

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ALAN DIEGO DA CONCEIÇÃO SANTOS

**ESTUDO METABOLÔMICO DE CULTIVARES DE CAQUI (*Diospyros kaki*)
DURANTE DIFERENTES ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO ATRAVÉS
DA RMN HR-MAS DE ¹H ALIADA À QUIMIOMETRIA**

CURITIBA

2016

ALAN DIEGO DA CONCEIÇÃO SANTOS

**ESTUDO METABOLÔMICO DE CULTIVARES DE CAQUI (*Diospyros kaki*)
DURANTE DIFERENTES ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO ATRAVÉS
DA RMN HR-MAS DE ¹H ALIADA À QUIMIOMETRIA**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Química – Área de Química Orgânica, do Setor de Ciências Exatas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Andersson Barison

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Ayub

CURITIBA

2016

S237e

Santos, Alan Diego da Conceição

Estudo metabólico de cultivares de caqui (*Diospyros kaki*) durante diferentes estágios de desenvolvimento através da RMN HR-MAS de ¹H aliada à quimiometria / Alan Diego da Conceição Santos. – Curitiba, 2016. 109 f. : il. color. ; 30 cm.

Tese - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2016.

Orientador: Andersson Barison – Co-orientador: Ricardo Ayub.
Bibliografia: p. 80-95.

1. Caqui. 2. Quimiometria. 3. RMN HR-MAS. I. Universidade Federal do Paraná. II. Barison, Andersson. III. Ayub, Ricardo. IV. Título.

CDD: 634.45


TERMO DE APROVAÇÃO

**ESTUDO METABOLÔMICO DE CULTIVARES DE CAQUI
(DIOSPYROS KAKI) DURANTE OS ESTÁGIOS DE
DESENVOLVIMENTO ATRAVÉS DA RMN HR-MAS ALIADA A
QUIMIOMETRIA**

por

ALAN DIEGO DA CONCEIÇÃO SANTOS

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Química, pela Comissão Examinadora composta por:



Prof. Dr. Andersson Barison
Orientador
Dep. de Química – UFPR




Prof. Dr. André J. Simpson
Department of Chemistry - U of T



Prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira
Dep. de Química - UFSCar



Prof. Dr. Luciano Morais Lião
Instituto de Química – UFG



Prof.ª Dr.ª Noemi Nagata
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 27 de abril de 2016.

Com amor e gratidão dedico este trabalho aos meus pais, Juciara e Azequias, por consumirem suas vidas em virtude do meu crescimento e bem-estar...

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná e ao Departamento de Química pela oportunidade de execução do trabalho.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

Ao CNPq, Finep e Fundação Araucária pelo apoio financeiro que permitiu a realização desse trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Andersson Barison por me aceitar como aluno de doutorado no tempo em que meu conhecimento sobre RMN se restringia aos termos 'singlete' e 'dubleto'. Aprendi sobre RMN e Ciência em um ambiente sem repressão, frieza, desconfiança, soberba e cheio de amizade, respeito as ideias alheias e parceria.

À Prof.^a Dr.^a Jaísa Soares, um marco na minha vida. Digna de um capítulo de agradecimento. Minha formação jamais seria a mesma sem a contribuição da professora Jaísa que mesmo sem qualquer obrigação e sempre atarefada disponibilizou seu tempo para mim. Minha referência na vida acadêmica: Jaísa Soares.

À Prof.^a Dr.^a Noemi Nagata pela disponibilidade e ensinamentos em quimiometria. As inúmeras discussões que tivemos foram fundamentais para o andamento do meu trabalho.

Aos professores Dr.^a Francinete Campos, Dr. Guilherme Sasaki e Dr. Ricardo Ayub pelo incentivo e contribuição na minha formação.

Ao Centro de RMN: Dr. Arquimedes Paixão, Dr. Diego Sabry (Popó), em especial, a turma da química Carol Grandizoli, Angelita Nepel, Kahlil Salomé, Flávia Fonseca, Andre Rüdiger e Fernanda Campos. Muito obrigado pela força e parceria de todos os momentos.

De modo especial, aos meus amigos e conterrâneos Lívia Dutra, Leociley Menezes e Maria de Fátima Santos, qualquer coisa que escreva aqui ficará pequena para expressar todo o meu agradecimento por vocês. Foram as melhores companhias de trabalho que já tive. O meu trabalho jamais teria a

qualidade alcançada sem a colaboração de vocês. Cada pedaço dessa tese tem um pedaço de vocês.

A Regiane e Leandro Strapasson pela acolhida, incentivo e amizade. Dois seres humanos incríveis.

Agradeço ao responsável pela empresa Boutin Fruticultura, Carlos Seara, pelo fornecimento das amostras de caqui, tornando possível o desenho experimental adotado no meu trabalho.

Enfim, a todos que diretamente e indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Jesus Sacramentado por todo amor misericordioso e incentivo. Sempre me surpreendendo com Seus cuidados. Companhia de todos os momentos! Os trajetos diários sempre foram pequenos para nossos diálogos.

Aos meus pais, Azequias e Juciara, pelo suporte diário e por me ensinarem a ser um verdadeiro ser humano. Aos meus irmãos Wesley e Taciara por construírem parte do que eu sou. Amo vocês!

Aos meus avós, tios (as), primos (as), padrinhos e madrinhas por todo incentivo acompanhado por mimos inestimáveis. Meu lugar de repouso!

A minha família curitibana, um dos melhores presentes nessa jornada. Vocês são demais, espero vê-los frequentemente e continuar com a bagunça que começamos em Curitiba: Alberto, Raul, Guilherme, Ednei, Valtinho, Makunga e Ezequiel (primeiros momentos) e os piores: Puska, Tiago Lucini, Léo, Marcinho, Marcelo, Felipe, Paula, Pirata, Japs, Sibebe, Jonny, Jeferson, Fernanda, Chicó e Letícia Sayure! Muito obrigado pela amizade e parceria, vocês fizeram toda diferença!

Por fim, a um trio composto por nordestinas arretadas: Tassy, Luzia e Magali. Vocês tornaram meu sul mais nordestino. A reta final foi marcada pela nossa bagunça. Muito obrigado!

RESUMO

Caqui (*Diospyros kaki*) é uma das principais fruteiras brasileira, caracterizada pela grande quantidade de cultivares. A investigação dos metabólitos primários e secundários presentes nas frutas tem levado a um cenário inconclusivo. Tal fato pode ser justificado pelo planejamento experimental que vem sendo adotado. Além do uso de métodos analíticos pouco apropriados, a influência do real estado de desenvolvimento do fruto não tem sido devidamente considerada. Dessa forma, esse trabalho reporta a investigação das mudanças metabólicas durante todo o desenvolvimento dos cultivares de caqui 'Fuyu' e 'Giombo' através da RMN HR-MAS de ^1H e análise quimiométrica. O uso dessa técnica permitiu a aquisição dos espectros diretamente dos frutos, minimizando as desvantagens dos métodos de extração, bem como, a atividade enzimática da invertase. Desta forma, espectros de ^1H de 140 caquis cultivados nas mesmas condições ambientais foram adquiridos, sendo 70 frutos de cada cultivar. A análise desses espectros revelou a baixa concentração da treonina, alanina, citrulina, GABA e ácido málico. Por outro lado, os sinais de carboidratos referentes a sacarose, glicose e frutose desempenharam um importante papel no desenvolvimento dos frutos. As tendências desses açúcares pôde ser descrita pelo aumento e diminuição da sacarose, seguido pelo aumento contínuo da área dos sinais da glicose e frutose. Ademais, foi observado uma notável diferença na região aromática dos dois cultivares no estágio inicial do processo. Para o cultivar 'Giombo', o sinal referente ao ácido gálico permaneceu até o final do desenvolvimento, enquanto que para o cultivar 'Fuyu', sinais referentes a polifenóis foram detectados somente no estágio inicial. A análise multivariada mostrou que os dois cultivares se desenvolvem de forma similar, sendo influenciado por ácidos orgânicos, aminoácidos, polifenóis e colina no primeiro mês, enquanto que para os meses restantes as mudanças foram associadas à presença de açúcares. Esses resultados podem ajudar na compreensão dos mecanismos do desenvolvimento dos frutos, que por sua vez, impactam a qualidade dos mesmos. Além disso, esse trabalho pode contribuir no desenvolvimento de novas estratégias de pós-colheita.

Palavras-chave: Caqui. RMN HR-MAS. Metabolômica.

ABSTRACT

Persimmon (*Diospyros kaki*) is an important horticultural crop which has many cultivated varieties. The investigation of primary and secondary metabolites in kaki fruits has led to inconclusive results in literature. Such a scenario has been attributed to the experimental design adopted. Besides the usage of unappropriated analytical methods, the influence of the actual stage of development of fruits has not been properly taken into consideration. In this context, the metabolic changes of two persimmon cultivars ('Fuyu' and Giombo') during the whole fruit development (from September to March) were evaluated by means of ¹H HRMAS-NMR along with chemometric analysis. The usage of HRMAS-NMR allowed the acquisition of spectra directly from the fruits avoiding the influence of extraction method as well as of enzymatic activity. For that purpose, it was acquired spectra of 140 persimmons cultivated under the same environment conditions, being 70 fruits of each cultivar. The visual analysis of these spectra revealed the low concentration of amino acids (threonine, alanine, citrulline and GABA) and organic acids (malic acid). On the other hand, the signals of carbohydrates (sucrose, glucose and fructose) seemed to play the most important role in the fruit development. The trends of sugars during the process could be described by the increase and decrease of sucrose, followed by the continuous increase of glucose and fructose signal intensity. In addition, it was observed a noticeable difference in the aromatic region of the two cultivars at the initial stage of development. For Giombo, the signal related to gallic acid remained until the end of the growth, while for Fuyu, signals of polyphenols were detected only at the initial stage. The holistic view offered by the multivariate analysis showed that the two cultivars develop in a similar manner. Such process was influenced by organic acid, amino acid, polyphenols and choline in the initial stage while for the rest of the months the changes were associated to the presence of sugars. These findings might help to the comprehension of fruit development, which in turn, impacts the quality of the fruits. Furthermore, they may lead to the improvement of the post-harvest strategies.

Key-words: Persimmon. NMR HR-MAS. Metabolomics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplo hipotético de como a metodologia de <i>binning</i> aborda os deslocamentos dos sinais. (a) cada sinal presente no espectro azul e vermelho estão contidos em um único <i>bucket</i> , (b) em um bucket é possível encontrar mais de um sinal, (c) correspondência incorreta de sinais sobrepostos, (d) um único sinal é representado por mais de um <i>bucket</i>	23
Figura 2. Classificação dos taninos.	31
Figura 3. Esquema da estratégia experimental para a escolha da sequência de pulso adequada.	38
Figura 4. Esquema da avaliação da repetibilidade inter e intra dias do preparo de amostra.	38
Figura 5. Esquema para a avaliação da representatividade da amostra.	39
Figura 6. Esquema para a avaliação da estabilidade da amostra.	40
Figura 7. Espectro de RMN HR-MAS de ^1H do fruto de caqui maduro utilizando as sequências de pulso <i>zgpr</i> , <i>noesypr1d</i> e <i>cpmgpr1d</i> . Acima a expansão de δ 1 a 3 mostrando o perfil para a parte do espectro com menor intensidade.	47
Figura 8. Espectro de RMN HR-MAS de ^1H do fruto de caqui verde utilizando diferentes sequências de pulsos. As setas mostram a qualidade da saturação do sinal da água.	47
Figura 9. Espectros de RMN HR-MAS de ^1H do fruto de caqui verde utilizando a sequência de pulsos <i>noesypr1d</i> ($d_1 = 1$ s e $d_8 = 100$ ms) com diferentes números de promediações. Nota-se a boa relação sinal/ruído quando empregado 512 promediações se assemelhando, em termos de perfil, a 1K de promediações.	48
Figura 10: Espectros de RMN HR-MAS de ^1H de caqui adquiridos de diferentes partes de um único fruto. São mostradas as regiões ampliadas para cada conjunto de espectros.	51
Figura 11. Espectros de RMN HR-MAS de ^1H de caqui (adquiridos conforme o item 3.3) com ampliação do sinal do TMSP. Acima o fruto maduro e abaixo o fruto verde.	52
Figura 12. Espectros ampliados de RMN HR-MAS de ^1H de caqui adquiridos em diferentes tempos após a retirada do fruto do congelador e exposto ao ambiente.	53

Figura 13. Espectros de RMN HR-MAS de ¹ H de caqui 'Fuyu' durante os diferentes estágios de desenvolvimento. Destaca-se a importante influência dos carboidratos no processo. Cada mês é identificado por sua respectiva letra inicial: setembro (S), outubro (O), novembro (N), dezembro (D), janeiro (J), fevereiro (F) e março (M).....	54
Figura 14: Espectros de RMN HR-MAS de ¹ H de caqui 'Giombo' durante os diferentes estágios de desenvolvimento. Destaca-se a importante influência dos carboidratos no processo. Cada mês é identificado por sua respectiva letra inicial: setembro (S), outubro (O), novembro (N), dezembro (D), janeiro (J), fevereiro (F) e março (M).....	55
Figura 15. Expansão (δ 1-3) dos espectros de RMN HR-MAS de ¹ H de caqui 'Fuyu' e 'Giombo' durante o processo de desenvolvimento (setembro (S) a março (M))......	58
Figura 16. Avaliação mensal (de setembro (S) à março (M)) da área integrada dos metabólitos presentes nos cultivares 'Fuyu' e 'Giombo' (<i>box plots</i>). Símbolos iguais mostram diferenças significativas entre os meses, a 5% de probabilidade, baseada no teste de Tukey.....	59
Figura 17. Expansão (δ 3-6) dos espectros de RMN HR-MAS ¹ H de caqui 'Fuyu' e 'Giombo' durante o processo de desenvolvimento (de setembro (S) a março (M))......	62
Figura 18. Atribuição dos sinais de carboidratos empregados na avaliação mensal da relação sinal/ruído dos cultivares de caqui.	63
Figura 19. Avaliação mensal (de setembro (S) à março (M)) da área integrada dos metabólitos presentes nos cultivares 'Fuyu' e 'Giombo' (<i>box plots</i>). Símbolos iguais mostram diferenças significativas entre os meses, a 5% de probabilidade, baseada no teste de Tukey.....	64
Figura 20. Expansão (δ 6 - 10) dos espectros de RMN HR-MAS de ¹ H de caqui 'Fuyu' (A) e 'Giombo' (B) durante o processo de maturação. Cada mês é identificado por sua respectiva letra inicial: setembro (S), outubro (O), novembro (N), dezembro (D), janeiro (J), fevereiro (F) e março (M).	66
Figura 21. Fluxograma mostrando as etapas de otimização para as análises de componentes principais (PCA). Utilizando o conjunto de dados que inclui amostra das duas cultivares, foram feitas diferentes combinações empregando os modos de integração e pré-processamentos oferecidos pelo AMIX.....	69

Figura 24. A) Gráfico de escores de PC1 (87,95%) versus PC2 (2,39%), utilizando 66 amostras de caqui. (B) Gráfico de influências (loadings) de PC1 versus PC2 explicando a classificação das amostras apresentadas no gráfico de escores. A linha tracejada mostra a trajetória do processo de desenvolvimento do fruto.	75
Figura 26. Ampliação da região entre δ 1,00-3,10 pelo espectro de RMN de ^1H em solução de FS. (D_2O , 600,13 MHz). GABA: Ácido gama aminobutírico; EGC: Epigallocatequina	97
Figura 27. Ampliação da região entre δ 1,20-3,20 do espectro de RMN de ^1H em solução de FD. (D_2O , 600,13 MHz). GABA: Ácido gama aminobutírico.....	97
Figura 28. Mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C (600 MHz, D_2O) de FS.	98
Figura 29. Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (600 MHz, D_2O) de FS.	98
Figura 30. Ampliação da região entre δ 3,20-5,50 pelo espectro de RMN de ^1H em solução de FS (D_2O , 600,13 MHz).	101
Figura 31. Ampliação da região entre δ 5,26-9,60 pelo espectro de RMN de ^1H em solução de FS (D_2O , 600,13 MHz).	104
Figura 32. Ampliação da região entre δ 6,1-7,1 do espectro de RMN de ^1H (em solução) para amostra FM. (D_2O , 400).....	107
Figura 33. Ampliação da região entre δ 6,1-7,1 do espectro de RMN de ^1H em solução de GM. (D_2O , 600).	108

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

COSY – *Correlation Spectroscopy*

HMBC – *Heteronuclear Multiple Broad Correlation*

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*

HSQC – *Heteronuclear Single Quantum Coherence*

LC-MS – *Liquid Chromatography- Mass Spectrometry*

NOESY – *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*

RMI – *Ressonância Magnética de Imagem*

PCA – *Principal Component Analysis*

TOCSY – *Total Correlation Spectroscopy*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	RMN APLICADA A METABOLÔMICA DE ALIMENTOS	16
1.2	ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA: ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)	21
1.3	FRUTAS NO BRASIL	26
1.3.1	CAQUI (<i>Diospyros kaki</i>)	27
2	OBJETIVOS	35
2.1	GERAL	35
2.2	ESPECÍFICOS	35
3	PARTE EXPERIMENTAL	37
3.1	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	37
3.2	OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA PARA AQUISIÇÃO DE ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ¹ H	37
3.2.1	Parâmetros de aquisição	37
3.2.2	Preparo da amostra	38
3.2.3	Teste de estabilidade da amostra	39
3.3	ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ¹ H	41
3.4	ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)	42
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1	OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA PARA A AQUISIÇÃO DE ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ¹ H	45
4.1.1	Parâmetros de aquisição	45
4.1.2	Preparo de amostra	49
4.1.3	Avaliação da estabilidade	53
4.2	PERFIL ESPECTRAL	54
4.2.1	Aminoácidos e ácidos orgânicos	56
4.2.2	Carboidratos	60
4.2.3	Região aromática	65
4.3	ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)	67
4.3.1	Otimização das condições para a PCA	67
4.3.2	PCA do cultivar 'Fuyu'	71
4.3.3	PCA do cultivar 'Giombo'	74
5	CONCLUSÃO	77
6	REFERÊNCIAS	80
	ANEXO I	96

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 RMN APLICADA A METABOLÔMICA DE ALIMENTOS

O amadurecimento da consciência alimentar despertou interesse na população para as propriedades dos alimentos, tal como, valor nutricional, autenticidade e qualidade. Essas características são, por sua vez, diretamente relacionadas com o contexto em que os alimentos são produzidos, estocados e consumidos (CIFUENTES, 2009; DENNIS, 1998; SHEPHERD et al., 2011). O efeito dos produtos alimentares na saúde humana vem sendo demonstrado através dos estudos epidemiológicos que relatam os hábitos alimentares e os riscos de doenças. Paralelamente ao valor nutricional, atenção significativa tem sido dada a prevenção de doenças (ESPÍN et al., 2007).

A ciência de alimentos evolui de acordo com a necessidade e exigências da população. Assegurar os benefícios dos alimentos requer um conhecimento mais detalhado da composição química. Nesse contexto, encontra-se a área de pesquisa conhecida como metabolômica, também chamada de metabonômica. A mesma é definida como a tentativa de identificar e quantificar o maior número de metabólitos possível em células, órgãos e organismos (SHEPHERD et al., 2011; ESPÍN et al., 2007; GERMAN et al., 2005).

De acordo com Villas-Bôas et al. (2005), o termo metabolômica ainda não está bem definido e vem sendo utilizado erroneamente, sendo muitas vezes confundido com “perfil metabólico”. De fato, alguns autores consideram os termos mencionados como sinônimos (WISHART, 2008; MANNINA et al., 2012a); no entanto, para Villas-Bôas a essência dos estudos metabolômicos é estabelecer a relação entre a caracterização dos fenótipos metabólicos e seus genótipos correspondentes. O estabelecimento da composição química através do uso de uma técnica analítica específica deveria ser definido como perfil metabólico (VILLAS-BÔAS et al., 2005).

Recentemente, a aplicação das tecnologias “ômicas” empregada nos estudos de domínio alimentar e nutricional tem sido definida como “*foodomic*” (CIFUENTES, 2009; CAPOZZI e BORDONI, 2013; GARCÍA-CAÑAS et al., 2012), que consiste numa visão abrangente da bioquímica dos alimentos

permitindo um melhor entendimento das redes metabólicas. Tais conhecimentos dão acesso às bases moleculares que contribuem para as características organolépticas e nutricionais dos alimentos (SHEPHERD et al., 2011; WISHART, 2008; CEVALLOS-CEVALLOS et al., 2009).

O acompanhamento da composição química nos alimentos é uma tarefa árdua devido à quantidade de compostos que podem estar presentes e as transformações bioquímicas inerentes as diferentes matrizes. De forma geral, a modificação de um componente químico afeta diretamente na produção dos demais provocando uma alteração no gosto, textura, aroma, funcionalidade, bioatividade, valor nutricional, tempo de vida e segurança dos alimentos (SHEPHERD et al., 2011).

A caracterização e a quantificação dessas transformações requerem metodologias que possam ir além da análise de compostos específicos ou classes de substâncias, fato que justifica a aderência por parte da comunidade científica aos estudos metabolômicos de alimentos. Neste contexto, surge a necessidade de técnicas sofisticadas e metodologias mais apropriadas capazes de oferecer melhores resultados (tanto qualitativos como quantitativos) com aumento de sensibilidade, precisão, especificidade e velocidade das análises (GARCÍA-CAÑAS et al., 2012).

A análise de alimentos é uma das mais importantes aplicações da química analítica. Há um grande número de técnicas comumente utilizadas na análise desse tipo de matriz que podem ser agrupadas como técnicas espectroscópicas, biológicas, de separação, de preparo de amostra, eletroquímica e técnicas hífenadas (GARCÍA-CAÑAS et al., 2012). De acordo com García-Cañas et al. (2012) as técnicas espectroscópicas têm se destacado na análise de alimentos, havendo o dobro de publicações quando levado em consideração os trabalhos entre os anos de 1990-2000 e 2001-2011. Esse fato pode ser justificado devido ao desenvolvimento instrumental das técnicas espectroscópicas, bem como ao uso de métodos quimiométricos multivariados que por sua vez, possibilitam uma melhor interpretação dos dados.

Entre as técnicas espectroscópicas há uma importante contribuição da ressonância magnética nuclear (RMN), sendo superada apenas pela espectrometria de massas e espectroscopia de fluorescência. Nas últimas

décadas, o desenvolvimento de novas sondas juntamente com os novos designs de magnetos e as técnicas de polarização ofereceram um importante melhoramento na sensibilidade e resolução contribuindo para a inserção da RMN na lista das técnicas empregadas na análise de alimentos (CEVALLOS-CEVALLOS et al., 2009).

A RMN permite a análise de amostras complexas - seja no estado líquido, sólido ou semi-sólido - sem alterar as características das mesmas. Diferentes metodologias de RMN têm sido empregadas com sucesso na análise de alimentos, a citar: RMN de alta resolução (MANNINA et al., 2012b) e baixa resolução (MARIETTE, 2009), RMN de sólidos (BERTOCCHI e PACI, 2008), ressonância magnética de imagem (RMI) (MARCONE et al., 2013) e fracionamento isotópico natural específico (RMN-FINE) (ROSSMANN, 2001). Tais métodos permitem a obtenção de diversas informações e devem ser selecionados de acordo com o objetivo do trabalho.

Através da RMN de alta resolução, as estruturas das moléculas podem ser determinadas permitindo análises qualitativas e quantitativas. A técnica de RMN de baixa resolução pulsada é capaz de informar sobre o tempo de relaxação, movimento intra e intermolecular, processos de difusão, dinâmica molecular, termodinâmica e propriedades estruturais de líquidos em sistemas porosos. Já a RMI produz imagem em alta resolução da amostra de forma não invasiva através das medidas do tempo de relaxação e coeficiente de difusão (MANNINA e SEGRE, 2002).

Entre as técnicas apresentadas, a RMN de alta resolução é a mais utilizada, no entanto, apresenta a desvantagem da necessidade de extração o que resulta na perda de informação. Outros inconvenientes podem ser somados a esse fato, por exemplo, a quantidade de amostra requerida para alcançar uma boa relação sinal-ruído e aumento de custo e do tempo de análise. Por outro lado, o estudo de matrizes sem qualquer tipo de tratamento com alta resolução pode ser alcançado utilizando a espectroscopia de RMN de alta resolução com giro em torno do ângulo mágico (HR-MAS: *High Resolution Magic Angle Spinning*).

A RMN HR-MAS permite a análise de amostras heterogêneas ou semissólidas que são caracterizadas pela falta de homogeneidade e movimento molecular limitado. Tais características são responsáveis pelo

alargamento dos sinais espectrais que, por sua vez, tem sua origem no acoplamento dipolar dos spins nucleares, na variação espacial da susceptibilidade magnética do meio e na relaxação do deslocamento químico anisotrópico, sendo este último o de menor importância quando comparado com os dois primeiros (CHEN e SINGER, 2007).

Devido à moção molecular restrita, os campos magnéticos gerados pelos diferentes spins interagem, resultando em um acoplamento dipolar diferente de zero (também conhecido com acoplamento dipolar direto), comportamento esse não observado nos fluídos. Além disso, para esse tipo de matriz a susceptibilidade do meio varia com a posição, resultando na magnetização não uniforme das moléculas pelo campo externo (CHEN e SINGER, 2007; CLARIDGE, 2009; MACOMBER, 1998).

Todos os fatores mencionados anteriormente dependem da relação angular entre o vetor internuclear e a direção do campo estático. Isso resulta na origem de campos magnéticos locais diferentes para cada pacote de spin, resultando em uma faixa larga de frequências de precessão e conseqüentemente o alargamento do sinal. A influência destes fatores pode ser drasticamente minimizada ao submeter à amostra a rápida rotação em um ângulo específico chamado “ângulo mágico” ($54,7^\circ$). Nessa condição, as contribuições do acoplamento dipolar e da diferença na susceptibilidade magnética tornam-se insignificantes e os sinais de RMN são similares a aqueles observados em líquidos (CHEN e SINGER, 2007; CLARIDGE, 2009; MACOMBER, 1998).

Quando comparada com a RMN de líquidos e sólidos, a técnica de RMN HR-MAS apresenta características positivas, sendo que a mais divulgada é sua habilidade para produzir espectros de alta resolução a partir da análise direta de amostras. Na RMN HR-MAS, os procedimentos de preparo de amostra são mínimos, permitindo as análises dos compostos em seu estado natural. Em outras palavras, esta ferramenta combina as típicas vantagens da RMN de líquidos e de sólidos requerendo um curto tempo para a aquisição dos espectros de hidrogênio mesmo utilizando poucos miligramas da amostra (BROBERG e KENNE, 2000). A técnica é ainda considerada sensível, sendo capaz de detectar componentes com concentração abaixo de $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ em misturas (GARROD et al., 1998).

Uma vez que a sonda HR-MAS possui uma configuração com gradiente de campo magnético, experimentos em duas dimensões convencionais (HSQC, HMBC, COSY, TOCSY e NOESY) podem ser adquiridos com alta resolução utilizando as mesmas sequências de pulsos empregadas na RMN de líquidos. No entanto, a depender das características da matriz nem sempre uma boa relação sinal-ruído é obtida, o que torna os espectros pouco informativos. A qualidade espectral dos experimentos de 1D e 2D permite a identificação dos compostos, visto que informações como multiplicidade e correlações homo e heteronucleares são obtidas. Substâncias polares e apolares podem ser simultaneamente identificadas, sendo assim, tanto metabólitos primários quanto secundários podem ser avaliados.

A identificação de metabólitos secundários nem sempre é possível em alimentos quando se usa a técnica de RMN HR-MAS. A diferença de concentração entre os metabólitos secundários e primários é de algumas ordens de magnitude e na maioria dos casos os compostos majoritários impossibilitam a observação dos compostos minoritários. Através da RMN HR-MAS tem sido identificado comumente ácidos graxos, aminoácidos, ácidos orgânicos, carboidratos e compostos fenólicos. Quando a identificação de compostos minoritários faz parte do objetivo do trabalho, o uso de procedimento de extração é inevitável. O único pré-requisito quanto ao emprego da RMN HR-MAS está relacionado à mobilidade das moléculas na amostra, condição que é facilmente satisfeita no caso dos alimentos.

Além da área de alimentos, a técnica de HR-MAS tem sido empregada na biomedicina (LINDON et al., 2009), ciência de materiais (ALAM e JENKINS, 2012), química combinatória (SHAPIRO e GOUNARIDES, 2000/2001), farmacêutica (MARZORATI et al., 2013), no monitoramento de síntese orgânica em fase sólida (BIANCO et al., 2000; RUHLAND et al., 1998; KEIFER et al., 1996), em estudos de algas (BROBERG et al., 1998; BROBERG e KENNE, 2000; JÉGOU et al., 2010), líquen (ALCANTARA et al., 2007) com plantas (KELLEHER et al., 2006; SCHEIDT et al., 2004; ALVES FILHO et al., 2012; SILVA et al., 2012).

Valentini et al. (2011) publicaram um artigo de revisão sobre a técnica que cobre boa parte dos trabalhos publicados previamente. Neste, os autores mostram as principais aplicações e destacando como esta técnica tem sido

pouco explorada na análises de alimentos. Além disso, foi apresentada a primeira revisão geral sobre HR-MAS na caracterização de alimentos (RIGHI et al., 2008). O nosso grupo de pesquisa publicou recentemente um artigo de revisão que discute como a RMN HR-MAS vem sendo usada na área de alimentos destacando os principais aspectos metodológicos e aplicações (SANTOS et al., 2015).

1.2 ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA: ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)

Os perfis espectrais de RMN obtidos a partir de alimentos são, na sua maioria, altamente congestionados, uma vez que, informações de centenas (ou até mesmo milhares) de metabólitos podem ser capturadas em apenas uma única corrida analítica (COEN et al., 2008). Mediante esse cenário, o processamento e a interpretação dos dados em estudos metabolômicos vêm sendo feito através de métodos de análise multivariada. Através destes, os perfis espectrais e suas intensidades são estatisticamente comparadas e usadas para identificar, por exemplo, qual a característica espectral responsável pela distinção das amostras (WISHART, 2008).

De forma geral, as ferramentas quimiométricas possibilitam a extração de informações relevantes de dados complexos. No entanto, para a obtenção de resultados significantes é requerido, além da aquisição de dados representativos a escolha adequada do método de análise, bem como o entendimento do propósito da análise (KJELDAHL e BRO, 2010).

Na metabolômica, a análise de componentes principais, do inglês *Principal Component Analysis* (PCA), é possivelmente uma das ferramentas quimiométricas mais utilizadas. Isso se deve ao fato que, normalmente, o primeiro passo na análise multivariada é explorar e descobrir as características gerais dos dados, possibilitando o seu agrupamento, tal como, a identificação de suas tendências (SMOLINSKA et al., 2012). Essas informações são facilmente encontradas ao utilizar a PCA.

O emprego da análise por PCA usada como base fundamental da maioria dos métodos modernos multivariados pode ainda ser justificado devido ao seu importante papel na identificação de amostra com comportamento

anômalo. A presença de amostras anômalas (do inglês *outliers*) afeta todas as metodologias baseadas nos métodos dos mínimos quadrados que são comumente empregados na análise multivariada dos dados (SMOLINSKA et al., 2012).

Em linhas gerais, a PCA descreve indivíduos, que anteriormente estavam em um ambiente multidimensional das variáveis, em um espaço de poucas dimensões (normalmente de duas ou três dimensões). Os novos eixos, chamados de componentes principais (PC), são combinações lineares das variáveis originais calculadas para maximizar a dispersão dos indivíduos. Para a obtenção da PCA as variáveis originais podem ser multiplicadas por um coeficiente denominado *loadings* (peso, em português). O valor numérico de *loadings* de uma dada variável em uma PC indica o quanto à mesma tem em comum com a componente principal. Isso significa que variáveis com autovalores nas PC's são responsáveis pela discriminação dos grupos, em outras palavras, possuem as informações úteis para discriminar as amostras (COEN et al., 2008; WISHART, 2008; KJELDAHL e BRO, 2010; SMOLINSKA et al., 2012). Uma discussão didática sobre os aspectos básicos da PCA foi abordada por Bro e Smilde (2014).

A análise multivariada dos dados de RMN é dificultada devido à possibilidade de variações nas frequências de ressonância das substâncias. Tal desalinhamento surge mesmo em análises padronizadas, uma vez que algumas regiões espectrais são mais ou menos sensíveis às interações intermoleculares, pH e temperatura, além das variações instrumentais. Dessa forma, há uma necessidade clara do emprego de uma abordagem computacional para alinhar os sinais corretamente (VU e LAUKENS, 2013; FERREIRA, 2015).

O desalinhamento dos sinais no conjunto de dados, chamado de “problema de correspondência”, é comumente relatado para os dados de RMN e LC-MS. O mesmo pode ser definido como a dificuldade de arranjar qualquer informação no devido lugar, por exemplo, em uma tabela colocar os valores corretos nas colunas e linhas correspondentes (ABERG et al., 2009).

O deslocamento das frequências de ressonância nos diferentes espectros compromete as intensidades dos sinais e conseqüentemente o resultado final da análise estatística. Uma solução simples e popular para

extrair as intensidades de múltiplos espectros, com o intuito de uma análise comparativa, é conhecida na literatura como *binning* ou *bucket*. *Binning* consiste em dividir o espectro em pequenas “caixas” (*buckets*), que idealmente são grandes suficientes para abranger as variações dos sinais. Em seguida, a intensidade de cada *bucket* é calculada a partir da área sob a curva. A metodologia convencional de *binning* corrige pequenas variações nos deslocamentos químicos apresentando como desvantagem a redução drástica da resolução dos dados (VU e LAUKENS, 2013).

A **Figura 1** mostra quatro exemplos hipotéticos de como o sistema de *binning* aborda as variações dos deslocamentos químicos. Observa-se que na **Figura 1a** os sinais presentes no espectro azul e vermelho acabam no mesmo *bucket*, representando a situação desejada. Já na **Figura 1b** múltiplos sinais ocupam um único *bucket*. Existe também o cenário onde há uma correspondência incorreta, **Figura 1c**, o primeiro sinal do espectro vermelho aparece no mesmo *bucket* onde se encontra o segundo sinal do espectro azul. Por fim, na **Figura 1d** observa-se as variações dos deslocamentos químicos cruzando as fronteiras dos *buckets*, um mesmo sinal é representado por mais de um *bin* (VU e LAUKENS, 2013).

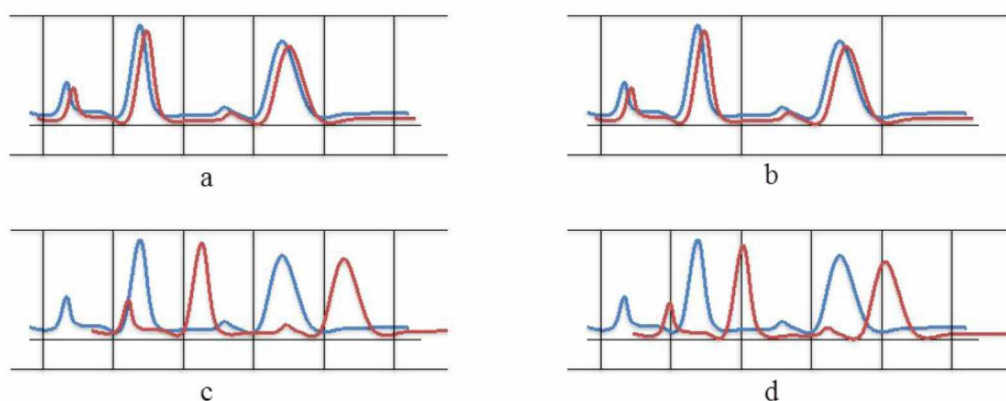


Figura 1. Exemplo hipotético de como a metodologia de *binning* aborda os deslocamentos dos sinais. (a) cada sinal presente no espectro azul e vermelho estão contidos em um único *bucket*, (b) em um bucket é possível encontrar mais de um sinal, (c) correspondência incorreta de sinais sobrepostos, (d) um único sinal é representado por mais de um *bucket*.

Os métodos baseados na abordagem *binning* são largamente utilizados devido à sua facilidade de uso e por mostrar performances aceitáveis. No entanto, tais metodologias perdem eficiência ao se deparar com grandes

variações dos deslocamentos dos sinais de RMN. A solução para processar e comparar espectros com variações nas frequências de ressonância consiste no alinhamento dos sinais. Uma série de metodologias tem sido desenvolvida nesse sentido, Vu e Laukens (2013) descrevem bem as possibilidades até então disponíveis. Entre elas se destacam os métodos mostrados na **Tabela 1**.

Tabela 1: Principais métodos de alinhamentos.

Método	Sigla	Referência
Correlation optimized warping (Alinhamento por Correlação Otimizada)	COW	NIELSEN et al., (1998)
Dynamic time warping (Alinhamento por Tempo Dinâmico)	DTW	TOMASI et al., (2004)
Fuzzy warping	FW	WU et al., (2006)
Generalized fuzzy hough transform	GFHT	CSENKI et al., (2007)
Interval correlation shifting	Icoshift	SAVORANI et al., (2010)
Partial Linear Fit	PLF	VOGELS et al., (1996)
Peak alignment by genetic algorithm (Alinhamento de picos por algoritmos genéticos)	PAGA	FORSHED et al., (2003)
Peak alignment by FFT	PAFFT	WONG et al., (2005)
Progressive consensus alignment of NMR spectra	PCANS	STAAB et al., (2010)
Hierarchical cluster – based peak alignment	CluPA	VU et al., (2011)

Fonte: Adaptado de Vu e Laukens (2013).

A desvantagem do uso de *buckets* pode ser superada ajustando os seus limites para o mínimo, com o objetivo de fornecer *buckets* otimizados de diferentes tamanhos (FERREIRA et al., 2015). A primeira metodologia baseada nessa ideia foi implementada no software comercial ACD/Labs™ (Toronto, Canadá) denominada *intelligent bucketing*. Em outro trabalho, Davis et al. (2007) introduziu o “*adaptive binning*” que define o tamanho do *bucket* baseado nos picos detectados no espectro de referência. Alternativas para o *bucketing* tradicional foram propostas recentemente na literatura denominado *Gaussian binning* e *dynamics adaptive binning*, no entanto, assim como o método

proposto por David et al. (2010) estas metodologias requerem um alto nível de conhecimento estatístico/matemático.

Nesse contexto, Souza et al. (2013) propuseram uma modificação no procedimento convencional de *bucketing*, designado como *optimized bucketing algorithm* (OBA), onde o tamanho do *bin* é otimizado através do estabelecimento dos seus limites no mínimo local utilizando um espectro médio de RMN. Dessa forma, os *buckets* com tamanhos variáveis passam a ser os mesmos para todas as amostras.

Essa metodologia foi avaliada utilizando três conjuntos de dados. Ao utilizar espectros de vinho, concluiu-se que a estratégia do *bucket* otimizado pode ser útil para a construção de modelos menos complexos (**MLR models**) com boas habilidades de predição. O desempenho da OBA na análise exploratória dos dados de biodiesel também foi avaliado, demonstrando que o mesmo pode ser de grande importância para os propósitos de reconhecimento de padrões. Por fim, no conjunto de dados de tumores no cérebro, o OBA permitiu a construção de um modelo PLS-DA capaz de discriminar tumores com menor número de erros de classificação.

Para o estabelecimento dos *buckets* com tamanhos variáveis, usa-se um espectro médio do conjunto de dados. No primeiro momento, são definidos dois parâmetros:

1 – o tamanho inicial dos *buckets*, que por sua vez é convertido em número de pontos (N) através da razão entre o tamanho do *bucket* e intervalo amostral (*sampling interval* - definido pelas condições experimentais);

2 – o parâmetro de flexibilidade (*slackness*), que é dado como porcentagem de N e define a distância que os limites podem se mover enquanto procura pelo mínimo local no espectro médio. O parâmetro de flexibilidade é expresso como: $s = \textit{slackness} \times 0,01 \times N$. Por exemplo, em um conjunto de dados adquirido com um intervalo amostral de δ 0,0004, selecionando o tamanho de *buckets* de δ 0,04 (o que resulta em um $N = 0,04/0,0004 = 100$ pontos) e 50% de *slackness* ($s = 50 \times 0,01 \times 100 = 50$ pontos), o tamanho do *bucket* pode variar de δ 0,02 a 0,06 (100 ± 50 pontos), dependendo onde o local mínimo é encontrado (SOUZA et al., 2013).

Um importante ponto a ser considerado na OBA é a escolha da melhor combinação entre o tamanho dos *buckets* e o parâmetro de flexibilidade

(*slackness*) para cada conjunto de dados. A melhor combinação destes parâmetros pode ser encontrada baseada na inspeção visual da extensão dos desalinhamentos na linha de base, do valor da variância explicada de uma PCA ou ainda pelo *simplicity value* da matriz que, por sua vez, está relacionado à qualidade do alinhamento dos espectros. Souza et al. (2013) sugere que o tamanho dos *buckets* não seja grande, uma vez que, essa metodologia provoca uma diminuição da resolução do eixo dos deslocamentos químicos, dessa forma deve haver uma harmonização entre a correção dos alinhamentos e a redução do número de variáveis.

1.3 FRUTAS NO BRASIL

Na literatura são encontrados diversos trabalhos que mostram a eficácia da RMN na análise de frutas, uma das matrizes alimentares de maior relevância no mundo. Dentro do mapa de agronegócio mundial, o Brasil possui uma importância inquestionável e vem mantendo sua colheita superior a 40 milhões de toneladas de frutas frescas desde 2004 (SANTOS et al., 2013).

Este resultado confere ao país o posto de terceiro maior produtor mundial de frutas (com aproximadamente 1,9 milhão de hectares de área plantada), sendo ultrapassado apenas pela China e Índia (SANTOS et al., 2013; FACHINELLO et al., 2011). De acordo com a Secretaria de Comércio Exterior (Secex) compilados pelo Ibraf (Instituto Brasileiro de Frutas), em 2013 o Brasil destinou aos clientes externos um total de 711,869 mil toneladas de frutas o que rendeu 657,528 milhões na receita anual. Entretanto, o valor de exportação representa apenas 3% daquilo que é colhido no Brasil (SANTOS et al., 2013).

Tendo em vista o potencial brasileiro para a exportação de frutas; programas de qualidade na cadeia de produção, em diferentes ramos, estão sendo adotados com o objetivo de consolidar uma maior participação do Brasil no mercado internacional. Nesse contexto, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) criou a Produção Integrada de Frutas (PIF) que tem como objetivos: rastrear a produção brasileira de frutas, conferir ao agricultor um selo de certificação e garantir a qualidade da fruta ao exportador. Dessa forma, o objetivo do PIF é elevar os padrões de qualidade e competitividade da

fruticultura brasileira ao patamar de excelência requerido pelo mercado internacional (GUEDES et al., 2007).

Em linhas gerais, a qualidade pode ser entendida como consequência de um controle efetivo de matéria-prima. Entre os estágios fisiológicos que estão envolvidos na qualidade da fruta destaca-se o processo de amadurecimento. O estágio de maturação envolve reações complexas, com alterações fisiológicas, metabólicas, bioquímicas e estruturais perceptíveis pela mudança de características como a coloração, textura, sabor e aroma (CHITARRA e CHITARRA, 2005). O acompanhamento das modificações químicas durante a maturação (pré-colheita) e pós-colheita contribui para a manutenção da qualidade, bem como, no aumento do tempo de armazenamento da fruta, o que pode contribuir para a diminuição do desperdício das mesmas, um grave problema da produção brasileira (CENCI 2006; TOFANELLI et al., 2007).

Durante a maturação até o completo amadurecimento, numerosos processos bioquímicos e degradativos ocorrem de forma sequencial ou concomitante. A mudança característica inicial da maturação é a degradação da clorofila, bem como, a síntese de outros pigmentos, envolvendo modificações na cor, seguida de aprimoramento do sabor pela síntese de açúcares e de substâncias voláteis, redução de acidez e da adstringência, acompanhadas de modificações da textura pelo amaciamento dos tecidos (CHITARRA e CHITARRA, 2005).

Dentro desse contexto, a avaliação das mudanças químicas que ocorrem nos estágios de pré e pós-colheita é de grande relevância, uma vez que permite entender os fenômenos que estão diretamente relacionados com a qualidade dos frutos e conseqüentemente interferem no seu valor nutricional, organoléptico e nutracêutico. No entanto, a variedade e a complexidade das modificações químicas envolvidas nesse processo tornam esse tipo de investigação um desafio.

1.3.1 CAQUI (*Diospyros kaki*)

Entre as principais fruteiras brasileiras encontra-se o caqui (*D. kaki*). De acordo com o Anuário Brasileiro de Fruticultura (2014), o cultivo desta espécie

ocupa a 17^a posição no *ranking* de produção, apresentando em 2013 um montante de 173 mil toneladas, o que correspondeu a um valor de 225 milhões de reais (IBGE, 2013).

Pertencente à família Ebenacea, o gênero *Diospyros* é o mais importante, em termos econômicos e numéricos, sendo composto por mais de 350 espécies. Entre elas se destaca a espécie “kaki” por conta do seu alto rendimento na produção de frutas (MALLAVADHANL et al., 1998). *D. kaki* é cultivado principalmente na China, Coréia, Japão, Brasil, Itália, Israel e Nova Zelândia (YAMAGISHI et al., 2005). No Brasil, as regiões Sul e Sudeste são as maiores produtoras, tendo como destaque na produção os estados de São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul (BRACKMANN, 2003).

A espécie *D. kaki* é caracterizada pela grande quantidade de cultivares. Estima-se que no Japão cerca de 1000 cultivares tem aparecido ao longo da história do seu cultivo (SUGIURA et al., 1988; YAMAGISHI et al., 2005). O termo “cultivar” (representado por “cv.”) é definido como uma variedade da espécie que foi escolhida, cultivada ou ainda melhorada. Comumente, os termos cultivar e variedade são confundidos, no entanto, o segundo é dito autêntico, ou seja, ocorre de forma natural (HAYNES, 2008). Genericamente, os diferentes cultivares de caqui podem ser divididos em dois grupos: adstringente e não adstringente. No Brasil, os cultivares mais cultivados são ‘Fuyu’, ‘Giombo’, ‘Kakimel’, ‘Kioto’ e ‘Rama-forte’ por apresentarem boa adaptação e produtividade (BIASI, 2009).

Além da importância econômica, o caqui tem sido apresentado como uma das frutas de maior atividade biológica (DAOOD et al., 1992; VEBERIC et al., 2010). Segundo Luo e Wang (2008) e Veberic et al. (2010) no passado, o caqui era utilizado para fins medicinais no tratamento de hipertensão, paralisia, tosses, queimaduras e hemorragias. Kim et al. (2009) relatou que as folhas e os frutos do caqui têm sido empregados na medicina tradicional coreana para tratar apoplexia, arteriosclerose, tosse e diarreia.

Entre os estudos de bioatividade dos frutos de caqui tem sido relatado efeitos relacionados à atividade antioxidante (GIORDANI et al., 2011), melhora no metabolismo lipídico (GORINSTEIN et al., 2000; PARK et al., 2008), atividade citotóxica (KAWASE et al., 2003), potencial agente antidiabético (LEE et al., 2007), induz a redução da pressão arterial e agregação de plaquetas,

exercendo um efeito benéfico sobre doenças coronárias (SANTOS-BUELGA e SCALBERT, 2000).

A chave da atividade biológica, bem como, das propriedades nutricionais e organolépticas dos alimentos se encontra na composição química. Por exemplo, a sensação de doçura e aroma em frutas está diretamente relacionada à proporção açúcares/ácidos orgânicos e teor de açúcar individual (DAOOD et al., 1992). Juntamente com os carotenoides, estes compostos podem ser utilizados como índice de qualidade da fruta (COLARIC et al., 2005).

Giordani et al. publicaram em 2011 uma revisão mostrando os principais metabólitos primários e secundários encontrados no caqui, bem como as metodologias empregadas na investigação da composição química da fruta. Na sua maioria, esses métodos são antigos e imprecisos, o que acaba gerando um número significativo de artefatos nos resultados. Esse fator juntamente com a falta de um protocolo que define o real estágio de maturação do fruto no momento da análise tornou impossível a comparação da composição química entre os diferentes cultivares. Ainda hoje, sabe-se pouco sobre a composição química do caqui e com poucas oportunidades de comparação entre os resultados encontrados por pesquisadores em países distintos.

As diferentes partes do caquizeiro (frutos, folhas, caule e raiz) contêm uma variedade de compostos como: carboidratos, ácidos orgânicos, vitaminas, taninos, polifenóis, fibras, carotenoides, terpenoides, esteroides, naftoquinonas e lipídeos (ZHOU et al., 2011; LEE e LEE, 2008; VEBERIC et al., 2010; DAOOD et al., 1992; HITAKA et al., 2013; EBERT e GROSS, 1985; GONDO et al., 1999). Boa parte desses compostos desenvolve um papel importante no sabor, na cor, bem como no valor nutritivo e farmacológico do fruto (ZHOU et al., 2011).

Para que a produção de caqui continue crescendo (e consequentemente os valores de exportação) é necessário o desenvolvimento de estudos que contemplem desde o aprimoramento das tecnologias pré e pós-colheita até metodologias mais eficazes para a avaliação da composição química do fruto.

A produção e a comercialização de caqui enfrentam problemas como, por exemplo, pouca informação sobre manejo (BUESA et al., 2013), transporte (LEE et al., 2005), estocagem (SOUZA et al., 2011; BIBI et al., 2007), curto tempo de prateleira (PALOU et al., 2013; HARIMA et al., 2003; LUO, 2007), grande número de cultivares, necessidade de tratamentos para a remoção de adstringência, assim como o efeito desse na qualidade dos frutos (PLAZA et al., 2012; GROSS et al., 1984).

Pang et al. (2007) consideram o amolecimento do fruto como o maior dos problemas enfrentados pelo caqui no processo de comercialização. Após o cultivo, este precisa ser consumido em um curto período devido à alta perecibilidade. Já em câmaras frias, sob refrigeração, o fruto apresenta potencial de conservação de 15 a 30 dias, o que pode ser considerado um período curto (HIDALGO et al., 2012). Além disso, devido à grande quantidade de cultivares de caqui do tipo adstringente boa parte da produção passa por um processo de remoção dos taninos (destanização) antes da comercialização. Embora esse processo resulte na melhora da qualidade sensorial do fruto, há uma diminuição no seu tempo de prateleira (PLAZA et al., 2012).

Taninos são metabólitos secundários de plantas superiores. A classificação sistemática dessas substâncias é uma tarefa árdua devido à sua diversidade estrutural, no entanto, a mesma pode ser descrita em quatro grupos principais (Figura 2):

- (1) – Galotaninos: são aqueles taninos em que a unidade galoil ou seus derivados meta-depsídeos (*meta-depsidic*) estão ligados a unidades de triterpenoides, poliol ou catequina;
- (2) – Elagitaninos: são aqueles em que, pelo menos, duas unidades galoil estão acopladas entre si pela ligação C-C, e não contém uma unidade de catequina ligada glicosidicamente;
- (3) – Taninos complexos: são taninos em que uma unidade de catequina está ligada a uma unidade de galotanino ou elagitanino glicosidicamente;
- (4) – Taninos condensados: são proantocianidinas oligoméricas ou poliméricas formadas por ligação de C-4 da catequina com C-8 ou C-6 da unidade monomérica seguinte.

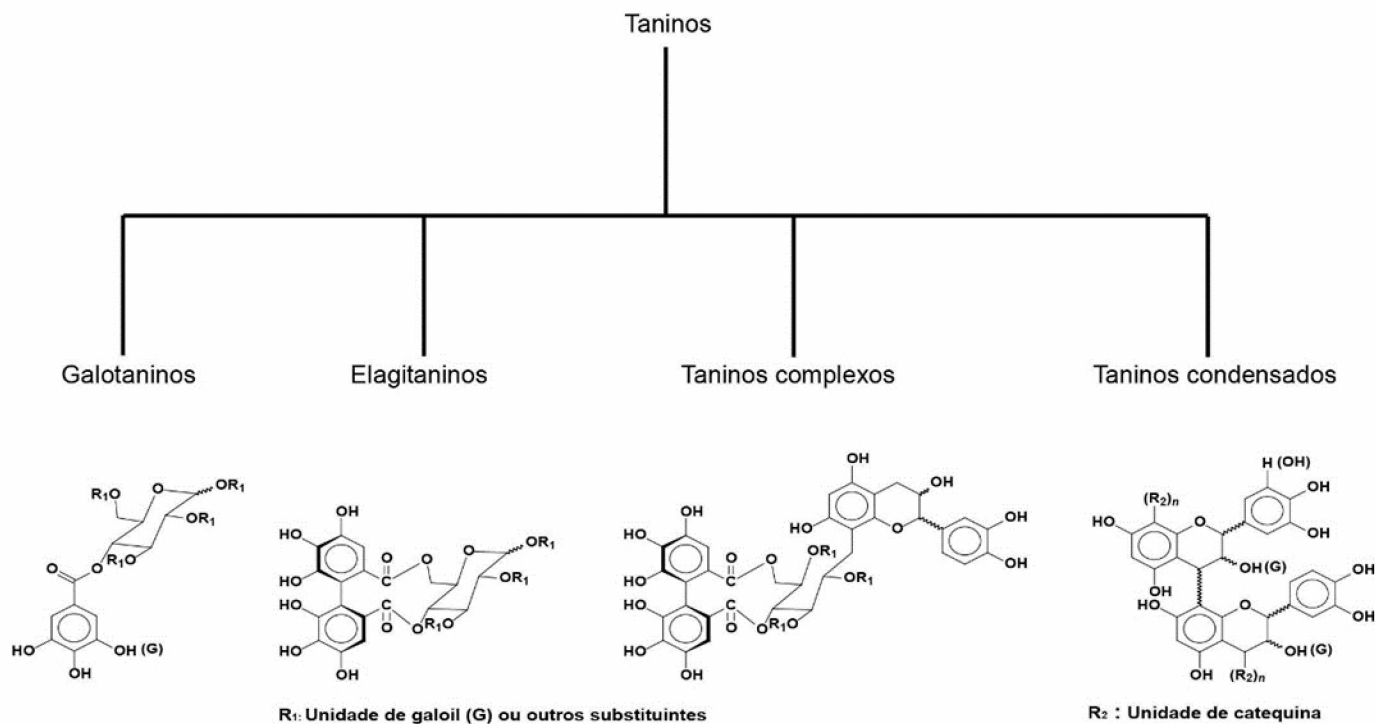


Figura 2. Classificação dos taninos. Fonte: adaptado de KHANBABAEE e VAN REE (2001).

A observação que muitos taninos podem ser hidrolisados em seus componentes - por exemplo, através de tratamento utilizando água quente - conduziu para a classificação de tais taninos como taninos hidrolisáveis que inclui ambos os galotaninos quanto os elagitaninos. As proantocianidinas oligoméricas ou poliméricas (taninos condensados), por sua vez, são classificados como não hidrolisáveis.

Segundo Ittah (1993), o caqui é rico em ambos taninos hidrolisáveis e não hidrolisáveis. No entanto, os taninos solúveis de baixo peso molecular são considerados os responsáveis pela adstringência em frutas, uma vez que os taninos se ligam fortemente a proteínas. Na boca, eles precipitam as proteínas presentes na saliva - majoritariamente amilase - e se ligam aos receptores, causando a sensação de secura característica dos alimentos adstringentes (ITTAH 1993; KAZUHIRO e KLUGE, 2009). Basicamente, para o caqui, a remoção da adstringência é realizada através da exposição da fruta a condições anaeróbicas ou a produtos de respiração anaeróbica. Sob condições anaeróbicas há a produção de acetaldeído que por sua vez reage com os

taninos solúveis formando compostos insolúveis não adstringentes (PLAZA et al., 2012; SALVADOR et al., 2007; SALVADOR et al., 2008). Entre as técnicas utilizadas para a destanização destaca-se o etanol a vapor, alta concentração de N_2 e, por fim, a metodologia mais aceita pela indústria: a alta concentração de CO_2 (SALVADOR et al., 2008).

Recentemente, Besada et al. (2013) utilizaram a abordagem metabolômica para avaliar o efeito da remoção da adstringência no perfil volátil (CG-MS) de 12 cultivares adstringentes. Ainda nesse contexto, Kondo et al. (2004) e Del Bubba et al. (2009) demonstraram os efeitos da destanização no valor nutricional e na atividade antioxidante do fruto.

Mediante ao exposto, destaca-se a necessidade de se ter mais conhecimento básico sobre a composição química de caqui nos diferentes estágios do desenvolvimento do fruto, que por sua vez, pode auxiliar na elaboração de novas estratégias para contornar as dificuldades enfrentadas no cultivo. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho é otimizar uma metodologia baseada na RMN HR-MAS para a avaliação metabolômica dos cultivares 'Fuyu' e 'Giombo', classificadas como não adstringente e adstringente - respectivamente, durante o processo completo de desenvolvimento do fruto. Além do suporte para a elaboração de novas metodologias para o acompanhamento de diferentes processos de pré e pós-colheita, o conhecimento da química do caqui pode agregar valor à fruteira uma vez que o amadurecimento das frutas influencia diretamente nas propriedades organolépticas e no valor nutritivo das mesmas, que conseqüentemente impacta no consumo, e por fim, na economia.

De acordo com a literatura, esse é o primeiro estudo da composição química de diferentes cultivares de caqui feito mensalmente. Em 1985, Ebert e Gross investigaram somente o teor de carotenoides na casca do fruto de *D. kaki* durante um ciclo completo de desenvolvimento do cultivar 'Triumph' (EBERT e GROSS, 1985). Além disso, até então, dentro do conjunto de ferramentas da RMN, somente a RMI foi utilizada para a avaliação qualitativa e quantitativa do fruto de *D. kaki* cv 'Fuyu' durante pós-colheita e maturação (CLARK e MACFALL, 1996; CLARK e MACFALL, 2003). Uma vez que o emprego da RMN HR-MAS permite a análise direta da composição química da amostra, os artefatos provenientes das metodologias até então empregadas

nesse contexto podem ser evitados (GIORDANI et al., 2011). Por fim, alguns pesquisadores também têm focado na investigação dos metabólitos secundários e primários em diferentes cultivares (ZHOU et al., 2011; VEBERIC et al., 2010; SUZUKI et al., 2005).

OBJETIVO

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Investigar a composição química de dois cultivares de caqui ('Fuyu' e 'Giombo') durante os diferentes estágios de desenvolvimento através da técnica de RMN HR-MAS aliada a quimiometria sob a ótica da abordagem metabolômica.

2.2 ESPECÍFICOS

✓ Desenvolver método analítico utilizando a técnica de RMN HR-MAS que permita o acompanhamento das modificações químicas ocorridas no caqui;

✓ Adquirir os espectros de RMN HR-MAS de ^1H das amostras de caqui ('Giombo' e 'Fuyu') coletadas durante todo o processo de desenvolvimento;

✓ Discriminar as amostras em grupos de acordo com os estágios de desenvolvimento através da técnica de PCA;

✓ Identificar os possíveis sinais de ^1H responsáveis pela diferenciação dos grupos através da análise de PCA, bem como, de experimentos de RMN bidimensionais (HSQC, HMBC, COSY e TOCSY);

✓ Avaliar as diferenças nos perfis metabólicos entre o caqui 'Giombo' e o 'Fuyu'.

PARTE EXPERIMENTAL

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras de caqui foram fornecidas pela empresa Boutin Fruticultura localizada na cidade de Porto Amazonas-PR. As coletas foram realizadas durante o ano de 2012-2013 cobrindo todo o processo de desenvolvimento. A mesma teve seu início no mês de setembro e finalizou em março para ambos cultivares ('Fuyu' e 'Giombo'). Os frutos foram coletados na altura mediana do caquizeiro cobrindo, randomicamente, toda a extensão do plantio. As coletas foram realizadas ao final do mês, preferencialmente no dia 29. Após a coleta as amostras foram mantidas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o dia da análise. As amostras são mencionadas no texto utilizando a letra F e G para designar 'Fuyu' e 'Giombo', respectivamente, e em seguida a inicial de cada mês. Por exemplo, a sigla FD significa amostras da cultivar 'Fuyu' no mês de dezembro.

3.2 OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA PARA AQUISIÇÃO DE ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ^1H

A otimização da metodologia para o estudo metabolômico de caqui compreendeu da avaliação dos parâmetros de aquisição, preparo e estabilidade da amostra. Foram utilizados frutos que representam o início e o final do processo de maturação, setembro e março respectivamente.

3.2.1 Parâmetros de aquisição

Três sequências de pulsos foram utilizadas nessa etapa: *zgpr*, *noesypr1d* e *cpmgpr1d*. Para a avaliação dos resultados levou-se em consideração o perfil espectral, a resolução dos sinais e a qualidade da saturação (**Figura 3**). Após selecionar a sequência de pulsos, avaliou-se o número de promediações variando entre 32 a 1K.

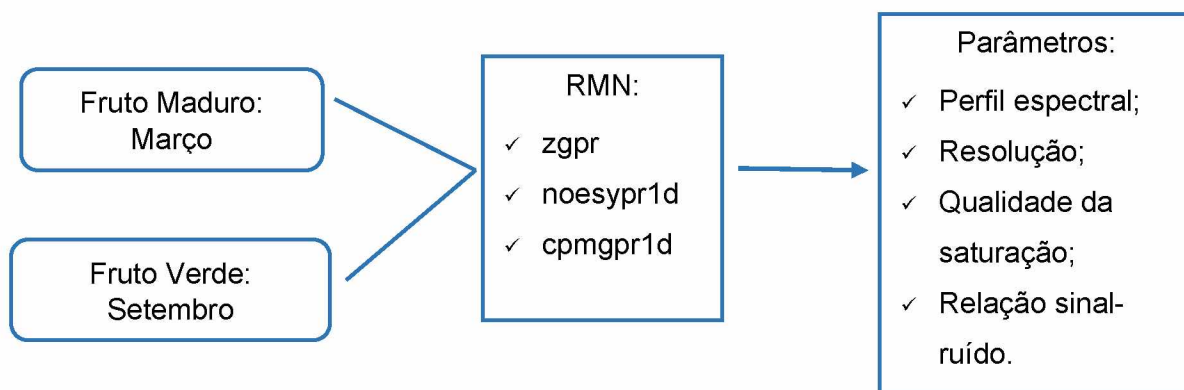


Figura 3. Esquema da estratégia experimental para a escolha da sequência de pulso adequada.

3.2.2 Preparo da amostra

A repetibilidade intra e inter-dias do preparo da amostra foi avaliada ao empacotar o rotor por cinco vezes em três dias diferentes com intervalo de 24 h (**Figura 4**). Também foi avaliada a representatividade da amostra usando diferentes partes de um único caqui (**Figura 5**). Em ambos os experimentos os espectros de hidrogênio foram comparados entre si.

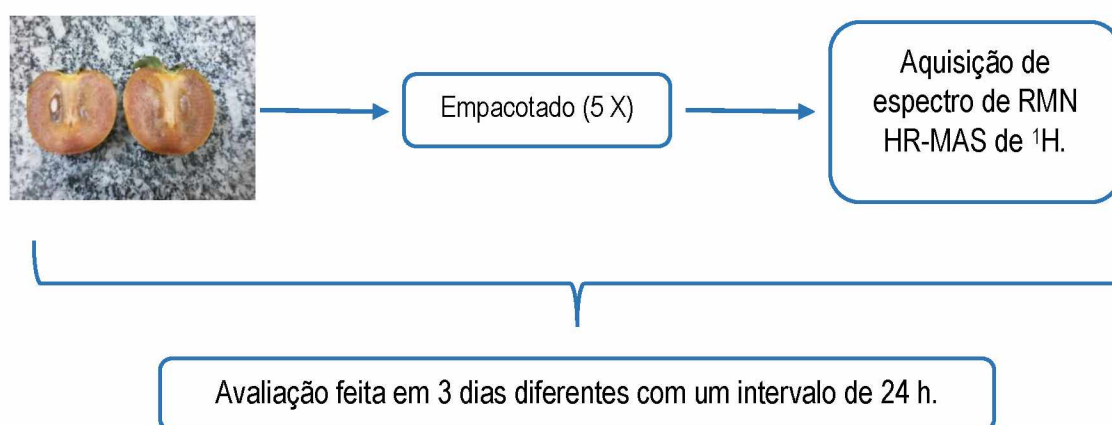


Figura 4. Esquema da avaliação da repetibilidade inter e intra dias do preparo de amostra.

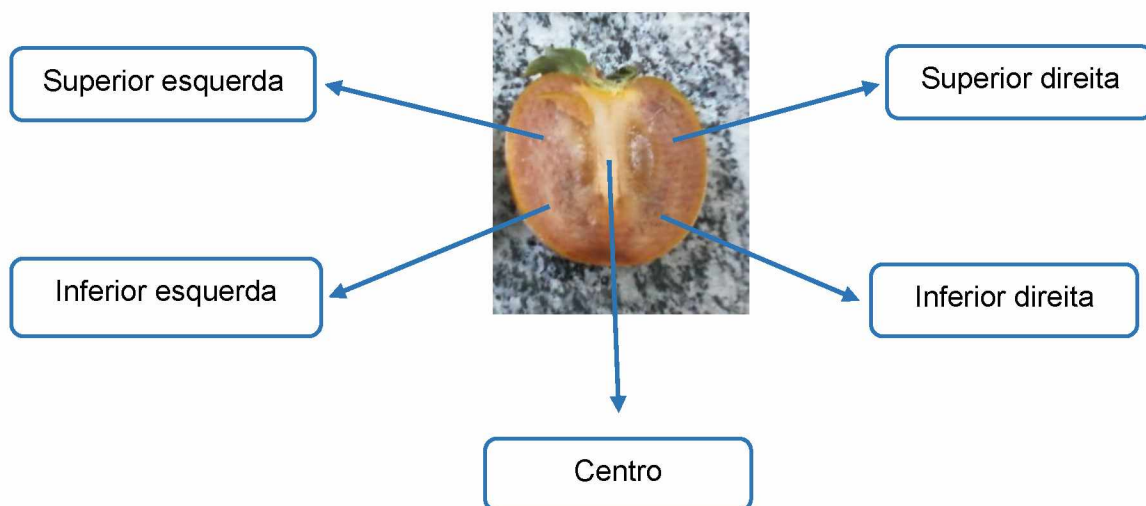


Figura 5. Esquema para a avaliação da representatividade da amostra.

3.2.3 Teste de estabilidade da amostra

A estabilidade da amostra foi averiguada por meio da: (1) aquisição de sucessivos espectros de hidrogênio durante 12 h com o rotor permanecendo dentro do magneto (20°C), (2) obtenção de espectros após a exposição do fruto as condições ambientes (23°C) com 2, 4, 6, 8, e 24 h depois da retirada da amostra do freezer e (3) aquisição de espectros de ^1H variando a velocidade de giro do rotor (**Figura 6**). Para a avaliação dos resultados, os espectros de RMN de ^1H adquiridos no tempo zero de cada experimento foram comparados com as demais medidas.

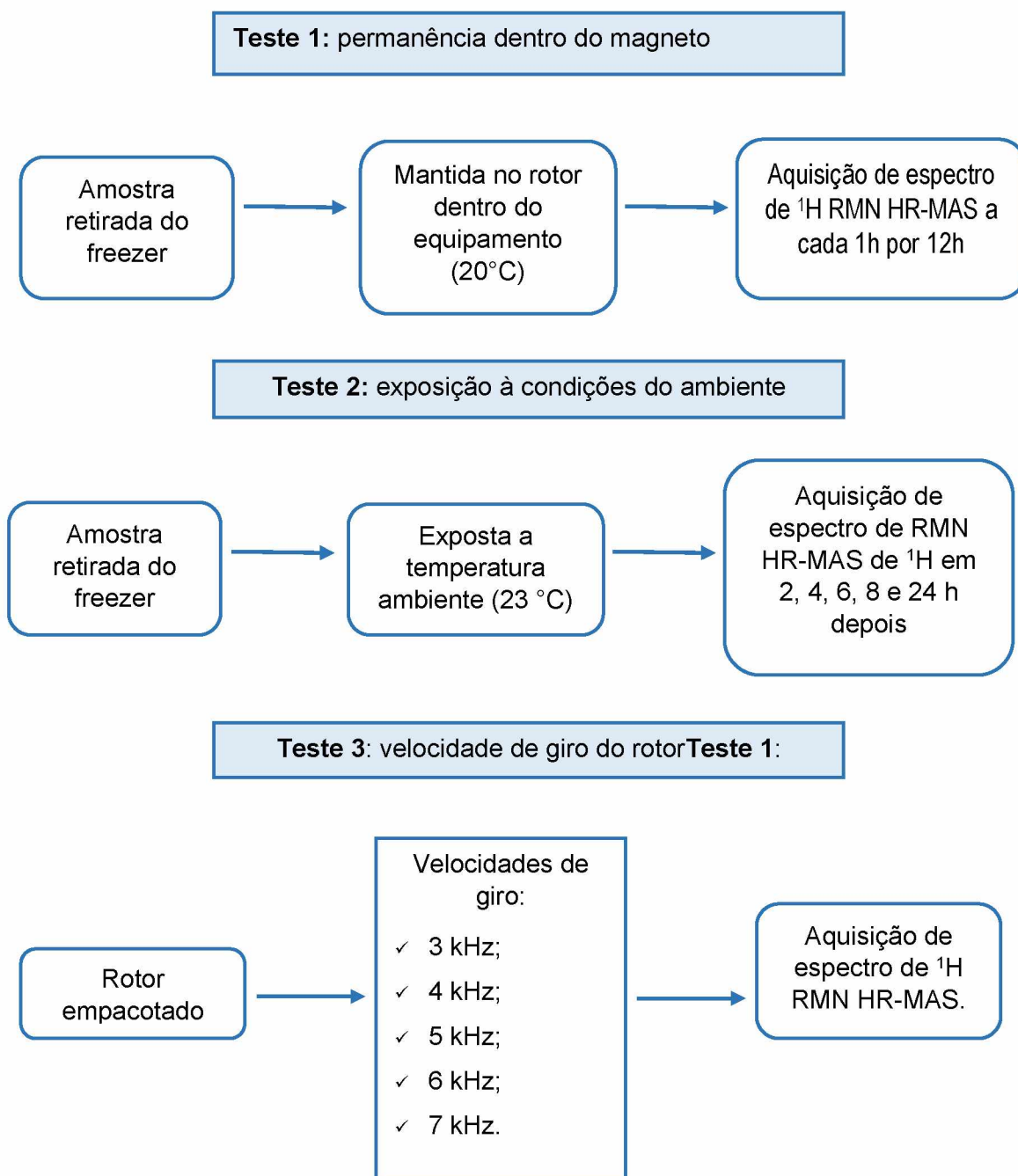


Figura 6. Esquema para a avaliação da estabilidade da amostra.

3.3 ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ^1H

Para a aquisição dos espectros de RMN HR-MAS, a fruta congelada foi dividida ao meio, retirou-se uma fatia de uma das bandas e a pulverizou com auxílio de N_2 líquido. Doze miligramas da polpa foi empacotada em um rotor de zircônio de 50 μL , seguido pela adição de uma solução tampão fosfato D_2O (pH=6,4; contendo 0,5 % de trimetilsililpropionato de sódio -TMSP- d_4). Fez-se necessário o uso de solução tampão, uma vez que a mudança no pH é uma das características do processo de maturação das frutas e que existe uma dependência bem conhecida entre os deslocamentos químicos e a variação do pH para compostos que possuem estado de ionização variável na faixa estudada (DEL CAMPO et al., 2006; GIL et al., 2000). Baseado na literatura optou-se pelo uso solução tampão de fosfato com pH 6,4 que se mostrou eficiente para o trabalho com mínima variação nos deslocamentos químicos para amostras em diferentes estágios de maturação (SHINTU e CALDARELLI, 2005; SHINTU e CALDARELLI, 2006 e SHINTU et al., 2007).

Os espectros de RMN HR-MAS de ^1H foram adquiridos em um espectrômetro de RMN Bruker, modelo AVANCE III, operando a 9,4 Tesla, observando o núcleo de hidrogênio a 400,13 MHz, equipado com uma sonda de alta resolução com giro no ângulo mágico (4 mm MAS $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}/\text{D}$).

As melhores condições alcançadas para a aquisição dos espectros de RMN HR-MAS de hidrogênio consistiu em: sequência de pulsos *noesypr1d* (com *relaxation delay* ($d1$) de 1,0 s e com o *mixing time* ($d8$) de 100 ms), 64 K de número de pontos (TD), 512 transientes (NS) e janela espectral de 5999,204 Hz, tempo de aquisição igual (AQ) a 5,4 s; temperatura 293 K.

Durante a aquisição as amostras foram giradas no ângulo mágico ($\theta = 54,74^\circ$) a uma velocidade de 5 KHz. O ângulo mágico foi ajustado diariamente e o *shimming* foi otimizado para cada amostra. Os espectros foram processados no programa TOPSPIN com 64K pontos aplicando-se uma multiplicação exponencial dos FIDs por um fator de 0,3 Hz. Os deslocamentos químicos foram calibrados em relação ao sinal do TMSP- d_4 (δ 0,0). O tempo experimental total foi de 60 min para cada amostra incluindo o tempo utilizado para o empacotamento do rotor.

Para a confirmação da atribuição dos sinais nos espectros de ^1H , experimentos de correlação direta, bem como a longa distância (HSQC e HMBC), foram adquiridos em um espectrômetro Bruker Avance III 600, operando a 14,1 Tesla, observando o núcleo de ^1H a 600 MHz e o núcleo de ^{13}C a 150 MHz, respectivamente. Uma sonda quadrinuclear ($^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}/^{31}\text{P}$) de 5 mm com detecção inversa e gradiente no eixo Z foi utilizada na aquisição dos dados. Os deslocamentos químicos foram reportados em ppm usando o sinal do TMS- d_4 como referência interna. Amostras de caqui de ambos cultivares representando o início, meio e fim do desenvolvimento foram extraídas diretamente em D_2O e então adquiriu-se os espectros 1D e 2D.

3.4 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)

Para análise de componentes principais (PCA) dos dados utilizou-se o programa AMIX[®] (versão 3.9.12, Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany). A região do espectro utilizada foi de δ 0,50-9,50 divididas em intervalos (denominados *buckets*) de δ 0,02. As áreas referentes aos sinais residuais da água (δ 4,5-5,2) e da acetona (δ 2,20-2,26) foram excluídas gerando uma matriz de dados composta de 70 amostras (linhas) e 446 variáveis (colunas) para cada cultivar.

A área de cada *bucket* foi integrada usando o modo de integração especial (*special integration mode*). Em seguida, os espectros foram escalados com relação a intensidade total (*scaled to total intensity*), ou seja, a intensidade do sinal medido para cada *bucket* foi dividida pela integral de todos os sinais do espectro. Dessa forma, as diferenças espectrais oriundas da variação da quantidade da amostra empregada pode ser minimizada.

Por outro lado, foi aplicado o auto escalamento (*scaled to unit variance*) nas colunas, o que significa que todas as variáveis (*buckets*) passaram a ter um peso similar na análise estatística. Esse tipo de pré-processamento é necessário para amostras onde a concentração dos compostos é bastante diferente na amostra. Foram gerados gráficos de escores para comparar as mudanças químicas ao longo do processo de desenvolvimento. A identificação dos metabólitos responsáveis pela separação entre os grupos foi realizada

através dos gráficos de influências (*loadings*), que mostram o peso relativo de cada *bucket* para as tendências observadas no gráfico de escores.

3.5 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

As áreas dos sinais responsáveis pela discriminação na análise de PCA foram determinadas e submetidas à análise de variância ANOVA. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey com significância de 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA PARA A AQUISIÇÃO DE ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ^1H

O estudo metabolômico requer um cuidado especial na aquisição dos dados. A metodologia deve ser otimizada para que os resultados alcançados sejam decorrentes apenas da influência do processo que se investiga, eliminando ao máximo as interferências referentes ao preparo de amostra ou problemas de ordem instrumental.

A maior parte dos trabalhos encontrados na literatura, na área de alimentos, não discute sobre os cuidados que devem ser observados ao desenvolver uma metodologia baseada em HR-MAS. Nesse contexto, algumas estratégias foram descritas no presente trabalho. Certamente, outras abordagens devem ser adicionadas dependendo do sistema que está sendo investigado.

A etapa de otimização consistiu na avaliação dos parâmetros de aquisição (sequência de pulsos e número de promediações), preparo de amostra (representatividade da amostra e reprodutibilidade intra e inter-dias) e estabilidade da amostra (exposição do fruto ao ambiente, permanência da amostra dentro do equipamento e influência da velocidade de giro do rotor).

4.1.1 Parâmetros de aquisição

A sequência de pulsos deve fornecer o máximo de informação da amostra e eliminar os sinais inconvenientes como, por exemplo, o sinal da água, que comumente aparece nos espectros de RMN, referente à troca química que ocorre entre D_2O e H_2O (SACCO et al., 1998; LIÃO et al., 2010 e MAZZEI e PICOLO, 2012). Foram testadas três sequências de pulsos para a saturação do sinal $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$: *zgpr*, *cpmgpr1d* e *noesypr1d*.

Durante essa etapa, caquis do início e fim do processo de maturação foram selecionados, representando as diferentes durezas dos frutos. Isso se faz necessário devido à dependência entre a resposta da técnica de HR-MAS e a mobilidade das moléculas na matriz (CHEN e SINGER, 2007). O maior teor de água encontrado em frutos no estágio final do desenvolvimento provoca o aumento

do grau de mobilidade das moléculas, que por sua vez, pode facilitar a saturação do sinal residual da água bem como no ajuste do *shimming*.

As **Figuras 7 e 8** mostram os espectros do fruto verde e maduro para as três sequências de pulso. A avaliação do desempenho das sequências de pulsos foi baseada no perfil espectral, resolução dos sinais e qualidade da saturação.

Ao observar os resultados para o fruto maduro notou-se que as três sequências de pulsos testadas foram satisfatórias, com destaque para a melhor relação sinal/ruído ao usar a *zgpr*. Essa sequência é a mais indicada pela BRUKER para estudos metabolômicos, uma vez que a saturação do sinal residual da água não interfere nos demais sinais. No entanto, a *zgpr* não se mostrou eficaz na saturação do sinal para os frutos verdes (**Figura 8**), neste caso, somente a *noesypr1d* se mostrou eficiente. Mediante aos bons resultados obtidos com essa sequência para os frutos maduros, a *noesypr1d* foi selecionada para o presente trabalho. A *noesypr1d* vem sendo utilizada em estudos metabolômicos (VERMATHEN et al., 2011; RITOTA et al., 2012a; RITOTA et al., 2012b).

A sequência de pulso *noesypr1d* é compreendida por: RD-90°-t₁-90°-t_m-90°-FID, onde RD representa um tempo de recuperação (d1), t₁ representa o primeiro incremento de um experimento NOESY e t_m (d8) é o tempo de mistura na sequência NOESY. Para avaliar os valores mais adequados desses parâmetros nas análises, foram feitos experimentos onde d1 assumiu valores de 1-4 s enquanto d8 variou em 50-150 ms. Ao alterar os valores de d1 e d8 não foram observadas diferenças no perfil espectral, optou-se por utilizar 1 s para d1 e 100 ms para d8.

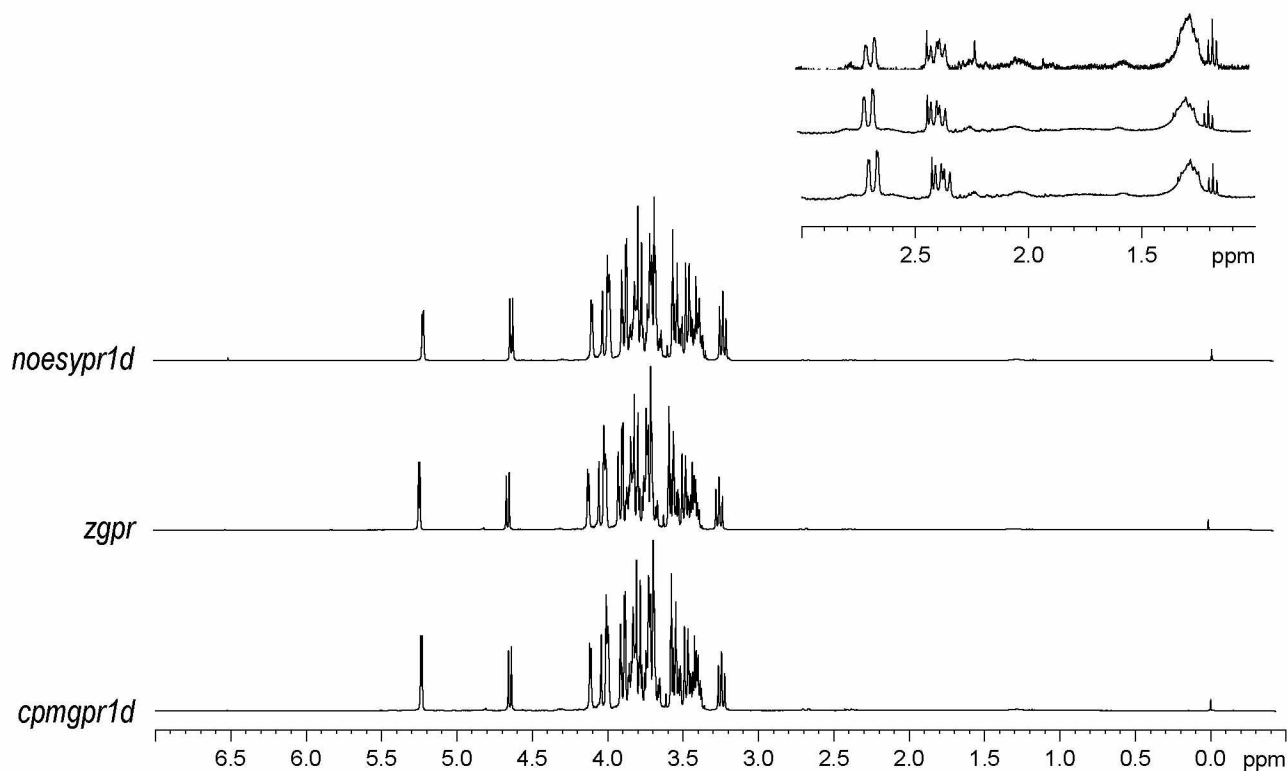


Figura 7. Espectro de RMN HR-MAS de ^1H do fruto de caqui maduro utilizando as sequências de pulso *zgpr*, *noesypr1d* e *cpmgpr1d*. Acima a expansão de δ 1 a 3 mostrando o perfil para a parte do espectro com menor intensidade.

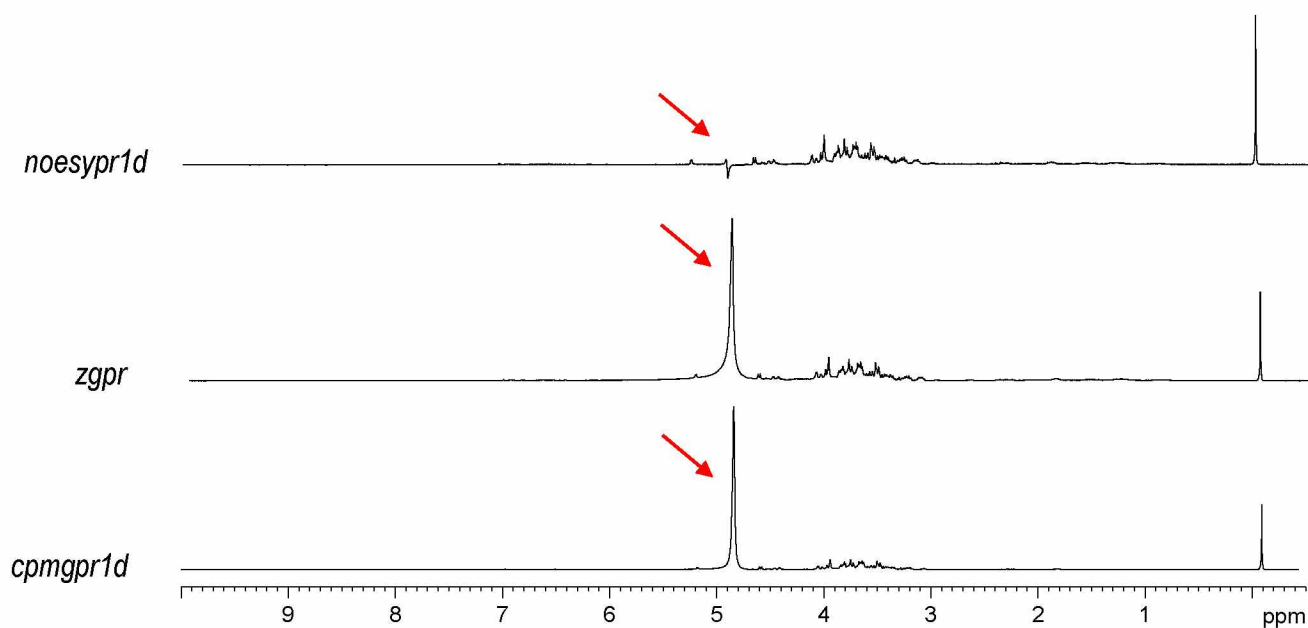


Figura 8. Espectro de RMN HR-MAS de ^1H do fruto de caqui verde utilizando diferentes sequências de pulsos. As setas mostram a qualidade da saturação do sinal da água.

Por fim, foi avaliado o número de promediações variando de 32 a 1K. A **Figura 9** mostra a expansão da região com sinais de menor intensidade de δ 1-3 para todas as condições analisadas. Como pôde ser observado, a intensidade do sinal adquirido com 512 promediações é suficiente para a atribuição dos sinais e semelhante, em termos de perfil espectral, àquela observada empregando 1K.

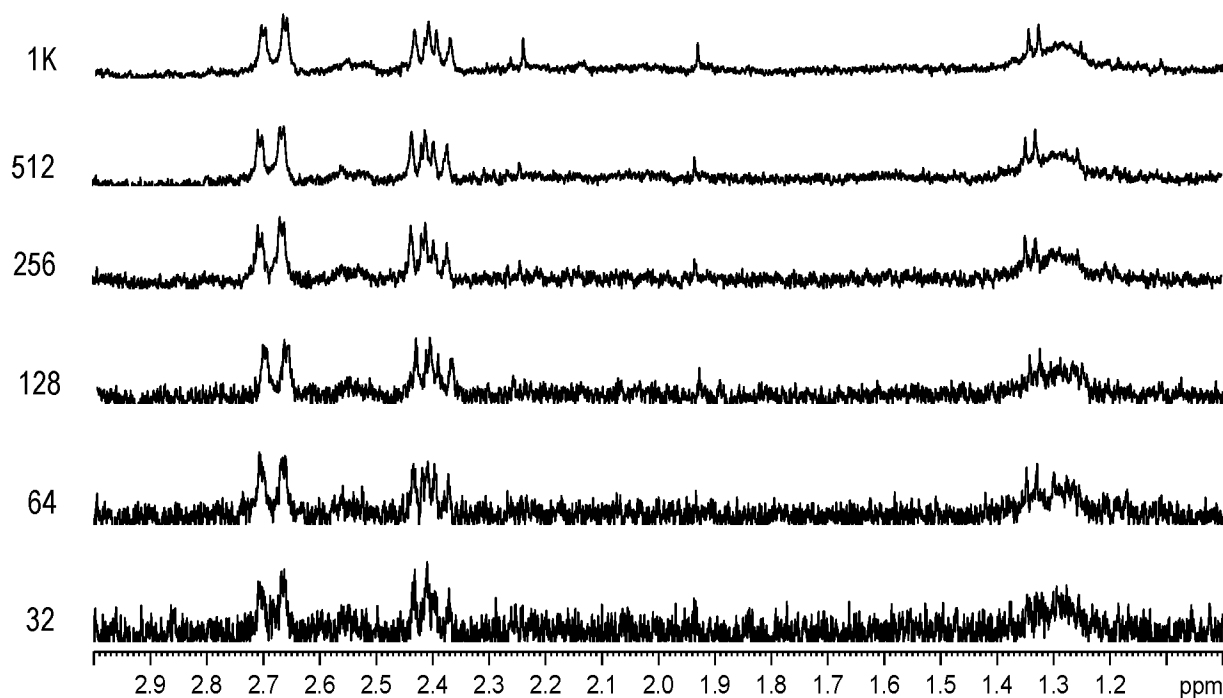


Figura 9. Espectros de RMN HR-MAS de ^1H do fruto de caqui verde utilizando a sequência de pulsos *noesypr1d* ($d_1 = 1$ s e $d_8 = 100$ ms) com diferentes números de promediações. Nota-se a boa relação sinal/ruído quando empregado 512 promediações se assemelhando, em termos de perfil, a 1K de promediações

4.1.2 Preparo de amostra

Em análises qualitativas, o preparo de amostra para HR-MAS é bastante simples, consistindo da inserção do material em um rotor juntamente com gotas de um solvente deuterado. Contudo, para análises quantitativas ou envolvendo tratamento quimiométrico, o preparo de amostra pode ser desafiante devido as dificuldades na reprodutibilidade do empacotamento da amostra no rotor (SANTOS et al., 2015).

Para investigação metabólica a mesma qualidade espectral deve ser mantida em todos os espectros, e portanto, o ajuste do *shimming* é relevante. De acordo com Piotto et al. (2005) teoricamente o *shimming* adequado em HR-MAS independe da amostra e do solvente utilizado, desde que o rotor esteja sempre na mesma posição dentro da sonda e que o volume detectado seja sempre o mesmo.

Dessa forma, com o objetivo de avaliar a reprodutibilidade do preparo da amostra intra e inter-dias, um fruto foi escolhido aleatoriamente e empacotado cinco vezes em três dias diferentes, em seguida espectros de RMN HR-MAS de ^1H foram adquiridos. Baseado na inspeção visual, foi observado uma boa reprodutibilidade no preparo da amostra resultando em espectros com perfis similares. Além disso, a largura da meia-altura do sinal do TMS- d_4 foi constante em todos os espectros confirmando a qualidade dos *shimmings* alcançados.

Uma vez que a quantidade de amostra normalmente utilizada para análise de HR-MAS é pequena, aproximadamente 12 mg, o procedimento amostral deve ser realizado em regiões que representem a amostra como um todo. A heterogeneidade inerente as frutas, torna tal representatividade um desafio, que pode adicionar algumas dificuldades para as análises estatísticas. Delgado-Doni et al. (2003) mostraram que diferentes perfis espectrais podem ser obtidos ao analisar diferentes partes de um mesmo fruto.

Como sugerido por Valentini et al. (2011) espectros de cinco partes diferentes de caquis foram adquiridos. Um único fruto foi dividido em duas partes e uma porção da parte superior e inferior de cada banda, além de um pedaço do centro foi utilizada para empacotar o rotor. Como observado na **Figura 10** a comparação dos perfis espectrais revelou diferenças significativas,

principalmente quando o espectro da parte central do caqui foi comparada aos demais espectros adquiridos. Com o objetivo de aumentar a representatividade das amostras foi decidido dividir as frutas em duas partes e então uma fatia do lado direito foi pulverizada com o auxílio de nitrogênio líquido.

A **Figura 11** mostra os espectros de hidrogênio para os frutos verdes e maduros empregando a metodologia descrita no **Item 3.3** da parte experimental. A qualidade espectral é notada ao observar a eficiência da saturação do sinal da água (δ 4,8) e a qualidade do *shimming* (através o sinal do TMSP em δ 0,0). Esse tipo de avaliação é essencial quando se trabalha com amostras que apresentam diferentes propriedades físicas (por exemplo, dureza), uma vez que estes interferem na qualidade da análise multivariada (PÉREZ et al., 2010).

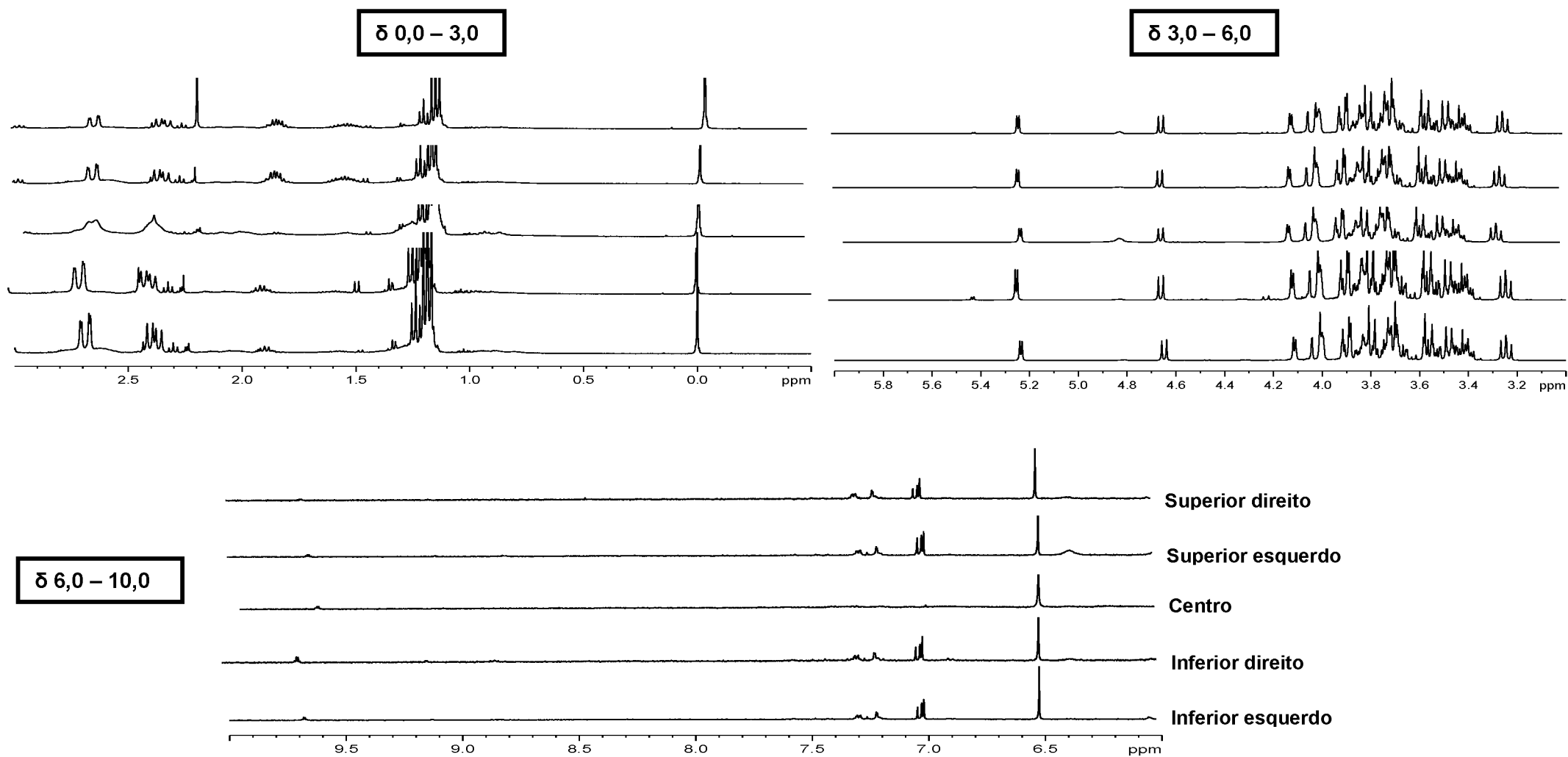


Figura 10: Espectros de RMN HR-MAS de ^1H de caqui adquiridos de diferentes partes de um único fruto. São mostradas as regiões ampliadas para cada conjunto de espectros.

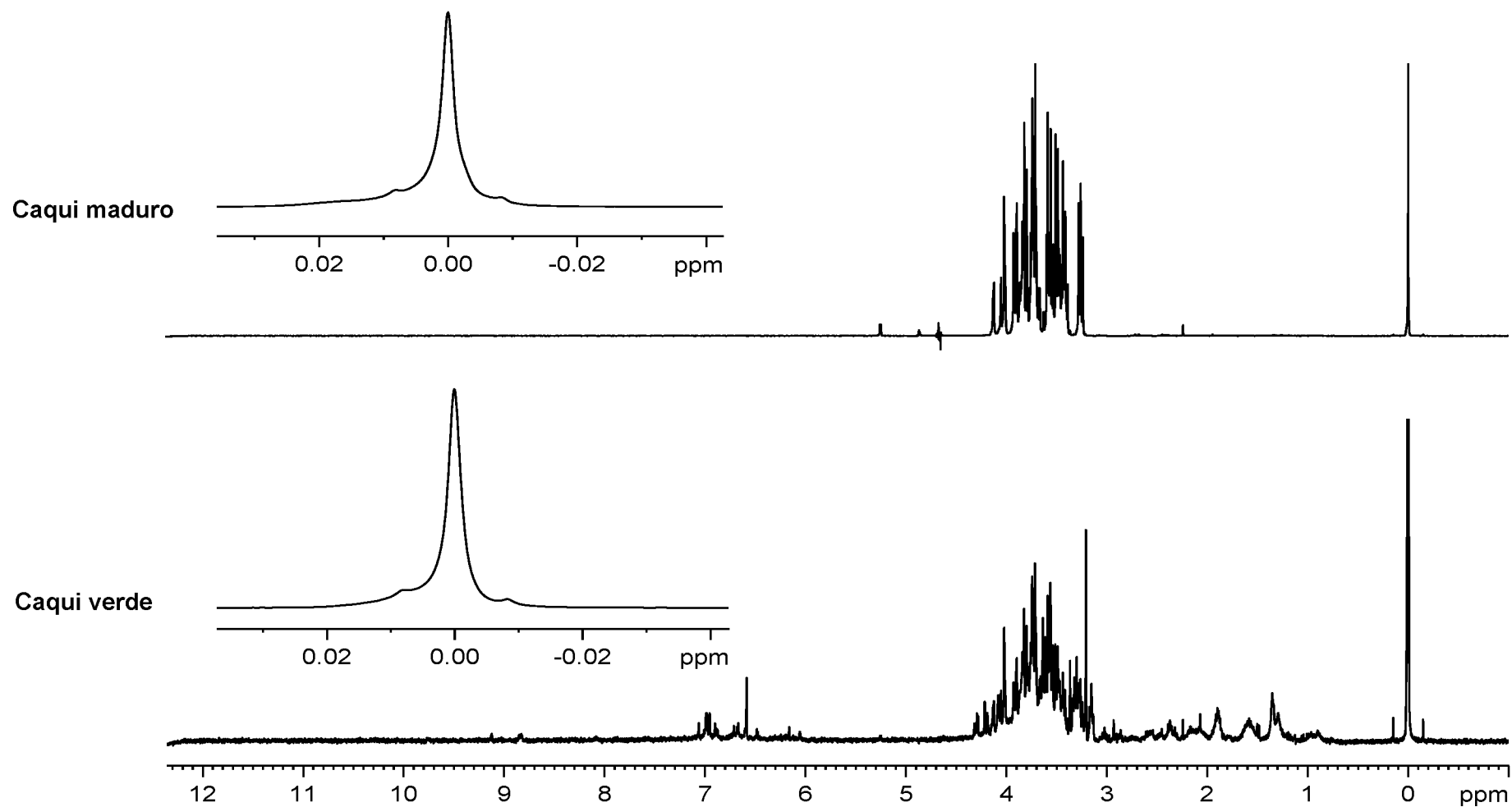


Figura 11. Espectros de RMN HR-MAS de ^1H de caqui (adquiridos conforme o item 3.3) com ampliação do sinal do TMS. Acima o fruto maduro e abaixo o fruto verde

4.1.3 Avaliação da estabilidade

A estabilidade da amostra foi averiguada por meio da: (1) aquisição de sucessivos espectros de hidrogênio durante 12 h com o rotor permanecendo dentro do magneto (20°C), (2) obtenção de espectros após a exposição do fruto as condições ambientes (23°C) com 2, 4, 6, 8, e 24 h depois da retirada da amostra do freezer e (3) aquisição de espectros de ^1H variando a velocidade de giro do rotor.

Através da inspeção visual dos espectros nenhuma mudança foi observada nos experimentos 1 e 2 (**Figura 6**). A investigação do efeito do giro do rotor na composição química é necessária uma vez que a rotação em alta velocidade pode provocar danos mecânicos e aquecimento da amostra. Matrizes alimentícias, na maioria dos casos, são consideradas resistentes a este tipo de estresse mecânico e apresentam compostos termolábeis em pequenas concentrações, sendo dificilmente detectadas por RMN.

Por outro lado, a avaliação dos espectros adquiridos no experimento 3 mostrou a intensificação do sinal em δ 6,52 associado ao ácido fumárico (**Figura 12**). Em estudos com suco de maçã, o aumento do teor do ácido fumárico foi justificado pela ação microbiológica, bem como, resultado de procedimentos envolvendo aquecimento. Baseado nesses resultados foi decidido retirar os frutos do freezer somente no momento da análise (KVASNICKA e VOLDRICH, 2000).

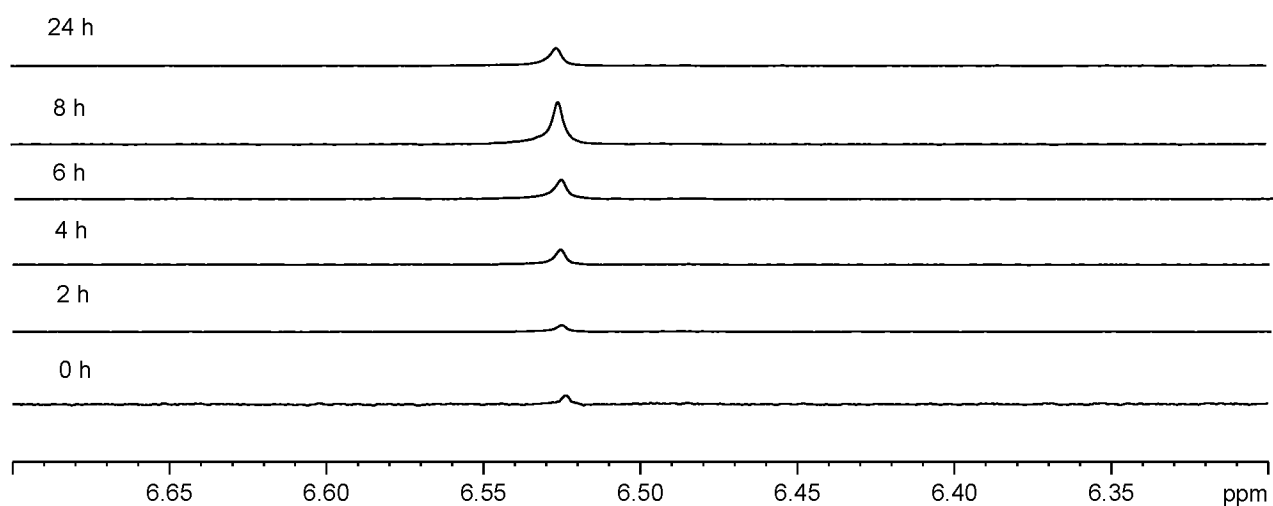


Figura 12. Espectros ampliados de RMN HR-MAS de ^1H de caqui adquiridos em diferentes tempos após a retirada do fruto do congelador e exposto ao ambiente.

4.2 PERFIL ESPECTRAL

Após a otimização da metodologia adquiriu-se os espectros de hidrogênio de 140 caquis, sendo 70 frutos para cada cultivar. Como mencionado anteriormente foi avaliada a maturação entre os meses de setembro a março. Para as análises, o fruto foi retirado do *freezer* aleatoriamente evitando a influência de tendências criadas por fatores instrumentais.

As **Figuras 13** e **14** mostram o perfil espectral dos cultivares de caqui durante os diferentes estágios de desenvolvimento. Como pôde ser observado, os espectros são dominados pelos sinais na região de δ 3,0-4,2 com alto grau de sobreposição dos sinais.

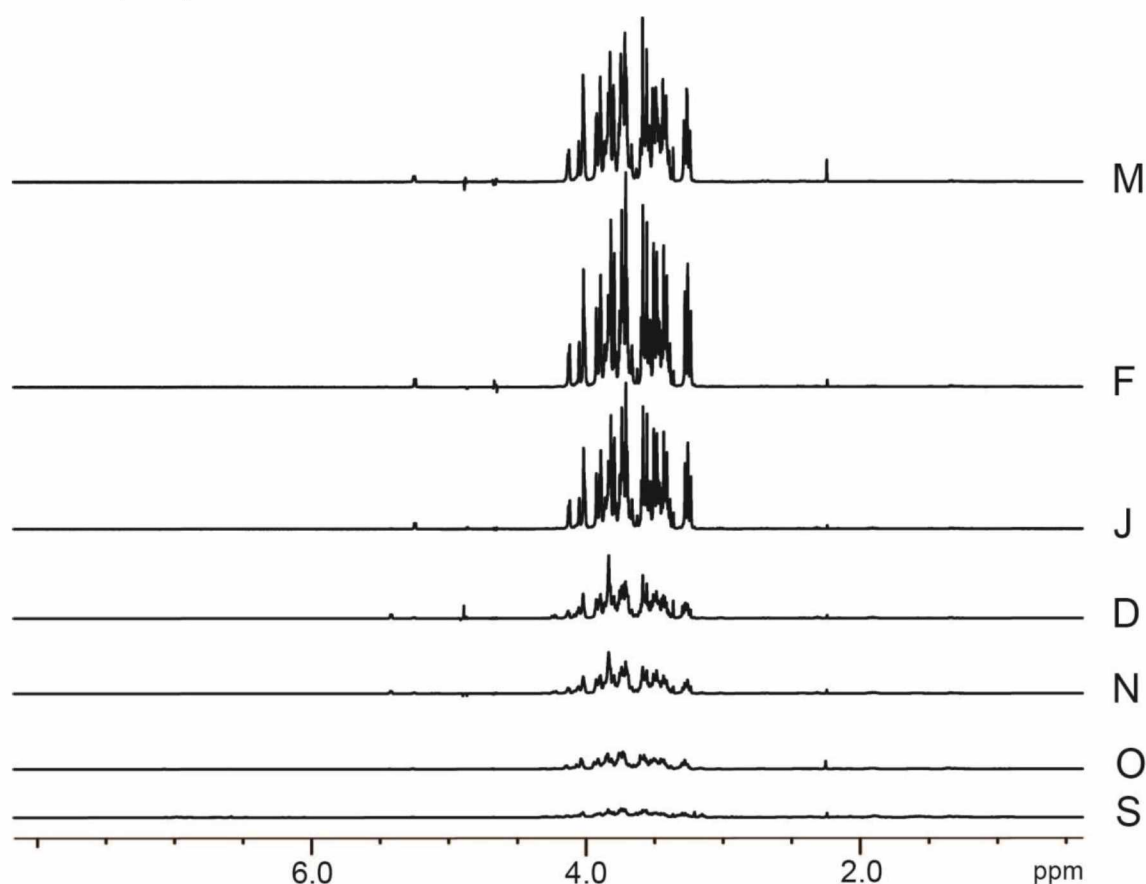


Figura 13. Espectros de RMN HR-MAS de ^1H de caqui 'Fuyu' durante os diferentes estágios de desenvolvimento. Destaca-se a importante influência dos carboidratos no processo. Cada mês é identificado por sua respectiva letra inicial: setembro (S), outubro (O), novembro (N), dezembro (D), janeiro (J), fevereiro (F) e março (M).

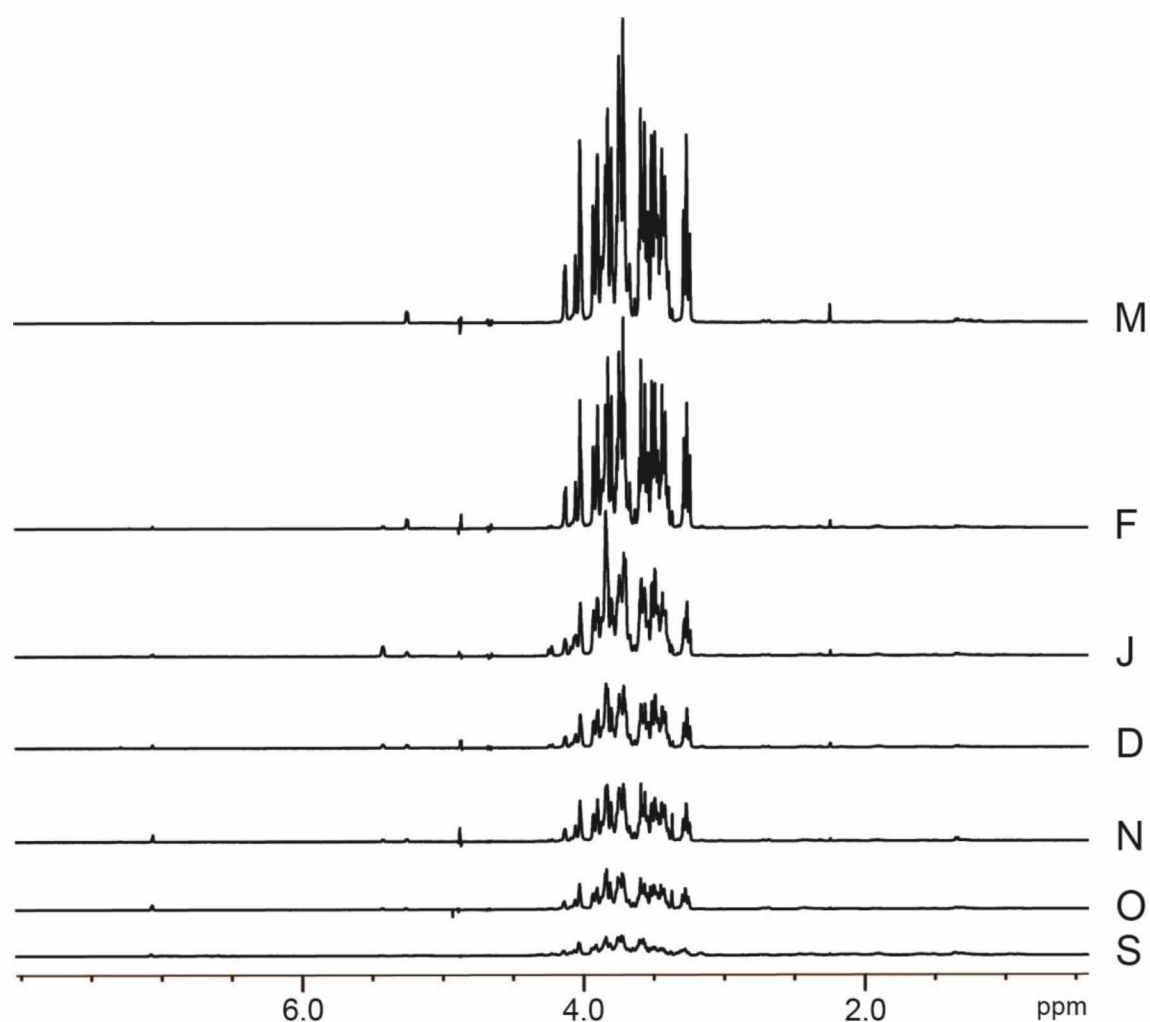


Figura 14: Espectros de RMN HR-MAS de ^1H de caqui 'Giombo' durante os diferentes estágios de desenvolvimento. Destaca-se a importante influência dos carboidratos no processo. Cada mês é identificado por sua respectiva letra inicial: setembro (S), outubro (O), novembro (N), dezembro (D), janeiro (J), fevereiro (F) e março (M).

Para melhor visualização e discussão dos resultados, os espectros foram divididos em três regiões: ácidos orgânicos e aminoácidos (δ 0,5-3,0), carboidratos (δ 3,0-6,0) e a região de aromáticos (δ 6,0-9,5) (GIL et al., 2000).

4.2.1 Aminoácidos e ácidos orgânicos

A inexpressiva intensidade dos sinais na região de δ 0,5–3,0 revelou a baixa concentração de aminoácidos e ácidos orgânicos no caqui. Esses resultados estão de acordo com aqueles apresentados por Ryu et al. (2015) que por sua vez, usaram a RMN em solução para a caracterização química de “caqui japonês”. A análise dessa região revelou que os compostos majoritários são: etanol (δ 1,19; *t*), treonina (δ 1,34; *d*), alanina (δ 1,48; *d*), citrulina (δ 1,61; *m*), GABA (δ 2,30; *t*) e o ácido málico (δ 2,70; *d*) (**Figura 15** - o assinalamento detalhado dos sinais pode ser verificado no ANEXO 1). Devido à importância destes sinais no desenvolvimento dos frutos, foi feito o acompanhamento da variação das áreas dos sinais referentes a esses compostos (**Figura 16**).

O ácido málico foi o único ácido orgânico identificado nessa região. Observou-se que a área do sinal δ 2,70 não variou significativamente para o cultivar Giombo, no entanto, para o cultivar Fuyu, baseado no teste de Tukey a 5% de probabilidade, houve um aumento estatisticamente significativo para as amostras de setembro e março (**Figura 16**). Stender et al. (1991) ao avaliarem diversos cultivares de caqui encontrados no Japão observaram o aumento do ácido málico com a maturidade do fruto. Além disso, os autores relataram a presença de outros ácidos orgânicos: succínico, cítrico e quínico.

Os ácidos málico e cítrico são dominantes na maioria das frutas e contribui efetivamente nas características organolépticas. Isso se deve ao fato dos ácidos orgânicos influenciarem a percepção dos açúcares, por exemplo, o ácido málico parece aumentar a percepção da sacarose, enquanto o ácido cítrico e o quínico geram o efeito contrário (LOBIT et al., 2006). Uma vez que há indício que o acúmulo do ácido málico está mais associado a fatores ambientais, como temperatura, do que a fatores genéticos, a comparação do comportamento do ácido málico entre os cultivares se torna dispensável (LOBIT et al., 2006).

No que se diz respeito aos aminoácidos, houve um destaque para a citrulina, a treonina, a alanina e o GABA, no entanto, devido à problemas com a linha de base nos espectros referentes aos estágios iniciais para os dois primeiros compostos, só foi possível fazer o acompanhamento da intensidade do sinal da alanina e do GABA.

Como pode ser observado na **Figura 16**, com o desenvolvimento de ambos os cultivares houve um decréscimo das áreas dos sinais da alanina e do GABA. No 'Giombo', a área dessas substâncias se mostraram estatisticamente diferentes entre os meses de setembro e março, o que acontece também no 'Fuyu' somente para a alanina. Com relação à área do sinal de GABA no 'Fuyu', foi observado diferença estatística entre os meses de novembro e março. Ademais, a análise visual do sinal da citrulina, também sugere que há diminuição da concentração desse composto com o desenvolvimento do fruto. Ackerman et al. (1992) relataram semelhante comportamento em uma variedade de maçã e concluíram que a diminuição de aminoácidos está associada ao processo de síntese de proteínas e degradação com a maturação, bem como ao efeito da diluição devido ao aumento da quantidade de água. Em outras palavras, o decréscimo de aminoácidos em ambos cultivares sugere uma forte necessidade dessas substâncias para a biossíntese de proteínas.

A avaliação dessa região permitiu ainda o acompanhamento da variação da área do sinal de etanol. Observou-se que para o 'Giombo' não houve diferença estatisticamente significativa ao longo do processo. Em relação ao 'Fuyu', somente durante os meses de setembro e janeiro foi observada uma variação significativa na área do sinal monitorado (**Figura 16**).

Etanol, juntamente com o acetaldeído, provocam mudanças importantes nos frutos, estejam eles no pé ou no período de pós-colheita. Entre as funções desenvolvidas por eles, destacam-se a produção de compostos voláteis e como agentes polimerizantes (PESIS, 2005). Sugiura et al. (1979) sugeriram que a produção desses dois metabólitos nas sementes e nas polpas de caqui está relacionado com o alto grau de adstringência encontrados nas frutas. Além disso, foi sugerido que os níveis de etanol e acetaldeído podem ser critério para indicar o tempo de colheita mais adequado (ZERBINI et al., 2001)

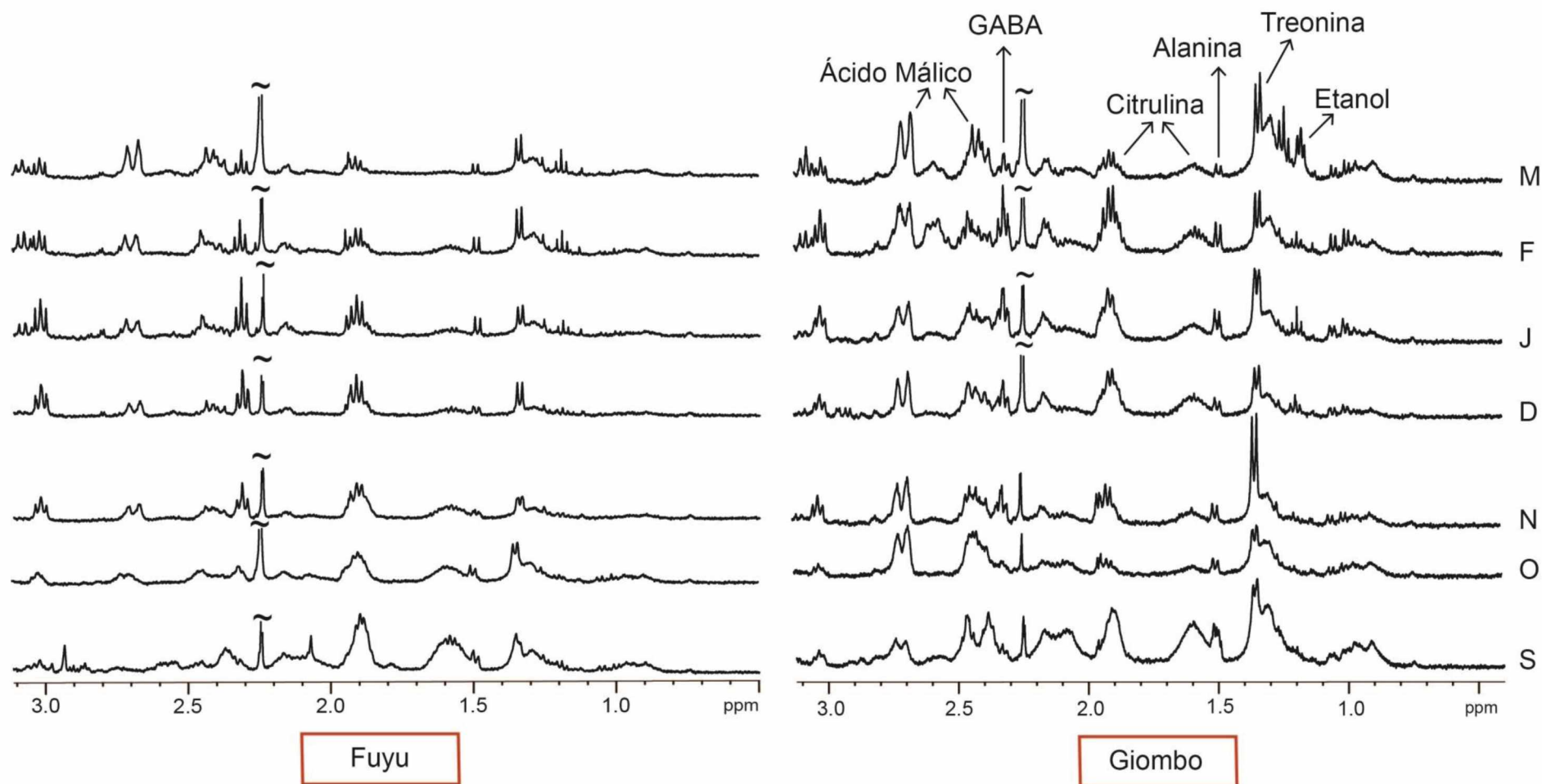


Figura 15. Expansão (δ 1-3) dos espectros de RMN HR-MAS de ¹H de caqui 'Fuyu' e 'Giombo' durante o processo de desenvolvimento (setembro (S) a março (M)).

Área integrada dos metabólitos individuais

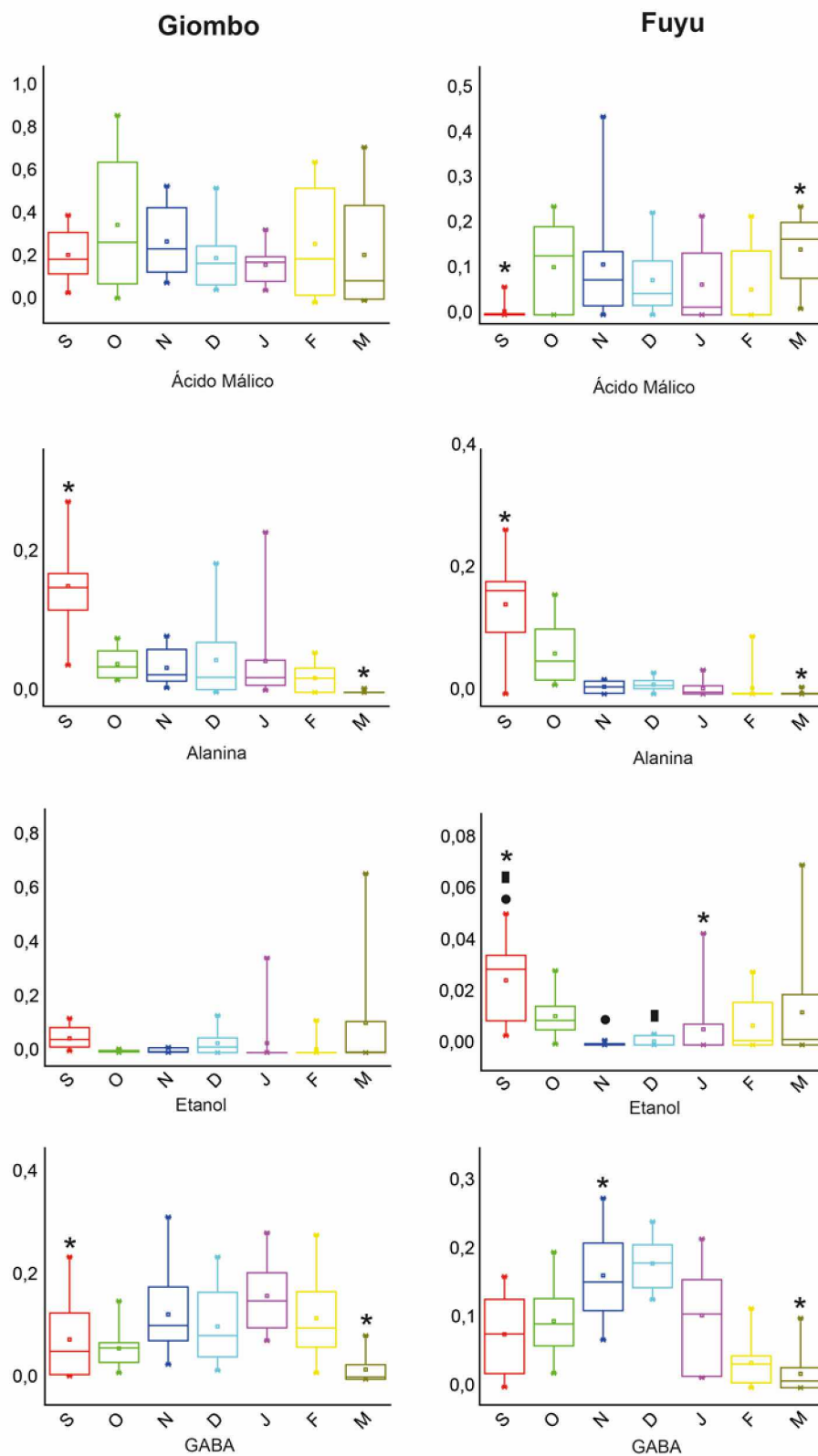


Figura 16. Avaliação mensal (de setembro (S) à março (M)) da área integrada dos metabólitos presentes nos cultivares 'Fuyu' e 'Giombo' (*box plots*). Símbolos iguais mostram diferenças significativas entre os meses, a 5% de probabilidade, baseada no teste de Tukey.

4.2.2 Carboidratos

A contribuição dos açúcares, apresentada na **Figura 17**, mostra que o caqui é uma fonte rica em carboidratos e que os mesmos estão presentes desde o primeiro estágio de desenvolvimento até o amadurecimento (RYU et al., 2015; GIORDANI et al., 2011; SEYMOUR et al., 1993). Como pode ser visto na **Figura 18**, os principais carboidratos encontrados foram glicose, frutose e sacarose, corroborando os resultados encontrados na literatura (GIORDANI et al., 2011; DEL BUBBA et al., 2009). Com o intuito de avaliar o comportamento desses açúcares no desenvolvimento do fruto, a área dos sinais referentes a esses compostos foi determinada em ambos os cultivares (**Figura 19**).

A magnitude da área dos sinais de carboidratos (sacarose, glicose e frutose) no estágio inicial e final do desenvolvimento dos frutos foram praticamente similar para os dois cultivares (**Figura 19**). No entanto, foi observado diferenças no comportamento destes compostos no decorrer do processo. A área do sinal referente ao hidrogênio anomérico da sacarose começa em valores próximos de zero para o 'Fuyu' e 'Giombo' tendo um acréscimo estatisticamente significativo no mês de janeiro para o 'Giombo' e nos meses de novembro e dezembro para o 'Fuyu'.

As áreas dos sinais referentes aos compostos α e β glicose aumentaram continuamente durante o desenvolvimento dos frutos (**Figura 19**). Para o 'Fuyu' houve um aumento estatisticamente significativo das áreas nos meses janeiro e fevereiro, a partir do qual se observou que a produção dos carboidratos aparentemente é estabilizada. Para o 'Giombo' os meses janeiro e fevereiro se mostraram estatisticamente diferentes com relação aos demais meses. O aumento contínuo da área dos sinais da glicose e frutose até o final do desenvolvimento é observado na **Figura 19**.

Embora a composição dos carboidratos em caqui esteja bem definida na literatura, até o momento não se tem um consenso sobre a tendência do comportamento dos açúcares livres durante o desenvolvimento do fruto (DEL BUBBA et al., 2009). Apesar disso, todos os estudos realizados são unânimes em relatar o aumento no teor de açúcares independente da adstringência do cultivar (GIORDANI et al., 2011). Algumas vezes, esse aumento é

caracterizado pelo acréscimo da sacarose e açúcares redutores, outras vezes pelo aumento e diminuição da sacarose seguida pelo aumento constante da glicose e frutose ou ainda pelo aumento relevante da sacarose e níveis praticamente estáveis de glicose e frutose (GIORDANI et al., 2011).

A falta de uma tendência definida para a composição de carboidratos pode ser justificado através da variabilidade genética, bem como proveniente do delineamento experimental que vem sendo adotado, por exemplo, a ausência de um protocolo para a definição do estágio de maturação do fruto ou o controle da atividade da enzima invertase, responsável pela hidrólise da sacarose em glicose e frutose. Esta enzima é fortemente afetada por diferentes parâmetros como estágio de maturação, método para a remoção da adstringência e procedimentos de extração (GIORDANI et al., 2011; DEL BUBBA et al., 2009; DAOODO et al., 1992; HIRAI et al., 2010; ZHENG e SUGIURA, 1990).

Baseado nos resultados apresentados observou-se que a tendência para os carboidratos no 'Fuyu' e 'Giombo' foi descrita pelo aumento e diminuição da sacarose seguido pelo aumento constante da glicose e frutose. Esse comportamento segue uma das tendências descritas por Giordani et al. (2011). No entanto, a metodologia empregada visou amenizar significativamente os fatores que contribuem para eventual divergência na concentração dos compostos, uma vez que foi realizado o acompanhamento mensal da composição química de frutos provenientes de fruteiras de mesma idade e que experimentaram as mesmas condições ambientais através da técnica de análise direta. Dessa forma, reduzindo, principalmente, as influências causadas pela definição errônea do estágio de desenvolvimento e atividade da enzima invertase.

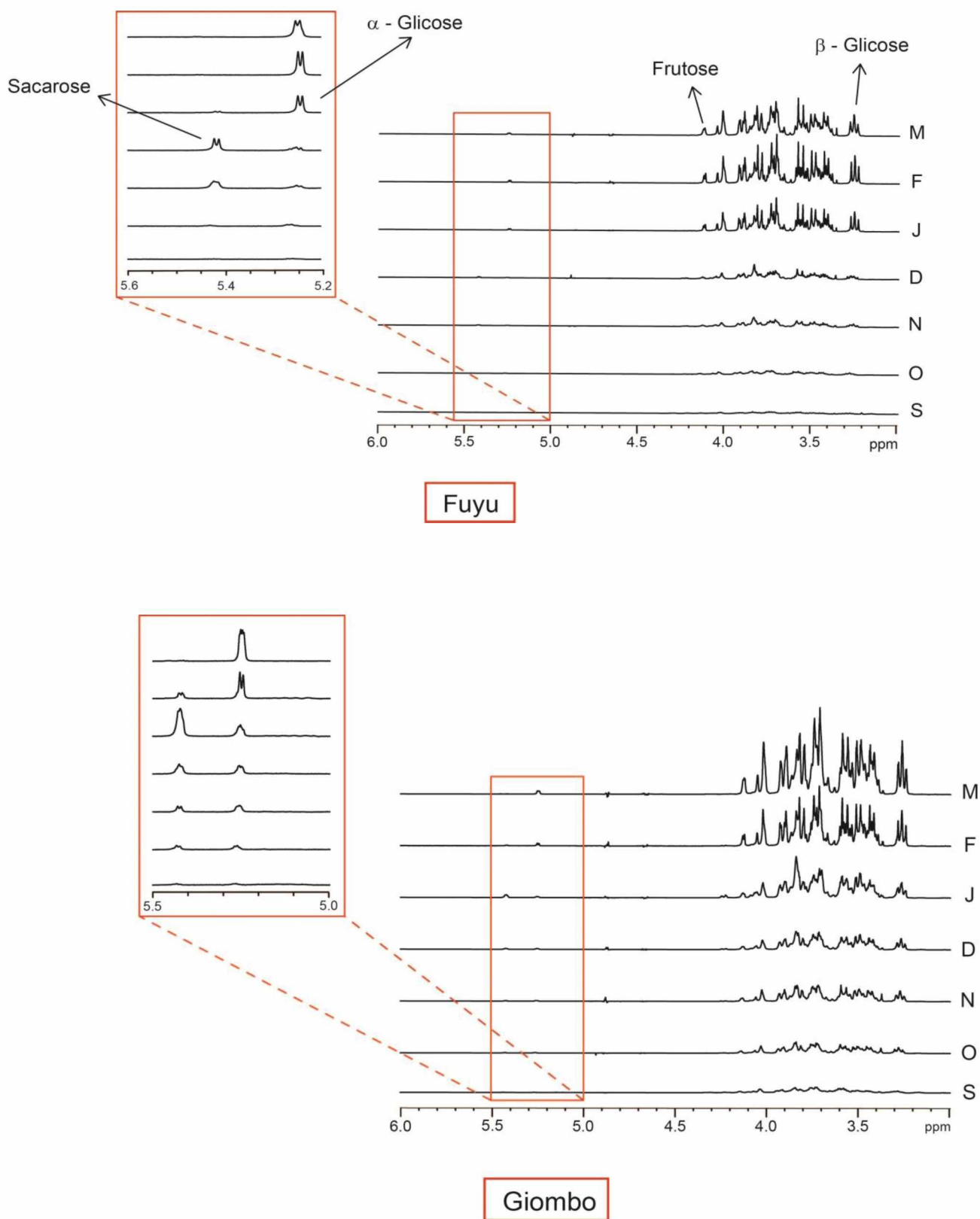


Figura 177. Expansão (δ 3-6) dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H de caqui 'Fuyu' e 'Giombo' durante o processo de desenvolvimento (de setembro (S) a março (M)).

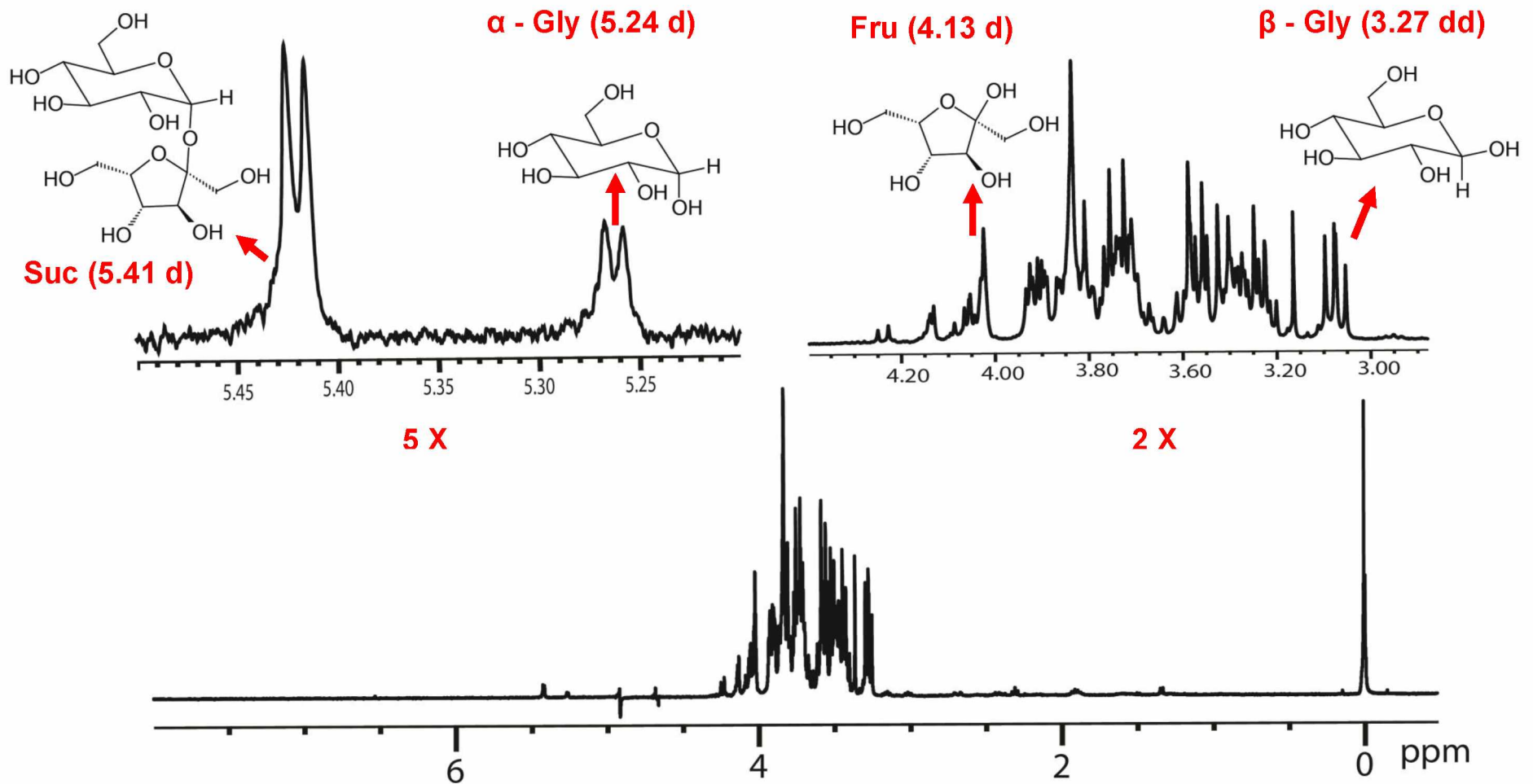


Figura 188. Atribuição dos sinais de carboidratos empregados na avaliação mensal da relação sinal/ruído dos cultivares de caqui.

Área integrada dos metabólitos individuais

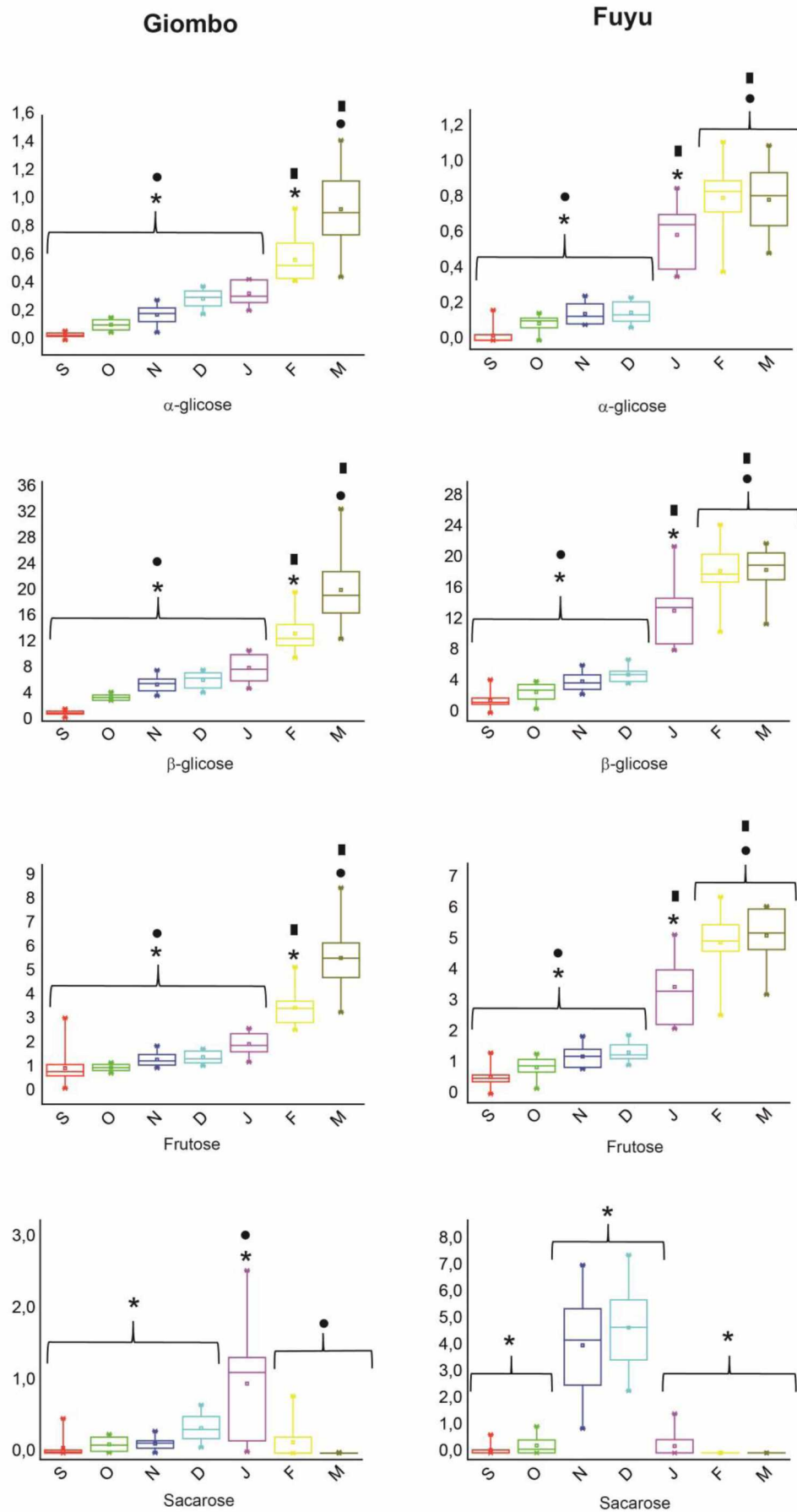
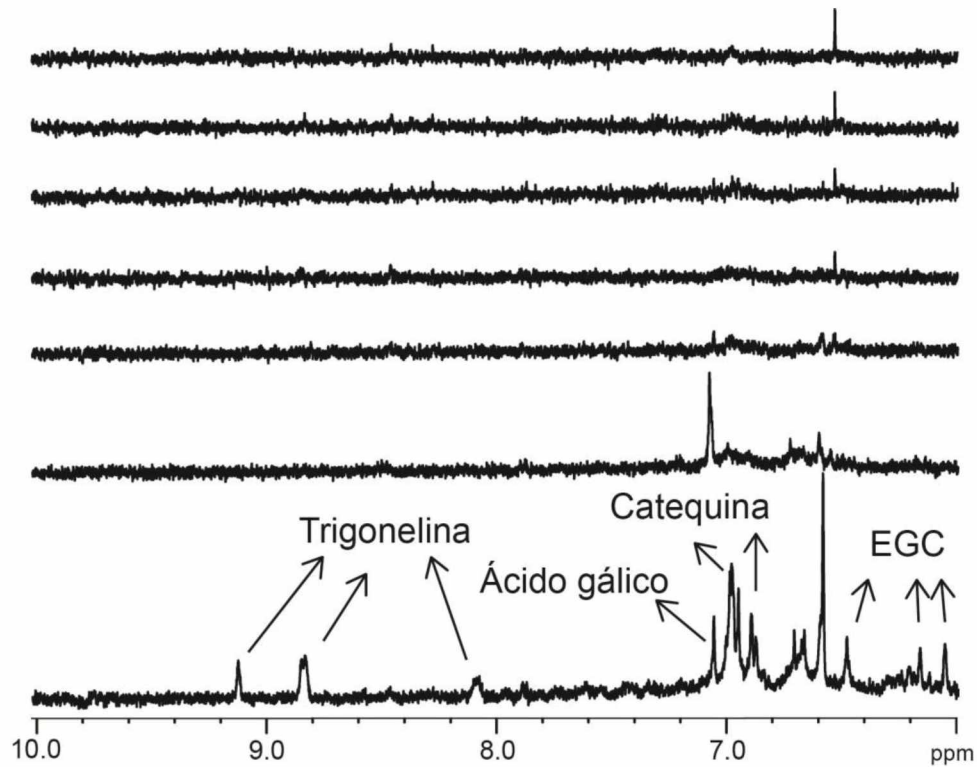


Figura 19. Avaliação mensal (de setembro (S) à março (M)) da área integrada dos metabólitos presentes nos cultivares 'Fuyu' e 'Giombo' (*box plots*). Símbolos iguais mostram diferenças significativas entre os meses, a 5% de probabilidade, baseada no teste de Tukey.

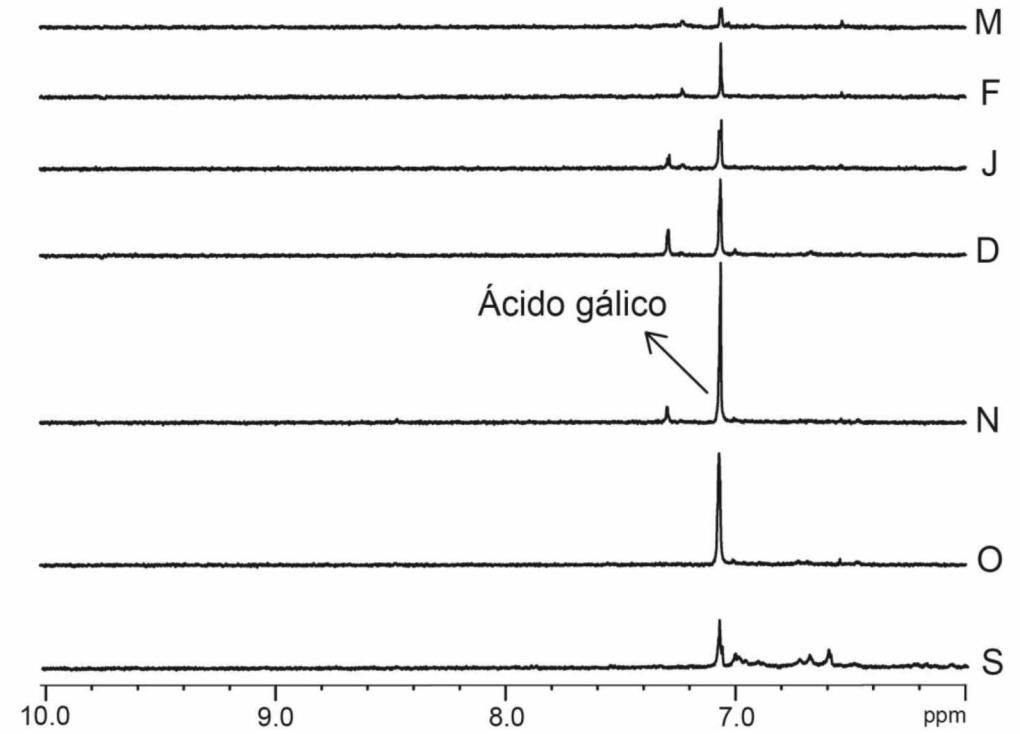
4.2.3 Região aromática

A região aromática apresentou sinais diferentes para os cultivares de caqui, com destaque para o mês de setembro (**Figura 20**). Foi possível a identificação do ácido fumárico (δ 6,52; s), ácido gálico (δ 7,06; s), trigonelina (δ 9,11; s), catequina (δ 6,97; s) e epigallocatequina (δ 6,58; s) no caqui 'Fuyu', enquanto que para o 'Giombo', somente o ácido gálico (δ 7,06; s) foi caracterizado. Para mais detalhes sobre a atribuição dos sinais, ver ANEXO 1. Ambos, epigallocatequina e catequina, têm sido relatados como unidades monoméricas flavan-3-ol dos taninos condensados encontrados em caqui (AKAGI et al., 2010; LI et al., 2010; MATSUO e ITO 1978; NAKATSUBO et al., 2002).

Estes resultados nos permitiram concluir que a síntese de polifenóis ocorreu principalmente no estágio inicial do desenvolvimento. Del Bubba et al., (2009) relataram uma observação similar apenas para cultivares adstringentes. Vale a pena ressaltar que um decréscimo acentuado dos sinais presentes na região dos aromáticos foi observado para o 'Fuyu'. A partir de outubro, somente o sinal referente ao ácido fumárico foi detectado. Por outro lado, o sinal do ácido gálico permaneceu até o final do desenvolvimento no 'Giombo', apresentando uma maior intensidade em dezembro. Normalmente, um teor mais elevado de compostos fenólicos é característico de cultivares adstringentes de caqui, quando comparados a aqueles não-adstringentes, o que sugere que esses cultivares podem ser considerados uma melhor fonte de compostos com propriedades antioxidantes (SUZUKI et al., 2005)



Fuyu



Giombo

Figura 200. Expansão (δ 6 - 10) dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H de caqui 'Fuyu' (A) e 'Giombo' (B) durante o processo de maturação. Cada mês é identificado por sua respectiva letra inicial: setembro (S), outubro (O), novembro (N), dezembro (D), janeiro (J), fevereiro (F) e março (M).

4.3 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)

Utilizou-se a análise de componentes principais (PCA) para a discriminação das amostras de acordo com os estágios de desenvolvimento de cada cultivar.

4.3.1 Otimização das condições para a PCA

Para os dados de RMN, as variáveis de entrada nas análises quimiométricas são comumente determinadas através dos *buckets* que consiste na divisão dos espectros em intervalos. Esse procedimento é realizado através do programa computacional AMIX[®] tendo os tamanhos dos *buckets* definidos pelo analista.

A escolha da melhor condição de discriminação das amostras, descrita no **Item 3.4**, foi encontrada após combinação de diferentes formas de integração e pré-processamento oferecidas pelo AMIX[®]. Antes da realização da análise multivariada ajustou-se a linha de base e a fase dos espectros, garantindo que as variáveis utilizadas estivessem em função apenas da composição química das amostras. Ao fazer isso são evitadas oscilações principalmente no cálculo dos valores de integrais, o que geraria resultados equivocados. Por fim, os espectros foram calibrados em relação ao sinal do TMS- d_4 em δ 0,0, evitando a variação dos deslocamentos químicos de um mesmo sinal em diferentes espectros.

No que se diz respeito à forma de integração, testou-se a soma das intensidades, soma das intensidades absolutas, intensidade positiva e negativa, bem como o modo de integração especial. Os pré-processamentos avaliados nos espectros foram: o escalamento com relação ao maior *bucket*, escalamento em relação à intensidade total dos sinais e, por fim, sem escalamento. Para as colunas, foram avaliados os pré-processamentos: sem escalamento, escalado em relação à variância unitária e escalamento pareto. A **Figura 21** mostra o fluxograma com as etapas da otimização.

Ao longo da otimização foi utilizado o conjunto de dados de ambas cultivares. Realizaram-se as análises de PCA com os espectros completos (δ 0,5-9,5) e em seguida utilizando regiões específicas: δ 0,5-3,0 (ácidos

orgânicos e aminoácidos), δ 3,0-6,0 (carboidratos e aminoácidos) e δ 6,0-9,5 (aromáticos), sempre excluindo a região do sinal de H₂O/HDO e da acetona.

A região empregada para a exclusão do sinal residual da água foi definida através da avaliação de três diferentes tamanhos de faixas (δ 4,70-4,85, δ 4,50-5,20 e δ 4,00-5,00). O objetivo foi investigar a variação no comportamento dos sinais vizinhos ao sinal de H₂O/HOD ocasionada pela supressão da água e do efeito de saturação cruzada. Esses sinais podem ter suas intensidades alteradas gerando falso agrupamento das amostras. Baseado nos resultados observou-se que independentemente do tamanho da região de exclusão a separação dos grupos se manteve igual. Isso significa que os sinais próximos ao sinal da água, possivelmente afetados pela saturação, não apresentam variância significativa a ponto de influenciar na separação dos grupos. Excluiu-se a região entre δ 4,50 e 5,20.

Baseado nos resultados optou-se em usar o modo de integração especial que dispensa a necessidade de corrigir a linha de base e a fase dos espectros; como pré-tratamento nos espectros foi escolhido escalamento em relação à intensidade total dos sinais, o qual normaliza as integrais de cada *bucket* em relação à intensidade total dos sinais de um espectro; sendo assim, as diferentes quantidades de amostras não influenciam na discriminação dos grupos. O pré-processamento escolhido para as colunas foi o escalamento por unidade de variância, onde os dados são auto escalados (AMIX, 2008).

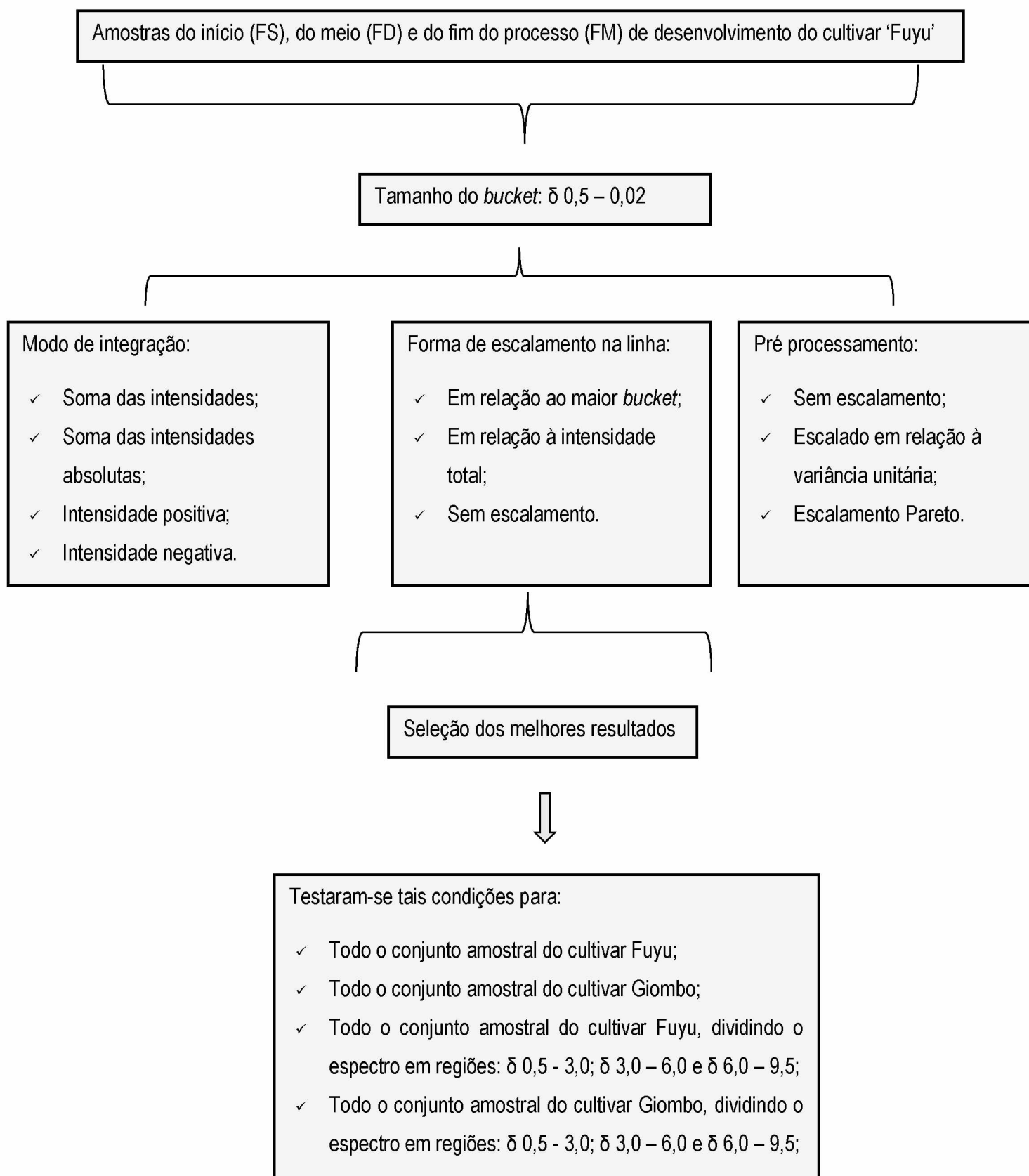


Figura 211. Fluxograma mostrando as etapas de otimização para as análises de componentes principais (PCA). Utilizando o conjunto de dados que inclui amostra das duas cultivares, foram feitas diferentes combinações empregando os modos de integração e pré-processamentos oferecidos pelo AMIX.

Além de discriminar os grupos, a PCA também auxilia no reconhecimento do comportamento anômalo das amostras, denominados *outliers*. Para isso o AMIX oferece duas ferramentas: o gráfico de *influence plot* e Hotelling T2. Na primeira alternativa é plotado no eixo Y a posição de cada amostra em relação à variância explicada pelas PCs consideradas, também chamado como espaço do modelo e, no eixo X a posição de cada amostra em relação ao centro do modelo. Para as amostras que estiverem fora das linhas de confiança determinada pelo analista foram consideradas *outliers* em potencial. Por outro lado, no Hotelling T2 é fornecido um contorno no gráfico de escores, representando o limite de confiança desejado, onde as amostras devem estar contidas (AMIX, 2008; SILVA, 2010). Para facilitar o entendimento é mostrado na **Figura 22** um exemplo dos gráficos de *influence plot* e Hotelling T2 adquiridos com as amostras do caqui 'Fuyu'.

No entanto, para que a amostra seja considerada, de fato, *outlier* deve ser feita a inspeção visual dos espectros. Uma vez encontrada uma justificativa plausível, pode-se realizar a exclusão dos dados. Esse procedimento evita que amostras que apenas possuam uma composição química diferenciada das demais sejam excluídas.

Com base no que foi discutido anteriormente foi possível à identificação de quatro amostras *outliers* para o caqui 'Fuyu' e 'Giombo' (FS4, FO9, FO10, FO11, GD1, GJ9, GO5 e GO9). Em todos estes casos, houve erro de ordem instrumental como, por exemplo, aquisições incompletas ou problemas com o *shimming* e, conseqüente alargamento do sinal.

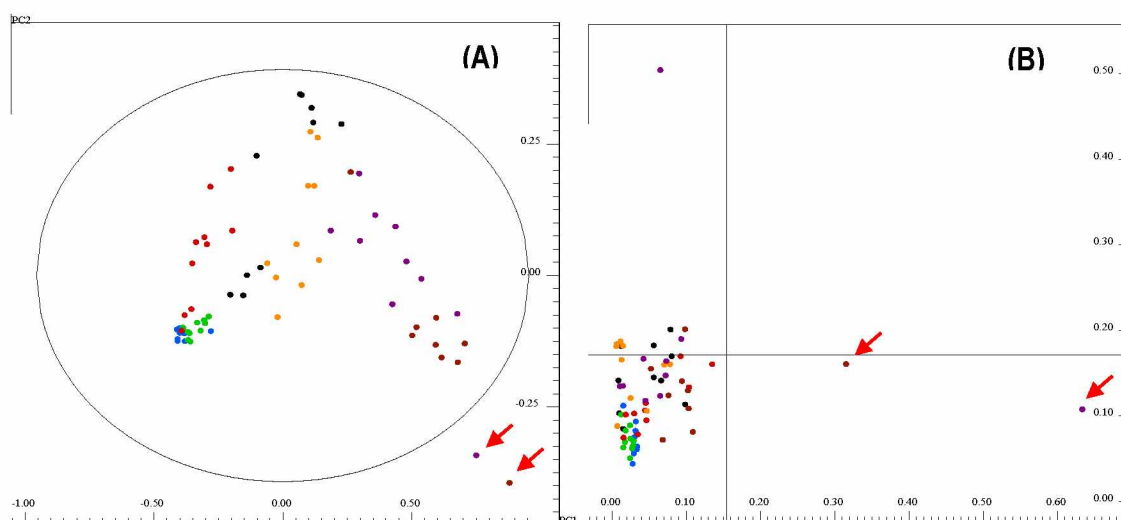


Figura 22. Exemplo do gráfico de Hotelling T2 (A) e *influence plot* (B) para o conjunto amostral do cultivar 'Fuyu'. Setas indicando que as amostras FS 4 (marrom) e FO9 (roxo) são possíveis *outliers*.

Os gráficos de escores e *loadings* referentes à análise de PCA para as amostras do cultivar 'Fuyu' são mostrados na **Figura 23 A**. A combinação de PC1 *versus* PC2 explica uma variância total de 92,05% (sendo 89,23% da variância explicada pela PC1 e 2,82% referente à PC2).

Através da análise dos gráficos de escores foi possível visualizar a discriminação de dois grupos bem definidos. O primeiro foi constituído pelas amostras de setembro, ocupando a região positiva de PC1 e PC2; enquanto que o segundo grupo foi formado pelas amostras de fevereiro e janeiro, no lado negativo de PC1 e positivo de PC2. A avaliação do gráfico de *loadings* permitiu a identificação dos compostos com maior impacto na variância (**Figura 23 B**).

Os ácidos orgânicos, aminoácidos e compostos aromáticos (todos já mencionados nas **Figuras 15 e 20**) influenciaram a discriminação das amostras FS, vale a pena mencionar que o *bucket* em δ 3,20-3,22, atribuído aos hidrogênios metílicos do grupo $N(CH_3)_3$ da colina, também foi considerado relevante nessa discriminação (PEREZ et al., 2010; SILVA, 2010). Para o grupo formado pelas amostras FJ e FF, o *bucket* associado ao sinal da α -glicose (δ 5,24-5,26) foi responsável pela discriminação desse grupo. A alta dispersão das amostras de outubro, novembro e dezembro nos diferentes quadrantes do gráfico de *loadings* dificulta a correlação das mesmas com as PCs selecionadas. Contudo, baseado nos dados de RMN, essas amostras

foram influenciadas pela presença da sacarose, como pode ser observado na **Figura 17**. Este resultado também foi sugerido pelo *bucket* em δ 5,40-5,42 no lado positivo de PC1 e negativo de PC2. Por fim, as amostras de março não formaram um grupo conciso. Para uma melhor avaliação de qual tendência apresenta essas amostras, um maior volume de dados deveria ser fornecido a análise estatística. Contudo, entre as amostras analisadas a discriminação parcial pode ser atribuída aos *buckets* em δ 3,25-3,28 e 4,12-4,14 (referentes aos compostos β -glicose e α -glicose) no lado negativo de PC1 e PC2.

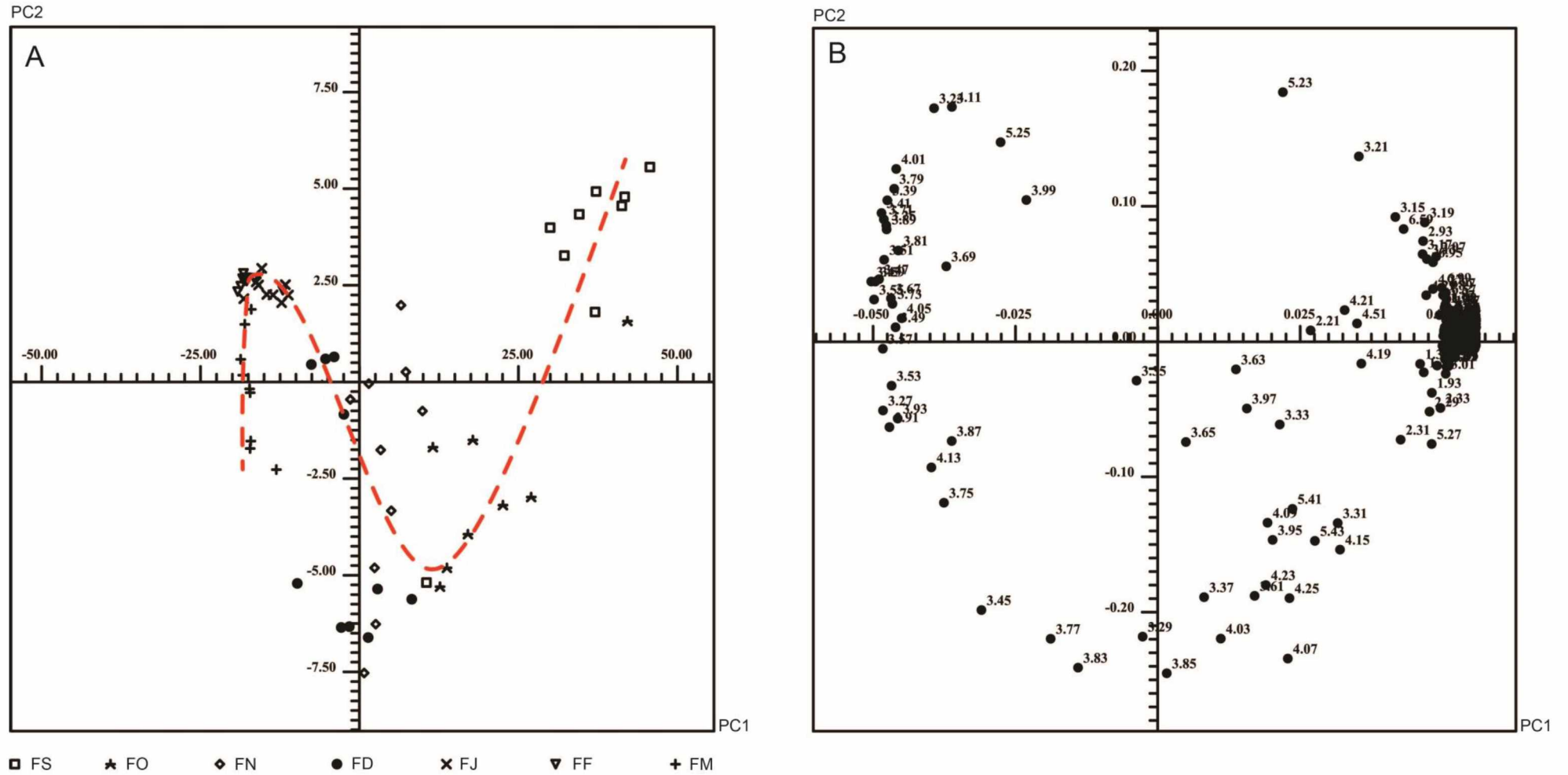


Figura 23. (A) Gráfico de escores de PC1 (89,23%) versus PC2 (2,82%), utilizando 66 amostras de caqui 'Fuyu'. (B) Gráfico de influências (loadings) de PC1 versus PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de escores. A linha tracejada mostra a trajetória do processo de desenvolvimento do fruto.

4.3.3 PCA do cultivar 'Giombo'

O gráfico de escores adquirido utilizando 66 amostras de caqui 'Giombo' é mostrado na **Figura 24 A**. Um modelo com duas componentes principais foi construído onde 90,34% da variância total pôde ser explicada. A primeira PC descreve 87,95% da variância enquanto que a PC2 reporta o adicional de 2,39%.

As amostras de Setembro foram agrupadas no lado positivo de PC1 e negativo de PC2. A análise dessas regiões no gráfico *loadings* demonstrou a influência dos mesmos compostos reportados para FS, também foi observado o agrupamento das amostras de Fevereiro e Março no lado negativo de PC1 e PC2 (**Figura 24 B**). Os *bucketes* associados aos sinais de carboidratos foram responsáveis por essa discriminação, sendo possível assinalar os sinais referentes aos buckets em δ 5,24-5,26, 3,24-3,28 e 4,10-4,14 (α e β -glicose bem como frutose, respectivamente). As demais amostras (Outubro, Novembro, Dezembro e Janeiro) não foram discriminadas uma vez que as mesmas estão amplamente espalhadas nas PCs selecionadas. Contudo, o *bucket* em δ 5,41-5,43 sugeriu a influência do sinal da sacarose para essas amostras, que por sua vez está de acordo com o aumento da sacarose observado na **Figura 17**.

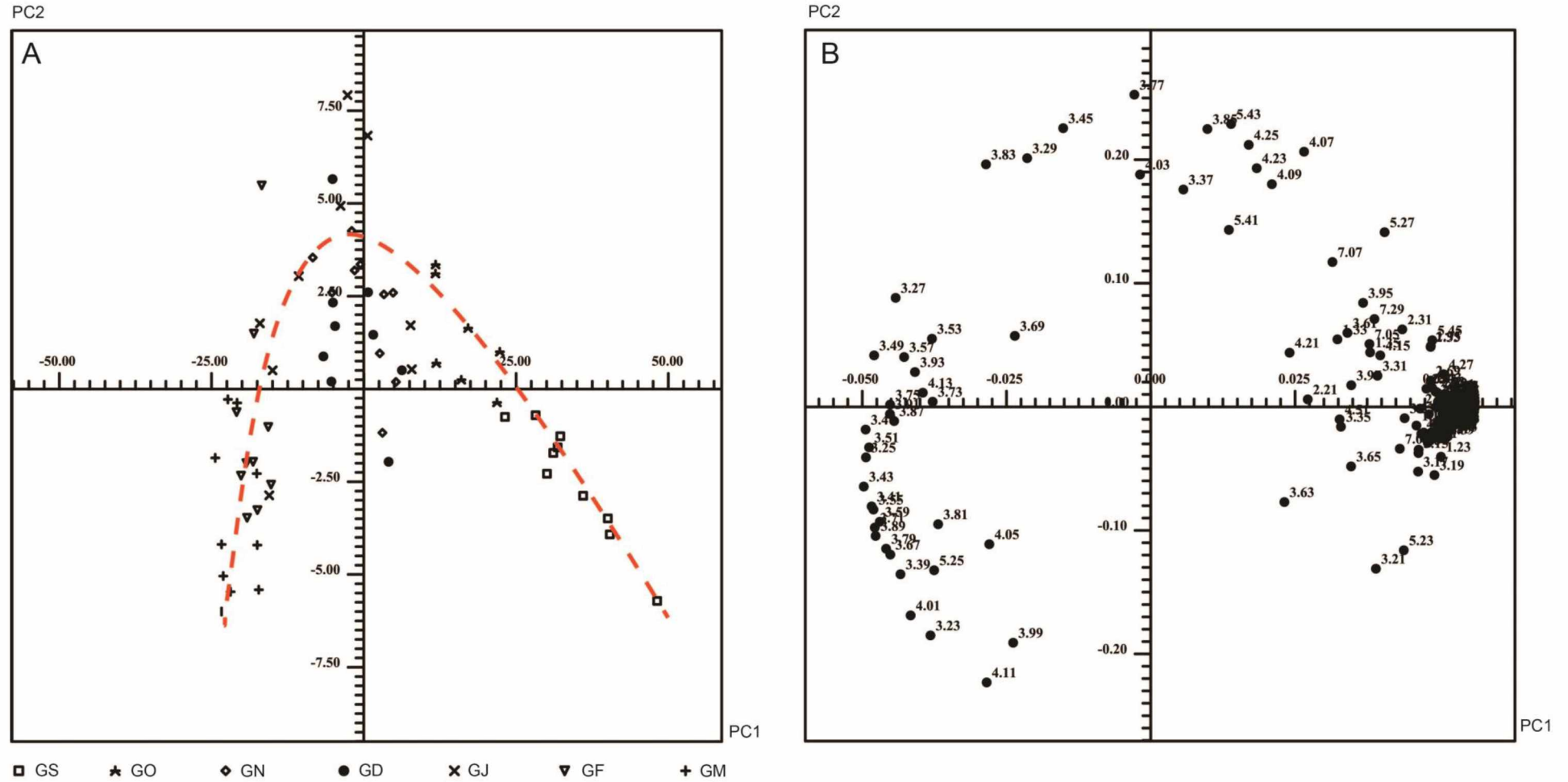


Figura 224. A) Gráfico de escores de PC1 (87,95%) versus PC2 (2,39%), utilizando 66 amostras de caqui. (B) Gráfico de influências (loadings) de PC1 versus PC2 explicando a classificação das amostras apresentadas no gráfico de escores. A linha tracejada mostra a trajetória do processo de desenvolvimento do fruto.

CONCLUSÃO

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho, a RMN HR-MAS combinada com a análise de componentes principais mostrou-se ser uma importante ferramenta para avaliação química de diferentes cultivares de caqui ('Fuyu' e 'Giombo') durante o desenvolvimento completo do fruto. O planejamento experimental empregado mostrou-se apropriado para avaliação desse processo, uma vez que todas as etapas de desenvolvimento foram levadas em consideração.

A análise direta dos espectros revelou a presença discreta de ácidos orgânicos e aminoácidos em caqui. Por outro lado, destacou a importante participação dos carboidratos no desenvolvimento do fruto que pôde ser descrita pelo aumento e diminuição da sacarose seguida pelo aumento constante da glicose e frutose para ambos os cultivares. Essa tendência está de acordo com os dados na literatura, todavia, esse resultado consiste no primeiro relato do comportamento de açúcares durante todo o processo de desenvolvimento de dois cultivares de caqui através de uma técnica de análise direta, minimizando os problemas relacionados à extração, atividade enzimática e problemas de protocolos que definem o real estágio de desenvolvimento dos frutos.

Ademais, no estágio inicial do desenvolvimento dos frutos foi observada uma notável diferença na região aromática para ambos os cultivares. Para o 'Giombo', o sinal relacionado ao ácido gálico permaneceu até o final do desenvolvimento, enquanto que para o 'Fuyu' os sinais de polifenóis foram detectados somente no estágio inicial.

A análise multivariada dos dados permitiu uma avaliação geral da composição química durante todo o processo. Os dois cultivares parecem desenvolver-se de maneira similar: no estágio inicial, há uma influência dos ácidos orgânicos, aminoácidos, polifenóis e colina, enquanto que para os meses restantes, as mudanças foram associadas a presença dos carboidratos. Observou-se a participação da sacarose no meio do processo, e no fim deste a contribuição da glicose e da frutose.

Por fim, o agrupamento das amostras de diferentes meses no final do desenvolvimento dos frutos, sugeriu que para a definição do estágio real de desenvolvimento da fruta, a composição química deve ser levada em

consideração. Normalmente, essa definição é baseada em um cartão de cores, porém nem sempre há uma relação direta entre a cor da casca e a composição química da fruta. A falta de protocolo para este propósito torna difícil a comparação entre os resultados de diferentes estudos. Além disso, tal agrupamento pode gerar novas ideias que visem o desenvolvimento de novas estratégias pós-colheita.

REFERÊNCIAS

6. REFERÊNCIAS

- ACKERMAN, J.; FISCHER, M.; AMADO, R. Changes in sugars, acids, and amino acids during ripening and storage of apples (cv. Glockenapfel). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, n. 7, p. 1131–1134, 1992.
- AKAGI, T.; SUZUKI, Y.; IKEGAMI, A.; KAMITAKAHARA, H.; TAKANO, T.; NAKATSUBO, F.; YONEMORI, K. Condensed Tannin Composition Analysis in Persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) Fruit by Acid Catalysis in the Presence of Excess Phloroglucinol. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**. v 79, n. 3, p. 275-281, 2010.
- ALAM, T.M.; JENKINS, J. E. HR-MAS NMR spectroscopy in material science, in: M.A. Farrukh (Ed.), *Advanced Aspects of Spectroscopy*, Intech Open, Croatia, 2012, pp. 279 - 306.
- ALCANTARA, G. B.; HONDA, N. K.; FERREIRA, M. M. C.; FERREIRA, A. G. Chemometric analysis applied in ¹H HR-MAS NMR and FT-IR data for chemotaxonomic distinction of intact lichen samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 595, n. 1-2, p. 3-8, 2007.
- BERTOCCHI, F.; PACI, M. Applications of high-resolution solid-state NMR spectroscopy in food science. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 20, p. 9317-9327, 2008.
- BESADA, C., SANCHEZ, G., SALVADOR, A., GRANELL, A. Volatile compounds associated to the loss of astringency in persimmon fruit revealed by untargeted GC-MS analysis. **Metabolomics**, v. 9, n. 1, p. 157-172, 2013.
- BIANCO, A.; FURRER, J.; LIMAL, D.; GUICHARD, G.; ELBAYED, K.; RAYA, J.; PIOTTO, M.; BRIAND, J. P. Multistep synthesis of 2,5-diketopiperazines on different solid supports monitored by high resolution magic angle spinning NMR spectroscopy. **Journal of Combinatorial Chemistry**, v. 2, n. 6, p. 681-690, 2000.
- BIASI, L. A. . Cultura do Caquiizeiro. In: II Encontro de Fruticultura dos Campos Gerais, 2009, Ponta Grossa. Anais. Ponta Grossa: UEPG, 2009. p. 3-12.

- BIBI, N.; KHATTAK, A. B.; MEHMOOD, Z. Quality improvement and shelf life extension of persimmon fruit (*Diospyros kaki*). **Journal of Food Engineering**, v. 79, n. 4, p. 1359-1363, 2007.
- BRACKMANN, A. A produção, o consumo e a qualidade do caqui no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 1, p. 1-198, 2003.
- BRO, RASMUS; SMILDE, Age K. Principal component analysis. **Analytical Methods**, v. 6, n. 9, p. 2812-2831, 2014.
- BROBERG, A.; KENNE, L. Use of high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance spectroscopy for *in situ* studies of low-molecular-mass compounds in red algae. **Analytical Biochemistry**, v. 284, n. 2, p. 367-374, 2000.
- BROBERG, A.; KENNE, L.; PERDERSÉN, M. In-situ identification of major metabolites in the red alga *Gracilariopsis lemaneiformis* using high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Planta**, v. 206, n. 2, p. 300-307, 1998.
- BUESA, I.; BADAL, E.; GUERRA, D.; BALLESTER, C.; BONET, L.; INTRIGLIOLO, D. S. Regulated deficit irrigation in persimmon trees (*Diospyros kaki*) cv. 'Rojo Brillante'. **Scientia Horticulturae**, v. 159, p. 134-142, 2013.
- CAPOZZI, F.; BORDONI, A. Foodomics: a new comprehensive approach to food and nutrition, **Genes e Nutrition**, v. 8, n. 1, p. 1-4, 2013.
- CASTEJÓN, D.; VILLA, P.; CALVO, M. M.; SANTA-MARÍA, G.; HERRAIZ, M.; HERRERA, A. ¹H-HRMAS NMR study of smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 48, n. 9, p. 693-703, 2010.
- CENCI, S. A. Boas práticas de pós-colheita de frutas e hortaliças na agricultura familiar. In: Fenelon do Nascimento Neto (Org.). *Recomendações Básicas para a Aplicação de Boas Práticas Agropecuárias e de Fabricação na Agricultura Familiar*. 1ª Ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p. 67-80, 2006.
- CEVALLOS-CEVALLOS, J. M.; REYES-DE-CORCUERA, J. I.; ETXEBERRIA, E.; DANYLUK, M. D.; RODRICK, G. E. Metabolomic analysis in food science: a review. **Trends in Food Science e Technology**, v. 20, n. 11-12, p. 557-566, 2009.

- CHEN, J.; SINGER, S. High-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy, in J.C. Lindon, J.K. Nicholson, E. Holmes (Eds.), *The handbook of metabonomics and metabolomics*, Elsevier B. V., New York, p. 113-147, 2007.
- CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. Aspectos fisiológicos do desenvolvimento de frutas e de hortaliças. In: *Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio*. Editora Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, p. 27-144, 2005.
- CIFUENTES, A. Food analysis and Foodomics. **Journal of Chromatography A**, v.1216, n. 43, p. 7109-7358, 2009.
- CLARIDGE, T. D. W. Experimental methods, in: *High-resolution NMR techniques in organic chemistry*, Elsevier, Amsterdam, p. 335-371, 2009.
- CLARK, C. J.; MACFALL, J. S. Magnetic resonance imaging of persimmon fruit (*Diospyros kaki*) during storage at low temperature and under modified atmosphere. **Postharvest Biology and Technology**, v. 9, n. 1, p. 97-108, 1996.
- CLARK, C. J.; MACFALL, J. S. Quantitative magnetic resonance imaging of 'Fuyu' persimmon fruit during development and ripening. **Magnetic Resonance Imaging**, v. 21, n. 6, p. 679-685, 2003.
- COEN, M.; HOLMES, E.; LINDON, J. C.; NICHOLSON, J. K. NMR-based metabolic profiling and metabonomic approaches to problems in molecular toxicology. **Chemical Research in Toxicology**, v. 21, n. 1, p. 9-27, 2008.
- COLARIC, M.; VEBERIC, R.; STAMPAR, F.; HUDINA, M. Evaluation of peach and nectarine fruit quality and correlations between sensory and chemical attributes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, n. 15, p. 2611-2616, 2005.
- CSENKI, L.; ALM, E.; TORGRIP, R. J. O.; ÅBERG, K. M.; NORD, L. I.; SCHUPPE-KOISTINEN I.; LINDBERG, J. Proof of principle of a generalized fuzzy Hough transform approach to peak alignment of one-dimensional ¹H NMR data. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, n. 3, p. 875-885, 2007.

- DAOOD, H. G.; BIACS, P.; CZINKOTAI, B.; HOSCHKE, Á. Chromatographic investigation of carotenoids, sugars and organic acids from *Diospyros kaki* fruits. **Food Chemistry**, v. 45, n. 2, p. 151-155, 1992.
- DAVIS, R. A.; CHARLTON, A. J.; GODWARD, J.; JONES, S. A.; HARRISON, M.; WILSON, J. C. Adaptive binning: an improved binning method for metabolomics data using the undecimated wavelet transform. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 85, n.1, p. 144-145, 2007.
- DEL BUBBA, M.; GIORDANI, E.; PIPPUCCI, L.; CINCINELLI, A.; CHECCHINI, L.; GALVAN, P. Changes in tannins, ascorbic acid and sugar content in astringent persimmons during on-tree growth and ripening and in response to different postharvest treatments. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, n. 7-8, p. 668-677, 2009.
- DEL CAMPO, 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**, v. 556, n. 2, p. 462-468, 2006.
- DELGADO-GOÑI, T.; CAMPO, S.; MARTÍN-SITJAR, J.; CABAÑAS, M.; SAN SEGUNDO, B.; ARÚS, C. Assessment of a ¹H high-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy procedure for free sugars quantification in intact plant tissue. **Planta**, v. 238, n. 2, p. 397-413, 2013.
- DENNIS, M. J. Recent developments in food authentication. **Analyst**, v. 123, n. 9, p. 151-156, 1998.
- EBERT, G.; GROSS, J. Carotenoid changes in the peel of ripening persimmon (*Diospyros kaki*) cv Triumph. **Phytochemistry**, v. 24, n. 1, p. 29-32, 1985.
- ESPÍN, J. C.; GARCÍA-CONESA, M. T.; TOMÁS-BARBERAN, F. A. Nutraceuticals: facts and fiction. **Phytochemistry**, v. 68, n. 22-24, p. 2986-3008, 2007.
- FACHINELLO, J. C.; PASA, M. S.; SCHMITZ, J. D.; BETEMPS, D. L. Situação e perspectivas da fruticultura de clima temperado no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, volume especial, p. 109-120, 2011.

- FERREIRA, M. M. C. Quimiometria – Conceitos, métodos e aplicações. Campinas, SP: Editora da Unicamp, p.107-238, 2015.
- FILHO, E. G. A.; SILVA, L. M. A.; CHOZE, R.; LIÃO, L. M.; HONDA, N. K.; ALCANTARA, G. B. Discrimination of sugarcane according to cultivar by ^1H NMR and chemometric analyses. **Journal of Brazilian Chemistry Society**, v. 23, n. 2, p. 273-279, 2012.
- FORSHEED, J.; SCHUPPE-KOISTINEN, I.; JACOBSSON, S. P. Peak alignment of NMR signals by means of a genetic algorithm. **Analytica Chimica Acta**, v. 487, n. 2, p. 189-199, 2003.
- GARCÍA-CAÑAS, V.; SIMÓ, C.; HERRERO, M.; IBÁÑEZ, E.; CIFUENTES, A. Present and future challenges in food analysis: foodomics. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 23, p. 10150-10159, 2012.
- GARROD, S.; HOLMES, E.; HUMPFER, E.; SPRAUL, M. HR-MAS: a new tool for semisolid samples, Bruker Report, p.146, n. 18, 1998.
- GERMAN, J. B.; HAMMOCK, B. D.; WATKINS, S. M. Metabolomics: building on a century of biochemistry to guide human health. **Metabolomics**, v. 1, n. 1, p. 3-9, 2005.
- GIL, A. M.; DUARTE, I. F.; DELGADILLO, I.; COLQUHOUN, I. J.; CASUSCELLI, F.; HUMPFER, E.; SPRAUL, M. Study of the compositional changes of mango during ripening by use of nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 5, p. 1524-1536, 2000.
- GIORDANI, E.; DOUMETT, S.; NIN, S.; DEL BUBBA, M. Selected primary and secondary metabolites in fresh persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.): A review of analytical methods and current knowledge of fruit composition and health benefits. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1752-1767, 2011.
- GONDO, M.; TANAKA, N.; TANAKA, T.; SHIMOMURA, K.; NAKANISHI, F.; ISHIMARU, K. A naphthalene glycoside from callus cultures of *Diospyros kaki*. **Phytochemistry**, v. 51, n. 7, p. 879-881, 1999.
- GORINSTEIN, S.; KULASEK, G. W.; BARTNIKOWSKA, E.; LEONTOWICZ, M.; ZEMSER, M.; MORAWIEC, M.; TRAKHTENBERG, S. The effects of diets, supplemented with either whole persimmon or phenol-free

- persimmon, on rats fed cholesterol. **Food Chemistry**, v. 70, n. 3, p. 303-308, 2000.
- GROSS, J.; BAZAK, H.; BLUMENFELD, A.; BEN-ARIE, R. Changes in chlorophyll and carotenoid pigments in the peel of 'Triumph' persimmon (*Diospyros kaki* L.) induced by pre-harvest gibberellin (GA3) treatment. **Scientia Horticulturae**, v. 24, n. 3-4, p. 305-314, 1984.
- GUEDES, M. S. B.; SENA, M.; TOLEDO, S. Certificação como estratégia competitiva internacional dos produtores de frutas no Brasil. In: Mundo Unifor. Fortaleza - CE, v. 01, 2007. Disponível em: <http://www.ecoeco.org.br/conteudo/publicacoes/encontros/vii_en/ensa3/trabalhos/certificacao_como_estrategia_competitiva.pdf> Acessado em 30 de março de 2015.
- HARIMA, S.; NAKANO, R.; YAMAUCHI, S.; KITANO, Y.; YAMAMOTO, Y.; INABA, A.; KUBO, Y. Extending shelf-life of astringent persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) fruit by 1-MCP. **Postharvest Biology and Technology**, v. 29, n. 3, p. 319-324, 2003.
- HAYNES, CINDY. Cultivar versus variety. Disponível em: <<http://www.ipm.iastate.edu/ipm/hortnews/2008/2-6/CultivarOrVariety.html>> Acessado em: 01 de Abril de 2015.
- HIDALGO, C.; MATEO, E.; MAS, A.; TORIJA, M. J. Identification of yeast and acetic acid bacteria isolated from the fermentation and acetification of persimmon (*Diospyros kaki*). **Food Microbiology**, v. 30, n. 1, p. 98 – 104, 2012.
- HIRAI, S.; ROKUHARAS, S.; SHIMIZUS, S. Changes in invertase activity of Japanese persimmon fruit during maturation storage and processing. **The Japanese Society for Food Science and Technology**, v. 33, n. 6, p. 369-374, 2010.
- HITAKA, Y.; NAKANO, A.; TSUKIGAWA, K.; MANABE, H.; NAKAMURA, H.; NAKANO, DAISUKE; K.; JUNEI; N. T.; MAEDA, H. Characterization of Carotenoid Fatty Acid Esters from the Peels of the Persimmon *Diospyros kaki*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 61, n. 6, p. 666-669, 2013.

- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Agrícola Municipal**, IBGE, 2013. Disponível em: < http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2013/default_perm_ods.shtm > Acessado em: 30 Mar. de 2013.
- ITTAH, Y. Sugar content changes in persimmon fruits (*Diospyros kaki* L.) during artificial ripening with CO₂: a possible connection to deastringency mechanisms. **Food Chemistry**, v. 48, n.1, p. 25 – 29, 1993.
- JÉGOU, C.; CULIOLI, G.; KERVAREC, N.; SIMON, G.; STIGER-POUVREAU, V. LC/ESI-MSⁿ and ¹H HR-MAS NMR analytical methods as useful taxonomical tools within the genus *Cystoseira* C. Agardh (Fucales; Phaeophyceae). **Talanta**, v. 83, n. 2, p. 613-622, 2010.
- KAWASE, M.; MOTOHASHI, N.; SATOH, K.; SAKAGAMI, H.; NAKASHIMA, H.; TANI, S.; SHIRATAKI, Y.; KURIHARA, T.; SPENGLER, G.; WOLFARD, K.; MOLNÁR, J. Biological activity of persimmon (*Diospyros kaki*) peel extracts. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 5, p. 495-500, 2003.
- KAZUHIRO, F.; KLUGE, R. A. Remoção de adstringência de caqui: um enfoque bioquímico, fisiológico e tecnológico. **Ciência Rural**, v. 39, n. 2, p. 585-594, 2009.
- KEIFER, P. A.; BALTUSIS, L.; RICE, D. M.; TYMLAK, A. A.; SHOOLERY, J. N. A comparison of NMR spectra obtained for solid-phase-synthesis resins using conventional high-resolution, magic-angle-spinning, and high-resolution magic-angle-spinning probes. **Journal of Magnetic Resonance, Series A**, v. 119, n. 1, p. 65-75, 1996.
- KELLEHER, B. P.; SIMPSON, M. J.; SIMPSON, A. J. Assessing the fate and transformation of plant residues in the terrestrial environment using HR-MAS NMR spectroscopy. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 70, n. 16, p. 4080-4094, 2006.
- KHANBABAEE, K.; VAN REE, T. Tannins: Classification and Definition. **Natural Product Reports**, v. 18, n. 6, p. 641-649, 2001.
- KIM, H.; LEE, C.; LEE, H. Antibacterial Activities of Persimmon Roots-derived Materials and 1,4-Naphthoquinone's Derivatives against Intestinal

- Bacteria. **Food Science and Biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 755-760, 2009.
- KJELDAHL, K.; BRO, R. Some common misunderstandings in chemometrics. **Journal of Chemometrics**, v. 24, n. 7-8, p. 558-564, 2010.
- KONDO, S.; YOSHIKAWA, H.; KATAYAMA, R. Antioxidant activity in astringent and non-astringent persimmons. **Journal of Horticultural Science e Biotechnology**, v. 79, n. 3, p. 390-394, 2004.
- KVASNIČKA, F.; VOLDŘICH, M. Determination of fumaric acid in apple juice by on-line coupled capillary isotachopheresis–capillary zone electrophoresis with UV detection. **Journal of Chromatography A**, v. 891, n. 1, p. 175-181, 2000.
- LEE, C.H., LEE, H.S. Acaricidal activity and function of mite indicator using plumbagin and its derivatives isolated from *Diospyros kaki* Thunb. roots (Ebenaceae). **Journal of Microbiology Biotechnology**, v. 2, n. 18, p. 314–321, 2008.
- LEE, H. J.; KIM, T.; KIM, S. J.; PARK, S. J. Bruising injury of persimmon (*Diospyros kaki* cv. Fuyu) fruits. **Scientia Horticulturae**, v. 103, n. 2, p. 179-185, 2005.
- LEE, Y. A.; CHO, E. J.; TANAKA, T.; YOKOZAWA, T. Inhibitory Activities of Proanthocyanidins from Persimmon against Oxidative Stress and Digestive Enzymes Related to Diabetes. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 53, n. 3, p. 287-292, 2007.
- LI, C.; LEVERENCE, R.; TROMBLEY, J. D.; XU, S.; YANG, JIE.; TIAN, Y.; REED, J. D.; HAGERMAN, A. E. High Molecular Weight Persimmon (*Diospyros kaki* L.) Proanthocyanidin: A Highly Galloylated, A-Linked Tannin with an Unusual Flavonol Terminal Unit, Myricetin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 16, p. 9033-9042, 2010.
- LIÃO, L. M.; CHOZE, R.; CAVALCANTE, P. P. A.; SANTOS, S. C.; FERRI, P. H.; FERREIRA, A. G. Perfil químico de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris*) pela técnica de *High Resolution Magic Angle Spinning* (HR-MAS). **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 634-638, 2010.
- LINDON, J. C.; BECKONERT, O. P.; HOLMES, E.; NICHOLSON, J. K. High-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy: application to

- biomedical studies. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 55, n. 2, p. 79-100, 2009.
- LOBIT, P.; GENARD, M.; SOING, P.; HABIB, R. Modelling malic acid accumulation in fruits: relationships with organic acids, potassium, and temperature. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 6, p. 1471-1483, 2006.
- LUO, Z. Effect of 1-methylcyclopropene on ripening of postharvest persimmon (*Diospyros kaki* L.) fruit. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, n. 2, p. 285-291, 2007.
- MACOMBER, R. S. Solid-state NMR spectroscopy, in: A complete introduction to modern NMR spectroscopy, John Wiley e Sons, Inc., New York, p. 283-304, 1998.
- MALLAVADHANL, U. V.; PANDA, A. K.; RAO, Y. R. Pharmacology and chemotaxonomy of *Diospyros*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 4, p. 901-951, 1998.
- MANNINA, L.; SEGRE, A. High resolution nuclear magnetic resonance: from chemical structure to food authenticity. **Grasas Aceites**, v. 53, n. 1, p. 22-33, 2002.
- MANNINA, L.; SOBOLEV, A. P.; CAPITANI, D. Applications of NMR metabolomics to the study of foodstuffs: truffle, kiwifruit, lettuce, and sea bass. **Electrophoresis**, v. 33, n. 15, p. 2290-2313, 2012a.
- MANNINA, L.; SOBOLEV, A. P.; VIEL, S. Liquid state ^1H field NMR in food analysis. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 66, p. 1-39, 2012b.
- Manual do programa AMIX de análises quimiométricas. Bruker Biospin, Karlsruhe, 2008.
- MARCONE, M. F.; WANG, S.; ALBABISH, W.; NIE, S.; SOMNARAIN, D.; HILL, A. Diverse food-based applications of nuclear magnetic resonance (NMR) technology. **Food Research International**, v. 51, n. 2, p. 729-747, 2013.
- MARIETTE, F. Investigations of food colloids by NMR and MRI. **Current Opinion in Colloid e Interface Science**, v. 14, n. 3, p. 203-211, 2009.

- MARZORATI, M.; BIGLER, P.; PLATTNER, M.; VERMATHEN, M. Feasibility of H-High Resolution-Magic Angle Spinning and pharmaceutical formulations. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 8, p. 3822-3827, 2013.
- MATTHAEI, C. J. **Estudio de compuestos de inclusión de Ciclodextrinas con flavonoides. Efecto sobre su actividad antioxidante**. Tese (Doctorado em Química) – Universidad del Chile, 2007.
- MATSUO, T.; ITO, S. The Chemical Structure of Kaki-tannin from Immature Fruit of the Persimmon (*Diospyros kaki* L.). **Agricultural and Biological Chemistry**. v. 42, n. 9, p. 1637-1643, 1978.
- MAZZEI, P.; PICCOLO, A. ¹H HRMAS-NMR metabolomic to assess quality and traceability of mozzarella cheese from Campania buffalo Milk. **Food Chemistry**, v. 132, n. 3, p. 1620-1627, 2012.
- NAKATSUBO, F.; ENOKITA, K.; MURAKAMI, K.; YONEMORI, K.; SUGIURA, A.; UTSUNOMIYA, N.; SUBHADRABANDHU, S.; Chemical structures of the condensed tannins in the fruits of *Diospyros* species. **Journal of Wood Science**. v. 48, n. 5, p. 414-418, 2002.
- NIELSEN, N. V.; CARSTENSEN, J. M.; SMEDSGAARD, J. Aligning of single and multiple wavelength chromatographic profiles for chemometric data analysis using correlation optimised warping. **Journal of Chromatography A**, v. 805, n. 1-2, p. 17-35, 1998.
- PALOU, L.; MONTESINOS-HERRERO, C.; BESADA, C.; TABERNER, V.. Postharvest Fruit rot of Persimmon (*Diospyros kaki*) in Spain Caused by *Lasiodiplodia theobromae* and *Neofusicoccum* spp. **Journal of Phytopathology**, v. 161, n. 9, p. 625-631, 2013.
- PANG, J. H.; MA, B.; SUN, H.; ORTIZ, G. I.; IMANISHI, S.; SUGAYA, S.; GEMMA, H.; EZURA, H. Identification and characterization of ethylene receptor homologs expressed during fruit development and ripening in persimmon (*Diospyros kaki* Thumb.). **Postharvest Biology and Technology**, v. 44, n. 3, p. 195-203, 2007.
- PARK, Y.-S.; LEONTOWICZ, H.; LEONTOWICZ, M.; NAMIESNIK, J.; JESION, I.; GORINSTEIN, S. Nutraceutical value of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) and its influence on some indices of atherosclerosis in an experiment on rats fed cholesterol-containing diet. **Advanced Horticultural Science**, v. 22, n. 4, p. 250-254, 2008.

- PÉREZ, E. M. S.; IGLESIAS, M. J.; ORTIZ, F. L.; PÉREZ, I. S.; GALERA, M. M.. Study of the suitability of HRMAS NMR for metabolic profiling of tomatoes: Application to tissue differentiation and fruit ripening. **Food Chemistry**, v. 122, n. 3, p. 877-887, 2010.
- PESIS, E. The role of the anaerobic metabolites, acetaldehyde and ethanol, in fruit ripening, enhancement of fruit quality and fruit deterioration. **Postharvest Biology and Technology**, v. 37, n. 1, p. 1-9, 2005.
- PIOTTO, M.; ELBAYED, K.; WIERUSZESKI, J.; LIPPENS, G. Practical aspects of shimming a high resolution magic angle spinning probe. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 173, n. 1, p. 84-89, 2005.
- PLAZA, L.; COLINA, C.; ANCOS, B.; SÁNCHEZ-MORENO, C.; PILAR CANO, M. Influence of ripening and astringency on carotenoid content of high-pressure treated persimmon fruit (*Diospyros kaki* L.). **Food Chemistry**, v. 130, n. 3, p. 591-597, 2012.
- RIGHI, V.; SCHENETTI, V.; MUCCI, A. A new NMR technique: HR-MAS applied to animal and vegetable soft materials, in: M.P. Colombini, L. Tassi (Eds.), *New trends in analytical, environmental and cultural heritage chemistry*, Trnasworld Research Network, Trivandrum, India, p. 31-42, 2008.
- RITOTA, M.; CASCIANI, L.; FAILLA, S.; VALENTINI, M. HRMAS-NMR spectroscopy and multivariate analysis meat characterization. **Meat Science**, v. 92, n.4, p. 754-761, 2012a.
- RITOTA, M.; CASCIANI, L.; HAN, B.; COZZOLINO, S.; LEITA, L.; SEQUI, P.; VALENTINI, M. Traceability of Italian garlic (*Allium sativum*L.) by means of HRMAS-NMR spectroscopy and multivariate data analysis. **Food Chemistry**, v. 135, n. 2, p. 684-693, 2012b.
- ROSSMANN, A. Determination of stable isotope ratios in food analysis. **Food Reviews International**, v. 17, n. 3, p. 347-381, 2001.
- RUHLAND, T.; ANDERSEN, K.; PEDERSEN, H. Selenium-linking strategy for traceless solid-phase synthesis: direct loading, aliphatic C-H bond formation upon cleavage and reaction monitoring by gradient MAS NMR spectroscopy. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 63, n. 25, p. 9204-9211, 1998.

- RYU, S.; FURIHATA, K.; KODA, M.; WEI, F.; MIYAKAWA, T.; TANOKURA, M. NMR-based analysis of the chemical composition of Japanese persimmon aqueous extracts. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 54, n. 3, p. 213-221, 2016.
- SACCO, A.; BOLSI, I. N.; MASSINI, R.; SPRAUL, M.; HUMPFER, E.; GHELI, S. Preliminary Investigation on the characterization of durum wheat flours coming from some areas of South Italy by means of ¹H High-Resolution Magic Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 10, p. 4242-4249, 1998.
- SALVADOR, A.; ARNAL, L.; BESADA, C.; LARREA, V.; HERNANDO, I.; PÉREZ-MUNUERA, I. Reduced effectiveness of the treatment for removing astringency in persimmon fruit when stored at 15 °C: Physiological and microstructural study. **Postharvest Biology and Technology**, v. 49, n. 3, p. 340-347, 2008.
- SALVADOR, A.; ARNAL, L.; BESADA, C.; LARREA, V.; QUILES, A.; PÉREZ-MUNUERA, I. Physiological and structural changes during ripening and deastringency treatment of persimmon fruit cv. 'Rojo Brillante'. **Postharvest Biology and Technology**, v. 46, n. 2, p. 181-188, 2007.
- SANTOS, A. D. C.; FONSECA, F. A.; LIÃO, L. M.; ALCANTARA, G. B.; BARISON, A. High-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance in foodstuff analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 73, p. 10-18, 2015.
- SANTOS, C. E.; KIST, B. B.; CARVALHO, C.; REETZ, E. R.; DRUM, M. Anuário brasileiro da fruticultura. Santa Cruz do Sul : Editora Gazeta Santa Cruz, 2013.
- SANTOS-BUELGA, C.; SCALBERT, A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 7, p. 1094-1117, 2000.
- SAVORANI, F.; TOMASI, G.; ENGELSEN, S. B. icoshift: A versatile tool for the rapid alignment of 1D NMR spectra. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 202, n. 2, p. 190-202, 2010.

- SCHEIDT, H. A.; PAMPEL, A.; NISSLER, L.; GEBHARDT, R.; HUSTER, D. Investigation of the membrane localization and distribution of flavonoids by high-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes**, v. 1663, n. 1-2, p. 97-107, 2004.
- SENER, S. D.; CHAPMAN, G. W.; FORBUS, W. R.; PAYNE, J. A. Sugar and Nonvolatile Acid Composition of Persimmons During Maturation. **Journal of Food Science**, n. 56, v. 4, p. 989-991, 1991.
- SEYMOUR, G. B.; TAYLOR, J. E.; TRUCKER, G. A. **Biochemistry of fruit ripening**. Springer Netherlands, p. 151-187, 1993.
- SHAPIRO, M. J.; GOUNARIDES, J. S. High Resolution MAS-NMR in combinatorial chemistry. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 71, n. 2, p. 130-148, 2000/2001.
- SHEPHERD, L. V. T.; FRASER, P.; STEWART, D. Metabolomics: a second-generation platform for crop and food analysis. **Bioanalysis**, v. 3, n. 10, p. 1143-1159, 2011.
- SHINTU, L.; CALDARELLI, S. High-Resolution MAS NMR and chemometrics: characterization of the ripening of Parmigiano Reggiano Cheese. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 4026-4031, 2005.
- SHINTU, L.; CALDARELLI, S. Toward the Determination of the geographical origin of Emmental(er) Cheese via High Resolution MAS NMR: A Preliminary. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 12, p. 4148-4154, 2006.
- SHINTU, L.; CALDARELLI, S.; FRANKE, B. M. Pre-selection of potential molecular markers for the geographic origin of dried beef by HR-MAS NMR spectroscopy. **Meat Science**, v. 76, n. 4, p. 700-707, 2007.
- SILVA, C. W. P. **Análise de biofluidos através de RMN aliada a quimiometria para caracterização de tumores e seu diagnóstico precoce**. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Paraná, 2010.
- SILVA, L. M. A.; FILHO, E. G. A.; CHOZE, R.; LIÃO, L. M.; ALCANTARA, G. B. ¹H HRMAS NMR spectroscopy and chemometrics for evaluation of metabolic changes in *Citrus sinensis* caused by *Xanthomonas*

- axonopodis* pv. *Citri*. **Journal of Brazilian Chemistry Society**, v. 23, n. 6, p. 1054-1061, 2012.
- SMOLINSKA, A.; BLANCHET, L.; BUYDENS, L. M. C.; WIJMENGA, S. S. NMR and pattern recognition methods in metabolomics: From data acquisition to biomarker discovery: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 750, p. 82-97, 2012.
- SOUZA, E. L.; SOUZA, A. L. K.; TIECHER, A.; GIRARDI, C. L.; NORA, L.; SILVA, J. A. DA; ARGENTA, L. C.; ROMBALDI, C. V. Changes in enzymatic activity, accumulation of proteins and softening of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) flesh as a function of pre-cooling acclimatization. **Scientia Horticulturae**, v. 127, n. 3, p. 242-248, 2011.
- SOUZA, S. A. A.; MAGALHÃES, A.; FERREIRA, M. M. C. Optimized bucketing for NMR spectra: three case studies. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 122, p. 93-102, 2013.
- STAAB, J. M.; O'CONNELL, T. M.; GOMEZ, S. M. Enhancing metabolomic data analysis with Progressive Consensus Alignment of NMR Spectra (PCANS). **BMC Bioinformatics**, v. 11, n. 1, p. 1-15, 2010.
- SUGIURA, A.; TAO, R.; TOMANA, T. Distinguishing between Japanese persimmon cultivars (*Diospyros kaki* L.) by means of Pollen Isozymes. **Scientia Horticulturae**, v. 38, n.1-2, p. 67 -77, 1988.
- SUGIURA, A.; YONEMORI, K.; HARADA, H.; TOMAMA, T. Changes of ethanol and acetaldehyde contents in Japanese persimmon fruits and their relation to natural deastringency. **Studies from Institute of Horticulture of Kyoto University**, v. 9, p. 41-47, 1979.
- SUZUKI, TAKUYA; SOMEYA, SHINICHI; HU, FANGYU; TANOKURA, MASARU. Comparative study of catechin compositions in five Japanese persimmons (*Diospyros kaki*). **Food Chemistry**, v. 93, n. 1, p. 149-152, 2005.
- TOFANELLI, M. B. D.; FERNANDES, M. S.; FILHO, O. B. M.; CARRIJO, N. S. Perdas de frutas frescas no comércio varejista de mineiros – GO: Um estudo de caso. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, n. 3, p. 513-517, 2007.

- TOMASI, G.; VAN DEN BERG, F.; ANDERSSON, C. Correlation optimized warping and dynamic time warping as preprocessing methods for chromatographic data. **Journal of Chemometrics**, v. 18, n. 5, p. 231-241, 2004.
- VALENTINI, M.; RITOTA, M.; CAFIERO, C.; COZZOLINO, S.; LEITA, L.; SEQUI, P. The HRMAS-NMR tool in foodstuff characterisation. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 49, p. 121-125, 2011.
- VEBERIC, R.; JURHAR, J.; MIKULIC-PETKOVSEK, M.; STAMPAR, F.; SCHMITZER, V. Comparative study of primary and secondary metabolites in 11 cultivars of persimmon fruit (*Diospyros kaki* L.). **Food Chemistry**, v. 119, n. 2, p. 477-483, 2010.
- VERMATHEN, M.; MARZORATI, M.; BAUMGARTNER, D.; GOOD, C.; VERMATHEN, P. Investigation of different apple cultivars by high resolution magic angle spinning NMR. A feasibility study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 24, p. 12784-12793, 2011.
- VILLAS-BÔAS, S. G.; RASMUSSEN, S.; LANE, G. A. Metabolomics or metabolite profile?. **Trends in Biotechnology**, v. 23, n. 8, p. 385-386, 2005.
- VOGELS, J. T. W. E.; TAS, A. C.; VENEKAMP, J.; VAN DER GREEF, J. Partial linear fit: A new NMR spectroscopy preprocessing tool for pattern recognition applications. **Journal of Chemometrics**, v. 10, n. 5-6, p. 425-438, 1996.
- VU, T. N.; VALKENBORG, D.; SMETS, K.; VERWAEST, K. A.; DOMMISSE, R.; LEMIÈRE, F.; VERSCHOREN, A.; GOETHALS, B.; LAUKENS, K. An integrated workflow for robust alignment and simplified quantitative analysis of NMR spectrometry data. **BMC Bioinformatics**, v. 12, n. 1, p. 1-14, 2011.
- WISHART, D. Metabolomics: applications to food science and nutrition research. **Trends in Food Science e Technology**, v. 19, n. 9, p. 482-493, 2008.
- WONG, J. W. H.; DURANTE, C.; CARTWRIGHT, H. M. Application of Fast Fourier Transform Cross-Correlation for the Alignment of Large

- Chromatographic and Spectral Datasets. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 17, p. 5655-5661, 2005.
- WU, W.; DASZYKOWSKI, M.; WALCZAK, B.; SWEATMAN, B. C.; CONNOR, S. C.; HASELDEN, J. N.; CROWTHER, D. J.; GILL, R. W.; LUTZ, M. W. Peak Alignment of Urine NMR Spectra Using Fuzzy Warping. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 46, n. 2, p. 863-875, 2006.
- YAMAGISHI, M.; MATSUMOTO, S.; NAKATSUKA, A.; ITAMURA, H. Identification of persimmon (*Diospyros kaki*) cultivars and phenetic by more effective RAPD analysis. **Scientia Horticulturae**, v. 105, n. 2, p. 283 – 290, 2005.
- ZERBINI, P.E.; GIUDETTI, G.; RIZZOLO, A.; GRASSI, M. Harvest and quality indexes of peach. **Informatore Agrario**. v. 57, p. 57–60, 2001
- ZHENG, G. H.; SUGIURA, A. Change in sugar composition in relation to invertase activity during growth and ripening of persimmon. **Journal of the Japanese Society for Horticultural**, v. 59, n. 2, p. 281-287, 1990.
- ZHOU, C.; ZHAO, D.; SHENG, Y.; TAO, J.; YANG, Y. Carotenoids in fruits of different persimmon cultivars. **Molecules**, v. 16, n. 1, p. 624-636, 2011.

ANEXO I

A atribuição de sinais de RMN em alimentos está bem estabelecida na literatura com a maioria dos trabalhos relatando, basicamente, a composição de metabólitos primários (carboidratos, ácidos orgânicos e aminoácidos). Um exemplo da potencialidade da RMN HR-MAS na identificação de substâncias foi demonstrado por CASTEJÓN et al. (2010) onde cerca de 160 metabólitos foram assinalados no perfil espectral de salmão do Atlântico (*Salmo salar*).

No entanto, no presente trabalho, não foi possível fazer a atribuição dos sinais baseado somente nos espectros de RMN HR-MAS. Optou-se então por usar a RMN em solução para confirmar a identificação dos compostos. Espectros (1D e 2D) das amostras dos cultivares de caqui - representando o início, o meio e o fim do desenvolvimento - foram adquiridos em um espectrômetro Bruker Avance III 600.

1 – Região δ 1,0-3,1:

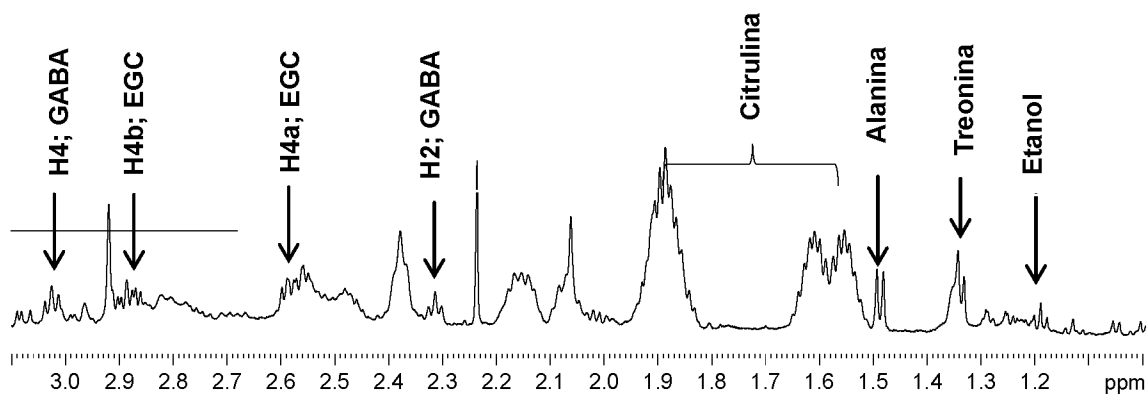


Figura 23. Ampliação da região entre δ 1,00-3,10 pelo espectro de RMN de 1H em solução de FS. (D₂O, 600,13 MHz). GABA: Ácido gama aminobutírico; EGC: Epigallocatequina

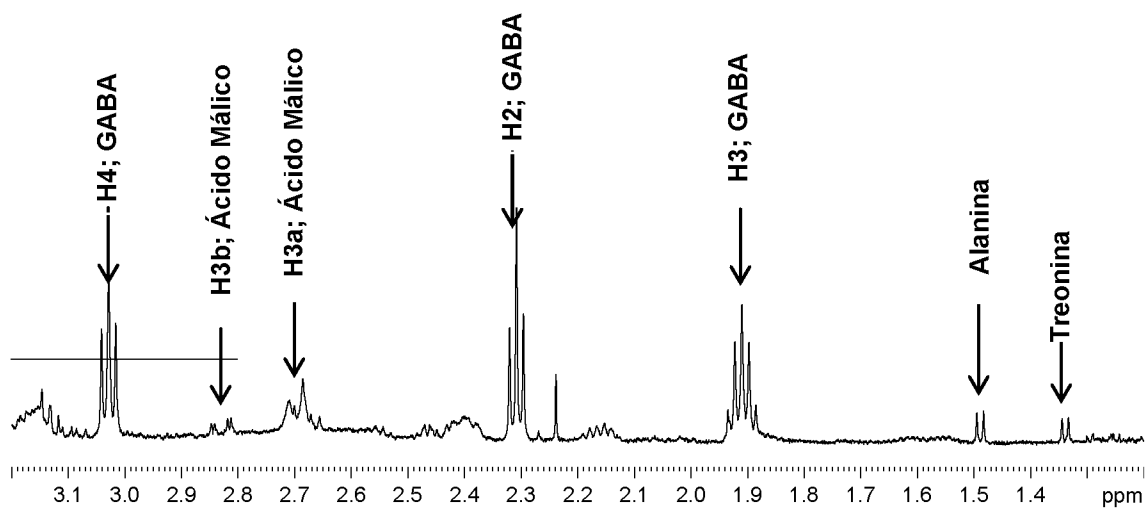


Figura 24. Ampliação da região entre δ 1,20-3,20 do espectro de RMN de 1H em solução de FD. (D₂O, 600,13 MHz). GABA: Ácido gama aminobutírico.

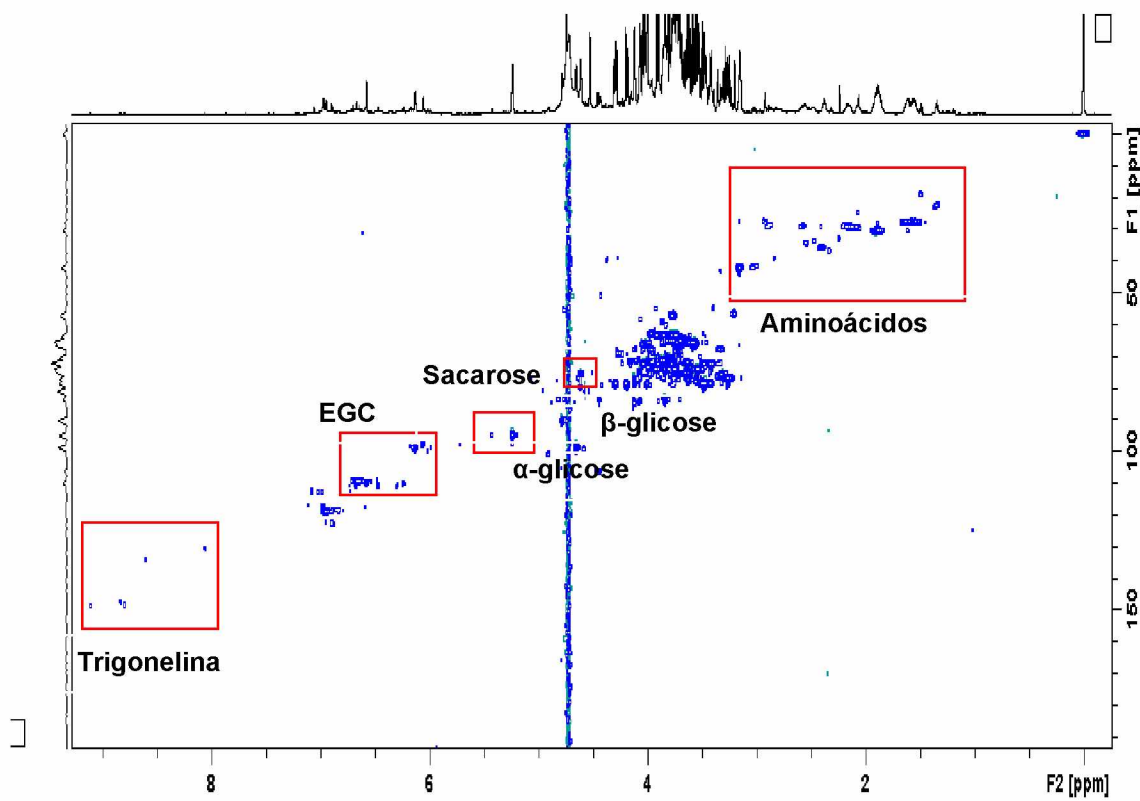


Figura 25. Mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C (600 MHz, D_2O) de FS.

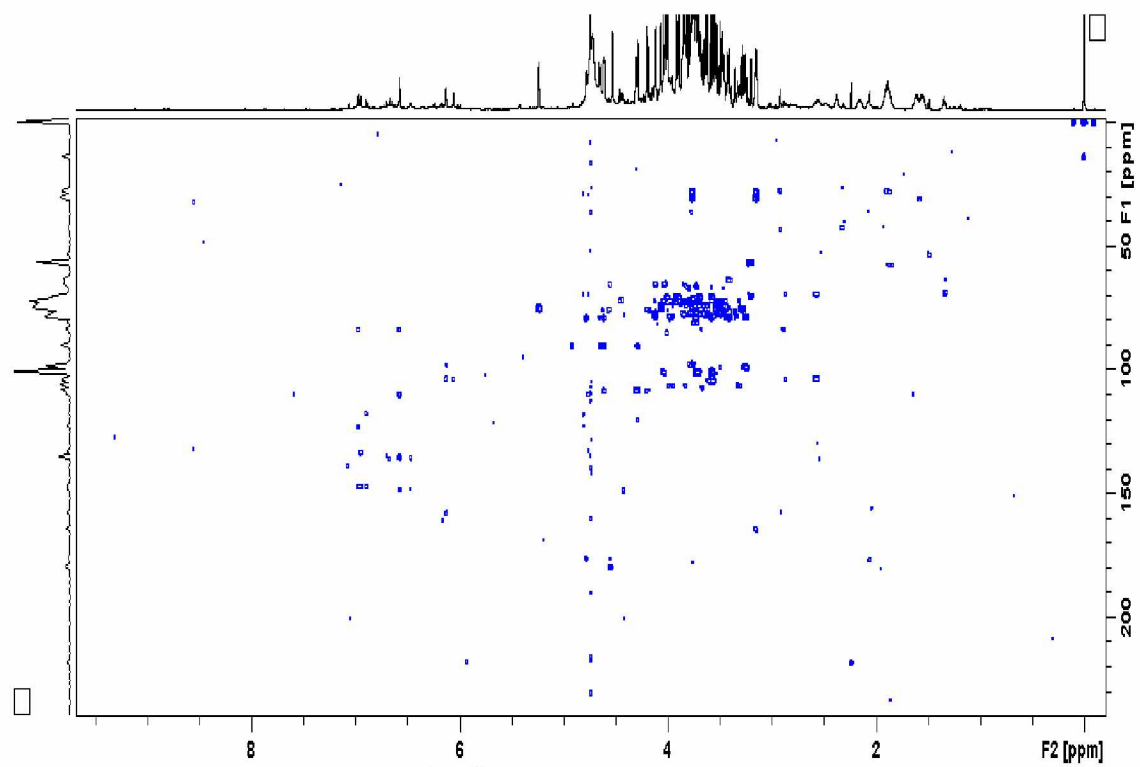
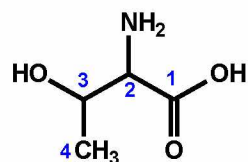


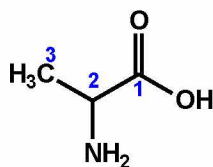
Figura 26. Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (600 MHz, D_2O) de FS.



Treonina

Tabela 2. Dados espectrais atribuídos a treonina

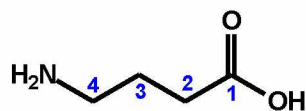
Posição	Treonina		Treonina (Ryu et al., 2015)	
	^1H (mult; J em Hz)	^{13}C	^1H (mult; J em Hz)	^{13}C
1	-	-	-	-
2	3,59 (<i>d</i> ; 8,9)	63,7	3,59	-
3	4,29 (<i>m</i>)	69,3	4,24	-
4	1,34 (<i>d</i> ; 6,5)	22,4	1,31	-



Alanina

Tabela 3. Dados espectrais atribuídos a alanina

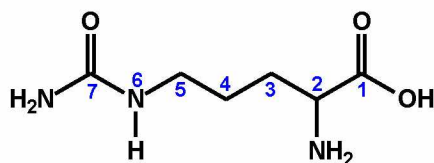
Posição	Alanina		Alanina (Ryu et al., 2015)	
	^1H (mult; J em Hz)	^{13}C	^1H (mult; J em Hz)	^{13}C
1	-	-	-	-
2	3,75 (<i>m</i>)	57,5	3,75 (<i>m</i>)	57,5
3	1,48 (<i>d</i> ; 7,0)	19,1	1,48 (<i>d</i> ; 7,0)	19,1



GABA

Tabela 4. Dados espectrais atribuídos ao GABA.

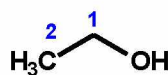
Posição	GABA		GABA (Ritota et al., 2012)	
	^1H (mult; J em Hz)	^{13}C	^1H (mult; J em Hz)	^{13}C
1	-	-	-	-
2	2,30 (<i>t</i> ; 7,3)	37,0	2,30 (<i>t</i> ; 7,3)	34,6
3	1,91 (<i>m</i>)	30,5	1,91 (<i>m</i>)	24,0
4	3,02 (<i>d</i> ; 7,5)	42,2	3,02 (<i>d</i> ; 7,5)	39,6



Citrulina

Tabela 5. Dados espectrais atribuídos a Citrulina.

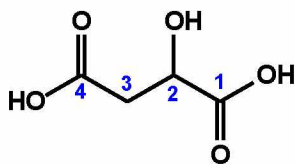
Posição	Citrulina		Citrulina (Ritota et al., 2012)	
	^1H (mult; J em Hz)	^{13}C	^1H (mult; J em Hz)	^{13}C
1	-	-	-	-
2	3,76 (<i>m</i>)	57,5	3,75	57,2
3	1,88 (<i>m</i>)	30,5	1,86	30,3
4	1,55 (<i>m</i>) 1,61 (<i>m</i>)	27,8	1,51 1,57	27,5
5	3,15 (<i>t</i> ; 6,7)	42,1	3,13	42,1
6	-	-	6,38	-
7	-	-	-	-



Etanol

Tabela 6. Dados espectrais atribuídos ao Etanol.

Posição	Etanol		Etanol (Ritota et al., 2012)	
	^1H (mult; J em Hz)	^{13}C	^1H (mult; J em Hz)	^{13}C
1	-	-	3,65 (<i>q</i>)	-
2	1,19 (<i>t</i> ; 7,0)	19,1	1,18 (<i>t</i> ; 7,0)	19,5



Ácido málico

Tabela 7. Dados espectrais atribuídos ao ácido málico

Posição	Ácido málico		Ácido málico (Ritota et al., 2012)	
	^1H (mult; J em Hz)	^{13}C	^1H (mult; J em Hz)	^{13}C
1	-	-	-	-
2	4,31 (<i>m</i>)	73,2	4,31 (<i>dd</i> ; 10,5; 2,9)	-
3a	2,41 (<i>dd</i> , 15,2; 4,5)	45,3	2,68 (<i>dd</i> ; 15,2; 2,9)	43,3
3b	2,70 (<i>d</i> , 15,2)		2,38 (<i>dd</i> ; 15,2; 10,5)	
4	-	-	-	-

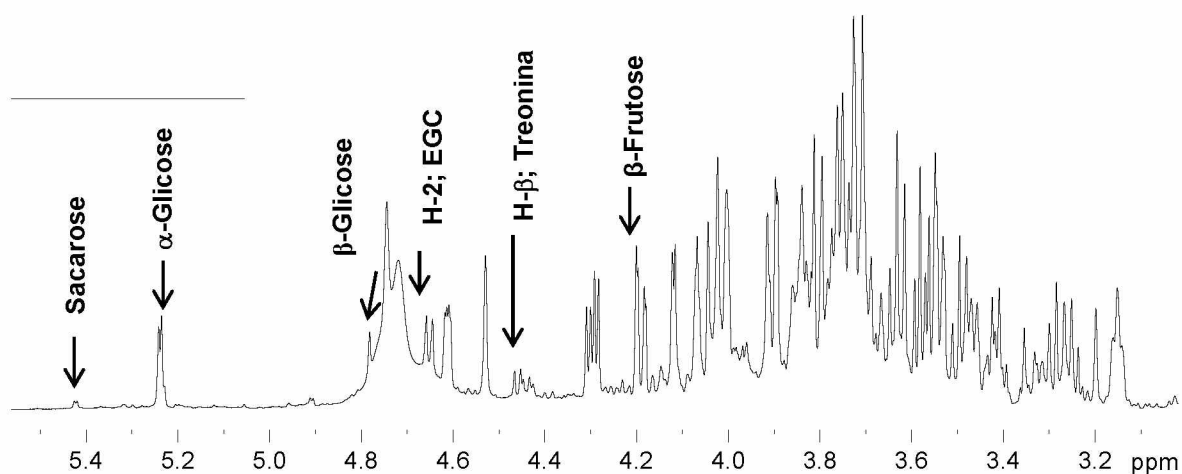
2 – Região δ 3,0-6,0:

Figura 27. Ampliação da região entre δ 3,20-5,50 pelo espectro de RMN de ^1H em solução de FS (D_2O , 600,13 MHz).

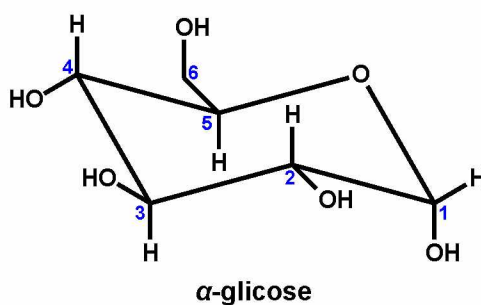


Tabela 8. Dados espectrais atribuídos a α -glicose

Posição	α -glicose		α -glicose (Perez et al., 2010)	
	^1H (mult; J em Hz)	^{13}C	^1H (mult; J em Hz)	^{13}C
1	5,22 (d ; 3,8)	95,2	5,25 (d ; 3,7)	92,9
2	3,53 (d ; 9,8 e 3,8)	74,6	3,57	72,4
3	3,73 (d ; 9,8)	75,6	3,73	73,6
4	3,42 (d ; 9,0)	72,6	3,44	70,5
5	3,80 (m)	72,4	3,73	76,3
6	3,89 (m) 3,90 (m)	63,7	3,88	61,5

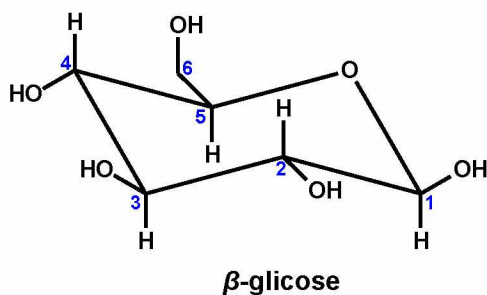


Tabela 9. Dados espectrais atribuídos a β -glicose.

Posição	β -glicose		β -glicose (Perez et al., 2010)	
	^1H (mult; J em Hz)	^{13}C	^1H (mult; J em Hz)	^{13}C
1	4,66 (<i>d</i> ; 7,9)	99,0	4,66 (<i>d</i> ; 7,9)	96,7
2	3,26 (<i>m</i>)	77,4	3,27	75,0
3	3,53 (<i>m</i>)	74,3	3,52	76,6
4	3,47 (<i>d</i> ; 9,0)	72,3	3,42	70,5
5	3,53 (<i>m</i>)	73,9	3,52	76,8
6	3,87 (<i>m</i>)	63,6	3,88	61,6
	3,73 (<i>m</i>)		3,73	

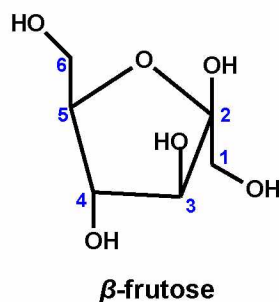
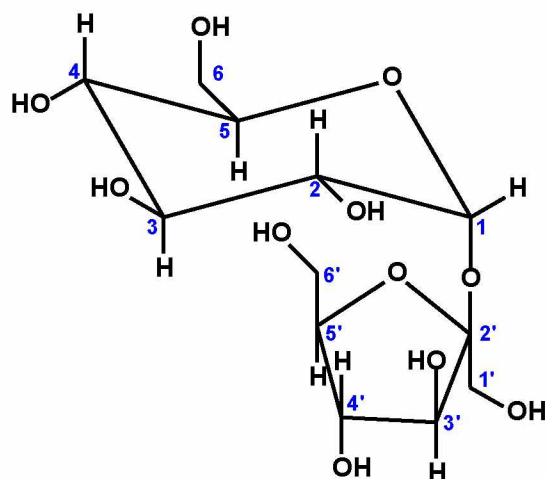


Tabela 10. Dados espectrais atribuídos a β -frutose

Posição	β -frutose		β -frutose (Perez et al., 2010)	
	^1H (mult; J em Hz)	^{13}C	^1H (mult; J em Hz)	^{13}C
1	3,58 (<i>m</i>)	65,7	3,57	63,7
	3,67 (<i>m</i>)		3,55	
2	-	-		102,4
3	4,12 (<i>d</i> ; 3,8)	78,6	4,12	76,3
4	3,72 (<i>m</i>)	75,6		75,3
5	3,83 (<i>m</i>)	83,7	3,82	81,5
6	3,80 (<i>m</i>)	63,7	3,81	63,3
	3,73 (<i>m</i>)		3,69	



Sacarose

Tabela 11. Dados espectrais atribuídos à sacarose

Posição	Sacarose		Sacarose (Ritota et al., 2012)	
	^1H (mult; J em Hz)	^{13}C	^1H (mult; J em Hz)	^{13}C
1	5,42 (<i>d</i> ; 3,8)	95,2	5,42 (<i>d</i> ; 3,9)	93,0
2	3,51 (<i>m</i>)	70,6	3,57 (<i>d</i> ; 9,9 e 3,9)	71,6
3	3,75 (<i>m</i>)	71,2	3,73	72,9
4	3,47 (<i>m</i>)	72,5		70,5
5	3,91 (<i>m</i>)	74,3	3,86	73,1
6	-	-	3,81	60,8
1'	-	-	3,68	61,5
2'	-	-		104,6
3'	-	-	4,22 (<i>d</i> ; 8,8)	77,4
4'	4,11	77,5	4,11	75,4
5'	3,83	83,8	3,88	81,8
6'	3,96	63,0	3,83	62,9

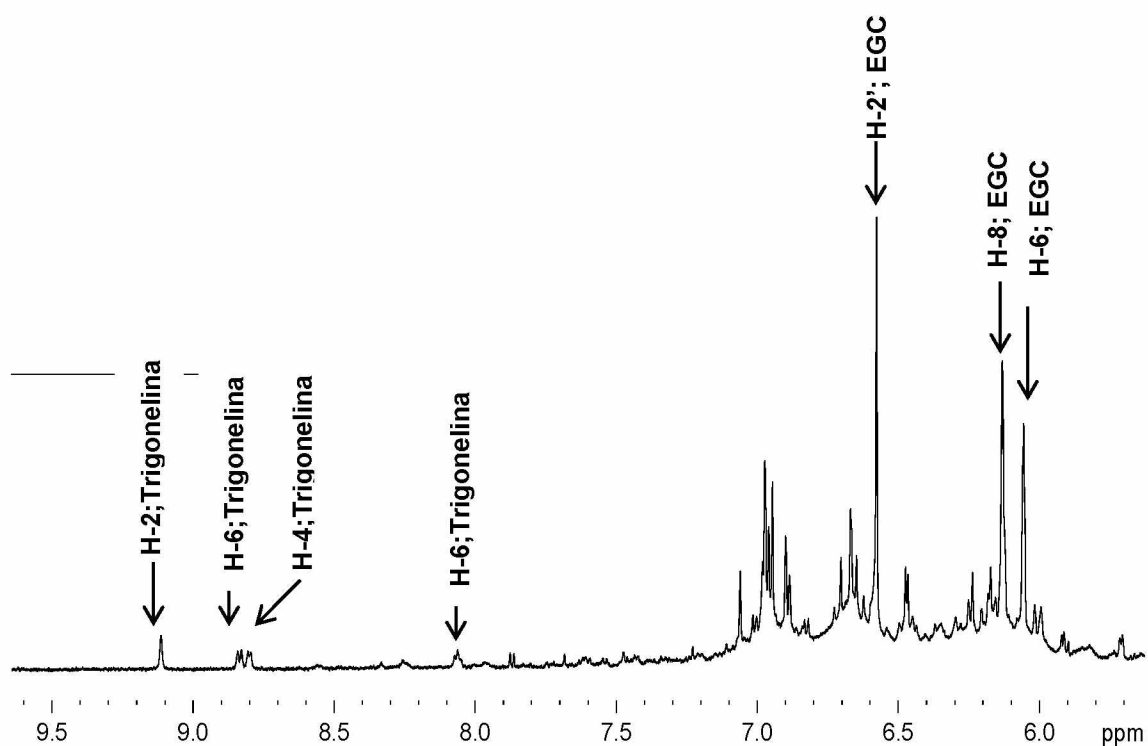
3 – Região δ 6,0-9,5:

Figura 28. Ampliação da região entre δ 5,26-9,60 pelo espectro de RMN de ^1H em solução de FS (D_2O , 600,13 MHz).

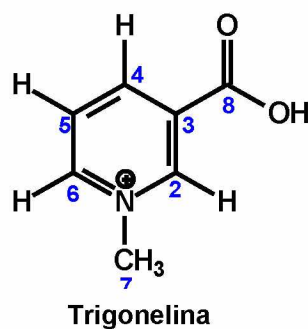
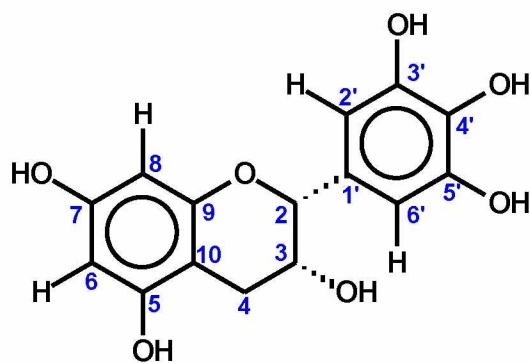


Tabela 12. Dados espectrais atribuídos a trigonelina

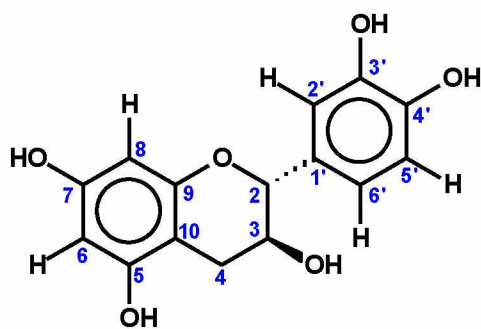
Posição	Trigonelina		Trigonelina (Ryul, et al., 2015)
	^1H (mult; J em Hz)	^{13}C	^1H (mult; J em Hz)
1	-	-	-
2	9,11 (s)	148,9	9,12
3	-	-	-
4	8,83 (<i>d</i> ; 8,1)	147,6	8,84
5	8,06 (<i>dd</i> ; 8,1 e 7,5)	130,8	8,09
6	8,80 (<i>d</i> ; 7,5)	148,9	8,84
7	-	-	-
8	-	-	-



Epigallocatequina

Tabela 13. Dados espectrais atribuídos para epigallocatequina (EGC)

Posição	Epigallocatequina			Epigallocatequina (Yuan et al., 2014) ^a
	¹ H (mult; <i>J</i> em Hz)	¹³ C	HMBC (¹ H- ¹³ C)	¹ H (mult; <i>J</i> em Hz)
1	-	-	-	-
2	4,74 (<i>m</i>)	83,7	1' e 6'	4,92 (<i>m</i>)
3	4,19 (<i>dd</i> ; 10,5 e 2,2)	69,6	-	4,32 (<i>m</i>)
4 _{eq}	2,88 (<i>m</i>)	29,2	2 e 3	2,81 (<i>m</i>)
4 _{ax}	2,57 (<i>m</i>)			2,93 (<i>m</i>)
5	-	-	-	-
6	6,05 (<i>d</i> ; 2,5)	98,4	7, 8 e 10	-
7	-	157,2	-	-
8	6,13 (<i>d</i> ; 2,5)	99,8	6, 7, 9 e 10	-
9		158,3		
10		103,6		
1'	-	132,9	-	-
2'	6,58 (<i>s</i>)	110,1	-	6,59 (<i>s</i>)
3'	-	148,5	-	-
4'	-	135,3	-	-
5	-	148,5	-	-
6'	6,58 (<i>s</i>)	110,1	2, 3', 2' e 4'	6,59 (<i>s</i>)



Catequina

Tabela 14. Dados espectrais atribuídos para catequina (C)

Posição	Catequina			Catequina (Mattahei, 2007)
	^1H (mult; J em Hz)	^{13}C	HMBC (^1H - ^{13}C)	^1H (mult; J em Hz)
1	-	-	-	-
2	4,74 (<i>m</i>)	83,6	1' e 6'	-
3	4,29 (<i>dd</i> ; 10,5 e 5,2)	79,0	-	4,19 (<i>m</i>)
4 _{eq}	2,89 (<i>m</i>)	29,2	2, 3 e 10	2,88 (<i>dd</i> ;----)
4 _{ax}	2,57 (<i>m</i>)			2,45 (<i>dd</i> ;----)
5	-	-	-	-
6	6,05 (<i>d</i> ; 2,5)	98,4	8 e 10	5,95 (<i>d</i>)
7	-	157,2	-	-
8	6,13 (<i>d</i> ; 2,5)	99,8	6, 7, 9 e 10	6,10 (<i>d</i>)
9		158,3		
10		103,6		
1'	-	133,5	-	-
2'	6,97 (<i>d</i> ; 2,0)	117,8	2,3', 4' e 6'	6,90 (<i>d</i>)
3'	-	141,0	-	-
4'	-	147,0	-	-
5	6,94 (<i>d</i> ; 8,0)	119,2	1', 3' e 4'	3,88 (<i>d</i>)
6'	6,89 (<i>dd</i> ; 8,0 e 2,0)	122,8	2, 3', 4' e 2'	6,83 (<i>dd</i>)

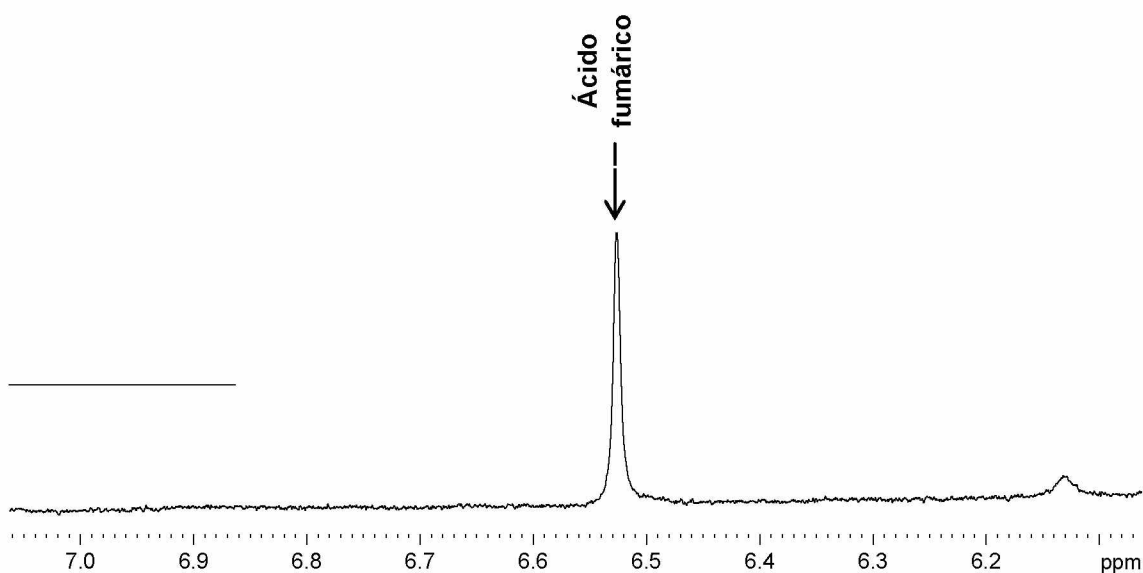
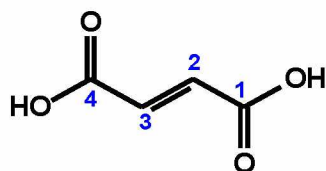


Figura 29. Ampliação da região entre δ 6,1-7,1 do espectro de RMN de ^1H (em solução) para amostra FM. (D_2O , 400).



Ácido fumárico

Tabela 15. Dados espectrais atribuídos ao ácido fumárico.

Posição	Ácido Fumárico		Ácido fumárico (Ritota et al., 2012)	
	^1H (mult; J em Hz)	^{13}C	^1H (mult; J em Hz)	^{13}C
1	-	177,0-	-	-
2	6,52 (s)	138,2	6,52	-
3	6,52 (s)	138,2	6,52	-
4	-	177,0	-	-

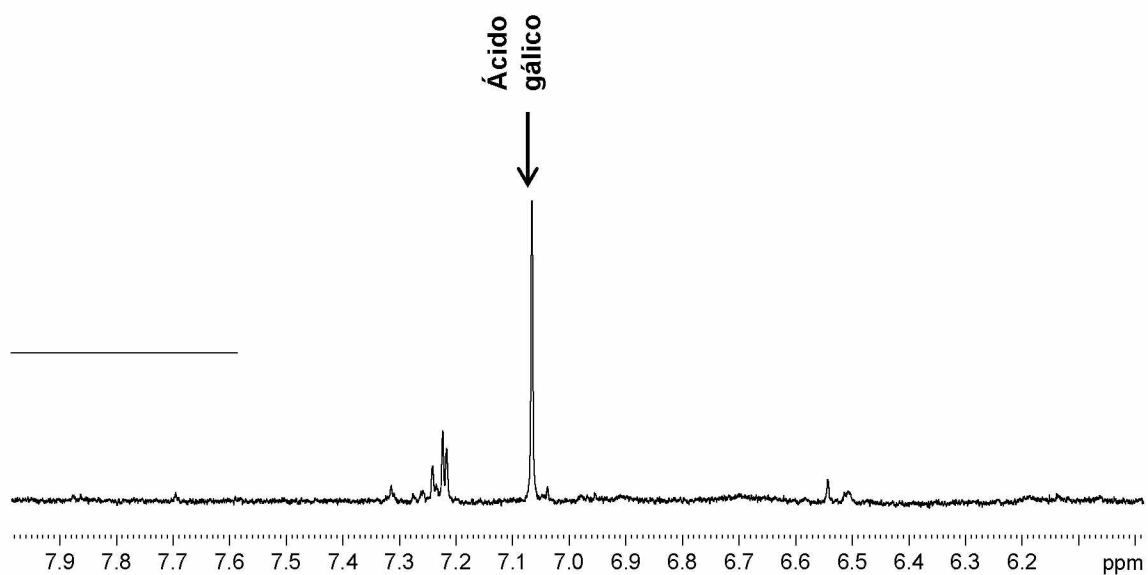
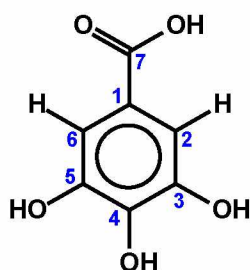


Figura 30. Ampliação da região entre δ 6,1-7,1 do espectro de RMN de ^1H em solução de GM. (D_2O , 600).



Ácido gálico

Tabela 16. Dados espectrais atribuídos ao ácido gálico.

Posição	Ácido gálico		Ácido gálico (Al-Zahrani, 2012)	
	^1H (mult; J em Hz)	^{13}C	^1H (mult; J em Hz)	^{13}C
1	-	-	-	121,9
2	7,06 (s)	112,5	7,07	111,2
3	-	-	-	146,7
4	-	139,0	-	140,0
5	-	-	-	146,7
6	7,06 (s)	112,5	7,07	111,2
7	-	177,3	-	168,7

Referências:

- AL-ZAHRANI, S. H. M. Antibacterial activities of gallic acid methyl ester on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of American Science**, v. 8, p. 07-12, 2012.
- RYU, S.; FURIHATA, K.; KODA, M.; WEI, F.; MIYAHAWA, T.; TANOKURA. NMR-based analysis of the chemical composition of Japanese persimmon aqueous extracts. **Magnetic Resonance Chemistry**, v. 54, n. 3, p. 213-221, 2016.
- YUAN, Y.; SONG, Y.; JING, W.; WANG, Y.; YANG, X.; LIU, D. Simultaneous determination of caffeine, gallic acid, theanine, (-)-epigallocatechin-3-gallate in green tea using quantitative ¹H NMR spectroscopy. **Analytical Methods**, v. 6, n. 3, p. 907-914, 2014.