



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

GIVALDO SOUZA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DE GUARANÁ (*Paullinia cupana*)
EMPREGANDO RMN, HPLC E UHPLC-MS ASSOCIADAS À FERRAMENTAS
QUIMIOMÉTRICAS VISANDO À SUA INDICAÇÃO GEOGRÁFICA**

**ILHÉUS – BAHIA
2016**

GIVALDO SOUZA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DE GUARANÁ (*Paullinia cupana*)
EMPREGANDO RMN, HPLC E UHPLC-MS ASSOCIADAS À FERRAMENTAS
QUIMIOMÉTRICAS VISANDO À SUA INDICAÇÃO GEOGRÁFICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Química. Área de concentração: Química Analítica Aplicada. Linha de Pesquisa: Análise de Alimentos e Bebidas

Orientador: Prof. Dr. Raildo Mota de Jesus (UESC)

Coorientador: Dr. Kirley Marques Canuto (EMBRAPA)

**ILHÉUS - BAHIA
2016**

S586 Silva, Givaldo Souza da.
Avaliação do perfil químico de guaraná (*Paullinia cupana*) empregando RMN, HPLC e UPLC-MS associadas a ferramentas quimiométricas visando à sua indicação geográfica / Givaldo Souza da Silva. – Ilhéus, BA: UESC, 2016.
xiv, 125 f. : il.

Orientador: Raldo Mota de Jesus.
Co-orientador: Kirley Marques Canuto.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Química.
Inclui referências.

1. Química analítica. 2. Guaraná. 3. Alimentos – Análise. 4. Cafeína – Efeitos fisiológicos. 5. Ressonância magnética nuclear. 6. Cromatografia líquida. I. Título.

CDD 543

GIVALDO SOUZA DA SILVA

AVALIAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DE GUARANÁ (*Paullinia cupana*)
EMPREGANDO RMN, HPLC E UPLC-MS ASSOCIADAS À FERRAMENTAS
QUIMIOMÉTRICAS VISANDO A SUA INDICAÇÃO GEOGRÁFICA

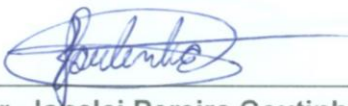
Ilhéus, 29/ 01/ 2016.



Dr. Raildo Mota de Jesus - UESC
Dr. em Química Analítica (UFBA)
(Orientador)



Dr. Edy Sousa de Brito – Embrapa Agroindústria Tropical
Dr. em Tecnologia de Alimentos (UNICAMP)



Dr. Janclei Pereira Coutinho - UESC
Dr. em Ciências dos Alimentos (UNICAMP)

Dedico este trabalho a Deus, pois ele tem me permitido força e sabedoria para vencer os obstáculos da vida, aos meus pais Gileno e Maria por serem eles meu porto seguro, minha referência de força, dignidade, honestidade e justiça. E meus irmão e amigos que contribuíram na minha formação enquanto ser humano.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me permitir a dádiva que é a vida, com força, com saúde.

Aos meus pais Gileno e Maria, e aos meus familiares pelo apoio em todas as etapas de minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Raildo Mota de Jesus, pela orientação, ensinamentos, conselhos, confiança e amizade.

Aos professores do PPGQuim, que contribuíram para minha formação humana e acadêmica.

A toda equipe do laboratório de Laboratório Multiusuário De Química De Produtos Naturais (LMQPN) da Embrapa Agroindústria Tropical, Prof. Dr. Kirley, Prof. Dr. Edy, Prof. Dr. Guilherme, aos analistas Dra. Lorena Mara e Dr. Paulo Ribeiro, e técnica Dra. Trigressa Rodrigues, que me receberam de braços abertos, e sempre foram extremamente solícitos e estavam sempre dispostos a me ajudar.

À Câmara Setorial do Guaraná do Baixo Sul, em especial ao Sr. Gerval Teófilo Brito e demais colaboradores, aos técnicos agrícolas da região, pelo apoio, disponibilidade e grande mobilização para a coleta das amostras, e aos produtores de guaraná pelo fornecimento das amostras.

A Profa. Dra. Rogete Mendonça do Instituto Federal do Amazonas, que obteve as amostras guaraná oriundas do comercio amazonense.

Aos colegas do Laboratório de Pesquisa em Química Análítica – LPQA, Madson, Luana, José Lucas, Herick, Leonardo, Luís Henrique, Roberta, Vinnicius Henrique, Bruna e André, pelo companheirismo, os bons momentos de distração, as conversas e discussões sobre a vida e a carreira acadêmica.

Aos meus colegas de turma do mestrado Wesley, Vinicius, Tiago, Claudio, Mayara, Pablo e Kesia pela convivência, os bons momentos de estudos, discussões.

Aos meus colegas de trabalho da UFOB, Lucinéia, Aline, Rony, Cloves, Juliana e Jorge por sempre estarem disponíveis a me ajudar nos meus afastamentos.

A UESC por ser a instituição que forneceu toda estrutura, tanto física quanto humana, que possibilitou a minha formação.

A CAPES, FINEP e a FAPESB que foram as agências fomentadoras do meu projeto de mestrado.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente para realização desse trabalho.

... O fim de uma viagem é apenas o começo de outra. É preciso ver o que não foi visto, ver outra vez o que se viu já, ver na primavera o que se vira no verão, ver de dia o que se viu de noite, com o sol onde primeiramente a chuva caía, ver a seara verde, o fruto maduro, a pedra que mudou de lugar, a sombra que aqui não estava. É preciso voltar aos passos que foram dados, para repetir e para traçar caminhos novos ao lado deles. É preciso recomeçar a viagem. Sempre.

José Saramago

AValiação DO PERFIL QUÍMICO DE GUARANÁ (*Paullinia cupana*) EMPREGANDO RMN, HPLC E UHPLC-MS ASSOCIADAS À FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS VISANDO À SUA INDICAÇÃO GEOGRÁFICA

RESUMO

A cultura do guaranazeiro (*Paullinia cupana*) em escala comercial, no Brasil, foi iniciada no estado do Amazonas, no entanto, na década de 70 a cultura começou a se espalhar pelo país. Com isso a Bahia aliou a boa adaptação climática da cultura a técnicas agrícolas e tornou-se o maior produtor de guaraná do país. Devido à importância econômica do guaraná para o estado da Bahia, faz-se necessário conhecer as suas características químicas do guaraná baiano, uma vez que as características químicas de determinado produto podem variar de acordo de vários fatores, incluindo características do solo, variedade de cultivo e condições ambientais e, dessa forma é possível, por meio de técnicas espectroanalíticas e ferramentas quimiométrica, obtenção de uma "impressão digital química" desses produtos. Nesse contexto identificação da origem geográfica de alimentos de agropecuários é de grande interesse para os consumidores e produtores, pois pode fornecer critérios determinantes para preço e garantias de qualidade. Assim, esse trabalho descreve a aplicação de método de análise multivariada aplicado em dados de Ressonância Nuclear Magnética de ^1H e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (UHPLC-QToF/MS) visando sua indicação geográfica. Foram coletadas amostras de guaraná do município de Maués-AM, nos municípios baianos do Baixo Sul (Valença, Taperoá e Ituberá), Una e do comércio de Ilhéus. A aplicação de análises quimiométricas sobre os espectros de RMN permitiu discriminar as amostras de acordo com a origem, essas por sua vez permitiram verificar que amostras de guaraná da Bahia apresentaram o maior de cafeína, catequina e epicatequina em sua composição, enquanto nas amostras do Amazonas os ácidos graxos foram os principais responsáveis por sua discriminação na análise de componentes principais (PCA). Além disso, RMN e HPLC-UV foram empregadas na estimativa de cafeína nas amostras de guaraná. Os resultados gerados dessas análises corroboraram com a PCA, evidenciando que as amostras de guaraná da Bahia têm concentração maior de cafeína em composição e o teste ANOVA revelou que no nível de 95 % de confiança as concentrações de cafeína entre as amostras são estatisticamente diferentes. Utilizando UHPLC-QToF/MS, os pares "tempo de retenção" e "massa/carga" foram utilizados como dados de entrada para gerar os modelos PCA e OPLS-DA, a OPLS-DA pode ser útil para encontrar componentes marcadores que possam explicar quais os compostos responsáveis por essa diferenciação. Assim, por meio dos tratamentos estatísticos de dados (PCA e OPLS-DA) foi possível alcançar atribuições tentativas dos metabólitos discriminantes nas diferentes classes de amostras. Depois da discriminação dos metabólitos foi possível elucidar os principais responsáveis pela diferenciação das amostras em função do perfil químico e sua respectiva origem, e foi possível inferir que os compostos Catequina, Epicatequina, Dímero de Procianidina do tipo B, Trímero de Procianidina do tipo A, Dímero de Procianidina do tipo A foram os principais responsáveis pela discriminação das amostras do Baixo sul. Desta forma, a RMN e UHPLC-QToF/MS aliadas a quimiometria tem se mostrado uma importante ferramenta em estudos metabólicos e no controle de qualidade de alimentos, em especial produtos agrícolas.

Palavras-chave: Guaraná, composição, cafeína, RMN, UHPLC, OPLS-DA.

**EVALUATION OF THE CHEMICAL PROFILE OF GUARANA (*Paullinia cupana*)
USING NMR AND UHPLC-MS ASSOCIATED WITH TOOLS CHEMOMETRIC AIMING
ORIGIN INDICATION**

ABSTRACT

The guarana crop (*Paullinia cupana*) on a commercial scale in Brazil was initiated in the state of Amazonas (AM), however, in the 70's its cultivation spread across the country. In Bahia (BA), the guarana plant had a good climatic adaptation and allied with good agricultural practices, this state became the country's largest producer of guaraná. Due to the economic importance of guarana for the state of Bahia, it is necessary to know its chemical characteristics of baiano guarana, since the chemical characteristics of a given product may vary according to several factors including soil characteristics, crop variety and environmental conditions, and thus it is possible, through espectroanalíticas techniques and chemometric tools, obtaining a "chemical fingerprint" of these products. In this context identify the geographic origin of agricultural food is of great interest to consumers and producers because it can provide decisive criteria for price and quality assurance. Thus, this work describes the application of multivariate analysis method applied to Nuclear Magnetic Resonance data of ^1H and liquid chromatography coupled to mass spectrometry (UHPLC-QToF / MS). In this study were collected guarana samples from Maués-AM, in some cities of Baixo Sul in Bahia (Valencia, Taperoá and Ituberá), Una and in Ilheus trade. Chemometric analysis on the NMR spectra enabled to discriminate the samples according to the source, revealing that Bahia's guarana samples have the highest caffeine contribution, catechin and epicatechin in the composition, while in the samples from Amazonas the fatty acids were the main responsible for their discrimination on the principal component analysis (PCA). Furthermore, NMR and HPLC were employed in the estimation of caffeine. The results corroborated with PCA, evidencing that Bahia samples of Bahia had higher concentrations of caffeine the ANOVA test showed that on level 95%, the caffeine concentration between samples are statistically different. Using UHPLC-QToF / MS, the pairs retention time and mass / charge were used as input to generate the PCA and OPLS-DA models, OPLS-DA can be useful to find markers components that might explain which the compounds responsible by this differentiation. So, by means of statistical data treatment (OPLS and PCA-DA) was possible achieve putative assignments of the metabolites discriminating in the different classes of samples. After the discrimination of metabolites was possible to elucidate the main responsible for the differentiation of samples in function to the chemical profile and its origin. Additionally, it was also possible to infer that compounds: Catechin, Epicatechin, Dimer Procyanidin type B, trimer procyanidin type A, Dimer Procyanidin type A were mainly responsible for the discrimination of the Baixo Sul samples. Thus, the NMR and UHPLC-QToF / MS

combined with chemometrics have been an important tool in metabolic studies and quality control of food, particularly agricultural products.

Keywords: Guarana, Composition, Caffeine, NMR, HPLC, OPLS-DA

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Fruto do guaraná (Paullinia cupana): a) cacho de frutos; b) o fruto maduro em evidencia, quando aberto que se assemelha a um olho humano.....	23
Figura 1.2: Municípios produtores de guaraná na Região do Baixo Sul da Bahia.....	25
Figura 1.3: Gráfico de produção do guaraná dos últimos anos nos principais estados produtores de guaraná: área plantada em hectare (A); produção em tonelada (P). *Fonte: Dados do IBGE.....	26
Figura 1.4: Estrutura química da Cafeína (1,3,7-trimetil-1H-purina-2,6(3H,7H)-diona)	27
Figura 2.1: Distribuição de publicações científica sobre as aplicações de RMN em na área de ciências e Tecnologia de alimentos compilados da base de dados ISI Web of Science, desde a primeira publicação até 2015, com palavras chave "NMR" e "Food Chemistry".....	32
Figura 2.2: Distribuição de publicações científica sobre as aplicações de RMN em na área de ciências e Tecnologia de alimentos compilados da base de dados ISI Web of Science, desde a primeira publicação até 2015, com palavras chave "NMR" e "Food Processing".....	33
Figura 2.3: Representação dos espectros de RMN de ^1H utilizado nas análises quimiométricas, subtraídos os sinais da HOD e do solvente (Metanol deuterado), representado na faixa cinza.....	44
Figura 2.4: Espectros de RMN de ^1H referente a região de ácido graxo. a) amostras do Amazonas e b) amostras do Baixo Sul.....	45
Figura 2.5: Gráfico de scores da PC1 x PC2 dos espectros de RMN de ^1H das amostras de guaraná do Baixo Sul (●), Comercial - BA (●), Una - Ba (●), Amazonas (●)	46
Figura 2.6: Gráfico de scores e pesos da PC1 x PC2 dos espectros de RMN de ^1H das amostras de guaraná do Baixo Sul (●), Comercial - BA (●), Una - Ba (●), Amazonas (●)	47
Figura 2.7: a) Gráfico de pesos projetado em linhas; b) espectro de RMN de ^1H para ilustrar suas regiões.....	48
Figura 2.8: Espectros de RMN de ^1H referente a região de ácido graxo. a) amostras do Baixo Sul e b) amostras do Amazonas.....	50
Figura 2.9: Diagrama de extremos e quartis do percentual de cafeína em guaraná.....	52
Figura 2.10: Figura 2.10: Cromatograma da amostra de guaraná destaque para o pico referente	53

à cafeína obtido por HPLC ($t = 14,0$ min) e $\lambda = 274$ nm.....	
Figura 2.11: Curva analítica obtida para cafeína empregando HPLC.....	54
Figura 3.1: Curva de van Deemter, ilustrando a evolução do tamanho das partículas para cromatografia líquida.....	62
Figura 3.2: Demonstração das principais diferenças entre PLS-DA e OPLS-DA. Para a PLS-DA (A), a direção discriminatória entre as classes é uma combinação de ambos os t_1 e t_2 . Em (B), OPLS-DA separa a direção discriminatória em $t_{p,1}$ da direção Y-ortogonais $t_{o,1}$, tornando o loadings correspondente $p_{p,1}$, simples para interpretar.....	65
Figura 3.3: Estrutura química da catequina (A) e epicatequina (B).....	68
Figura 3.4: Estrutura química da Procianidina.....	69
Figura 3.5: Diferentes fragmentações entre as procianidinas – (a)Tipo A e (b) Tipo B.....	70
Figura 3.6: Propostas de fragmentação para dímeros de procianidinas do tipo B, mostradas nos picos 2 e 6 com íon precursor em m/z 577.....	72
Figura 3.7: Propostas de fragmentação para os principais íons do trimero de procianidinas do tipo B, mostradas no pico 5 com íon precursor em m/z 577.....	74
Figura 3.8: Propostas de fragmentação para dímeros de procianidinas do tipo A mostradas nos picos 12 e 13 com íon precursor em m/z 575.....	76
Figura 3.9: Gráfico de scores da PC1 x PC2 dos dados usando o tempo de retenção e razão massa carga (T_R - m/z) das amostras de guaraná do Baixo Sul (•), Comercial - BA (●), Una - Ba (●), Amazonas(●).....	77
Figura 3.10: Gráfico de pesos da PC1 x PC2 dos Tempo de Retenção (t_R) das amostras de guaraná obtidos por UHPLC-Qtof/MS.	79
Figura 3.11: Gráfico de pesos da PC1 x PC2 das Massas (m/z) das amostras de guaraná obtidas por UHPLC-Qtof/MS.	79
Figura 3.12: Gráfico de Hotelling's T^2 a partir dos dados de PCA.	80
Figura 3.13: Gráfico de DModX - resumo do ruído do modelo PCA.	81
Figura 3.14: OPLS-DA Gráfico de escore dos grupos BA x U baseados em UHPLC-Q / dados TOF MS em modo negativo.	83
Figura 3.15: Gráfico de dispersão (S-plot): a covariância $p[1]$ x correlação $p[1](corr)(loadings)$ de um modelo de duas classes OPLS-DA (U vs. BA) são mostrados aqui em formato de S-plot.	84
Figura 3.16: Comparação da intensidade relativa dos potenciais biomarcadores entre BA x U.....	86
Figura 3.17: OPLS-DA Gráfico de escore dos grupos AM x BA baseados em dados de UHPLC-Q/TOF MS em modo negativo.....	87
Figura 3.18: Gráfico de dispersão (S-plot): a covariância $p[1]$ x correlação $p[1](corr)(loadings)$ de um modelo de duas classes OPLS-DA (AM vs. BA) são mostrados aqui em formato de S-plot.....	88

Figura 3.19: OPLS-DA Gráfico de escore dos grupos AM x BS baseados em dados de UHPLC-Q/TOF MS em modo negativo.	90
Figura 3.20: Gráfico de dispersão (S-plot): a covariância $p[1]$ x correlação $p[1](corr)(loadings)$ de um modelo de duas classes OPLS-DA (U vs. BA) são mostrados aqui em formato de S-plot.	91
Figura 3.21: Comparação da intensidade relativa dos potenciais marcadores entre AM x BS.....	92
Figura 3.22: OPLS-DA Gráfico de escore dos grupos BS (preto) x U (verde) baseados em dados de UHPLC-Q/TOF MS em modo negativo.	93
Figura 3.23: Gráfico de dispersão (S-plot): a covariância $p[1]$ x correlação $p[1](corr)(loadings)$ de um modelo de duas classes OPLS-DA (BS vs. U) são mostrados aqui em formato de S-plot.....	94
Figura 3.24: Comparação da intensidade relativa dos potenciais marcadores entre BS x U.....	96
Figura 3.25: OPLS-DA Gráfico de escore dos grupos BA (preto) x BS (verde) baseados em dados de UHPLC-Q/TOF MS em modo negativo.	97
Figura 3.26: Gráfico de dispersão (S-plot): a covariância $p[1]$ x correlação $p[1](corr)(loadings)$ de um modelo de duas classes OPLS-DA (Ba vs. BS) são mostrados aqui em formato de S-plot.....	98
Figura 3.27: Comparação da intensidade relativa dos potenciais marcadores entre BA x BS.....	100
Figura 3.28: OPLS-DA Gráfico de escore dos grupos AM (preto) x U (verde) baseados em dados de UHPLC-Q/TOF MS em modo negativo.	101
Figura 3.29: Gráfico de dispersão (S-plot): a covariância $p[1]$ x correlação $p[1](corr)(loadings)$ de um modelo de duas classes OPLS-DA (AM vs. U) são mostrados aqui em formato de S-plot.....	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Origem e identificação das amostras de guaraná	35
Tabela 2.2: Principais compostos identificados.....	40
Tabela 2.3: Estimativa de cafeína por RMN.....	52
Tabela 2.4: Resumo da análise de variância - fator único para percentual de cafeína obtidos por RMN.....	53
Tabela 2.5: Concentração média de cafeína nos grupos, determinada por HPLC.....	54
Tabela 2.6: Resumo da ANOVA - fator único para percentual de cafeína em guaraná obtido por HPLC.....	55
Tabela 2.7: Concentração de cafeínas nas amostras de guaraná e seu respectivo desvio padrão relativo (RSD) por RMN e por HPLC.....	56
Tabela 2.8: Estimativa da concentração de cafeína por RMN vs. HPLC.....	57
Tabela 2.9: Resumo da análise de variância - fator único para o percentual de cafeína obtida por RMN versus HPLC.....	57
Tabela 3.1: Constituintes identificados ou tentativamente identificados em Paullinia cupana.....	69
Tabela 3.2: Tempo de retenção/Massa de compostos como potencial biomarcadores para amostras de BA x U.	84
Tabela 3.3: Tempo de retenção/Massa de compostos como potencial biomarcadores para amostras de AM x BA.....	89
Tabela 3.4: Tempo de retenção/Massa de compostos como potencial biomarcadores para amostras de AM x BS.....	91
Tabela 3.5: Tempo de retenção/Massa de compostos como potencial biomarcadores para amostras de BS x U.	95
Tabela 3.7: Tempo de retenção/Massa de compostos como potencial biomarcadores para amostras de BS x BS.	99
Tabela 3.7: Tempo de retenção/Massa de compostos como potencial biomarcadores para amostras de AM x U.....	103

LISTA DE SIGLAS, SIMBOLOS E ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
AQ	Tempo de Aquisição
BFF	Fenzofuran-Forming Fission
CD ₃ OD	Metanol deuterado
COSY	Correlated Spectroscopy
d1	Tempo de espera entre uma aquisição
D ₂ O	Oxido de deutério
DEQ	Diagrama de Extremos e Quartis
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ESI	Ionização por eletrospray
ESI ⁻	Polaridade negativa de ESI
FE	Fase Estacionária
FID	Free Induction Decay
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
FT-Raman	Fourier Transform Raman
GC	Gas chromatography
HETP	Altura Equivalente para Pratos Teórico/Eficiência Teórica da Coluna
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation- - Fourier Transform Raman Spectroscopy
HPLC	High Performance Liquide Chromatography
HRF	Clivagem Heterocíclica do anel
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
Hz	Hertz
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICP OES	Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma Acoplado Indutivamente
ICP-MS	Espectrometria de Massa com Plasma Acoplado Indutivamente
IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento em Hertz
LC	Cromatografia Líquida
LC-MS	Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas
LMQPN	Laboratório Multiuso de Química de Produtos Naturais
m/z	Relação massa/carga
MS	Espectrômetro de massas
OPLS-DA	Análise Discriminante por Projeções Ortogonais a Estruturas Latentes (OPLS-DA)
PC	Componente Principal
PCA	Análise de Componentes Principais
PLS	mínimos quadrados parciais
PLS-DA	Análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA)
ppm	parte por milhão
Q ²	Variância da previsibilidade do modelo
QTof	Quadrupolo-Tempo de voo
R ²	Variância de ajuste do modelo
RDA	Retro Diels-Alder
RMN	Ressonância Nuclear Magnética

RMN de ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
RMN de ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RSD	Desvio Padrão Relativo
t_1	Tempo de relaxação dos núcleos
TMSP	Propionato de Tetrametilsilila
t_R	Tempo de Retenção Cromatográfico
UHPLC	Cromatografia Líquida de Ultra Performance
UV	Ultravioleta
δ	Deslocamento químico em partes por milhão (ppm)

SUMÁRIO

RESUMO.....	IX
CAPITULO I: CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	20
1 INTRODUÇÃO	20
2 OBJETIVOS	23
2.1 Geral.....	23
2.2 Específicos	23
3. REVISÃO DE LITERATURA	24
3.1 O Guaraná.....	24
3.2 Produção Nacional do Guaraná	26
3.3 Composição química do guaraná.....	28
3.3.1 A Cafeína	29
CAPITULO II: AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE AMOSTRAS DE GUARANÁ EMPREGANDO RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR E FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS.....	32
1 INTRODUÇÃO	32
1.2 RMN aplicada à análise de alimentos	33
1.3 RMN aliada à análise de componentes principais (PCA)	36
2 MATERIAL E MÉTODO	37
2.1 Amostragem	37
2.2 Análise por RMN	38
2.2.1 Preparo da amostra.....	38
2.2.1 Obtenção dos espectros de RMN unidimensionais.....	38
2.2.3 Obtenção dos espectros de RMN bidimensionais	39
2.3 Análises quimiométricas.....	39
2.3.1 Análises por Componentes Principais (PCA)	39

2.4 Estimativa da concentração da cafeína por RMN	40
2.5 Análise por HPLC	40
2.5.1 Preparo de Amostras	40
2.5.2 Análise Cromatográfica	40
2.5.2 Condições do HPLC	41
2.5.3 Curva de Calibração	41
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
3.1 Identificação dos principais compostos	42
3.3 Estimativa da quantidade de cafeína em guaraná por RMN	52
3.4 Determinação de cafeína por HPLC	55
3.5 Comparação da estimativa da concentração de cafeína determinadas por RMN e HPLC	57
CAPITULO III: AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE AMOSTRAS DE GUARANÁ EMPREGANDO UHPLC-MS	61
1 INTRODUÇÃO	61
1.2 HUHPLC-Qtof-MS	62
1.3 Análise Discriminante por Projeções Ortogonais a Estruturas Latentes (OPLS-DA)	65
2 METODOLOGIA	68
2.1 Análise e determinação de constituintes do extrato de Guaraná através do equipamento Xevo UHPLC-Qtof	68
2.1.1 Preparo do extrato	68
2.1.2 Análise cromatográfica	68
2.1.3 Condições do Massas de Alta resolução - Xevo-QToF	68
2.3.2 Análise quimiométrica	69
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
3.1 Análise e determinação de constituintes do extrato de Guaraná	70
3.2 Analise de Componentes Principais	79
3.3 - Análise de OPLS-DA e Discriminação de Origem	84
3.3.1 - Amostras Comerciais da Bahia (BA) x Amostras de UNA (U)	85
3.3.2 - Amostras Comerciais da Bahia (BA) x Amostras do Estado do Amazonas (AM)	88
3.3.3 - Amostras Estado do Amazonas (AM) x Amostras do Baixo Sul da Bahia (BS)	91
3.3.4 - Amostras do Baixo Sul da Bahia (BS) x Amostras de Una (U)	95

3.3.5 - Amostras Comerciais da Bahia (BA) x Amostras do Baixo Sul da Bahia (BS)	98
3.3.6 - Amostras do Estado do Amazonas (AM) x Amostras de Una (U)	102
CAPITULO IV: CONSIDERAÇÕES FINAIS	107
REFERÊNCIAS.....	109

CAPITULO I

CONSIDERAÇÕES GERAIS

CAPITULO I: CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO

A Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) considera o Brasil como o terceiro maior produtor de frutas do mundo[1], ainda assim muitas de nossas frutas nativas precisam ter seus estudos mais explorados.

Um dos produtos típicos da amazônia mais conhecidos no Brasil e no exterior, é o guaraná (*Paullinia cupana*), que é muito apreciado por suas qualidades energéticas e gastronômicas. Estudos demonstram que as sementes de guaraná são ricas em cafeína (contendo até 8 % massa seca), juntamente com teofilina e teobromina, terpenos, flavonoides e amido [2]. O teor de cafeína em guaraná é cerca de 4 a 6 vezes maior do que o encontrado em grãos de café, folhas de chá e nozes de cola [3-4].

Apesar da origem amazônica, o guaranazeiro se adaptou bem as condições edafoclimáticas da região do Baixo Sul da Bahia. Com base nos dados do IBGE (2015), desde o ano 2000, a Bahia é o maior produtor de guaraná em escala comercial do Brasil [5].

A produção média estado da Bahia no 2015 foi de 2600 toneladas, muito superior ao produzido por outros estados produtores [6]. Essa diferença de produtividade entre os estados se deve principalmente às condições climáticas favoráveis do Sul da Bahia como índice pluviométrico, temperatura e umidade relativa do ar e ao sistema de produção adotado nesse estado, que atua combinando grandes áreas de monocultivo, e uso intensivo de defensivos agrícolas. O guaraná tem grande destaque na indústria alimentícia, onde 70% da produção são direcionados a indústria de bebidas gaseificadas (em forma de xarope), e os demais 30% são direcionados para exportação e consumo interno [7].

Tendo em vista a relevância econômica dessa cultura para o estado da Bahia é importante avaliar as características e propriedades química desse produto, bem como determinar a identidade química, a chamada “impressão digital química” (*chemical fingerprint*), que fornece informações químicas que caracterizam o cultivar de determinada região.

A indicação geográfica em alimentos de fontes agropecuárias é de grande interesse para os consumidores e produtores, uma vez que pode fornecer critérios determinantes para preço e garantias de qualidade. Dessa forma é possível, por meio de técnicas espectroanalíticas, obtenção de uma "impressão digital química" desses produtos. A impressão digital química consiste em analisar um conjunto de amostra de forma global, ou seja, de forma que o maior número de diferentes metabolitos seja avaliado, a fim de classificar as amostras com base em padrões de metabolitos, conhecidos como "impressões digitais". Esses padrões podem mudar em resposta a diferentes formas de estímulos que a planta é exposta, tais como patógenos, fatores edafoclimáticos ou perturbações genéticas [8].

Técnicas de impressão digital tornaram-se uma das abordagens mais poderosas para o controle de qualidade em alimentos [9]. Além de possibilitar a verificação de possíveis adulterações em alimentos e inferir na indicação geográfica das amostras. Dentro desse universo, atualmente, vários trabalhos científicos têm sido publicados na elaboração de impressão digital e indicação geográfica para alimentos utilizando técnicas de separação e espectroscópicas tais como ICP OES na indicação de origem de vinhos [10-11]; ICP-MS em amostras de vinhos [12], mexilhões [13], arroz [14], cerveja [15]; Infravermelho (IV) na indicação de origem de mel [16] e lentilha [17]; Ultravioleta (UV) na indicação de origem e impressão digital de *Wolfiporia extensa* [18] e vinhos [19]; Ressonância Magnética Nuclear (RMN) na caracterização geográfica de cacau [20] e estudo da origem de café [21]; UHPLC na indicação de plantas medicinais [22-23] determinação da origem de mel monofloral e polifloral [24] discriminação de oregano orgânico e convencional[25].

Perfil metabólico e impressões digitais utilizando análises espectroscópicas e técnicas de espectrometria, como RMN e cromatografia líquida espectrometria de massa (LC-MS), têm sido utilizados em combinação para determinar os valores e identidade relativa dos componentes de extratos de ervas específicas [26].

Assim é possível aliar as vantagens da RMN, simultânea detecção de metabólicos secundários e fato de que a intensidade do sinal é proporcional à concentração, permitindo comparação direta entre as concentrações de compostos sem a necessidade de curvas de calibração [27], adicionando as vantagens da LC-MS, mais especificamente a UHPLC, análise de alta sensibilidade que resulta em separação rápida, a capacidade para gerar cromatograma em um curto período de tempo por UHPLC tem facilitado a análise simultânea de amostras complexas [28].

Dessa forma, no presente estudo foram utilizadas RMN, HPLC e UHPLC-MS para avaliar o perfil químico de amostras de guaraná produzidos nos estados da Bahia e do Amazonas.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o perfil químico de guaraná (*P. cupana*) empregando RMN, HPLC-UV e UHPLC-MS associadas à ferramentas quimiométricas.

2.2 Específicos

- Avaliar a qualidade de sementes de guaraná produzidas em diferentes municípios da região sul da Bahia e do estado do Amazonas, tendo como marcador a cafeína.
- Caracterizar amostras de guaraná de diferentes origens utilizando RMN, HPLC e UHPLC-MS;
- Avaliar os espectros de amostra de guaraná visando a indicação geográfica das mesmas, por meio da impressão digital química;
- Aplicar Análise de Componentes Principais (PCA) e OPLS-DA para identificação de possíveis agrupamentos das amostras de guaraná em função de suas características e origem;

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O Guaraná

O guaranazeiro (*P. cupana*) é originário da região amazônica, onde o mesmo era usado por índios Sateré-Mawé que descobriram o fruto antes mesmo da conquista do continente americano [29 - 30]. Há ocorrência média de 195 espécies do gênero *Paullinia* na América tropical e subtropical e pelo menos nove espécies são descritas como nativas brasileiras [31].

Ducke, (1937), descreveu as diferenças morfológicas que distinguem as populações de plantas encontradas no Alto Rio Negro, na Venezuela, daquelas encontradas em Maués-AM. De acordo com Ducke, *P. cupana* var. *Typica* é o guaraná venezuelano enquanto *P. cupana* var. *Sorbilis* encontrada no estado do Amazonas-Brasil, sendo essa última a espécie com maior importância econômica [32]. Assim podemos resumir a classificação botânica do guaranazeiro, produzido comercialmente no Brasil, da seguinte forma: Divisão: Angiospermae; Classe: Dicotiledônea; Família: Sapindaceae; Gênero: *Paullinia*; Espécie: *Paullinia cupana*; subespécies ou variedades: *sorbilis* ou *typica*.

Na Figura 1.1 está representado o fruto do guaraná, cujo nome provém do termo indígena *uaraná*, que significa olho de gente, uma alusão à semelhança física de seus frutos com os olhos humanos. A semente escura, com um involúcro vermelho, representa uma característica marcante para a identificação de guaraná. A fruta possui uma cápsula pequena, com pedúnculo desenvolvido, quando estão verdes tem coloração verde-escuro e quando maduro apresenta-se vermelho ou vermelho-alaranjado, podendo apresentar de uma a três sementes [33]. Quando atingida a maturação completa, abre-se parcialmente, deixando à mostra o pelicarpo de cor castanha-escuro, de textura crustácea, parcialmente coberto por uma substância branca (arilo) [34].



Figura 1.1: Fruto do guaraná (*P. cupana*): a) cacho de frutos; b) o fruto maduro em evidência, quando aberto que se assemelha a um olho humano.

As sementes são comercializadas de quatro diferentes formas: guaraná em rama (grão torrado), guaraná em bastão (guaraná em rama triturado e pilado, moldado em formato de bastão, seco e defumado), guaraná em pó (grão torrado e moído) e xaropes (produto exclusivo de indústrias de considerável tecnologia e nível de capitalização) [35].

A Portaria n. 70, de 16 de março de 1982, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento classifica o guaraná em pó como “o produto obtido da amêndoa finamente triturada, moída ou pilada”. A norma também estabelece as características de qualidade, apresentação, embalagem, armazenamento e transporte do guaraná em grão, em bastão e em pó para fins de comercialização [36].

As etapas principais usadas para a produção do guaraná em pó são a fermentação, despulpamento, peneiragem, lavagem, secagem, torrefação, classificação, seleção e moagem. No início, os cachos de guaraná são amontoados por dois ou três dias para sofrer leve fermentação e amolecimento das cascas. Logo após, é feita a separação da semente das cascas e dos arilos usando despulpadeiras, nessa etapa retira-se aproximadamente 20% do peso da semente pela perda do pericarpo. As sementes são então colocadas em uma peneira de arame e lavadas em água corrente para a eliminação de restos de casca e arilo remanescentes. As ráquis dos frutos são retiradas e é realizada a secagem de 10 a

12 horas ao ar livre, ou sob processos artificiais, sendo essa uma importante etapa para aumentar o tempo de estocagem do produto. Em seguida, as sementes são aquecidas em fornos de chapa (torrefação) até o ponto de estalarem, adquirindo uma coloração marrom após se partirem.

Depois é realizada etapa de separação das sementes de acordo com o seu tamanho e ponto de torrefação. Ao final, as amêndoas são moídas por moinhos de martelo e passadas por peneiras finas para a obtenção do produto em pó [35]. Da produção de guaraná 70% é direcionada a indústria de bebidas gaseificadas (em forma de xarope), e os demais 30% são direcionados para exportação e consumo interno, em forma de pó e bastão. A maior parte, se não a totalidade do guaraná produzido em todo o mundo é de origem brasileira.

3.2 Produção Nacional do Guaraná

A primeira notícia sobre a existência do guaraná no país foi dada pelo padre Felipe Bettendorf, chefe nas missões da Companhia de Jesuítas do Maranhão, que por sua vez encontrou o guaraná entre os índios Sateré-Mawé que consumiam uma bebida estimulante constantemente, também destacou os efeitos diurético, contra dores de cabeça, febre e câibras, quando realizava viagem pelo rio Amazônia por volta de 1669 [37]. Lleras (1994) relata que o uso do guaraná no velho continente foi documentado em 1775 [38]. Ainda hoje o Brasil é praticamente o único país a produzir guaraná em escala comercial, tendo em 2014 produção média de aproximadamente 3.574 toneladas [39].

Na década de 70, o governo federal começou a promover a expansão da cultura do guaraná para outras regiões, visto que na época era produzido em escala comercial apenas no município amazonense de Maués. Na época o Ministério da Agricultura assinou a Lei 5.823, de 14/11/1972, conhecida como a Lei dos Sucos, regulamentada pelo Decreto-Lei 73.267, de 6/12/1973. A Lei estabeleceu quantidade de 0,2 g a 2 g de guaraná para cada litro de refrigerante, e de 1 g a 10 g de guaraná para cada litro de xarope. Embora o quantitativo entre o mínimo e o máximo permitido legalmente ser de dez vezes, gerou maior demanda pelo produto, a partir daí o guaraná começou a se difundir em outras regiões do país, como na Bahia, Mato Grosso, Pará, Acre e Rondônia [40].

O primeiro relato sobre o guaraná na Bahia foi na década de 30, no município de Uruçuca. O guaranazeiro encontrou na Bahia condições edafo-climáticas

favoráveis ao seu desenvolvimento, em especial na região do Baixo Sul da Bahia [41]. O guaraná foi introduzido no município de Ituberá, e a cultura se expandiu para outros municípios do Baixo Sul da Bahia. Esta região abrange uma área de 7.168,10 Km² e é composta por 14 municípios: Aratuípe, Cairu, Camamu, Igrapiúna, Ituberá, Jaguaripe, Nilo Peçanha, Taperoá, Teolândia, Valença, Wenceslau Guimarães, Gandu, Piraí do Norte e Presidente Tancredo Neves. A Figura 1.2 mostra a região do Baixo Sul e seus respectivos municípios

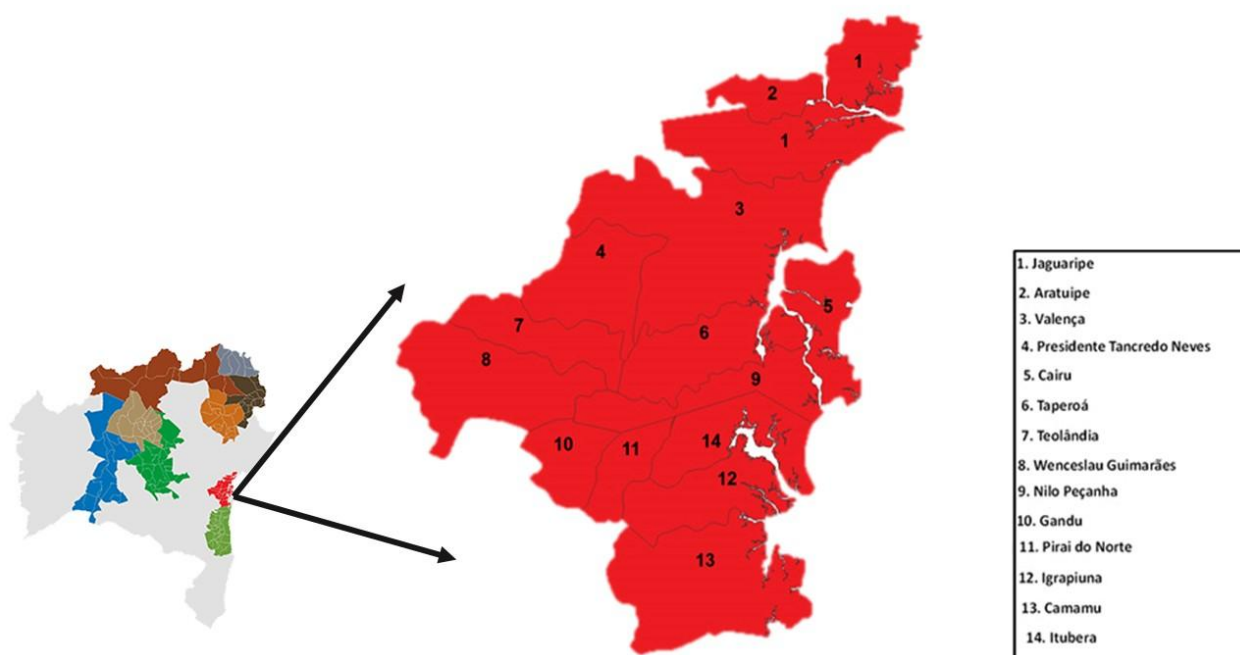


Figura 1.2: Municípios produtores de guaraná na Região do Baixo Sul da Bahia.

Dados do IBGE (2015) mostram que desde a década de 90 a Bahia é o maior produtor de guaraná em escala comercial do Brasil, tendo uma produção média dos últimos anos de aproximadamente 2.735 toneladas. A Figura 1.3 apresenta a produção e área plantada de guaraná dos últimos anos nos principais estados produtores [39, 42-45].

Os dados da Figura 1.3 mostram que o estado do Amazonas até 2013 apresentava maior área plantada, no entanto, sua produção é muito menor que a produção da Bahia. A maior produtividade da Bahia está relacionada à utilização, por produtores baianos, de técnicas básicas de cultivo, como combinação de grandes áreas de monocultivo, uso de defensivos agrícolas, ainda pouco utilizadas

pelos seus pares no Amazonas, que por sua vez mantêm sua produção de forma semi-extrativista [7]. A forma de produção no estado do Amazonas pode estar relacionada como a maneira que o guaraná era cultivado pelos índios, de forma extrativista para consumo próprio. O fato dos índios consumirem habitualmente o guaraná, fez com que houvesse curiosidade quanto a constituição e o interesse pelos estudos químico, e terapêutico dessa planta.

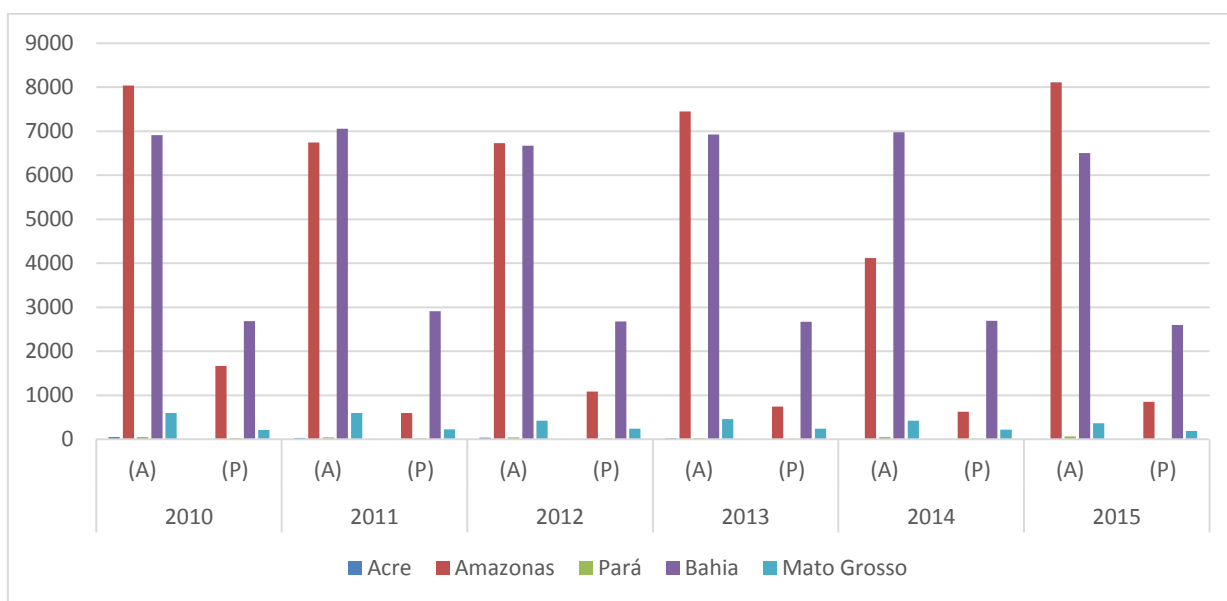


Figura 1.3: Gráfico de produção do guaraná dos últimos anos nos principais estados produtores de guaraná: área plantada em hectare (A); produção em tonelada (P). *Fonte: Dados do IBGE [5-6,42-45].

3.3 Composição química do guaraná

Um dos primeiros estudos sobre a composição química do guaraná foi o de Theodor Martius, que descreveu a massa do guaraná como constituída por óleo graxo verde, resina, goma, amido, celulose e uma matéria cristalina, branca e amarga, a qual denominou guaranina, que mais tarde foi identificada como cafeína [46].

A composição química do guaraná caracteriza-se pela presença de taninos, ácido gálico, saponinas, catequinas, epicatequinas e de alcaloides do tipo metilxantinas, como cafeína, teofilina e teobromina [29,37]. Sendo que desses compostos os principais são as catequinas/epicatequinas, por conta de sua atividade farmacológica, e dos alcaloides cuja principal substância e de maior interesse é a

cafeína devido o interesse em sua utilização para aumentar a capacidade física e cognitiva [47].

A literatura apresenta alguns trabalhos tratando da determinação da composição química do guaraná por meio de FT-Raman [3], outros tratam da quantificação específica da cafeína em guaraná por espectroscopia [48] e por HPLC [49 - 50]. Alguns pesquisadores estudaram a presença de taninos e metilxantinas, catequinas e epecatequinas por HPLC [51-53], determinação de metilxantinas empregando eletroforese capilar [51, 54], e xantinas e alcaloides por cromatografia gasosa [55].

3.3.1 A Cafeína

Estudos demonstram que as sementes de guaraná são ricas em cafeína, contendo até 8 % dessa substância em matéria seca, juntamente com teofilina e teobromina, terpenos, flavonoides e amido, podem representar cerca de 3 a 6% do peso do fruto [55]. O teor de cafeína em guaraná é cerca de 4 a 6 vezes maior do que a de aqueles de grãos de café, folhas de chá e nozes de cola [3, 56].

A cafeína, cuja a estrutura química é apresentada na Figura 1.4, foi isolada pela primeira vez das sementes de café em 1819 por Friedlieb Ferdinand Runge [57]. É a substância psicoativa mais consumida em todo o mundo, sendo classificada entre os compostos com bases purínicas metiladas (metilxantinas), estruturalmente identificada como 1,3,7-trimetilxantina [58, 59].

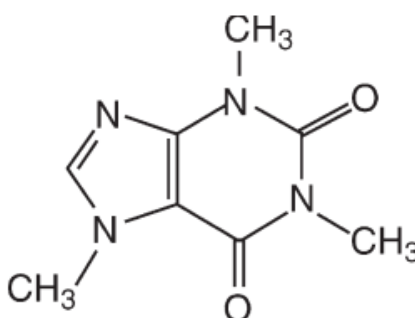


Figura 1.4: Estrutura química da Cafeína (1,3,7-trimetil-1H-purina- 2,6(3H,7H)-diona) [57].

O fato de ser a cafeína uma substância muito consumida despertou no meio científico o interesse por sua aplicação farmacológica. A ação farmacológica da cafeína prevalece no sistema nervoso central. Ela atua de forma antagônica aos receptores de adenosina, o que aumenta o estado de alerta do indivíduo e promove

assim uma melhora na associação das ideias e das atividades intelectuais, maior resistência ao cansaço e sensação de bem-estar [60, 54]. Apresenta relação com o aumento do estado de alerta do indivíduo, melhorando a capacidade cognitiva e física [61].

Alguns estudos foram realizados ao longo dos anos para verificar o efeito da cafeína no organismo de animais e humanos. A cafeína causa a inibição da peroxidação lipídica induzida por espécies reativas em ratos [62], melhora a função pulmonar e estimula o sistema respiratório em pessoas com asma [63], redução da fadiga e tempo de exaustão [64] e possui atividade antitumoral [65]. Estudo mais recente, feito com camundongos, aponta a relação da cafeína com a prevenção da depressão [66].

Em contrapartida o consumo de cafeína de forma inadequada pode interferir de forma negativa no controle motor e na qualidade do sono, pode causar irritabilidade em indivíduos com ansiedade. O consumo regular pode ter relação com a elevação da pressão arterial de modo persistente, com isso, indivíduos com hipertensão, arritmia cardíaca e doença coronariana devem evitar o consumo [67]. Em gestante, a cafeína pode causar um atraso na migração para o hipocampo de um grupo específico de neurônios gabaérgicos, que secretam ácido gama-aminobutírico, e acaba atrapalhando o processo de construção do cérebro do feto [68].

CAPITULO II

**Avaliação da composição de amostras de guaraná
empregando RMN, HPLC e ferramentas quimiométricas**

CAPITULO II: AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE AMOSTRAS DE GUARANÁ EMPREGANDO RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR E FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS

1 INTRODUÇÃO

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) começou a ser desenvolvida em 1924 por W. Pauli, que propôs que determinados núcleos atômicos deveriam possuir propriedade de spin e momento magnético. Dessa forma, poderiam ser induzidos a um desdobramento de seus níveis de energia quando em contato a um campo magnético [69].

Apesar da teoria já desenvolvida, apenas em 1946, Felix Bloch e Purcell, em trabalhos independentes, conseguiram provar que, devido ao desdobramento dos níveis de energia, os núcleos absorvem radiação eletromagnética em um campo magnético intenso. Através desse trabalho, os cientistas foram agraciados em 1952 com o Premio Nobel de Física [70]. A RMN só começou a atrair o olhar dos químicos, em especial os orgânicos, por volta de 1950 quando Proctor e Yu, que eram alunos de Bloch, desenvolveram o conceito de deslocamento químico [71] essa descoberta foi fundamental para elucidação de compostos orgânicos.

A RMN é fundamentalmente uma forma de espectroscopia de absorção molecular, semelhante à espectrometria de infravermelho e ultravioleta [72]. Ou seja, mede-se a energia emitida a partir da transição de energia, uma vez que a amostra pode absorver radiação na região de radiofrequências, em uma frequência regida pelas características da amostra.

Do seu surgimento até os dias atuais a RMN tem sofrido mudanças importantes que trouxeram melhoras na qualidade de análise, tais como: a transformada de Fourier que possibilitou o uso de técnicas pulsadas e com isso acumular FIDs (Free Induction Decay- decaimento de indução livre), o avanço na produção de ímãs supercondutores, assim obtendo campo magnéticos maiores possibilitando gerar espectros em duas (2D) ou várias dimensões, e a chegada de sondas com gradiente de campo as quais permitem mais qualidade dos experimentos [73].

Os avanços no desenvolvimento da técnica permitiram à mesma, que antes era considerada tradicionalmente como uma técnica para identificação e elucidação de moléculas, também fosse utilizada como uma importante ferramenta para análise de misturas complexas como análises de metabólitos de plantas e animais, quimiotaxonomia de espécies, controle de qualidade de alimentos [74]. A RMN apresenta algumas características que lhe dão vantagem sobre outras técnicas analíticas, como: não ser uma análise destrutiva e poder detectar um grande número de compostos simultaneamente em uma única medida experimental [79]

A RMN gera matrizes de dados altamente complexas e com uma grande similaridade espectral, assim, a análise visual pode ser inviável. Dentro desse contexto a quimiometria pode ser adotada para empregar ferramentas estatísticas, matemáticas e computacionais no tratamento de dados químicos e para facilitar a interpretação dos dados. Assim, métodos de exploração multivariada podem ser aplicados aos dados de RMN, tais como análise de componente principal (PCA) [74-76-77].

1.2 RMN aplicada à análise de alimentos

A RMN só veio ser aplicada à análise de alimentos por volta de 1980. Este atraso estava relacionado com a falta de profissionais especializados para aplicação da técnica de RMN em alimentos, o alto custo do equipamento, manutenção, etc [78]. Com o aperfeiçoamento do instrumento de RMN e melhora na forma de coleta e análise de dados, esta técnica tem se tornado um bom atrativo para ciências e tecnologia de alimentos. Além disso, quando se trata de amostra complexa, como é o caso de amostras de alimentos, a RMN tem atraído, ainda mais atenção, pois é uma técnica em que é possível trabalhar com pouco ou nenhum pré-tratamento de amostra (como extração e purificação), quando comparada a outras técnicas como CG e HPLC [79].

Uma análise de um único espectro de hidrogênio feita de forma detalhada pode fornecer informações acerca da estrutura e composição química dos principais constituintes químicos presentes na amostra [80]. Além disso, é capaz de detecção simultânea de um grande número de composto de baixa massa molecular em uma mistura complexa. A RMN possui ainda recursos e tecnologia para análises reprodutíveis na identificação e quantificação de moléculas [81-83].

Assim, a RMN tem sido amplamente utilizada nos diversos campos da pesquisa em ciências de alimentos, incluindo microbiologia de alimentos, química de alimentos e engenharia de alimentos [84-85]. O trabalho de revisão de Marcone et al. (2013) ilustra o aumento significativo ao longo dos últimos anos da produção de artigos em revista na área de ciências e tecnologia de alimentos. Seguindo o mesmo procedimento de pesquisa realizado por Marcone et al. (2013), foi feito um levantamento de publicações na base de dados da *Web of Science* relacionando as palavras chave RMN, Food Chemistry e Food Processing. Os dados estão dispostos nas Figuras 2.1 e 2.2.

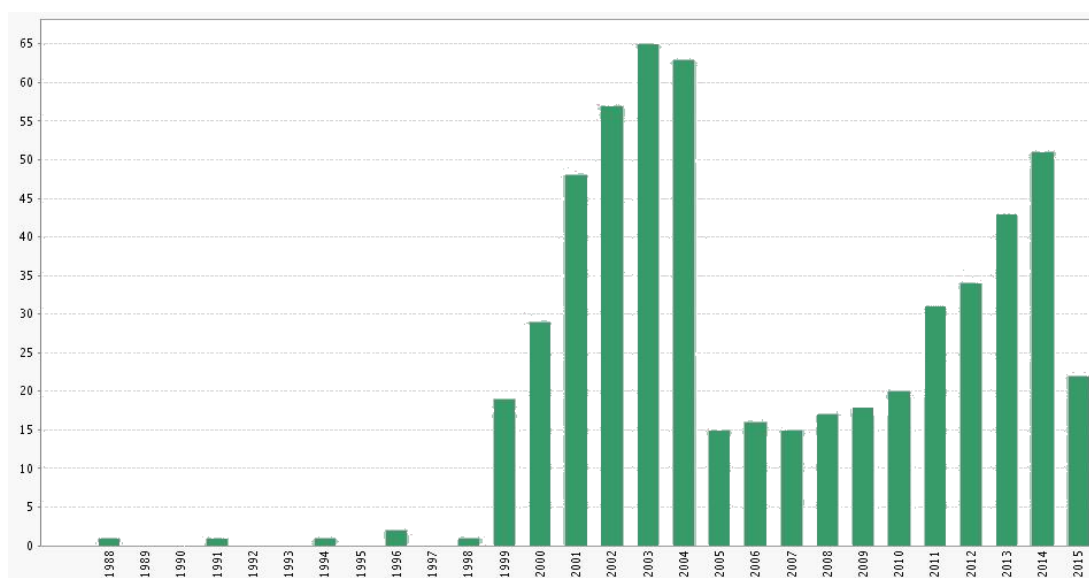


Figura 2.1: Distribuição de publicações científica sobre as aplicações de RMN na área de ciência alimentar e Tecnologia compilados da base de dados ISI Web of Science, desde a primeira publicação até 2015, com palavras chave “NMR” e “Food Chemistry”.

Analisando as informações contidas nas Figuras 2.1 e 2.2, é possível inferir que o avanço nas aplicações da RMN em amostras de alimentos aumentou muito com o passar dos anos. O aumento do número de publicações se deu por conta do avanço nos equipamentos de RMN, com advento da Transformada de Fourier e a RMN pulsada. Esse avanço na técnica permitiu a sua aplicação para os mais diversos fins com classificação taxonômica de plantas [86], determinação de ácido graxo em carnes [87], avaliação da qualidade de biodiesel [88], contaminantes em água [89], e os mais diversos tipos de amostras e finalidades. Nesse contexto destaca-se a aplicação de RMN na autenticação de alimentos.

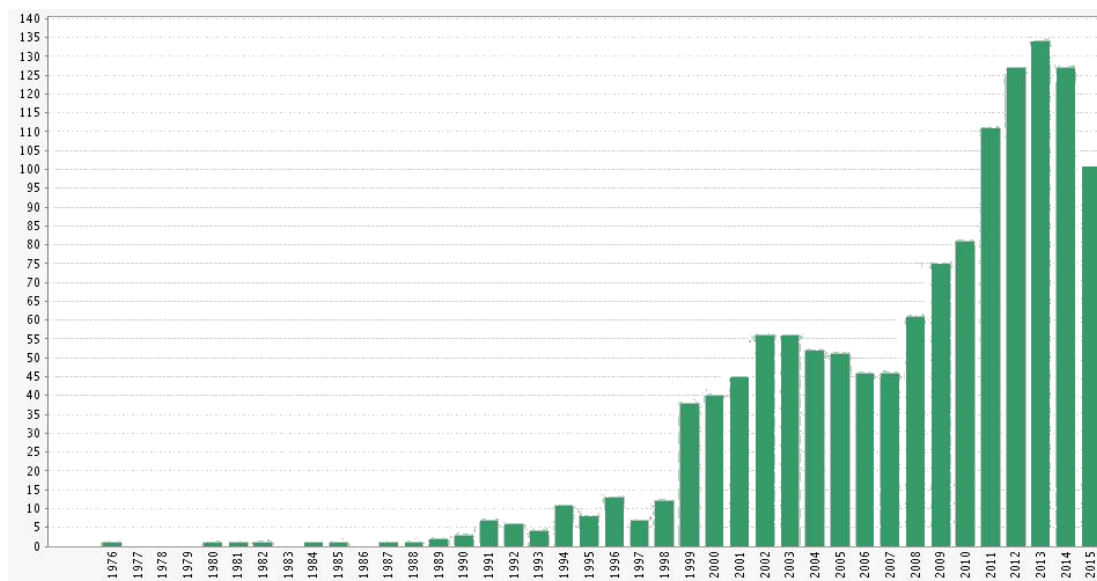


Figura 2.2: Distribuição de publicações científica sobre as aplicações de RMN na área de ciência alimentar e Tecnologia compilados da base de dados ISI Web of Science, desde a primeira publicação até 2015, com palavras chave "NMR" e "Food Processing".

Autenticação de alimentos é uma das principais preocupações no que diz respeito à alimentação de qualidade. Existe, portanto, uma necessidade no desenvolvimento de métodos analíticos confiáveis para assegurar o cumprimento do controle de origem geográfica, bem como a determinação da autenticidade do produto através da detecção de eventuais adulterações.

Dentro desse universo, técnicas de RMN para detectar autenticação em diferentes alimentos têm sido relatadas [78]. Trabalhos com azeite de oliva, como o trabalho de Rezzi et al. (2005) que analisou azeite de oliva usando RMN de ^1H combinado com ferramentas quimiométricas multivariadas, a fim de classificar os azeites das várias regiões do mediterrâneo, obtendo a indicação de origem[90], MARINI et al. (2004) autenticação de azeites de oliva de origem italiana [91].

Análise de bebidas como classificação de vinhos de acordo com a matéria prima [92], determinação geográfica de mel [20], classificação de vinagre brasileiro[93], e balsâmico [94] e determinação geográfica de queijo[95].

Análise de RMN apresenta uma gama de informações em seus espectros, dessa forma, torna-se muito difícil a sua interpretação, além disso apresentam muitas relações de complexo entendimento [96]. Dentro desse contexto, aliar a ferramentas quimiométricas para tratamento dessas informações é um caminho útil e viável, pois com a quimiometria é possível explorar e classificar essas informações de dados de RMN.

1.3 RMN aliada à análise de componentes principais (PCA)

A quimiometria é uma ferramenta matemática que envolve a aplicação de métodos matemáticos, estatísticos e computacionais para investigar, interpretar, classificar e fazer previsão de conjuntos de dados de interesse químico, que permite a visualização de dados apresentando-os de forma mais simplificada, geralmente ilustrado por meio de gráfico.

Dentre as ferramentas quimiométricas podemos citar Análise de Componentes Principais (PCA). A PCA foi proposta por Pearson em 1901, e desenvolvida por Hotelling 30 anos depois [97, 98]. No entanto, só começou a ser usada como método classificatório em química já passados 70 anos [99]. Essa ferramenta consiste em um método que permite a redução da dimensionalidade através da representação do conjunto de dados em um novo sistema de eixos, denominados componentes principais (PC), permitindo a visualização da natureza multivariada dos dados em poucas dimensões. A representação de menor dimensão mantém as características reais do conjunto de dados que mais contribuem para variância, e assim, é possível de forma mais fácil obter informações reais [97].

Na PCA ocorre a decomposição da matriz original, que é realizada em que matrizes menores: escores; pesos (*loadings*). Os escores representam a disposição das amostras no novo espaço vetorial, e que revela correlações entre as variáveis e a informação de quão determinada variável contribui para os novos eixos, assim como as relações entre as variáveis originais na matriz de pesos [98].

Um dos primeiros trabalhos que aliou RMN a ferramenta quimiométrica PCA utilizou espectro de RMN ^1H obtidos de urina para classificação de amostras contendo toxinas [100]. Atualmente são inúmeros os trabalhos que aplicam PCA a RMN e utilizando as mais diversas amostras, como distinção de amostras de fármacos contaminados [101], diferenciar cultivares de maçãs [102], discriminação do óleo de bacalhau de acordo com o modo de criação e origem [103], origem geográfica de pistache [104].

2 MATERIAL E MÉTODO

2.1 Amostragem

As amostras foram adquiridas nas cidades de Maués-AM e Ilhéus-Ba. Essas amostras foram acondicionadas sob refrigeração, temperatura aproximada de 2° C, até o momento da análise. Deste modo, foram coletadas sementes de guaraná em fazendas localizadas na região do Baixo Sul da Bahia (Valença, Taperoá e Ituberá) e na cidade de Una, localizada no Sul da Bahia, que produz guaraná em escala comercial. Todas as amostras foram codificadas de acordo com a Tabela 2.1. Essas amostras foram processadas segundo orientações da SBRT (2008) [35] adaptada: os frutos de guaraná *in natura* foram fermentados durante dois dias em sacos plásticos a temperatura ambiente (a fermentação tem a função de amolecer a casca do fruto), após fermentação foram lavados com água corrente e depois água destilada, descascados, e as sementes colocadas em uma estufa com circulação e renovação de ar, a uma temperatura média de 50° C por aproximadamente 12 horas.

As sementes de cada amostra foram divididas em três alíquotas, dando origem a três replicatas biológicas, em seguida foram moídas em moinho de facas.

Tabela 2.1: Origem e identificação das amostras de guaraná.

ORIGEM	QUANTIDADE	CÓDIGO
Baixo Sul (Valença, Taperoá e Ituberá)	15	BS
Una	6	U
Comercial Bahia (Ilhéus)	5	BA
Amazonas-Maués	9	AM
Total	32	

2.2 Análise por RMN

2.2.1 Preparo da amostra

Pesaram-se 30 mg do guaraná moído, ao qual foram adicionados 490 μL de metanol deuterado (CD_3OD) 190 μL de água deuterada (D_2O) e 20 μL de solução com 5,6 mg/mL de EDTA (os íons paramagnéticos podem ser complexados através da adição de EDTA, atenuando o problema de alargamento das linhas espectrais) e 1,6 mg/mL de propionato de tetrametilsilila (TMSP-d4). Em seguida a mistura foi levada ao banho de ultrassom por 2 minutos, centrifugada por 2 minutos (600 RPM) e retirado o sobrenadante para análise.

2.2.1 Obtenção dos espectros de RMN unidimensionais

Os espectros de RMN foram obtidos em um equipamento Agilent DD2 de 600 MHz (para núcleo de ^1H) e equipado com uma sonda One Probe de 5 mm de diâmetro interno (H-F/15N-31P) de detecção inversa e gradiente de campo no eixo “z”, localizado no Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais (LMQPN) da Embrapa Agroindústria Tropical. O preparo das amostras foi realizado em triplicata (replicata biológica) e os experimentos também foram obtidos em triplicata (replicata instrumental/analítica).

Para realizar a quantificação da cafeína e estimar o tempo ideal ($5T_1$) para ser utilizado na obtenção dos dados, inicialmente o pulso de 90° foi calibrado e a sonda, devidamente sintonizada. Assim, a sequência de pulsos de inversão-recuperação foi utilizada para estimar o tempo de relaxação dos núcleos amostrais. O valor encontrado foi distribuído entre o d_1 (tempo de espera para relaxação dos núcleos) e o tempo de aquisição (AQ). Assim, os espectros unidimensionais de RMN de ^1H foram adquiridos com um tempo de espera entre cada aquisição de 23 s, tempo de aquisição de 3,3 s, ganho de 30, 32 transientes em uma janela espectral de 16 ppm e 32k de número de pontos reais. Para o processamento desses dados, os espectros foram referenciados com o padrão interno de TMSP-d4 em 0 ppm, apodizados através de uma multiplicação exponencial do decaimento de indução livre (FID) por um fator de alargamento de 0,3 Hz, um fator de preenchimento de 2 (*zero filling*), correção manual de fase e linha de base.

2.2.3 Obtenção dos espectros de RMN bidimensionais

Para a caracterização dos compostos foram utilizados os experimentos bidimensionais com gradiente de campo (*g*COSY, *g*HSQC e *g*HMBC) além de dados reportados previamente na literatura. Os experimentos bidimensionais de *g*COSY 45°, *g*HSQC e *g*HMBC foram realizados com largura espectral em F2 de 16 ppm para todos, em F1 de 16 ppm, 200 ppm e 240 ppm, número de promediações (ns) igual 32, 64 e 90, respectivamente. Os parâmetros a seguir foram os mesmos para as medidas de *g*COSY, *g*HSQC, *g*HMBC: tempos de espera entre cada aquisição de 1 s, com 200 pontos durante a aquisição (td) em F1 e 1.442 pontos durante a aquisição em F2, no processamento foram utilizados 1.024 pontos (si) em F1 e 2.000 pontos em F2.

2.3 Análises quimiométricas

Os espectros de RMN de ^1H foram utilizados como variáveis de entrada no programa Amix® versão 3.9.11 para geração de arquivos conhecidos como *bucket table*. Para formação das *bucket tables*, os espectros foram divididos em intervalos com 0,04 ppm de largura. Dentro de cada intervalo, foi feito o processamento de dimensionamento a partir do sinal de maior intensidade, o que resultou em uma única variável dentro de cada faixa no espectro, removendo-se assim problemas de mal alinhamento dos dados. Para análise integral dos constituintes, foram selecionadas as regiões entre δ 0,70 e 8,50, excluindo-se a região entre δ 4,65 e 5,00 referente ao sinal do solvente – D₂O e entre δ 3,20 e 3,40 referente ao sinal do metanol deuterado. Além disto, o espectro entre δ 6,50 e 8,40 foi selecionado para a análise somente dos compostos com hidrogênios aromáticos.

2.3.1 Análises por Componentes Principais (PCA)

Os espectros unidimensionais RMN de ^1H transformados em *buckets*, foram utilizados como variáveis de entrada para as análises de PCA. Todos os dados da matriz final foram pré-processados realizando a centralização dos dados em torno da média.

2.4 Estimativa da concentração da cafeína por RMN

A RMN quantitativa baseia-se no princípio da proporcionalidade entre as massas, intensidade absoluta e no número de hidrogênios referentes a cada sinal que origina uma molécula. Desta forma, foi feita a correlação entre o valor da integral e o número de hidrogênios referentes ao sinal anomérico da sacarose de concentração conhecida e os valores das integrais e o número de hidrogênios dos analitos alvo que se desejavam quantificar que, no caso, foi o sinal da metoxila da cafeína em 3,98 ppm (adquirido sob condições quantitativas).

2.5 Análise por HPLC

2.5.1 Preparo de Amostras

O preparo de amostras foi através da adaptação do trabalho de Meinhart, et al (2010) [105]. Um teste preliminar de mostrou que 98% da cafeína era extraída na segunda partição líquido-líquido.

Para o preparo das amostras foi utilizado uma alíquota de aproximadamente 10 mg de amostra de guaraná em pó. A amostra foi transferida para um funil de separação de 125 mL, sendo posteriormente adicionados 60,0 mL clorofórmio. Em seguida, foram adicionados lentamente 10,0 mL de uma solução $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH. A partição foi homogeneizada cuidadosamente por 10 minutos, evitando-se a formação de emulsão. Logo após fração clorofórmica foi coletada e transferida para um balão de fundo redondo, e feita uma segunda partição com 40 mL de clorofórmio e repetido o processo. O clorofórmio foi evaporado em um evaporador rotativo na temperatura de $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Após evaporação, as amostras foram ressuspensas com 10 mL de água deionizada, filtradas em filtro Millex $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ de poro Merck (Alemanha) e injetadas no sistema de cromatografia líquida de alta eficiência.

2.5.2 Análise Cromatográfica

Para determinação da cafeína foi utilizado um cromatógrafo a líquido de alta eficiência (HPLC), modelo Prominence LC-20A Shimadzu (Japão), com detector UV-Vis ajustado para o comprimento de onda de 274 nm, sistema de quaternário de bombas, sistema de injeção manual com *loop* de $20 \text{ }\mu\text{L}$. As corridas cromatográficas foram realizadas com coluna C18 (fase ligada composta por grupos fenil (12,3 %),

octadecil (20 %) e octil (12,5 %)) ShimPack Shimadzu (Japão com 250 mm de comprimento, tamanho de partícula de 4,6 μm e tamanho do poro de 12 nm e temperatura ajustada para 40 °C.

2.5.2 Condições do HPLC

O método cromatográfico foi baseado no trabalho de Meinhart, et al (2010) [105] As amostras foram injetadas com auxílio de uma microseringa Hamilton de 50 μL . A fase móvel foi constituída de metanol grau cromatográfico e solução aquosa de ácido acético 0,1 % (v/v), com gradiente iniciado com 100 % de solução aquosa de ácido acético 0,1 % (solvente A), variando para 100 % de metanol (solvente B) após 9,85 minutos, Todos os solventes constituintes da fase móvel foram filtrados em um sistema de filtração a vácuo contendo filtro de membrana de 0,22 μm e desgaseificados em um banho ultrassônico antes das análises. Após eluição do pico referente à cafeína, retornou-se para as condições iniciais, aguardando-se um tempo de 5 minutos de condicionamento para a corrida seguinte. O fluxo da fase móvel foi de 0,74 mL min^{-1} . Para detecção foi utilizado o detector UV-Vis ajustado para o comprimento de onda de 274 nm.

2.5.3 Curva de Calibração

Foi preparada a solução estoque de cafeína, na concentração de 1000 mg L^{-1} . Para isso, foram pesadas aproximadamente 0,0100 g de cada padrão sólido de cafeína (Sigma aldrich) em balança analítica sendo posteriormente dissolvidos em uma pequena quantidade de água deionizada e transferidos para balão volumétrico de 10 mL. A solução estoque foi, então, transferida para tubo Falcon de 15 mL e armazenada em um refrigerador, em uma temperatura abaixo de 4 °C.

Para curva de calibração foram selecionadas e preparadas duas amostras, uma com elevada e outra com baixa concentração de cafeína dentro do conjunto total das amostras (tendo como parâmetro a estimativa feita anteriormente por RMN) e injetadas para análise da área do pico referente à cafeína. Além disso, foi injetado o padrão com concentração de 1000 mg L^{-1} , a partir da comparação das áreas dos picos das amostras e do padrão, estabeleceu-se a faixa de concentração da curva de calibração entre 1 a 11 mg L^{-1}

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

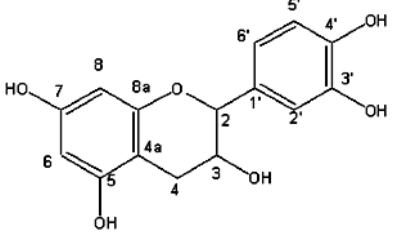
3.1 Identificação dos principais compostos

A caracterização dos compostos orgânicos foi realizada através da análise dos espectros unidimensionais de RMN de ^1H , bidimensionais de correlação homonucleares ^1H - ^1H COSY e bidimensionais de correlações heteronucleares ^1H - ^{13}C de HSQC e HMBC. Os valores de deslocamentos químico encontrados nos experimentos foram comparados com os já reportados na literatura, a fim de confirmar a caracterização [106-111]. Na Tabela 2.2 estão apresentados os principais compostos identificados no guaraná em pó.

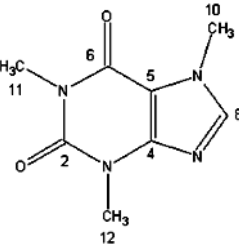
Por se tratar de uma composição complexo e heterogênea, foi possível identificar várias substâncias de diferentes classes no extrato das amostras de guaraná. Com destaque para cafeína encontrada em grande quantidade, corroborando assim com o que tem descrito na literatura sobre a cafeína como principal composto do guaraná [32, 61, 112]. Além da cafeína, foi identificado a presença de tanino no guaraná em quantidades consideráveis e se encontra principalmente sob a forma de taninos condensados ou proantocianidinas (polímeros flavan-3-ol), com maior prevalência de catequinas e epicatequinas [113], foram identificados alguns aminoácidos como alanina, valina, treonina. Alguns ácidos orgânicos, e identificado a presença de açúcares como reportado a literatura [114].

Tabela 2.2: Principais compostos identificados.

<i>Estruturas</i>	Nº C	δ ^1H (multiplicidad e* J em Hz)	(δ ^{13}C)	Ref. ^1H	Ref. ^{13}C
Polifenol					

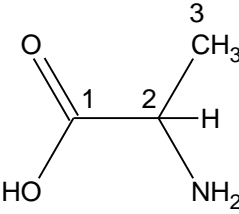
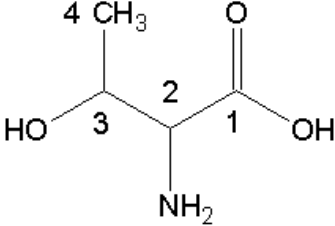
 <p><i>Catequina/epi-catequina</i>^[109-110]</p>	2	4,87	81,53	4,53	82,8
	3	4,06	70,3	3,99	68,4
	4 α	2,89/2,84	30,9/30,2	2,91	28,8
	4 β	2,72/2,52	30,9/30,2	2,53	28,8
	4a	---	103,0/102,3	--	100,7
	5	----	159,3	--	157,2
	6	6,02	98,7/98,8	6,02	96,2
	7	---	158,9	--	157,8
	8	5,91	97,8/98,0	5,88	95,5
	8a	---	no	--	156,9
	1'	---	134,0	--	132,3
	2'	6,88	117,4/118,4	6,90	115,3
	3'	---	147,6	--	145,7
	4'	---	147,6	--	145,7
5'	7,03	117,3	6,80	115,7	
6'	6,85	121,8/122,5	6,76	120,1	

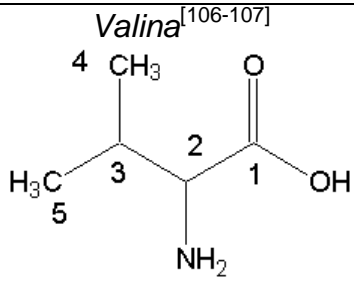
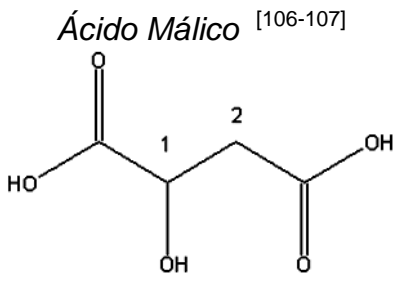
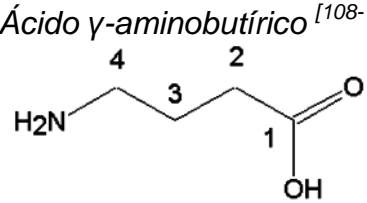
Alcalóide

 <p><i>Cafeína</i>^[111]</p>	2	----	155,5	----	151,3
	4	----	151,4	----	148,3
	5	----	110,5	----	107,1
	6	----	159,0	----	154,9
	8	7,90	146,3	7,58	141,2
	10	4,0	37,2	4,01	33,2
	11	3,39	31,1	3,37	27,5
	12	3,55	- 33,9	3,55	29,3

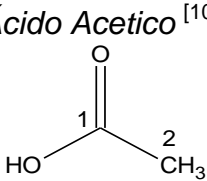
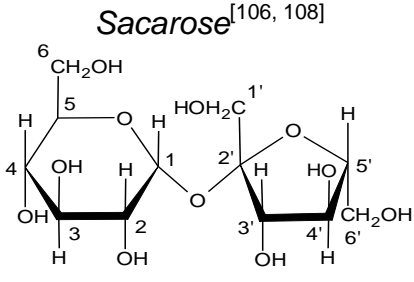
Continuação da Tabela 2.

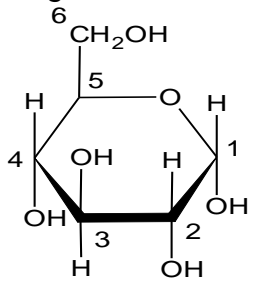
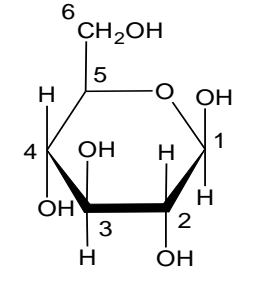
Aminoácido

 <p><i>Alanina</i>^[106-107]</p>	2	3,7 (o)	54,0	3,9 (q, 7,3)	53,4
	3	1,49 (d 7,2)	19,7	1,52 (d 7,3)	19,1
	1	----	178,6		178,5
 <p><i>Treonina</i>^[106-107]</p>	2	3,88 (o)	o	3,81 (d 4,2)	63,4
	3	4,03 (o)	72,0	4,35 (m)	69,3
	4	1,33 (d 6,6)	23,9	1,35 (d 6,5)	22,3

<p><i>Valina</i> ^[106-107]</p> 	2 3 4 5	3,62 (o) 2,28 (o) 1,02 (d 7,2) 1,07 (d 7,2)	o 32,5 19,7 20,7	3,82 (d 4,4) 2,33 (m) 1,02 (d 7,1) 1,06 (d 7,1)	n 32,0 19,1 20,9
Ácido Orgânico					
<p><i>Ácido Málico</i> ^[106-107]</p> 	3 2b 2a	3,62 (o) 2,88 (16,8; 4,8) 2,71 (o)	72,1 31,0 31,0	4,60 (dd, 6,7; 4,6) 2,90 (dd, 16,5; 4,6) 2,85 (dd 6,7; 16,5)	70,9 31,0 31,0
<p><i>Ácido γ-aminobutírico</i> ^[108-109]</p> 	4 3 2	3,02 (t 7,2) 1,91 (qui 7,2) 2,30 (t 7,2)	43,2 27,1 37,6	3,00 (t 7,2) 1,90 (qui 7,2) 2,28 (t 7,2)	42,6 26,8 37,8

Continuação da Tabela 2.

<p><i>Ácido Acético</i> ^[106]</p> 	2 1	1,93 (s) ---	26,8 184,3	1,94 (s) ---	26,0 182,1
Açúcares					
<p><i>Sacarose</i> ^[106, 108]</p> 	1 2 3 4 5 6 1' 2' 3' 4' 5'	5,42 (d 3,7) 3,56 (o) 3,76 (o) 3,48 (o) 3,85 (o) 3,82 (o) 3,82 (o) 3,89 (o) 4,05 (m) 4,22 (m) 3,68 (m)	95,0 74,1 75,5 72,3 75,5 63,1 65,2 84,3 77,0 79,3 64,5	5,40 (d 3,8) 3,89 a 3,57 (m) n n n n n 4,03 (t 8,4) 4,1 (d 9,0)	95,5 73,3 75,2 71,4 76,1 62,7 65,0 82,3 76,2 78,1

				N	63,0
<p><i>α-glucose</i>^[106, 108]</p> 	<p>1 2 3 4 5 6</p>	<p>5,23 (<i>d</i> 3,8) 3,47 (<i>m</i>) 3,77 (<i>m</i>) 3,56 (<i>m</i>) 3,72 (<i>m</i>) 3,85 (<i>m</i>)</p>	<p>95,0 72,3 75,6 74,0 63,9 75,5</p>	<p>5,17 (<i>d</i> 3,8) 3,89 a 3,36 (<i>o</i>) n n n n</p>	<p>95,8 72,2 76,0 72,8 64,2 74,5</p>
<p><i>β-glucose</i>^[106, 108]</p> 	<p>1 2 3 4 5 6</p>	<p>1 - 4,65 (<i>d</i> 7,90) 2 - 3,26 (<i>m</i>) 3 - 3,75 (<i>m</i>) 4 - 3,48 (<i>m</i>) 5 - 3,41 (<i>m</i>) 6 - 3,90 (<i>m</i>)</p>	<p>98,6 77,5 63,6 78,8 72,2 63,7</p>	<p>4,55 (<i>d</i> 7,8) 3,25 (<i>t</i> 8,4) n n n n</p>	<p>99,3 77,6 56,1 79,0 72,8 63,1</p>

s – simpleto;
d – dupleto;

t – tripleto;
q – quadrupleto;

quin – quinteto;
m - multipleto

n – não informado;
no – não observado
o – sinal sobrepost;

3.2 Análise quimiométrica dos dados de RMN de ^1H para estudo de origem das amostras de guaraná

A fim de se identificar possíveis relações existentes entre a origem geográfica e a composição química das amostras de guaraná, os espectros unidimensionais de RMN de ^1H transformados em *buckets* foram utilizados como variáveis de entrada para as análises de PCA. As áreas selecionadas em cinza na Figura 2.3 tratam-se das regiões excluindo entre δ 4,65 e 5,00 referente ao sinal do solvente –HOD e entre δ 3,20 e 3,40 referente ao sinal do metanol deuterado.

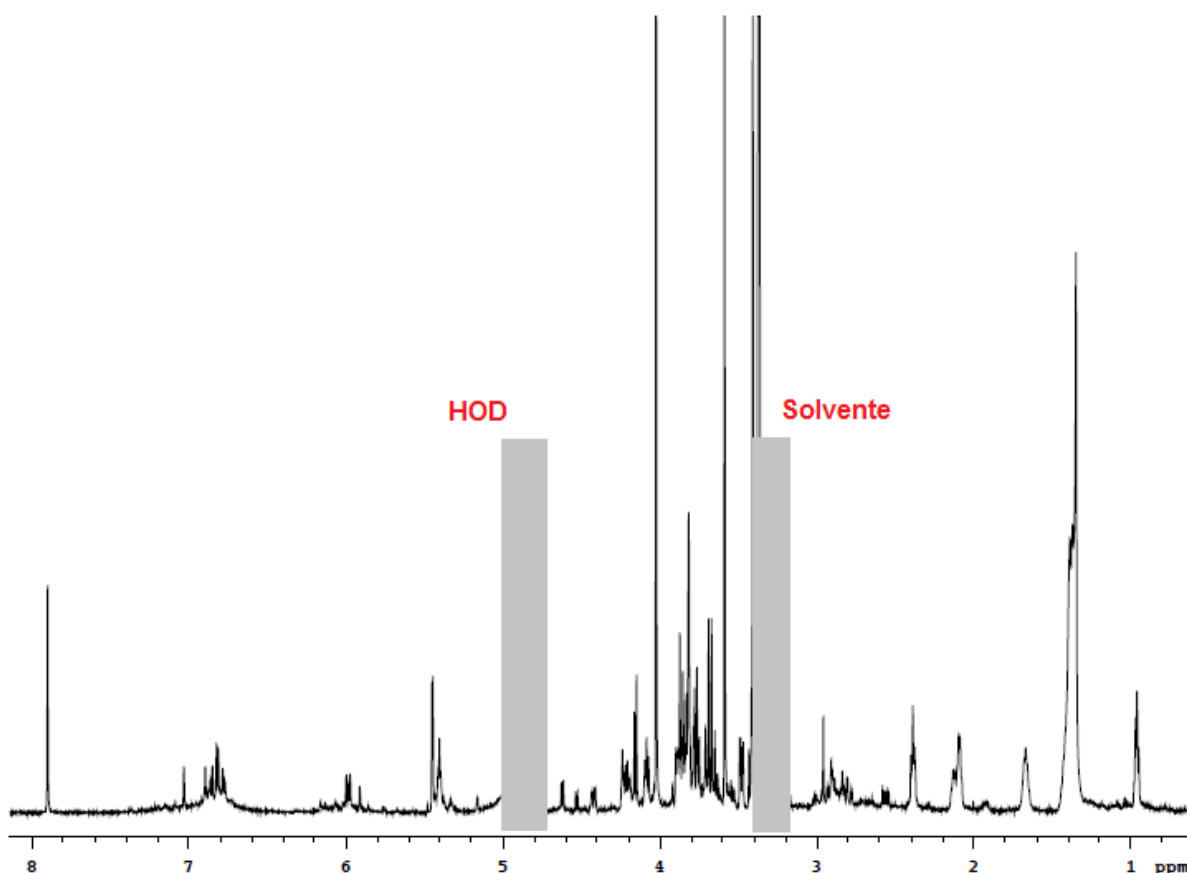


Figura 2.3: Representação dos espectros de RMN de ^1H utilizado nas análises quimiométricas, subtraídos os sinais da HOD e do solvente (Metanol deuterado), representado na faixa cinza.

Para a análise por PCA, a região do espectro analisada foi dividida em *buckets* de 0,04 ppm, resultando em 199 variáveis, na Figura 2.4 está contida a representação dos *buckets*. Com os *buckets*, um número menor de variáveis é criado e assim, é possível corrigir problemas relacionados a a variação de

deslocamento químico, que é causada por fatores como instabilidade instrumental e concentração de íons em solução (pH), reduzindo assim, análises incorretas dos dados.

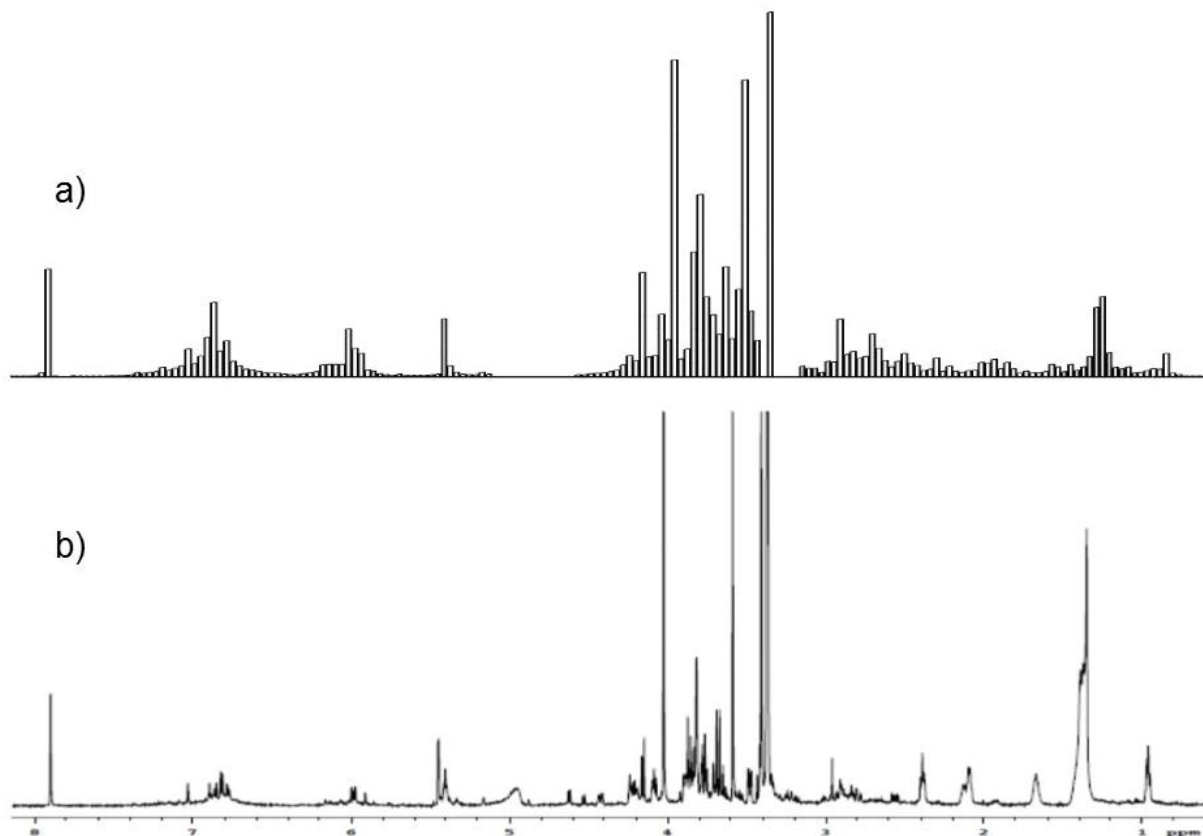


Figura 2.4: a) Representação dos bucket tables gerado com 0,04 ppm; b) Espectro de RMN de ^1H da amostra de guaraná

As amostras de guaraná foram divididas em grupos de acordo com a origem, assim foram separadas em: Baixo Sul apresentadas na cor azul (●); as amostras Comerciais da Bahia na cor verde (●); as amostras da cidade de Una – Ba na cor vermelha (●); e as amostra de Amazonas na cor preta (●). Utilizou-se a análise exploratória por componentes principais, a fim de se verificar a distinção desses grupos de acordo com semelhanças ou disparidades do perfil metabólico oriundo dos espectros de RMN ^1H .

A Figura 2.5 apresenta o gráfico de *scores* de PCA dos espectros de RMN de ^1H , onde são discriminadas as amostras de acordo com a origem. Os *scores* das informações adquiridas pela PCA, com 66,6% do total da variância acumulada nos eixos diaxiais PC1 e PC2. A PCA apresenta certa tendência na separação das amostras, assim, é possível identificar a formação de dois grupos majoritários

distribuídos sob a primeira componente principal. A esquerda da PC1 (*scores* negativos) encontra-se um grupo formado por amostras do Baixo Sul-Ba (azul) e a maioria da amostra de Una-Ba (em vermelho), e do lado direito (*scores* positivos de PC1) encontram-se a maioria das amostras do Amazonas (preto), a maioria das amostras comerciais (verde) e uma amostra de UNA (a U2 em vermelho).

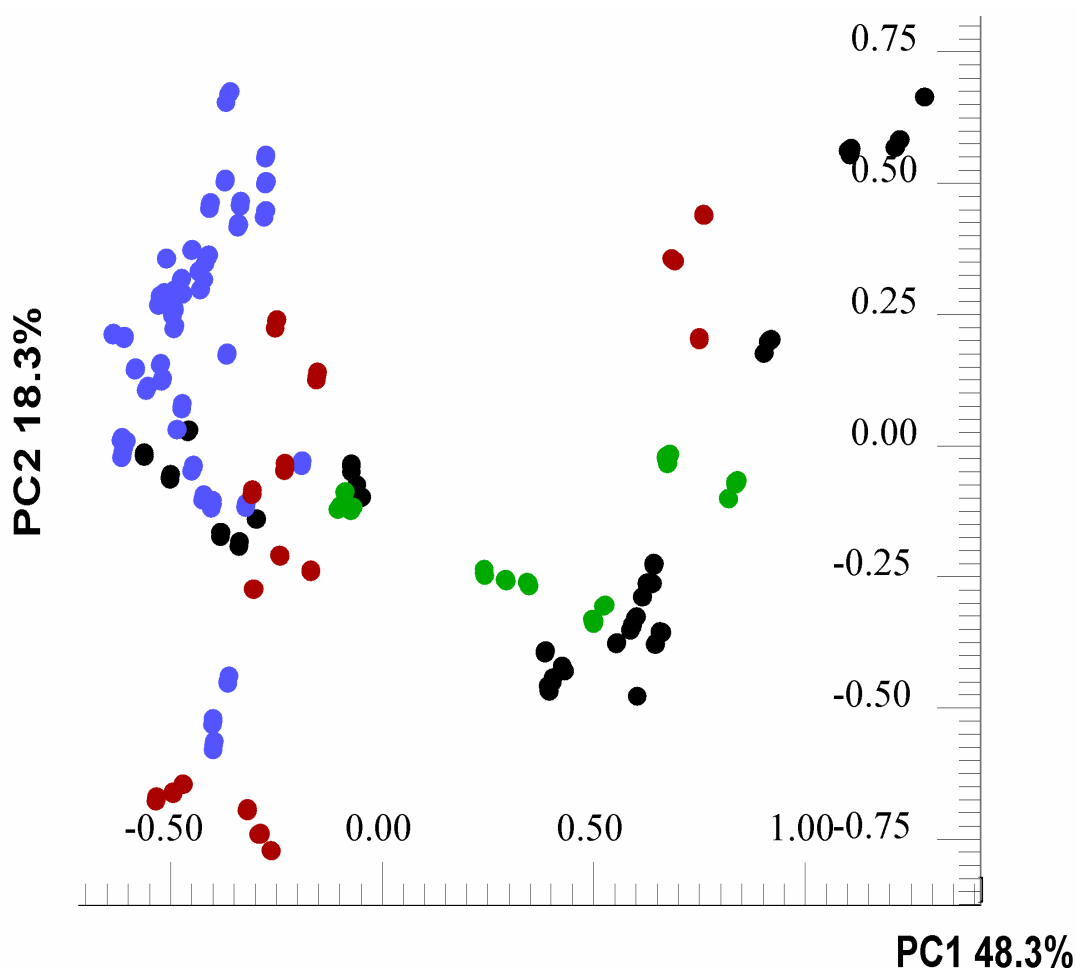


Figura 2.5: Gráfico de scores da PC1 x PC2 dos espectros de RMN de ^1H das amostras de guaraná do Baixo Sul (•), Comercial - BA (•), Una - Ba (•), Amazonas (•).

As amostras coletadas no município de Una-Ba, com exceção a triplicata U2, em sua maioria estão situadas na em valores negativos de PC2 e negativos de PC1. Já para as amostras comerciais da Bahia a tendência de discriminação não foi obtida como esperado já que a maior parte das amostras apresentaram tendências de agrupamento com as amostras do Amazonas.

A fim de obter maiores informações quanto a discriminação das amostras, foi gerado um gráfico com scores e pesos (*loadings*) de PC1 e PC2 concomitantemente. A análise dos loadings com os escores simultaneamente é extremamente útil, pois é possível entender os marcadores (compostos) responsáveis pela discriminação, representados na Figura 2.6.

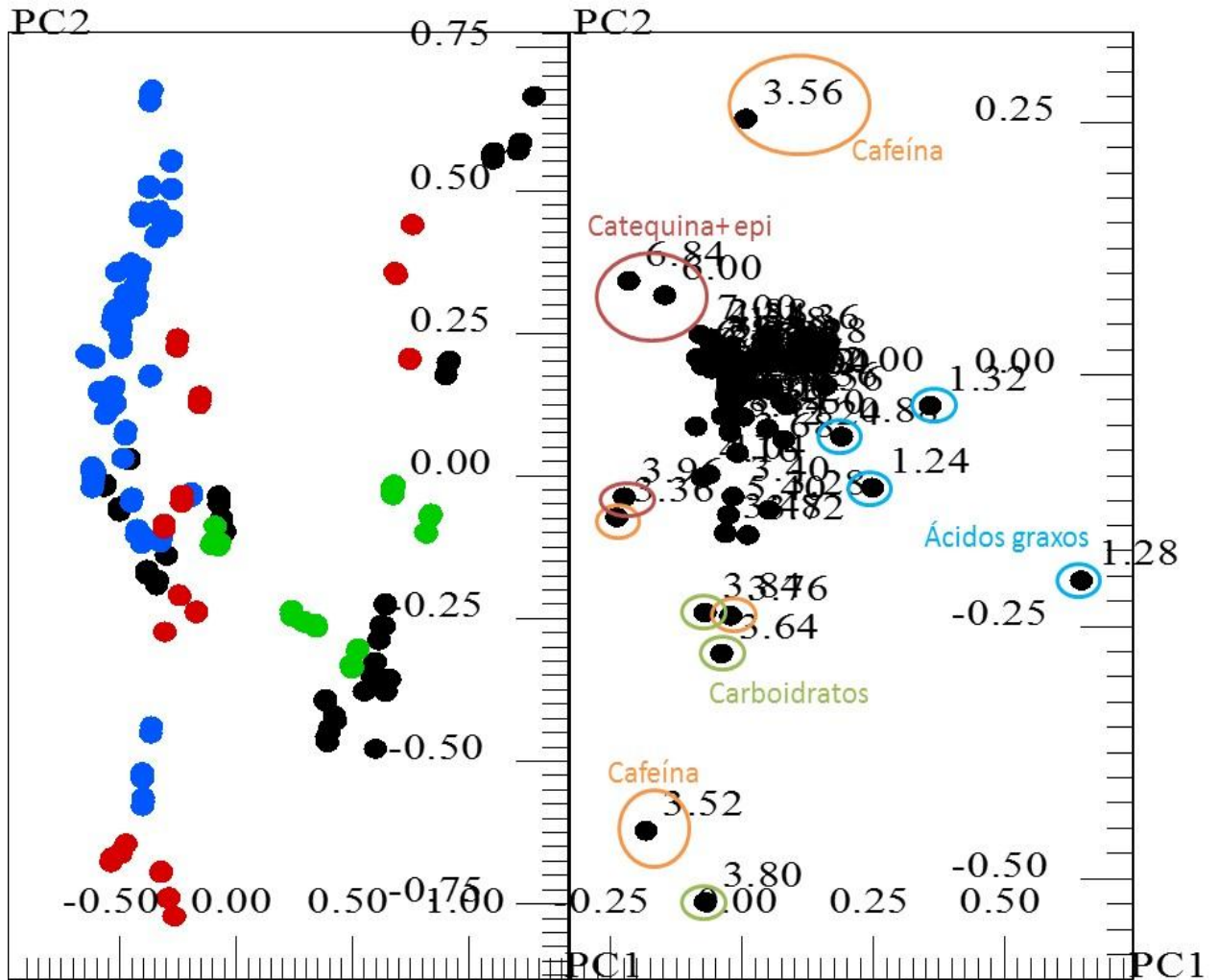


Figura 2.6: Gráfico de scores e pesos da PC1 x PC2 dos espectros de RMN de ^1H das amostras de guaraná do Baixo Sul (\bullet), Comercial - BA (\bullet), Una - Ba (\bullet), Amazonas (\bullet).

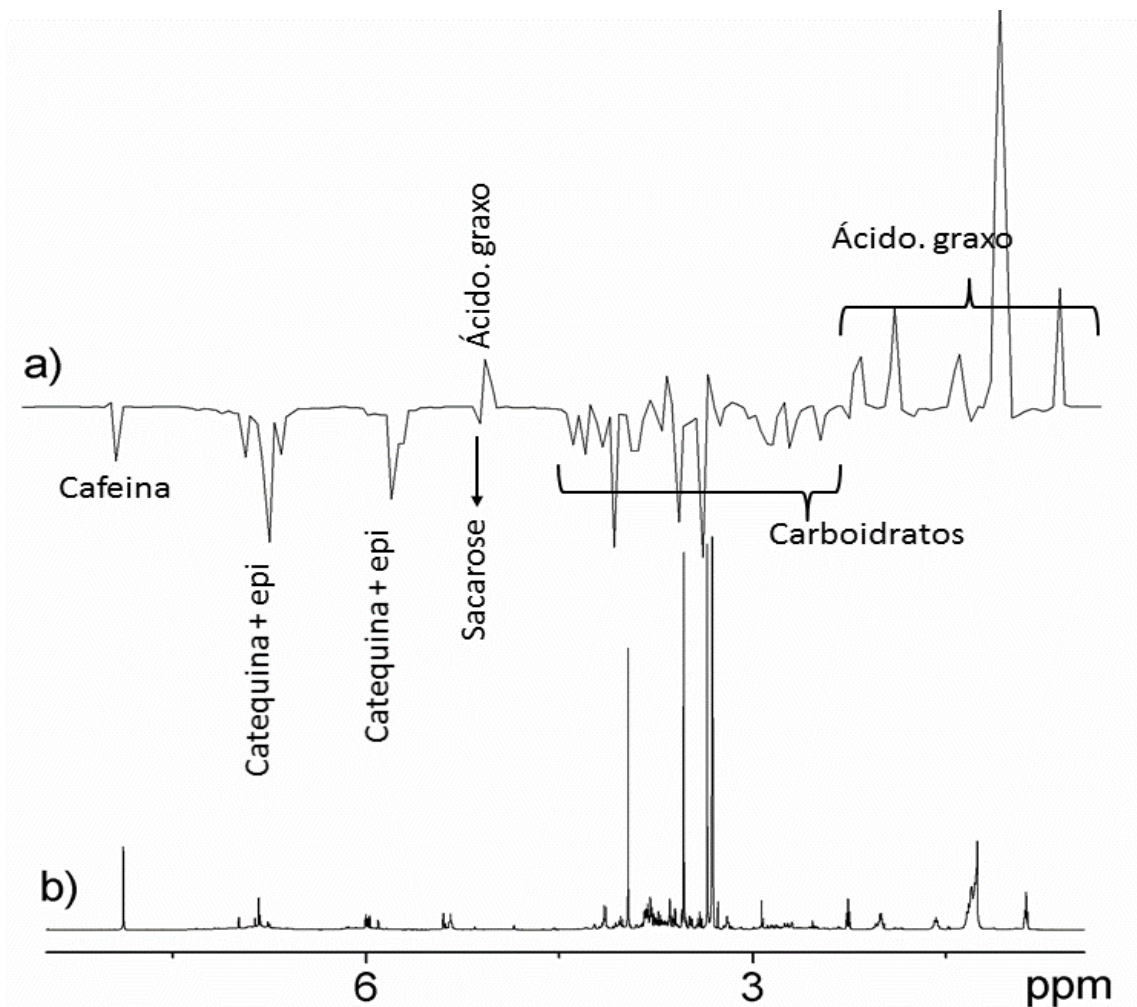


Figura 2.7: a) Gráfico de pesos projetado em linhas; b) espectro de RMN de ^1H para ilustrar suas regiões.

Assim, para melhorar a visualização das tendências de separação dos grupos formados na PC1, os pesos foram projetados em linhas (Figura 2.7 a). Além disto, um espectro de RMN de ^1H também foi gerado (Figura 2.7 b) para destacar as regiões responsáveis pelas distinções dos dados na PC1.

Analisando o gráfico de pesos (*loadings*) (Figura 2.6) nota-se que algumas variáveis contribuíram para posição das amostras no gráfico de *scores*. Assim, os compostos epicatequina e catequina (deslocamentos químicos em δ 6,84 e 3,36), cafeína (deslocamento químico em δ 3,56; 3,52) e os carboidratos (deslocamento químico na região entre δ 2,2 a 4,2, com os hidrogênios anoméricos entre δ 4,8 e 5,2) foram as variáveis responsáveis por alocar as amostras do Baixo Sul e a maioria de Una com escores negativos de PC1, que apresentou 48,3 % da variância total acumulada. Através da análise dos loadings projetados em linhas (Figura 2.7a)

pode-se corroborar a análise da PC1, onde é possível ratificar a contribuição desses compostos quanto à tendência de separação das amostras do Baixo Sul e Una-BA das demais, que por sua vez apresentam em sua composição maior concentração dos compostos mencionados anteriormente (cafeína, catequina, epi-catequina e carboidratos). Foram projetados gráficos de PCA com PC1xPC3 e PC2xPC3, no entanto as projeções não apresentaram habilidade na discriminação das classes, assim esses gráficos não foram apresentados.

As amostras de origem amazônica apresentam um perfil diferente quanto a composição de alguns metabolitos. Tal fato é observado na análise da PCA (Figura 2.5 e 2.6), onde nota-se que essas amostras estão alocadas em escores positivos de PC1 e, desta forma, apresentam maiores concentrações dos ácidos graxos e menores concentrações de cafeína, catequina e epicatequina. Assim, pode-se confirmar a contribuição dos ácidos graxos na distinção dessas amostras, ao observar os sinais na região entre δ 1,0 e 2,3 da Figura 2.8a, onde estes aparecem com contribuição positiva na PC1.

Buscando ressaltar a diferença de composição das amostras oriundas da Bahia e Amazonas, foi realizada uma comparação entre os espectros de RMN de ^1H o qual está apresentado na Figura 2.8. Quando analisados visualmente percebe-se que a amostra do Amazonas apresenta picos característicos de ácidos graxos mais intensos sugerindo assim, maior quantidade desses compostos em sua composição. Avato et al. (2003), através da RMN de ^{13}C , reportaram a presença de ácido graxos como o ácido oleico, linoleico e ácido paulínico em sementes de guaraná [115].

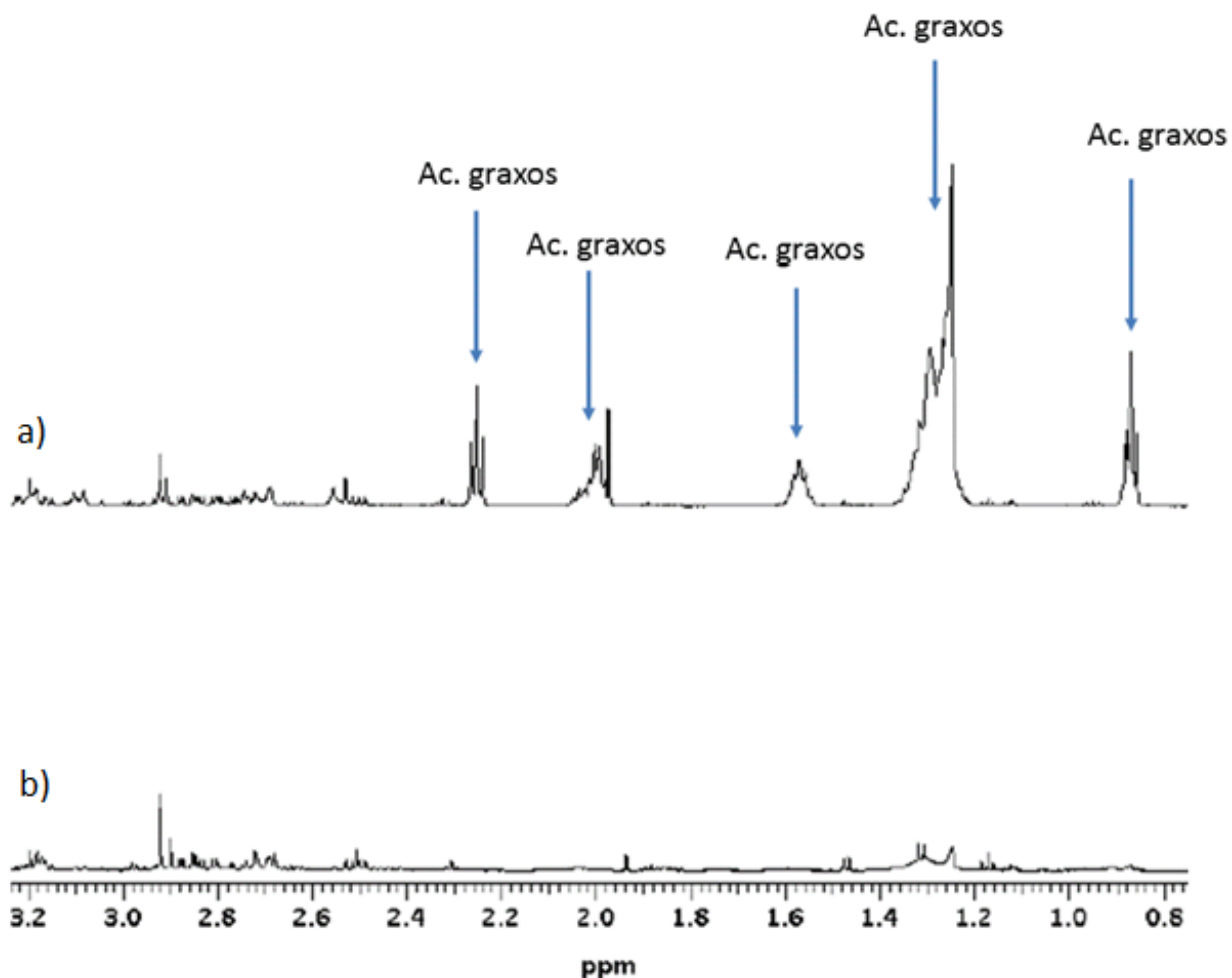


Figura 2.8: Espectros de RMN de ¹H referente a região de ácido graxo. a) amostras do Amazonas e b) amostras do Baixo Sul.

3.3 Estimativa da quantidade de cafeína em guaraná por RMN

O método para quantificação da cafeína baseia-se em um princípio da ressonância no qual a intensidade do sinal é diretamente proporcional à quantidade de núcleos que dão origem ao sinal de RMN. Assim, para a determinação das concentrações por RMN é necessário que a integral sobre uma determinada ressonância no espectro de uma amostra de referência de concentração conhecida seja correlacionada com a intensidade do sinal na amostra de interesse com concentração desconhecida [116]. Assim, para esse trabalho foi feita a correlação entre o valor da integral e o número de hidrogênios referentes ao sinal anomérico da sacarose de concentração conhecida e os valores das integrais e o número de hidrogênios de uma das metoxila da cafeína com deslocamento químico em δ 3,78.

Ao quantificar uma substância por RMN, alguns parâmetros de aquisição devem ser considerados, tais como: o tempo de relaxação dos núcleos (t_1) e o

tempo de espera entre uma aquisição (d1), ajuste de sintonia do equipamento, dentre outros [117]. Desta forma, vale ressaltar que os espectros de RMN de ^1H foram obtidos em condições quantitativas e com uma boa relação sinal/ruído.

A representação da quantidade de cafeína em amostras de guaraná foi feita por meio de Diagrama de Extremos e Quartis, representado na Figura 2.9. Esse diagrama como o nome indica, os extremos – mínimo e máximo, e os quartis – 1º quartil (Q1 ou Q0,25) acumulou 25% dos menores valores, a mediana ou 2º quartil e o 3º quartil (Q3 ou Q0,75) que acumulou 25% dos maiores valores. O valor da concentração máxima e, valores anômalos, que estão fora dos 95% do intervalo de confiança e estão representados por asteriscos nas extremidades.

Para concentração da cafeína, o método obtido pelo espectrômetro de RMN é dado em mMol L^{-1} , assim foram feitos procedimentos matemáticos, Equação 6, para se obter o valor da cafeína em percentual relacionando com a massa de amostras pesada.

$$P = \left[\left\{ \left(\frac{C_o}{1000} \right) MM_{Cafeina} \right\} 0,7 \right] \frac{30}{100} \quad \text{Equação 1}$$

Onde em que:

C_o : Concentração em mmol L^{-1} obtida vai aparelho de RMN

MM: Massa Molar da cafeína (g mol^{-1})

0,7: Volume (mL) total do extrato obtido

30: Massa (mg) utilizada na preparação do extrato.

A Figura 2.9 representa o Diagrama de Extremos e Quartis (DEQ), com os dados de quantificação da cafeína em guaraná via RMN. Analisando o diagrama é possível verificar que os dados de quantificação da cafeína corroboram as disposições das amostras no gráfico da PCA (Figuras 2.5 e 2.6), em que as amostras do Baixo Sul da Bahia e de Una-Ba apresentam tendências a maiores concentrações de cafeína na composição, e em contrapartida, as amostras de guaraná de origem amazônica apresentam tendências a menores concentrações de cafeína na composição.

Tabela 2.3: Estimativa de cafeína por RMN.

Grupo	Contagem	Média (%)	Variância
AM	9	1,852	0,289
BA	5	2,189	0,119
U	6	2,719	0,441
BS	15	2,603	0,273

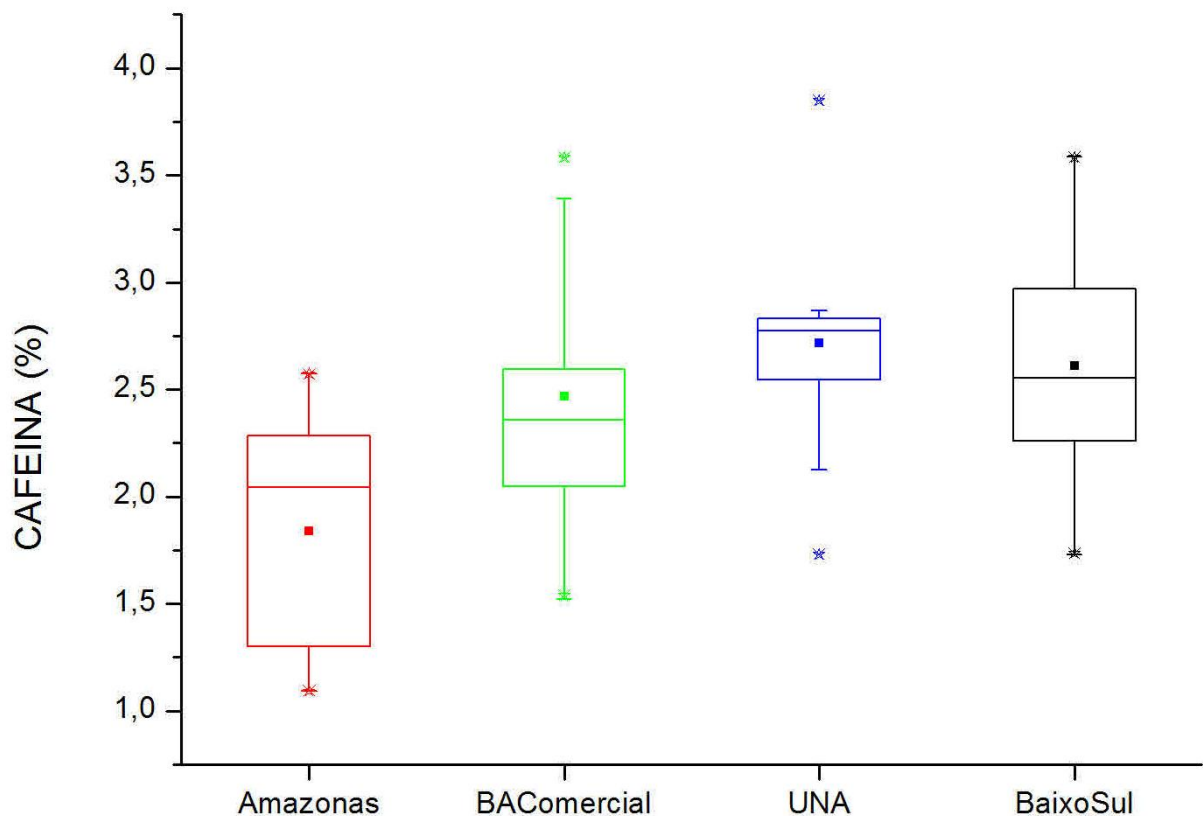


Figura 2.9: Diagrama de extremos e quartis do percentual de cafeína em guaraná

De acordo com a Figura 2.9 pode-se observar o percentual de cafeína de cada grupo, de acordo com a origem das amostras: Amazonas; Comercial-BA; Baixo Sul; Uma-BA. Adicionalmente, na Tabela 2.3 estão representados os percentuais médios de cada grupo de amostras. Assim, é possível inferir que as amostras do Baixo Sul e Una-Ba e comerciais da Bahia exibem um perfil de cafeína semelhante,

com percentual médio acima de 2,0 %, ao contrário das amostras comerciais e do estado do Amazonas que apresentam percentual médio abaixo de 2,0 %.

Para o estudo em questão foi realizada a análise de variância unifatorial (ANOVA) com os dados de estimativas de cafeínas por RMN. Com esse procedimento foi possível detectar diferenças em diversas médias populacionais pela comparação das variâncias [118]. O resultado, representado na Tabela 2.4, mostrou que para um nível de 95 % de confiança as amostras têm percentual de cafeína em sua composição que são estatisticamente diferentes.

Tabela 2.4: Resumo da ANOVA - fator único para percentual de cafeína obtidos por RMN.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	4,120	3	1,373	4,829	0,007	2,911
Dentro dos grupos	8,817	31	0,284			
Total	12,937	34				

3.4 Determinação de cafeína por HPLC

A HPLC foi utilizada para avaliação da concentração de cafeína das amostras de guaraná, e comparar com os resultados obtidos com o método quantitativo por RMN proposto para estimar a concentração de cafeína em amostras de guaraná. A cafeína ($\lambda = 274 \text{ nm}$), a qual apresentou um tempo de retenção em 14 minutos, como ilustrado na Figura 2.10.

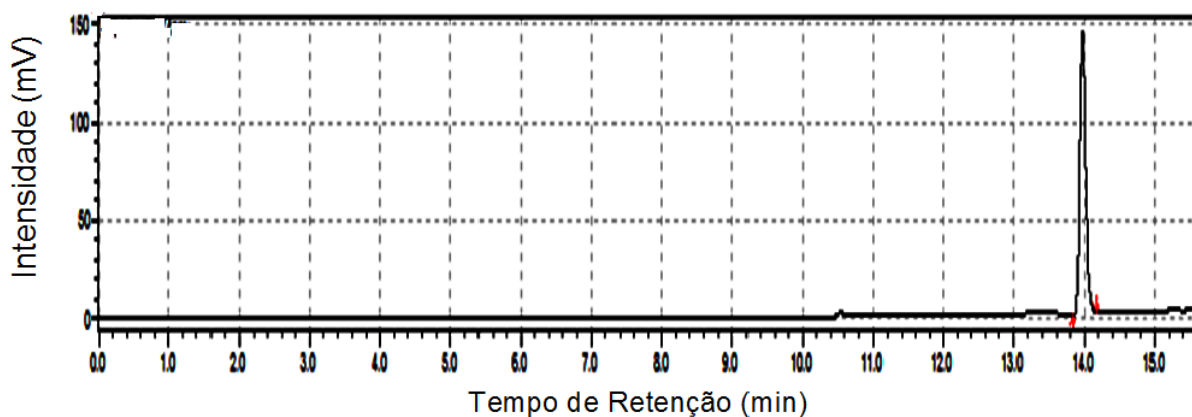


Figura 2.10: Cromatograma da amostra de guaraná destaque para o pico referente à cafeína obtido por HPLC ($t = 14,0 \text{ min}$) e $\lambda = 274 \text{ nm}$.

O método foi linear no intervalo de 1 a 11 mg L⁻¹. A Figura 2.11 ilustra a curva analítica obtida por HPLC para a cafeína, e sua respectiva equação da reta e coeficiente de correlação. O coeficiente de correlação (R^2) mede a fração de variação observada em y (área do pico), quanto mais próximo o R^2 estiver de 1, melhor o modelo linear explica as variações de y [118], assim é possível avaliar que pelo valor de R^2 de 0,9999 que esse modelo é linear e que explica as variações desejadas.

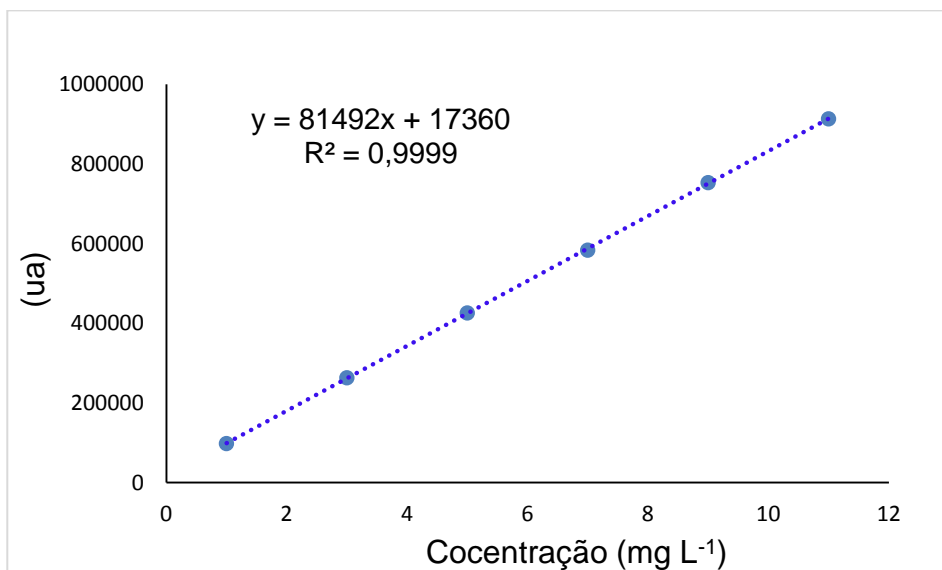


Figura 2.11: Curva analítica obtida para cafeína empregando HPLC.

A análise de cafeínas por HPLC, representada na Tabela 2.5, mostrou que dentro os grupos de amostras de guaraná as amostras comerciais da Bahia apresentaram menor concentração, enquanto que as amostras de Una foram as que tiveram maior valor médio de cafeína.

Tabela 2.5: Concentração média de cafeína nos grupos, determinada por HPLC

Grupo	Contagem	Média (%)	Variância
AM	9	3,070	0,432
BA	5	2,831	0,477
UNA	6	3,924	0,478
BS	15	3,732	0,453

Foi realizada a análise de variância unifatorial (ANOVA) com os dados de estimativas de cafeínas por HPLC, representada na Tabela 2.6, notou-se, então, que no nível de 95% de confiança as médias de população das amostras são diferentes entre si. O valor de F calculado (4.213) foi maior que o F crítico (2.911), confirmando a distinção entre as amostras.

Tabela 2.6: Resumo da ANOVA - fator único para percentual de cafeína em guaraná obtido por HPLC.

Fonte da variação	SQ	GI	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	5,747	3	1,916	4,213	0,013	2,911
Dentro dos grupos	14,093	31	0,455			
Total	19,840	34				

3.5 Comparação da estimativa da concentração de cafeína determinadas por RMN e HPLC

A fim de comparar as concentrações de cafeínas obtidos por meio da estimativa por RMN foi feita a determinação de cafeína das amostras por HPLC. Ao comparar a concentração de cafeína nas amostras foi possível notar que os valores para cafeína determinados por HPLC foram maiores que os obtidos por RMN. Os dados de médias estão representados nas Tabelas 2.7 e 2.8.

Na Tabela 2.7 está representada a média populacional dos dados, e seus respectivos valores de intervalo de confiança (IC) e Desvio Padrão Relativo (RSD). Esses testes descrevem a confiabilidade dos dados [118]. Todas as amostras apresentaram valor de intervalo de confiança (IC) < 1. Com exceção da amostra AM7 todas outras apresentaram RSD < 10 tanto nas estimativas por RMN quanto na determinação por HPLC.

O maior valor médio no percentual de cafeína obtido quando determinado por HPLC pode estar relacionado com o processo de preparo de amostras que para HPLC foi feito por meio de extração exaustiva, com o método utilizado para análise de HPLC obteve-se aproximadamente 98 % extração da cafeína. Apesar da

espectroscopia de RMN não ser uma técnica tão sensível como a Espectroscopia na região do Ultravioleta (UV) e do infravermelho (IV) e Espectrometria de Massas (EM) [119], no processo de aquisição dos espectros garantiu-se que a obtenção do sinal e a condição quantitativa ideal para o procedimento.

Tabela 2.7: Concentração de cafeínas nas amostras de guaraná e seu respectivo desvio padrão relativo (RSD) por RMN e por HPLC.

Amostra	Estimativa por RMN		HPLC	
	Concentração \pm IC (%)	RSD	Concentração \pm IC (%)	RSD
AM1	1,47 \pm 0,11	3,2	3,84 \pm 0,03	0,3
AM2	2,18 \pm 0,57	10,0	3,36 \pm 0,34	4,1
AM3	1,30 \pm 0,15	4,6	2,99 \pm 0,53	7,1
AM4	1,10 \pm 0,09	3,1	1,96 \pm 0,37	7,6
AM5	2,27 \pm 0,05	0,9	3,44 \pm 0,16	1,9
AM6	2,22 \pm 0,16	2,9	3,09 \pm 0,36	4,6
AM7	1,37 \pm 0,15	4,7	2,02 \pm 0,57	11,3
AM8	2,53 \pm 0,06	1,0	3,43 \pm 0,09	1,1
AM9	2,38 \pm 0,21	3,4	3,48 \pm 0,08	0,9
BS1	2,72 \pm 0,11	3,9	3,43 \pm 0,10	1,1
BS2	2,10 \pm 0,04	1,0	2,65 \pm 0,17	2,6
BS3	2,64 \pm 0,34	5,1	3,63 \pm 0,15	1,6
BS4	3,16 \pm 0,09	1,2	4,37 \pm 0,36	3,4
BS5	2,75 \pm 0,40	5,6	3,87 \pm 0,34	3,5
BS6	2,30 \pm 0,45	7,2	3,60 \pm 0,11	1,3
BS7	2,32 \pm 0,13	5,6	3,49 \pm 0,06	0,7
BS8	2,68 \pm 0,36	5,3	4,87 \pm 0,11	0,9
BS9	3,45 \pm 0,24	2,8	4,54 \pm 0,45	4,0
BS10	3,55 \pm 0,07	0,8	4,78 \pm 0,20	1,7
BS11	2,43 \pm 0,04	0,7	3,56 \pm 0,23	2,6
BS12	2,29 \pm 0,42	7,5	3,29 \pm 0,07	0,9
BS13	2,53 \pm 0,57	9,1	3,96 \pm 0,17	1,8
BS14	1,98 \pm 0,03	0,5	3,17 \pm 0,02	0,3
BS15	2,22 \pm 0,23	4,3	2,76 \pm 0,40	5,8
BA1	1,70 \pm 0,37	8,9	1,68 \pm 0,23	5,6
BA2	1,99 \pm 0,08	1,6	2,70 \pm 0,53	8,0
BA3	2,54 \pm 0,19	3,1	3,35 \pm 0,04	0,5
BA4	2,42 \pm 0,21	3,6	3,18 \pm 0,06	0,8
BA5	2,32 \pm 0,03	0,5	3,25 \pm 0,03	0,3
U1	2,82 \pm 0,02	0,3	3,81 \pm 0,71	7,5
U2	1,81 \pm 0,22	4,8	3,84 \pm 0,01	0,1
U3	2,58 \pm 0,05	0,7	3,22 \pm 0,07	0,9
U4	3,72 \pm 0,27	2,9	5,25 \pm 0,26	2,0
U5	2,72 \pm 0,37	5,4	3,57 \pm 0,04	0,4
U6	2,81 \pm 0,11	1,5	3,85 \pm 0,32	3,3

Tabela 2.8: Estimativa da concentração de cafeína por RMN vs. HPLC

Grupo	Contagem	Média (%)	Variância
RMN	35	2,371	0,381
HPLC	35	3,466	0,584

Para comparar dados de cafeína obtidos por RMN e HPLC foi realizada a análise de variância unifatorial (ANOVA). A ANOVA mostrou que para um nível de 95 % de confiança as amostras têm percentual de cafeína estatisticamente diferentes de acordo com a técnica utilizada, a Tabela 2.9 representa o resumo da análise.

Tabela 2.9: Resumo da análise de variância - fator único para o percentual de cafeína obtida por RMN versus HPLC

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	20,988	1	20,988	43,542	0,000	3,982
Dentro dos grupos	32,777	68	0,482			
Total	53,765	69				

CAPITULO III

**Avaliação da composição de amostras de guaraná
empregando UHPLC-MS**

CAPITULO III: AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE AMOSTRAS DE GUARANÁ EMPREGANDO UHPLC-MS

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos várias técnicas têm sido empregadas para análise do perfil metabólico de alimentos como por exemplo estudo da origem geográfica de milhos (*Zea mays*) por IV [120], análise de vinho por UV [121], compostos fenólicos em goji berry por RMN[122] e análise de mel por cromatografia [123]. Adicionalmente, a cromatografia líquida acoplado à espectrometria de massas tem sido reportada. A espectrometria de massas tem a habilidade de separar compostos, no entanto, a combinação com a cromatografia, mais especificamente a cromatografia líquida tem sido aplicada para separação e identificação de compostos químicos nas mais variadas amostras [124].

Dentro desse contexto, a cromatografia líquida de ultraeficiência (HUHPLC) acoplada com analisadores de massa moderno como o tipo **Quadrupolo-Tempo de voo** (Q-Tof) é uma recente técnica que tem sido altamente usada no estudo de metabolitos de plantas, amostras biológicas e de alimentos. A técnica utiliza colunas cromatográficas de partículas pequenas ($< 2,0 \mu\text{m}$) que, melhoram a resolução e reprodutibilidade dos picos, aumentam a sensibilidade e reduzem o tempo de análise [188, 195].

Quando se trata do estudo de perfil metabólico de amostras o volume de dados gerado por meio de um equipamento de UHPLC-MS é muito grande. Assim, as ferramentas quimiométricas tornam-se extremamente úteis no que tange a interpretação de dados complexos. Dentro desse universo encontram-se as duas ferramentas amplamente utilizadas em análise de perfil metabólico de alimentos: Análise de Componentes Principais (PCA) e a Análise Discriminante por Projeções Ortogonais a Estruturas Latentes (OPLS-DA).

A PCA pode ser um poderoso método para a análise de discriminação entre as diferentes espécies, enquanto OPLS-DA pode ser útil para identificar encontrar componentes (marcadores químicos) responsáveis por essa diferenciação. Nesse capítulo foram aplicadas as ferramentas quimiométricas PCA e OPLS-DA aos dados

de UHPLC-MS para discriminação de guaraná de diferentes origens de acordo com o perfil metabólico.

1.2 HUHPLC-Qtof-MS

Os primeiros passos para o surgimento da CLAE foi a mecanização de cromatografia líquida em coluna aberta, feita por Moore e Stein por volta de 1958 [125]. Dentro deste universo surgiu a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE ou do inglês High Performance Liquid Chromatography - HPLC). [126].

De sua criação até os dias atuais essa técnica alcançou muito avanços, os quais foram impulsionados pelo desenvolvimento contínuo de novas partículas de fase estacionária (FE) capazes de melhorar a separação e obter mais estabilidade química e mecânica [127]. Em 1967, foi introduzida por Horvath [128] a utilização de fases estacionárias partículas de sílica porosa irregulares e rígidas de 40 a 50 μm com grande distribuição de tamanho, essas por sua vez, ofereciam eficiência em torno de 1000 pratos teóricos/15 cm, rápida taxa de transferência de massa, porém apresentavam baixa capacidade de amostra, consequência da baixa área superficial [Erro! Indicador não definido.-127, 129].

Por volta de 1970 surgiu FE de 10 μm desenvolvida por Kirkland. Essa era preparada pela precipitação da sílica gel de uma solução de silicato, seguida por secagem, moagem e separação de tamanho por decantação apresentavam ganho de 6000 pratos/15 cm comparadas a já existentes. No entanto, apresentavam problemas na reprodutibilidade do enchimento, por conta da presença de partículas menores e irregulares [126 - 127].

Além do mais, devido às partículas pequenas consequentemente a coluna apresentava maior resistência ao escoamento, existindo, assim a necessidade de maior pressão para conduzir a fase móvel (solvente líquido) através da coluna. Assim, bombas de alta pressão e colunas com embalagem metálicas foram empregadas para criar e suportar as altas pressões necessárias para a técnica conhecida como de alto desempenho (HPLC) [130].

Depois dos anos 80 iniciou-se a introdução de partículas esféricas e a atenção voltou-se para a redução do diâmetro das partículas de FE, que por sua vez, alcançavam até 22000 pratos/15 cm. E passados 50 anos do desenvolvimento de cromatografia, surgiram as partículas esféricas porosas de 2,5 – 1,7 μm , porém com

esses tamanhos de partículas era exigido instrumentação mais sofisticada, a fim de se obter o máximo desempenho cromatográfico [131]. Além do mais, trabalhar com partículas menores demanda alta pressão, assim para driblar esse problema sistemas cromatográfico capazes de trabalhar em altas pressões, acima de 100 MPa, foram criados dando origem a Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UHPLC).

Inicialmente a técnica foi denominada de cromatografia líquida de ultra alta eficiência, com os primeiros trabalhos com impacto relevante foram publicados em 1997 [132-133] que utilizaram partículas porosas de 1-1,5 μm , empregada na separação benzodiazepínicos de compostos farmacêuticos, ainda sim a técnica era limitada a laboratórios que produziam seu próprio aparelho [136]. A qualidade de separação pela técnica foi um fator que favoreceu o crescimento de estudo e pesquisa para o desenvolvimento da técnica [127], dando origem a cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC).

A UHPLC é uma das técnicas mais avançadas no campo da separação, aliando o princípio a cromatografia HPLC e utilizando FE com partículas menores, esses dois fatores permitem aumento de resolução de picos e diminuem o tempo de análise [134-136]. Uma das principais vantagens do uso de partículas menores que 2 μm é que a eficiência da coluna pode ser mantida com a diminuição do seu comprimento. A coluna menor permite separações mais rápidas, pois que o tempo de separação tem relação proporcional ao comprimento da coluna. Além do mais, uma coluna menor, quando comparada a uma maior, empregando-se a mesma vazão de fase móvel, gasta uma menor quantidade de solvente, de amostra e de FE [127, 129].

As partículas menores tendem a reduzir a altura de prato teórico e, dessa forma, são obtidas colunas com um número de pratos maior, logo, são mais eficientes. As partículas pequenas tendem a possibilitar trocas do soluto na FM e nos poros das partículas mais rapidamente por conta da menor profundidade dos poros. Assim, o tempo gasto é menor para transferência de massa do analito entre a FM e a FE, eluindo em picos estreitos [127]. O princípio da separação de compostos é dado pela equação de Van Deemter, que é uma fórmula empírica que descreve a relação entre a velocidade linear (taxa de fluxo) e altura do prato (HETP, altura equivalente para pratos teórico/eficiência teórica da coluna). De acordo com o princípio da separação da HPLC/UHPLC, uma vez que, o tamanho das partículas de

material da coluna diminui, a eficiência da separação cromatográfica, a velocidade e resolução também aumenta [137].

Na Figura 3.1 está representada a curva de van Deemter [129, 131 138], que relaciona valores de altura de pratos teóricos em função da velocidade. Percebe-se que partículas $\leq 2 \mu\text{m}$ podem ser usadas para separações rápidas, pois mesmo com uso de colunas curtas e com altas velocidades a eficiência é mantida.

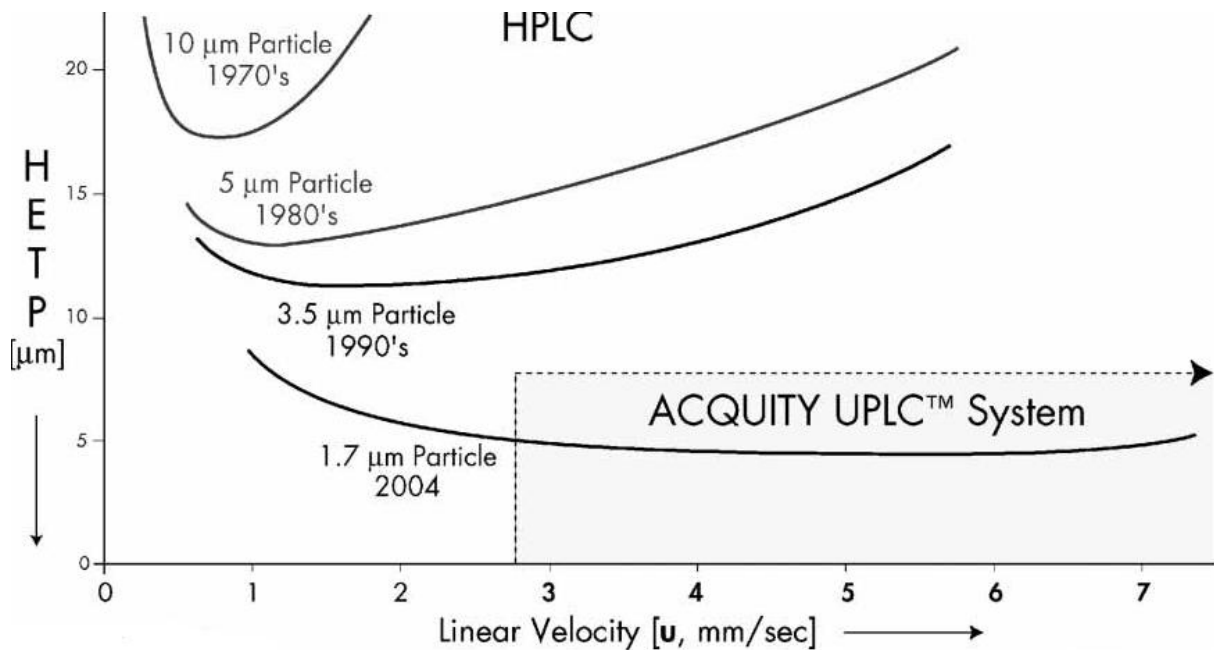


Figura 3.1: Curva de van Deemter, ilustrando a evolução do tamanho das partículas para cromatografia líquida [131].

O primeiro equipamento comercialmente produzido foi feito pela Waters Corporation, conhecido como Acquityz ultra performance liquid chromatography system (UHPLC™), esse foi comercializado em 2004 [131, 139]. Atualmente a UHPLC vem sendo empregada em diversas aplicações como determinação de agrotóxico, análise de alimentos em geral, determinação de conservantes em cosméticos e até análise de material biológico.

A grande aplicação e estudo da UHPLC permitiu, assim como na HPLC, que essa técnica fosse se desenvolvendo e sendo aprimorada quanto a sua utilização, nesse contexto destaca-se o acoplamento de UHPLC com o espectrômetro de massas. O acoplamento entre estas duas técnicas dá origem a uma ferramenta analítica versátil e de grande potencial na análise qualitativa e quantitativa [140]. Esse por sua vez combina as vantagens da cromatografia como a alta seletividade e

eficiência de separação com as vantagens da espectrometria de massas, que são obtenção de informação estrutural, massa molecular e aumento adicional da seletividade [129]. Detecção de MS é significativamente aprimorada por UHPLC: aumento das concentrações de pico; redução da dispersão cromatográfica em caudas inferiores; promove o aumento da eficiência fonte de ionização [131, 139]

Um trabalho feito por meio do monitoramento de metabolitos *in vivo* compara os desempenhos do HPLC e UHPLC acoplados com espectrômetro de massas. Os dados da pesquisa ilustram os benefícios obtidos a partir da resolução adicional da UHPLC, tanto em termos de especificidade e qualidade espectral, revelando novas informações e reduzindo o risco de não se detectar metabolitos potencialmente importante, portanto, conclui que o UHPLC em comparação com HPLC tem-se um ganho de resolução e o aumento do número de picos discretos [141].

Um outro trabalho, realizado em 2007, fez primeira aplicação genômica funcional da tecnologia UHPLC-MS a fim de traçar o perfil metabólico de urinas de machos e fêmeas de dois grupos de linhagens fenotipicamente normais de ratos (C57BL19J e Alpk: ApfCD) e uma cepa "ratinho nu" e feita uma comparação com análises por HPLC-MS. Os resultados mostraram que UHPLC (FE com partículas de 1,7 μm) oferece vantagens significativas sobre HPLC (FE com partículas de 3,5 μm) de fase reversa convencional, com mais do dobro da capacidade de pico, um aumento de quase 10 vezes na velocidade e 3-5 vezes na sensibilidade [142].

A evolução da UHPLC e possibilidade de acoplamento com espectrometria de massa, permitiu também o emprego de analisadores de massa moderno como o tipo Quadrupolo-Time-of-flight (Q-ToF). A associação dos dois analisadores, ao contrário dos outros analisadores de massa que são examinadas sequencialmente através de um intervalo de razões m/z de interesse e fornecer o espectro de massas selecionadas, o analisador ToF detecta todos os íons que entram no tubo de voo em um momento específico, isso só é possível por conta da sua alta velocidade de varredura [143].

1.3 Análise Discriminante por Projeções Ortogonais a Estruturas Latentes (OPLS-DA)

A OPLS-DA tem suas bases teóricas fundamentada na PLS. Esta ferramenta foi introduzida por Wold em 1975 [144], e trata-se de um método de calibração multivariada que utiliza a técnica de Análise de Componentes Principais

(PCA) para a redução da dimensionalidade do conjunto de dados para posterior correlação entre os espectros (matriz \mathbf{X}) e as propriedades de interesse (matriz \mathbf{Y}) por meio de modelo multivariado [145 -148]. O PLS permite identificar fatores (combinações lineares das variáveis X) que melhor modelam as variáveis dependentes Y .

Do PLS surgiu uma variante a chamada OPLS, introduzida em 2002 por Trigg e Wold [149], A ideia principal da OPLS é separar a variação sistemática de X em duas partes, uma que é linearmente relacionada com Y e outra que não está relacionada (ortogonal) a Y . O-PLS fornece uma maneira de remover variação sistemática de um conjunto de dados de entrada \mathbf{X} não correlacionadas com a resposta definida \mathbf{Y} ; dentro outras palavras, para remover a variabilidade em que \mathbf{X} é ortogonal ao \mathbf{Y} . Essa partição dos dados de X facilita a capacidade de interpretação do modelo resultante. Assim, mais informação e conhecimento de um sistema pode ser recuperada e analisada [144, 149].

As ferramentas quimiométricas PLS e OPLS utilizam o conhecimento obtido durante o desenho do estudo. Elas permitem separar as observações por meio de um gráfico de dispersão (*score plot*) em, pelo menos duas classes diferentes e, desta forma, usar outros métodos multivariados mais avançados como a análise discriminante (DA), para corroborar seus resultados [147].

OPLS-DA foi discutido pela primeira vez em 2006 [146], considera a vantagens da Ortogonal PLS mais simples que a PLS, aplicando na OPLS a análise discriminante (DA) que mantém as vantagens da OPLS adicionando as vantagens da análise discriminante [144]. O principal benefício de interpretação usando OPLS-DA em comparação com PLS-DA, encontra-se na capacidade de OPLS-DA para separar a variação preditiva da não-preditiva (ortogonal) [146], como representado na Figura 3.2. A vantagem de OPLS-DA em comparação com PLS-DA que é um único componente é usado como um preditor para a classe, enquanto que os outros componentes descrevem a variação ortogonal para o primeiro componente preditivo [150-151]. Um trabalho que comparou o modelo OPLS-DA e PLS-DA para avaliar risco de lesões, observou que o OPLS-DA mostrou-se melhor modelo quanto se tratando da interpretação dos dados [144].

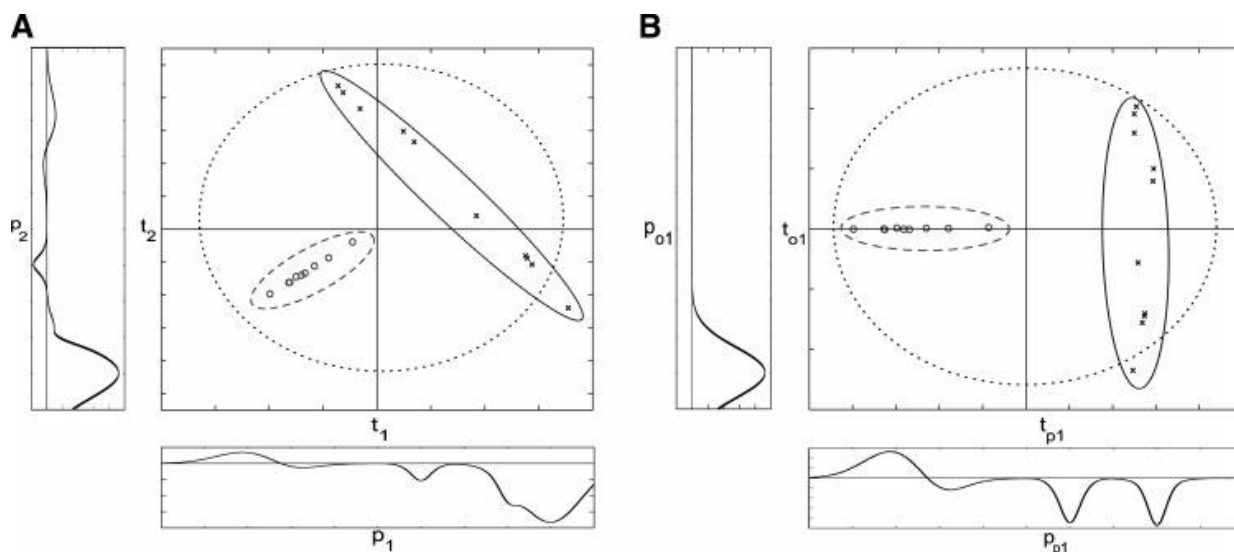


Figura 3.2: Demonstração das principais diferenças entre PLS-DA e OPLS-DA. Para a PLS-DA (A), a direção discriminatória entre as classes é uma combinação de ambos os t_1 e t_2 . Em (B), OPLS-DA separa a direção discriminatória em $t_{p,1}$ da direção Y-ortogonal $t_{o,1}$, tornando o loadings correspondente $p_{p,1}$, simples para interpretar [144].

A OPLS-DA ultimamente tem sido aplicada a algumas técnicas de análise como RMN de ^1H : para verificar os efeitos da adubação foliar e pesticidas durante a formação do fruto sobre a composição nutricional de laranjas [152]; para visualizar correlação padrões entre metabólitos de patos de idades diferentes [153], discriminação entre produtos de tomates chinês e italiano [154]. Utilizando IV: para analisar resíduo de parede celular de diferentes leveduras [155]; classificação de origem de milho [156]; classificação de cultivar de arroz [157]. E tem se mostrando uma ferramenta muito útil em dados de cromatográfica com analisador de massas, pois facilita a interpretação dos dados, classificação e identificação de biomarcadores.

Dessa forma, a OPLS-DA vem sendo associada a: LC-MS/MS na discriminação de constituintes de framboesa preta cultivada na Coreia do Sul [158] e UHPLC-Qtof/MS na autentificação de suco de frutas [159], análise metabolômica e origem de laranja [160], estudo de metabólitos contaminantes em planta [161]; análise de espécie reativa de oxigênio produzidas por tabaco [162]; análise de material biológico [163] e análise metabólômica de urina suína tratada com β 2-agonists [164].

2 METODOLOGIA

2.1 Análise e determinação de constituintes do extrato de Guaraná através do equipamento Xevo UHPLC-Qtof

2.1.1 Preparo do extrato

Pesaram-se 20 mg do guaraná moído, ao qual foram adicionados 2 mL de metanol 70% (grau HPLC). Em seguida a mistura foi levada ao banho de ultrassom por 2 minutos, centrifugada por 2 minutos (600 RPM) e retirado o sobrenadante para análise.

2.1.2 Análise cromatográfica

A análise foi realizada em um UHPLC modelo Acquity (Waters), acoplado a um detector de massas com analisador Quadrupolo/Tempo de Voo (QtoF, Waters). As corridas cromatográficas foram realizadas em uma coluna Waters Acquity UHPLC BEH (150 x 2,1 milímetros, 1,7 µm), temperatura fixa de 40 °C, fases móveis água com 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (B), gradiente variando 0-15 min (2-95%) de B; (15,1-17) min (100%) de B; (17,1-19,1) min (2%) de B, fluxo de 0,4 mL / min e volume de injeção de 5 µl.

2.1.3 Condições do Massas de Alta resolução - Xevo-QToF

A ionização foi realizada com fonte eletrospray (modo negativo - ESI⁻), adquirido na faixa de 110-1180 De temperatura da fonte fixa a 120 °C, temperatura de dessolvatação 350 °C, fluxo do gás dessolvatação de 500 L/h, cone de extração de 0,5 V, voltagem capilar de 2,6 kV. Em baixo scan, a tensão de cone foi 35 V, energia de colisão de 5 eV (trap). Em alto scan, a tensão do cone foi de 35 V, com uma rampa de energia de colisão de 20-40 rampa eV (trap). Leucina encefalina foi utilizada como lock mass. O modo de aquisição foi MS^E. O instrumento foi controlado pelo software Masslynx 4.1 (Waters Corporation).

2.3.2 Análise quimiométrica

As análises foram feitas por meio do software MassLynx (versão 4.1, Waters Corporation). Para as análises foram realizadas as seguintes condições: tempo de retenção 2,50 a 6 min, range entre 120 a 1180 Da e eliminação do ruído em 5. Uma lista da identidade dos picos foi criada usando o tempo de tenção, razão massa carga (m/z). A intensidade de cada pico detectado foi normalizada através das intensidades dos picos na amostra. O método utilizado para gerar o PCA foi centrado na média. Os resultados dos pares tr- m/z , nome das mostras e intensidade dos íons foram analisados por PCA e OPLS-DA.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise e determinação de constituintes do extrato de Guaraná

O conjunto de técnicas usadas para análise permite a separação e caracterização de misturas complexas, e possibilitam a identificação e quantificação de moléculas alvo. As informações geradas a partir dos espectros de massas e de padrões de referência permitiram a identificação de quatorze compostos, representados na Tabela 3.1, caracterizados como catequina, epicatequina, um dissacarídeo, além de oligômeros denominados de procianidinas que é uma classe de taninos condensados da série flavan-3-ol, [165], já relatados como componentes em diversos alimentos e bebidas como uva, vinho e chá verde [166-168]. A literatura mostra estudos de isolamento e caracterização de procianidinas em guaraná [169-170].

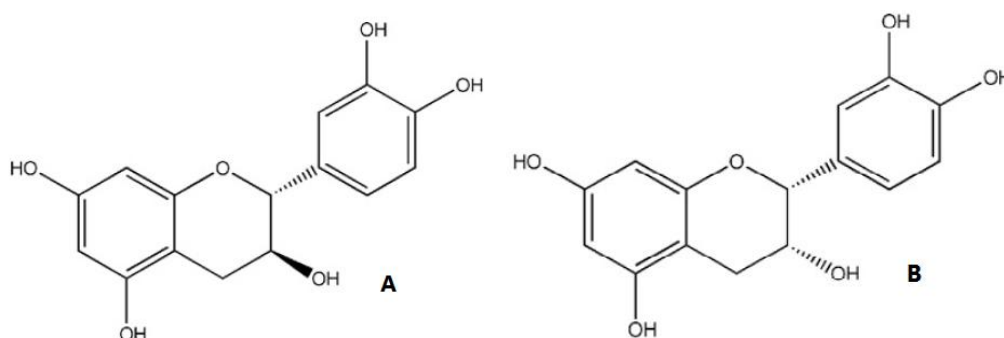


Figura 3.3: Estrutura química da catequina (A) e epicatequina (B) [165].

Tabela 3.1: Constituintes identificados ou tentativamente identificados em *Paullinia cupana*.

Nº do Pico	Tr min	[M-H] ⁻ Calculado	[M-H] ⁻ Observado	Fragmentação (EM/EM)	Formula Empírica	ppm (erro)	Tentativa Identificação
1	0,89	341,1080	341,1084	179,0548	C ₁₂ H ₂₁ O ₁₁	1,2	Dissacarídeo
2	2,78	577,1353	577,1346	451,1090; 425,0877; 407,0781; 289,0736	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₂	1,2	Prc B-type dímero
3	2,92	1153,2610	1153,2614	865,2078; 577,1353; 425,0789; 407,0789; 289,0721	C ₆₀ H ₄₉ O ₂₄	0,8	Prc B-type Tetrâmero
4	3,10	289,0713	289,0712	245,0658; 205,0489	C ₁₅ H ₁₃ O ₆	0,3	Catequina *
5	3,22	865,1963	865,1980	739,1872; 577,1364; 425,0864; 407,0787; 289,0709	C ₄₅ H ₃₇ O ₁₈	0,3	Prc B- tipo Trímero
6	3,28	577,1347	577,1346	451,1115; 425,0893; 407,0794; 289,0710	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₂	0,2	Prc B-tipo dímero
7	3,45	863,1849	863,1823	711,1403; 573,1063; 451,1047; 411,0740; 289,0702	C ₄₅ H ₃₅ O ₁₈	3,0	Prc A-tipo Trímero
8	3,55	289,0707	289,0712	245,0778; 205,0495	C ₁₅ H ₁₃ O ₆	1,7	Epicatequina *
9	3,59	863,1790	863,1823	711,1334; 573,1038; 451,0998; 411,0697; 289,0720	C ₄₅ H ₃₅ O ₁₈	3,8	Prc A- tipo Trímero
10	3,95	1151,2499	1151,2457	863,1879; 575,1196; 407,0688; 289,0729	C ₆₀ H ₄₇ O ₂₄	3,6	Prc A- tipo Tetrâmero
11	4,03	1151,2496	1151,2457	863,1858; 575,1148; 407,0743; 289,0789	C ₆₀ H ₄₇ O ₂₄	3,4	Prc A- tipo Tetrâmero
12	4,42	575,1178	575,1190	449,0874; 423,0763; 407,0761; 289,0748	C ₃₀ H ₂₃ O ₁₂	2,7	Prc A- tipo dímero
13	4,90	575,1201	575,1190	449,1015; 423,0775; 407,0698; 289,0671	C ₃₀ H ₂₃ O ₁₂	1,9	Prc A- tipo Dímero
14	5,41	861,1700	861,1667	575,1207; 449,1167; 423,0686; 289,0751	C ₄₅ H ₃₃ O ₁₈	3,8	Prc A- tipo Dímero

* Identificado através de comparação com o padrão.

As procianidinas podem apresentar dois tipos de ligação, do tipo **A** e **B**, representadas na Figura 3.4, que variam na ligação na unidade do flavonoide: as do tipo B são caracterizadas por unidades flavanóides individualmente ligados, geralmente entre C-4 e C-6 da unidade de extensão de cadeia ou C-4 e C-8 da unidade de terminação de cadeia. As procianidinas do tipo A diferem das do tipo B, por possuir uma ligação éter adicional em C-2 [171-172].

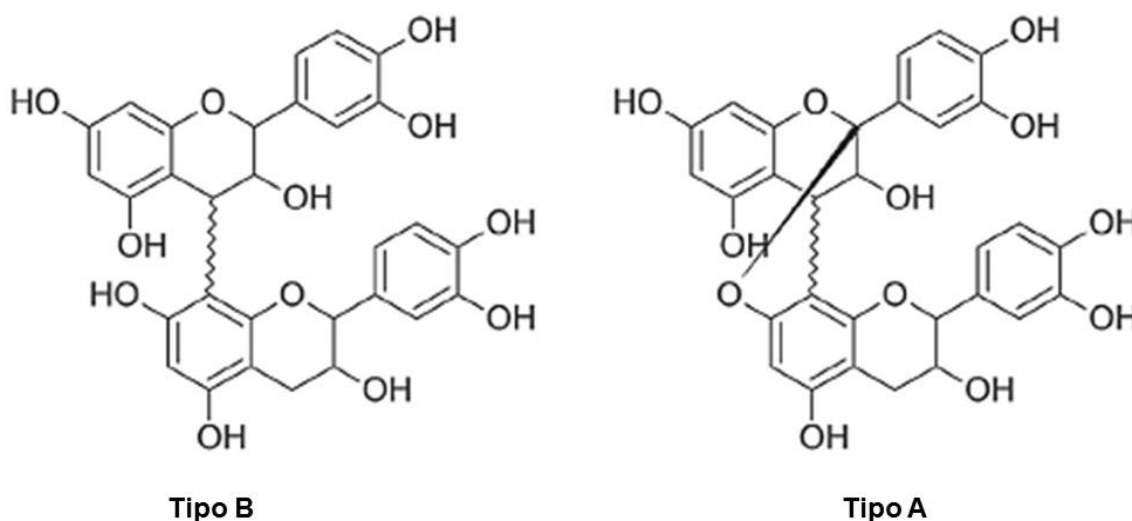


Figura 3.4: Estrutura química da Procianidina [173].

Na Figura 3.5 estão representados os íons m/z 575, 863, 1151. Esses íons diferenciam-se em 288 Da e são atribuídos a procianidinas do tipo A formada por dímeros, trímeros e tetrâmeros, respectivamente. As procianidinas do tipo B apresentam íons em m/z 577, 865 e 1153 e diferenciam das do tipo A em 2 unidades de massas. Nesse estudo foi observado procianidinas com grau de polimerização, variando entre 2 a 4 unidades de (epi)catequinas condensadas.

Os mecanismos de fragmentação permitem a identificação e caracterização das procianidinas, onde as mais comuns, em modo negativo, foram através da fissão heterocíclica do anel B com perda de 126 Da (Heterocyclic Ring Forming fission, HRF); Retro Diels-Alder com perda de 152 Da; saída de água; formação de benzofurano (benzofuran-forming fission - BFF)); quinona metideo (quinone methide fission (QM)); além da saída de ácido gálico com perda de 152 Da.

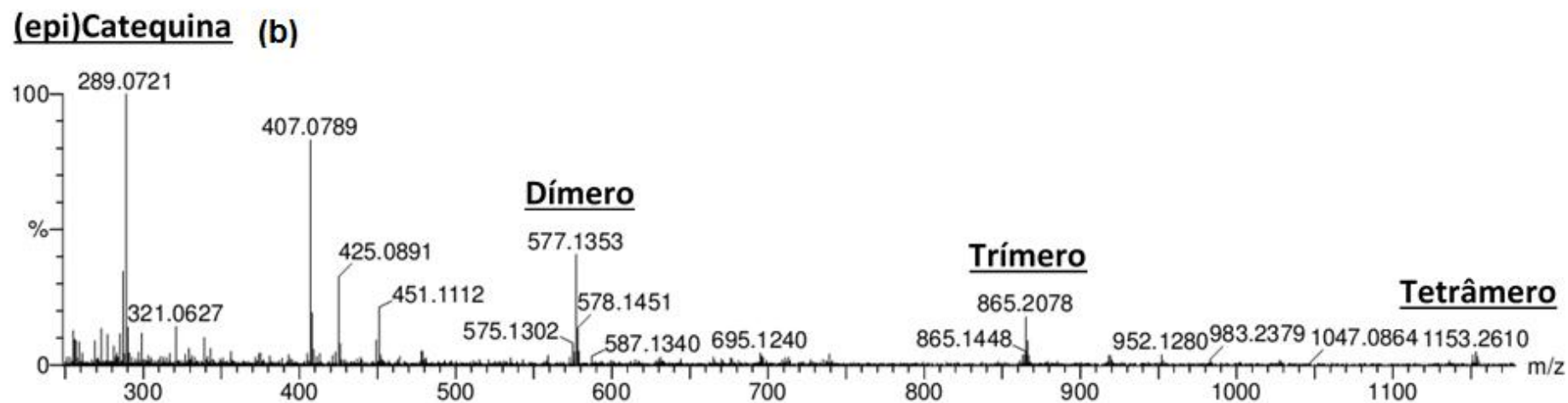
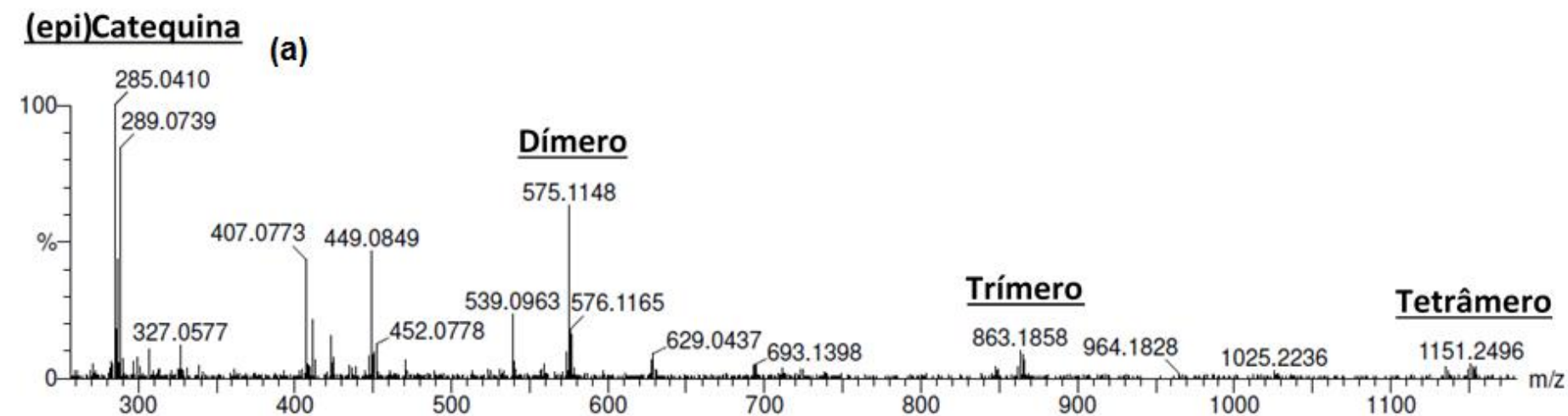


Figura 3.5: Diferentes fragmentações entre as procianidinas – (a)Tipo A e (b) Tipo B

O pico 1 mostrou um $[M-H]^-$ em m/z 341,1080 com um fragmento EM/EM em m/z 179 sugerindo a perda de hexose. O composto foi identificado como um dissacarídeo [174].

Os picos 2 e 6 mostraram um íon precursor em m/z 577, na Figura 3.6 está representada a proposta de fragmentação, com fragmentos EM/EM em m/z 451 $[M-H-126]$, oriundo da fissão heterocíclica do anel B (HRF) e saída do 1,3,5-triidroxibenzeno; m/z 425 $[M-H-152]$, Retro Diels-Alder de uma unidade de (epi)catequina superior, que refere-se à perda de uma unidade galoil; m/z 425 $[M-H-18]$ refere-se eliminação da água, provavelmente na posição 3-OH do anel C, assim formando um íon (m/z 407), esse, por sua vez, mais estável que o m/z 425, provavelmente por conta da formação da ligação no anel F; e m/z 289 $[M-H-288]$, quinona metideo (Quinone methide, perda de (epi)catequina formada pela ligação interflavonoídica, consistente com dímeros de procianidinas do tipo B, (epi)catequina-(epi)-catequina [166, 175-177].

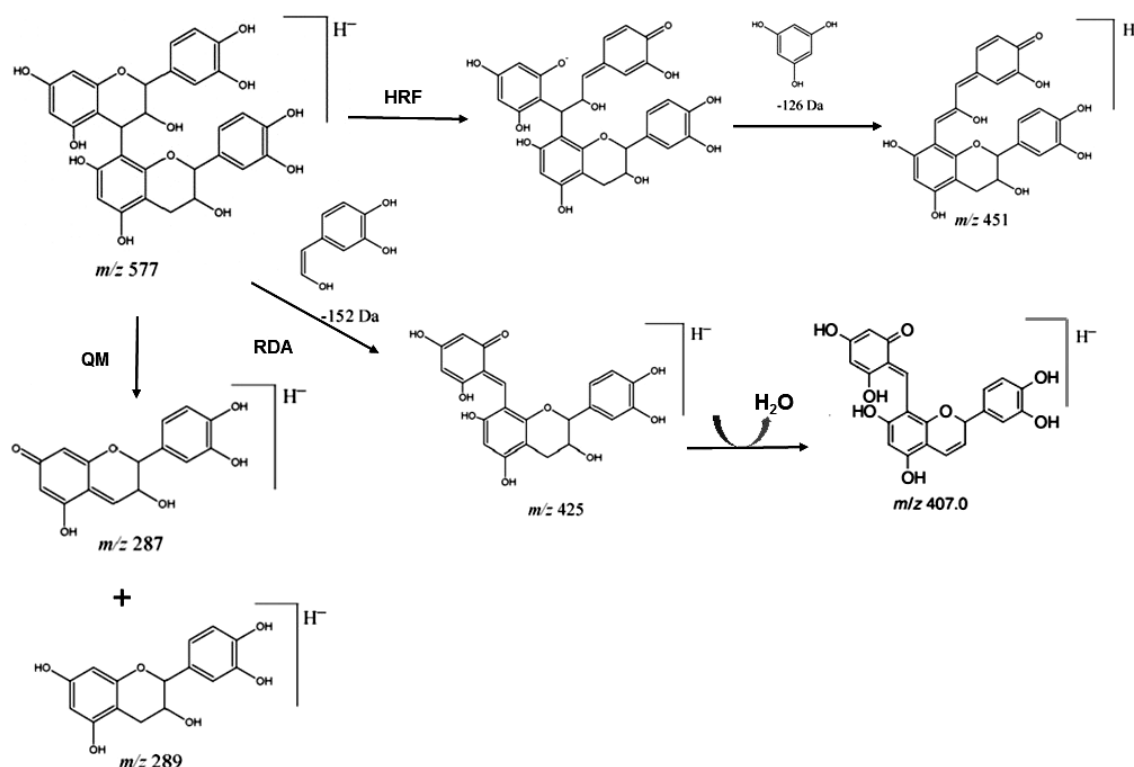


Figura 3.6: Propostas de fragmentação para dímeros de procianidinas do tipo B, mostradas nos picos 2 e 6 com íon precursor em m/z 577 [177-178].

O espectro de massas do pico **3** mostrou um $[M-H]^-$ em m/z 1153, com fragmentos EM/EM em m/z 865 e 577 [M-H-288; M-H-576] atribuídos a perda de uma e duas unidades de (epi)catequinas respectivamente (QM); m/z 425 [M-H-576-152], formado a partir de uma quebra de ligação interflavânica seguida de uma Retro Diels-Alder; e m/z 289 [M-H-864] típico da (epi)catequina. Tais fragmentos são representativos de tetrâmeros de procianidinas do tipo B, que consiste na junção de duas procianidina do Tipo B: (epi)catequina-(epi)catequina-(epi)catequina-(epi)catequina [166, 175].

Os picos **4** e **8** foram identificados como catequina e epicatequina através do íon precursor em m/z 289 que apresentou um tempo de retenção semelhante aos padrões.

Para o íon precursor com massa em m/z 865, pico **5**, que possui proposta de fragmentação apresentada na Figura 3.7, onde observaram-se fragmentos de massa em m/z 739 [M-H-126] por meio do mecanismo de fissão heterocíclica (HRF) do anel C do manômero superior de (ep)catequina, a clivagem possibilita a saída do anel A como 1,3,5-triidroxibenzeno; m/z 577 [M-H-288], perda de uma unidade de (epi)catequina superior via mecanismo (QM), assim formando uma unidade dimérica com os anéis D-F e G-I; m/z 425 [M-H-289-152], formado a partir de uma quebra de uma ligação interflavânica e eliminação da unidade de (ep)catequina anéis A-C, seguida do mecanismo de Retro Diels-Alder no anel F, assim formando o íon m/z 425 e eliminando o anel E em forma de uma unidade de galoil; o íon m/z 407 [M-H-289-152-18] sugere a perda de água do fragmento m/z 425; e m/z 289 [M-H-577] característico da (epi)catequina. Esses dados mostram uma procianidina do tipo B formada por (epi)catequina-(epi)catequina-(epi)catequina [166, 175, 179].

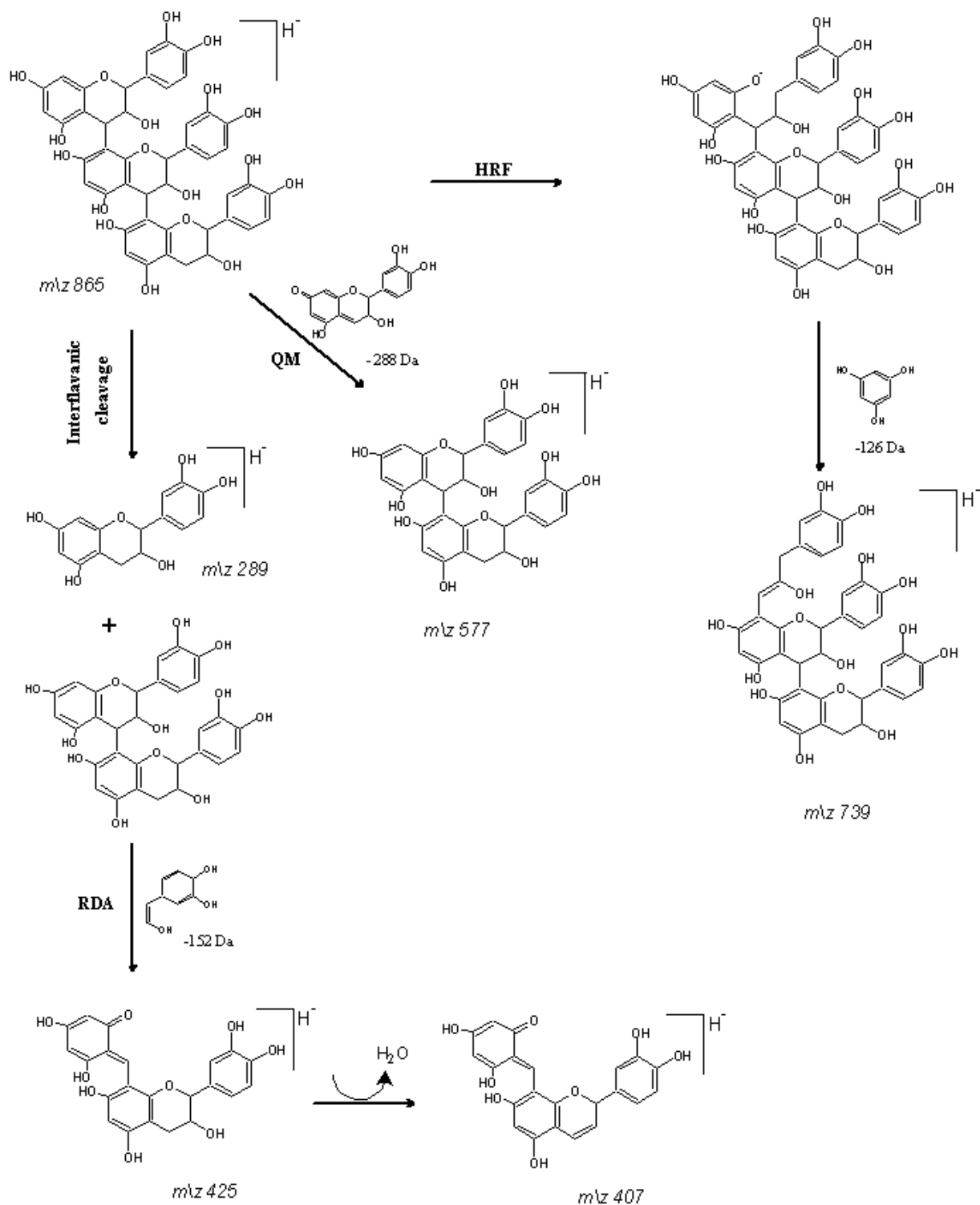


Figura 3.7: Propostas de fragmentação para os principais íons do trimero de procianidinas do tipo B, mostradas no pico 5 com íon precursor em m/z 577.

A ligação de trimeros com somente uma ligação tipo A podem apresentar (epi)cat-A-(epi)cat-(epi)cat com fragmentos em m/z 573 e 289 gerados da QM

clivagem entre meio e a unidade terminal ou (epi)cat-(epi)cat-A-(epi)cat com fragmentos em m/z 575 e 289 a partir QM clivagem entre top e a unidade do meio. Os picos **7** e **9** apresentaram um íon precursor em m/z 863, apresentando fragmentos em m/z 711, 573 e 289. O fragmento em m/z 711 é formado a partir de retro Diels Alder da unidade de (epi)catequina com perda de 152 Da. Baseado no fragmentos, os picos **7** e **9** foram caracterizados como (epi)cat-A-(epi)cat-(epi)cat [166, 180].

Os picos **10** e **11** apresentaram um íon precursor em m/z 1151 com fragmentos EM/EM em m/z 863 [M-H-288] e 575 [M-H-576], através de Qm clivagem, com perda de unidades (epi)catequina; m/z 407 [M-H-575-150-18], RDA seguido de perda de água; 289 [M-H-862], QM clivagem de três unidades de (epi)catequina. Os picos foram caracterizados como tetrâmeros de procianidina A formados por (epi)catequina-(epi)catequina-(epi)catequina-(epi)catequina [166, 175].

Os picos **12** e **13** mostraram um íon precursor em m/z 575,1178, na Figura 3.8 está representada proposta de fragmentação para esse íon, mostrando fragmentos EM/EM em m/z 449 [M-H-126], HRF; 423 [M-H-152], Retro Diels-Alder de uma unidade de (epi)catequina ligada; e 289 [M-H-288], Qm clivagem de uma unidade de (epi)-catequina. Os dados mostram que os picos são formados por dímeros de procianidina tipo A ($C_{30}H_{23}O_{12}$) [175], este por sua vez, apresenta em sua estrutura dois prótons a menos que o dímero de procianidina do tipo B [181-182].

O pico **14** mostrou um íon precursor em m/z 861 compatível com a presença de um trímero de procianidina ligados por duas ligações do tipo A [166]

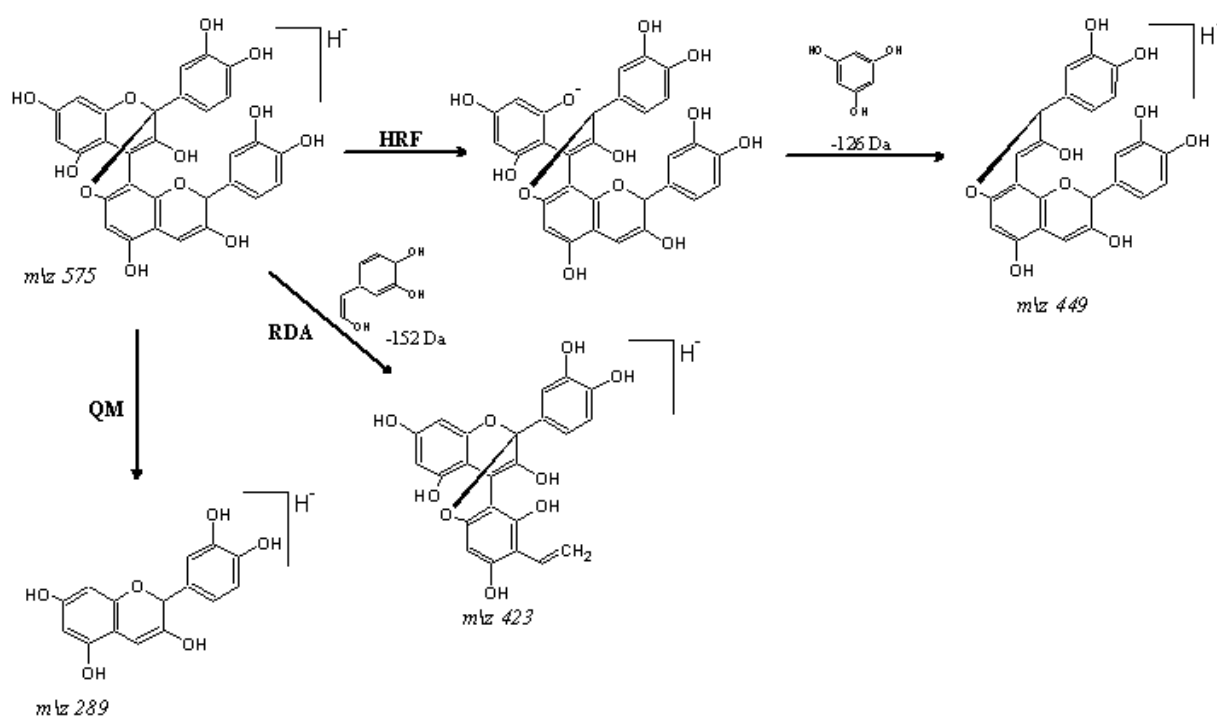


Figura 3.8: Propostas de fragmentação para dímeros de procianidinas do tipo A mostradas nos picos **12 e 13** com íon precursor em m/z 575 [182].

3.2 Análise de Componentes Principais

As amostras de guaraná foram divididas em grupos de acordo com a origem,: Baixo Sul (BS) apresentadas por quadrado na cor azul (■); as amostras Comerciais da Bahia (BA) na cor verde (■); as amostras da cidade de Una – Ba (U) na cor vermelha (■); e as amostra de Amazonas (AM) na cor preta (■). Utilizou-se a Análise de Componentes Principais (PCA), representado na Figura 3.9, com objetivo de verificar a distinção entre os grupos de acordo com do perfil metabólico, por meio dos dados de tempo de retenção e razão massa carga (T_R - m/z), obtidos a partir da análise de amostras de guaraná por UHPLC-Qtof/MS.

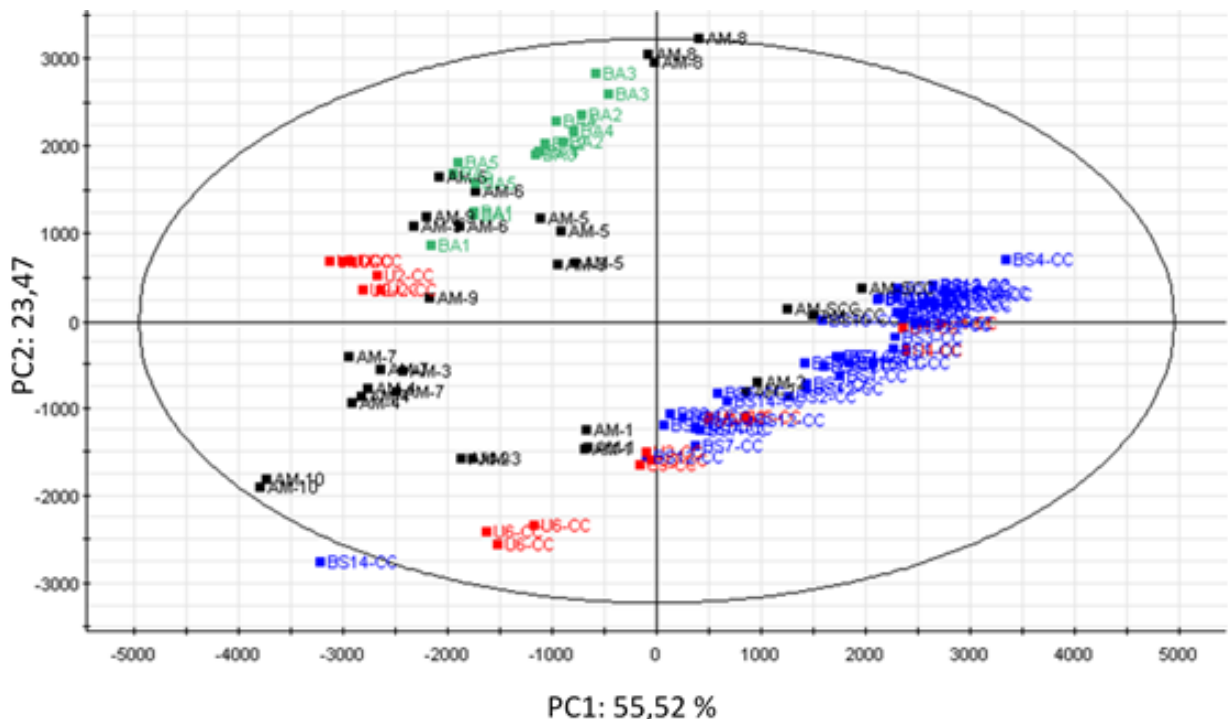


Figura 3.9: Gráfico de scores da PC1 x PC2 dos dados usando o tempo de retenção e razão massa carga (T_R - m/z) das amostras de guaraná do Baixo Sul (■), Comercial - BA (■), Una - Ba (■), Amazonas (■).

Os escores das informações adquiridas pela PCA, com 79 % do total da variância acumulada nos eixos diaxiais PC1 e PC2.

É possível identificar a tendência de formação de dois grupos majoritários distribuídos sob a primeira componente principal (PC1). A esquerda da PC1 (scores

negativos) encontra-se um grupo formado por amostras comerciais de Bahia (BA em verde), do lado direito (scores positivos de PC1) encontra-se a maioria da amostra do Baixo Sul (BS em azul). Já originárias de Una-Ba (U em vermelho) e do estado do Amazonas (AM em preto) a tendência de agrupamento de discriminação não foi obtida como esperado já que algumas das amostras apresentaram tendências de agrupamento com as amostras do BA e BS, e outras com distribuição aleatória no plano.

Nas Figuras 3.10 e 3.11 estão representados os gráficos de pesos (*loadings*) com *Tempo de Retenção* (t_R) e *Massa* (m/z), respectivamente, das amostras de guaraná. A análise desses gráficos permite destacar quais foram os pares de t_R - m/z responsáveis pela distribuição e agrupamento das amostras no gráfico de score (Figura 3.9). Assim é possível inferir que os compostos (destacados em vermelho nas Figura 3.10 e 3.11) catequina **Catequina** (t_R - m/z : 3.08 - 289.0749), **Epicatequina** (t_R - m/z : 3.55 - 289.0759) com valores de *scores* positivo em PC1 e PC2, e os compostos **Dímero de Procianidina do tipo B** (t_R - m/z : 3.26 - 577.1458), **Trímero de Procianidina do tipo A** (t_R - m/z : 3.59 - 863.1722), **Dímero de Procianidina do tipo A** (t_R - m/z : 4.43 - 575.1169) e **Dímero de Procianidina do tipo A** (t_R - m/z : 4.90 - 575.1165) com valores de *scores* negativos em PC1 e PC2 foram os principais responsáveis pela discriminação das amostras do Baixo sul.

Já os compostos (destacados em azul nas Figuras 3.10 e 3.11) **Dímero de Procianidina do tipo A** (t_R - m/z : 4.89 - 575.1165), **Dímero de Procianidina do tipo A** (t_R - m/z : 4.43 - 575.1169) e **Trímero de Procianidina do tipo B** (t_R - m/z : 3.59 - 863.1722) com valores negativos em PC1 e positivos em PC2 são os principais responsáveis pela discriminação das amostras comerciais da Bahia.

dados, representados nas Figura 3.12 e 3.13, respectivamente. As duas ferramentas estatísticas são complementares e, portanto, devem ser combinados para uso^[183]. Além disso, as parcelas de contribuição para Hotelling T2 ou DModX são utilizados para analisar quais as variáveis contribuem para observações defeituosas.

O intervalo Hotelling's T2 determina a distância da origem no plano modelo (centro do espaço score) para cada observação selecionada. Um valor T2 grande para uma dada observação indica que a observação está longe das outras contidas nas componentes selecionadas no espaço pontuação [184].

O gráfico de DModX representa a distância de uma observação multivariada do no modelo, assim, quando a amostra está dentro de controle, ou seja, explicado pelo modelo, o valor DModX deve ser pequeno [184]



Figura 3.12: Gráfico de Hotelling's T² a partir dos dados de PCA.

Analisando o gráfico de Hotelling's T², representado na Figura 3.12, é possível inferir que apenas as amostras U6, AM8, AM5 e AM6 são *outliers*, ou seja, apresentam-se com valores de T² altos e estão acima do limite controle de 95% e U6 acima de 99%, essas amostras são anômalas ao centro dos dados da PCA. O Hotelling's T² pode está relacionado com valores extremos de áreas de pico. Levando-se em consideração o

número reduzido de amostras acima do valor crítico, optou-se por não retirar as mesmas do modelo.

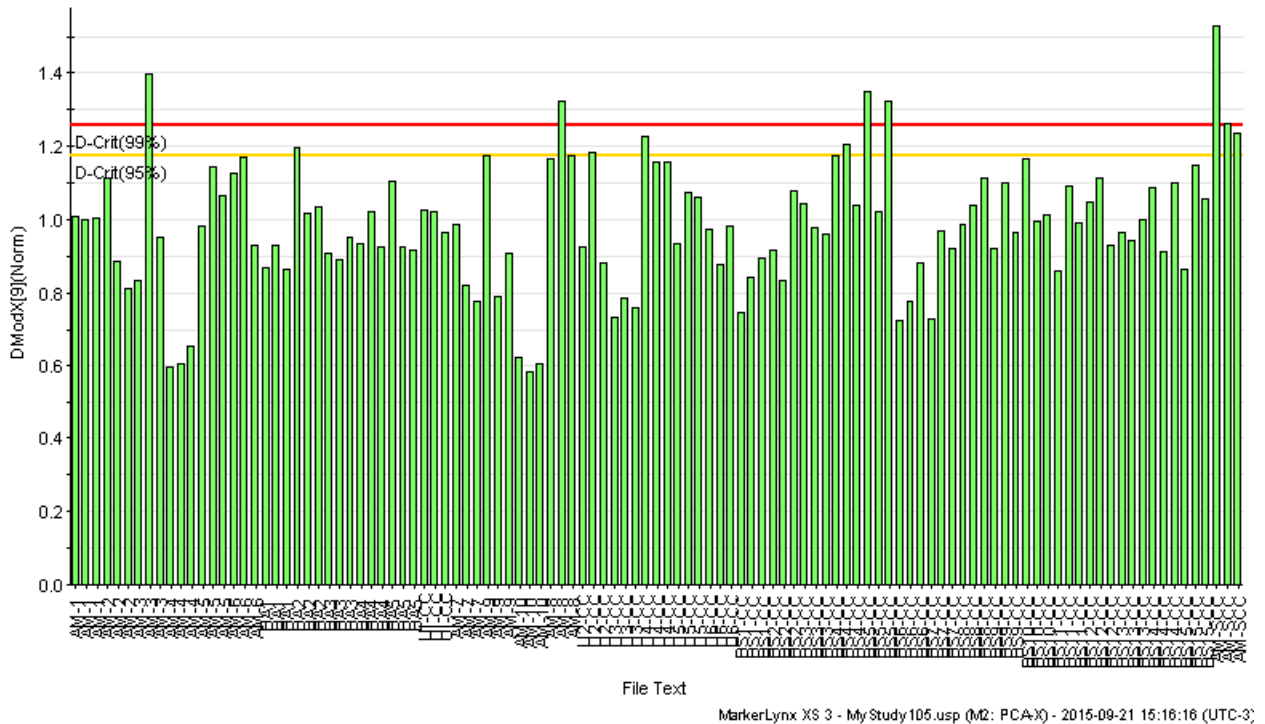


Figura 3.13: Gráfico de DModX - resumo do ruído do modelo PCA.

Nos dados mostrados no gráfico de DModX que fornecem a distância de cada amostra em relação ao espaço para cada observação, representado na Figura 3.13, é possível notar que a variação em um número reduzido de observações (AM3, AM2, AM8, U4, BS4, BS5) não foi explicada pelo modelo pela PCA, estão acima do limite de controle (95%-nível de confiança), assim, optou-se por manter as observações dentro do modelo. Este desvio pode estar relacionado com alteração da relação de correlação entre picos, ou seja, as proporções de áreas. Assim, a estrutura de covariância dos dados mudou, sugerindo a ocorrência de um novo fenômeno não capturado pelo modelo estabelecido [183].

Vale ressaltar que mesmo que uma amostra apareça como possível outlier nestes gráficos tanto de Hotelling's T2 e DModx, esses desvios podem estar relacionados, como por exemplo, à contaminação no preparo da amostra ou até mesmo contaminação da própria amostra. Uma vez que, as amostras foram processadas com

casca, essas poderiam estar contaminadas com fungos entre a casca e a semente e passarem por sementes sadias na etapa de seleção de sementes, essa possível contaminação, por sua vez, pode ter alterado o perfil cromatográfico dessas amostras.

3.3 - Análise de OPLS-DA e Discriminação de Origem

Foram realizadas análises com UHPLC-Qtof/MS, e nos dados dessa análise empregou-se a ferramenta quimiométrica OPLS-DA para comparar os grupos de amostras de acordo com a origem. A análise de OPLS-DA é um bom método supervisionado para estudo de íons que contribuem para classificação entre amostras experimentais [185]. No modelo OPLS-DA a classificação entre dois grupos é visualizada nas formas de gráfico de scores e gráfico de dispersão (S-plot).

O gráfico de scores resume observações em termos de tendências e padrões no conjunto de dados e separando do ruído [186] e o S-plot utiliza as informações de carga/massa e tempo de retenção (T_R - m/z) para ajudar na visualização da contribuição das variáveis, ele combina os perfis covariância e correlação dos pesos (*loading*) resultante da componente de previsão do modelo OPLS-DA [187-190] onde correlação para a classe ou grupo é calculado para um máximo de 1 [186]. Os íons com alto valor de correlação e covariância são localizados distante da origem e, conseqüentemente, contribuem significativamente para separação das classes [187, 191].

Em dados de OPLS-DA além da separação visual dos perfis das amostras através dos gráficos de dispersão, devemos observar outros parâmetros como o ajuste do modelo gerado. Geralmente, quando se utiliza este tipo de análise supervisionado existe o risco em relação ao ajuste dos dados. Dessa forma, é importante a utilização da validação para verificar a precisão e confiabilidade do modelo [192]. Essa verificação se dá por meio parâmetros como R^2Y e Q^2 , esses por sua vez, podem indicar em OPLS-DA a habilidade de predição de classe em todo o modelo [193].

O Q^2 usado para verificar a capacidade preditiva do modelo, e explica a fração da variação de Y que pode ser predita pelo modelo [124, 187, 189, 193] e avalia a qualidade estatística do modelo, que geralmente expressa como resultado da validação cruzada e fornece uma medida qualitativa da coerência entre os dados previstos e

originais [194189]. Já R2Y é usado para verificar o grau de ajuste do modelo, e trata-se da variação de Y explicada pelo modelo [187, 189, 193 -194].

Teoricamente quando os valores de R2Y e Q² se aproximam de 1 melhor previsão o modelo terá [187]. No entanto, quando o R2Y e Q2 são superiores a 0,5 pode-se acreditar que o modelo tem boa previsão [193].

3.3.1 - Amostras Comerciais da Bahia (BA) x Amostras de UNA (U)

O modelo OPLS-DA foi construído para pesquisar diferenças individuais e os potenciais biomarcadores metabólicos que podem realmente refletir as diferenças entre os grupos BA e U. Quando utilizamos o OPLS-DA com análise discriminante para amostras BA e U, tem-se uma clara separação e classificação, representado pelo gráfico de score na Figura 3.14. As observações representadas são médias ponderadas dos dados originais, portanto, proporcionando um bom resumo dos dados. Além disso, os scores exibem a separação dos grupos com valores de R2Y=0,97 e Q2=0,85. Esse resultado sugere que o modelo explica 97% das variações de Y, com habilidade preditiva de 85%, sendo assim o modelo é válido e confiável [195-196].

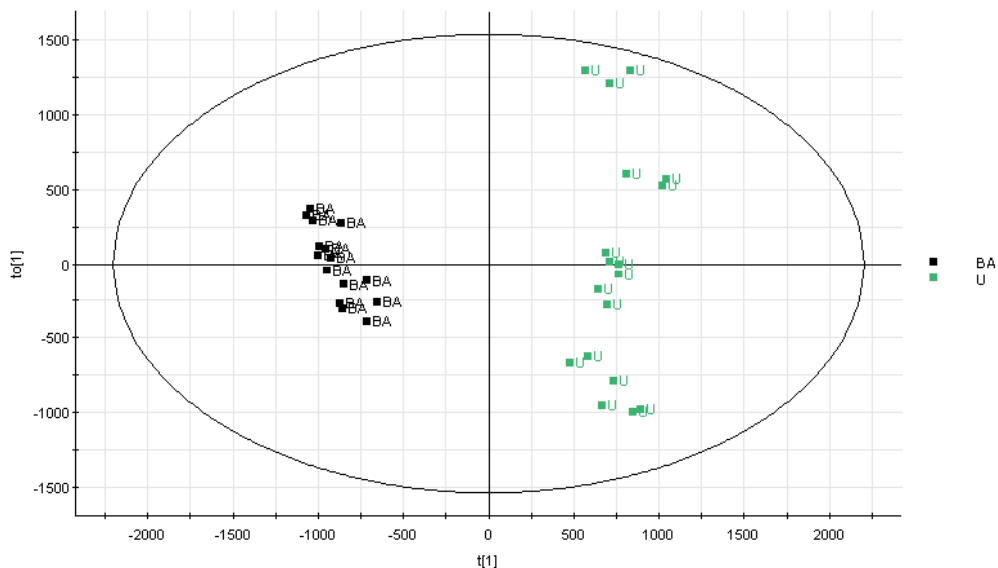


Figura 3.14: OPLS-DA Gráfico de escore dos grupos BA x U baseados em UHPLC-Q / dados TOF MS em modo negativo.

Através do gráfico de dispersão (OPLS-DA) podemos ver a projeção da variância contra a correlação das variáveis, e os metabólitos, neste caso, de maior importância no modelo, representado na Figura 3.15. Os principais íons responsáveis pela separação das amostras estudadas, observada no gráfico de scores (Figura 3.14), foram selecionados (destacados em vermelho) como potenciais biomarcadores. Julgado pela distância a partir da origem, uma série de metabólitos foram escolhidos como biomarcadores. Em nosso estudo, os íons foram tentativamente identificados com base em medições de massa e tempo de retenção através do UHPLC-Q-TOF/MS.

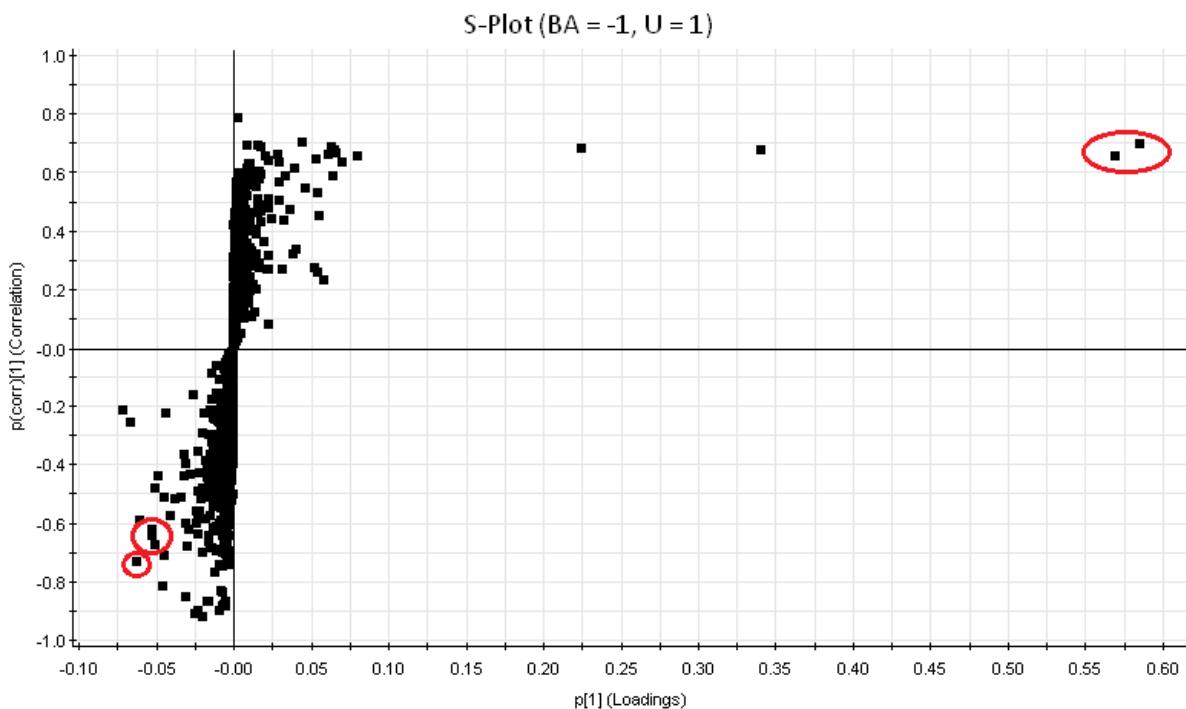


Figura 3.15: Gráfico de dispersão (S-plot): a covariância $p[1]$ x correlação $p[1](corr)(loadings)$ de um modelo de duas classes OPLS-DA (U vs. BA) são mostrados aqui em formato de S-plot. Os pontos são exatos pares Massa / Tempo de Retenção (t_R - m/z). O quadrante superior direito do S-plot mostra os componentes que são elevados em U, o grupo de controle, enquanto o quadrante inferior esquerdo mostra t_R - m/z elevados na BA.

Os tempos de retenção e massas dos possíveis biomarcadores estão contidos na Tabela 3.2. A partir do gráfico de S-plot foram destacados 6 íons como possíveis biomarcadores, esses por sua vez, foram os principais responsáveis pela classificação e separação entre as amostras de BA e U.

Tabela 3.2: Tempo de retenção/Massa de compostos como potencial biomarcadores para amostras de BAxU.

Nº	Primário ID	Tempo de Retenção	Massa	p[1]	p(corr)[1]	Composto Sugerido
1	4.09_423.0847	4.09	423.0847	-0.0523135	-0.622988	NI*
2	4.90_575.1165	4.90	575.1165	0.569175	0.654822	Proc-Tipo A-Dímero
3	2.81_578.1808	2.81	578.1808	-0.0529077	-0.645091	Proc-Tipo B-Dímero
4	3.54_632.1099	3.54	632.1099	-0.0504398	-0.676335	NI*
5	3.92_711.1920	3.92	711.1920	-0.0620476	-0.731197	NI*
6	3.59_863.1722	3.59	863.1722	0.585132	0.697431	Proc-Tipo A-Trímero

*NI: Não Identificado

Dos seis principais íons biomarcadores responsáveis pela diferenciação dos grupos apenas 3 foram possíveis de ter sua estrutura elucidada: t_R - mz 4.90/575.1165, como **Dímero de Procianidina do Tipo A** ($C_{30}H_{35}O_{12}$); t_R - mz 2.81/578.1808 como **Dímero de Procianidina do Tipo B** ($C_{30}H_{25}O_{12}$); t_R - mz 3.59/863.1722 como **Trímero de Procianidina do Tipo A** ($C_{45}H_{35}O_{18}$).

A Figura 3.16 representa a intensidade relativa dos potenciais biomarcadores na semente de guaraná das amostras de BA e U. É possível notar que os compostos Dímero de Procianidina do tipo A e Trímero de Procianidina do tipo A foram os responsáveis pela diferenciação das amostras de Una e a Procianidina do tipo B dímero foi um dos responsáveis pela diferenciação das amostras comerciais da Bahia.

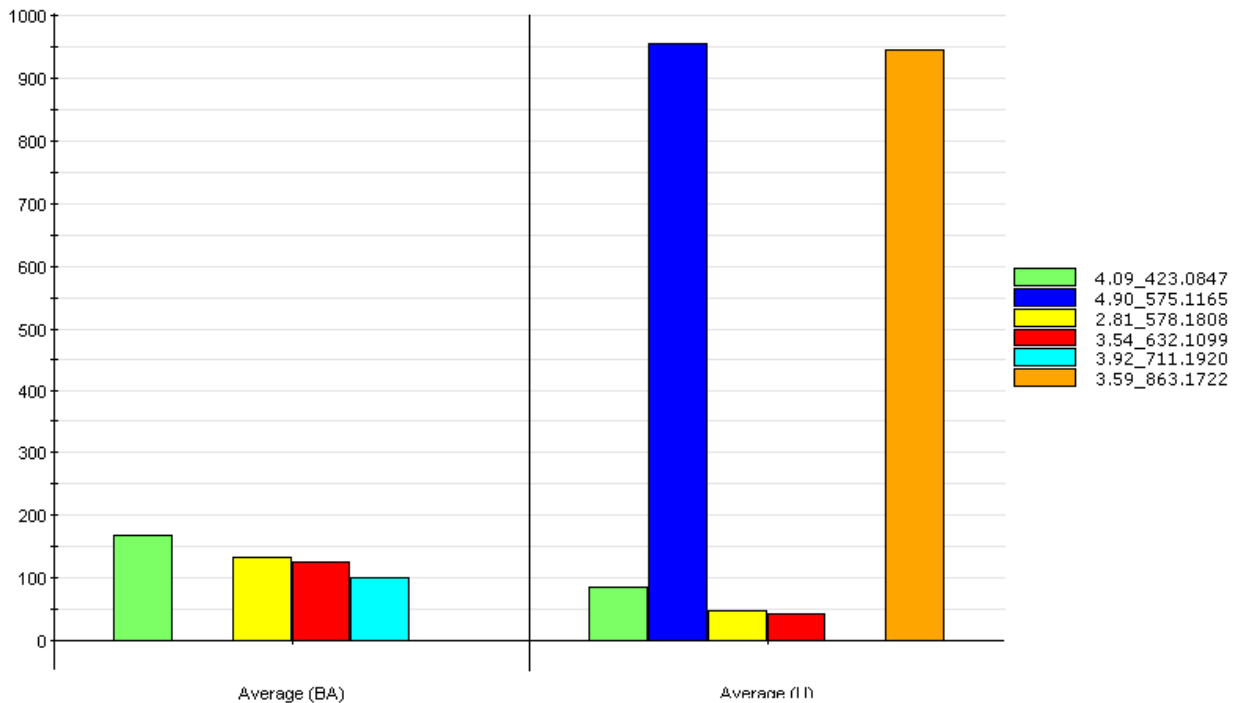


Figura 3.16: Comparação da intensidade relativa dos potenciais biomarcadores entre BA x U.

3.3.2 - Amostras Comerciais da Bahia (BA) x Amostras do Estado do Amazonas (AM)

Ao analisar o gráfico de score gerado pelo OPLS-DA, representado na Figura 3.17, entre as amostras BA e AM, é possível notar a clara separação dos dois grupos de amostras. Os scores de OPLS-DA exibem a separação dos grupos com valores de $R^2Y=0,97$ e $Q^2=0,81$. Esse resultado sugere que o modelo explica 97% das variações de Y, com habilidade preditiva de 81%, sugere-se, assim, que o modelo está bem estabelecido e tem boa previsão [195-196].

Apesar de ambos os grupos as amostras serem de origem comercial, ocorre variação intraclasses maior no grupo do estados do Amazonas quando comparadas as comerciais do estado da Bahia. Essa variação intraclasses pode está relacionando com com a amostragem, pois como se trata de amostras comerciais a o cultivo, origem, e processamentos podem sofrer variações.

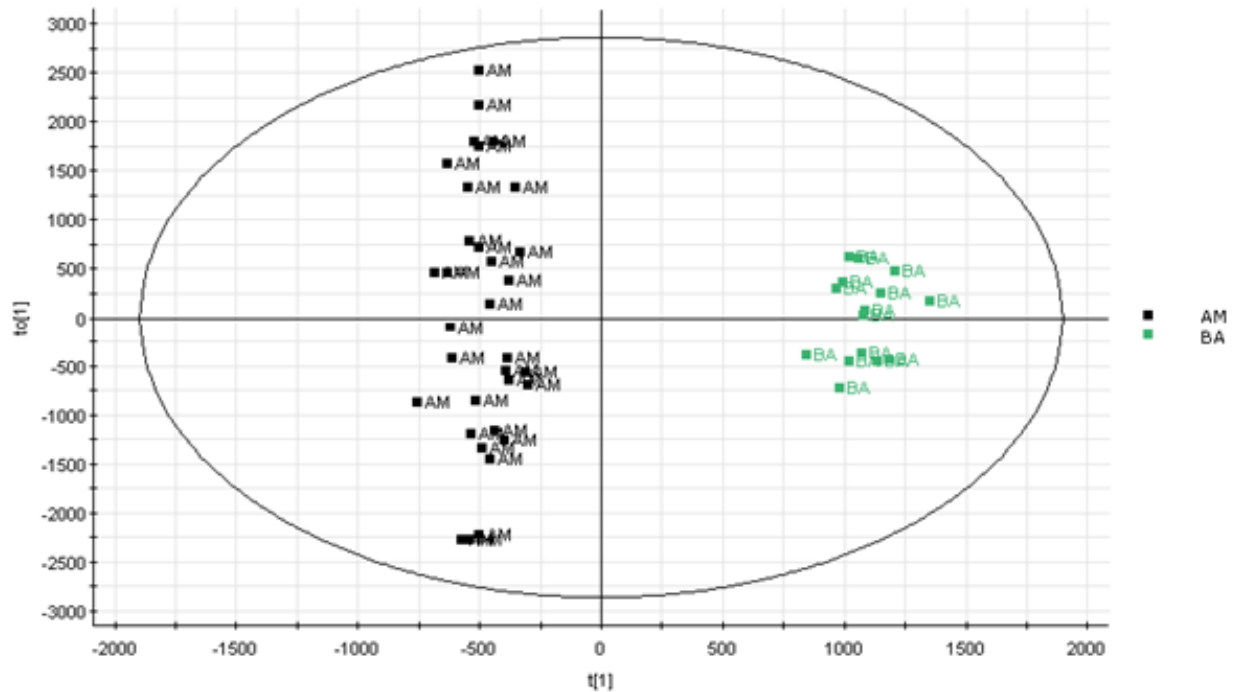


Figura 3.17: OPLS-DA Gráfico de escore dos grupos AM x BA baseados em dados de UHPLC-Q/TOF MS em modo negativo.

Na Figura 3.18 está representado o gráfico de dispersão (S-plot), na parte inferior estão os íons que foram responsáveis pela classificação das amostras de BA e acima ou íons responsáveis pelas amostras de AM. Os íons que contribuíram para a separação observada no gráfico de score (Figura 3.17), foram destacados em vermelho no gráfico S-plot como potenciais biomarcadores, cada ponto represente o par de Massa/Tempo de Retenção (t_R - m/z). Alguns dos mais importantes valores de t_R - m/z foram selecionados e estão contidos na Tabela 3.3.

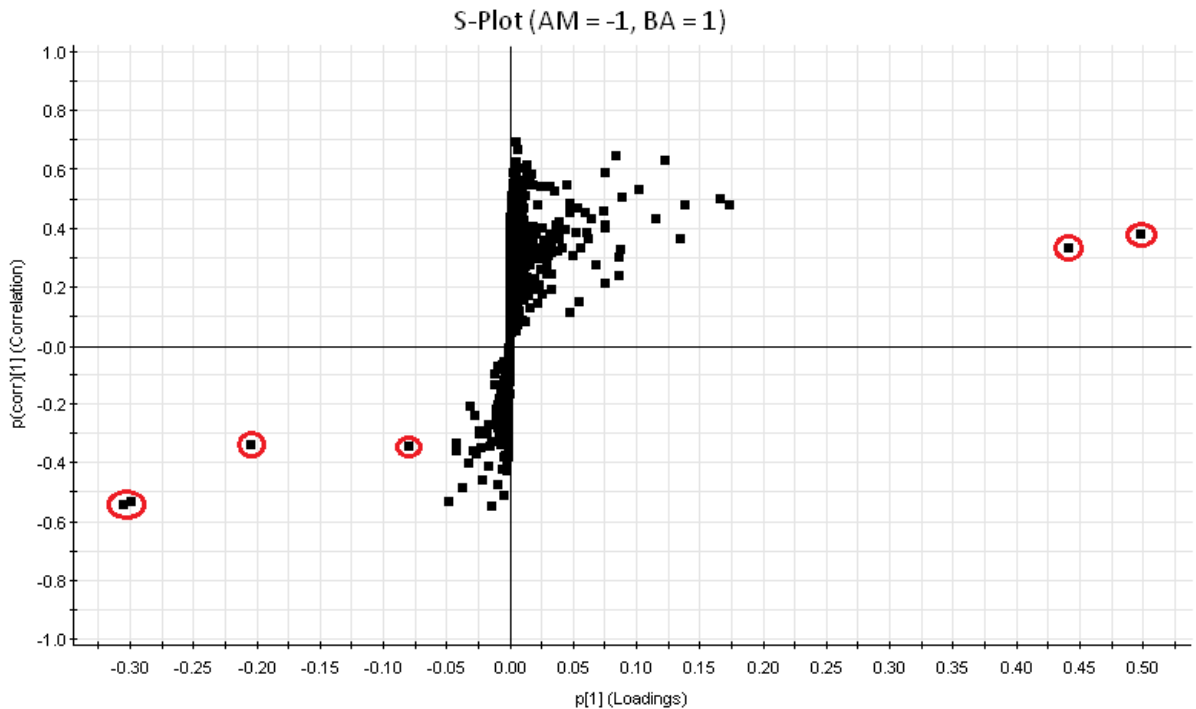


Figura 3.18: Gráfico de dispersão (S-plot): a covariância $p[1]$ x correlação $p[1](corr)(loadings)$ de um modelo de duas classes OPLS-DA (AM vs. BA) são mostrados aqui em formato de S-plot. Os pontos são exatos pares Massa / Tempo de Retenção (t_R - m/z). O quadrante superior direito do S-plot mostra os componentes que são elevados em BA, o grupo de controle, enquanto o quadrante inferior esquerdo mostra t_R - m/z elevados na AM.

Na Tabela 3.3 foi listado os seis biomarcadores mais importantes e seus respectivos valores de t_R - m/z , covariância e correlação. Os valores de t_R - m/z serviram de base para identificação ou tentativa de identificação dos potenciais biomarcadores responsáveis pela classificação e separação das amostras e suas respectivas origens.

Assim, foi possível tentativamente identificar as estruturas dos seis biomarcadores mais importantes: t_R - m/z 3.55_289.0759, como **Epicatequina** ($C_{15}H_{13}O_6$); t_R - m/z 3.08_289.0749, como **Catequina** ($C_{15}H_{13}O_6$); t_R - m/z 4.43_575.1169 como, **Dímero de Procianidina do tipo A** ($C_{30}H_{23}O_{12}$); t_R - m/z 4.90_575.1165, como **Dímero de Procianidina do tipo A** ($C_{30}H_{23}O_{12}$); t_R - m/z 2.81_577.1326, como **Dímero de Procianidina do tipo B** ($C_{30}H_{25}O_{12}$); t_R - m/z 3.59_863.1722, como **Trímero de Procianidina do tipo A** ($C_{45}H_{35}O_{18}$).

Os compostos Dímero de Procianidina do tipo A, Dímero de Procianidina do tipo B e Trímero de Procianidina do tipo A foram os principais biomarcadores responsáveis pela classificação e separação das amostras de origem amazônica. Já a **Epicatequina** e **Catequina** foram os principais biomarcadores responsáveis pela classificação e separação das amostras comerciais originárias da Bahia.

Tabela 3.3: Tempo de retenção/Massa de compostos como potencial biomarcadores para amostras de AM x BA.

Nº	Primário ID	Tempo de Retenção	Massa	p[1]	p(corr)[1]	Composto Sugerido
1	3.55_289.0759	3.55	289.0759	0.498457	0.377754	Epicatequina
2	3.08_289.0749	3.08	289.0749	0.441825	0.330507	Catequina
3	4.43_575.1169	4.43	575.1169	-0.304724	-0.544442	Proc-Tipo A-Dímero
4	4.90_575.1165	4.90	575.1165	-0.298671	-0.533565	Proc-Tipo A-Dímero
5	2.81_577.1326	2.81	577.1326	-0.0789885	-0.346607	Proc-Tipo B-Dímero
6	3.59_863.1722	3.59	863.1722	-0.204655	-0.339172	Proc-Tipo A-Trímero

3.3.3 - Amostras Estado do Amazonas (AM) x Amostras do Baixo Sul da Bahia (BS)

O gráfico de score gerando pelo OPLS-DA entre as amostras BA e AM, representado na Figura 3.19. Nota-se claramente separação dos dois grupos de amostras. Os scores de OPLS-DA exibem a separação dos grupos com valores de $R^2Y=0,97$ e $Q^2=0,81$. Apesar de duas amostras outliers tanto no grupo de amostra de AM e BS, o modelo consegue explicar 94% das variações, com habilidade preditiva de 87%, dessa forma é possível inferir que o modelo está bem estabelecido e tem boa previsão [195-196].

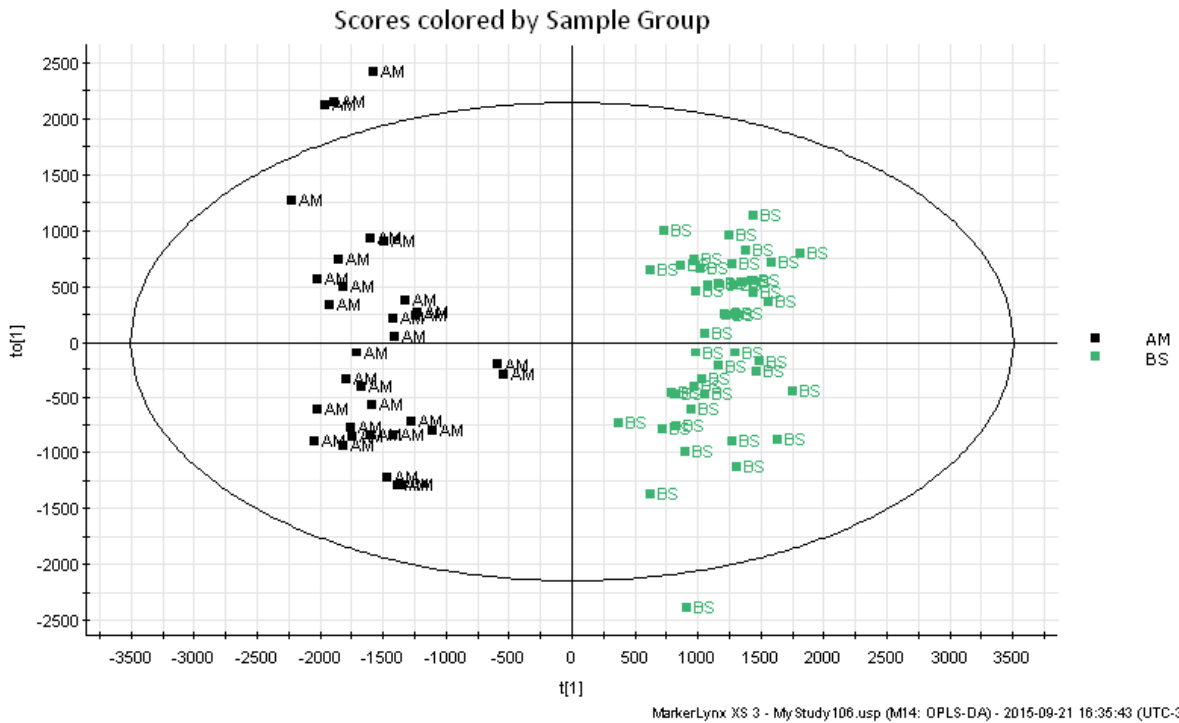


Figura 3.19: OPLS-DA Gráfico de escore dos grupos AM x BS baseados em dados de UHPLC-Q/TOF MS em modo negativo.

Os íons que contribuíram para a separação observada no gráfico de score (Figura 3.19), foram destacados em vermelho no gráfico S-plot como potenciais biomarcadores, representado na Figura 3.20, cada ponto representa o par de Massa/Tempo de Retenção (t_R - m/z). Os valores de t_R - m/z que foram selecionados e destacados no gráfico de dispersão estão contidos na Tabela 3.4.

Foram selecionados nove t_R - m/z para os possíveis biomarcadores responsáveis pela separação e classificação dos grupos de amostras de AM e BS. Os valores de t_R - m/z foram usados como base para identificação ou tentativamente de identificação dos potenciais, no entanto, do total de nove apenas três foram identificados ou tentativamente de identificados. Todos os potenciais biomarcadores mais importantes e seus respectivos valores de t_R - m/z , covariância e correlação estão contidos na Tabela 3.4.

Assim, foi possível elucidar as estruturas de três dos nove biomarcadores mais importantes: t_R - m/z 3.55_289.0759, como **Epicatequina** ($C_{15}H_{13}O_6$); t_R - m/z 3.08_289.0749,

como **Catequina** ($C_{15}H_{13}O_6$; t_R - m/z 3.59_863.1722, como **Trímero de Procianidina do tipo A** ($C_{45}H_{35}O_{18}$).

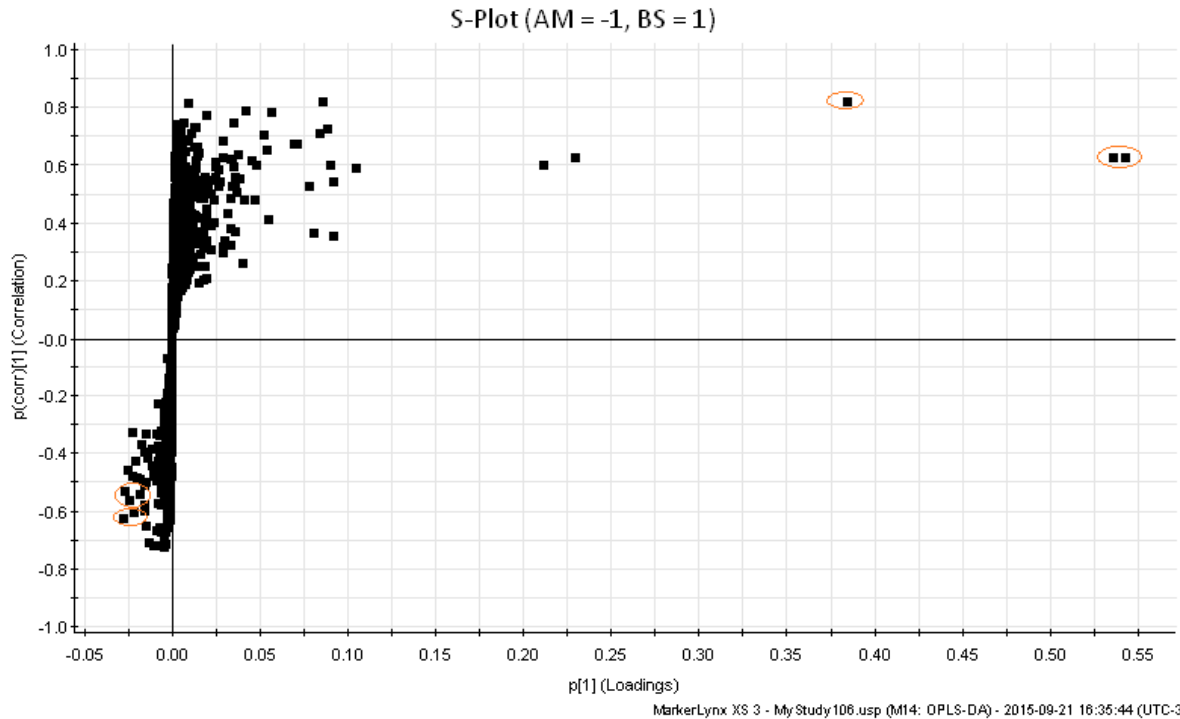


Figura 3.20: Gráfico de dispersão (S-plot): a covariância $p[1]$ x correlação $p[1](corr)(loadings)$ de um modelo de duas classes OPLS-DA (U vs. BA) são mostrados aqui em formato de S-plot. Os pontos são exatos pares Massa / Tempo de Retenção (t_R - m/z). O quadrante superior direito do S-plot mostra os componentes que são elevados em U, o grupo de controle, enquanto o quadrante inferior esquerdo mostra t_R - m/z elevados na BA.

Tabela 3.4: Tempo de retenção/Massa de compostos como potencial biomarcadores para amostras de AM x BS.

Nº	Primário ID	Tempo de Retenção	Massa	$p[1]$	$p(corr)[1]$	Composto Sugerido
1	2.64_179.0641	2.64	179.0641	-0.0185092	-0.494644	NI*
2	3.55_289.0759	3.55	289.0759	0.536445	0.622665	Epicatequina
3	3.08_289.0749	3.08	289.0749	0.543303	0.622152	Catequina
4	4.21_577.1771	4.21	577.1771	-0.0240567	-0.563495	NI*
5	2.81_578.1808	2.81	578.1808	-0.0276539	-0.629653	NI*
6	3.54_580.2049	3.54	580.2049	-0.0265334	-0.532659	NI*
7	3.09_580.2047	3.09	580.2047	-0.0198877	-0.486254	NI*
8	3.78_848.2594	3.78	848.2594	-0.0215517	-0.605577	NI*
9	3.59_863.1722	3.59	863.1722	0.385217	0.814558	Proc-Tipo A-Trímero

*NI: Não Identificado

A Epicatequina, Catequina, Trímero de Procianidina do tipo A foram os mais relevantes compostos responsáveis pela classificação das amostras, em especial as amostras oriundas do Baixo sul da Bahia. Essa observação fica clara quando se analisa a intensidade relativa dos potenciais marcadores na semente de guaraná das amostras de AM x BS, representadas na Figura 3.21. Nota-se, então, que Epicatequina (t_R -mz 3.55_289.0759), Catequina (t_R -mz 3.08_289.0749), Trímero de Procianidina do tipo A (t_R -mz 3.59_863.1722) apresentaram intensidades relativas para amostras do Baixo Sul da Bahia muito maior do que quando comparada com as intensidades apresentadas por esses mesmo compostos para amostras do estado do Amazonas. Sugere-se então que as amostras do Baixo Sul da Bahia apresentam em sua composição maior contribuição dos compostos em questão.

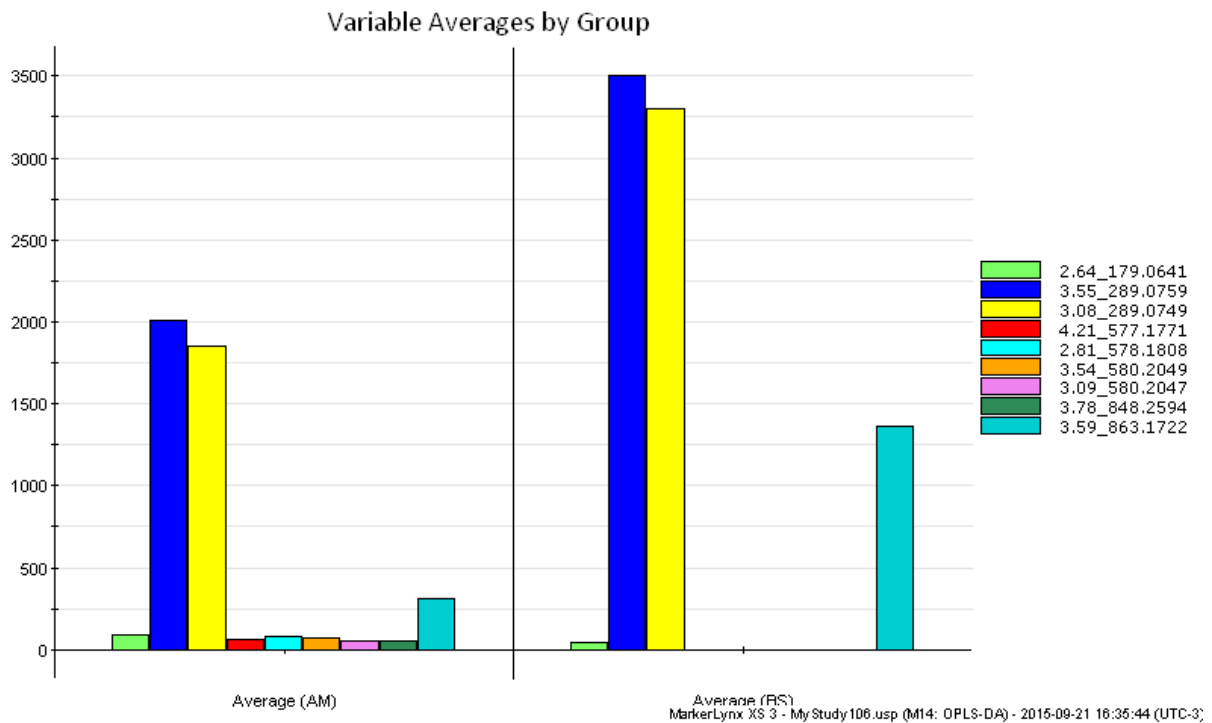


Figura 3.21: Comparação da intensidade relativa dos potenciais marcadores entre AM x BS.

3.3.4 - Amostras do Baixo Sul da Bahia (BS) x Amostras de Una (U)

O resultado do estudo de OPLS-DA para as amostras de BS x U, representado na Figura 3.22, mostrou-se satisfatório separadas, de acordo com os scores de OPLS-DA que exibiram a separação dos grupos com valores de $R^2Y=0,89$ e $Q^2=0,68$. Com isso, o resultado sugere que o modelo explica 89% das variações de Y, com habilidade preditiva de 68%. Mesmo com valores de R^2Y e Q^2 abaixo dos apresentados até então, o modelo está bem estabelecido e tem boa previsão [195-196].

Esses baixos valores de parâmetro de qualidade do modelo (R^2Y e Q^2), pode estar relacionado com o fato de que as amostras terem origens geográfica próximas, ou seja, todas da região Sul da Bahia e por estarem próxima podem apresentar perfis químicos “semelhantes”. Essa região é dividida em “sub-regiões” conhecidas como Baixo Sul (Costa do Dendê), Sul (Costa do Cacau) e Extremo Sul (Costa do Descobrimento), sendo que Una se encontra na região Sul, a chamada Costa do cacau.

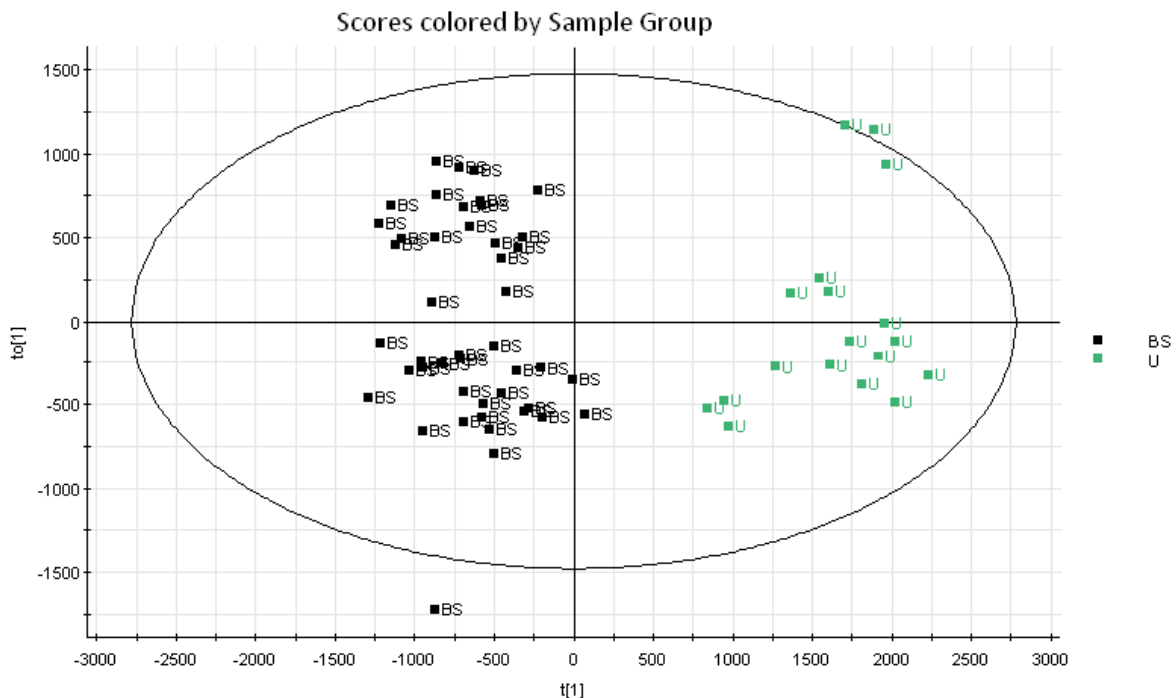


Figura 3.22: OPLS-DA Gráfico de escore dos grupos BS (preto) x U (verde) baseados em dados de UHPLC-Q/TOF MS em modo negativo.

Na Figura 3.23, está representado o gráfico de dispersão (S-plot) mostra a covariância (p) versus correlação ($p(\text{corr})$), a partir do mesmo podemos entender e identificar os íons com potencial biomarcadores responsável pela classificação e separação entre as amostras de BS e U. Foram selecionado nove íons, com respectivos par de t_R - m/z , como possíveis principais responsáveis pela separação e classificação das amostras de acordo com a origem e perfil metabólico, esses estão destacados em vermelho no gráfico S-plot. A partir do par de t_R - m/z foi possível identificar ou tentativamente identificar suas respectivas estruturas, no entanto, dos nove apenas três foram identificados.

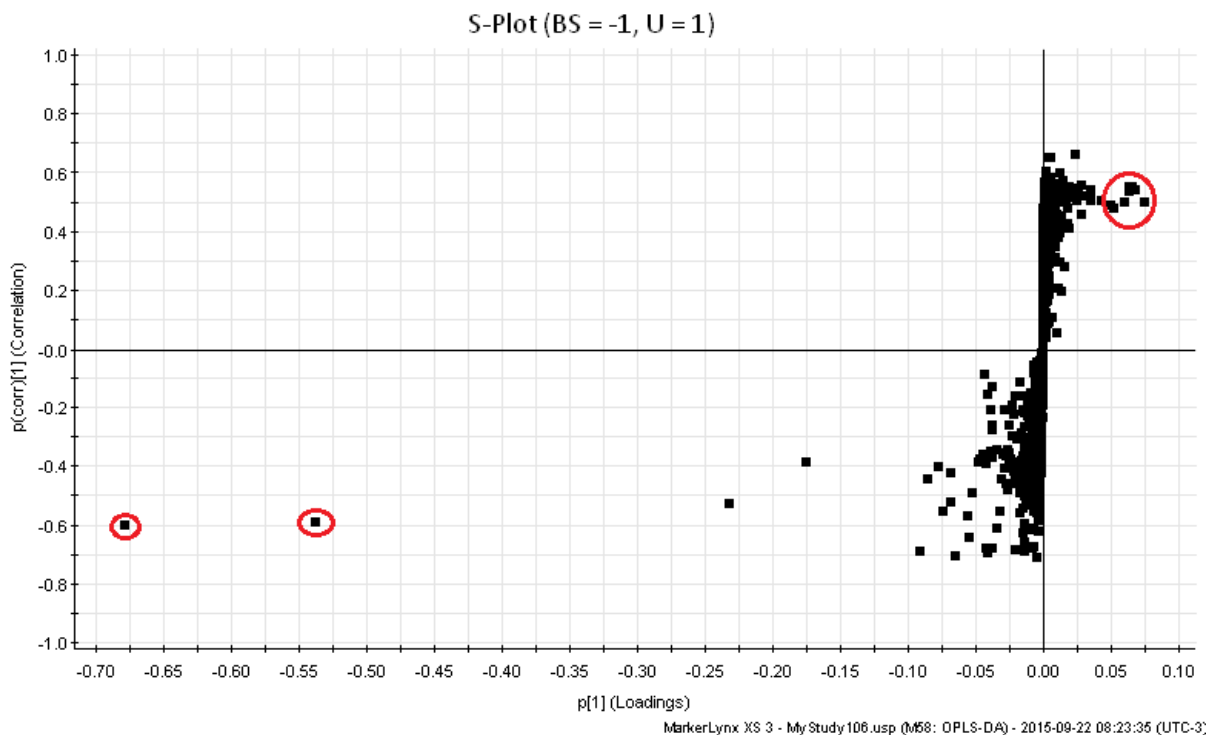


Figura 3.23: Gráfico de dispersão (S-plot): a covariância $p[1]$ x correlação $p[1](\text{corr})(\text{loadings})$ de um modelo de duas classes OPLS-DA (BS vs. U) são mostrados aqui em formato de S-plot. Os pontos são exatos pares Massa / Tempo de Retenção (t_R - m/z). O quadrante superior direito do S-plot mostra os componentes que são elevados em U, o grupo de controle, enquanto o quadrante inferior esquerdo mostra t_R - m/z elevados em BS.

Os dados de t_R - mz , valores de covariância e correlação dos íons selecionados, estão representados na Tabela 3.5. Foi possível elucidar as estruturas de três dos nove biomarcadores mais importantes: t_R - mz 3.55_289.0759, como **Epicatequina** ($C_{15}H_{13}O_6$); t_R - mz 3.08_289.0749, como **Catequina** ($C_{15}H_{13}O_6$); t_R - mz 2.81_577.1753, como **Dímero de Procianidina do tipo B** ($C_{30}H_{25}O_{12}$).

Tabela 3.5: Tempo de retenção/Massa de compostos como potencial biomarcadores para amostras de BS x U.

	Primário ID	Tempo de Retenção	Massa	p[1]	p(corr)[1]	Composto Sugerido
1	3.02_215.0773	3.02	215.0773	0.0610274	0.497422	NI*
2	3.02_233.0883	3.02	233.0883	0.0525282	0.476802	NI*
3	3.55_289.0759	3.55	289.0759	-0.537594	-0.592907	Epicatequina
4	3.08_289.0749	3.08	289.0749	-0.678666	-0.604123	Catequina
5	5.40_575.1623	5.40	575.1623	0.0752944	0.500245	NI*
6	4.04_575.1598	4.04	575.1598	0.0668298	0.551683	NI*
7	4.90_576.1658	4.90	576.1658	0.0644324	0.535459	NI*
8	2.81_577.1753	2.81	577.1753	0.0644245	0.55205	Proc-Tipo B-Dímero
9	3.58_864.2464	3.58	864.2464	0.0691541	0.541763	NI*

Os dados apresentados na Figura 3.24 trata-se Comparação da intensidade relativa dos potenciais marcadores entre BS x U. Ao analisar essa figura constata-se, que Epicatequina (t_R - mz 3.55_289.0759), Catequina (t_R - mz 3.08_289.0749) apresentam intensidade relativa muito maior em amostras do Baixo Sul, quando comparada com a intensidade observada em amostras de Una, pode-se inferir-se, então que as amostras do Baixo Sul, como supracitado nos experimento entre BSxAM, tem em sua composição maior contribuição desses compostos quando comparadas com amostras oriunda de Una. Enquanto as amostras de Una possuem contribuição maior do Dímero de Procianidina do tipo B ($C_{30}H_{25}O_{12}$) em sua composição.

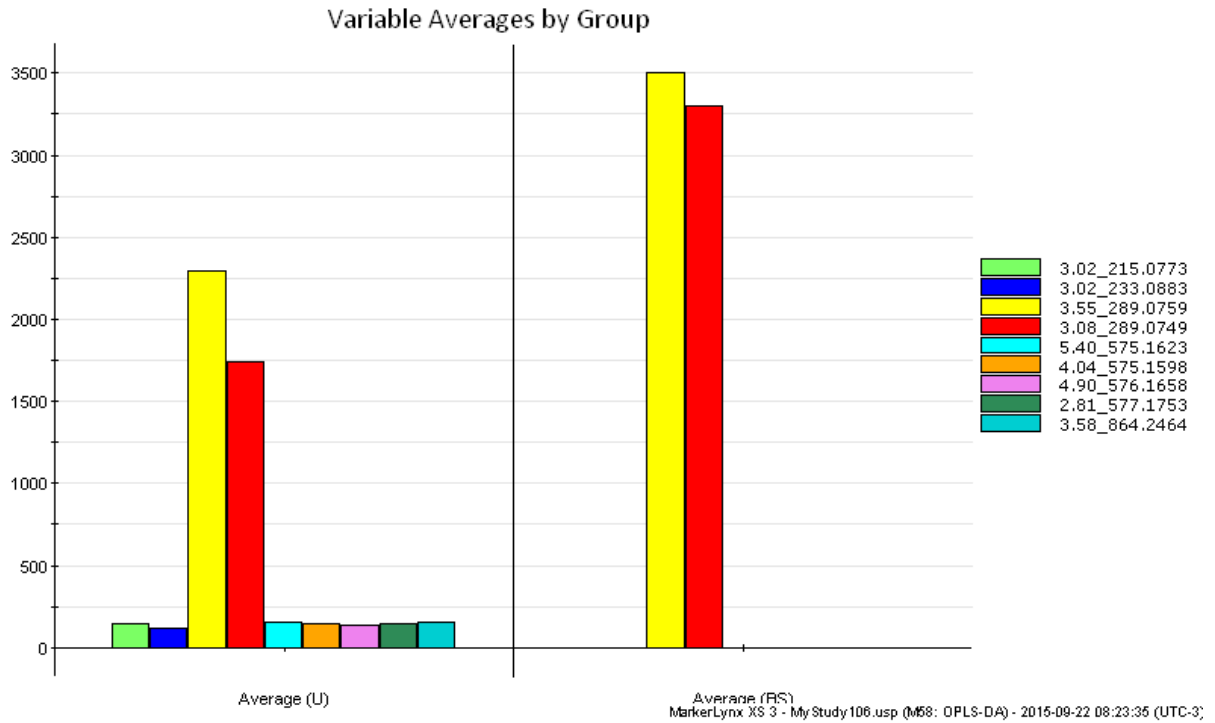


Figura 3. 24: Comparação da intensidade relativa dos potenciais marcadores entre BS x U.

3.3.5 - Amostras Comerciais da Bahia (BA) x Amostras do Baixo Sul da Bahia (BS)

O OPLS-DA foi usado para entender a separação intercalasse e identificar potencial biomarcador nas amostras de guaraná comerciais da Bahia e amostras do Baixo Sul da Bahia. Nota-se claramente separação dos dois grupos de amostras. Os scores de OPLS-DA, representado na Figura 3.25, exibem a separação dos grupos com valores de $R^2Y=0,97$ e $Q^2=0,81$, os modelos com R^2Y e Q^2 próximos de 1 indica excelência do modelo [187]. Assim, o modelo consegue explicar 98% das variações, com habilidade preditiva de 97%, dessa forma é possível inferir que o modelo está bem estabelecido e tem boa previsão [195-196].

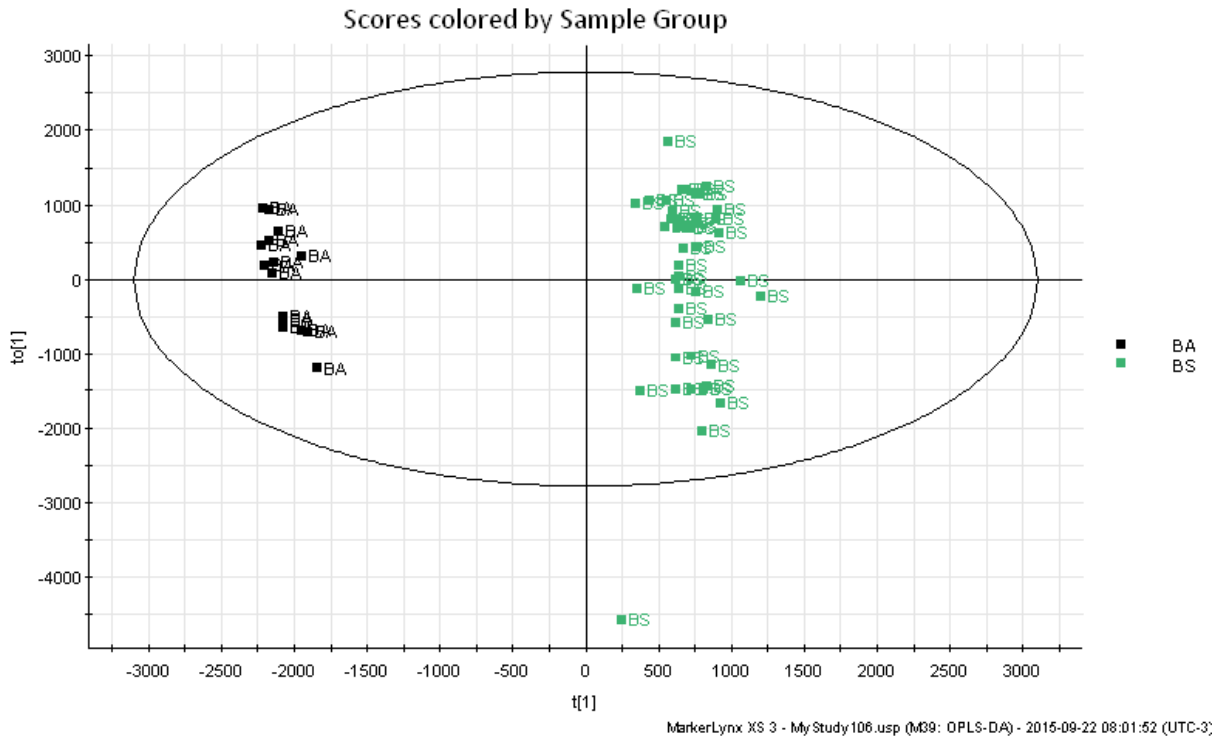


Figura 3.25: OPLS-DA Gráfico de escore dos grupos BA (preto) x BS (verde) baseados em dados de UHPLC-Q/TOF MS em modo negativo.

Está representado na Figura 3.26 o gráfico de dispersão (S-plot), que mostra a covariância (p) versus correlação ($p(\text{corr})$), a partir do mesmo é possível visualizar a significativa contribuição dos íons como biomarcadores responsáveis pela discriminação entre as classes estudadas (BA x BS).. Foram selecionados dez pares de t_R - m/z como possíveis principais responsáveis pela separação e classificação das amostras de acordo com a origem e perfil metabólico, esses estão destacados em vermelho no gráfico S-plot.

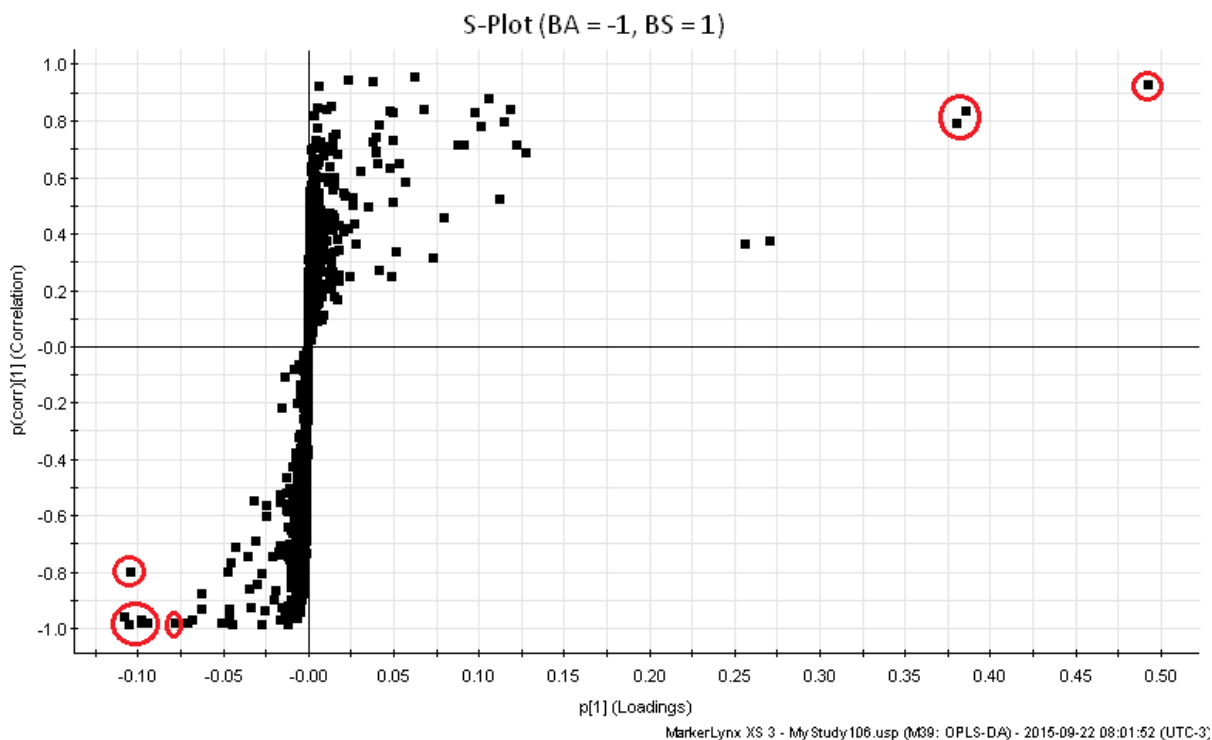


Figura 3.26: Gráfico de dispersão (S-plot): a covariância $p[1]$ x correlação $p[1](corr)(loadings)$ de um modelo de duas classes OPLS-DA (Ba vs. BS) são mostrados aqui em formato de S-plot. Os pontos são exatos pares Massa / Tempo de Retenção (t_R - m/z). O quadrante superior direito do S-plot mostra os componentes que são elevados em BS, o grupo de controle, enquanto o quadrante inferior esquerdo mostra t_R - m/z elevados em BA.

Por meio do par de t_R - m/z foi possível identificar ou tentativamente identificar suas respectivas estruturas, porém dos dez apenas três foram identificados. Todos os íons selecionados e seus respectivos valores de t_R - m/z , covariância e correlação estão representado na Tabela 3.6.

Assim, foi possível elucidar as estruturas do três biomarcadores mais importantes: t_R - mz 4.43_575.1169 como, **Dímero de Procianidina do tipo A** ($C_{30}H_{23}O_{12}$); t_R - mz 4.90_575.1165, como **Dímero de Procianidina do tipo A** ($C_{30}H_{23}O_{12}$); t_R - mz 3.59_863.1722, como **Trímero de Procianidina do tipo A** ($C_{45}H_{35}O_{18}$).

Tabela 3.6: Tempo de retenção/Massa de compostos como potencial biomarcadores para amostras de BA x BS.

	Primário ID	Tempo de Retenção	Massa	p[1]	p(corr)[1]	Composto Sugerido
1	4.43_575.1169	4.43	575.1169	0.380896	0.788045	Proc-Tipo A-Dímero
2	4.90_575.1165	4.90	575.1165	0.386395	0.834317	Proc-Tipo A-Dímero
3	5.40_575.1623	5.40	575.1623	-0.0974825	-0.969352	NI*
4	4.90_576.1658	4.90	576.1658	-0.0972204	-0.980618	NI*
5	4.43_576.1651	4.43	576.1651	-0.107438	-0.958613	NI*
6	3.26_578.1809	3.26	578.1809	-0.0773024	-0.980642	NI*
7	3.79_847.2479	3.79	847.2479	-0.0936608	-0.982162	NI*
8	3.59_863.1722	3.59	863.1722	0.492767	0.923141	Proc-Tipo A-Trímero
9	3.93_863.2460	3.93	863.2460	-0.103595	-0.803412	NI*
10	3.60_865.2609	3.60	865.2609	-0.104547	-0.984652	NI*

*NI: Não Identificado

Na Figura 3.27 estão representados a comparação da intensidade relativa dos potenciais marcadores entre BA x BS. Ao analisar a figura constata-se que o **Dímero de Procianidina do tipo A** ($C_{30}H_{23}O_{12}$), **Dímero de Procianidina do tipo A** ($C_{30}H_{23}O_{12}$), **Trímero de Procianidina do tipo A** ($C_{45}H_{35}O_{18}$) foram os íons que mais contribuíram para classificação das amostras do Baixo Sul da Bahia, pode-se inferir, então, que esses compostos contribuem mais na composição de amostras de originárias de BS quando comparadas com amostras de BA. Enquanto que as amostras comerciais da Bahia tiveram os demais íons (que não foram identificados) como principal responsáveis pela classificação.

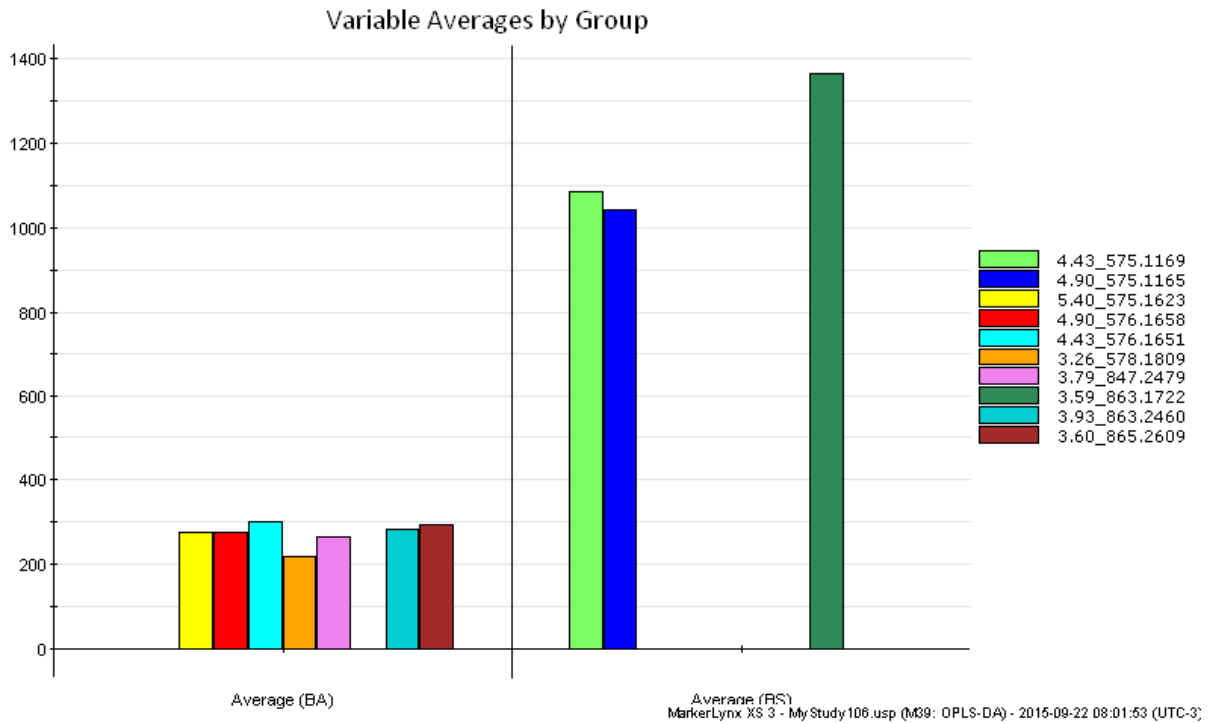


Figura 3.27: Comparação da intensidade relativa dos potenciais marcadores entre BA x BS.

3.3.6 - Amostras do Estado do Amazonas (AM) x Amostras de Una (U)

O resultado do estudo de OPLS-DA, apresentado na Figura 3.28, para as amostras de AM x U, mostrou-se satisfatoriamente separadas, no entanto, não como esperado por se tratar de amostras de regiões geograficamente distintas. De acordo com os scores de OPLS-DA que exibiram a separação dos grupos com valores de $R^2Y=0,83$ e $Q^2=0,66$. Dessa forma, esses dois parâmetros sugerem que o modelo explica 83 % das variações de Y, com habilidade preditiva de 66 %. Mesmo com valores de R^2Y e Q^2 abaixo dos apresentados até então, modelo com valores de R^2Y e Q^2 acima de 0,5 está bem estabelecido e tem boa previsão [195-196].

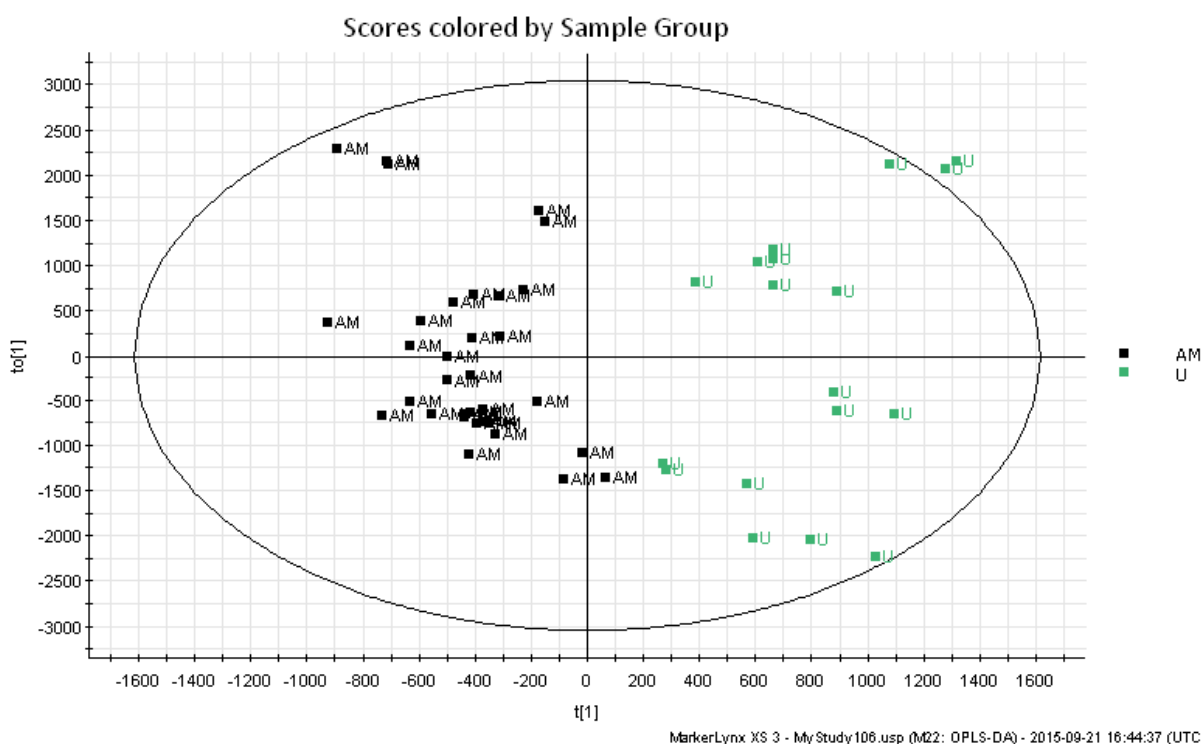


Figura 3.28: OPLS-DA Gráfico de escore dos grupos AM (preto) x U (verde) baseados em dados de UHPLC-Q/TOF MS em modo negativo.

O gráfico de dispersão (S-plot) para (AM x U), representado na Figura 3.29, mostra a covariância (p) versus correlação ($p(\text{corr})$), a partir do foram selecionado quatorze pares de t_R - m/z como possíveis principais responsáveis pela separação e classificação das amostras estudadas, de acordo com a origem e perfil metabólico, esses estão destacados em vermelho no gráfico S-plot.

Através do par de t_R - m/z foi possível identificar ou tentativamente identificar suas respectivas estruturas, porém dos quatorze selecionados como os principais responsáveis pela discriminação apenas cinco foram identificados. Todos os íons selecionados e seus respectivos valores de t_R - m/z , covariância e correlação estão representado na Tabela 3.7.

Os compostos identificados como potencial biomarcadores, representados na Tabela 3.7, foram: t_R - m/z 4.43_575.1169 como, **Dímero de Procianidina do tipo A** ($C_{30}H_{23}O_{12}$); t_R - m/z 4.90_575.1165, como **Dímero de Procianidina do tipo A** ($C_{30}H_{23}O_{12}$); t_R - m/z 2.81_577.1326, como **Dímero de Procianidina do tipo B** ($C_{30}H_{25}O_{12}$); foram os principais responsáveis pela discriminação das amostras de Una, enquanto, o t_R - m/z 3.59_863.1722, identificado como **Trímero de Procianidina do tipo A** ($C_{45}H_{35}O_{18}$) contribui também para discriminação das amostras do AM.

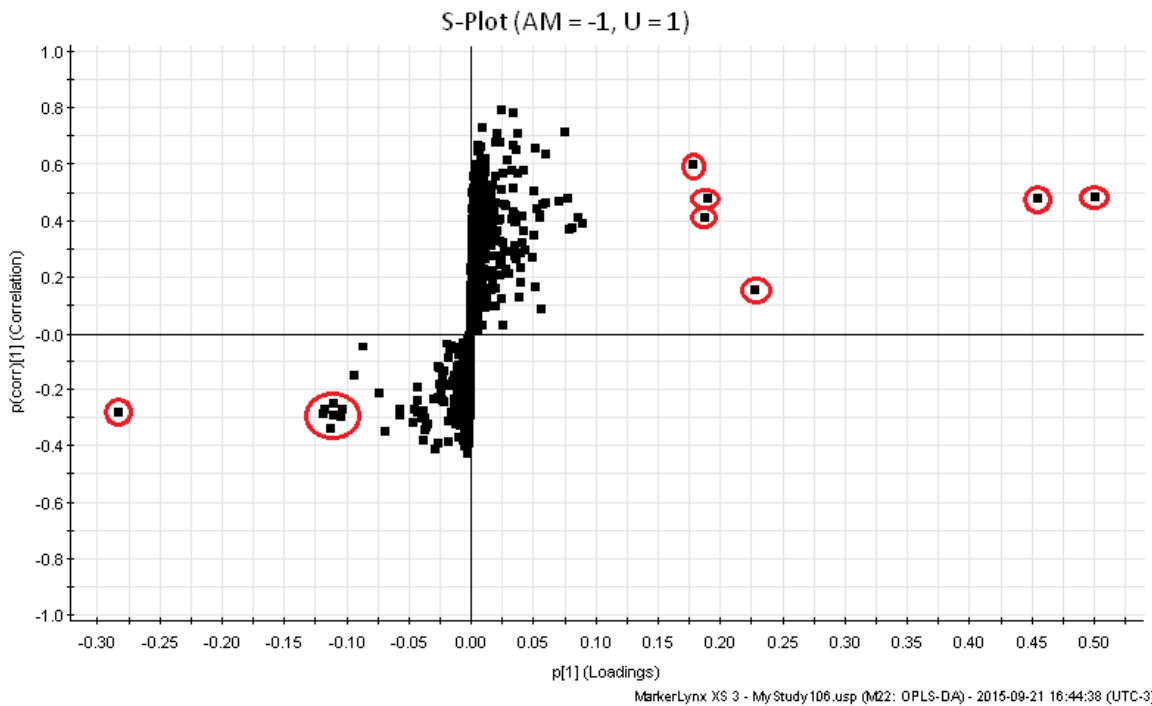


Figura 3.29: Gráfico de dispersão (S-plot): a covariância $p[1]$ x correlação $p[1](corr)(loadings)$ de um modelo de duas classes OPLS-DA (AM vs. U) são mostrados aqui em formato de S-plot. Os pontos são exatos pares Massa / Tempo de Retenção (t_R - m/z). O quadrante superior direito do S-plot mostra os componentes que são elevados em AM, o grupo de controle, enquanto o quadrante inferior esquerdo mostra t_R - m/z elevados em U.

Tabela 3.7: Tempo de retenção/Massa de compostos como potencial biomarcadores para amostras de AM x U.

	Primário ID	Tempo de Retenção	Massa	p[1]	p(corr)[1]	Composto Sugerido
1	3.55_289.0759	3.55	289.0759	0.228001	0.153069	Proc-Tipo A-Dímero
2	3.05_321.0685	3.05	321.0685	0.187258	0.411136	NI*
3	4.90_575.1165	4.90	575.1165	0.455453	0.477109	Proc-Tipo A-Dímero
4	4.90_576.1227	4.90	576.1227	0.178488	0.595752	NI*
5	2.81_577.1326	2.81	577.1326	0.190768	0.476481	Proc-Tipo B-Dímero
6	3.59_863.1722	3.59	863.1722	0.501005	0.481611	Proc-Tipo A-Trímero
7	4.04_575.1598	4.04	575.1598	-0.10993	-0.251465	NI*
8	3.53_579.2028	3.53	579.2028	-0.118275	-0.29168	NI*
9	3.09_579.2024	3.09	579.2024	-0.112315	-0.341899	NI*
10	3.59_711.1856	3.59	711.1856	-0.103947	-0.298783	NI*
11	3.59_863.2375	3.59	863.2375	-0.282625	-0.281998	Proc-Tipo A-Trímero
12	3.95_863.1806	3.95	863.1806	-0.110272	-0.295162	NI*
13	3.58_864.2464	3.58	864.2464	-0.117041	-0.273417	NI*
14	3.93_863.2460	3.93	863.2460	-0.102925	-0.274524	NI*

*NI: Não Identificado

CAPITULO IV

CONSIDERAÇÕES FINAIS

CAPITULO IV: CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ressonância magnética nuclear (RMN de ^1H e bidimensionais) mostrou-se uma técnica bastante promissora para o monitoramento da composição química em amostras de sementes do guaraná, pois permitiu a identificação simultânea de vários compostos de maneira rápida e em uma amostra complexa. Assim, Os experimentos de RMN 1D e 2D, bem como dados reportados na literatura, permitiram a identificação dos constituintes majoritários nas amostras de guaraná, tais como como cafeína, catequina, epicatequina além de ácidos orgânicos e carboidratos sem a necessidade de isolamento prévio dos compostos e tão pouco a utilização de padrões.

A identificação da composição do guaraná empregando ressonância magnética nuclear aliada a análise de componentes principais, possibilitou observar variações na composição química das amostras de guaraná de diferentes origens. Ademais, com a aplicação da PCA foi possível determinar os sinais responsáveis pela discriminação de origem das amostras em que foi possível observar um grupo com maiores concentrações de cafeína e polifénóis e outro, com maiores concentrações de ácidos graxos.

Embora as amostras comerciais não mostrarem discriminação definida, foi possível sugerir uma tendência de diferenciação entre as amostras do Amazonas e Baixo Sul da Bahia, sendo a cafeína (deslocamento químico em δ 7,90; 4,0; 3,39 e 3,55) e catequina e epicatequinas os principais responsáveis por essa separação com maiores concentrações nas amostras da Bahia. Já as amostras do Amazonas apresentaram maiores concentrações dos ácidos graxo que, desta forma, contribuíram para a tendência de discriminação dos grupos amostrais.

A análise quantitativa por RMN possibilitou a obtenção de uma estimativa do teor de cafeína no guaraná corroborando a tendência observada na PCA, em que as amostras do Baixo Sul e Una apresentaram maiores concentrações de cafeína e polifenóis em sua composição. Contudo, ainda se faz necessário uma maior amostragem, principalmente das amostras oriundas do estado do Amazonas, para que a distinção observada na PCA seja confirmada. Ademais, a utilização de métodos de quantificação de cafeína distintos (como a espectroscopia de ultravioleta) bem como a

adoção de outros métodos espectroscópicos aliados a quimiometria, também são imperativos para que a qualidade da informação a ser divulgada seja assegurada.

As análises de cromatográfica líquida e espectrometria de massas com um analisador do tipo “tempo de voo” (TOF) aliada a ferramentas quimiométrica de PCA mo pôde-se observar correlação entre os dados químicos e a origem de algumas amostras, como por exemplo as originárias do Baixo Sul da Bahia que tiveram como os principais responsáveis por discriminação Catequina, Epicatequina, Dímero de Procianidina do tipo B, Trímero de Procianidina do tipo A, Dímero de Procianidina do tipo A e Dímero de Procianidina do tipo A. Enquanto as amostras comerciais da Bahia tiveram compostos Dímero de Procianidina do tipo A, Dímero de Procianidina do tipo e Trímero de Procianidina do tipo B como os principais responsáveis pela discriminação das amostras comerciais da Bahia

Diversos modelos de predição com base em OPLS-DA foram apresentados nesta Dissertação, revelou o grande potencial desta técnica em predizer distinção entre grupo de amostras. Deste modo, foi gerada uma lista quatorze picos de íons, detectados pelo UHPLC-QToF/MS, como sendo discriminantes das amostras de guaraná e suas respectivas origem. As informações geradas a partir dos espectros de massas e de padrões de referência permitiram a identificação de quatorze compostos, caracterizados como catequina, epicatequina, um dissacarídeo, além de oligômeros denominados de procianidinas.

As análises de OPLS-DA mostraram que os compostos Catequina e Epicatequina se mostra presentes na discriminação das amostras do Baixo Sul da Bahia e Comercial da Bahia, quando comparada as de outra origem, portanto, essas amostras de guaraná têm contribuição maior desses compostos em sua composição. Já as amostras de originária de Una e do estado do Amazonas apresentam os compostos Dímero de Procianidina do tipo A e B, Trímero de Procianidina do tipo A como os principais responsáveis por sua discriminação.

REFERÊNCIAS

-
- [1] FACHINELLO, J. C.; PASA, M. S.; SCHMTIZ, J. D.; BETEMPS, D. L. Situação e perspectivas da fruticultura de clima temperado no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, p. 109-120, 2011.
- [2] PAGLIARUSSI, R. S.; FREITAS, L. A. P.; BASTOS, J. K. A quantitative method for the analysis of xanthine alkaloids in *Paullinia cupana* (guarana) by capillary column gas chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 25, p. 371-374, 2002.
- [3] EDWARDS, H. G. M.; FARWELL, D. W.; OLIVEIRA, L. F. C.; ALIA, J. M.; HYARIC, M. L.; AMEIDA, M. V. FT-Raman spectroscopic studies of guarana and some extracts. **Analytica Chimica Acta**, v. 532, p. 177–186, 2005
- [4] CLAUDIO, A. F. M.; Ferreira, A. M.; Freire, M. G.; Coutinho, J. A. P. Enhanced extraction of caffeine from guaraná seeds using aqueous solutions of ionic liquids. **Green Chemistry**, v. 15, p. 2002–2010, 2013.
- [5] INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, **Levantamento Sistemático da produção Agrícola**: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil, Rio de Janeiro v. 23, n. 09, p. 1-80, 2010.
- [6] INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, **Levantamento Sistemático da produção Agrícola**: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil, Rio de Janeiro v. 29, n. 01, p. 1-78, 2016
- [7] BRASIL - Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Superintendência da Zona Franca de Manaus (SUFRAMA). Projeto Potencialidades regionais Estudo de Viabilidade Econômica. Guaraná, 2003.
- [8] KATJA DETTMER, K.; ARONOV, P. A.; HAMMOCK, B. D. Mass spectrometry-based Metabolomics. **Mass Spectrometry Reviews**, v.26, p. 51-78, 2007.
- [9] MOREIRA, I.; SCHEEL, G. L.; HATUMURA, P. H.; SCARMINIO, I. S. Efeito do solvente na extração de ácidos clorogênicos, cafeína e trigonelina em *coffea arábica*. **Química Nova**, v. 37, n. 1, p. 39-43, 2014
- [10] GONZALVEZ, A.; LLORENS, A.; CERVERA, M. L.; ARMENTA, S.; DE LA GUARDIA, M. Elemental fingerprint of wines from the protected designation of origin Valencia. **Food Chemistry**, v.112, p. 26–34, 2009.
- [11] SPERKOVÁ, J.; SUCHÁNEK, M. Multivariate classification of wines from diferente Bohemian regions (Czech Republic). **Food Chemistry**, v. 93, p. 659–663, 2005.

-
- [12] FURIA, E.; NACCARATO, A.; SINDONA, G.; STABILE, G.; TAGARELLI, A. Multielement Fingerprinting as a Tool in Origin Authentication of PGI Food Products: Tropea Red Onion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 8450–8457, 2011.
- [13] COSTAS-RODRÍGUEZ, M.; LAVILLA, L.; BENDICHO, C. Classification of cultivated mussels from Galicia (Northwest Spain) with European Protected Designation of Origin using trace element fingerprint and chemometric analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 664, p. 121–128, 2010.
- [14] CHEAJESADAGUL, P.; ARNAUDGUILHEM, C.; SHIOWATANA, J.; SIRIPINYANOND, A.; SZPUNAR, J. Discrimination of geographical origin of rice based on multi-element fingerprinting by high resolution inductively coupled plasma mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 141, p. 3504–3509, 2013.
- [15] MAHMOOD, N.; PETRACO, N.; H. E. Y. Elemental fingerprint profile of beer samples constructed using 14 elements determined by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS): multivariation analysis and potential application to forensic sample comparison. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, p. 861–869, 2012.
- [16] CHEN, L.; WANG, J.; YE, Z.; ZHAO, J.; XUE, X.; HEYDEN, Y. V.; SUN, Q. Classification of Chinese honeys according to their floral origin by near infrared spectroscopy, **Food Chemistry**, v. 135, p. 338–342, 2012.
- [17] KOUVOUTSAKIS, G.; MITSIS, C.; TARANTILIS, P. A.; POLISSIOU, M. G.; PAPPAS, C. S. Geographical differentiation of dried lentil seed (*Lens culinaris*) samples using Diffuse Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy (DRIFTS) and discriminant analysis. **Food Chemistry**, v. 145, p. 1011–1014, 2014.
- [18] LI, Y.; ZHANG, J.; ZHAO, Y.; LI, Z.; LI, T.; WANG, Y. Characteristic Fingerprint Based on Low Polar Constituents for Discrimination of *Wolfiporia extensa* according to Geographical Origin Using UV Spectroscopy and Chemometrics Methods. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 1, p. 1–9, 2014.
- [19] CASALE, M.; OLIVERI, P.; ARMANINO, C.; LANTERI, S.; FORINA, M. NIR and UV–vis spectroscopy, artificial nose and tongue: Comparison of four fingerprinting techniques for the characterisation of Italian red wines. **Analytica Chimica Acta**, v. 668, p. 143–148, 2010.
- [20] CALIGIANI, A.; PALLA, L.; ACQUOTTI, D.; MARSEGLIA, A.; PALLA, A. Application of ¹H NMR for the characterisation of cocoa beans of different geographical origins and fermentation levels. **Food Chemistry**, v. 157, p. 94–99, 2014.
- [21] CONSONNI, R.; CAGLIANI, L. R.; COGLIATI, C. NMR based geographical characterization of roasted coffee. **Talanta**, v. 88, p. 420–426, 2012.

[22] SONG, H.; KIM, D.; WOO, S.; LEE, H. K.; OH, S. R. An approach for simultaneous determination for geographical origins of Korean Panax ginseng by UHPLC-QTOF / MS coupled with OPLS-DA models. **Journal of Ginseng Research**, v. 37, n. 3, p. 341–348, 2013.

[23] SONG, H. H.; MOON, J. Y.; RYU, H. W.; NOH, B. S.; KIM, J. H.; LEE, H. K.; OH, S. R. Discrimination of white ginseng origins using multivariate statistical analysis of data sets. **Journal of Ginseng Research**, v. 38, n. 3, p. 187–193, 2014.

[24] ZIELIŃSKI, Ł.; DEJA, S.; JASICKA-MISIAK, I.; KAFARSKI, P. Chemometrics as a tool of origin determination of polish monofloral and multifloral honeys. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 2973–2981, 2014.

[25] GAO, B.; QIN, F.; DING, T.; CHEN, Y.; LU, W.; YU, L. Differentiating Organically and Conventionally Grown Oregano Using Ultraperformance Liquid Chromatography Mass Spectrometry (UHPLC-MS), Headspace Gas Chromatography with Flame Ionization Detection (Headspace-GC-FID), and Flow Injection Mass Spectrum (FIMS) Fingerprints Combined with Multivariate Data Analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.62, p. 8075-8084, 2014.

[26] KIM, E. J.; KWON, J.; PARK, S. H.; PARK, C.; SEO, Y.; SHIN, X .H.; KIM, H. K.; LEE, K.; CHOI, S.; RYU, D. H.; HWANG, G. Metabolite profiling of angelica gigas from different geographical origins using 1 h nmr and UHPLC-ms analyses. **JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY**, V. 59, P. 8806–8815, 2011.

[27] PALOMINO-SCHÄTZLEIN, M.; ESCRIG, P. V.; BOIRA, H.; PRIMO, J.; PINEDA-LUCENA, A.; CABEDO, N. Evaluation of nonpolar metabolites in plant extracts by ¹³C NMR spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 21, p. 11407–11416, 2011.

[28] WILSON, I. D.; NICHOLSON, J. K.; CASTRO-PEREZ, J.; GRANGER, J. H.; JOHNSON, K. A.; SMITH, B. W.; PLUMB, R. S. High Resolution “ Ultra Performance ” Liquid Chromatography Coupled to oa-TOF Mass Spectrometry as a Tool for Differential Metabolic Pathway Profiling in Functional Genomic Studies research articles. **Journal of Proteome Research**, v. 4, p. 591–598, 2005.

[29] HENMAN, A. R. Guarana (*Paullinia cupana var. sorbilis*): Ecological and social perspectives on an economic plant of the central Amazon basin. **Journal of Ethnopharmacol.** v. 6, p. 311-338, 1982.

[30] FUKUMASU H.; AVANZO, J. L.; NAGAMINE, M. K.; BARBUTO, J. A.; RAO, K. V.; DAGLI, M. L. Z. *Paullinia cupana Mart var. sorbilis* guaraná reduces cell proliferation and increases apoptosis of B16/F10 melanoma lung metastases in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** v. 41, p. 305-310, 2006.

-
- [31] ÂNGELO, P. C. S. Guarana (*Paullinia cupana var. sorbilis*), an anciently consumed stimulant from the Amazon rain forest: the seeded-fruit transcriptome. **Plant Cell Reports**. v. 27; p.117–124, 2008.
- [32] SCHIMPL, F. C.; SILVA, J. F.; GONÇALVES, J. F. C.; MAZZAFERA, P. Guarana: Revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, p. 14–31, 2013..
- [33] ERICKSON, H. T.; CORRÊA, M. P. F.; ESCOBAR, J. R. Guaraná (*Paullinia cupana*) as a commercial crop in Brazilian Amazonia. **Economic Botany**, v. 38, n. 3, p. 273-286, 1984.
- [34] FARIA, J. J. P. Manual de Produção do Guaraná. Edição SEBRAE. Cuiabá. 2000.
- [35] Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas (SBRT). **Guaraná em pó, xarope e extrato**: Informações técnicas sobre a fabricação de produtos de guaraná, assim como processos, máquinas e equipamentos empregados, 2013.
- [36] BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n. 70, de 16 de março de 1982. Dispõe sobre normas de identidade, qualidade, embalagem, armazenamento e transporte do guaraná em grão, em bastão e em pó. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 19 mar. 1982.
- [37] HERMAN, A. R. Vida Natural. **O Guaraná: Sua cultura, propriedades, formas de preparação e uso**. 2 ed. Global/Ground, São Paulo, Brasil, p.77, 1986.
- [38] LLERAS, E. Species of *Paullinia* with economic potential. Neglected Crops: 1492 from a different perspective. J. E. Hernando Bermejo and J. León (eds.). **Plant Production and Protection**, Series n. 26. FAO, Rome, Italy. p. 223 – 228, 1994.
- [39] INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, **Levantamento Sistemático da produção Agrícola**: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil, Rio de Janeiro, v. 29, n. 05, p. 1-76, 2015
- [40] HOMMA, A. R. O. Extrativismo, Biodiversidade e Biopirataria na Amazônia. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2008.
- [41] VASCONCELOS, A.; NASCIMENTOS, J. C.; MAIA, A. L. A cultura do guaraná, In: Simposio Internacional Sobre Plantas De Interes Economico De La Flora Amazonica, 1972, Belém, Brasil. **Atas...** Belém: IICA, 1972, p. 61-74.
- [42] INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, **Levantamento Sistemático da produção Agrícola**: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil, Rio de Janeiro v. 24, n. 01 p. 1-80, 2011.

-
- [43] INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, **Levantamento Sistemático da produção Agrícola**: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil, Rio de Janeiro, v. 25, n. 02, p. 1-88, 2012.
- [44] INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, **Levantamento Sistemático da produção Agrícola**: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil, Rio de Janeiro, v. 26, n. 01, p. 1-83, 2013.
- [45] INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, **Levantamento Sistemático da produção Agrícola**: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil, Rio de Janeiro, v. 27, n. 01, p. 1-85, 2014
- [46] MARTIU, T. V. Ueber die Zusammensetzung des Guaranins. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 36, n. 1, p. 93-95, 1840.
- [47] ATROCH, A. L. Aspectos gerais da cultura do guaraná. **Foods & Food Ingredients Journal of Japan**. v. 204, p. 53-56, 2002.
- [48] PELOZO, I. M. G.; CARDOSO, M. L. C.; MELL, J. C. P. Spectrophotometric Determination of Tannins and Caffeine in Preparations from *Paullinia cupanavar*. *Sorbilis*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n. 3, p.447-451, 2008.
- [49] BELLIARDO, F.; MARTELLI, A.; VALLE, M. G. HPLC Determination of Caffeine and Theophylline in *Paullinia cupana* Kunth (Guarana) and Cola spp. Samples. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung**, v. 180, p. 398-401, 1985.
- [50] SOMBRA, L. L.; GÓMEZ, M. R.; OLSINA, R.; MARTÍNEZ, L. D.; SILVA, M. F. Comparative study between capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography in 'guarana' based phytopharmaceuticals, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, p. 989–994, 2005.
- [51] MARX, F. Analysis of guarana seeds. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung**, v. 190, p. 429-431, 1990.
- [52] SOUSA, S. A.; ALVES, S. F.; PAULA, J. A. M.; FIUZA, T. S.; PAULA, J. R.; BARA, M. T. F. Determinação de taninos e metilxantinas no guaraná em pó (*Paullinia cupana Kunth*, *Sapindaceae*) por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 866-870, 2010.
- [53] KLEIN, T.; LONGHINI, R.; MELLO, J. C .P. Development of an analytical method using reversed-phase HPLC-PDA for a semipurified extract of *Paullinia cupana var. sorbilis* (guaraná). **Talanta (Oxford)**, v.88, p. 502-506, 2012.

[54] MORAES M. L. L.; MICKE, G.A.; FUJIYA, N.M.; TAVARES, M.F.M. Separação e análise de metilxantinas em extratos de guaraná e erva mate por eletroforese capilar. **Revista Analítica**, v.5, p. 44-50, 2003.

[55] PAGLIARUSSI, R. S.; FREITAS, L. A. P.; BASTOS, J. K. A quantitative method for the analysis of xanthine alkaloids in *Paullinia cupana* (guarana) by capillary column gas chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 25, p. 371-374, 2002.

[56] CLAUDIO, A. F. M.; Ferreira, A. M.; Freire, M. G.; Coutinho, J. A. P. Enhanced extraction of caffeine from guaraná seeds using aqueous solutions of ionic liquids. **Green Chemistry**, v. 15, p. 2002–2010, 2013.

[57] WALDVOGEL, S. R. Caffeine - A Drug with a Surprise. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 42, n. 6, p. 604-605, 2003.

[58] CAMARGO, M. C. R.; TOLEDO, M. C. F. Teor de cafeína em cafés brasileiros. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 4, p. 421-424, 1998.

[59] TFOUNI, S. A. V.; CAMARGO, M. C. R.; VITORINO, S. H. P.; MENEGÁRIO, T.F.; TOLEDO, M. C. F. Contribuição do guaraná em pó (*Paullinia cupana*) como fonte de cafeína na dieta. **Revista de Nutrição**, v. 20, n. 1, p. 63-68, 2007.

[60] RIBEIRO, J. A.; SEBASTIÃO, A. M. Caffeine and adenosine. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 20, p. S3-S15, 2010.

[61] KUSKOSKI, E. M.; ROSEANE, F.; GARCÍA, A. A.; TRONCOSO G. A. M. Chemical and pharmacological properties of the fruit Guaraná (*Paullinia cupana*). **Vitae**, v. 12, n. 2, p. 45-52. 2005.

[62] DESAVAGAYAM, T.P.; KAMAT J.P.; MOHAN, H.; KESAVAN, P.C. Caffeine as an antioxidant: inhibition of lipid peroxidation induced by reactive oxygen species. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1281, p. 63-70, 1996

[63] DALY, J. W. Caffeine analogs: biomedical impact. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, n. 16, p. 2153-2169, 2007.

[64] BELL, D. G.; MCLELLAN, T. M. Exercise endurance 1, 3, and 6 h after caffeine ingestion in caffeine users and nonusers. **Journal of Applied Physiology**, v. 93, p.1227-1234, 2002

[65] OHTA, A.; GORELIK, E.; PRASAD, S. J.; ROCHESE, F.; LUKASHEV, D.; WONG, M. K.; HUANG, X.; CALDWELL, S.; LIU, K.; SMITH, P.; CHEN, J. F.; JACKSON, E. K.; APASOV, S.; ABRAMS, S.; SITKOVSKY, M. A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 35, p. 13132-13137, 2006.

-
- [66] KASTER, M.P.; MACHADO, N.J.; SILVA, H.B.; NUNES, A.; ARDAIS, A.P.; SANTANA, M.; BAQI, Y.; MÜLLER, C.E.; RODRIGUES, A.L.S.; PORCIÚNCULA, L.O.; CHEN, J.F.; TOMÉ, Â.R.; AGOSTINHO, P.; CANAS, P.M.; CUNHA, R. A. Caffeine acts through neuronal adenosine A_{2A} receptors to prevent mood and memory dysfunction triggered by chronic stress, **Proceedings of the National Academy of Sciences**, p. 1–6, 2015.
- [67] DE MARIA, C.A.B.; MOREIRA, R.F.A. Cafeína: Revisão sobre métodos de análise. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 99-105, 2007
- [68] SILVA, Carla G.; MÉTIN, C.; FAZELI, W.; MACHADO, N.J.; DARMOPIL, S.; LAUNAY, P.S.; GHESTEM, A.; NESA, M.P.; BASSOT, E.; SZABÓ, E.; BAQI, Y.; MÜLLER, C.E.; TOMÉ, A.R.; IVANOV, A.; ISBRANDT, D.; ZILBERTER, Y.; CUNHA, R.A.; ESCLAPEZ, M.; BERNARD, C. Adenosine receptor antagonists including caffeine alter fetal brain development in mice., **Science translational medicine**, v. 5, n. 197, p. 197-104, 2013.
- [69] MACOMBER, R. S. **A Complete Introduction to Modern NMR Spectroscopy** Editora Wiley Interscience, 1997, p. 357.
- [70] SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Princípios de Análise Instrumental**. 6ª ed. Porto Alegre: Editora Bookman, 2009.
- [71] PROCTOR, W. G.; YU, F. C. The dependence of a Nuclear Magnétic Ressonacnce frequency upon chemical compound. **Physical Review**. v. 77, p. 717-717. 1950.
- [72] SILVERSTAIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação de compostos orgânicos**, LCT- Livros Técnicos, editora S.A., 7ª edição, p. 460, 2006.
- [73] KAISER, R. C. RMN 2D: detecção inversa e gradiente de campo na determinação estrutural de compostos orgânicos. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 231-236, 2000.
- [74] SILVA, L.M.A.; ALVES FILHO, E.G.; CHOZE, R.; LIÃOA, 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 the Brazilian Chemical Society**, v.23, n. 6, p. 1054-1061, 2012.
- [75] LONGOBARDI, F.; VENTRELLA, A.; BIANCO, A.; CATUCCI, L.; CAFAGNA, I.; GALLO, V.; MASTRORILLI, P.; AGOSTIANO, A. Non-targeted ¹H NMR fingerprinting and multivariate statistical analyses for the characterisation of the geographical origin of Italian sweet cherries. **Food Chemistry**, v. 141, p. 3028–3033, 2013.
- [76] POPESCU, R.; COSTINEL, D.; DINCA, O. R.; MARINESCU, A.; STEFANESCU, I.; IONETE, R.E. Discrimination of vegetable oils using NMR spectroscopy and chemometrics. **Food Control**, v. 48, p. 84–90, 2014.

-
- [77] GU, H.; PAN, Z.; XI, B.; ASIAGO, V.; MUSSELMAN, B.; RAFTERY, D. Principal component directed partial least squares analysis for combining nuclear magnetic resonance and mass spectrometry data in metabolomics: Application to the detection of breast cancer. **Analytica Chimica Acta**, v. 686, p. 57–63, 2011.
- [78] 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, p. 729–747, 2013.
- [79] NORD, L.I.; VAAG, P.; DUUS, J.O. Quantification of organic and amino acids in beer by 1H NMR spectroscopy. **Analytical Chemistry**, vol. 76, p. 4790-4798. 2004.
- [80] TAVERES, L.A.; FERREIRAS, A.G. ANÁLISES QUALI- E QUANTITATIVA DE CAFÉS COMERCIAIS VIA RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR. **Química Nova**, vol.29, n.5, p. 911-915, 2006.
- [81] WELJIE, A.M.; NEWTIN, J.; JIRIK, F.R.; VOGEL, H.J. Evaluating low-intensity unknown signals in quantitative proton NMR mixture analysis, **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 23, p. 8956–8965, 2008.
- [82] LIU, C.; PAN, D.; YE, Y.; CAO, J. 1H NMR and multivariate data analysis of the relationship between the age and quality of duck meat., **Food chemistry**, v. 141, n. 2, p. 1281–6, 2013.
- [83] CUBERO-LEON, E.; PEÑALVER, R.; MAQUET, A., Review on metabolomics for food authentication, **Food Research International**, v. 60, p. 95–107, 2014.
- [84] GASPAR, P; CARVALHO, A. L.; VINGA, S.; SANTOS, H.; NEVES, A. R. From physiology to systems metabolic engineering for the production of biochemicals by lactic acid bacteria. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 6, p. 764–788, 2013.
- [85] NEVES, A. R.; POOL, W. A.; KOK, J.; KUIPERS, O. P; SANTOS, H. Overview on sugar metabolism and its control in *Lactococcus lactis* - the input from in vivo NMR. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 3, p. 531–54, 2005.
- [86] ALCANTARA, G. B.; BARISON, A.; FERREIRA, A. G. Chemotaxonomic Discrimination of Lichens by 1H NMR, solution and HRMAS, and Chemometric Analysis. **Annals of Magnetic Resonance**, v. 5, p. 1-4, 2006.
- [87] SICILIANO, C.; BELSITO, E.; MARCO, R.; DI GIOIA, M.L.; LEGGIO, A.; LIGUORI, A. Quantitative determination of fatty acid chain composition in pork meat products by high resolution 1H NMR spectroscopy, **Food Chemistry**, v. 136, n. 2, p. 546–554, 2013.
- [88] MONTEIRO, M.R.; AMBROZIN, A.R.P.; SANTOS, M.S; BOFFO, E.F.; PEREIRA-FILHOS, E.R.; LIÃO, LM. Evaluation of biodiesel-diesel blends quality using 1H NMR and chemometrics, **Talanta**, v. 78, p. 660–664, 2009

[89] WATANABE, M.; OHTA, Y.; LICANG, S.; MOTOYAMAB, N.; J.K.P. Contents of Water-Soluble Metabolites and Mineral Nutrients to Evaluate the Effects of Pesticides and Organic and Chemical Fertilizers on Tomato Fruit Quality, **Food Chemistry**, v. 169, p. 387–395, 2014.

[90] REZZI, Serge *et al*, Classification of olive oils using high throughput flow 1H NMR fingerprinting with principal component analysis, linear discriminant analysis and probabilistic neural networks, **Analytica Chimica Acta**, v. 552, p. 13–24, 2005.

[91] MARINI, F. *et al*, Supervised pattern recognition to authenticate Italian extra virgin olive oil varieties, **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 73, p. 85–93, 2004.

[92] SON, Hong Seok *et al*, Metabolomic studies on geographical grapes and their wines using 1H NMR analysis coupled with multivariate statistics, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 1481–1490, 2009.

[93] BOFFO, Elisangela F. *et al*, Classification of Brazilian vinegars according to their 1H NMR spectra by pattern recognition analysis, **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, p. 1455–1460, 2009.

[94] CONSONNI, R. *et al*, NMR and Chemometric methods: A powerful combination for characterization of Balsamic and Traditional Balsamic Vinegar of Modena, **Analytica Chimica Acta**, v. 611, p. 31–40, 2008.

[95] SHINTU, Laetitia; CALDARELLI, Stefano, Toward the determination of the geographical origin of emmental(er) cheese via high resolution MAS NMR: A preliminary investigation, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 4148–4154, 2006.

[96] WARD, J.L.; HARRIS, C.; LEWIS, J.; BEALE, M.H., Assessment of 1H-NMR spectroscopy and multivariate analysis as a technique for metabolite fingerprinting of *Arabidopsis thaliana*, **Phytochemistry**, v. 62, p. 949-957, 2003.

[97] WOLD, S.; GELADI, K.E. Principal Component Analyses. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 2, p. 37-52, 1987.

[98] BRO, R.; SMILDE, A. K. Principal component analysis. **Analytical Methods**, v. 6, p. 2812–2831, 2014.

[99] BRUNS, R.E.; FAIGLE, J.F.G. **Química Nova**. Quimiometria, v. 8, p. 84-98, 1985

[100] GARTLAND, K. P. R.; BEDDELL, C. R.; LINDON, J. C.; NICHOLSON, J. K.; Application of pattern-recognition methods to the analysis and classification of toxicological data derived from proton NMR spectroscopy of urine, **Molecular Pharmacology**, v. 39, p. 629-642, 1991.

[101] ZANG, Q.; KEIRED, D.A.; WOODB, R.D.; BUHSED, L.F.; MOOREE, C.M.V.; NASRE, M.; AL-HAKIME, A.; TREHYD, M.L.; WELSHA, W.J. Combining ¹H NMR spectroscopy and chemometrics to identify heparin samples that may possess dermatan sulfate (DS) impurities or oversulfated chondroitin sulfate (OSCS) contaminants, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, p. 1020–1029, 2011.

[102] 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, p. 12784–12793, 2011.

[103] STANDAL, I.B.; PRAEL, A.; MCEVOY, L.; AXELSON, D.E.; AURSAND, M. Discrimination of cod liver oil according to wild/farmed and geographical origins by GC and ¹³C NMR, **JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 85, p. 105–112, 2008.

[104] SCIUBBA, F.; CAPUANI, G.; DI COCCO, M.E.; AVANZATO, D.; DELFINI, M. Nuclear magnetic resonance analysis of water soluble metabolites allows the geographic discrimination of pistachios (*Pistacia vera*), **Food Research International**, v. 62, p. 66–73, 2014.

[105] Meinhart D. A.; Bizzotto, C. S.; Ballus, C. A.; Prado, M. A.; Bruns, R. E.; Teixeira Filho, J.; Godoy, H. T. Optimisation of a CE method for caffeine analysis in decaffeinated coffee. **Food Chemistry**, v. 120, n. 4, p. 1155- 1161, 2010.

[106] Ye, Y.; Yang, R.; Lou, Y.; Chen, J.; Yan, X.; Tang, H. Effects of Food Processing on the Nutrient Composition of *Pyropia yezoensis* Products Revealed by NMR-based Metabolomic Analysis. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 2, n. 10, p. 749-756, 2014.

[107] Nord, L.I.; Vaag, P.; Duus, J. Ø. Quantification of organic and amino acids in beer by ¹H nmr spectroscopy. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 16, p. 4790-4798, August 15, 2004.

[108] BALAYSSAC, S.; TREFI, S.; GILARD, V.; MALET-MARTINO, M.; MARTINO, R.; DELSUC, M.A. 2D and 3D DOSY ¹H NMR, a useful tool for analysis of complex mixtures: Application to herbal drugs or dietary supplements for erectile dysfunction. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 50, p. 602–612, 2009.

[109] WISHART, D.; TZUR, D.; KNOX, C.; EISNER, R.; GUO, A.C.; YOUNG, N.; CHENG, D.; JEWELL, K.; ARNDT, D.; SAWHNEY, S.; CHRIS FUNG, C.; NIKOLAI, L.; LEWIS, M.; COUTOULY, M.A.; FORSYTHE, I.; TANG, P.; SHRIVASTAVA, S.; JERONCIC, K.; STOTHARD, P.; AMEGBEY, G. BLOCK, D. HAU, D.D.; WAGNER, J.; MINIACI, J.; CLEMENTS, M.; GEBREMEDHIN, M.; GUO, N.; ZHANG, Y.; DUGGAN, G.E.; MACINNIS, G.D; WELJIE, A.M.; DOWLATABADI, R.; BAMFORTH, F.; CLIVE, D.; GREINER, R.; LI, L.; MARRIE, T.; SYKES, B.D.; VOGEL, H.J.; QUERENGESSER, L.

HMDB: the Human Metabolome Database. **Nucleic Acids Research**, v. 35, Database issue D521–D526, 2007.

[110] DAVIS, A.L.; CAI, Y.; DAVIES, A.; LEWIS, J.R. ¹H and ¹³C NMR Assignments of Some Green Tea Polyphenols. **Magnetic Resonance In Chemistry**, V. 34, P. 887-890, 1996.

[111] SITKOWSKI, J.; STEFANIAK, L.; NICOL, L.; MARTIN, M.L.; MARTIN, G.J.; WEBB, G.A. Complete assignments of the ¹H, ¹³C and ¹⁵N NMR spectra of caffeine. **Spectrochimica Acta Part A**, v 51A, n. 5, p. 839-841, 1995.

[112] SCHIMPL, F. C.; KIYOTA, E.; MAYER, J. L. S.; GONÇALVES, J. F. C.; SILVA, J. F.; MAZZAFERA, P. Molecular and biochemical characterization of caffeine synthase and purine alkaloid concentration in guarana fruit. **Phytochemistry**, v.105, p. 25–36, 2014.

[113] USHIROBIRA, T. M. A.; YAMAGUTI, E.; UEMURA, L. M.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; MELLO, J. C. P. Chemical and Microbiological Study of Extract from Seeds of Guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 1, p. 5-9, 2007.

[114] DALONSO, N.; PETKOWICZ, C. L. O. Guarana powder polysaccharides: Characterisation and evaluation of the antioxidant activity of a pectic fraction. **Food Chemistry**, v. 134, p.1804–1812, 2012.

[115] AVATO, P.; PESANTE, M.A.; FANIZZI, F.P.; SANTOS, C.A.M. Seed Oil Composition of *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke. **Lipids**, v. 38, n. 7, 2003.

[116] WIDER, Gerhard; DREIER, Lars, Measuring protein concentrations by NMR spectroscopy, **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 6, p. 2571–2576, 2006.

[117] CLARIDGE, T.D.W. **High-resolution NMR techniques in organic chemistry**. Tetrahedron Organic Chemistry Series, Oxford, Pergamon Press, vol.19,1999, 382 p.

[118] SKOOG, A. D.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J. CROUCH, S. R. Fundamentos da Química Analítica. Ed. 9. São Paulo: Cengage Learning, 2014, 950 p.

[119] OLIVEIRA, C. R. Emprego da RMN aliada à quimiometria no controle de qualidade de suco de laranja. 2004, 103 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2004.

[120] ZHOU, X.; YANG, Z.; HAUGHEY, A. S.; GALVIN-KING, P.; HAN, L.; ELLIOTT, C. T. Classification the geographical origin of corn distillers dried grains with solubles by near infrared reflectance spectroscopy combined with chemometrics: A feasibility study, **Food Chemistry**, v. 189, p. 13–18, 2015.

-
- [121] SEM, I.; TOKATL, F. Differentiation of wines with the use of combined data of UV–visible spectra and color characteristics. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 45, p. 101–107, 2016.
- [122] FORINO, M.; TARTAGLIONE, L.; DELL’AVERSANO, C.; CIMINIELLO, P. NMR-based identification of the phenolic profile of fruits of *Lycium barbarum* (goji berries). Isolation and structural determination of a novel N-feruloyl tyramine dimer as the most abundant antioxidant polyphenol of goji berries, *Food Chemistry*, v. 194, p. 1254–1259, 2006.
- [123] ZHAO, J.; DU, X.; CHENG, N.; CHEN, L.; XEU, X.; ZHAO, J. Identification of monofloral honeys using HPLC–ECD and chemometrics, *Food Chemistry*, v. 194, p. 167–174, 2016.
- [124] WU, X.; LI, Y.; WANG, Q.; LI, W.; FENG, Y. Effects of berberine and pomegranate seed oil on plasma phospholipid metabolites associated with risks of type 2 diabetes mellitus by U-HPLC / Q-TOF-MS. *Journal of Chromatography B*, v. 1007, p. 110–120, 2015.
- [125] PACHECO, S.; BORGUINI, R. G.; SANTIAGO, M. C. P. A.; Nascimento, L. S. M.; Godoy, R. L. O. Artigo História da Cromatografia Líquida História da Cromatografia Líquida. v. 7, n. 4, p. 1225–1271, 2015.
- [126] COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: UNICAMP. 2006.
- [127] MALDANER, L.; SALES, C.; JARDIM, F. O ESTADO DA ARTE DA CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA. *Química Nova*, v. 32, n. 1, p. 214–222, 2009.
- [128] HORVTHA, C. G.; PREISS, B. A.; LIPSKY, S. R. Fast Liquid Chromatography: An Investigation of Operating Parameters and the Separation of Nucleotides on Pellicular Ion Exchangers. *Analytical Chemistry*, v. 39, n. 12, p. 1442–1428, 1967.
- [129] NGUYEN, D. T. T.; GUILLARME, D.; RUDEAZ, S.; VEUTHEY, J. Fast analysis in liquid chromatography using small particle size and high pressure. *Journal of Separation Science*, v. 29, p. 1836–1848, 2006.
- [130] HORVTHA, C.; NAHUM, A.; FRENZ, J. H. High-Performance displacement chromatography. *Journal of Chromatography*, v. 218, p. 365–393, 1981.
- [131] SWARTZ, M. E. UHPLC: An Introduction and Review. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 28, p. 37 - 41, 2007.

-
- [132] JERKOVICH, A. D.; MELLORS, J. S.; JORGENSON, J. W.; MAJORS, R. E. The Use of Micrometer-Sized Particles in UHPLC. **LCGC Asia Pacific**, v. 6, n. 4, p. 8–12, 2003.
- [133] WU, N.; LIPPERT, J. A.; LEE, M. L. Practical aspects of ultrahigh pressure capillary liquid chromatography. **Journal of chromatography. A**, v. 911, n. 1, p. 1–12, 2001.
- [134] APOLLONIO, L. G.; PIANCA, D. J.; WHITTALL, I. R.; MAHER, W. A.; KYD, J. M. A demonstration of the use of ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry [UHPLC/MS] in the determination of amphetamine-type substances and ketamine for forensic and toxicological analysis. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 836, n. 1-2, p. 111–5, 2006.
- [135] PEDRAGLIO, S.; ROZIO, M. G.; MISIANO, P.; REALI, V.; DONDIO, G.; BIGOGNO, C. New perspectives in bio-analytical techniques for preclinical characterization of a drug candidate: UHPLC-MS / MS in in vitro metabolism and pharmacokinetic studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, p. 665–673, 2007.
- [136] NOVÁKOVÁ, L.; VILDOVÁ, A.; PATRICIA, J.; GONC, T.; SOLICH, P. Development and application of UHPLC – MS / MS method for the determination of phenolic compounds in Chamomile flowers and Chamomile tea extracts. **Talanta**, v. 82, p. 1271–1280, 2010.
- [137] VAN DEEMTER, J. J.; ZUIDERWEG, F. J.; KLINKENBERG, A. Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer nonideality in chromatography. **Chemical Engineering Science**, v. 5, p. 271–289, 1956.
- [138] ALLWOOD, J. W.; GOODACRE, R. An Introduction to Liquid Chromatography – Mass Spectrometry Instrumentation Applied in Plant Metabolomic Analyses † Untargeted Plant Metabolomics and the. **Phytochemical Analysis**, v. 21, p. 33–47, 2010.
- [139] SWARTZ, Me. Ultra performance liquid chromatography (UHPLC): An introduction. **Separation Science ReDefined**, v. 586, p. 8–14, 2005.
- [140] LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente “ compatíveis ”? II. A escolha do analisador de massas. **Scientia Chomatographiaca**, v. 5, n. 1, p. 27–46, 2013.
- [141] PLUMB, R.; CASTRO-PEREZ, J.; GRANGER, J.; BEATTIE, I.; JONCOUR, K.; WRIGHT, A. Ultra-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-orthogonal time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 18, p. 2331–2337, 2004.

-
- [142] WILSON, I. D.; NICHOLSON, J. K.; CASTRO-PEREZ, J.; GRANGER, J. H.; JOHNSON, K. A.; SMITH, B. W. High Resolution “ Ultra Performance ” Liquid Chromatography Coupled to oa-TOF Mass Spectrometry as a Tool for Differential Metabolic Pathway Profiling in Functional Genomic Studies research articles. **Journal of Proteome Research**, v. 4, p. 591–598, 2005.
- [143] ARDREY, R. E. **Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction**, Wiley: Huddersfield, 2003.
- [144] SADEGHI-BAZARGANI, H.; BANGDIWALA, S. I.; MOHAMMAD, K.; MAGHSOUDI, H.; MOHAMMADI, R. Compared application of the new OPLS-DA statistical model versus partial least squares regression to manage large numbers of variables in an injury case-control study. **Scientific Research and Essays**, v. 6, n. 20, p. 4369–4377, 2011.
- [145] SOUZA, A. M.; BREITKREITZ, M. C.; FILGUEIRAS, P. R.; ROHWEDDER, J. J. R.; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para calibração multivariada na determinação de paracetamol em comprimidos comerciais utilizando espectroscopia no infravermelho próximo: um tutorial, parte II. **Quimica Nova**, v. 36, n. 7, p. 1057–1065, 2013.
- [146] BYLESJÖ, M.; RANTALAINEN, M.; CLOAREC, O.; NICHOLSON, J. K.; HOLMES, E.; TRYGG, J. OPLS discriminant analysis: combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification. **Journal of Chemometrics**, n. September, p. 398–405, 2007.
- [147] TRYGG, J.; HOLMES, E.; LUNDSTEDT, T. Chemometrics in metabonomics. **Journal of Proteome Research**, v. 6, n. 2, p. 469–479, 2007.
- [148] BYLESJÖ, M.; RANTALAINEN, M. Model Based Preprocessing and Background Elimination: OSC, OPLS, and O2PLS Comprehensive. *In*: BROWN, S.; TAULER, R.; WALCZAK, B. **Chemometrics: Chemical and Biochemical Data Analysis**, AMSTERDAM: Elsevier, 2009, p. A129-A138.
- [149] TRYGG, J.; WOLD, S. Orthogonal projections to latent structures (O-PLS). **Journal of Chemometrics**, v. 16, n. 3, p. 119–128, 2002.
- [150] Wiklund, S.; Johansson, E.; Sjostrom, L.; Mellerowicz, E. J.; Edlund, U.; Shockcor, J. P.; Gottfries, J.; Trygg, J. Visualization of GCITOF-MS-Based Metabolomics Data for Identification of Biochemically Interesting Compounds using OPLS Class Models. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 1, p. 115–122, 2008.
- [151] WESTERHUIS, J. A.; VAN VELZEN, E. J. J.; HOEFSLOOT, H. C. J.; Smilde, A. K. Multivariate paired data analysis: Multilevel PLS-DA versus OPLS-DA. **Metabolomics**, v. 6, n. 1, p. 119–128, 2010.

-
- [152] ZHANG, X.; BREKSA, A. P.; MISHCHUK, D. O.; FAKE, C. E.; O'MAHONY, M. A.; SLUPSKY, C. M. Fertilisation and pesticides affect mandarin orange nutrient composition. **Food Chemistry**, v. 134, n. 2, p. 1020–1024, 2012.
- [153] LIU, C; PAN, D; YE, Y; CAO, J. ¹H NMR and multivariate data analysis of the relationship between the age and quality of duck meat. **Food chemistry**, v. 141, n. 2, p. 1281–6, 2013.
- [154] CONSONNI, R.; CAGLIANI, L. R.; STOCCHERO, M.; PORRETTA, S. Triple concentrated tomato paste: Discrimination between Italian and Chinese products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 11, p. 4506–4513, 2009.
- [155] MOORE, J. P.; ZHANG, S.; NIEUWOUDT, H. H.; DIVOL, B.; TRYGG, J.; BAUER, F. F. multivariate approach using ATR mid-infrared spectroscopy to measure the surface mannoproteins and β -glucans of yeast cell walls during wine fermentations. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 10054–10063, 2015.
- [156] ZHOU, X.; YANG, Z.; HAUGHEY, S. A.; GALVIN-KING, P.; HAN, L.; ELLIOTT, C. T. Classification the geographical origin of corn distillers dried grains with solubles by near infrared reflectance spectroscopy combined with chemometrics: A feasibility study. **Food Chemistry**, v. 189, p. 13–18, 2015.
- [157] LIN, W.; YANG, C.; KUO, B. Classifying cultivars of rice (*Oryza sativa* L.) based on corrected canopy reflectance spectra data using the orthogonal projections to latent structures (O-PLS) method. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 115, p. 25–36, 2012.
- [158] JO, Y.; PARK, H.; CHOI, S.; KIM, S.; BAO, C.; KIM, H. W.; CHOI, H.; LEE, H. J. AUH, J. Metabolomic Analysis Reveals Cyanidins in Black Raspberry as Candidates for Suppression of Lipopolysaccharide-Induced Inflammation in Murine Macrophages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 22, p. 5449–5458, 2015.
- [159] JANDRIĆ, Z.; ROBERTS, D.; RATHOR, M. N.; ABRAHIM, A.; ISLAM, M.; CANNAPAN, A. Assessment of fruit juice authenticity using UHPLC-QToF MS: a metabolomics approach. **Food chemistry**, v. 148, p. 7–17, 2014.
- [160] DÍAZ, R.; POZO, O. J.; SANCHO, J. V.; HERNÁNDEZ, F. Metabolomic approaches for orange origin discrimination by ultra-high performance liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 157, p. 84–93, 2014.
- [161] MACHERIUS, A.; SEIWERT, B.; SCHRÖDER, P.; HUBER, C.; LORENZ, W.; REEMTSMA, T. Identification of plant metabolites of environmental contaminants by UHPLC-QToF-MS: The in vitro metabolism of triclosan in horseradish. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 5, p. 1001–1009, 2014.

-
- [162] CHO, K.; KIM, Y.; WI, S. J.; SEO, J. B.; KWON, J.; CHUNG, J. H.; PARK, K. Y.; NAM, M. H. Nontargeted Metabolite Profiling in Compatible Pathogen- Inoculated Tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. Wisconsin 38) Using UHPLC-Q-TOF/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 11015–11028, 2012.
- [163] BARRI, T.; DRAGSTED, L. O. UHPLC-ESI-QTOF/MS and multivariate data analysis for blood plasma and serum metabolomics: Effect of experimental artefacts and anticoagulant. **Analytica Chimica Acta**, v. 768, p. 118–128, 2013.
- [164] WU, Y.; BI, Y.; BINGGA, G.; LI, X.; ZHANG, S.; LI, J.; LI, H.; DING, S.; XIA, X. Metabolomic analysis of swine urine treated with B2-agonists by ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1400, p. 74–81, 2015.
- [165] VALLS, J.; MILLÁN, S.; MARTÍ, M. P.; BORRÀS, E.; AROLA, L. Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols, **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 7143–7172, 2009.
- [166] ZHANG, S.; ZHU, M. J. Characterization of Polyphenolics in Grape Pomace Extracts Using ESI Q-TOF MS/MS. **Journal of Food Science and Nutrition**, v. 1, p. 1-10, 2010.
- [167] FULCRAND, H.; MANÉ, CARINE PREYS, S.; MAZEROLLES, G.; BOUCHUT, C.; MAZAURIC, J. P.; SOUQUET, J. M.; MEUDECI, E.; LI, Y.; COLE, R. B.; CHEYNIER, V. Direct mass spectrometry approaches to characterize polyphenol composition of complex samples, **Phytochemistry**, v. 69, n. 18, p. 3131–3138, 2008.
- [168] CÁDIZ-GURREA, M. L.; FERNÁNDEZ-ARROYO, S.; SEGURA-CARRETERO, A., Pine Bark and Green Tea Concentrated Extracts : Antioxidant Activity and Comprehensive Characterization of Bioactive Compounds by HPLC – ESI-QTOF-MS, **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, p. 20382–20402, 2014.
- [169] YAMAGUTI-SASAKI, E. ITO, L. A. CANTELI, V. C. D. USHIROBIRA, T. M. A. UEDA-NAKAMURA, T. DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V.; MELLO, J. C. P. Antioxidant capacity and in vitro prevention of dental plaque formation by extracts and condensed tannins of *Paullinia cupana*, **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 8, p. 1950–63, 2007.
- [170] SOUSA, S.; ALVES, S. F.; PAULA, J. A. M.; FIUZA, T. S.; PAULA, J. R.; BARA, M. T. F. Determinação de taninos e metilxantinas no guaraná em pó (*Paullinia cupana* Kunth, Sapindaceae) por cromatografia líquida de alta eficiência, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 866–870, 2010.
- [171] MORENO, J.; PEINADO, R. Polyphenols. In: _____. **Enological Chemistry**. 1 ed.: Elsevier Science, 2012. p. 53-76.

-
- 172[172] FERREIRA, D.; MARAIS, J. P. J.; COLEMAN, C. M.; SLADE, D. Proanthocyanidins: Chemistry and Biology. In: MANDER, L.; LIU, H. B. **Comprehensive Natural Products II**, 1 ed. Elsevier Science, 2010. p. 605-661.
- [173] MARCHI, F.; SERAGLIA, R.; MOLIN, L.; TRALDI, P.; VEDOVA, A. D.; GARDIMAN, M.; ROSSO, M.; FLAMINI, R. Study of isobaric grape seed proanthocyanidins by MALDI-TOF MS. **Mass Spectrometry**, v. 49, p. 826–830, 2014.
- [174] RUSSO, D.; KENNY, O. S. T. J.; MILELLA, L., H. M. B.; DIOP, M. S.; RAI, D. K.; BRUNTON, N. P. Profiling of phytochemicals in tissues from *Sclerocaryabirreaby* HPLC-MS and their link with antioxidant activity. **Chromatography**, v. 2013, p. 1-11, 2013.
- [175] QIANG, L. V.; LUO, F.; ZHAO, X.; LIU, Y.; HU, G.; SUN, C.; LI, XIAN Identification of Proanthocyanidins from Litchi (*Litchi chinensis* Sonn .) Pulp by LC-ESI- Q-TOF-MS and Their Antioxidant Activity, **Plos One**, p. 1–17, 2015.
- [176] NEGRI, G.; SANTI, D.; TABACH, R. Bitter acids from hydroethanolic extracts of *Humulus lupulus* L ., Cannabaceae , used as anxiolytic, **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, n. 3, p. 3410-3420, 2010.
- [177] HELLSTRÖM, J.; SINKKONEN, J.; KARONEN, M.; MATTILA, P. Isolation and structure elucidation of procyanidin oligomers from Saskatoon berries (*Amelanchier alnifolia*), **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 1, p. 157–164, 2007.
- [178] GU, L. KELM, M. A.; HAMMERSTONE, J. F.; ZHANG, Z.; BEECHER, G.; HOLDEN, J.; HAYTOWITZ, D.; PRIOR, R. L. Liquid chromatographic / electrospray ionization mass spectrometric studies of proanthocyanidins in foods, **Journal of Mass Spectrometr** n. 38, p. 1272–1280, 2003.
- [179] TALA, V. R. S.; SILVA, C. V.; RODRIGUES, C. M.; NKENGFAK, A. E.; SANTOS, C. L.; VILEGAS, W. Characterization of Proanthocyanidins from *Parkia biglobosa* (Jacq.) G. Don. (Fabaceae) by Flow Injection Analysis — Electrospray Ionization Ion Trap Tandem Mass Spectrometry and Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Mass Spectrometry, **Journal Molecules**, v. 18, n. 3, p. 2803–2820, 2013.
- [180] GALAVERNA, R. S.; SAMPAIO, P. T. B.; BARATA, L. E. S.; EBERLIN, M. N.; FIDELIS C. H. V. Differentiation of two morphologically similar Amazonian *Aniba* species by mass spectrometry leaf fingerprinting. **Analytical Methods**, v.7, p.1984-1990, 2015.
- [181] ROUX, E. L.; DOCO, T.; SARNI-MANCHADO, P.; LOZANO, Y.; CHEYNIER, V. A-type proanthocyanidins from pericarp of *Litchi chinensis*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 7, p. 1251–1258, 1998.
- [182] LI, S.; XIAO, J.; CHEN, L.; HU, C.; CHEN, P.; XIE, B.; SUN, Z. Identification of A-series oligomeric procyanidins from pericarp of *Litchi chinensis* by FT-ICR-MS and LC-MS. **Food Chemistry**, v. 153, p. 31-39, 2012.

-
- [183] XIONG, H.; YU, L. X.; QU, H. Batch-to-Batch Quality Consistency Evaluation of Botanical Drug Products Using Multivariate Statistical Analysis of the Chromatographic Fingerprint. **AAPS PharmSciTech**, v. 14, n. 2, p. 802–810, 2013.
- [184] HUANG, H.; QU, H. A comparative fingerprint study using high-performance liquid chromatography, ultraviolet, and near-infrared spectroscopy to evaluate the quality consistency of Danshen injections produced by different manufacturers. **Analytical Methods**, v. 5, n. 2, p. 474–482, 2013.
- [185] LIU, Y. T.; PENG, J. B.; JIA, H. M.; ZHANG, H. W.; DING, G.; ZOU, Z. M. Urinary metabonomic evaluation of the therapeutic effect of traditional Chinese medicine Xin-Ke-Shu against atherosclerosis rabbits using UHPLC-Q/TOF MS. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 136, p. 104–114, 2014.
- [186] JONES, M. D.; AVULA, B.; WANG, Y. H.; LU, L.; ZHAO, J.; AVONTO, C.; ISAAC, G.; MEEKER, L.; YU, K.; LEGIDO-QUIGLEY, C.; SMITH, N.; KHAN, I. A. Investigating sub-2 μ m particle stationary phase supercritical fluid chromatography coupled to mass spectrometry for chemical profiling of chamomile extracts. **Analytica Chimica Acta**, v. 847, p. 61–72, 2014.
- [187] LI, S.; LIU, H.; JIN, Y.; LIN, S.; CAI, Z.; JIANG, Y. Metabolomics study of alcohol-induced liver injury and hepatocellular carcinoma xenografts in mice. **Journal of chromatography. B**, v. 879, n. 24, p. 2369–75, 2011.
- [188] XIAO-WEI, L.; FENG, Z.; SHOU-HONG, G.; BO, J.; WAN-SHENG, C. Metabolite profiling of Zi-Shen pill in rat biological specimens by UHPLC-Q-TOF / MS. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 13, n. 2, p. 145–160, 2015.
- [189] WANG, Y.; GAO, D.; CHEN, Z.; LI, S.; GAO, C.; CAO, D.; LIU, F.; LIU, H.; JIANG, Y. Acridone Derivative 8a Induces Oxidative Stress-Mediated Apoptosis in CCRF-CEM Leukemia Cells: Application of Metabolomics in Mechanistic Studies of Antitumor Agents. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. e63572, 2013.
- [190] LU, N.; WEI, D.; CHEN, F.; YANG, S. T. Lipidomic profiling reveals lipid regulation in the snow alga *Chlamydomonas nivalis* in response to nitrate or phosphate deprivation. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 4, p. 605–613, 2013.
- [191] LIU, Y. T.; PENG, J. B.; JIA, H. M.; CAI, D. Y.; ZHANG, H. W.; YU, C. Y.; ZOU, Z. M. UHPLC-Q/TOF MS standardized Chinese formula Xin-Ke-Shu for the treatment of atherosclerosis in a rabbit model. **Phytomedicine**, v. 21, n. 11, p. 1364–1372, 2014.
- [192] MICHELL, A. W., MOSEDALE, D., GRAINGER, D. J., & BARKER, R. A. (2008). Metabolomic analysis of urine and serum in Parkinson's disease. *Metabolomics*, 4(3), 191–201.

[193] SHANG, J.; LIU, J.; HE, M.; SHANG, E.; ZHANG, L.; SHAN, M.; YAO, W.; YU, B.; YAO, Y.; DING, A. UHPLC/Q-TOF MS-based plasma metabolic profiling analysis of the bleeding mechanism in a rat model of yeast and ethanol-induced blood heat and hemorrhage syndrome. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 92, p. 26–34, 2014.

[194] WORLEY, B.; POWERS, R. Multivariate Analysis in Metabolomics. **Current Metabolomics**, v. 1, n. 1, p. 92–107, 2012.

[195] WAN, J. B.; BAI, X.; CAI, X. J.; RAO, Y.; WANG, Y. S.; WANG, Y. T. Chemical differentiation of Da-Cheng-Qi-Tang, a Chinese medicine formula, prepared by traditional and modern decoction methods using UHPLC/Q-TOFMS-based metabolomics approach. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 83, p. 34–42, 2013.

[196] QI, Y.; PI, Z.; LIU, S.; SONG, F.; LIN, N.; LIU, Z. Metabonomic study of adjuvant-induced arthritis in rats using ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Molecular bioSystems**, v. 10, n. 10, p. 2617–25, 2014.