--	ND	--

**C1A, C1B, C1C e C1D:** suco comercial 01; **C2A, C2B, C2C e C2D:** suco comercial 02; **C3A, C3B, C3C e C3D:** suco comercial 03.

**ND:** Não detectado o sinal do metabólito no espectro de RMN de <sup>1</sup>H.

## Resultados e Discussões

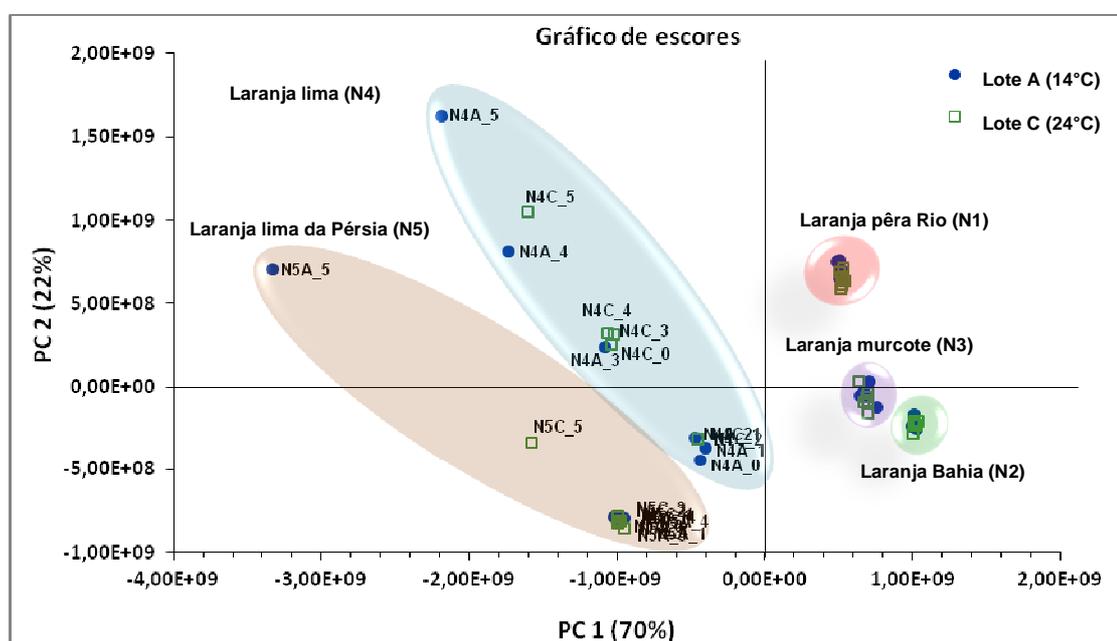


**Figura 4.2.2.5.** Gráficos de quantificação relativa para os ácidos: fórmico, succínico, pirúvico, acético e láctico para as amostras de suco de laranja comercial estudadas. As letras nos códigos das amostras referem-se ao lote de armazenamento: **A** = armazenado a 14°C e analisado antes da validade; **B** = armazenado a 14°C e analisado após da validade; **C** = armazenado a 24°C e analisado antes da validade; **D** = armazenado a 24°C e analisado após da validade; **ND\*** = Não detectado o sinal do metabólito no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ .

## Resultados e Discussões

### 4.2.2.2 Suco de laranja natural

A matriz de dados gerada para a análise das amostras de suco de laranja natural passou a ser constituída por 60 linhas (60 amostras de suco de laranja natural) e a mesma quantidade de colunas apresentadas pelo método **A** (20767 variáveis). A **Figura 4.2.2.5.** apresenta o gráfico de escores desta análise e a soma dos valores obtidos para as duas primeiras componentes principais [PC1 (70%) e PC2 (22%)] apresentaram uma explicação de 92% do total da variância do banco de dados.



**Figura 4.2.2.6.** Gráfico de escores PC1 (70%) versus PC2 (22%) das amostras de suco de laranja do grupo natural analisadas pelo método **A**.

Na **Figura 4.2.2.6.** observa-se a formação de cinco grupos (5) bem definidos para as amostras de suco natural N1 (laranja pêra Rio), N2 (laranja Bahia), N3 (laranja murcote), N4 (laranja lima) e N5 (laranja lima da Pérsia). Pode-se visualizar que as amostras de suco natural N1, N2 e N3 estão separadas em três (3) grupos distintos nos valores positivos da primeira componente principal, enquanto que, nos valores negativos da primeira componente principal observa-se a formação de dois (2) grupos para as amostras de suco natural N4 e N5. Esses dois grupos apresentam-se mais sensíveis a temperatura de armazenamento que os demais, a qual pode ser observada pela dispersão das amostras no gráfico de escores.

## **Resultados e Discussões**

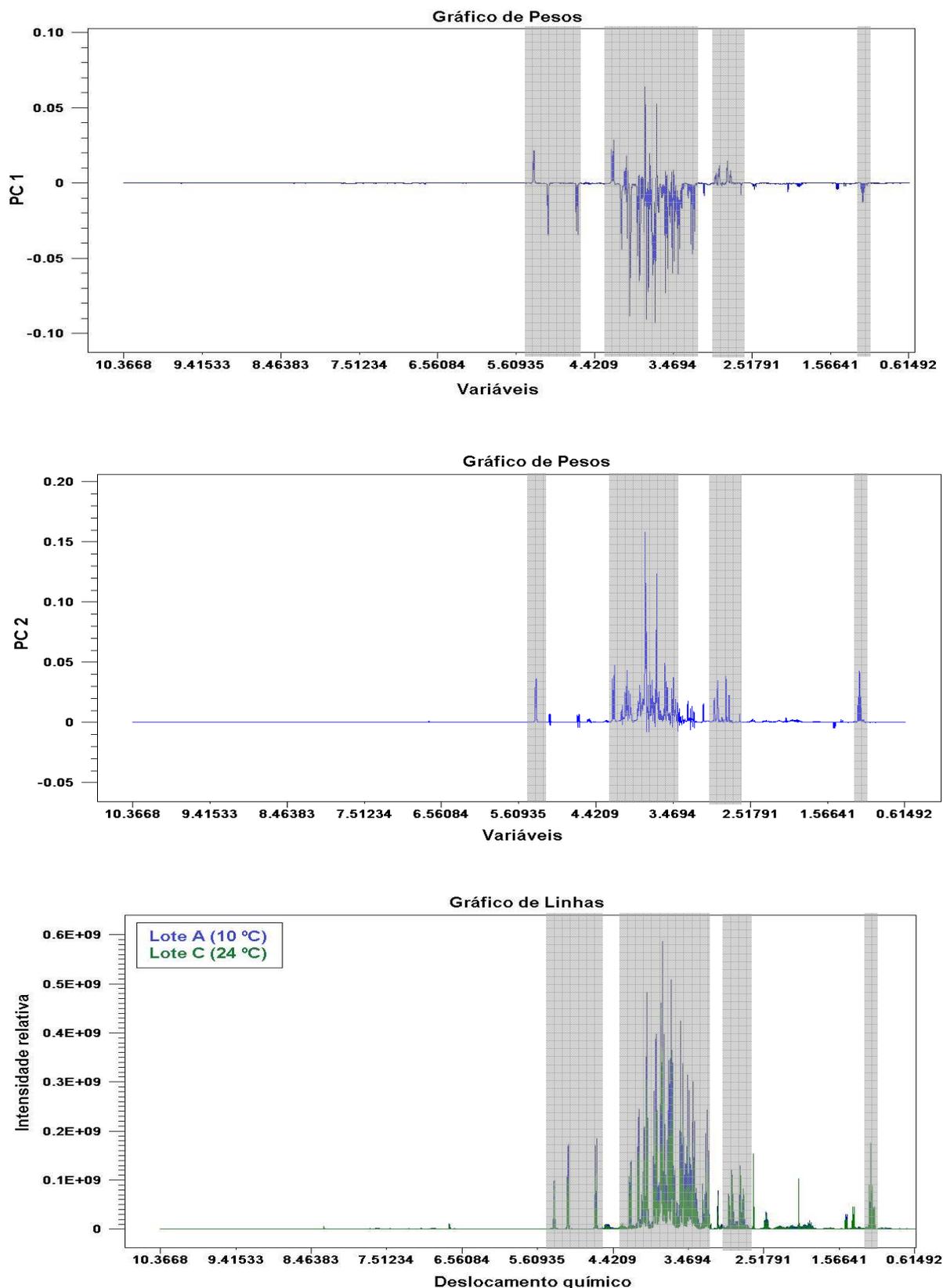
---

De acordo como o gráfico de escores (**Figura 4.2.2.6.**) as amostras do grupo N1, N2 e N3 refrigeradas a 14 °C e 24 °C analisadas durante o período de 24 horas apresentam-se bem reunidas em seus respectivos grupos. Desse modo, as temperaturas de refrigeração tiveram pouca influência no processo de degradação desses grupos de amostras de suco natural. Contudo, as amostras de suco natural do grupo N4 e N5 apresentaram dispersão considerável nos valores positivos e negativos da segunda componente principal do gráfico de escores.

As amostras N4A\_3, N4A\_4, N4A\_5, N4C\_3, N4C\_4 e N4C\_5 analisadas 6 horas após o tempo inicial, apresentaram uma forte tendência em se agruparem nos valores positivos da segunda componente principal, enquanto que, as amostras remanescentes do grupo N4 (laranja lima) agruparam-se nos valores negativos da segunda componente principal. Logo, essa tendência de separação entre as amostras do grupo pode estar associada ao processo de degradação do suco natural do grupo N4.

Da mesma maneira, as amostras N5A\_5 e N5C\_5, correspondentes ao grupo N5 (laranja lima da Pérsia), analisadas 24 horas após o tempo inicial apresentaram tendência em agrupar nos valores positivos da segunda componente principal, enquanto que o restante das amostras do grupo N4 permaneceram agrupadas nos valores negativos da segunda componente principal.

O gráfico de pesos (**Figura 4.2.2.7.**) apresenta as regiões dos espectros que mais contribuíram para as separações discutidas anteriormente. A figura apresenta os valores para as duas primeiras componentes principais e as variáveis destacadas pela cor cinza foram às responsáveis pelas separações. Nota-se que para a primeira e segunda componente principal os sinais referentes à sacarose (5,40 e 4,20 ppm),  $\alpha$ -glicose (5,23 ppm),  $\beta$ -glicose (4,63 ppm), frutose (3,97 ppm), ácido cítrico (2,94 e 2,80 ppm) e o etanol (1,17 ppm) tiveram maior influência na separação dos grupos das amostras de suco natural N1, N2, N3, N4 e N5. Através das informações obtidas pelo gráfico de pesos da primeira componente principal, pode-se destacar a semelhança entre os grupos N1, N2 e N3 sendo ocasionada basicamente pela sacarose, frutose e ácido cítrico.

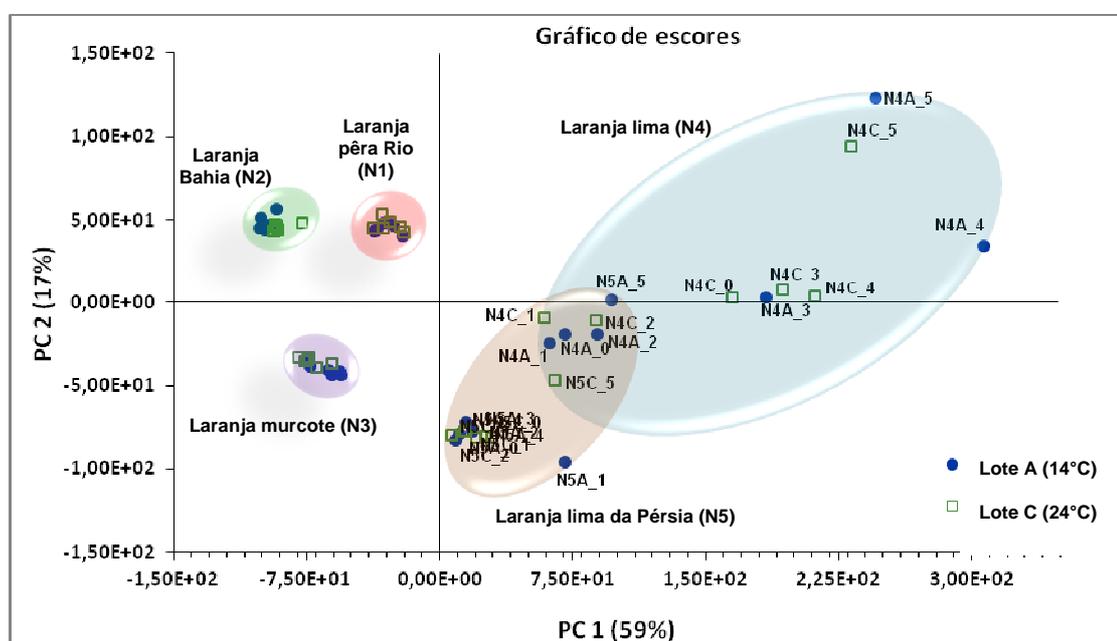
**Resultados e Discussões**

**Figura 4.2.2.7.** Gráfico de pesos das componentes principais um (01) e dois (02) das amostras de suco de laranja natural destacando-se as variáveis de maior importância na separação do método **A**.

## Resultados e Discussões

Com o intuito de avaliar possíveis alterações nos metabólitos minoritários presentes nas amostras de suco de laranja natural foi empregado a análise pelo método **B**. A nova matriz de dados gerada nesta análise é constituída pelo mesmo número de linhas que a matriz gerada no método **A** (60 amostras de suco de laranja natural), porém difere na quantidade de colunas (16437 variáveis).

O gráfico de escores desta análise é apresentado na **Figura 4.2.2.8**. A soma dos valores obtidos para as duas primeiras componentes principais [PC1 (59%) e PC2 (17%)] apresentaram uma explicação de 76% do total da variância do banco de dados.



**Figura 4.2.2.8.** Gráfico de escores PC1 (59%) versus PC2 (17%) das amostras de suco de laranja do grupo natural analisadas pelo método **B**.

## **Resultados e Discussões**

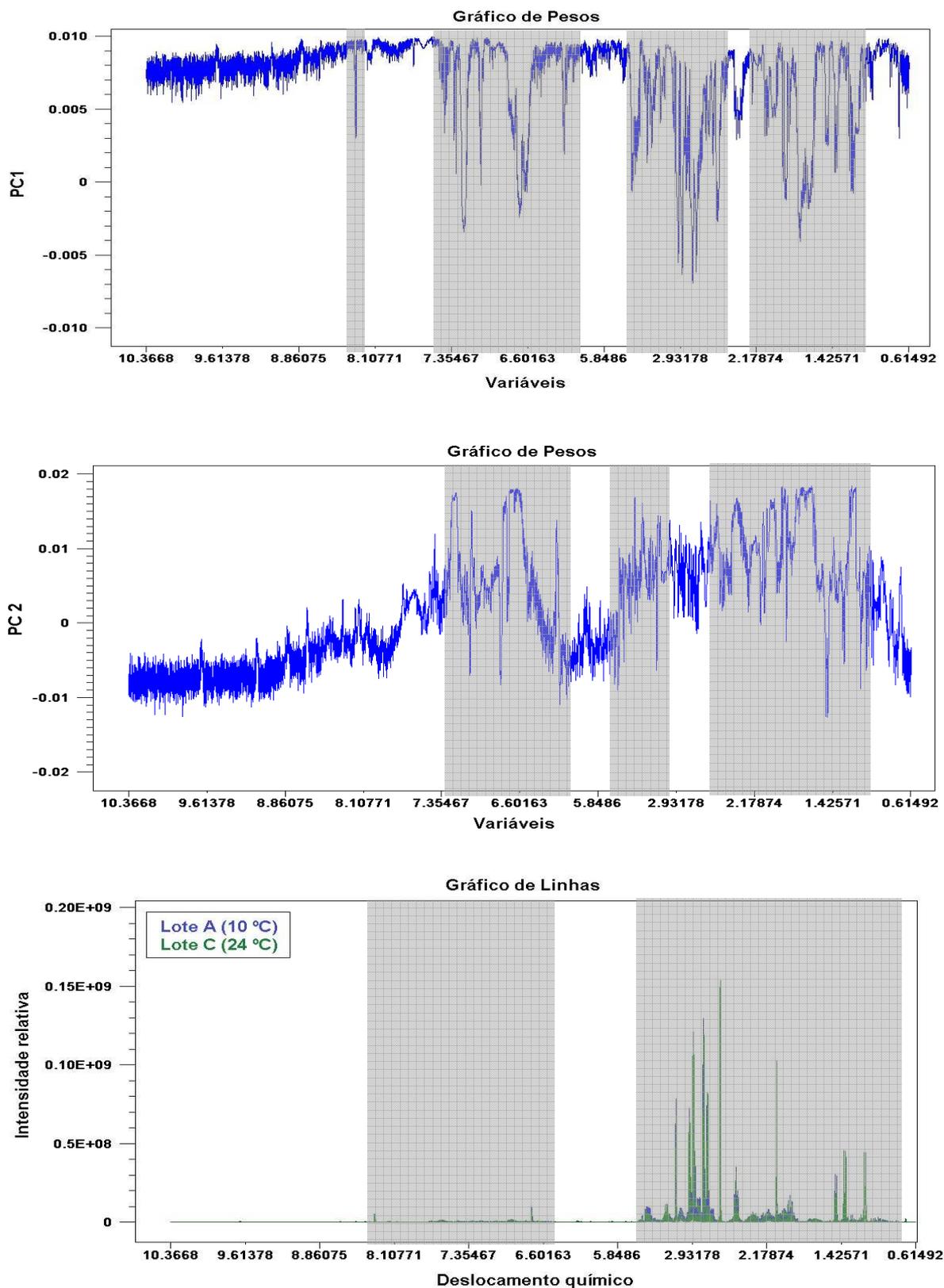
---

Na **Figura 4.2.2.8.** observa-se novamente a formação de cinco grupos entre as amostras de suco natural. Nos valores negativos da primeira componente principal pode-se visualizar que as amostras de suco natural N1, N2 e N3 estão separadas em três (3) grupos distintos, enquanto que, as amostras de suco natural N4 e N5 tiveram maior influência dos valores positivos da primeira componente principal.

As amostras do grupo N1, N2 e N3 refrigeradas a 14 °C e 24 °C analisadas durante o período de 24 horas apresentam-se bem reunidas em seus respectivos grupos, apenas uma amostra refrigerada a 24 °C do grupo N2 apresenta uma leve tendência em separar-se das demais amostras do grupo. Assim, as temperaturas de refrigeração tiveram pouca influência no processo de degradação desses grupos de amostras de suco natural.

Na análise das amostras do grupo N4 observa-se uma dispersão considerável entre as amostras refrigeradas a 14 °C e 24 °C analisadas 6 horas após o tempo inicial. As amostras N4A\_3, N4A\_4, N4A\_5, N4C\_3, N4C\_4 e N4C\_5 correspondentes a esse período, apresentaram-se uma forte tendência em se agruparem ao longo dos eixos positivos das duas primeiras componentes principais do gráfico de escores. Da mesma maneira, as amostras N5A\_5 e N5C\_5, correspondentes ao grupo N5, analisadas 24 horas após o tempo inicial apresentaram tendência em agrupar nos valores positivos da segunda componente principal, enquanto que, o restante das amostras do grupo N4 permaneceram agrupadas ao longo do eixo negativo da segunda componente principal. Logo, essa tendência de separação entre as amostras dos grupos pode estar associada ao processo de degradação do suco natural do grupo N4 e N5.

O gráfico de pesos (**Figura 4.2.2.9.**) apresenta as regiões dos espectros que mais contribuíram para as separações discutidas anteriormente. A figura apresenta os valores para as duas primeiras componentes principais e as variáveis destacadas pela cor cinza foram às responsáveis pelas separações.

**Resultados e Discussões**

**Figura 4.2.2.9.** Gráfico de pesos das componentes principais um (01) e dois (02) das amostras de suco de laranja natural destacando-se as variáveis de maior importância na separação do método **B**.

## **Resultados e Discussões**

---

De acordo com o gráfico de pesos da **Figura 4.2.2.9.** os metabólitos que mais contribuíram para a separação obtida foram a hidroximetilfurfural (7,52 – 7,56 ppm), os sinais referentes aos ácidos fórmico (8,30 ppm), fúmarico (6,71 ppm), málico (4,47; 2,86 e 2,76 ppm), cítrico (2,94 e 2,80ppm), succínico (2,65 ppm), pirúvico (2,21 ppm), acético (2,07 ppm) e láctico (1,39 ppm). Além disso, os grupos N4 e N5 tiveram maior tendência em separar dos demais grupos na primeira componente principal devido à influência da temperatura de armazenagem, em que os ácidos fórmico e fúmarico foram os que mais contribuíram para esta tendência.

Com o mesmo propósito e considerações feitas para as amostras de suco comercial, foi realizado a quantificação relativa para os sinais dos ácidos: fórmico (8,30 ppm), fúmarico (6,71 ppm), succínico (2,65 ppm), pirúvico (2,21 ppm), acético (2,07 ppm) e láctico (1,39 ppm) das amostras de suco laranja natural. A **Tabela 4.2.2.2.** e os gráficos da **Figura 4.2.2.10** apresentam a quantificação relativa para os metabólitos citados anteriormente. Nota-se, que nesta tabela os metabólitos quantificados são os mesmos das amostras de suco de laranja comercial, com exceção do ácido fúmarico presente apenas nas amostras de suco natural N2 (laranja Bahia), N4 (laranja lima) e N5 (laranja lima da Pérsia).

De acordo com os valores descritos na **Tabela 4.2.2.2.** foi observado apenas a presença de ácido succínico nas amostras do grupo N1 (laranja pêra Rio), enquanto que para as amostras do grupo N3 (laranja murcote) não foram detectados a presença de nenhum dos metabólitos descritos na tabela. Dessa maneira, o agrupamento das amostras no gráfico de escores da **Figura 4.2.2.8.** mostrou que as amostras não tiveram alterações durante o período em que foram analisadas, independentemente da temperatura de refrigeração das amostras.

A amostra N2C, do grupo N2 (laranja Bahia) apresentou um leve aumento na quantidade dos ácidos fórmico, fúmarico, succínico, pirúvico e acético, e um aumento considerável na quantidade de ácido láctico após o período de armazenamento de 24 horas sob a refrigeração de 24 °C. Assim, a amostra apresentada no gráfico de escores da **Figura 4.2.2.8.** apresentou uma leve tendência em separar-se das demais amostras do grupo, essa tendência pode ser explicada pela alteração ocorrida nas quantidades desses metabólitos.

Para as amostras N4C e N5C, foi observado o aumento apreciável das quantidades dos ácidos: fórmico, succínico, pirúvico, acético e láctico após o período de armazenamento de 24 horas sob a refrigeração de 24 °C. Logo, para as

## Resultados e Discussões

amostras N4A e N5A refrigeradas a 14 °C houve apenas o aumento da quantidade de ácido fúmarico após o período de 24 horas de armazenamento. Portanto, as dispersões observadas na análise de PCA (**Figura 4.2.2.8.**) podem ser esclarecidas por essas alterações ocorridas nos metabólitos presentes nessas amostras de suco de laranja.

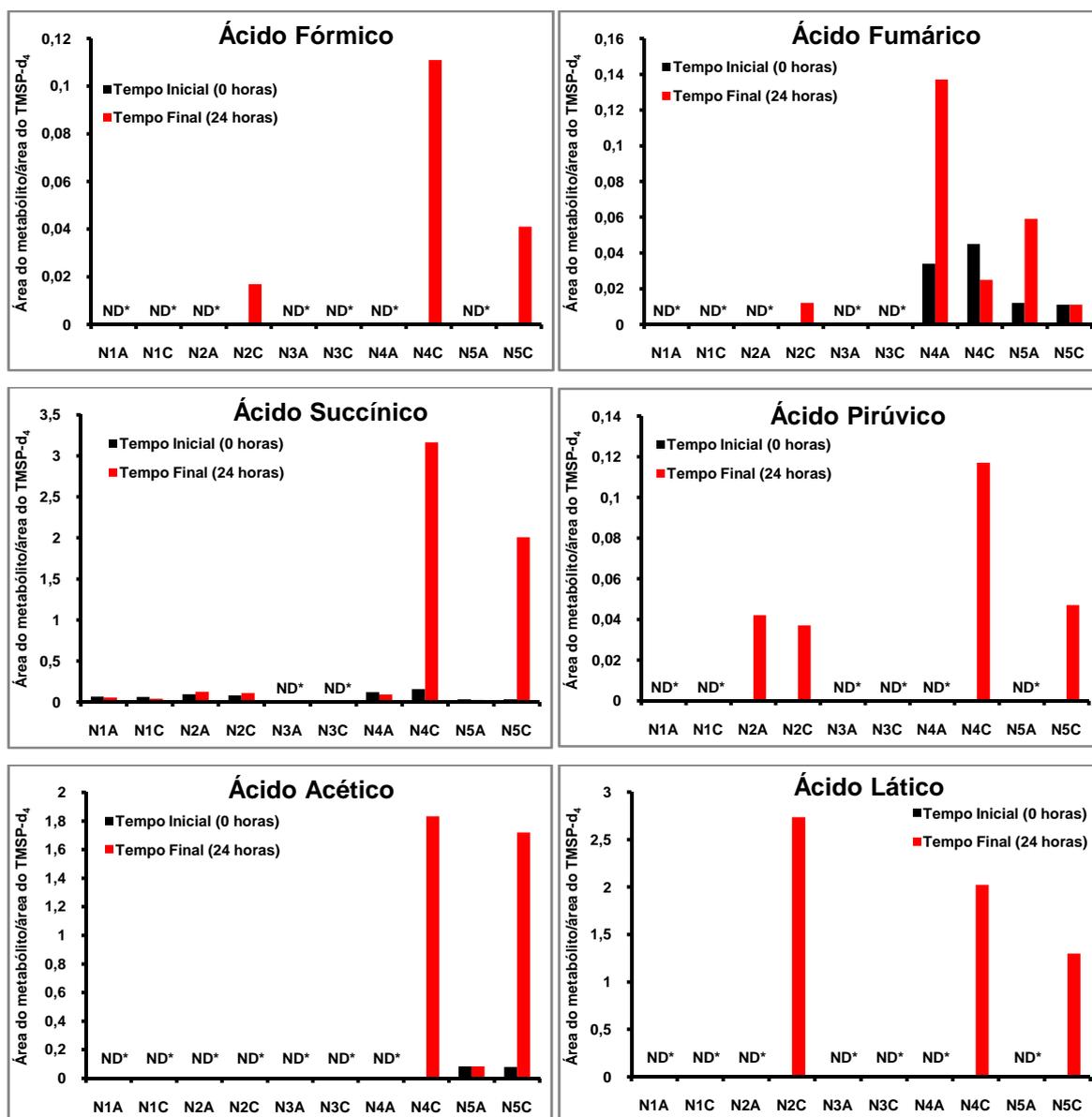
**Tabela 4.2.2.2.** Quantificação relativa (área do metabólito/área do TMSP-d<sub>4</sub>) dos metabólitos presentes nas amostras de suco de laranja natural.

	Ácido Fórmico		Ácido Fumárico		Ácido Succínico		Ácido Pirúvico		Ácido Acético		Ácido Láctico	
	0	24	0	24	0	24	0	24	0	24	0	24
<b>Tempo (horas)</b>	0	24	0	24	0	24	0	24	0	24	0	24
<b>N1A</b>	ND	ND	ND	ND	0,066	0,053	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>N1C</b>	ND	ND	ND	ND	0,062	0,039	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>N2A</b>	ND	ND	ND	ND	0,093	0,124	ND	0,042	ND	ND	ND	ND
<b>N2C</b>	ND	0,017	ND	0,012	0,081	0,111	ND	0,037	ND	ND	ND	2,734
<b>N3A</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>N3C</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>N4A</b>	ND	ND	0,034	0,137	0,120	0,090	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>N4C</b>	ND	0,111	0,045	0,025	0,156	3,165	ND	0,117	ND	1,832	ND	2,023
<b>N5A</b>	ND	ND	0,012	0,059	0,034	0,026	ND	ND	0,083	0,084	ND	ND
<b>N5C</b>	ND	0,041	0,011	0,011	0,033	2,010	ND	0,047	0,079	1,719	ND	1,297

**N1A e N1C:** Laranja pêra Rio; **N2A e N2C:** Laranja Bahia; **N3A e N3C:** Laranja murcote; **N4A e N4C:** Laranja lima; **N5A e N5C:** Laranja lima da Pérsia.

**ND:** Não detectado o sinal do metabólito no espectro de RMN de <sup>1</sup>H.

## Resultados e Discussões



**Figura 4.2.2.10.** Gráficos de quantificação relativa para os ácidos: fórmico, fúmarico, succínico, pirúvico, acético e láctico para as amostras de suco de laranja natural estudadas. As letras nos códigos das amostras referem-se ao lote de armazenamento: **A** = armazenado a 14°C e **C** = armazenado a 24°C; **ND\*** = Não detectado o sinal do metabólito no espectro de RMN de <sup>1</sup>H.

**4.3. Calibração Multivariada**

Com a finalidade de quantificar o conteúdo de etanol presente nas amostras de suco de laranja comercial e natural foram construídos dois modelos de calibração multivariada (PCR e PLS) e um modelo de calibração univariada.

O sinal do etanol em 1,17 ppm no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  não apresenta sobreposição de nenhum outro núcleo de hidrogênio, ou seja, nessa região é encontrado apenas o sinal do metabólito a ser quantificado. Portanto, a escolha desse sinal foi baseada nessa característica apresentada, a qual evita a quantificação de outros metabólitos em conjunto do etanol.

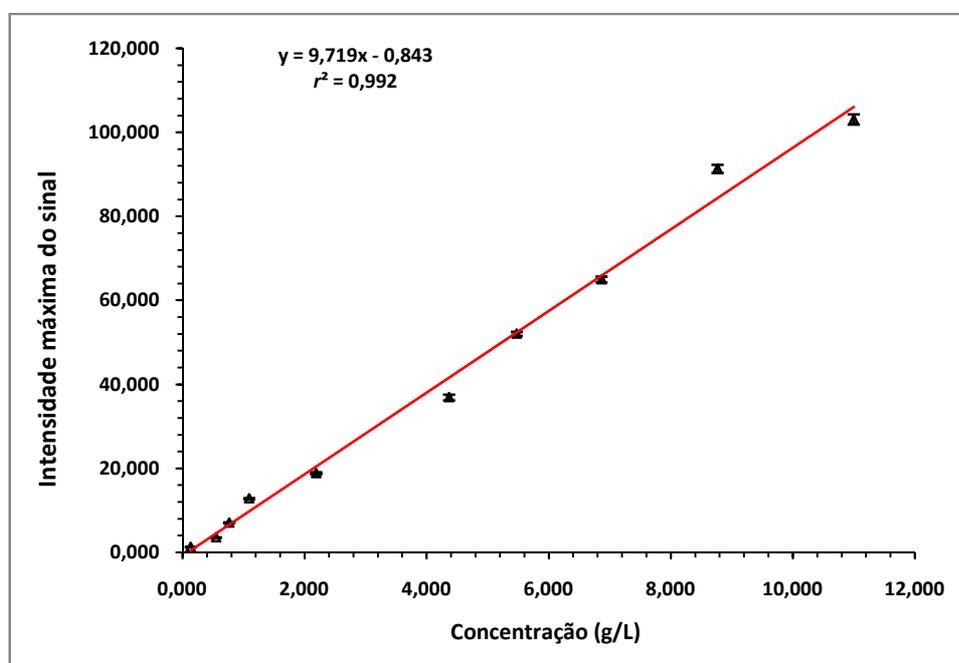
Para a construção do modelo de calibração univariada, dez (10) amostras de referências foram usadas para levantar uma curva de calibração para o sinal do etanol. As amostras de referências foram obtidas misturando-se o conteúdo do etanol, em proporções mostradas na **Tabela 4.3.1.**, em algumas amostras de suco de laranja que não apresentavam a presença desse composto. Após a obtenção dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , foram feitas as deconvoluções dos sinais em 1,17 ppm (com multiplicidade de um tripleto) para todas as amostras de referências. Dessa maneira, a intensidade máxima do tripleto do etanol representa a variável de medida e a concentração de etanol (g/L) representa o parâmetro de referência.

**Tabela 4.3.1.** Valores médios da concentração de etanol e da intensidade máxima do sinal.

Amostra	Concentração de etanol (g/L)	Intensidade máxima do sinal
cal01	0,136	1,290 ( $\pm 0,021$ )
cal02	0,548	3,587 ( $\pm 0,037$ )
cal03	0,767	7,135 ( $\pm 0,078$ )
cal04	1,096	12,858 ( $\pm 0,141$ )
cal05	2,192	18,878 ( $\pm 0,228$ )
cal06	4,370	36,941 ( $\pm 0,398$ )
cal07	5,479	52,057 ( $\pm 0,482$ )
cal08	6,867	65,028 ( $\pm 0,662$ )
cal09	8,767	91,356 ( $\pm 0,982$ )
cal10	11,000	103,096 ( $\pm 1,210$ )

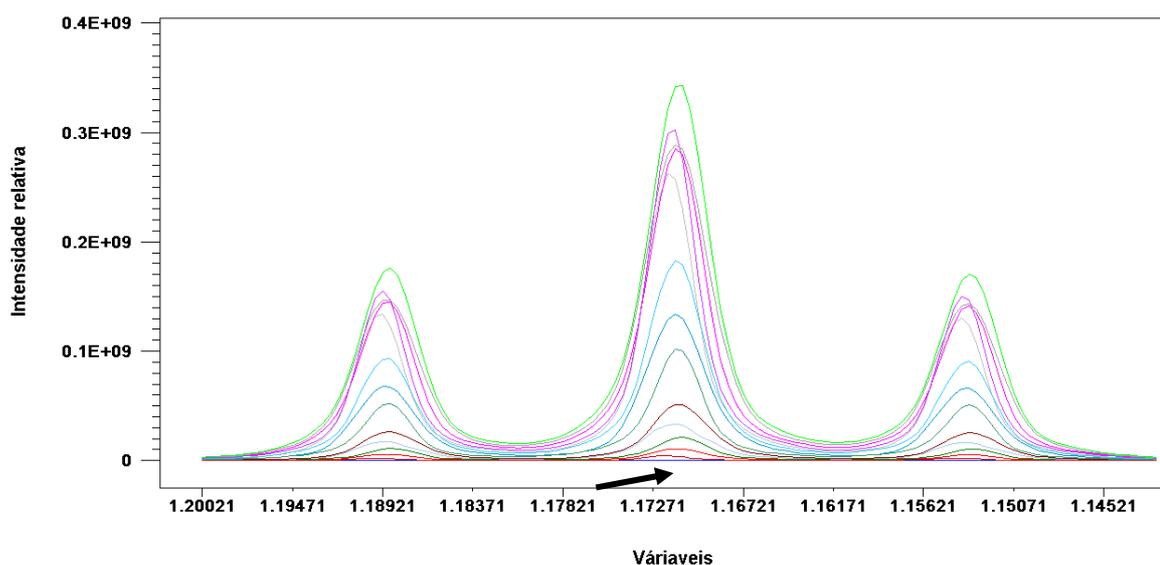
## Resultados e Discussões

Utilizando esses valores de concentrações do etanol e de intensidades máximas construiu-se a curva de calibração que está ilustrada na **Figura 4.3.1**. Para a construção da curva de calibração do etanol foram usados os valores médios das replicatas (triplicatas) para dar mais confiança durante a quantificação. O coeficiente de correlação entre a concentração real e a concentração prevista ( $r^2$ ) é igual a 0,9925, esse valor indica que o modelo de quantificação apresenta-se em boas condições para a quantificação do etanol. O valor considerável para o  $r^2$  encontrado foi dado pela pequena dispersão dos valores das replicadas usadas para construção da curva, conseqüentemente, esses valores são responsáveis pela qualidade do modelo de calibração.



**Figura 4.3.1.** Curva de calibração univariada para o etanol.

Para a construção dos modelos PCR e PLS foram usadas treze (13) amostras de referências. Na primeira etapa da construção do modelo de calibração multivariada foram selecionadas apenas as variáveis da matriz de dados referentes ao sinal em 1,17 ppm, desse modo o vetor inicial era representado por 20767 variáveis e após seleção passou a ser representado por apenas 128 variáveis. A **Figura 4.3.2.** apresenta as variáveis selecionadas das amostras de referências para a etapa de validação e calibração dos modelos PCR e PLS para o etanol.



**Figura 4.3.2.** Variáveis referentes ao grupo  $\text{CH}_3$  do etanol, com multiplicidade de um tripleto, usadas para a construção dos modelos PCR e PLS das amostras de referências de suco de laranja. A seta em destaque na figura indica a amostra usada como branco, ou seja, amostra considerada ausente de etanol, contudo esta amostra não foi utilizada para construção dos modelos de calibração.

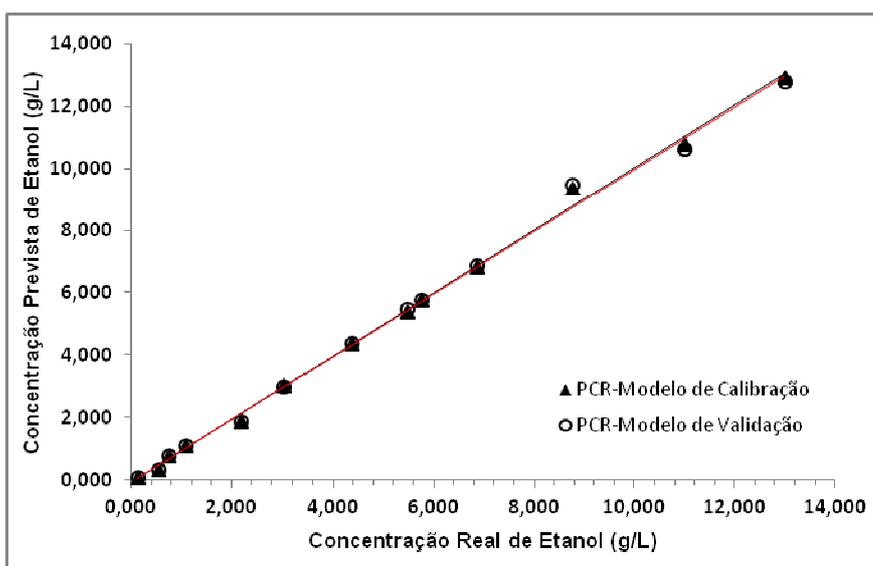
Após a seleção das variáveis, foi realizada a etapa de calibração dos modelos PCR e PLS utilizando o mesmo conjunto de amostras da validação. O método de validação cruzada foi utilizado para avaliar o desempenho dos modelos obtidos. A **Tabela 4.3.2.** apresenta os valores das concentrações de etanol (g/L) usadas na construção dos modelos PCR e PLS.

## Resultados e Discussões

**Tabela 4.3.2.** Valores médios das concentrações de etanol utilizados para a construção dos modelos PCR e PLS.

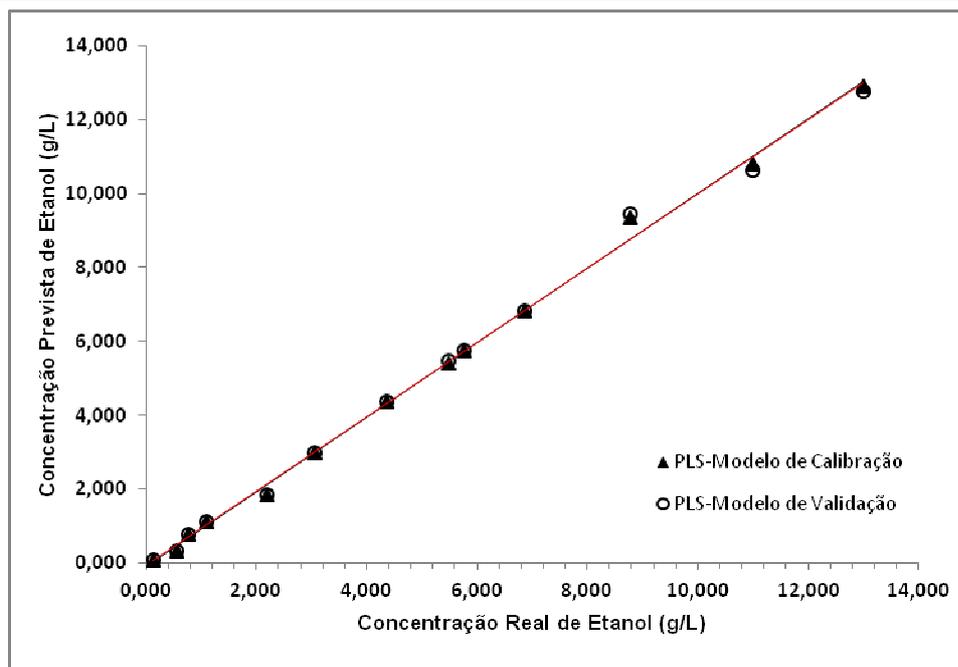
Amostra	Concentração de etanol (g/L)
cal01	0,136
cal02	0,548
cal03	0,767
cal04	1,096
cal05	2,192
cal06	3,056
cal07	4,370
cal08	5,479
cal09	5,767
cal10	6,867
cal 11	8,767
cal 12	11,000
cal 13	13,000

Na **Figuras 4.3.3.** e **4.3.4.** são mostrados os gráficos de calibração e validação para os modelos PCR e PLS obtidos, respectivamente.



**Figura 4.3.3.** Curva de regressão multivariada para o modelo PCR comparando o valor real e o predito durante a calibração e a validação.

## Resultados e Discussões



**Figura 4.3.4.** Curva de regressão multivariada para o modelo PLS comparando o valor real e o predito durante a calibração e a validação.

Vários parâmetros são obtidos após a etapa de validação dos modelos de calibração multivariada. Porém, como foi destacado no **item 3.7.2.**, alguns deles são usados para aperfeiçoar os parâmetros de pré-processamento e transformação da primeira etapa e outros são adotados para julgar a qualidade do modelo criado. Dessa forma, a **Tabela 4.3.3.** estão listados os principais parâmetros usados para aferir a qualidade dos modelos de calibração criados neste trabalho, além de apresentar um comparativo com o valor de  $r^2$  encontrado na calibração univariada.

**Tabela 4.3.3.** Parâmetros obtidos nas calibrações multivariadas e univariada.

Modelo	PC's <sup>a</sup>	Var % <sup>b</sup>	SEVal <sup>c</sup>	RMSEVal <sup>d</sup>	$r^2$ Val <sup>e</sup>	SECal <sup>f</sup>	RMSECal <sup>g</sup>	$r^2$ Cal <sup>h</sup>	SECal/SEVal <sup>i</sup>
PCR	2	99,83	0,26	25,55	0,9983	0,21	21,00	0,9988	0,81
PLS	2	99,89	0,26	25,54	0,9983	0,21	20,76	0,9989	0,81
Calibração Univariada	--	--	--	--	--	--	--	0,992	--

<sup>a</sup> Componentes Principais; <sup>b</sup> Percentual de Variância na matriz X; <sup>c</sup> Erro Padrão de Validação; <sup>d</sup> Erro Quadrático Médio de Validação; <sup>e</sup> Coeficiente de Correlação entre a Concentração Real e a Concentração Prevista durante a Validação; <sup>f</sup> Erro Padrão de Calibração; <sup>g</sup> Erro Quadrático Médio de Calibração; <sup>h</sup> Coeficiente de Correlação entre a Concentração Real e a Concentração Prevista durante a Calibração e <sup>i</sup> Critério de Similaridade.

## **Resultados e Discussões**

---

De acordo com os valores de  $r^2$  da **Tabela 4.3.3.** as calibrações por PCR e PLS apresentaram valores melhores que a calibração univariada. Os valores de  $r^2$  refletem até que ponto os valores das variáveis de medidas estão relacionados com os parâmetros de referências, dessa forma quanto mais próximo do valor um (1) significa que a variação explicada responde por uma grande percentagem da variação total dos dados.

A escolha entre os modelos PCR e PLS foram baseadas nos parâmetros apresentados na **Tabela 4.3.3.** A relação entre os valores de SECal e SEVal acima de 0,75 indicam se o modelo está bem ajustado ou não<sup>64</sup>. Dessa maneira os modelos PCR e PLS indicaram estar bem ajustados, pois apresentaram valores de 0,81. Assim, analisando os valores de RMSECal e RMSEVal para os dois modelos, observa-se que o modelo PLS apresenta valores menores que o modelo PCR, indicando que os erros quadrados médios de calibração e validação estão melhores ajustados para o modelo PLS. Além disso, o modelo PLS apresentou uma explicação de 99,89% do total da variância do banco de dados, enquanto que, o modelo PCR apresentou 99,83%. Portanto, a segunda etapa da construção do modelo multivariado foi realizada apenas para o PLS, onde foram previstas as concentrações de etanol nas amostras de suco de laranja.

A **Tabela 4.3.4.** apresenta os valores das concentrações absolutas de etanol presente nas amostras comerciais e naturais de suco de laranja previstas pelo modelo PLS. O modelo PLS criado consegue prever concentrações acima de 0,136 g/L e abaixo 13,000 g/L de etanol com erros de medidas aceitáveis. Assim, as amostras C2A, C2B no tempo inicial, C2C e C2D (suco comercial 02) e as amostras N5A e N5C (laranja lima da Pérsia) apresentaram valores inferiores a 0,136 g/L de etanol.

**Resultados e Discussões****Tabela 4.3.4.** Valores absolutos para as concentrações de etanol presentes nas amostras comerciais e naturais de suco de laranja.

Amostras Comerciais	Concentração de etanol (g/L)		Amostras Naturais	Concentração de etanol (g/L)		
	Tempo (dias)	0		15	Tempo (horas)	0
<b>C1A</b>		3,334 ( $\pm$ 0,193)	3,839 ( $\pm$ 0,122)	<b>N1A</b>	0,873 ( $\pm$ 0,260)	0,721 ( $\pm$ 0,341)
<b>C1B</b>		1,619 ( $\pm$ 0,421)	--	<b>N1C</b>	0,856 ( $\pm$ 0,374)	0,846 ( $\pm$ 0,281)
<b>C1C</b>		3,180 ( $\pm$ 0,124)	9,575 ( $\pm$ 1,332)	<b>N2A</b>	0,578 ( $\pm$ 0,391)	0,500 ( $\pm$ 0,211)
<b>C1D</b>		2,387 ( $\pm$ 0,288)	--	<b>N2C</b>	0,485 ( $\pm$ 0,352)	0,555 ( $\pm$ 0,266)
<b>C2A</b>		--	--	<b>N3A</b>	0,204 ( $\pm$ 0,107)	0,392 ( $\pm$ 0,094)
<b>C2B</b>		--	--	<b>N3C</b>	0,286 ( $\pm$ 0,127)	0,258 ( $\pm$ 0,098)
<b>C2C</b>		--	12,476 ( $\pm$ 0,720)	<b>N4A</b>	0,914 ( $\pm$ 0,483)	2,208 ( $\pm$ 1,208)
<b>C2D</b>		--	--	<b>N4C</b>	0,864 ( $\pm$ 0,580)	3,244 ( $\pm$ 0,660)
<b>C3A</b>		0,617 ( $\pm$ 0,308)	0,324 ( $\pm$ 0,098)	<b>N5A</b>	--	0,212 ( $\pm$ 0,102)
<b>C3B</b>		0,360 ( $\pm$ 0,404)	--	<b>N5C</b>	--	0,913 ( $\pm$ 0,189)
<b>C3C</b>		0,691 ( $\pm$ 0,094)	0,736 ( $\pm$ 0,104)			
<b>C3D</b>		0,314 ( $\pm$ 0,448)	--			

**C1A, C1B, C1C e C1D:** suco comercial 01; **C2A, C2B, C2C e C2D:** suco comercial 02; **C3A, C3B, C3C e C3D:** suco comercial 03; **N1A e N1C:** Laranja pêra Rio; **N2A e N2C:** Laranja Bahia; **N3A e N3C:** Laranja murcote; **N4A e N4C:** Laranja lima; **N5A e N5C:** Laranja lima da Pérsia.

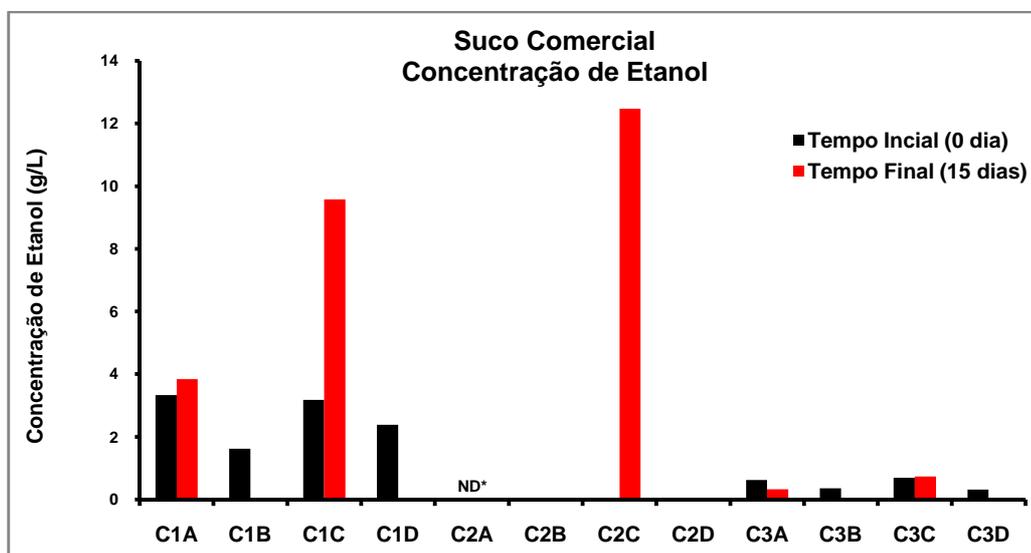
Analisando a tabela de quantificação absoluta para o etanol, observa-se que os valores das concentrações encontradas para o suco comercial 01 no tempo inicial, independentemente das condições de refrigeração e validade, são superiores aos valores encontrados para todas as amostras comerciais e naturais de suco de laranja analisadas. Logo, a amostra C1A mantida sob refrigeração de 14 °C, antes do período de validade, teve pouca alteração do conteúdo de etanol durante o período analisado, enquanto que, a amostra C1C refrigerada a 24 °C, analisada antes do período de validade, apresentou um aumento de três vezes no conteúdo de etanol após quinze dias de armazenamento. Desse modo, o conteúdo de etanol encontrado para essa amostra explica a tendência que ela apresenta em se separar

## Resultados e Discussões

do restante das amostras do grupo no gráfico de escores da análise por PCA (Figura 4.2.2.1.).

Todas as amostras comerciais de suco de laranja analisadas após o período de validade, independente da temperatura de refrigeração, tiveram as concentrações de etanol reduzidas pela metade, quando comparadas com as amostras analisadas antes do período de validade. Lembrando que, as amostras analisadas após período de validade descrito pelo fabricante foram mantidas intactas e sob as condições de armazenamento deste trabalho.

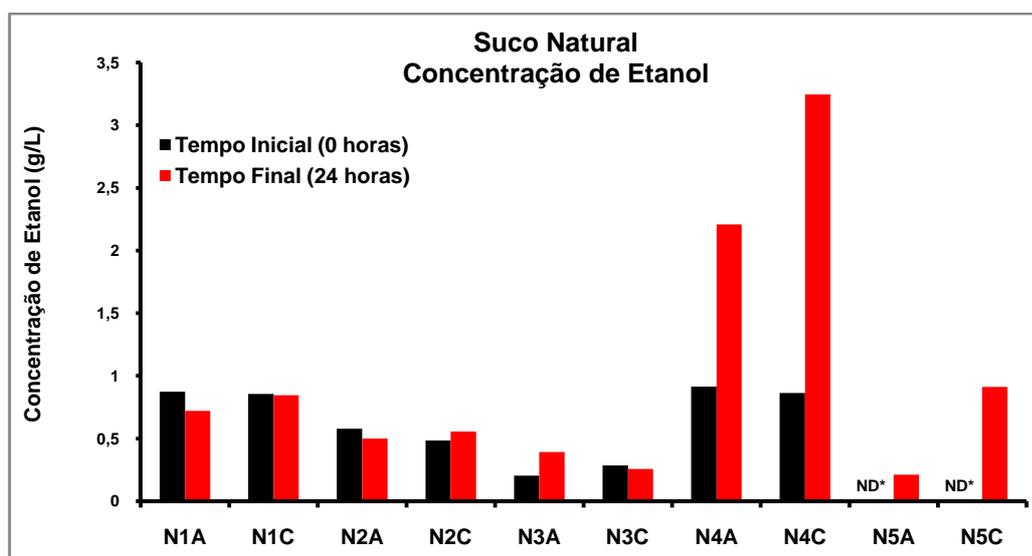
A amostra C2C (suco comercial 02) refrigerada a 24 °C, analisada antes do período de validade, teve um elevado aumento da concentração de etanol após quinze dias de armazenamento. Logo, esse aumento da concentração de etanol explica a separação dessa amostra com as demais amostras do grupo mostrada no gráfico de escores da Figura 4.2.2.1., indicando a influência desse metabólito na separação das amostras. As alterações do conteúdo de etanol para as amostras de suco de laranja comercial podem ser visualizadas melhor no gráfico da Figura 4.3.5.



**Figura 4.3.5.** Gráfico de quantificação do etanol para as amostras de suco de laranja comercial estudadas. As letras nos códigos das amostras referem-se ao lote de armazenamento: **A** = armazenado a 14°C e analisado antes da validade; **B** = armazenado a 14°C e analisado após da validade; **C** = armazenado a 24°C e analisado antes da validade; **D** = armazenado a 24°C e analisado após da validade; **ND\*** = Não detectado o sinal do metabólito no espectro de RMN de <sup>1</sup>H.

## Resultados e Discussões

Para as amostras naturais de suco de laranja N1 (laranja pêra Rio), N2 (laranja Bahia) e N3 (laranja murcote), refrigeradas a 14 °C e 24 °C e analisadas durante o período de 24 horas observou-se que os valores encontrados para as concentrações de etanol nessas amostras não tiveram alterações significativas durante o período de armazenamento dos sucos, justificando o agrupamento dessas amostras na análise de PCA (**Figura 4.2.2.5**). Todavia, as amostras de suco de laranja N4 (laranja lima) e N5 (laranja lima da Pérsia) tiveram as concentrações de etanol significativamente aumentadas durante o período de 24 horas de armazenamento sob a influência das temperaturas de refrigeração de 14 °C e 24°C. Da mesma maneira que no suco comercial, as alterações do conteúdo de etanol para as amostras de suco de laranja natural podem ser visualizadas melhor no gráfico da **Figura 4.3.6**.



**Figura 4.3.6.** Gráfico de quantificação do etanol para as amostras de suco de laranja natural estudadas. As letras nos códigos das amostras referem-se ao lote de armazenamento: **A** = armazenado a 14°C e **C** = armazenado a 24°C; **ND\*** = Não detectado o sinal do metabólito no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ .

## 5. CONCLUSÕES

As conclusões a respeito desse trabalho são as seguintes:

- 1) A ressonância magnética nuclear (RMN de  $^1\text{H}$  e bidimensionais) mostrou-se como uma importante ferramenta na caracterização e quantificação relativa dos metabólitos presentes nas amostras de suco de laranjas estudadas. Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  combinados com análise multivariada dos dados mostraram-se promissores na detecção de indicadores de degradação nos sucos comerciais (em três (3) fabricantes diferentes) e nas cinco (5) variedades de sucos naturais das laranjas pêra Rio e Bahia (*C. sinensis* (L.) *Osbeck* spp.), murcote (*Citrus grandis* (L.) *Osbeck*), lima (*C. aurantifolia*) e lima da Pérsia (*C. limettiodes*).
- 2) Os dados fornecidos pelos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  aliados a análise multivariada se mostraram muito adequados para diferenciar amostras comerciais das amostras naturais de sucos de laranjas através dos constituintes químicos majoritários (sacarose,  $\alpha$ -glicose,  $\beta$ -glicose, frutose, ácido cítrico e etanol) e minoritários (histidina, ácido fórmico, fenilalanina, tirosina, florina, DMP, ácido málico, ácido acético, arginina, ácido pirúvico e ácido málico), utilizando o método A (dados centrados na média) e o método B (dados autoescalados), respectivamente, por análise de componentes principais (PCA).
- 3) As amostras de sucos naturais da laranja lima e lima da Pérsia foram as que mais sofreram alterações durante o período de 24 horas sob as temperaturas de 14 °C e 24 °C, onde os ácidos: fórmico, fúmarico, succínico, pirúvico, acético e láctico tiveram suas concentrações alteradas. As amostras de sucos de laranjas comerciais 01, 02 e 03 também apresentaram alterações durante o período em que foram analisadas sob as temperaturas de 14 °C e 24 °C, tanto antes quanto após a validade, porém o suco comercial 01 foi o que mais apresentou alterações como, por exemplo, o aumento da concentração de ácido pirúvico em cinco (5) vezes e treze (13) vezes, nas amostras mantidas sob refrigeração de 14 °C e 24°C, respectivamente, analisadas após a validade do produto. Portanto, o uso da quantificação relativa aliada à análise multivariada dos dados apresentou-se com grande potencial para avaliar o processo de degradação em amostras de sucos de laranjas tanto comerciais quanto naturais.
- 4) Os dados fornecidos pelos espectros RMN de  $^1\text{H}$  aliados ao modelo de calibração multivariada PLS possibilitou quantificar o conteúdo de etanol (intervalo de 0,136 g/L - 13,000 g/L) presente nas amostras de sucos de laranjas comerciais e

## **Conclusões**

---

naturais. O suco de laranja comercial 01 apresentou conteúdo de aproximadamente quatro (4) vezes maior que os demais sucos estudados, enquanto que, o suco de laranja comercial 02 e da laranja lima da Pérsia foram os que apresentaram menores quantidades no conteúdo de etanol. Com isso, o modelo de calibração multivariada PLS aplicado apresentou como vantagem a determinação direta, simultânea e rápida do conteúdo de etanol em amostras de sucos de laranjas comerciais e naturais.

**6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. TIENNE, L.; DESCHAMPS, M. C.; ANDRADE, A. M.. Produção de carvão e subprodutos da pirólise da casca e do bagaço da laranja (*Citrus sinensis*). *Biomassa e Energia*. Seropédica – RJ. vol. 01, n. 02, p. 191-197. 2004.
2. MAZZINI, R. B.; PIO, R. M.. Caracterização morfológica de seis variedades cítricas com potencial ornamental. *Revista Brasileira de Fruticultura*. Campinas – SP. vol. 32, n. 32, p. 463-470. 2010.
3. NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R.. O retrato da citricultura brasileira. *FEA-RP e FUNDACE*. Ribeirão Preto – SP. p. 01-137. 2010.
4. BRASIL, TODA FRUTA. A história da laranja. (Online). Disponível em: <http://www.todafruta.com.br/portal/icNoticiaAberta.asp?idNoticia=2382>. Acesso em janeiro de 2012.
5. BRASIL, CITRUS. Associação nacional dos exportadores de sucos cítricos. História da laranja. (Online). Disponível em: <http://www.citrusbr.com/exportadores-citricos/setor/historia-da-laranja-150989-1.asp>. Acesso em janeiro de 2012.
6. BASTIANEL, M; DORNELLES, A. L. C.; MACHADO, M. A.; WICKERT, E.; MARASCHIN, S. F.; COLETTA FILHO, H. D.; SCHAFFER, G.. Caracterização de genótipos de *Citrus* spp. através de marcadores RAPD. *Ciência Rural*. Porto Alegre – RS. vol. 35, n. 05, p. 763-768. 2001.
7. BARRET, H. C.; RHODES, A. M.. A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated *Citrus* and its closes relatives. *Systematic Botany*. Orlando – Flórida. vol. 01, n. 32, p. 105-136. 1976.
8. SAWZAKI, H. E.; SODEK, E.; PIO, R. M.; MULLER, G. W.. Identificação de espécies de citros mediante polimorfismo enzimático. *Bragantia*. Campinas – SP. vol. 51, n. 02, p.121-128. 1992.
9. OLIVEIRA, R. P.; CRISTOFANI, M.; AGUILHAR-VILDOSO, C. I.; MACHADO, M. A.. Diversidade genética entre híbridos de tangerina ‘Cravo’ e laranja ‘Pêra’. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. Pelotas – RS. vol. 37, n. 04, p. 479-484. 2002.

## Referências Bibliográficas

---

10. LOPES, J. M. S.; DÉO, T. F. G.; ANDRADE, B. J. M.; GIROTO, M.; FELIPE, A. L. S.; JUNIOR, C. E. I.; BUENO, C. E. M. S.; SILVA, T. F.; LIMA, F. C. C.. Importância econômica dos citros no Brasil. *Revista Científica Eletrônica de Agronomia*. Garça – SP. 20ª ed. 2011.
11. BRASIL, MAPA. Decreto 6.871, de 04 de Junho de 2009. Ementa: Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de Junho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Publicado no Diário Oficial da União de 05 de junho de 2009.
12. BRASIL, AGROANALYSIS. A revista de agronegócios da FGV. Como definir o suco de laranja. (Online). Disponível em: [http://www.agroanalysis.com.br/especiais\\_detalhe.php?idEspecial=49&ordem=3](http://www.agroanalysis.com.br/especiais_detalhe.php?idEspecial=49&ordem=3). Acesso em janeiro de 2012.
13. BRASIL, CITRUS. Associação nacional dos exportadores de sucos cítricos. Laranja e Suco. (Online). Disponível em: <http://www.citrusbr.com/exportadores-citricos/laranja-suco/tipos-de-sucos-e-bebidas-192889-1.asp>. Acesso em janeiro de 2012.
14. BRASIL, AGRONÉGIOS. Associação Brasileira Exportadores de Cítricos. (Online). Disponível em: <http://www.abecitrus.com.br>. Acesso em janeiro de 2010.
15. BRASIL, ADVFN. Advanced Financial Network. (Online). Disponível em: [http://wiki.advfn.com/pt/Suco\\_de\\_laranja:Hist%C3%B3ria](http://wiki.advfn.com/pt/Suco_de_laranja:Hist%C3%B3ria). Acesso em setembro de 2011.
16. BRASIL, AGROLINK. Brasil lidera exportações de suco e busca novos mercados. (Online). Disponível em: [http://www.agrolink.com.br/noticias/brasil-lidera-exportacao-de-sucos-e-busca-novos-mercados\\_131408.html](http://www.agrolink.com.br/noticias/brasil-lidera-exportacao-de-sucos-e-busca-novos-mercados_131408.html). Acesso em janeiro de 2012.
17. CORRÊA NETO, R. S.; FARIA, J. A. F.. Fatores que influenciam na qualidade do suco de laranja. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Campinas – SP. vol. 19, n. 01. 1999.
18. GRAUMLICH, T. R.; MARCY, J. E.; ADAMS, J. P.. Aseptically packaged orange juice and concentrate: a review of the influence of processing and packaged condition on quality. *Journal Agricultural Food Chemistry*. Gainesville – Florida. vol. 34, n. 3, p. 402-405. 1986.

**Referências Bibliográficas**

---

19. SUGAI, A. Y.; SHIGEOKA, D. S.; BADOLATO, G. G.; TADINE, C. C.. Análise físico-química e microbiológica do suco de laranja minimamente processado armazenado em lata de alumínio. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. São Paulo – SP. vol. 22, n. 03, p. 233-238. 2002.
20. RAIMUNDO, E.; KRUGUER, R. L.; DI LUCCIO, M.; CICHOSKI, A. J.. Cor, viscosidade e bactérias lácticas em suco de laranja pasteurizado e submetido ao efeito da luz durante ao armazenamento. *Alimentos e Nutrição*. Araraquara – SP. vol. 18, n. 04, p. 449-456. 2007.
21. BOFFO, E. F.. *Estudo da origem biossintética do ácido acético e determinação da acidez em amostras de vinagres comerciais via RMN de <sup>2</sup>H e <sup>1</sup>H*. São Carlos, Programa de Pós – Graduação em Química – UFSCar, 2004. Dissertação de mestrado, 68 p.
22. ROUSE, A. H.; ATKINS, C. D.. Heat inactivation of pectinesterase in fruit juice. *Food Technology*. Chicago – EUA. Vol. 07, n. 06, p. 221-223. 1953.
23. ROUSE, A. H.; ATKINS, C. D.. Time temperature relationships for heat of inactive of pectinesterase in citrus juice. *Food Technology*. Chicago – EUA. vol. 07, n. 12, p. 489-491. 1953.
24. EARGMAN, B.A. & ROUSE, A.H. Heat inactivation temperature-time relationships for pectinesterase inactivation in citrus juices. *Journal of Food Science*. Chicago – EUA. vol. 41, n. 06, p. 1396-1397, 1976.
25. KIMBALL, D.A. Citrus processing: quality control and technology. *Van Nostrand Reinhold*. New York – EUA. p. 473. 1991.
26. AMSTALDEN, L. C.. *Estudo sobre a ação de pectinesterase em suco de laranja*. Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas, 1992. Dissertação, 188 p.
27. VERSTEEG, C.; ROMBOUTS, C.H.; SPAANSEN, H.; PILNIK, W.. Thermostability and orange cloud destabilizing properties of multiple pectinesterases from orange. *Journal of Food Science*. Chicago – EUA. vol. 45, n. 4, p. 969-971. 1980.
28. ROSA, J. S.; GODOY, R. L. O.; OIANO NETO, J.; CAMPOS, R. S.; ARAUJO, M. C. P.; BORGUINI, R. G.; PACHECO, S.; MATTA, V. M.. “Estudo da taxa de degradação de vitamina C em alguns sucos de frutas”. *Anais do 3º Simpósio de Segurança Alimentar*. Guaratiba – RJ, 2010.

**Referências Bibliográficas**

---

29. TEIXEIRA, M.; MONTEIRO, M.. Degradação da vitamina C em suco de fruta. *Alimentos e Nutrição*. Araraquara – SP. vol. 17, n. 02, p. 219-227. 2006.
30. SPRAUL, M.; SCHÜTZ, B.; HUMPFER, E.; MÖTTER, M.; SCHÄFER, H.; KOSWIG, S.; RINKE, P.. Mixture analysis by NMR as applied to fruit juice quality control. *Magnetic Resonance in Chemistry*. Baden-Württemberg – Germany. vol. 47, p. 130-137. 2009.
31. PROCTOR, W. G.; YU, F. C.. The dependence of a Nuclear Magnetic Resonance frequency upon chemical compound. *Physical Review*. California – EUA. vol. 77, p. 717-717, 1950.
32. NASCIMENTO, E. S. P.. “Análise metabolômica via RMN: amostras de urina e látex”. São Carlos, Programa de Pós – Graduação em Química – UFSCar, 2011. Tese de doutorado, 171 p.
33. SPRAUL, M.; SCHÜTZ, B.; RINKE, P.; KOSWIG, S.; HUMPFER, E.; SCHÄFER, H.; MÖTTER, M.; FANG, F.; MARX, U. C.; MINOJA, A.. NMR-Based multi parametric quality control of fruit juices: SGF Profiling. *Nutrients*. Rhesinstetten – Germany. vol. 01, p. 148-155. 2009.
34. NORD, L. I.; VAAG, P.; DUUS, J. O.. Quantification of organic and amino acids in beer by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *Analytical Chemistry*. Copenhagen – Denmark. vol. 76, p. 4790-4798. 2004.
35. LINDON, J. C.; NICHOLSON, J. K.; HOLMES, E.; ANTTI, H.; BOLLARD, M. E.; KEUN, H.; BECKONERT, O.; EBBELS, T. M.; REILY, M. D.; ROBERTSON, D.; STEVES, G. J.; LUKE, P.; BREAU, A. P.; CANTOR, G. H.; BIBLE, R. H.; NIEDERHAUSER, U.; SENN, H.; SCHLOTTERBECK, G.; SIDELMANN, U. G.; LAURSEN, S. M.; TYMIK, A.; CAR, B. D.; MCKEEMAN, L. L.; COLET, J-M.; LOUKACI, A.; THOMAS, C.. Contemporary issues in toxicology – The role of metabonomics in toxicology and its evaluation by the COMET project. *Toxicology and Applied Pharmacology*. London – United Kingdom. vol. 187, p. 137-146. 2003.
36. HOLMES, E.; NICHOLLS, A. W.; LINDON, J. C.; CONNOR, S. C.; CONNELLY, J. C.; HASELDEN, J. N.; DAMMENT, S. J. P.; SPRAUL, M.; NEIDIG, P.; NICHOLSON, J. K.. Chemometric models for toxicity classification based on NMR spectra of biofluids. *Chemical Research in Toxicology*. London – United Kingdom. vol. 13, p. 471-478. 2000.

**Referências Bibliográficas**

---

37. GIL, A. M.; DUARTE, I. F.; GODEJOHANN, M.; BRAUMANN, U.; MARASCHIN, M.; SPRAUL, M.; Characterization of the aromatic composition of some liquid foods by nuclear magnetic resonance spectrometry and liquid chromatography with nuclear magnetic resonance and mass spectrometric detection. *Analytica Chimica Acta*. Aveiro – Portugal. vol. 488, p. 35-51. 2003.
38. NICHOLSON, J. K.; FOXAL, P. J. D.; SPRAUL, M.; FARRANT, R. D.; LINDON, J. C.. 750 MHz  $^1\text{H}$  and  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy of human blood plasma. *Analytical Chemistry*. London – United Kingdom. vol. 67, p. 793-811. 1995.
39. BOFFO, E. F.. “Utilização da RMN aliada a métodos quimiométricos na análise de méis e aguardentes”. São Carlos, Programa de Pós – Graduação em Química – UFSCar, 2009. Tese de doutorado, 177 p.
40. BRESCIA, M. A.; KOSIR, I. J.; CALDAROLA, V.; KIDRIC, J.; SACCO, A.. Chemometric classification of Apulian and Slovenian wines using  $^1\text{H}$  NMR and ICP-OES together with HPICE data. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. vol. 51, p. 21-26. 2003.
41. VIGLI, G.; PHILIPPIDIS, A.; SPYROS, A.; DAIS, P.. Classification of edible oils by employing  $^{31}\text{P}$  and  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy combination with multivariate statistical analysis. A proposal for the detection of seed oil adulteration in virgin olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Crete – Greece. vol. 51, p. 5715-5722. 2003.
42. CHARLTON, A. J.; FARRINGTON, W. H. H.; BRERETON, P.; Application of  $^1\text{H}$  NMR an multivariate statistics for screening complex mixture: quality control and authenticity of instant coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. York – United Kingdom. vol. 50, p. 3098-3101. 2002.
43. TAVARES, L. A.. “Utilização de métodos quimiométricos aliados a RMN na caracterização dos diferentes tipos de cafés comerciais. São Carlos, Programa de Pós – Graduação em Química – UFSCar, 2007. Tese de doutorado, 169 p.
44. LE GALL, G.; COLQUHOUN, I. J.; DAVIS, A. L.; COLLINS, G. J.; VERHOEYEN, M. E.. Metabolite profile of tomato (*Lycopersicon esculentum*) using  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy as a tool to detect potential unintended effects

## Referências Bibliográficas

---

- followings a genetic modification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Norwich – United Kingdom. vol. 51, p. 2447-2456. 2003.
45. CLARKSON, C.; SIBUM, M.; MESEN, R.; JAROSZEWSKI, J. W.. Evaluation of on-line solid-phase extraction parameters for hyphenated, high performance liquid chromatography-solid-phase extraction-nuclear magnetic resonance application. *Journal of Chromatography A*. Copenhagen – Denmark. vol. 1165, p. 1-9. 2007.
46. JAROSZEWSKI, J. W.. Hyphenated NMR methods in natural products research, part 1: direct hyphenation. *Planta Medica*. Copenhagen – Denmark. vol. 71, p. 691-700. 2005.
47. JAROSZEWSKI, J. W.. Hyphenated NMR methods in natural products research, part 2: HPLC-SPE-NMR and other new trends in NMR hyphenation. *Planta Medica*. Copenhagen – Denmark. vol. 71, p. 795-802. 2005.
48. CUNY, M.; GALL, G. LE; COLQUHOUN, I.J.; LEES, M.; RUTLEDGE, D.N. Evolving Window Zone Selection method followed by Independent Component Analysis as useful chemometric tools to discriminate between grapefruit juice, orange juice and blends. *Analytica Chimica Acta*. Nantes - France. vol. 597, p. 203–213, 2007.
49. CAMPO, DEL G.; BERREGI, I.; CARACENA, R.; SANTOS, J. I.. Quantitative analysis of malic and citric acids in fruit juices using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*. San Sebastián - Spanish. vol. 556, p. 462–468, 2006.
50. LE GALL, G.; PUAUD, M.; COLQUHOUN, I. J.. Discrimination between orange juice and pulp wash by <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy: identification of marker compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Norwich – United Kingdom. vol. 49, p. 580-588, 2001.
51. LOUCHE, L. M. M.; GAYDOU, E. M.; LESAGE, J. C.. Determination of phlorin as peel marker in orange (*Citrus sinensis*) fruits and juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Marseille - France. vol. 46, p. 4193-4197, 1998.

**Referências Bibliográficas**

---

52. MARTIN, G. J.; KOZIET, J.; ROSSMANN, A.; DENNIS, J. Site-specific natural isotope fractionation in fruit juices determined by deuterium NMR an European inter-laboratory comparison study. *Analytica Chimica Acta*. Nantes - France. vol. 321, p. 137-146, 1996.
53. PUPIN, A. M.; DENNIS, M. J.; PARKER, I.; KELLY, S.; BIGWOOD, T.; TOLEDO, M. C. F.. Use of isotopic analyses to determine the authenticity of Brazilian orange juice (*Citrus sinensis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. São Paulo - Brasil. vol. 46, p. 1369-1373, 1998.
54. JAMIN, E.; GUERIN, R.; RETIF, M.; LEES, M.; MARTIN, G.J. Improved detection of added water in orange juice by simultaneous determination of the oxygen-18/oxygen-16 isotope ratios of water and ethanol derived from sugars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Nantes - France. vol. 51, p. 5202-5206, 2003.
55. MARTIN, G. G.; MARTIN, Y.L.; NAULET, N.; MCMANUS, J. D.. Application of <sup>2</sup>H SNIF-NMR and <sup>13</sup>C SIRA-MS analyses to maple syrup: detection of added sugars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Nantes - France. vol. 44, p. 3206-3213, 1996.
56. JAMIN, E.; MARTIN, F.; SANTAMARIA-FERNANDEZ, R.; LEES, M.. Detection of Exogenous Citric Acid in Fruit Juices by Stable Isotope Ratio Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Nantes - France. vol. 53, p. 5130-5133, 2005.
57. PRICE, W. S.. "Water signal suppression in NMR spectroscopy". Annual reports in NMR Spectroscopy. Academic Press. vol. 38, p. 289-354. 1999.
58. CLARIDGE, T. D. W. *High-resolution NMR techniques in organic chemistry*. Editora Pergamon. Oxford – United Kingdom. p. 382. 1999.
59. PARELLA, T.. *Pulse Program Catalogue: I. 1D & 2D NMR Experiments*. NMR Guide 4.1 - TOPSPIN 2.1. Copyright © 2008. Bruker Biospin.
60. DEFERNEZ, M.; COLQUHOUN, I. J. Factors affecting the robustness of metabolite fingerprinting using <sup>1</sup>H NMR spectra. *Phytochemistry*. Norwich – United Kingdom. vol. 62, p. 1009–1017, 2003.
61. PEDERSEN, D. K.. "Spectroscopy and chemometric exploration of food quality: early prediction of meat quality". Denmark, Department of Dairy and Food Science – The Royal Veterinary and Agricultural University, 2002. Ph.D. Thesis. 233 p.

**Referências Bibliográficas**

---

62. FARHAT, L. A.; BELTON, P. S.; WEBB, G. A.. *Magnetic resonance in food science. From molecules to man*. RSC Publishing. Cambridge – United Kingdom. p. 205. 2007.
63. NUNES, P. G. A.. Uma nova técnica para seleção de variáveis em calibração multivariada aplicada às espectrometrias UV-VIS e NIR. João Pessoa, Programa de Pós – Graduação em Química – UFPB, 2008. Tese de doutorado, 106 p.
64. FERRÃO, M. F.; CARVALHO, C. W.; MÜLLER, E. I.; DAVANZO, C. U.. Determinação simultânea dos teores de cinza e proteína em farinha trigo empregando NIR-PLS e DRIFT-PLS. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Campinas – SP. vol. 24, n. 03, p. 333-340, 2004.
65. 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  $^1\text{H}$  RMN spectra of apple juices: discriminations between apple varieties. *Food Chemistry*. Norwich – United Kingdom. vol. 61, n. 01/02, p. 207-213. 1998.
66. BELTON, P.S.; DELGADILLO, 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 Chemistry*. Norwich – United Kingdom. vol. 44, p. 1483-1487, 1996.
67. DUARTE, I. F.; DELGADILHO, I.; GIL, A. M.; Study of natural mango juice spoilage and microbial contamination with *Penicillium expansum* by high resolution  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy. *Food Chemistry*. Aveiro – Portugal. vol. 96, p. 313-324, 2006.