

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Qualidade Química de Suco de Uva Comercial, Perfil  
Químico de Bananas e Açaí Juçara e Atividade  
Quimiopreventiva de Câncer de Extratos de Bananas.**

**Chemical Quality of Commercial Grape Juice, Chemical Profile of Banana and  
Acai Juçara and Cancer Chemopreventive Activity of Banana Extracts.**

**Bruno Gomes de Oliveira**

**Tese de Doutorado em Química**

**Vitória - ES**

**2019**

Bruno Gomes de Oliveira

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Química

**Área de Concentração:** Química

Orientador: Prof. Dr. Wanderson Romão  
Coorientadora: Profa. Dra Denise Coutinho Endringer

**VITÓRIA - ES**  
**2019**

Qualidade Química de Suco de Uva Comercial, Perfil Químico  
de Bananas e Açaí Juçara e Atividade Quimiopreventiva de  
Câncer de Extratos de Bananas.

Bruno Gomes de Oliveira

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade  
Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do grau de  
Doutor em Química.

Aprovado em 27/06/2019 por:

---

**Prof. Dr. Wanderson Romão**  
Instituto Federal do Espírito Santo  
Orientador

---

**Profa. Dra. Denise Coutinho Endringer**  
Universidade de Vila Velha  
Coorientadora

---

**Prof. Dr. Álvaro Cunha Neto**  
Universidade Federal do Espírito Santo

---

**Prof. Dr. Paulo Roberto Filgueiras**  
Universidade Federal do Espírito Santo

---

**Prof. Dr. José Aires Ventura**  
Instituto Capixaba de Pesquisa,  
Assistência Técnica e Extensão Rural

---

**Prof. Dr. Helber Barcellos da Costa**  
MULTIVIX

**Universidade Federal do Espírito Santo**

Vitória, Junho de 2019

A minha filha Maria Clara Mezzabarba de Oliveira

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pela sua presença em minha vida.

Aos meus pais, Rogério e Elizabel e toda minha família, pelo apoio e amor. A vocês dedico toda minha glória.

A Manuely Defaveri Vicente Mezzabarba e Maria Clara Mezzabarba de Oliveira, pelo apoio, carinho e paciência.

Aos professores Wanderson Romão e Denise Coutinho Endringer, pela orientação, paciência e pelo conhecimento transmitido.

Aos professores Álvaro Cunha Neto, Paulo Roberto Filgueiras, Helber Barcellos da Costa e José Aires Ventura por aceitarem participar da banca de tese, colaborando para o crescimento desse trabalho.

Ao INCAPER, em especial o professor José Aires Ventura, pelo fornecimento das amostras e auxílio no projeto de pesquisa.

A equipe do Laboratório Nupecfarma, da UVV, em especial a professora Denise Endringer pelo auxílio e desenvolvimento da pesquisa.

Aos amigos de Laboratório de Petroleômica e Forense: Lindamara, Heloísa, Radigya, Flávia, Eliane, Lilian, Heloá, Eloilson, Nayara, Rayana e Fernanda.

A CAPES, CNPQ e FAPES pelo auxílio nesse período.

A PPGQUI-UFES, em especial aos professores que colaboraram no meu crescimento.

“Você erra todos os arremessos que não tenta”

*Michael Jordan*

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Principais estados produtores de frutas do Brasil – Área colhida no ano de 2016. ....	18
<b>Figura 2.</b> Principais estados produtores de frutas do Brasil – Valor da Produção em 2016. ....	19
<b>Figura 3.</b> Frutas mais produzidas no Espírito Santo em 2018 (% em massa). ....	20
<b>Figura 4.</b> Diagrama de um espectrômetro de massas. ....	21
<b>Figura 5.</b> Esquema de uma fonte de ionização por electrospray (ESI). ....	22
<b>Figura 6.</b> Esquema de um espectrômetro de massas FT-ICR (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). ....	22
<b>Figura 7.</b> Esquema de uma célula de ICR. ....	24
<b>Figura 8.</b> Esquema do processo de carcinogênese. Editado. ....	26
<b>Figura 9.</b> Produção de uva (em %) por Estados em 2016. ....	32

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Taxas de isótopos estáveis de amostras selecionadas.....	35
Tabela 2. Espécies químicas propostas por ESI(-)FT-ICR MS para as amostras de suco de uva adulterado com suco de maçã. ....	40
Tabela 3. Conteúdo de suco de maçã em suco de uva comercial.....	48
Tabela 4. Compostos identificados nas frações glicídicas das amostras de banana.	61
Tabela 5. Identificação por ESI(-)FT-ICR MS de compostos fenólicos presentes em amostras de banana.....	70
Tabela 6. Atividades quimiopreventivas de seis cultivares de banana. ....	77
Tabela 7. Moléculas identificadas por ESI-FT-ICR MS em sete populações de juçara. ....	84

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APCI - Ionização química a pressão atmosférica, do inglês *Atmospheric-pressure chemical ionization*.

APPI - Fotoionização a pressão atmosférica, do inglês *Atmospheric Pressure Photoionization*.

ATT - Acidez total titulável.

C18 – Octadecil.

CI - Ionização química, do inglês *Chemical ionization*.

CID - Dissociação induzida por colisão, do inglês *Collision-induced dissociation*.

EI - Ionização por elétrons, do inglês *Electron ionization*.

ESI - Ionização por Eletrospray, do inglês *Electrospray Ionization*.

FT-ICR MS - Espectrometria de Massas com analisador de Ressonância Ciclotrônica de Íons e com Transformada de Fourier, do inglês *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry*.

INCAPER - Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural.

iNOS – Inibição do Óxido Nítrico Sintase.

LD – Limite de detecção.

LQ – Limite de quantificação.

MALDI - Dessorção/ionização por matriz assistida por laser, do inglês *Matrix-assisted laser desorption/ionization*.

MALDI - Dessorção/ionização por matriz assistida por laser.

MTT - Brometo de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio.

NADP - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.

NF- $\kappa$ B - Fator de Transcrição Nuclear Kappa B.

PCA - Análise de componentes principais, do inglês *Principal component analysis*.

pH - Potencial hidrogeniônico.

PIQs - Padrões de Identidade e Qualidade.

PLS - Regressão parcial dos mínimos quadrados, do inglês *Partial least squares*.

QR – Quinona Redutase

RML - Regressão linear múltipla, do inglês *Multiple linear regression*.

RMSEC – Erro quadrado médio de calibração, do inglês *Root Mean Square of Calibration*.

RMSEP - Erro quadrado médio de predição, do inglês *Root Mean Square Error of Prediction*.

SST - Sólidos solúveis totais.

TOF - Tempo de vôo, do inglês *Time-of-flight*.

## LISTA DE SÍMBOLOS

% m/m - Porcentagem em massa

% v/v - Porcentagem em volume

°C - Graus Celsius

μL - Microlitros

$\vec{a}$  - *Aceleração centrípeta.*

$\vec{B}$  - *Campo magnético uniforme.*

$\vec{F}$  - *Força.*

$f$  - *Frequência Ciclotrônica*

$m$  - *Massa do íon.*

m/z - *Razão massa/carga*

mg - *Miligramas*

min - *Minutos*

mL - *Mililitros*

$q$  - *Carga do íon.*

$r$  - *Raio.*

$\vec{v}$  - *Velocidade Linear.*

$\vec{\omega}$  - *Velocidade Angular.*

## RESUMO

A Espectrometria de Massas com analisador de Ressonância Ciclôtrônica de Íons e com Transformada de Fourier (FT ICR – MS) aliada a fonte de ionização por eletrospray (ESI) é uma poderosa ferramenta de análise química. Neste trabalho foi desenvolvida uma metodologia de identificação e quantificação de adulteração de suco de uva com suco de maçã. Foram elaborados um modelo de calibração univariado e dois modelos de calibração multivariados (PLS e MLR). Os três modelos apresentaram resultados com boa precisão e exatidão. Foram testadas onze amostras de sucos de uva integral comercial. Destas onze amostras, duas delas apresentaram teor de suco de maçã de aproximadamente 24% m/m e os outros nove sucos investigados ou não continham suco de maçã ou apresentavam teor abaixo do limite de quantificação. Além disso, utilizando ESI(-) FT ICR – MS foi possível estudar o perfil glicídico e fenólico de bananas das cultivares Pacovan, Ambrosia, Vitória, Japira, Prata Comum e Tropical em quatro estádios de maturação. Foi possível observar o aumento do teor de carboidratos nos frutos, durante a maturação e que as bananas Prata (Japira, Vitória, Prata Comum e Pacovan) apresentaram teor de monossacarídeos superior ao teor de dissacarídeos e as Gros Michel (Ambrosia) e Maçã (Tropical) apresentaram teor de dissacarídeos superior ao teor de monossacarídeos. Já o perfil polifenólico destas amostras indicou uma predominância de flavonóides e ácidos cinâmicos, sendo vinte polifenóis detectados, como por exemplo: epicatequina, ácido ferúlico hexosídeo, derivado do ácido cafeico, derivado do ácido gálico, proantocianidina e quercetina deoxihexosehexosídeo. Foram analisados também o potencial quimiopreventivo de câncer associado a indução de quinona-redutase e inibição da produção de óxido nítrico, NF- $\kappa$ B e aromatase. A cultivar Pacovan, estágio de maturação 2, apresentou alta inibição de NF- $\kappa$ B enquanto a cultivar Japira, nos estádios de maturação 2, 4 e 7 e Ambrosia, estágio 4, apresentaram inibição de aromatase superior a 50%. Todas as amostras, exceto Pacovan no estágio de maturação 7, Tropical no estágio de maturação 7, apresentaram inibição de iNOS superior a 80%. O perfil polifenólico de sete populações de juçara também foi investigado neste trabalho. Os polifenóis foram classificados em três classes fitoquímicas: flavonóides, ácidos fenólicos e antocianinas, sendo a classe dos flavonóides a mais abundante. Dentre os

compostos identificados destacam-se o dihidrokaempferol, ácido protocatecuico hexosídeo, ácido siringico hexosídeo, orientina e malvidin-glicosídeo.

Palavras-chave: Espectrometria de Massas, Adulteração de suco de uva e Quimioprevenção de câncer.

## ABSTRACT

Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry (FT ICR-MS) allied to electrospray ionization (ESI) is a powerful tool for chemical analysis. In this work, a methodology was developed for the identification and quantification of grape juice with apple juice adulteration. An univariate and two multivariate calibration models (PLS and MRL) were developed. The three models presented results with good precision and accuracy. Eleven samples of commercial whole grape juice were tested. Of these eleven samples, two of them presented apple juice content of approximately 24% m/m and the other nine juices investigated they either did not contain apple juice or had a content below the limit of quantification. In addition, using the ESI(-) FT ICR-MS, it was possible to study the glycidic and phenolic profile of bananas of the Pacovan, Ambrosia, Vitória, Japira, Prata Comum and Tropical varieties at four maturation stages. It was possible to observe the increase of the carbohydrate content in the fruits, during maturation. The Prata (Japira, Vitória, Prata Comum and Pacovan) bananas had a monosaccharide content higher than the disaccharide content. Conversely, Gros Michel (Ambrosia) and Maçã (Tropical) had a higher disaccharide content than the monosaccharide content. The polyphenolic profile of these samples indicated a predominance of flavonoids and cinnamic acids, of which 20 polyphenols were detected, for example: epicatechin, hexoside ferulic acid, caffeic acid derivative, gallic acid derivative, proanthocyanidin and quercetin deoxyhexosehexoside. The cancer chemopreventive potential associated with quinone reductase induction, inhibition of the nitric oxide production, NF- $\kappa$ B and aromatase were also analyzed. Pacovan cultivar, maturation stage 2, showed high inhibition of NF- $\kappa$ B whereas Japira cultivar, at maturation stages 2, 4 and 7 and Ambrosia, stage 4, showed aromatase inhibition higher than 50%. All samples except Pacovan at maturity stage 7, Tropical at maturation stage 7, showed inhibition of iNOS greater than 80%. The polyphenolic profile of seven genotypes of juçara was also investigated in this work. Polyphenols were classified into three phytochemical classes: flavonoids, phenolic acids and anthocyanins, with the most abundant flavonoid class. Among the identified compounds are dihydrokaempferol, protocatechuic hexoside acid, syringe hexoside acid, orientin and malvidin-glycoside.

Keywords: Mass Spectrometry, Adulteration of grape juice, Cancer Chemoprevention.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL .....	18
1.1 A FRUTICULTURA NO BRASIL.....	18
1.2 A FRUTICULTURA NO ESPÍRITO SANTO.....	19
1.3 ESPECTROMETRIA DE MASSAS .....	20
1.3.1 Ionização por Electrospray (ESI).....	21
1.3.2 Espectrometria de Massas de Ressonância Ciclotrônica de Íons com Transformada de Fourier (FT-ICR MS) .....	22
1.4 UTILIZAÇÃO DE FT – ICR MS PARA AVALIAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DE FRUTOS E SEUS PRODUTOS DE PROCESSAMENTO .....	24
1.5 QUIMIOPREVENÇÃO DE CÂNCER .....	25
1.5.1 Ensaio de Indução da Enzima NAD(P)H: Quinona Redutase (QR) .....	26
1.5.2 Ensaio de Inibição de Fator de Transcrição Nuclear $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) .....	27
1.5.3 Ensaio de Inibição da Aromatase .....	27
1.5.4 Ensaio de Inibição da Óxido Nítrico Sintase Indutível (iNOS) .....	28
1.6 ANÁLISES QUIMIOMÉTRICAS.....	28
2. CONTROLE DE QUALIDADE DE SUCO DE UVA ADULTERADO COM SUCO DE MAÇÃ POR ESI (-) FT - ICR MS.....	30
2.1 INTRODUÇÃO.....	30
2.1.1 A Viticultura no Brasil e no Mundo.....	31
2.1.2 Suco de Uva.....	33
2.1.3 Suco de Maçã .....	33
2.1.4 Adulteração em Sucos .....	34
2.2. OBJETIVO .....	36
Desenvolver uma metodologia para detecção e quantificação de suco de maçã em suco de uva integral comercial, utilizando FT - ICR MS. ....	36
2.3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	36
2.3.1 Amostras .....	36
2.3.2 Análise de ESI(-)FT-ICR MS .....	36
2.3.3 Calibração Univariada .....	37
2.3.4 Análises Quimiométricas .....	38

2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
2.4.1 Análise de ESI (-) FT-ICR MS .....	39
2.4.2 Calibração Univariada .....	42
2.4.3 Análises Quimiométricas .....	43
2.5 CONCLUSÕES.....	48
3. ESTUDO DO PERFIL FENÓLICO E GLICÍDICO ASSOCIADO À MATURAÇÃO DE BANANAS POR ESI FT-ICR MS E ATIVIDADES QUIMIOPREVENTIVA DE CÂNCER .....	49
3.1 INTRODUÇÃO.....	49
3.1.1 O Cultivo da Banana no Espírito santo .....	50
3.2 OBJETIVO .....	51
3.3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	51
3.3.1 Amostras .....	51
3.3.2 Análises Físico – Químicas .....	52
3.3.3 Preparo dos Extratos Glicídicos .....	52
3.3.4 Preparo dos Extratos Polifenólicos.....	52
3.3.5 ESI(-)FT-ICR MS e ESI(-)FT-ICR MS/MS .....	53
3.3.6 Quantificação de Polifenóis Totais.....	54
3.3.7 Painel de bioensaios <i>in vitro</i> de quimioprevenção de câncer .....	54
3.3.8 Análises estatísticas .....	56
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
3.4.1 Análises Físico – Químicas .....	57
3.4.2 Perfil Glicídico .....	59
3.4.3 Análise de Polifenóis Totais .....	66
3.4.4 Perfil Fenólico por ESI(-)FT-ICR MS .....	67
3.4.5 Atividade Quimiopreventiva de Câncer .....	76
3.5 CONCLUSÕES.....	78
4. PERFIL FENÓLICO DE FRUTOS DA PALMEIRA JUÇARA ( <i>Euterpe edulis</i> MARTIUS).....	79
4.1 INTRODUÇÃO.....	79
4.1.1 Os Frutos da Palmeira Juçara.....	79

4.2 OBJETIVO .....	80
4.3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	80
4.3.1 Amostras .....	80
4.3.2 ESI-FT-ICR MS e ESI-FT-ICR MS / MS .....	81
4.3.3 LCQ Fleet Ion Trap MS / MS .....	81
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	81
4.4.1. Perfil Fenólico .....	81
4.5 CONCLUSÃO .....	88
6. REFERÊNCIAS.....	90

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1 A FRUTICULTURA NO BRASIL

A fruticultura é um importante ramo do agronegócio brasileiro, em 2017, o valor total arrecadado com exportação de frutas foi de aproximadamente 950 milhões de dólares, sendo exportadas cerca de 880 mil toneladas de frutas. Os principais compradores de frutas brasileiras são Países Baixos, Estados Unidos, Reino Unido e Espanha. Apesar disso, a exportação nacional de frutas ainda é pequena. Algumas frutas como mamão, maçã e uva apresentam baixa taxa de exportação, apenas 3% da produção.<sup>1</sup>

Além disso, a fruticultura brasileira é uma das mais diversificadas do mundo e apresenta área cultivada de mais de 2 milhões de hectares, gerando empregos no campo, na agroindústria, na cadeia produtiva e no ramo de fornecedores de insumos e serviços.<sup>2</sup>

Em 2016, o estado que mais produziu, em área colhida e em valor de produção, foi São Paulo, seguido por Bahia, Rio Grande do Sul e Minas Gerais. O Espírito Santo foi o nono mais produtivo (Figuras 1 e 2).<sup>3</sup>

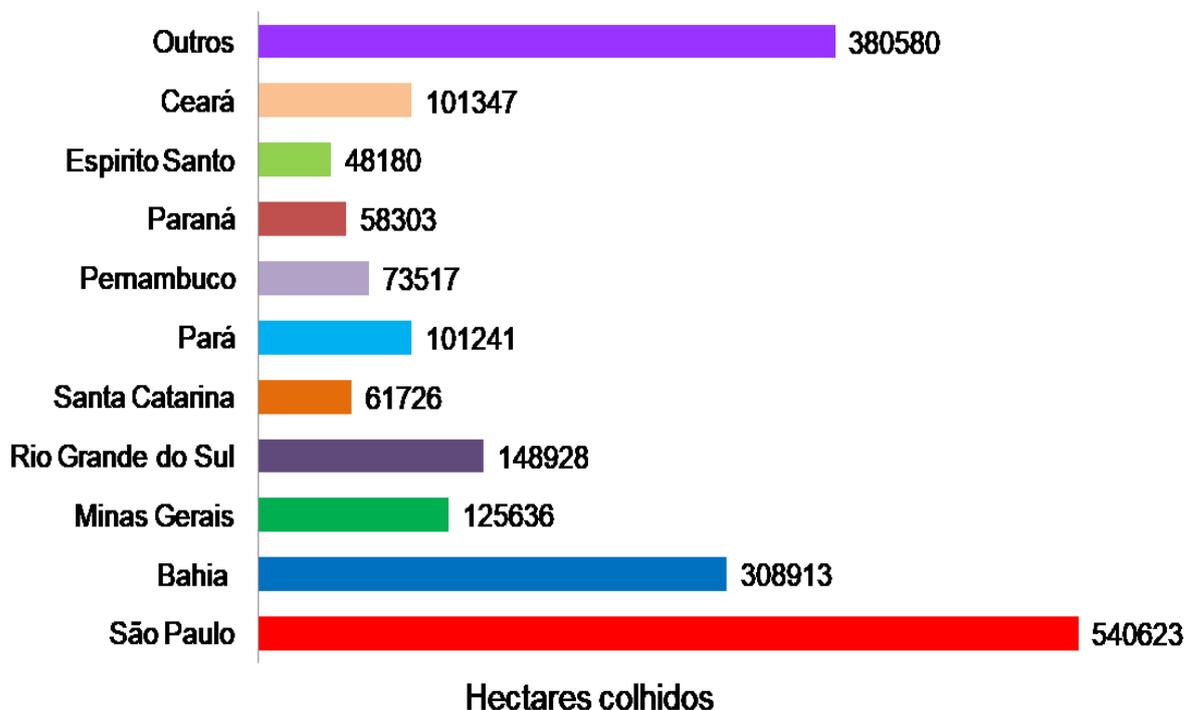
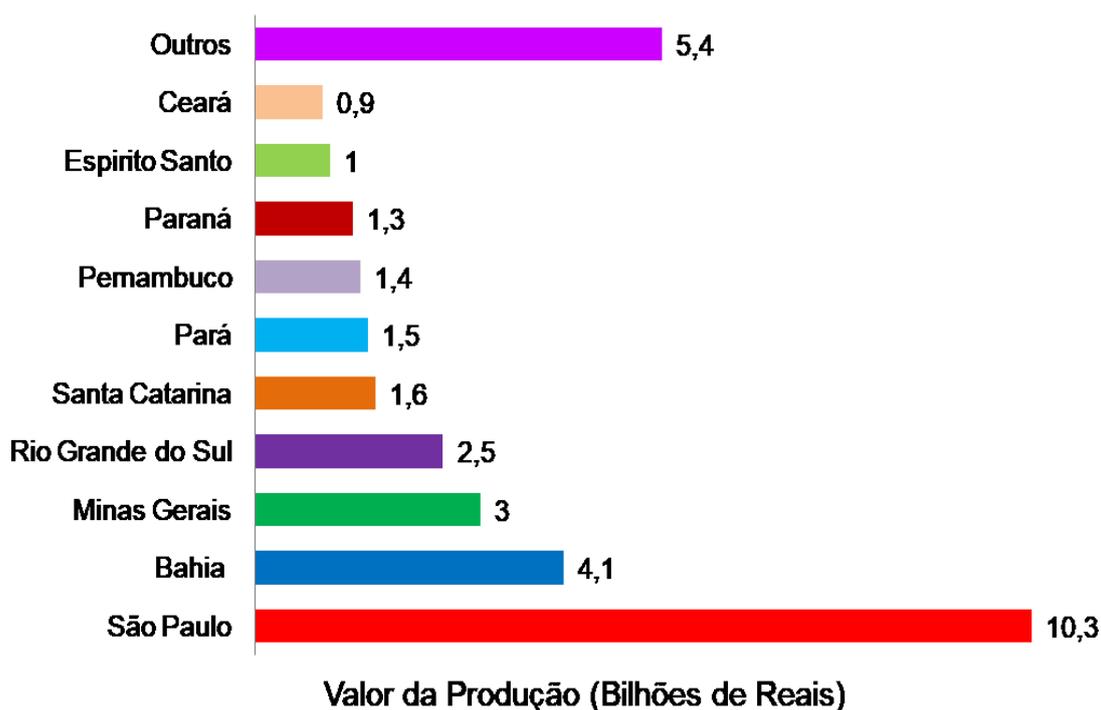


Figura 1. Principais estados produtores de frutas do Brasil – Área colhida no ano de 2016.<sup>3</sup>



**Figura 2.** Principais estados produtores de frutas do Brasil – Valor da Produção em 2016.<sup>3</sup>

Estudos que contribuem para a elucidação do perfil químico de frutas; controle de qualidade de frutas e seus produtos de processamento; e estudos das propriedades benéficas à saúde, como a quimioprevenção de câncer, têm papel importante na valoração da fruticultura.

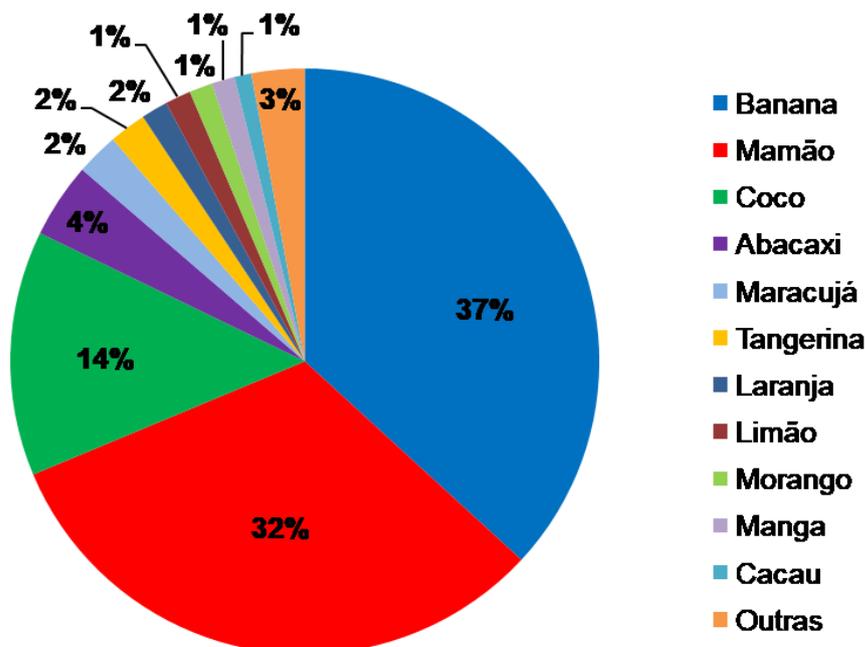
## 1.2 A FRUTICULTURA NO ESPÍRITO SANTO

A fruticultura no Espírito Santo é desenvolvida com apoio do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER) e da Secretaria de Estado da Agricultura, Abastecimento, Aquicultura e Pesca (SEAG). Estes órgãos dão apoio a 14 pólos de fruticultura, onde são cultivados principalmente: abacaxi, acerola, banana, caju, cacau, coco, goiaba, laranja, mamão, manga, maracujá, morango, tangerina e uva.<sup>4</sup>

Em 2018, a fruticultura capixaba apresentou um aumento de cerca de 150 mil toneladas na produção em relação a 2017. As frutas que mais impulsionaram esse aumento foram a banana, cacau, coco e mamão. A produção de banana teve um aumento de 16,8%, a de cacau de 53,2%, a de coco de 24,3% e a de mamão de 20,5%.<sup>5</sup>

A produção total de frutas, em 2018, no Espírito Santo foi de cerca de 1,1

milhão de toneladas. As frutas mais produzidas no estado foram: a banana com uma produção de cerca de 408 mil toneladas (37% da produção), mamão com uma produção de cerca de 353 mil toneladas (32% da produção) e o coco com uma produção de cerca de 150 mil toneladas (14% da produção) (Figura 3).<sup>5</sup>



**Figura 3.** Frutas mais produzidas no Espírito Santo em 2018 (% em massa).

### 1.3 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A espectrometria de massas é uma importante técnica para a química, bioquímica, medicina, entre outras áreas da ciência. A técnica pode ser utilizada para detecção e quantificação de íons, elucidando problemáticas relacionadas ao controle ambiental, química forense, controle de qualidade de alimentos, metabolômica, petroleômica e etc.<sup>6</sup>

O princípio básico da espectrometria de massas é gerar íons a partir de substâncias orgânicas ou inorgânicas através de métodos adequados, separá-los de acordo com suas razões massa / carga ( $m/z$ ) e detectá-los qualitativas e quantitativamente.<sup>6</sup>

Basicamente, um espectrômetro de massas é composto por um sistema de injeção de amostra, que pode ser através de cromatografia líquida, cromatografia gasosa ou bomba com seringa; sistema de ionização, que pode ser ionização por

elétrons (EI), ionização química (CI), ionização por electrospray (ESI), ionização química a pressão atmosférica (APCI), fotoionização a pressão atmosférica (APPI) ou dessorção / ionização por matriz assistida por laser (MALDI); analisadores de massa, que podem ser setor magnético, quadrupolo, aprisionamento de íons (do inglês: *íon trap*), tempo de voo (do inglês: *time-of-flight* – TOF), *orbtrap* e ressonância ciclotrônica de íons (do inglês: *íon cyclotron resonance* – ICR); e detectores (Figura 4).<sup>7,8</sup>

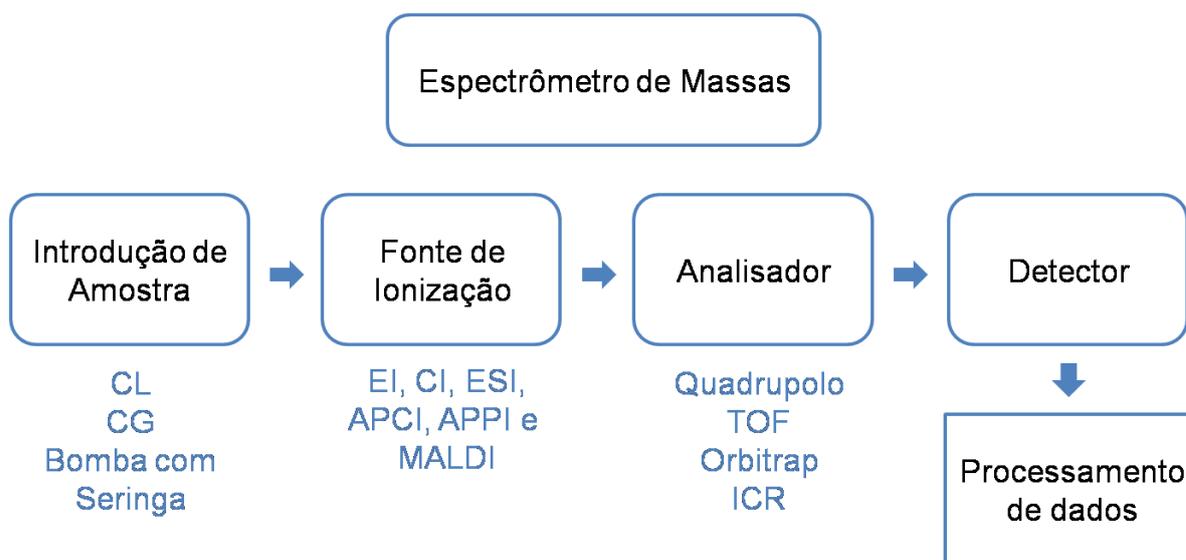


Figura 4. Diagrama de um espectrômetro de massas.<sup>9</sup>

### 1.3.1 Ionização por Electrospray (ESI)

Analitos com polaridade elevada são facilmente ionizados na fonte ESI, enquanto moléculas de caráter apolar apresentam dificuldade de ionização. Sendo assim, para melhor ionização de alguns analitos, antes da injeção na fonte de ESI, é necessária a adição de base para desprotonar ou de ácido para protonar as moléculas. Em seguida, a amostra é injetada por um capilar com fluxo constante. Entre este capilar e um contra eletrodo é aplicada uma diferença de potencial elétrico, que gera um campo elétrico sobre a amostra. Este campo elétrico induz a acumulação de cargas na superfície do líquido, formando gotas carregadas. Além disso, é injetado um gás aquecido que evapora o solvente, fazendo aumentar a repulsão entre os íons, que são ejetados para dentro do analisador (Figura 5).<sup>8</sup>

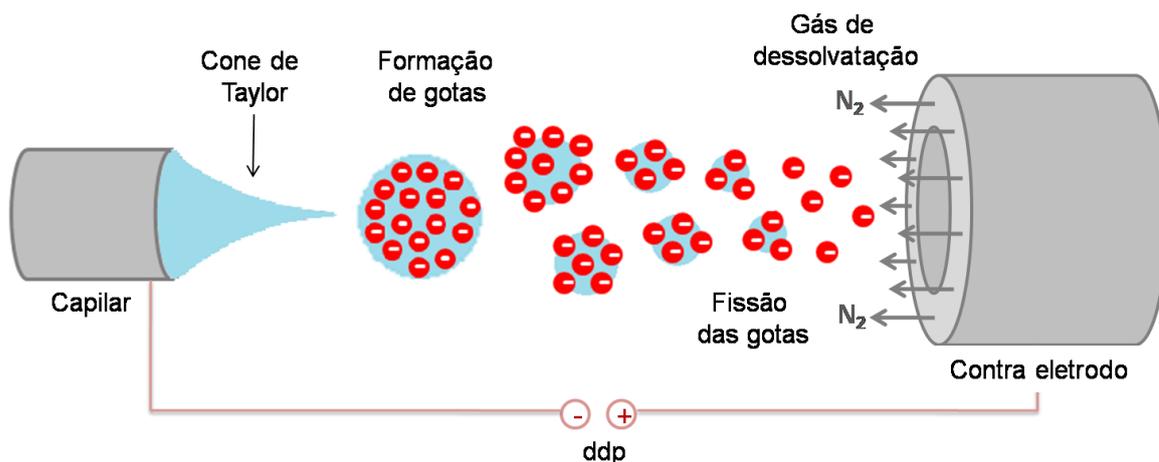


Figura 5. Esquema de uma fonte de ionização por electrospray (ESI).

### 1.3.2 Espectrometria de Massas de Ressonância Ciclotrônica de Íons com Transformada de Fourier (FT-ICR MS)

A ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier (FT – ICR) foi desenvolvida por Comisarow e Marshall em 1974. Alguns espectrômetros de massas combinam diversos tipos de analisadores, como por exemplo célula de ICR combinada com quadrupolos, hexapolos e octapolos, como é o caso do modelo Solarix, da Bruker Daltonics, Bremen, Germany (Figura 6).<sup>8</sup>

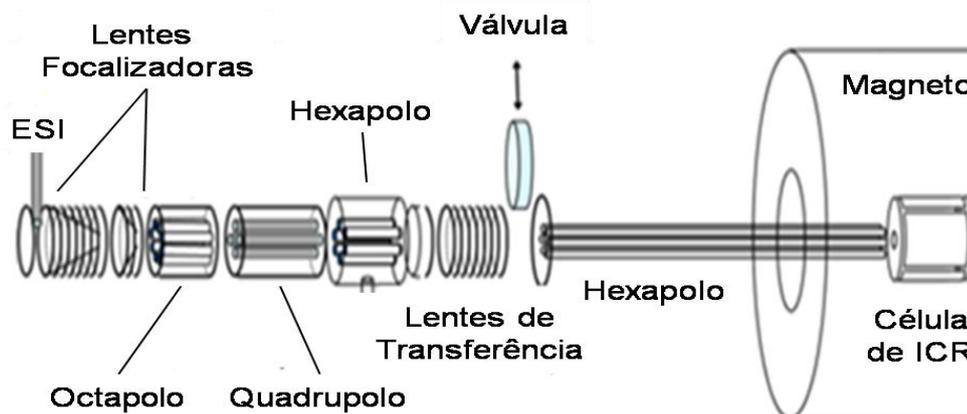


Figura 6. Esquema de um espectrômetro de massas FT-ICR (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

A utilização de células ICR na espectrometria de massas possibilitou a construção de equipamentos com altíssima resolução e exatidão. No interior da célula de ICR há um campo magnético uniforme  $\vec{B}$ . Quando uma partícula de massa  $m$  e carga  $q$  entra perpendicularmente a esse campo magnético ela sofre ação da Força  $\vec{F}$  (Equação 1). Essa força faz com que a partícula assuma um movimento

ciclotrônico com aceleração centrípeta  $\vec{a}$ , raio  $r$ , velocidade linear  $\vec{v}$ , velocidade angular  $\omega$  e frequência ciclotrônica  $f$  dentro da célula de ICR. <sup>6</sup>

$$F = qvB \quad (1)$$

Sabe-se que:

$$F = ma \quad (2)$$

$$a = \frac{v^2}{r} \quad (3)$$

$$v = \omega r \quad (4)$$

$$f = \frac{\omega}{2\pi} \quad (5)$$

Substituindo a Equação 3 na equação 2, tem-se:

$$F = m \frac{v^2}{r} \quad (6)$$

Igualando as Equações 1 e 6, tem-se:

$$r = \frac{mv}{qB} \quad (7)$$

Substituindo as Equações 4 e 5 na equação 7, tem-se:

$$f = \frac{qB}{2\pi m} \quad (8)$$

A partir da Equação 7, percebe-se que o raio da trajetória da partícula é diretamente proporcional à massa e a velocidade da partícula e inversamente proporcional à carga e ao campo magnético. A partir da Equação 8, percebe-se que a frequência ciclotrônica dos íons na célula de ICR é diretamente proporcional à carga da partícula e ao campo magnético e inversamente proporcional à massa da partícula. <sup>6</sup>

Desta forma, íons de mesmo  $m/z$ , terão a mesma frequência ciclotrônica, originando dentro da célula de ICR diversos grupos de íons de determinadas frequências ciclotrônicas. Para aumentar o raio de trajetória dos íons, aproximando-os das placas de detecção, são aplicados pulsos de radio frequência. A passagem destes pacotes de íons induz correntes elétricas em frequências iguais às frequências ciclotrônicas de cada pacote de íons na placa detectora, gerando assim um sinal no domínio do tempo, que através da Transformada de Fourier é convertida para o domínio da frequência e depois convertida em um espectro de massas (Equação 8) (Figura 7). <sup>8</sup>

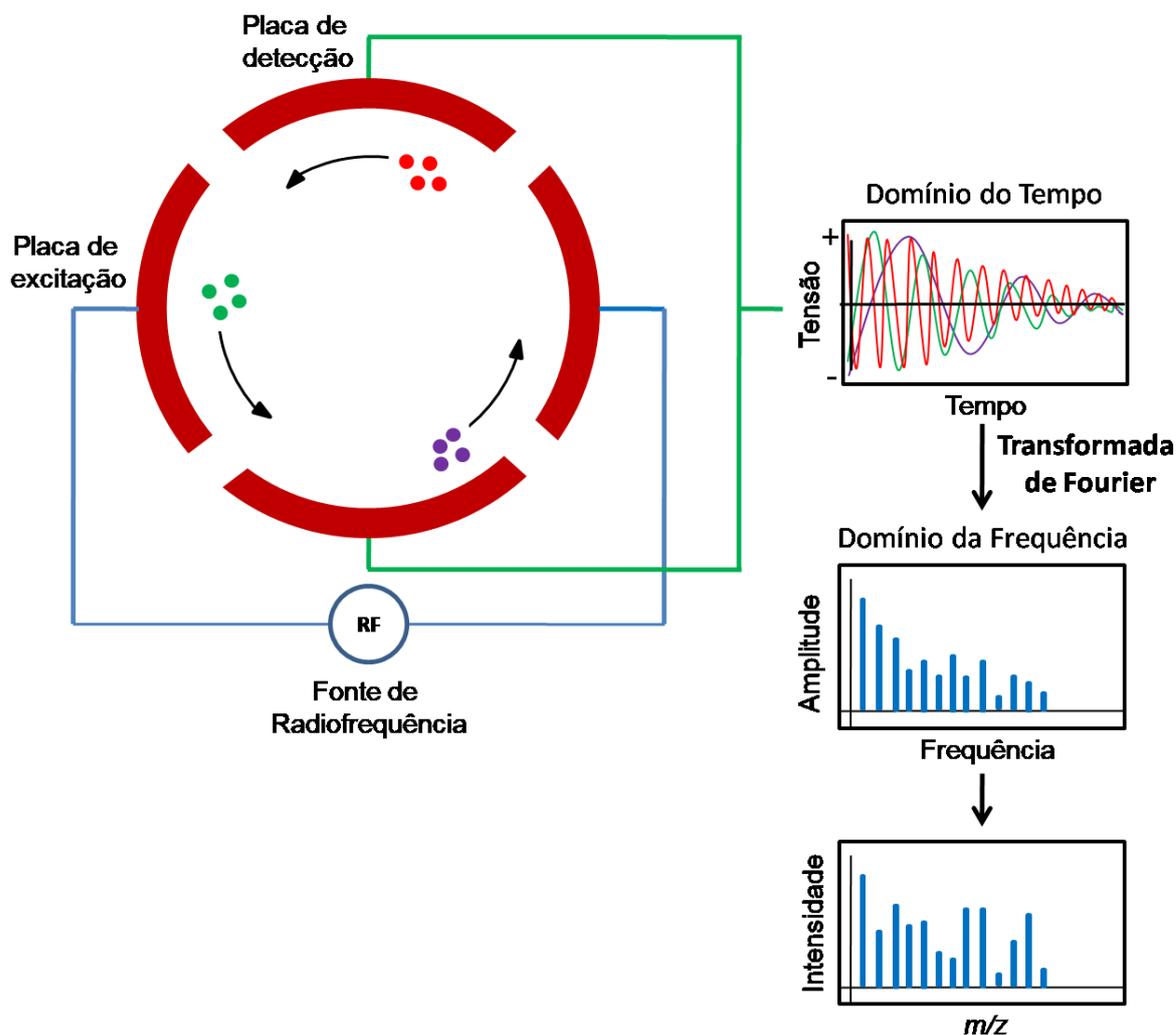


Figura 7. Esquema de uma célula de ICR.

#### 1.4 UTILIZAÇÃO DE FT – ICR MS PARA AVALIAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DE FRUTOS E SEUS PRODUTOS DE PROCESSAMENTO

A espectrometria de massas é uma importante ferramenta utilizada na análise de frutas e seus produtos de processamento. A altíssima resolução de equipamentos com o FT – ICR MS é uma poderosa ferramenta para detecção de moléculas presentes em frutos, com uma altíssima resolução e exatidão.<sup>10</sup>

O perfil glicídico e de ácidos orgânicos de manga ubá (*Mangifera indica*), em quatro estádios de maturação, foi avaliado utilizando FT – ICR MS. Foi possível observar que com o decorrer da maturação os teores de açúcares, como glicose e sacarose foram aumentando e que os teores de ácidos orgânicos foram diminuindo. Além disso, foi possível identificar oito polifenóis presente nestes frutos, sendo eles:

galáto de metila, ácido elágico, glicogalin, digalato de metila, mangiferina, digaloil glicose, trigaloil glicose e tetragaloil glicose.<sup>10</sup>

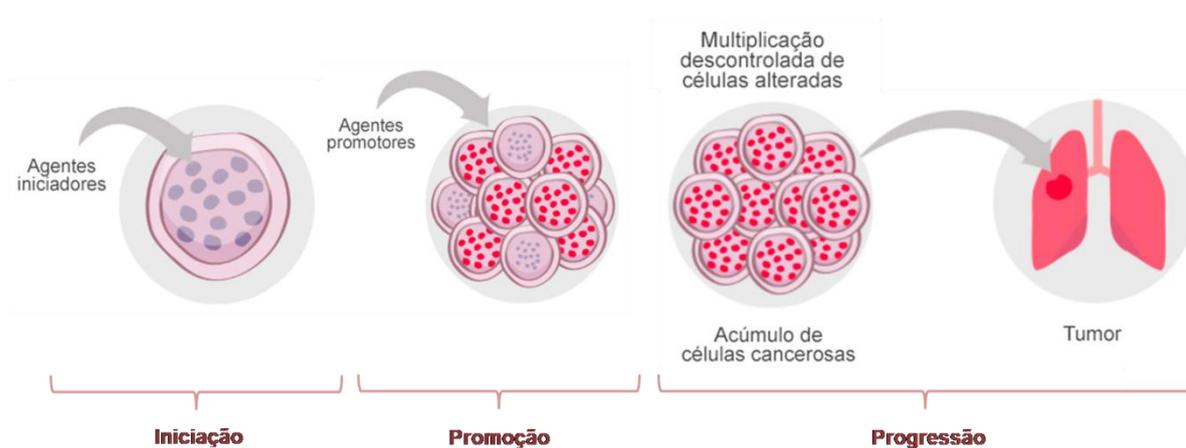
O envelhecimento natural de água de coco, à 23 °C durante quinze dias, foi avaliado utilizando FT – ICR MS. Foi possível observar que após três dias os teores de açúcares começaram a diminuir e que marcadores como ácido cítrico, ácido galacturônico, ácido glucônico e ácido sacarico foram detectados e aumentaram seus teores.<sup>11</sup>

A adulteração de café arábica com café conilon foi identificada e quantificada utilizando análise multivariada aplicada aos dados gerados por um FT – ICR MS. Dentre os compostos identificados temos: ácido ferulico hexosídeo, ácido cafeico chiquimico e ácido feroloilcafeicoquinico.<sup>12</sup>

### **1.5 QUIMIOPREVENÇÃO DE CÂNCER**

O câncer é um conjunto de mais de 100 tipos de enfermidades que tem como principal característica a multiplicação desordenada das células. Essas células se ploriferam em tecidos e órgãos dando origem a diversos tipos de cânceres.<sup>13</sup>

O processo de formação de câncer chama-se carcinogênese, envolvendo três fases: iniciação, promoção e progressão. Na fase de iniciação os agentes cancerígenos provocam modificações no DNA da célula. Na segunda fase, promoção, as células geneticamente alteradas sofrem os efeitos de agentes promotores transformando-as em células pré-tumorais. Para que ocorra a transformação de células iniciadas em células pré-tumorais é necessário que os agentes cancerígenos tenham contato longo e continuado com a célula. Desta forma, muitas vezes a suspensão do contato interrompe a carcinogênese. A fase final é a fase de progressão, em que ocorre a alteração fenotípica e a multiplicação desordenada e irreversível de células, progredindo para células tumorais (Figura 8).<sup>13</sup>



**Figura 8.** Esquema do processo de carcinogênese. Editado.<sup>13</sup>

A carcinogênese, por apresentar diversas fases, muitas vezes é lento, podendo levar anos, sendo assim possível de interrupção por meio da quimioprevenção. A quimioprevenção do câncer é a utilização de substâncias naturais ou sintéticas visando inibir, reverter ou eliminar a carcinogênese.<sup>14</sup>

### 1.5.1 Ensaio de Indução da Enzima NAD(P)H: Quinona Redutase (QR)

Algumas substâncias possuem a capacidade de induzir enzimas detoxificadoras presentes no organismo. Essas enzimas, como por exemplo, a quinona redutase, catalisam as reações de redução de radicais livres, causando a detoxificação. A detoxificação é um importante processo que impede a formação da carcinogênese na fase de iniciação. Ou seja, evita que agentes iniciadores modifiquem o DNA da célula, interrompendo o início do processo.<sup>15</sup>

A indução da quinona redutase pode ser avaliada através de ensaios *in vitro* utilizando células hepatoma murino Hepa1c1c7 que contém QR indutível. Neste teste, a quinona menadiona é reduzida a menadiol. O menadiol, de forma espontânea sofre oxidação e retorna a menadiona, causando redução do brometo de 3-(4,5- dimetiltazo-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) para azul de formazana, que é quantificado por espectrofotometria no comprimento de onda de 595 nm.<sup>16-18</sup>

Diversos estudos evidenciaram que várias classes de moléculas presentes em produtos naturais, como por exemplo, terpenóides, antocianinas, lignanas e flavonóides apresentam potencial indutor de quinona redutase.<sup>19-22</sup> Além disso, alguns extratos de frutas como a banana apresentaram atividade de indução da QR.<sup>23</sup>

### 1.5.2 Ensaio de Inibição de Fator de Transcrição Nuclear $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)

O NF- $\kappa$ B, fator nuclear  $\kappa$ B, é um conjunto de proteínas (NF- $\kappa$ B1 (p50/p105), NF- $\kappa$ B2 (p52/p100), c-Rel, RelA (p65/NF- $\kappa$ B3) e RelB) que são importantes na transcrição durante a síntese proteica. Este complexo proteico é naturalmente inibido por inibidores- $\kappa$ B (I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , Bcl3, p100 e p105). Na célula, o NF- $\kappa$ B é relacionado à transcrição de diversos genes pró-inflamatórios e em situações normais é inibida por inibidores - $\kappa$ B. Entretanto, em inflamações crônicas, a expressão de NF- $\kappa$ B é aumentada e a de inibidores I $\kappa$ B é diminuída, o que pode propiciar a formação de carcinogênese. Desta forma, como NF- $\kappa$ B participa diretamente das fases de promoção e progressão do câncer, a busca por substâncias inibidoras de NF- $\kappa$ B pode resultar em descoberta de substâncias quimiopreventivas.<sup>16, 24-26</sup>

O potencial de inibição de NF- $\kappa$ B de possíveis agentes quimiopreventivos pode ser avaliada através de ensaios *in vitro* utilizando células HepG2 (hepatoma humano) co-transfectada com o gene NF- $\kappa$ B-luciferase. Neste teste a inibição é verificada a partir da inibição da fluorescência, gerada pela enzima luciferase, através de espectrofotômetro.<sup>16, 24-26</sup>

Diversos estudos têm mostrado que produtos naturais são ricos em compostos inibidores de NF- $\kappa$ B, como por exemplos flavonóides, estilbenos e ácidos fenólicos.<sup>27-29</sup>

### 1.5.3 Ensaio de Inibição da Aromatase

No Brasil o câncer de mama é o tipo de câncer mais desenvolvido em mulheres. Em 2018, surgiram 57900 casos de câncer de mama no Brasil.<sup>13</sup>

A aromatase é um catalisador que participa da transformação de androgênios em estrogênios. Estudos mostram que a presença de estrogênios nas células da mama está ligada a maior incidência de formação de câncer de mama. Desta forma, a inibição da aromatase, que atua na fase de progressão do processo da carcinogênese, pode ser uma forma viável de prevenção deste tipo de câncer de mama.<sup>30, 31</sup>

Estudos têm evidenciado que algumas classes de metabólitos secundários apresentam atividade de inibição de aromatase. Algumas dessas classes são estilbenos e flavonóides.<sup>32, 33</sup>

#### 1.5.4 Ensaio de Inibição da Óxido Nítrico Sintase Indutível (iNOS)

O óxido nítrico (NO) é um radical livre formado a partir da arginina que é transformado em citrulina, pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS). Existem três tipos de enzimas NOS, a nNOS (óxido nítrico sintase neuronal), eNOS (óxido nítrico sintase endotelial) e iNOS (óxido nítrico sintase indutível). As enzimas nNOS e eNOS produzem pequenas quantidades de NO e por pouco tempo, já a iNOS produz quantidades mais elevadas de NO e durante maior intervalo de tempo, estimulando inflamações crônicas. Desta forma, compostos químicos que possuem capacidade de inibição da iNOS são considerados bons agentes quimiopreventivos.<sup>34</sup>

Frutas como mirtilo apresentam substâncias como pterostilbeno capaz de inibir enzimas como iNOS em processos de inflamação cutânea.<sup>35</sup> Outros metabólitos como o resveratrol induziu a atividade da iNOS em inflamações no fígado.<sup>36</sup>

#### 1.6 ANÁLISES QUIMIOMÉTRICAS

O desenvolvimento tecnológico acarretou na produção de equipamentos cada vez mais modernos. Estes equipamentos têm capacidade de gerar uma enorme gama de dados. Entretanto, estes enormes conjuntos de dados, geralmente, não trazem respostas químicas diretas. Muitas vezes sua interpretação direta é complicada. Desta forma, são necessários que estes dados sejam matematicamente trabalhados, para que uma resposta química seja criada.<sup>37</sup> A quimiometria é uma disciplina da química que utiliza matemática e estatística para planejar e fornecer o maior número de informações químicas de forma otimizada.<sup>38</sup>

A análise de componentes principais (PCA) é um método utilizado para correlacionar variáveis e a partir deste conjunto de variáveis correlacionadas gerar uma componente principal. Este novo conjunto de variáveis (componente principal) concentrará o maior número de informações possíveis. Desta forma, as informações são concentradas em poucas variáveis, diminuindo assim, a dimensão do conjunto de dados.<sup>39</sup>

A regressão por quadrados mínimos parciais (PLS) utiliza modelagem de componentes principais para gerar variáveis latentes, correlacionando os dados de uma matriz com a propriedade de interesse. Desta forma, há uma redução de dimensionalidade. Este tipo de modelo torna possível relacionar uma variável com

diversas outras e possibilita a predição de dados de interesse.<sup>40</sup>

Na regressão linear múltipla (MLR) uma relação matemática gera valores para a variável resposta, a partir de variáveis independentes. Ao contrário da regressão linear simples, que apresenta variável dependendo apenas de um fator, a regressão linear múltipla apresenta variáveis dependentes de mais de um fator.<sup>41</sup>

## 2. CONTROLE DE QUALIDADE DE SUCO DE UVA ADULTERADO COM SUCO DE MAÇÃ POR ESI (-) FT - ICR MS

### 2.1 INTRODUÇÃO

O suco integral de uva apresenta ótimas qualidades nutracêuticas, pois apresenta grande variedade de substâncias benéficas à saúde, como flavonóides e taninos.<sup>42</sup> A legislação brasileira determina que o suco de uva seja uma bebida não fermentada e não diluída, obtida da parte comestível da uva (*Vitis spp.*), através de um processo tecnológico adequado.<sup>43</sup> Sendo assim, não é permitido a adição de qualquer substância ao suco, seja ela, água, açúcares ou sucos de outras frutas.

Por se tratar de um produto de alto valor comercial, o suco de uva é susceptível a várias formas de adulteração, tais como: adição de água, açúcares ou sucos de frutas de menor valor comercial, como por exemplo, a adição de suco de maçã em suco de uva integral.<sup>44-46</sup>

A maçã é uma fruta de sabor agradável e rica em pectina, um gelificante e espessante natural que impede a separação de fases no suco.<sup>47, 48</sup> Desta forma, a adição de suco de maçã é de difícil detecção e pode mascarar a adição de água ou outros aditivos ao suco de uva.

Metodologias de controle de adulteração de sucos de uva através da adição de suco de maçã são raros. Atualmente um dos métodos mais utilizados para detecção de fraudes em sucos é baseado na espectrometria de massas de razão isotópica.<sup>45, 49, 50</sup> Entretanto, esse método é mais utilizado para detecção de adulterantes como açúcares de milho ou cana (via C<sub>4</sub> de fixação de CO<sub>2</sub>), não sendo muito eficaz na diferenciação de açúcares presentes nos sucos naturais de uva e maçã que apresentam porcentagem de carbono-13 próximas.<sup>45</sup> Neste caso, eles apresentam um similar mecanismo de fixação de CO<sub>2</sub> (via C<sub>3</sub>).<sup>45, 49, 50</sup> A detecção de duas substâncias presentes no suco de maçã (phlorizin e sorbitol) foi utilizado para identificação e quantificação de suco de maçã em suco de uva integral,<sup>44</sup> entretanto, devido a complexidade da amostra, que pode sofrer diversas influências como estágio de maturação, tipo do cultivar e variações climáticas, um número maior de marcadores é necessário para que a adulteração seja detectada e quantificada de forma mais confiável. Portanto, o desenvolvimento de metodologias analíticas para detectar e quantificar adulterações em suco de uva é um desafio.

Técnicas de espectrometria de massa (MS), tais como a espectrometria de

massa de ressonância de ciclôtrica de íons com transformada de Fourier (FT-ICR MS), permitem a identificação de constituintes químicos em misturas orgânicas complexas.<sup>11</sup>

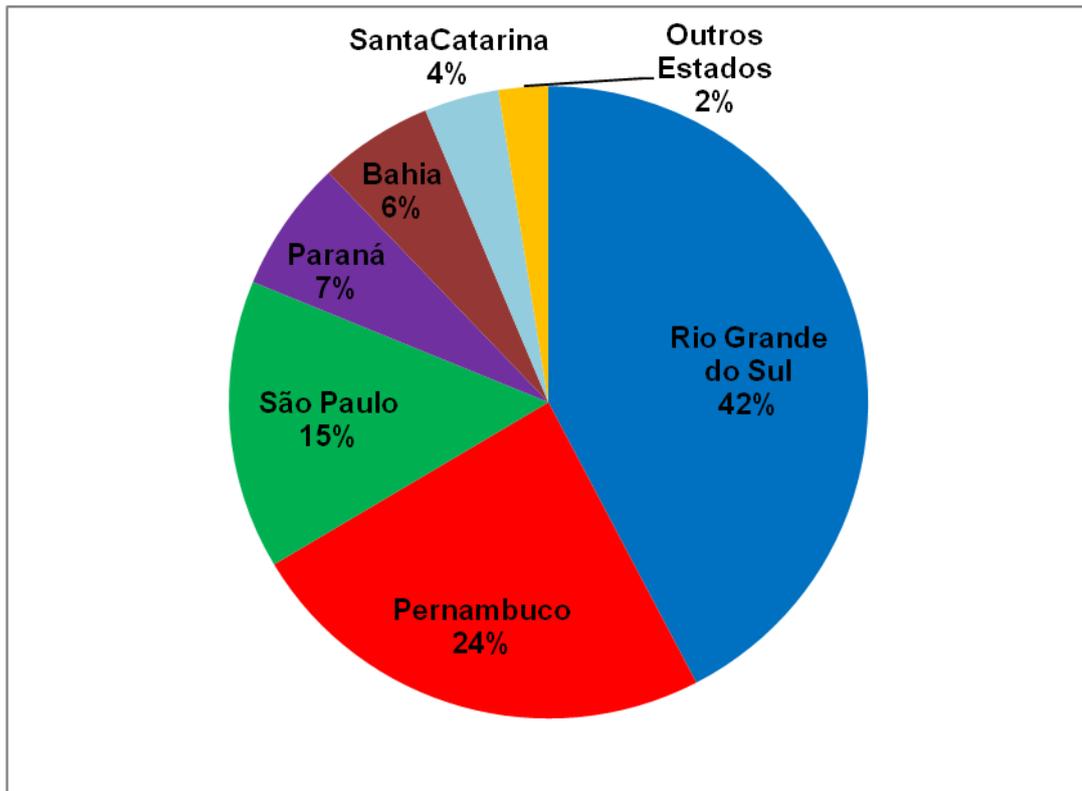
### 2.1.1 A Viticultura no Brasil e no Mundo

A uva é uma fruta não climatérica, produzida em cachos de 15 a 200 uvas, cujo cultivo data de 6000 a 8000 anos no Oriente Médio.<sup>51, 52</sup> Suas propriedades nutracêuticas e aroma agradável fazem com que essa fruta seja largamente consumida em todo o mundo de diversas formas, como por exemplo *in natura*, suco ou vinho.

A uva apesar de possuir elevado teor de carboidratos, apresenta baixo índice glicêmico. São também uma importante fonte de manganês, vitamina B6, vitamina B1, potássio e vitamina C.<sup>53</sup> Além disso, é uma fruta rica em compostos fenólicos, como catequina, ácido gálico, procianidina, quercetina<sup>54</sup> e resveratrol.<sup>55</sup>

A uva é uma das frutas mais produzidas em todo o mundo. A produção mundial anual é estimada em cerca de 75 milhões de toneladas. Em 2014, a área cultivada foi de 7,5 milhões de hectares, com uma produção de 10 toneladas/hectares, das quais 41% foram produzidas na Europa, 29% na Ásia e 21% nas Américas, em 100 países diferentes. Do total desta produção, cerca de 50% foi utilizada para produção de vinho (35,9 milhões de toneladas), cerca de um terço foi consumido como fruta *in natura* (26,8 milhões de toneladas) e o restante foi consumido como suco (3,7 milhões de toneladas) ou desidratada (6,2 milhões de toneladas).<sup>53</sup>

Em 2016, a área plantada com videiras no Brasil foi de quase 78 mil hectares, sendo 63,4% da área plantada situada no estado do Rio Grande do Sul. A produção total de uva no Brasil, chegou a cerca de 980 mil toneladas. O Rio Grande do Sul é o maior produtor nacional, seguido por Pernambuco e São Paulo (Figura 9).<sup>58</sup>



**Figura 9.** Produção de uva (em %) por Estados em 2016. <sup>58</sup>

Devido às altas temperaturas do clima tropical no Brasil, a uva apresenta ciclo de maturação precoce ou intermediário. Desta forma, o controle da maturação e a escolha do período de colheita são fatores importantes, principalmente quando estas frutas são destinadas à produção de sucos e vinhos.<sup>56</sup> Na primeira fase de desenvolvimento da uva ocorre uma rápida divisão celular e aumento do volume celular. Em seguida, ocorre a fase de amadurecimento, em que ocorrem importantes mudanças bioquímicas. Nesta fase, as uvas aumentam seu volume, amolecem, diminuem o teor de ácidos, aumentam o teor de açúcares e intensificam a coloração.<sup>57</sup>

As uvas destinadas a elaboração de sucos devem apresentar elevado teor de açúcar e acidez equilibrada. Além disso, devem apresentar elevado teor de pigmentos, uma vez que sucos de uva com coloração clara não tem uma boa aceitabilidade por parte dos consumidores.<sup>56</sup>

A uva, por ser de fácil perecibilidade é uma das frutas de maior utilização de tecnologia em sua produção (refrigeração, embalagem e armazenamento a frio). Por esse motivo, é a fruticultura com maior valor comercial de produção, seguida pelo cultivo de maçã e melancia.<sup>53</sup>

### 2.1.2 Suco de Uva

O suco de uva é uma bebida não fermentada e não diluída, obtida da parte comestível da uva, através de um processo tecnológico padronizado.<sup>43</sup> Ou seja, não é permitido adição de água, sucos de outras frutas ou açúcar em sua composição. Além disso, deve apresentar teor mínimo de sólidos solúveis de 14° Brix e acidez total, em termos de ácido tartárico, mínima de 0,41g/100g de suco.<sup>43</sup>

As principais cultivares de uva utilizados para produção de suco no Brasil são: Concord, Isabel e Bordô. Estas cultivares são muito utilizadas devido aos seus elevados teores de açúcares e elevado teor de substâncias corantes, como polifenóis.<sup>58</sup>

Os principais constituintes do suco de uva são: água, carboidratos (principalmente sacarose, frutose e pectinas), ácidos orgânicos, minerais, substâncias nitrogenadas, compostos fenólicos e vitaminas. A água presente no suco é originária da própria fruta, uma vez que não é permitida a adição. Os principais açúcares encontrados são a glicose e a frutose, que são de fácil absorção pelo organismo humano. Os ácidos são responsáveis pelo sabor levemente azedo dos sucos e os principais ácidos presentes são o ácido tartárico, málico e cítrico.<sup>58</sup>

Entre os minerais presentes estão o potássio, o cálcio, o magnésio, o manganês, o sódio, o ferro, os fosfatos, os sulfatos e os cloretos. Os principais compostos nitrogenados presentes são os aminoácidos, proteínas e polipeptídeos. Os compostos fenólicos são responsáveis pelo sabor adstringente do suco, além de funcionarem como antioxidantes. A pectina é um geleificante natural que aumenta a viscosidade do suco de uva.<sup>58</sup>

### 2.1.3 Suco de Maçã

A macieira (*Malus spp.*) é originária da Europa e da Ásia e seu cultivo no Brasil iniciou-se em 1960 em Santa Catarina.<sup>59</sup> A principal cultivar de maçã produzida no Brasil é a Gala.<sup>60</sup> Esta fruta teve um aumento de produção no Brasil nos últimos anos e seu consumo é realizado *in natura*, na forma de sucos, geléias, cidras e produtos desidratados.<sup>62</sup>

A maçã é uma fruta de fácil decomposição, principalmente devido a danos mecânicos causados no tecido da fruta, induzindo reações enzimáticas indesejáveis.<sup>62</sup> Além disso, formato ruim, tamanho pequeno, coloração desigual, manchas de podridão e problemas fisiológicos são outras características que

diminuem o valor comercial do fruto. Estes frutos representam cerca de 30 % da produção.<sup>63</sup>

Uma vez que a produção de maçã tem crescido no Brasil, uma alternativa econômica para essas maçãs de descarte é a utilização para produção de suco.<sup>64</sup>

#### **2.1.4 Adulteração em Sucos**

A adulteração de produtos alimentares pode ocorrer de diversas formas. As formas mais comuns de adulteração é a substituição de ingredientes por ingredientes de menor valor econômico.<sup>65</sup> Em sucos, as formas mais comuns de adulterações são: adição de água, adição de suco de frutas de menor valor comercial, adição de açúcares e adição de corantes.<sup>67</sup>

No Brasil o controle de qualidade de sucos é realizado utilizando como referência os Padrões de Identidade e Qualidade (PIQs), que indicam suas características físico-químicas e sensoriais.<sup>43</sup> Entretanto, análises físico-químicas tradicionais, não são capazes de identificar adição de suco de frutas de menor valor comercial, açúcares e corantes ao suco. Um dos métodos físico-químicos utilizados para avaliar o teor de sólidos solúveis totais (SST) (incluindo açúcares) é a refratometria. Este método é baseado no índice de refração de líquidos translúcidos, sendo que quanto maior o teor de SST maior será o índice de refração. Entretanto, este procedimento não é capaz de desvendar qual a substância responsável pelo aumento do teor de SST, como por exemplo, açúcares ou sucos de outras frutas.<sup>68</sup>

Uma metodologia muito utilizada para detecção de adulteração por adição de açúcares ou sucos de menor valor comercial é a utilização de espectrometria de massas de razão isotópica. A utilização desta técnica possibilitou a detecção de adulteração de néctar de uva com açúcares de cana de açúcar. Este tipo de adulteração ocorre quando o néctar possui quantidade de suco de uva inferior ao mínimo exigido pela legislação e para mascarar a queda do teor de SST é adicionado açúcar oriundo de cana de açúcar.<sup>69</sup>

Também foi elaborada uma metodologia de análise isotópica em polpas, sucos tropicais e néctares de manga e de goiaba, quantificando o carbono proveniente de plantas dos ciclos fotossintéticos C3 (manga e goiaba) e C4 (açúcar de cana) para detectar possíveis adições de açúcares de cana a esses produtos.<sup>70</sup>

A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa com razão isotópica proporcionou, através da análise de carbono – 13 presentes em

seus açúcares, a detecção de adição de açúcar de cana em amostras de suco de limão comercial.<sup>71</sup> Adulteração por adição de açúcar de cana em suco de laranja também foi detectada utilizando espectrometria de massas de razão isotópica do carbono – 13.<sup>68</sup>

Na maioria das plantas frutíferas, por exemplo, maçã, laranja, pêsego, pêra e uva, o dióxido de carbono é fixado através do ciclo de Calvin. Este processo de fixação do dióxido de carbono designado por "via C3". Nestas plantas o carbono existente tem uma razão  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  mais baixa do que o dióxido de carbono atmosférico. Já na cana de açúcar e no milho, a fixação de carbono ocorre via o ciclo de Hatch-Slack (via C4). Nestas plantas o carbono existente possui uma razão  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  próximo à do dióxido de carbono atmosférico.<sup>67</sup>

É possível observar na tabela 1 que a razão  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  do suco de maçã e suco de uva, por se tratarem de plantas C3, são próximas. Desta forma, a utilização da espectrometria de massas de razão isotópica não é uma boa ferramenta para detectar e quantificar adição de suco de maçã em suco de uva.

**Tabela 1.** Taxas de isótopos estáveis de amostras selecionadas.<sup>67, 72</sup>

<b>Amostra</b>	<b><math>\delta^{13}\text{C}</math> (‰)</b>
Dióxido de carbono atmosférico	-7
Produtos resultantes de plantas C3	-22 a -33
Produtos resultantes de plantas C4	-9 a -15
Suco de maçã	- 25
Suco de uva	- 24

O processamento industrial de frutas gera grandes quantidades de subprodutos, como a casca. Algumas indústrias têm produzido suco de baixa qualidade utilizando esses subprodutos. Uma metodologia utilizando cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massas foi utilizada para detectar metabólitos presentes no suco da polpa do abacaxi e na casca do abacaxi e desta forma, foi possível detectar e quantificar a presença de suco de casca de abacaxi em suco de abacaxi.<sup>74</sup>

A clorizina e o sorbitol são compostos presentes em grande quantidades no

suco de maçã e em pouca quantidade no suco de uva. Um método utilizando cromatografia líquida de alto desempenho foi desenvolvido para detectar e quantificar esses compostos em suco de uva comercial adulterado com sucos de maçã.<sup>44</sup>

O perfil espectroscópico de ressonância magnética de hidrogênio foi investigado para detecção de suco de laranja adulterado com suco de laranja clementina. A utilização de um modelo de PLS possibilitou a identificação e quantificação da fraude.<sup>75</sup>

## **2.2. OBJETIVO**

Desenvolver uma metodologia para detecção e quantificação de suco de maçã em suco de uva integral comercial, utilizando FT - ICR MS.

## **2.3 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.3.1 Amostras**

Para o preparo do suco de uva em laboratório, primeiramente as frutas foram lavadas com água da rede de abastecimento doméstico e depois com água deionizada. Posteriormente, as uvas foram esmagadas e acondicionadas em uma erlemeyer. As uvas foram aquecidas em banho-maria a uma temperatura de 70 °C por 20 minutos e posteriormente a 60°C por 1 hora. Para separar o suco do caroço e casca, o material foi levemente prensado em peneira doméstica.<sup>59</sup>

Foram preparadas misturas de sucos de uva integral e suco de maçã integral, em triplicata, nas concentrações: 0, 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 100 % m/m de suco de maçã. Além disso, onze marcas de sucos de uva integral, compradas em supermercado, foram analisadas, em triplicatas, sendo elas: Casa da Uva ®, Serra da Uva ®, Aurora ®, Sunny Day ®, Salton ®, Natural One ®, Campo Largo ®, Garibaldi ®, Uva Só ®, Mito ® e Campo Largo Uva Leve ®. Os sucos foram nomeados aleatoriamente como suco 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11.

### **2.3.2 Análise de ESI(-)FT-ICR MS**

Para análise no ESI(-)FT-ICR MS (modelo 9.4 T Solarix, BrukerDaltonics, Bremen, Alemanha), 2,5 µL de suco e 23µg de glicose deuterada D-Glicose-1,2,3,4,5,6,6-d7 (SIGMA) foram adicionados a 975 µL de metanol. Os extratos foram injetados, em triplicata, diretamente na fonte de ESI(-) utilizando uma seringa com

fluxo de  $2,0 \mu\text{Lh}^{-1}$ . Os espectros foram obtidos em uma faixa de massa  $m/z$  150-1500. As condições da fonte de ESI foram: pressão de gás nebulizador de 2 bar, voltagem capilar de 3,8 kV, e a temperatura de transferência capilar de  $200^\circ \text{C}$ . O tempo de acumulação dos íons foi de 0,01 s. Cada espectro foi adquirido pela acumulação de 16 varreduras (*scans*). Os espectros foram obtidos com alta resolução, fornecendo fórmulas moleculares inequívocas para os íons moleculares de carga única (espécies  $\text{C}_c\text{H}_h\text{N}_n\text{O}_o\text{S}_s$ ). Os espectros de massa foram adquiridos e processados utilizando o *software* de *Compass Data Analysis* (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). As fórmulas estruturais dos compostos foram obtidas através do *software* chemspider database ([www.chemspider.com](http://www.chemspider.com)).

Para os experimentos de MS/MS, a janela do quadrupolo foi fechada em um intervalo de 1 Da. A energia de colisão foi de 7 V, sendo argônio o gás de colisão utilizado. A fim de aumentar a quantidade de íons na cela ICR (analisador do FTMS), o tempo de acumulação de íons no hexapolo (ion accumulation time) foi de 0,02 s. Cada espectro foi adquirido a partir da acumulação de 16 scans.

### 2.3.3 Calibração Univariada

Para a construção da curva de calibração, foram utilizados os valores das razões das somas das intensidades dos sinais de cinco marcadores ( $m/z$  439, 475, 483, 491 e 521) pelas intensidades dos sinais do dopante D-Glicose-1,2,3,4,5,6,6-d7 ( $m/z$  366), na concentração de  $23,53 \mu\text{g/mL}$ , em função da concentração do suco de maçã (em % m/m). Ao todo quatorze pontos foram utilizados para a construção da curva de calibração (0, 1, 3, 5, 15, 20, 30, 35, 45, 50, 60, 65, 75, e 100 % m/m de suco de maçã) e cinco pontos foram utilizados para avaliar a exatidão do método (10, 25, 40, 55 e 70 % m/m de suco de maçã). Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados utilizando as Equações 9 e 10: <sup>76</sup>

$$LOD = \bar{X} + t \cdot s \quad (9)$$

$$LOQ = \bar{X} + 10 \cdot s \quad (10)$$

em que  $\bar{X}$  é a média de sete medidas dos valores do branco,  $t$  é a abscissa da distribuição de student e  $s$  é o desvio padrão dos brancos.

Os cinco pontos utilizados para testar o modelo (10, 25, 40, 55 e 70 % m/m suco de maçã) foram utilizados para calcular a exatidão do método. A exatidão foi avaliada utilizando o cálculo do erro relativo, através da Equação 11: <sup>76</sup>

$$\% \text{ ErroRelativo} = \frac{X_{lab} - X_v}{X_v} 100 \quad (11)$$

em que  $X_{lab}$  é a concentração de suco de maçã encontrado experimentalmente e  $X_v$  é o valor verdadeiro.

### 2.3.4 Análises Quimiométricas

A análise de componentes principais (PCA) foi aplicada a uma matriz de dados construída a partir da triplicata de dezenove diferentes concentrações de suco de maçã em suco de uva (0, 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 100 % m/m), totalizando cinquenta e sete amostras e as variáveis escolhidas foram as razões das intensidades de cada sinal ( $m/z$  439, 475, 483, 491 e 521) pela intensidade do sinal do dopante D-Glicose-1,2,3,4,5,6,6-d7 ( $m/z$  366), na concentração de 23,53  $\mu\text{g/mL}$ , obtendo 5 variáveis. As linhas da matriz foram preenchidas com as amostras e as colunas com as variáveis. Utilizou-se o MATLAB 9.0 (R2013a) para realizar o pré-tratamento de dados e construção dos modelos. Além disso, outra matriz realizada a partir de onze amostras comerciais de suco de uva, também em triplicata, trinta e três linhas, com as mesmas variáveis, cinco colunas, foi aplicada ao modelo para assimilar a real porcentagem de suco de maçã nas amostras comerciais.

Para quantificar o suco de maçã em suco integral de uva, foi utilizado a regressão linear múltipla (MLR) e a regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS) com a utilização de *repeated double cross validation*.<sup>77</sup> Para a construção da matriz de dados, considerou-se a razão das intensidades de cada sinal ( $m/z$  439, 475, 483, 491 e 521) pela intensidade do sinal do dopante D-Glicose-1,2,3,4,5,6,6-d7 ( $m/z$  366) para cada amostra. Quatorze pontos foram utilizados para calibração (0, 1, 3, 5, 15, 20, 30, 35, 45, 50, 60, 65, 75, e 100 % m/m de suco de maçã) e cinco pontos utilizados para testar o modelo (10, 25, 40, 55 e 70 % m/m de suco de maçã), todos em triplicata. O erro quadrado médio de predição (RMSEP) foi calculado utilizando a equação 12:

$$RMSEP = \sqrt{\frac{1}{n_{pred}} \sum (y_i - \hat{y}_i)^2} \quad (12)$$

em que  $n_{pred}$  é o número de amostras de previsão e  $\hat{y}_i$  é o valor médio (suco de maçã contido em suco de uva) do conjunto de dados de dezenove concentrações. Os valores de LD e LQ foram calculados utilizando as Equações 13 e 14:<sup>77-79</sup>

$$LOD = 3,3\delta_x ||b_k|| \quad (13)$$

$$LOQ = 10\delta_x ||b_k|| \quad (14)$$

em que  $\delta_x$  corresponde a estimação do nível de ruído nos dados e  $b_k$  é o coeficiente de regressão para k-variável com base no modelo de regressão.

## 2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.4.1 Análise de ESI (-) FT-ICR MS

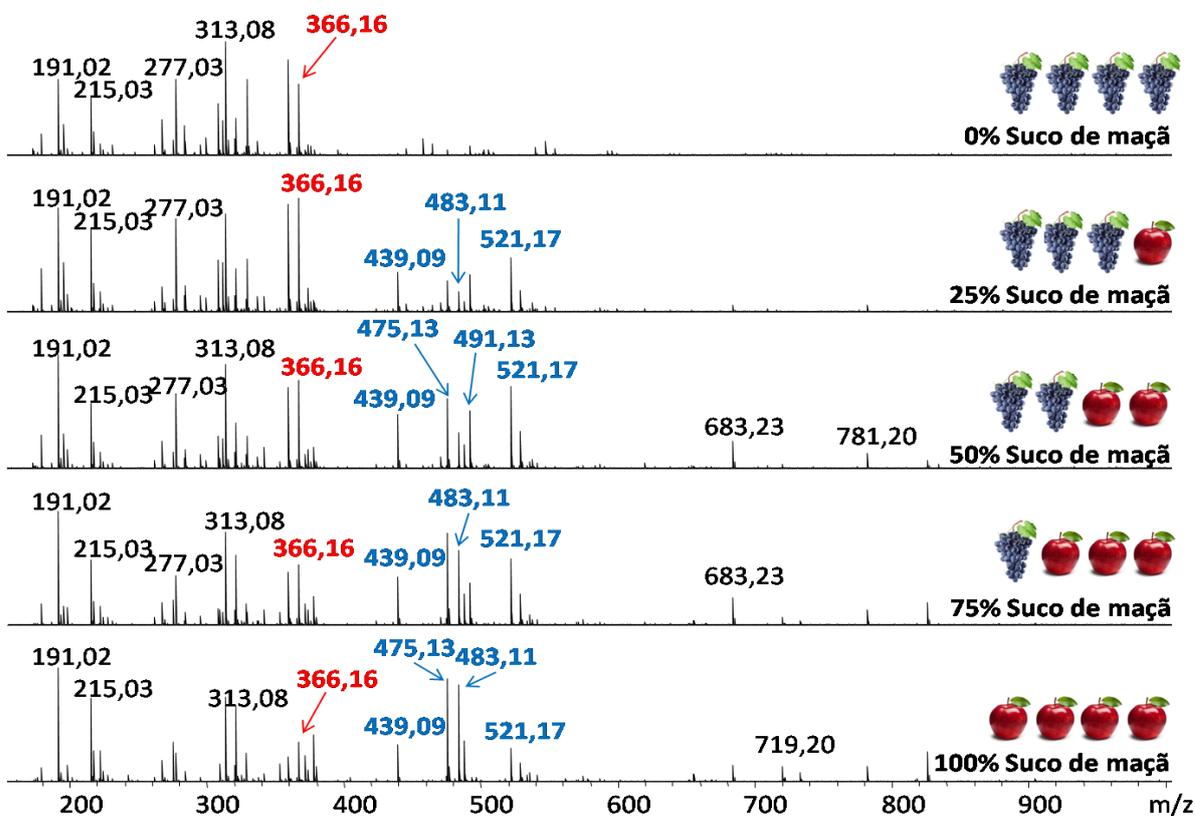
Foram adquiridos espectros de ESI(-)FT-ICR MS de todas as misturas de sucos de uva integral e suco de maçã integral, em triplicata, nas concentrações variando de 0 a 100 % m/m de suco de maçã dopadas com glicose-1,2,3,4,5,6,6-d7, na concentração de 23,53  $\mu\text{g/mL}$ . Foram detectados cinco moléculas presentes no suco de maçã e um sinal do dopante glicose-1,2,3,4,5,6,6-d7 (Tabela 2). O Composto 1, íon  $[\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{D}_7\text{O}_{12}]^-$  de  $m/z$  366, foi identificado como aduto contendo uma molécula de glicose e o dopante glicose-1,2,3,4,5,6,6-d7. O experimento de CID (do inglês, *collision induced dissociation*) confirmou a conectividade do composto, através da formação dos fragmentos de  $m/z$  186 e 179, que correspondem às perdas de glicose e glicose-1,2,3,4,5,6,6-d7, respectivamente (Anexo 1a). O Composto 2, íon  $[\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{O}_{12} - \text{H}]^-$  de  $m/z$  439, foi identificado como Maclurin 3-C-glucosídeo e seu perfil de fragmentação apresentou fragmento de  $m/z$  259, devido a perda do anel hexosídeo (Anexo 1b). O Composto 3, íon  $[\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{O}_{16} - \text{H}]^-$  de  $m/z$  475, foi identificado como um trissacarídeo, no qual seu perfil de fragmentação, gerou íon de  $m/z$  295, devido a perda de um anel hexosídeo (Anexo 1c). O Composto 4, íon  $[\text{C}_{15}\text{H}_{28}\text{O}_{15} + \text{Cl}]^-$  de  $m/z$  483 foi identificado como um marcador de suco de maçã, entretanto, não foi possível atribuir uma possível molécula a esse sinal de forma confiável partir do seu espectro de ESI(-)MS/MS. O Composto 5, íon  $[\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{O}_{17} - \text{H}]^-$  de  $m/z$  491, foi identificado como um aduto de dissacarídeo / ácido dihidroxibutanodióico, onde sua fragmentação originou íon de  $m/z$  311, relativo à perda de anel hexosídeo (Anexo 1d). Por fim, o Composto 6, íon  $[\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_{17} - \text{H}]^-$  de  $m/z$  521, foi identificado como um aduto de dissacarídeo e monossacarídeo e sua fragmentação gerou o íon de  $m/z$  341, produzido a partir da eliminação neutra de um monossacarídeo de 180 Da (Anexo 1e).

**Tabela 2.** Espécies químicas propostas por ESI(-)FT-ICR MS para as amostras de suco de uva adulterado com suco de maçã.<sup>80</sup>

<i>m/z</i> (exp.)	Fórmula Molecular (M-H) <sup>-</sup>	DBE	Erro (ppm)	MS/MS	Molécula
1 366.16357	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> D <sub>7</sub> O <sub>12</sub>	-	-0.36	186; 179	<p>Aduto de glicose / glicose deuterada</p>
2 439.08612	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> O <sub>12</sub>	10	4.74	259	<p>Maclurin 3-C-glicosídeo</p>
3 475.13074	C <sub>16</sub> H <sub>27</sub> O <sub>16</sub>	3	-0.60	295	<p>Trissacarídeo</p>
4 483.11235	C <sub>15</sub> H <sub>28</sub> ClO <sub>15</sub>	1	-0.27	324; 295	-
5 491.12571	C <sub>16</sub> H <sub>27</sub> O <sub>17</sub>	-	-0.69	311	<p>Aduto de dissacarídeo / ácido dihidroxibutanodióico</p>
6 521.17270	C <sub>18</sub> H <sub>33</sub> O <sub>17</sub>	-	-0.73	341	<p>Aduto de dissacarídeo / monossacarídeo</p>

Foi possível observar, que em geral, nos espectros de ESI(-)FT-ICR MS, que as intensidades dos sinais da glicose deuturada (valores destacados em vermelho) diminuem enquanto que as intensidades dos sinais correspondentes as moléculas presentes no suco de maçã (valores destacados em azul) aumentam em função da concentração do suco de maçã (Figura 10).

O perfil glicídico de sucos é um importante parâmetro para avaliar possíveis adulterações de outras frutas que podem ser adicionadas como sucos e que possuem valor comercial inferior. Embora vários fatores como estágio de maturação e período de colheita afetem os teores de açúcares nas frutas, em geral, existe uma constância na relação entre os teores dos diferentes açúcares de cada fruta.<sup>81</sup> Trabalhos anteriores mostram que a uva apresenta elevado teor dos monossacarídeos de glicose e frutose em relação ao baixo teor do dissacarídeo sacarose. Já a maçã apresenta a razão dissacarídeos/monossacarídeos mais elevado do que a uva.<sup>81, 82</sup> Analisando os espectros de ESI(-) foi possível notar que com o aumento do teor de suco de maçã, houve um aumento das intensidades dos sinais na região de  $m/z$  400 a 600 em que predomina a presença dos dissacarídeos (Figura 10).



**Figura 10.** Espectro de massa ESI (-) FT-ICR de sucos de uva / maçã a 100/0, 75/25, 50/50, 25/75 e 0/100% m/m.<sup>80</sup>

### 2.4.2 Calibração Univariada

Uma curva de calibração foi obtida, utilizando as misturas de suco de uva e suco de maçã em concentrações de 0 a 100 % m/m de suco de maçã. Quatorze pontos foram utilizados para a construção do modelo de calibração e cinco (10, 25, 40, 55 e 70 wt% de suco de maçã) foi utilizado para checar a exatidão do modelo. A curva analítica mostrou linearidade com  $r^2 = 0,995$  (Figura 11). Os valores de LD e LQ foram de 2,5 % m/m e 6,8 % m/m, respectivamente. A exatidão do método foi medida utilizando os cinco pontos escolhidos para teste. As amostras teste de concentração 10, 25, 40, 55 e 70 % m/m de suco de maçã apresentaram média de erro relativo de -1,7, -9,7, -1,9, -3,9 e 0,9%, respectivamente. Estes resultados mostram uma exatidão média de 4,8 % m/m. Este erro relaciona o quanto em porcentagem o valor do teor da amostra medida em laboratório utilizando o ESI(-)FT-ICR MS pode variar em função do seu valor de teor verdadeiro. Ou seja, quanto menor o valor do erro relativo, maior será a exatidão do método. Obtiveram melhores exatidões as amostras cujas concentrações são de 10, 40, 70 % m/m, no qual, as amostras medidas em laboratório variaram menos em relação ao valor real, enquanto que as amostras de concentrações de 25 e 55 % m/m tiveram maiores variações em suas previsões. Todavia, todas tiveram variações inferiores a 10% em relação ao teor real, o que indicou ser um modelo que apresentou boa exatidão.

Onze amostras de sucos de uva comerciais foram aplicadas à regressão linear e o resultado é expresso na Tabela 3. Nove amostras não apresentaram teor de suco de maçã ou apresentaram teor abaixo do LD, enquanto as duas restantes (amostra Suco 9 e 11) apresentaram um teor de suco de maçã igual a  $(24 \pm 1)$  % m/m.

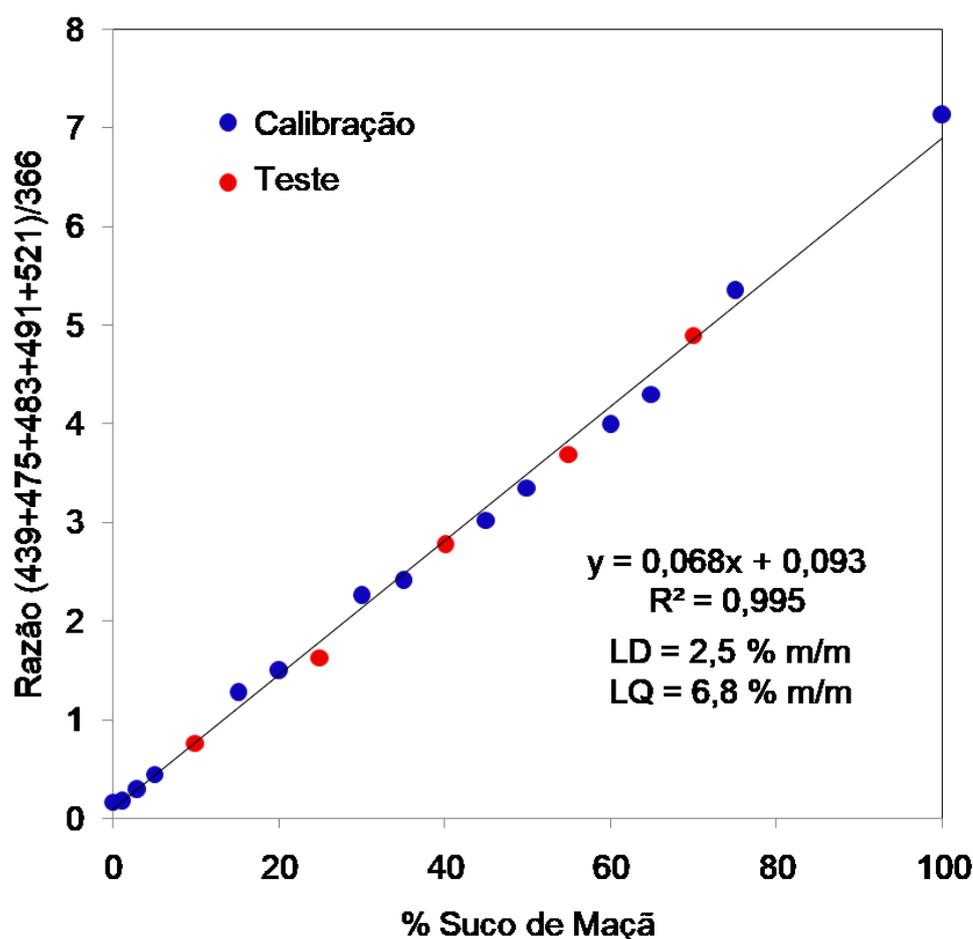


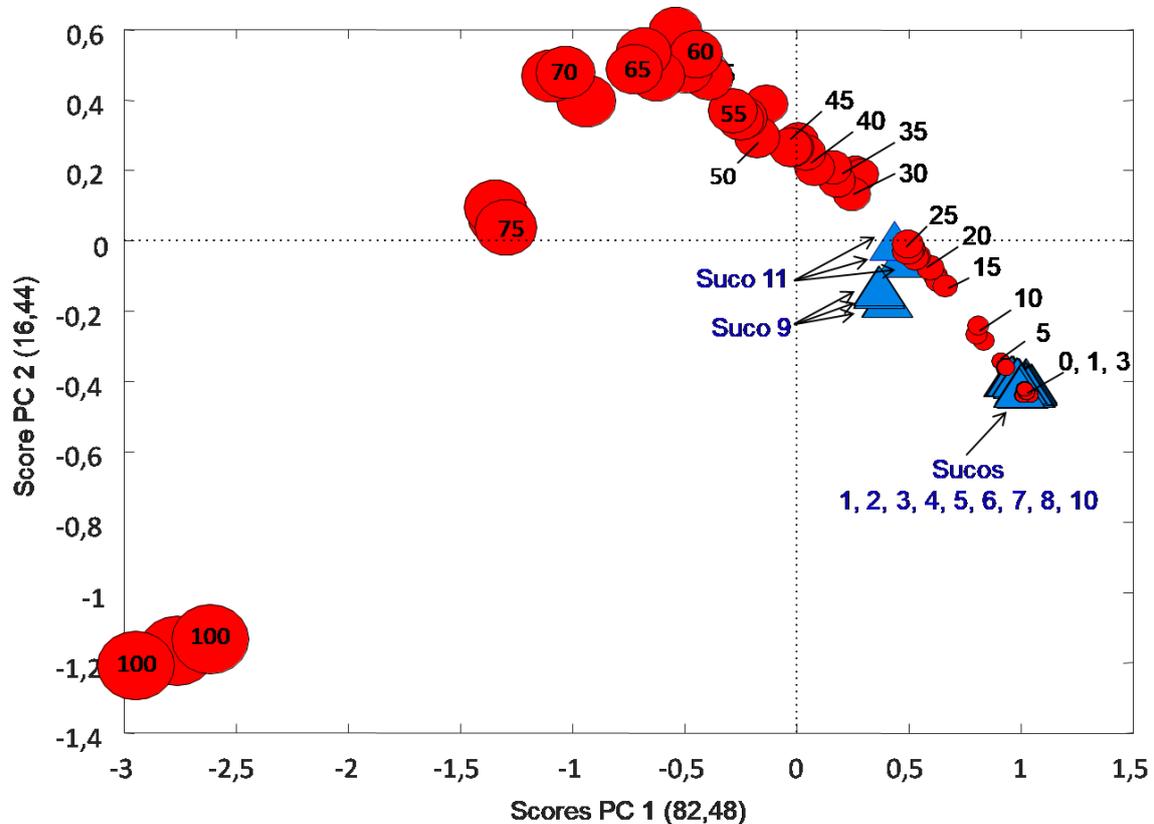
Figura 11. Curva de calibração para quantificação de suco de maçã em suco de uva. <sup>80</sup>

### 2.4.3 Análises Quimiométricas

Um modelo de PCA foi construído a partir dos espectros de massas de dezenove misturas de suco de uva e maçã utilizando a PC1 e PC2, que explicam juntas 98,92 % da variância total (Figura 12). O objetivo foi selecionar regiões relacionadas com a adição de suco de maçã em suco de uva. Foi possível verificar uma tendência de aumento de concentração de suco de maçã a partir do quadrante positivo para o quadrante negativo da PC1, ou seja, quanto mais à esquerda do quadrante negativo da PC1, maior é a adulteração com o suco de maçã. É importante verificar que mesmo com adição de pequenas quantidades do adulterante houve uma evidente separação entre as amostras.

Os espectros de onze amostras de suco de uva comerciais foram aplicados ao modelo PCA. Das onze amostras apenas duas, as amostras (Suco 9 e 11), aparecem deslocadas no sentido negativo da PC1. Estas amostras aparecem em uma região próxima às amostras de calibração do modelo com o teor de  $\approx 25$  % m/m

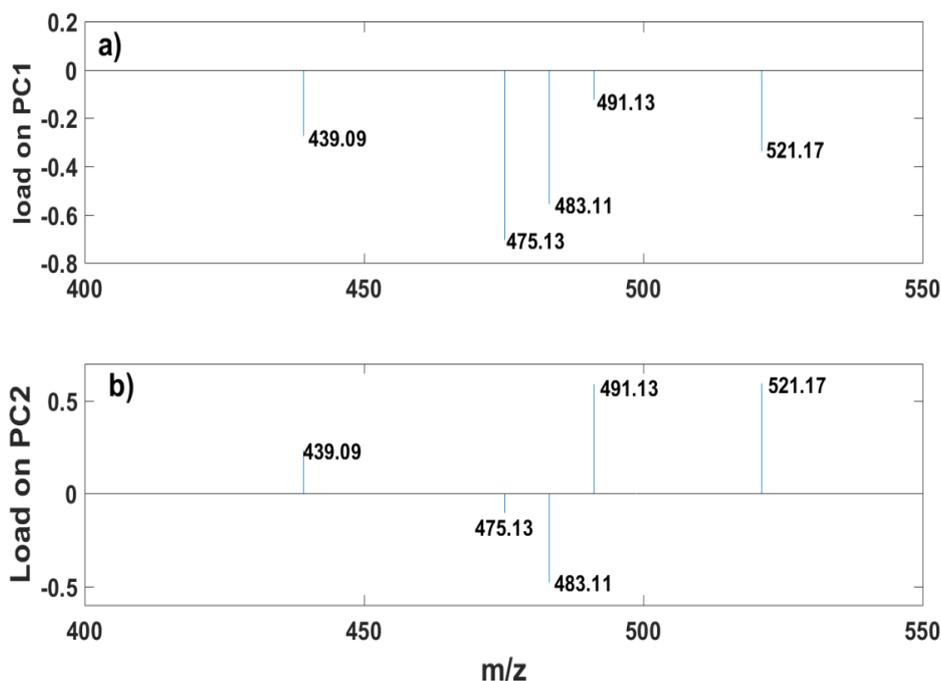
de suco de maçã. Estes resultados condizem com os valores obtidos no modelo univariado.



**Figura 12.** Análise de PCA contendo gráficos de pontos para amostras de Suco de Uva adulteradas com suco de maçã. O tamanho do marcador é proporcional ao teor de suco de maçã nas amostras. <sup>80</sup>

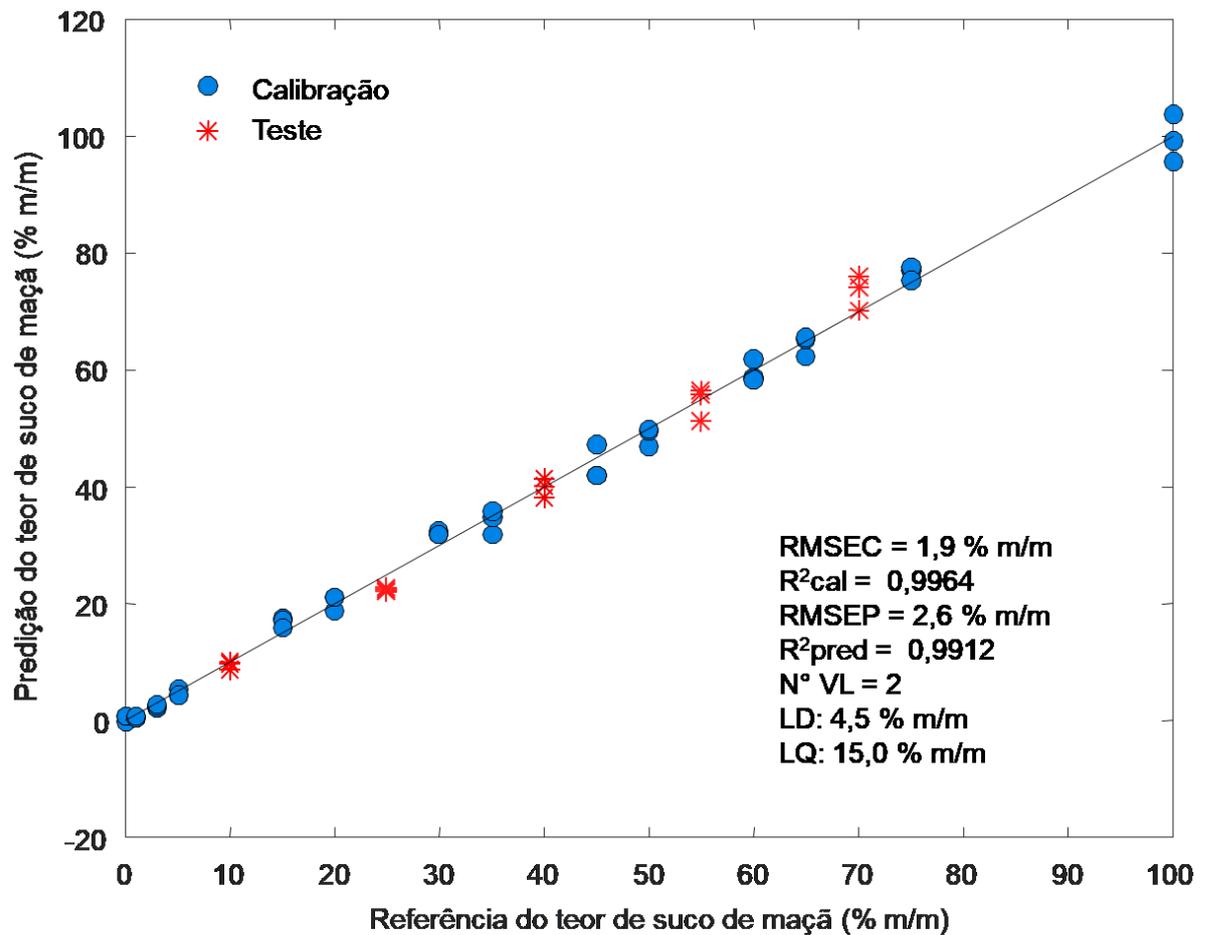
As variáveis mais relacionadas à adulteração do suco de maçã em suco de uva podem ser observadas a partir do gráfico de loadings (Figura 13), no qual, o eixo das abscissas representa as variáveis em razões massa carga ( $m/z$ ) e no eixo das ordenadas o valor de loading de cada variável, onde quanto maior seu valor maior sua importância ao modelo. Abaixo da origem se encontram as variáveis que exercem influência inversa e acima as que influenciam diretamente o modelo. Para o gráfico de loadings da PC1 (Figura 13a) todas as cinco variáveis tiveram influência inversa, sendo que a variável de  $m/z$  475 (load -0,7027) foi a mais importante e a de  $m/z$  491 (load -0,1231) foi a menos importante. O gráfico de loadings para a PC2 (Figura 13b) mostrou que os  $m/z$  de 475 (load -0,1041) e 483 (load -0,4776) influenciaram inversamente o modelo, os  $m/z$  439 (load de +0,2342),  $m/z$  491 (load +0,5921) e  $m/z$  521 (load +0,5963) influenciam diretamente, os  $m/z$  491 e  $m/z$  521 foram os de maiores alcances, ou seja, maior importância ao modelo, por fim, o  $m/z$

475 foi o que menos influenciou. Ao analisar os gráficos de loadings da PC1 e PC2 em concomitância (Figura 13), têm-se que as variáveis mais importantes ao modelo foram os de  $m/z$  475 (load da PC1 -0.7027),  $m/z$  491 (load da PC2 +0.5921) e  $m/z$  521 (load da PC2 +0.5963), esses íons estão entre os açúcares que possuem maiores intensidades no espectro de ESI(-)FT-ICR, como ilustra a Figura 10.



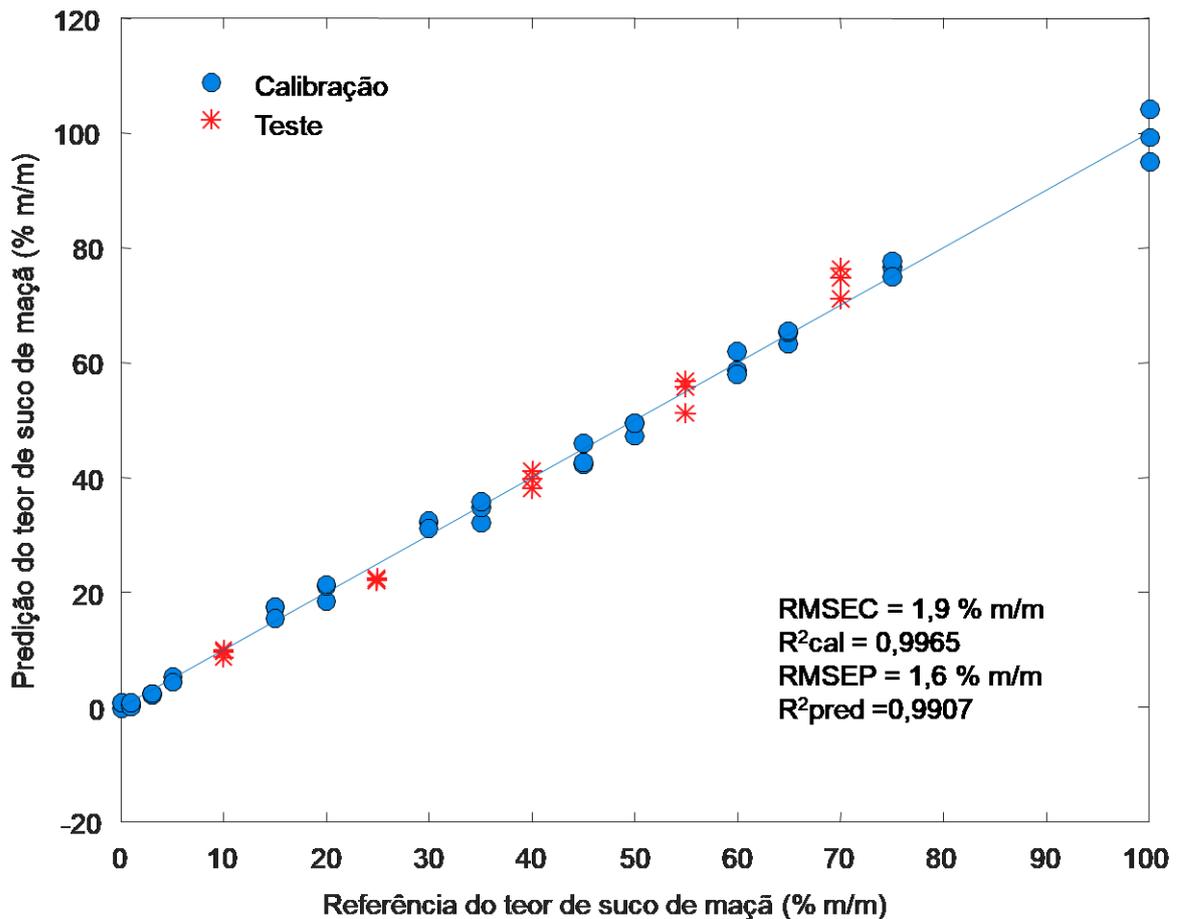
**Figura 13.** Análises de PCA contendo gráficos de carga para PC1 (a) e PC2 (b) para amostras de suco de uva adulteradas com diferentes conteúdos de suco de maçã.<sup>80</sup>

No modelo PLS duas variáveis latentes foram geradas (Figura 14). O erro médio de calibração (RMSEC) foi de 1,9 % m/m e erro médio de predição (RMSEP) de 2,6 % m/m, o coeficiente de determinação das amostras do conjunto de calibração ( $R^2_{cal}$ ) de 0,9964 e coeficiente de determinação das amostras do conjunto de previsão ( $R^2_{pred}$ ) de 0,9912. De acordo com a Figura 14, não houve amostras outliers presentes no conjunto e os parâmetros estatísticos mostraram boa exatidão do modelo. Os valores de LD e LQ foram de 4,5 % m/m e 15,0 % m/m, respectivamente. Das onze amostras de sucos de uva comerciais aplicadas ao modelo, as amostras de suco 9 e 11 apresentaram  $(24 \pm 1)$  % m/m e  $(23 \pm 1)$  % m/m de suco de maçã, respectivamente, sendo esse resultado similar ao obtido pelo método univariado (Tabela 3).



**Figura 14.** Relação entre os teores de suco de maçã previstos e de referência em suco de uva da PLS.<sup>80</sup>

Semelhante ao modelo de PLS, o modelo de regressão linear múltipla (MLR) foi construído, obtendo-se um gráfico de previsto e medido (Figura 15) e alguns parâmetros estatísticos. O modelo de MLR forneceu RMSEC de 1,9 % m/m, RMSEP de 1,6 % m/m, R<sup>2</sup>cal de 0,9965 e R<sup>2</sup>pred de 0,9907. Ao analisar esses parâmetros foi possível concluir que o modelo de MLR também apresentou boa exatidão. Similar aos resultados anteriores, as amostras de suco 9 e 11 apresentaram um teor de suco de maçã de  $(24 \pm 1)$  % m/m e  $(23 \pm 1)$  % m/m, respectivamente (Tabela 3).



**Figura 15.** Relação entre os teores de suco de maçã previstos e de referência em suco de uva da MLR.<sup>80</sup>

Os três modelos de quantificação (regressão linear, PLS e MLR) apresentaram resultados próximos. Para todos os modelos a concentração de suco de maçã detectado na amostra de suco 9 foi de  $(24 \pm 1)$  % m/m enquanto que para a amostra de suco 11 variou de 23 a  $(24 \pm 1)$  % m/m. O modelo univariado foi mais linear, possuindo  $R^2$  de 0,9950 enquanto que o MLR e PLS  $R^2_{pred}$  de 0,9907 e 0,9912, respectivamente. O MLR apresentou melhor exatidão com valor de RMSEP de 1,6 % m/m, o PLS de 2,6 % m/m e o univariado erro relativo de 4,8%. Para baixas concentrações de suco de maçã (% m/m), o modelo de regressão linear univariada apresentou menores valores de LD (2,5 % m/m) e LQ (6,8% m/m) enquanto o PLS apresentou LD e LQ de 4,5 % m/m e 15,0 % m/m, respectivamente.

**Tabela 3.** Conteúdo de suco de maçã em suco de uva comercial.<sup>80</sup>

Suco de Uva	% Suco de Maçã Regressão Linear	% Suco de Maçã MLR	% Suco de Maçã PLS
1	NQ	NQ	NQ
2	NQ	NQ	NQ
3	NQ	NQ	NQ
4	NQ	NQ	NQ
5	NQ	NQ	NQ
6	NQ	NQ	NQ
7	NQ	NQ	NQ
8	NQ	NQ	NQ
9	24 ± 1	24 ± 1	24 ± 1
10	NQ	NQ	NQ
11	24 ± 1	23 ± 1	23 ± 1

\* NQ = valor abaixo do limite de quantificação

## 2.5 CONCLUSÕES

A técnica FT-ICR MS associada ao tratamento de dados é um procedimento confiável para identificação e quantificação de suco de maçã em suco de uva integral. A PCA, feita a partir da razão das intensidades de cada de um dos cinco sinais das moléculas presentes no suco de mão ( $m/z$  439, 475, 483, 491 e 521) pela intensidade do sinal do dopante D-Glicose-1,2,3,4,5,6,6-d7 ( $m/z$  366), fornece boa separação entre os dezenove diferentes teores de suco de maçã (% m/m). Para teores de suco de maçã mais altos, o método de calibração multivariado (PLS e MLR) apresenta menores erros de exatidão, 2,6 % m/m e 1,6 % m/m, respectivamente e o univariado de 4,8%. Para baixas concentrações de teor de suco de maçã em suco de uva, o método univariado apresenta menores valores de LD e LQ em relação ao PLS, desta forma, a detecção e quantificação de baixos teores de suco de maçã em suco de uva é melhor previsto pelo método univariado.

### 3. ESTUDO DO PERFIL FENÓLICO E GLICÍDICO ASSOCIADO À MATURAÇÃO DE BANANAS POR ESI FT-ICR MS E ATIVIDADES QUIMIOPREVENTIVA DE CÂNCER

#### 3.1 INTRODUÇÃO

A banana é uma fruta largamente consumida em todo o mundo. Em 2017, a produção mundial chegou a cerca de 18 milhões de toneladas. Os principais exportadores de banana são os países de Caribe e a América Latina e os principais consumidores da fruta são os Estados Unidos, e a União Européia, que juntos consomem aproximadamente 58 % de toda a banana exportada.<sup>83, 84</sup>

Devido à grande variedade de metabólitos, esta fruta possui sabor agradável, proporcionado por açúcares, ácidos e compostos voláteis. A banana é conhecida por ter atividade antioxidante, sendo atribuído a diversas classes de metabólitos, especialmente a compostos fenólicos.<sup>85</sup> A polpa da banana possui antioxidantes como catequina, epicatequina, ligninas, taninos e antocianinas.<sup>86</sup> Estudos têm evidenciado que os flavonóides possuem efeitos benéficos à saúde humana. Estes benefícios estão ligados às suas propriedades antioxidantes, quelantes, antimutagênicas e antitumorais.<sup>87</sup> A atuação como antioxidantes ocorre pois os polifenóis, preferencialmente, se oxidam preservando os antioxidantes naturais do corpo. Os flavonoides também inibem alguns sistemas enzimáticos, como a prostaglandina sintase, interferindo na carcinogênese.<sup>88</sup>

A carcinogênese é dividida em três estágios, os quais frequentemente se sobrepõem; iniciação, progressão e promoção.<sup>89</sup> Agentes farmacêuticos, naturais ou sintéticos, ou componentes da dieta, como os polifenóis que atuam prevenindo, retardando ou revertendo o processo de carcinogênese são descritos como agentes quimiopreventivos de câncer.<sup>89, 90</sup> Estes são classificados em duas classes: agentes bloqueadores, capazes de inibir a etapa de iniciação pela prevenção da ativação carcinogênica (indutores da quinonareductase); e agentes supressores, que dificultam a proliferação de células malignas (inibidores do NF- $\kappa$ B, inibidores da aromatase, inibidores da produção de óxido nítrico).<sup>90</sup> Um dos principais objetivos para a quimioprevenção do câncer continua sendo a descoberta de novos agentes efetivos com baixos efeitos colaterais e sem toxicidade.<sup>90</sup> Para a triagem de produtos naturais com potencial atividade anti-carcinogênica, um painel de bioensaios *in vitro* foi estabelecido e permite monitorar a quimioprevenção em vários estágios.<sup>90</sup>

O potencial quimiopreventivo de câncer de frutos de bananas foi evidenciado empregando-se o bioensaio de indução da quinona redutase *in vitro*.<sup>23</sup>

A busca por maior qualidade e produtividade resultou em desenvolvimento de novos cultivares de bananeira. Esses cultivares apresentam maior resistência a doenças e tolerância à seca e ao frio.<sup>91</sup> Ainda são escassos os trabalhos que investigam, a nível molecular, o perfil fenólico e glicídico associado à maturação e atividades quimiopreventivas, principalmente destes cultivares. Este trabalho investigou o perfil químico de amostras de frutas de seis cultivares de bananas em quatro estádios de maturação, utilizando a técnica de ESI(-) FT-ICR MS e os resultados foram associados com análises físico-químicas como pH, acidez titulável em termos de ácido cítrico e sólidos solúveis totais (TSS, expresso na forma de °Brix). Além disso, o potencial efeito quimiopreventivo de câncer dos frutos foi investigado empregando-se um painel de ensaios *in vitro* (citotoxicidade pelo método MTT, indução da quinona redutase, inibição do NF-κB, inibição da aromatase e inibição de produção de óxido nítrico-iNOS).

### 3.1.1 O Cultivo da Banana no Espírito Santo

O pólo produtor de banana no Espírito Santo fica localizado nos municípios de Alfredo Chaves, Iconha, Anchieta, Guarapari, Rio Novo do Sul, Vargem Alta, Marechal Floriano, Cariacica, Viana, Santa Leopoldina e Domingos Martins.<sup>92</sup>

A produção de banana é desenvolvida por cerca de 17 mil propriedades rurais, predominantemente familiares, gerando cerca de 30 mil postos de empregos e cerca de 23 mil hectares de área plantada.<sup>92</sup>

O INCAPER vem desenvolvendo novas cultivares de banana resistentes a algumas pragas. Alguns exemplos são 'Ambrosia', 'Tropical', 'Vitória', 'Pacovan' e 'Japira'.<sup>93, 94</sup>

A banana é fonte de minerais, sendo componente fundamental na alimentação em todo o mundo.<sup>95</sup> O sabor é um atributo de qualidade, quando sua polpa se encontra verde, é caracterizado por forte adstringência e amargor, sendo indício de maior acúmulo de compostos fenólicos solúveis, principalmente taninos. Durante o amadurecimento, ocorre a polimerização desses compostos fenólicos, causando a diminuição da adstringência e amargor, e aumentando a doçura do fruto.<sup>96</sup> Estudos indicam a banana como uma fruta rica em compostos fenólicos.<sup>97</sup> Os compostos fenólicos são conhecidos por suas atividades biológicas distintas, dentre

elas se destacam a elevada atividade antioxidante.<sup>98</sup> A banana possui alto conteúdo polifenólico, principalmente na polpa,<sup>99</sup> onde variados estudos avaliaram a atividade antioxidante de extratos de banana,<sup>100</sup> atividade antiulcerogênica,<sup>101</sup> auxílio na diminuição da diarreia,<sup>102</sup> atividade anticarcinogênica,<sup>103</sup> e indução da quinona redutase.<sup>23</sup>

O perfil químico das cultivares Ambrosia, Tropical, Vitória, Pacovan e Japira em relação a compostos fenólicos, açúcares e compostos voláteis ainda não foram estudados. Sendo assim, o presente trabalho se torna importante, pois o conhecimento das qualidades nutracêuticas destas é um dado importante para a população e para os produtores do Estado.

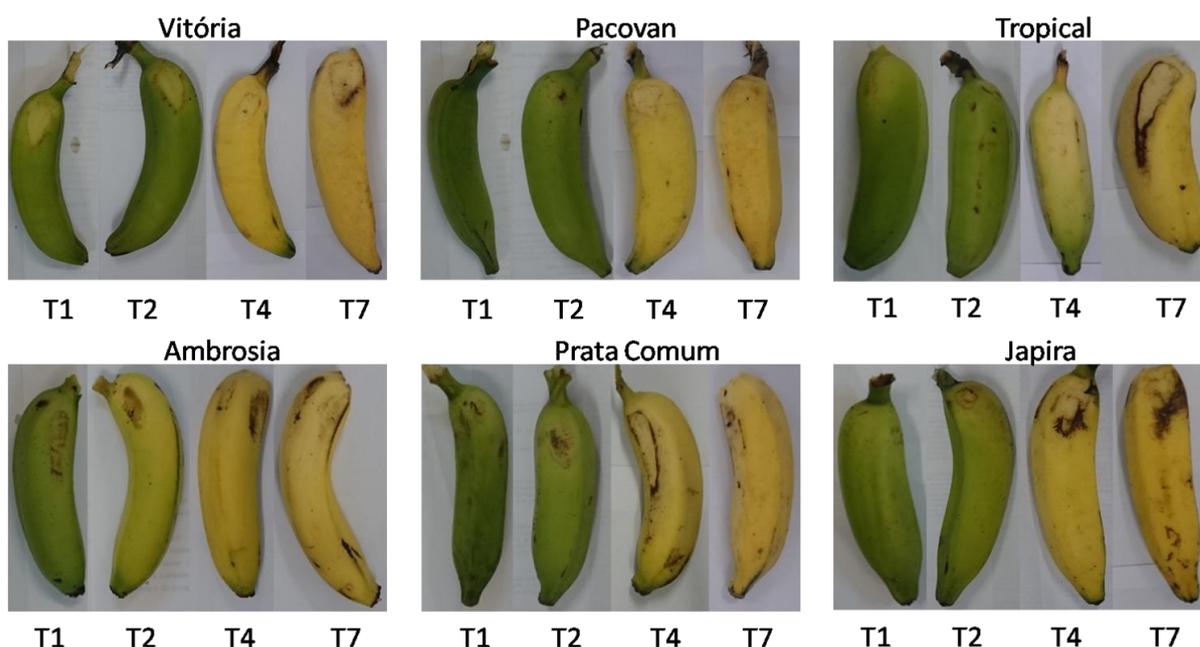
## **3.2 OBJETIVO**

Estudar o perfil fenólico e glicídico de bananas cultivadas no Espírito Santo, em seus estádios de maturação, e sua atividade quimiopreventiva do câncer.

## **3.3 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.3.1 Amostras**

Foram analisadas amostras de seis cultivares de bananas, sendo elas: 'Prata Comum' (AAB), 'Pacovan' (AAB), 'Japira' (AAAB), 'Ambrosia' (AAAA), 'Vitória' (AAAB) e 'Tropical' (AAAB), em quatro estádios de maturação, cultivadas nas fazendas experimentais do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER). As amostras foram colhidas no estádio de maturação 1 e deixadas amadurecer naturalmente em temperatura de aproximadamente 20°C. Para a escolha dos quatro estádios de maturação foi utilizado o critério visual conforme a carta de cores desenvolvida em trabalhos anteriores,<sup>104</sup> sendo a escala de variação: T1- totalmente verde; T2- verde com traços amarelos; T3- mais verde que amarelo; T4- mais amarelo que verde; T5- amarelo com ponta verde; T6- todo amarelo; e T7- amarelo com áreas café. Neste trabalho, os estádios escolhidos para estudos foram T1, T2, T4 e T7 (Figura 16). Todas as análises químicas, físico-químicas e biológicas foram realizadas em triplicata.



**Figura 16.** Fotografia de seis cultivares de bananas em quatro estádios de maturação.

### 3.3.2 Análises Físico – Químicas

Foram realizadas análises de pH, acidez titulável em termos de ácido málico e sólidos solúveis totais (TSS, expresso na forma de °Brix). As análises de pH e sólidos solúveis totais (TSS) foram realizadas utilizando-se, respectivamente, pHmetro (Metron modelo 827 pH Lab) e refratômetro de bancada (ABBE com escala de refração de 1,300-1,72 nD de 0 - 95°Brix modelo 2 WAJ). A acidez titulável (TA) foi determinada por titulação utilizando uma solução de NaOH  $0,1 \text{ molL}^{-1}$  (SIGMA®) padronizada (resultados foram expressos em gramas do ácido málico/100 g da polpa).<sup>105</sup>

### 3.3.3 Preparo dos Extratos Glicídicos

Para análise do conteúdo de açúcares, 10g de polpa de banana foi homogeneizada em liquidificador doméstico juntamente com 15 mL de uma solução metanol/água (50% v/v). O homogeneizado foi filtrado em gaze para extrair a parte fibrosa. Posteriormente, uma nova filtração foi realizada usando papel de filtro Unifil® faixa preta para extrair possíveis materiais não solubilizados.

### 3.3.4 Preparo dos Extratos Polifenólicos

Para extrair e concentrar compostos fenólicos, 10 g de polpa foram trituradas

em liquidificador doméstico, colocadas em um recipiente âmbar juntamente com 20 mL de uma solução de metanol, etanol e acetona (1:1:1, em volume) e deixadas em banho ultrassônico com frequência de 40 KHz por 1 h. Posteriormente, o extrato foi filtrado em papel Unifil<sup>®</sup> faixa preta. Este processo foi repetido duas vezes, utilizando a pasta retida no papel e soluções de 30 e 20 mL, consecutivamente, de metanol, etanol e acetona (1:1:1, em volume). Os filtrados foram concentrados em uma única solução e o solvente evaporado em rota evaporador à temperatura menor que 40°C. O extrato foi avolumado para 20 mL adicionando-se metanol e levado ao freezer por 24 h.

Depois disso, os extratos foram centrifugados à 2500 x g por 10 min, para precipitação de pectina. Após a centrifugação o procedimento foi repetido mais duas vezes. O metanol foi totalmente evaporado em rota evaporador à temperatura inferior a 40°C e 50 mL de água foram adicionados às amostras.

Os extratos foram lavados com 30 mL de água em cartucho com 360 mg de sílica modificada com C18, para remover açúcares e concentrar compostos fenólicos. Os compostos fenólicos foram extraídos do cartucho utilizando 20 mL de solução metanólica 25 % v/v e posteriormente foram rotaevaporados e avolumados até 2 mL. Os cartuchos haviam sido previamente condicionados pela injeção de 30 mL de metanol e seguidamente com 30 mL de água.

### 3.3.5 ESI(-)FT-ICR MS e ESI(-)FT-ICR MS/MS

Para injeção dos extratos concentrados em açúcares, 300 µL do homogeneizado, 300 µL de solução dopante de glicose deuterada D-Glicose-1,2,3,4,5,6,6-d<sub>7</sub> (SIGMA) ( $5 \times 10^{-3}$  mol/L) e 4 µL de NH<sub>4</sub>OH PA (Vetec Química Fina Ltda, Brazil) foram adicionados a 1,5 mL de metanol. Para injeção dos extratos concentrados em polifenóis, 1 mL dos extratos foram basificadas com 4 µL NH<sub>4</sub>OH PA (Vetec Química Fina Ltda, Brazil).

As amostras foram injetadas diretamente em um FT-ICR MS (modelo 9.4 T Solarix, BrukerDaltonics<sup>®</sup>, Bremen, Alemanha). Os espectros de ESI(-) foram obtidos em uma faixa de massa *m/z* 200-2000. As condições da fonte de ESI(-) foram: pressão de gás nebulizador de 2 bar, voltagem capilar de 2,5 kV, e a temperatura de transferência capilar de 180° C. O tempo de acumulação dos íons foi de 0,10 s. Cada espectro foi adquirido pela acumulação de 100 varreduras (*scans*). Os espectros foram obtidos com alta resolução ( $m/\Delta m_{50\%} = 400000$ , onde  $\Delta m_{50\%}$

corresponde à largura do sinal a meia altura), fornecendo fórmulas moleculares inequívocas para os íons moleculares de carga única (espécies  $C_cH_hN_nO_oS_s$ ). Os espectros de massas foram adquiridos e processados utilizando o *software* de *Compass Data Analysis* (BrukerDaltonics, Bremen, Alemanha). As fórmulas estruturais dos compostos foram obtidas através do software chemspiderdatabase ([www.chemspider.com](http://www.chemspider.com)).

Para os experimentos de MS/MS, a janela do quadrupolo foi fechada em um intervalo de 1 Da, proporcionando o isolamento do íon de interesse. Posteriormente, o íon é conduzido para o interior de uma cela de colisão (hexapolo) com energia de colisão variando entre 3 - 20 V, sendo Argônio o gás de colisão utilizado. A fim de aumentar a quantidade de íons na cela ICR, o tempo de acumulação de íons no hexapolo (ionaccumulation time) foi 0,1 s. Cada espectro foi adquirido a partir da acumulação de 100 scans.

### 3.3.6 Quantificação de Polifenóis Totais

A concentração total de polifenóis foi determinada para os extratos polifenólicos, utilizando-se reação com reagente de Folin-Ciocalteu. A leitura no espectrofotômetro ocorreu no comprimento de onda de 715 nm. Uma curva de calibração de cinco pontos foi obtida ( $R^2 = 0,999$ ), utilizando soluções do padrão de ácido gálico anidro (VETEC®). Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g}$  de equivalente ácido gálico / 100 g polpa *in natura*.<sup>106</sup>

### 3.3.7 Painel de bioensaios *in vitro* de quimioprevenção de câncer

Para a avaliação do potencial quimipreventivo de câncer foram empregados o ensaio de viabilidade celular, indução da quinonaredutase, inibição do NF- $\kappa$ B, inibição da produção de óxido nítrico e inibição da aromatase.

A citotoxicidade dos extratos foi avaliada pelo método de Sulforodamina B.<sup>107</sup> Células de Hepa 1c1c7 (células de hepatoma de murídeo, ATCC CRL-2026), células 293 – NF- $\kappa$ B, transfectada com gene NF- $\kappa$ B-luciferase, e macrófagos da linhagem RAW 264.7 (ATCC® TIB-71™) foram semeadas na mesma concentração usada para cada ensaio de quimioprevenção cultivadas em meio Dulbecco's modified Eagle's (DMEM) adicionado de 100 IU  $\text{mL}^{-1}$  penicilina, e 100  $\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  estreptomicina (Sigma–USA) a 37 °C e a umidade controlada e 5%  $\text{CO}_2$  e semeadas em uma placa de 96 poços na densidade de 5.  $10^4$  células  $\text{mL}^{-1}$ . Todos os extratos foram testados

na concentração de  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Após 72h de incubação, as células eram fixadas com  $50 \mu\text{L}$  de 20% TCA (ácido tricloroacético) por 30 min a  $4^\circ\text{C}$ . Após esse período, a placa foi lavada quatro vezes com água de torneira. As proteínas aderidas foram coradas com  $50 \mu\text{L}$  de 0,4% SRB em 1% ácido acético por poço e incubadas por 30 min a temperatura ambiente. Em seguida, enxaguadas com 1% ácido acético 4 vezes cuidadosamente. Após secas por 30 a 60 min, os cristais foram solubilizados com  $200 \mu\text{L}$  de Tris base  $\text{pH} = 10$  por 5 min. A densidade ótica foi determinada a 515 nm. A sobrevivência foi calculada em relação ao controle negativo 10% DMSO (dimetilsulfóxido). Para o controle positivo foi utilizado camptotecina ( $10 \mu\text{M}$ ).<sup>108</sup> As amostras são consideradas citotóxicas quando o valor de sobrevivência está abaixo de 90%.<sup>15</sup>

A determinação da atividade de quinonaredutase (QR) foi desenvolvida utilizando células Hepa 1c1c7 (células de hepatoma de murídeo, ATCC CRL-2026) que foram semeadas na densidade de  $0,5 \times 10^4$  células  $\text{mL}^{-1}$ , juntamente com os extratos ( $20 \mu\text{g/mL}$ ), em placas de 96 poços. A atividade enzimática foi determinada utilizando extrato aquoso em função da redução do MTT mediada por menadiol. A absorção foi determinada em 595 nm. Um ensaio de proteína total usando coloração de violeta de cristal foi executado em paralelo.<sup>90</sup> Os experimentos foram realizados em triplicata.

O ensaio de inibição de NF- $\kappa$ B foi realizado utilizando célula 293 – NF- $\kappa$ B, transfectada com gene NF- $\kappa$ B-luciferase. Essas células foram semeadas em placa esterilizada a uma concentração de  $1,5 \times 10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$  e deixadas a alcançar aproximadamente 80% de confluência por 48 h de incubação. Após o tratamento com as amostras testadas por 10 min, as células foram incubadas por mais 6 h com ou sem TNF- $\alpha$  ( $5 \text{ ng mL}^{-1}$ ). Em seguida, as células foram lavadas com PBS e posteriormente, as células foram lavadas com PBS e o ensaio de luciferase foi realizado utilizando o sistema de ensaio Luc da Promega®, de acordo com orientações do fabricante. A atividade de luciferase foi monitorada utilizando leitor de microplacas e Na-tosil-L-fenilalanina clorometilcetona (TPCK) foi utilizado como controle positivo.<sup>109</sup>

O ensaio da inibição de produção de óxido nítrico (iNOS) foi realizado em cultura de macrófagos da linhagem RAW 264.7(ATCC® TIB-71™). As células foram semeadas a uma densidade de  $2.10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$  em placas com 96 poços e cultivadas em incubadora sob atmosfera controlada de  $\text{CO}_2$  durante 24h. O meio de

cultivo foi substituído por meio livre de vermelho de fenol e o extrato ( $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) foi adicionado à placa. Após 15 min, houve a estimulação com  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  de lipopolissacarídeo (LPS), seguido de incubação por 20 h. Em seguida, a produção de NO foi, através de espectrofotometria, determinada pelo teor do nitrito, que é um produto oxidativo de NO. O teor de nitrito foi determinado pela reação de Griess. A absorvância foi medida num leitor de microplacas a 540 nm contra uma curva de calibração com padrões de nitrito. O L-NG-monometil arginina citrato (L-NMMA), foi utilizado como controle positivo com um valor de IC 50.<sup>110</sup>

Para avaliar a atividade de aromatase, o sistema de regeneração NADPH foi pré-incubado a uma concentração de  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  de extrato. Nangerina (concentração final de  $74,46 \mu\text{M}$  a  $0,57 \mu\text{M}$ ) foi utilizado como controle positivo e DMSO 0.5% foi utilizado como controle negativo. Após adição do composto de teste e dos controles, foi realizada incubação por 10 min a  $37^\circ\text{C}$ . Depois adicionou-se  $100 \mu\text{L}$  da mistura enzimática e substrato e incubou-se por mais 30 min à  $37^\circ\text{C}$ . Em seguida, houve adição de  $75 \mu\text{L}$  de NaOH  $5 \text{ mol.L}^{-1}$ , a reação foi agitada por 5 min e incubada por 2 h à  $37^\circ\text{C}$ . A fluorescência foi medida a 485 nm (excitação) e 530 nm (emissão).<sup>90</sup>

### 3.3.8 Análises estatísticas

Os dados de quantificação química, físico-química e de quimioprevenção de câncer são apresentados com média e desvio padrão. Para apresentação dos dados de massas dos polifenóis, foram construídos gráficos de bolhas utilizando os sinais detectados nos espectros de FT ICR-MS. Na abscissa foram plotados os valores de  $m/z$  e nas ordenadas os estádios de maturação. As intensidades relativas dos sinais de cada polifenol foram representadas pelo tamanho das bolhas, ou seja, quanto maior o tamanho da bolha (Figura 22); maior a intensidade do sinal. Para análise dos dados de massas do perfil glicídico das seis cultivares de bananas em quatro estádios de maturação, utilizando a técnica de ESI (-) FT – ICR MS, foram construídos gráficos utilizando a razão da soma dos sinais de todos os açúcares detectados ( $m/z$  179, 215, 239, 269, 279, 313, 327, 341, 359, 377, 431, 521, 683, 719 e 1025) pela soma das intensidades dos sinais da glicose deuterada ( $m/z$  186, 222, 366, 373 e 528) (barra azul) (Figura 19). Todos os dados foram analisados empregando-se análise de variância ANOVA e o teste de Tukey para comparação de médias entre os quatro estádios de maturação a 5% de significância.

### 3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.4.1 Análises Físico – Químicas

As amostras das cultivares Vitória, Pacovan, Prata Comum, Japira, Ambrosia e Tropical apresentaram um aumento dos valores de SST em função do amadurecimento (Figura 17). Com exceção da cultivar Ambrosia, os teores de SST das cultivares Vitória, Pacovan, Japira, Tropical e Prata aumentaram significativamente a partir do quarto estágio de maturação. Por outro lado, nas frutas da cultivar Ambrosia, os teores de SST elevou-se até o quarto estágio, se mantendo constante no último estágio (Figura 17). O aumento do teor de SST, durante o amadurecimento de frutas, ocorre principalmente em virtude da formação de carboidratos solúveis como sacarose, glicose e frutose, que podem ser originados devido à degradação do amido por ação da enzima amilase.<sup>111</sup>

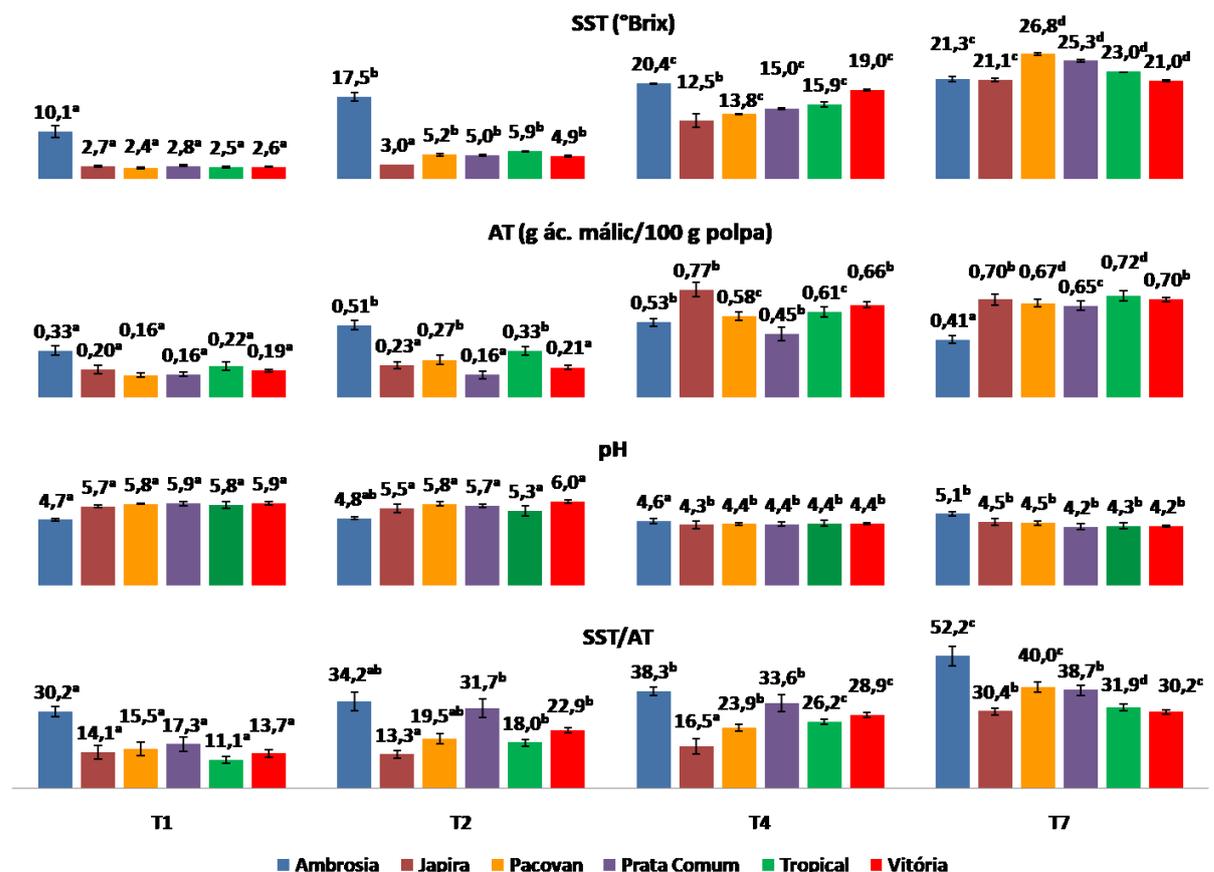
Um comportamento similar ao SST é observado para a distribuição dos valores de AT. Para os quatro estágios de maturação estudados, os valores de AT aumentaram a partir do estágio 1 ao 7 para as cultivares Tropical e Pacovan. Já na cultivar Vitória, os valores de AT podem ser agrupados em dois grupos (estádios 1 e 2; e estádios 4 e 7). Os dois últimos estádios são bastante superiores aos primeiros (i.e. 300%). Para a cultivar Ambrosia, houve um aumento do teor de AT entre os estádios 1 e 2, mantendo-se constante entre os estádios 2 e 4 e aumentando entre os estádios 4 e 7. Na cultivar Prata Comum, o teor de AT para os estádios 1 e 2 são significativamente idênticos e aumentam a partir do estágio 2 até o estágio 7. Na cultivar Japira, o teor de AT se manteve constante nos dois primeiros estádios aumentando após o estágio 4 (Figura 17). Em trabalhos anteriores utilizando as cultivares Caipira, ThapMaeo e Tropical, em geral, a variação dos teores de AT condiz com o reportado na literatura, no qual eles aumentaram durante a maturação das frutas.<sup>112</sup>

Outra propriedade monitorada é o pH. É de se esperar que os seus valores diminuam durante a maturação do fruto. Estes resultados corroboraram com os resultados encontrados nos ensaios de AT, uma vez que o aumento do teor de ácidos orgânicos gera uma diminuição de pH das amostras. Os resultados para as cultivares Vitória, Pacovan, Japira, Tropical e Prata comum mostraram que os dois primeiros estádios de maturação apresentaram valores de pH semelhantes, diminuindo até o estágio 4, mantendo-se constante até o estágio 7. Para a cultivar Ambrosia, os valores de pH se mantiveram constantes até o estágio 4 e partir deste

estádio, apresentaram um leve aumento até o estágio 7 (Figura 17).

A razão SST/AT é um importante fator para a determinação do grau de maturação das frutas. Frutas com estádios de maturação avançados possuem valores de razão SST/AT elevados. A cultivar Tropical apresentou crescimento do valor da razão SST/AT e as análises estatísticas mostraram que há diferença significativa entre todos os estádios estudados. Para a cultivar Vitória houve um aumentonos valores de SST/AT até o estágio de maturação 4, se mantendo constante posteriormente. As cultivares Japira, Ambrosia e Pacovan, apresentaram até o estágio 4, constância nos valores de SST/AT, aumentando seu valor no último estágio. Para a cultivar Prata comum, os valores de SST/AT aumentaram até o estágio 2 e a partir desta fase mantiveram-se constantes (Figura 17).

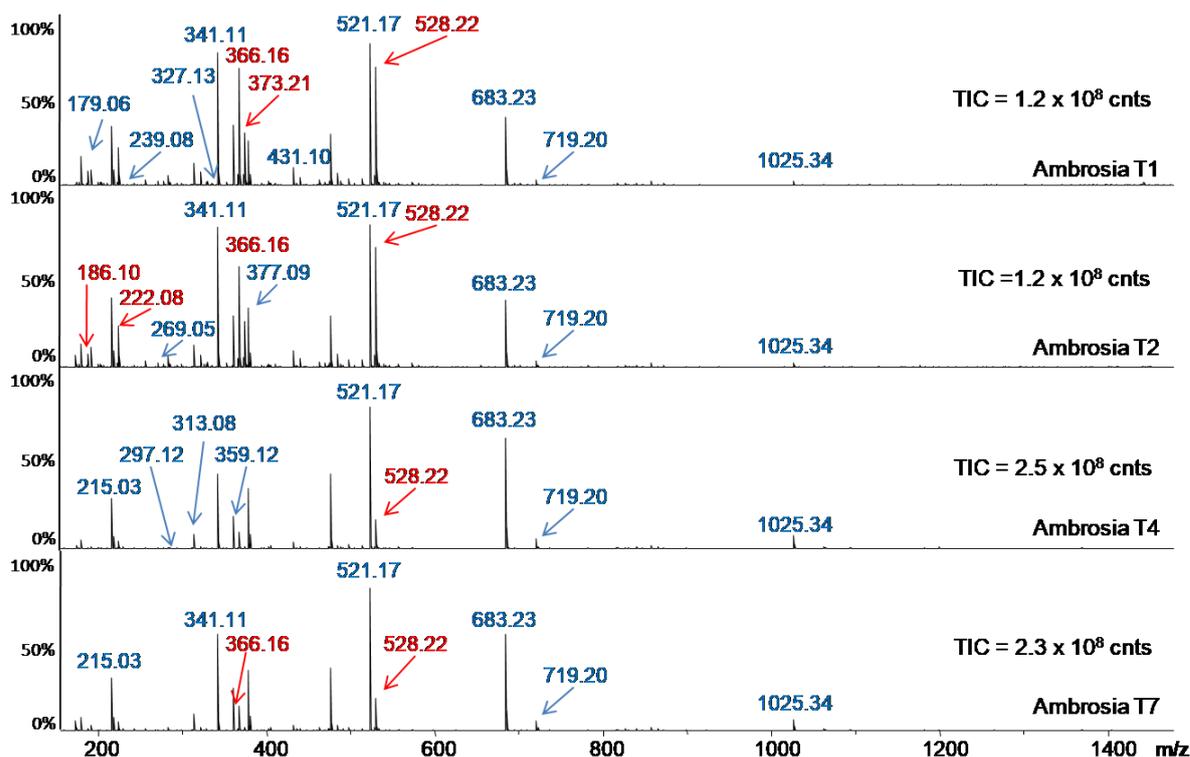
Em geral, os dados dos ensaios físico-químicos encontrados para as amostras de banana em função do estágio de maturação condizem com os resultados reportados na literatura.<sup>113</sup>



**Figura 17.** Resultados de Ensaio Físico-Químicos para quatro estádios de maturação de seis cultivares de banana. Letras iguais indicam que as amostras não apresentam diferenças significativas entre si e letras diferentes indicam que as amostras apresentam diferenças significativas entre si. A comparação foi realizada entre as amostras de uma mesma cultivar em seus estádios de maturação.

### 3.4.2 Perfil Glicídico

Foram adquiridos espectros de ESI(-)FT-ICR MS de todas as amostras de banana. Para relacionar o perfil glicídico das diferentes cultivares de banana em seus estádios de maturação, foram adicionados às amostras, um padrão interno do dopante glicose-1,2,3,4,5,6,6-d7. Desta forma, foi possível observar, nos espectros de MS (Figura 18), que as intensidades dos sinais da glicose deuterada (valores em vermelho) diminuem com o aumento do estágio de maturação. Como consequência do aumento dos valores de SST em função do estágio de maturação, as intensidades dos sinais dos açúcares (valores em azul) aumentam à medida que a fruta amadurece.



**Figura 18.** Espectros de ESI(-)FT-ICR MS de quatro estádios de maturação da cultivar Ambrosia. Os valores em vermelhos representam a razão  $m/z$  da glicose deuterada e os valores em azul representam a razão  $m/z$  dos açúcares.

A altíssima resolução e exatidão do FT-ICR MS bem como a realização de experimentos de CID (ESI(-)MS/MS), permitiu a identificação estrutural de 20 compostos, onde suas fórmulas moleculares, valores de  $m/z$ , DBEs, e erros de massas (ppm) são mostrados na Tabela 4.

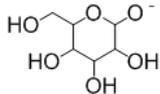
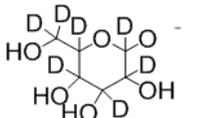
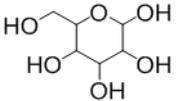
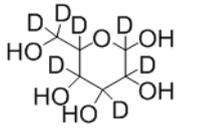
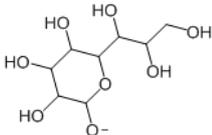
Os compostos 1 e 2, íons  $[C_6H_{11}O_6]^-$  e  $[C_6H_4D_7O_6]^-$  de  $m/z$  179 e 186, respectivamente, foram identificados como glicose e glicose deuterada, respectivamente. A molécula de glicose, bem como a sua forma deuterada, foram também identificadas como adutos de cloro, produzindo os compostos 3, íon  $[C_6H_{12}O_6 + Cl]^-$  de  $m/z$  215; e 4, íon  $[C_6H_5D_7O_6 + Cl]^-$  de  $m/z$  222. O perfil de fragmentação do primeiro mostrou fragmento de  $m/z$  179, relativo à perda de cloro (Anexo 2a). O composto 5, íon  $[C_8H_{15}O_8]^-$  de  $m/z$  239, foi identificado como um octapirranose, tendo sua conectividade química identificada a partir dos experimentos de CID, onde o fragmento produzido de  $m/z$  179 é relativo a eliminação do substituinte do anel hexosídeo (Anexo 2b).

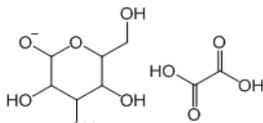
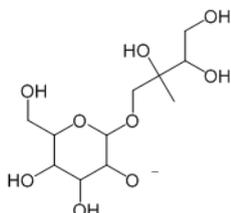
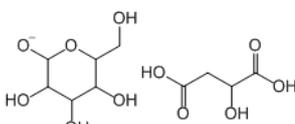
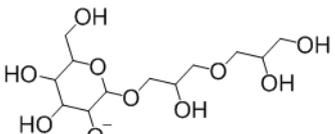
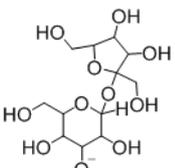
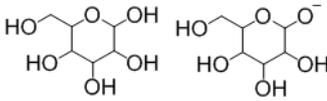
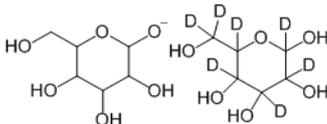
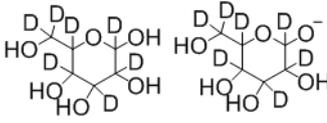
Os compostos 6-8, íons  $[C_8H_{13}O_{10}]^-$ ,  $m/z$  269,  $[C_{11}H_{21}O_9]^-$ ,  $m/z$  297 e  $[C_{10}H_{17}O_{11}]^-$ ,  $m/z$  313, foram identificados como aduto de galatopirranose/ácido etanodióico, trihidroxi-2-metilbutil- glicopiranosídeo e aduto de glicose / ácido málico, respectivamente. O composto 9, íon  $[C_{12}H_{23}O_{10}]^-$  de  $m/z$  327, foi identificado 3-(2,3-dihidroxipropoxi)-2-hidroxipropil-galatopiranosídeo e seu espectro de ESI(-)MS/MS gerou os fragmentos de  $m/z$  179, oriundo da perda do substituinte do anel hexosídeo (Anexo 2c). O composto 10, íon  $[C_{12}H_{21}O_{11}]^-$  de  $m/z$  341, foi identificado como sacarose, sua fragmentação resultou em íon de  $m/z$  179, relativo à perda da glicose e íon de  $m/z$  161 oriundo à perda da frutose (Anexo 2d).

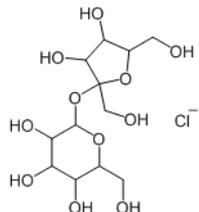
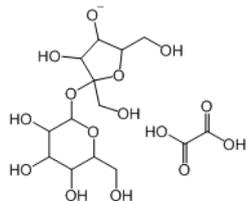
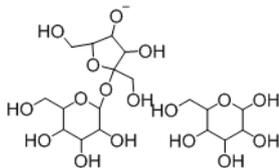
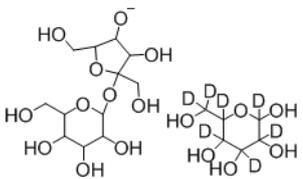
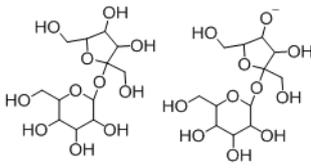
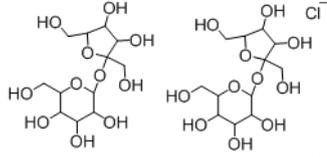
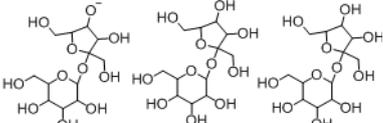
O composto 11, íon  $[C_{12}H_{23}O_{12}]^-$  de  $m/z$  359, foi identificado como aduto de duas moléculas de glicose, onde o seu perfil de fragmentação originou íons de  $m/z$  179, relativo à separação das duas moléculas de glicose (Anexo 2e). O composto 12, íon  $[C_{12}H_{16}D_7O_{12}]^-$  de  $m/z$  366, foi identificado como aduto de glicose/glicose deuterada e seu perfil de fragmentação originou íons de  $m/z$  179, relativo à perda da molécula de glicose deuterada (Anexo 2f). O composto 13, íon  $[C_{12}H_9D_{14}O_{12}]^-$  de  $m/z$  373, foi identificado como aduto de duas moléculas de glicose deuterada e seu perfil de fragmentação originou íons de  $m/z$  186, relativo novamente à separação do aduto (Anexo 2g). O composto 14, íon  $[C_{12}H_{22}O_{11} + Cl]^-$  de  $m/z$  377, que corresponde a molécula de sacarose, foi identificado como aduto de cloro, onde seu perfil de fragmentação gerou íons de  $m/z$  341, relativo à perda do cloro e  $m/z$  179 oriundo da fragmentação da ligação glicosídica (Anexo 2h). O composto 15, íon  $[C_{14}H_{23}O_{15}]^-$  de  $m/z$  431, foi identificado como um aduto de frutofuranosil-glicopiranosídeo / ácido etanodióico, e sua fragmentação gerou íons de  $m/z$  341 oriundo da dissociação do aduto (Anexo 2i). O composto 16, íon  $[C_{18}H_{33}O_{17}]^-$  de  $m/z$  521, foi identificado como

aduto de sacarose / glicose e seu perfil de fragmentação é mostrado no Anexo 2j. O composto 17, íon  $[C_{18}H_{26}D_7O_{17}]^-$  de  $m/z$  528, foi identificado como sacarose / glicose D7. O composto 18 e 19, íons  $[C_{24}H_{43}O_{22}]^-$  e  $[C_{24}H_{44}O_{22} + Cl]^-$  de  $m/z$  683 e 719, foram identificados como adutos de duas moléculas de sacarose, em sua forma desprotonada e clorada, respectivamente. Os perfis de fragmentação dos compostos 17-19 são mostrados nos Anexos 2k-m. O composto 20, íon  $[C_{36}H_{65}O_{33}]^-$  de  $m/z$  1025, foi identificado como um cluster de sacarose e seu perfil de fragmentação gerou íons de  $m/z$  683 e 341, relativos à perda de uma e duas moléculas de sacarose, respectivamente (Anexo 2n).

**Tabela 4.** Compostos identificados nas frações glicídicas das amostras de banana.

$m/z$ (exp.)	Fórmula Molecular (M-H <sup>+</sup> ) <sup>-</sup>	DBE	Erro (ppm)	MS/MS	Molécula	
1	179.05618	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub>	1	-0,36	-	 Glucose
2	186.10013	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> D <sub>7</sub> O <sub>6</sub>	1	-0,42	-	 Glucose - D <sub>7</sub>
3	215.03286	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> ClO <sub>6</sub>	-	-0,34	179	 Glucose / Cloro
4	222.07681	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ClD <sub>7</sub> O <sub>6</sub>	-	-0,39	-	 Glucose - D <sub>7</sub> / Cloro
5	239.0774	C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> O <sub>8</sub>	1	-0,68	179	 Octapiranosose

6	269.05163	$C_8H_{13}O_{10}$	-	-0,78	-	 <p>Galatopiranosose / ácido ethanodioico</p>
7	297.11923	$C_{11}H_{21}O_9$	1	-0,42	-	 <p>Trihidroxi-2-metilbutil-glicopiranosídeo</p>
8	313.07783	$C_{10}H_{17}O_{11}$	-	-0,61	-	 <p>Glucose / Ácido Málico</p>
9	327.12995	$C_{12}H_{23}O_{10}$	1	-0,87	179	 <p>3-(2,3-Dihidroxipropoxi)-2-hidroxipropil galatopiranosídeo</p>
10	341.10905	$C_{12}H_{21}O_{11}$	2	-0,34	179, 161	 <p>Sacarose</p>
11	359.11968	$C_{12}H_{23}O_{12}$	-	-0,51	179	 <p>Glucose / Glucose</p>
12	366.16356	$C_{12}H_{16}D_7O_{12}$	-	-0,33	179	 <p>Glucose - <math>D_7</math> / Glucose</p>
13	373.20756	$C_{12}H_9D_{14}O_{12}$	-	-0,50	186	 <p>Glucose - <math>D_7</math> / Glucose - <math>D_7</math></p>

14	377.08586	$C_{12}H_{22}ClO_{11}$	-	-0,66	341, 179	 <p>Sacarose / Cloro</p>
15	431.10464	$C_{14}H_{23}O_{15}$	-	-0,91	341	 <p>Frutofuranosil-glicopiranosídeo / ácido etanodióico</p>
16	521.17259	$C_{18}H_{33}O_{17}$	-	-0,51	341	 <p>Sacarose / Glucose</p>
17	528.21655	$C_{18}H_{26}D_7O_{17}$	-	-0,54	341	 <p>Sacarose / Glucose - D<sub>7</sub></p>
18	683.22586	$C_{24}H_{43}O_{22}$	-	-1,04	341	 <p>Sacarose / Sacarose</p>
19	719.20286	$C_{24}H_{44}ClO_{22}$	-	-1,44	377	 <p>Sacarose / Sacarose / Cloro</p>
20	1025.34298	$C_{36}H_{65}O_{33}$	-	-1,58	683, 341	 <p>Sacarose / Sacarose / Sacarose</p>

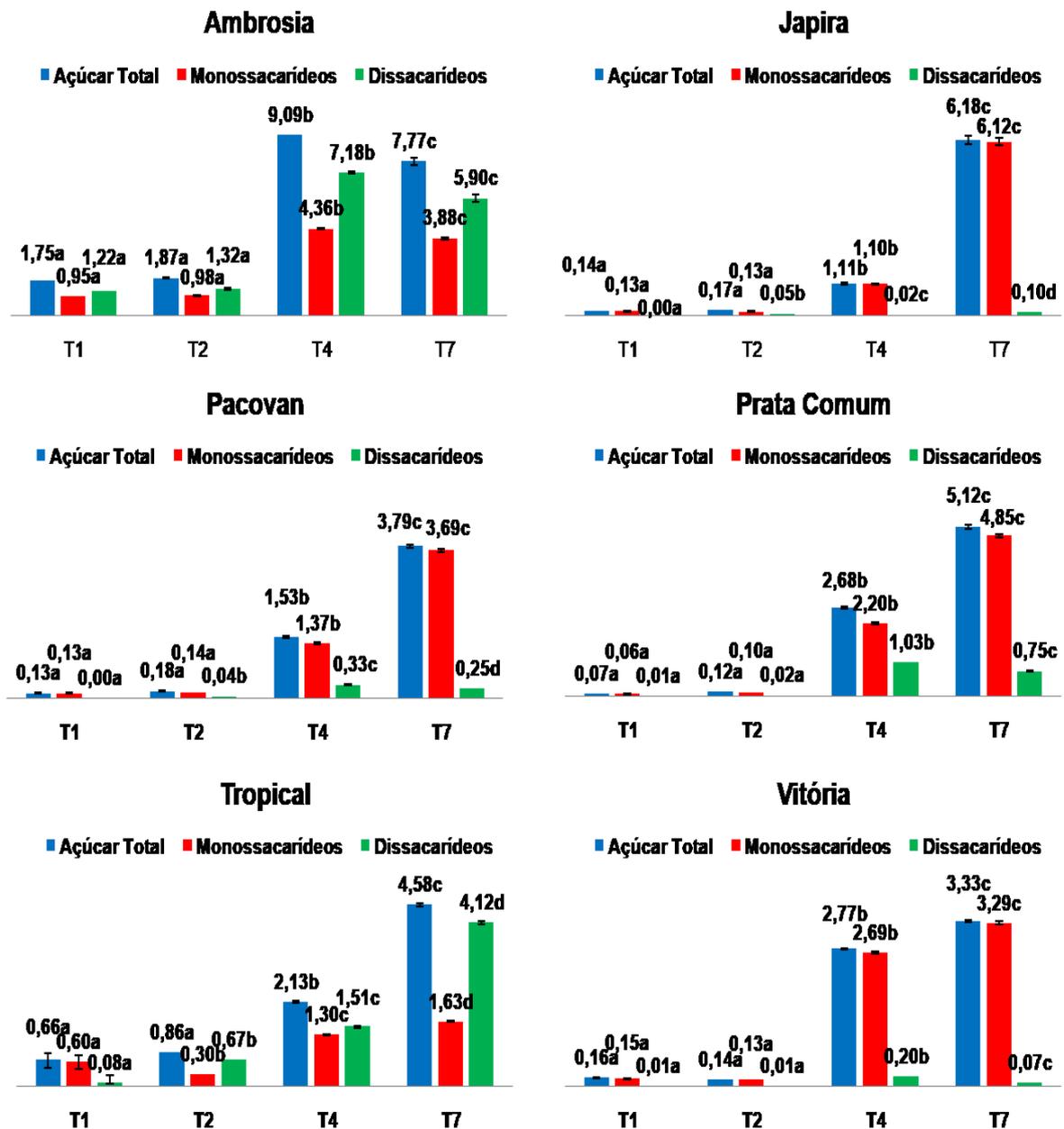
Para avaliar o perfil glicídico utilizando os dados de ESI(-)FT-ICR MS das seis cultivares de bananas em função dos quatro estádios de maturação estudados, foram construídos gráficos utilizando a razão da soma dos sinais de todos os açúcares detectados ( $m/z$  179, 215, 239, 269, 279, 313, 327, 341, 359, 377, 431, 521, 683, 719 e 1025) pela soma das intensidades dos sinais da glicose deuterada ( $m/z$  186, 222, 366, 373 e 528) (barra azul, Figura 19). Em geral, o teor de açúcares aumentou durante o processo de amadurecimento. A cultivar Ambrosia foi a que apresentou maiores teores de açúcares nos dois primeiros estádios de maturação. Esses resultados condizem com as medidas de SST e demonstram que essa cultivar apesar de apresentar aspectos visuais de uma fruta em estágio de maturação inicial (Estádio 1- totalmente verde; Estádio 2 - verde com traços amarelos), apresenta um comportamento em que, precocemente, ocorre a conversão de amido em carboidratos, como monossacarídeos e dissacarídeos.

Outra maneira de interpretar os dados de ESI(-) obtidos para as frações glicídicas, é analisar a razão dos sinais dos compostos monossacarídeos e dissacarídeos. A razão da soma das intensidades absolutas dos sinais dos monossacarídeos ( $m/z$  179, 215, 239, 269, 297, 313, 327, 359 e 521) pela soma das intensidades dos sinais da glicose deuterada ( $m/z$  186, 222, 366, 373 e 528) foi representada pelas barras vermelhas e a razão da soma das intensidades absolutas dos sinais dos dissacarídeos ( $m/z$  341, 377, 431, 521, 683, 719 e 1025) pela soma das intensidades dos sinais da glicose deuterada ( $m/z$  186, 222, 366, 373 e 528) foi representada pelas barras verdes (Figura 19).

As bananas do subgrupo Prata ('Japira', 'Vitória', 'Prata Comum' e 'Pacovan') apresentaram teor de monossacarídeos superior ao teor de dissacarídeos. Já as bananas dos subgrupos Gros Michel ('Ambrosia') e Maçã ('Tropical') apresentaram teor de dissacarídeos superior ao teor de monossacarídeos (Figura 19). A literatura mostra que a cultivar Gros Michel apresentou, nos primeiros dias de maturação, um maior teor de sacarose em relação aos teores de monossacarídeos. Entretanto, nos estádios finais de maturação o teor de monossacarídeos aumentou ultrapassando o teor de sacarose.<sup>114</sup>

Os açúcares podem ser classificados como açúcares redutores e não redutores. Os monossacarídeos, por apresentarem grupos aldeídos ou cetonas livres, são açúcares redutores e alguns dissacarídeos, como a sacarose, por

apresentarem ligações glicosídicas entre seus carbonos anoméricos, não possuem grupos aldeídos ou cetonas livres, sendo assim classificados como açúcares não redutores. O escurecimento não enzimático via reação de Maillard é uma importante reação de degradação de açúcares redutores que ocorre no fruto. Os produtos desta reação são compostos que interferem no aroma, sabor e cor dos frutos e, além disso, podem gerar características sensoriais indesejadas aos frutos, principalmente durante o processamento destes.<sup>115</sup> Desta forma, a relação entre os tipos de açúcares presentes no fruto (Figura 19) é uma informação importante. As frutas das cultivares Ambrosia e Tropical apresentaram teor de dissacarídeos superior ao teor de monossacarídeos (açúcares redutores). Os dissacarídeos majoritariamente encontrados nestas cultivares são classificados como açúcares não redutores e por isso não contribuem para o escurecimento não enzimático via reação de Maillard, tornando assim, estas duas cultivares menos susceptíveis ao escurecimento não enzimático.<sup>116</sup>

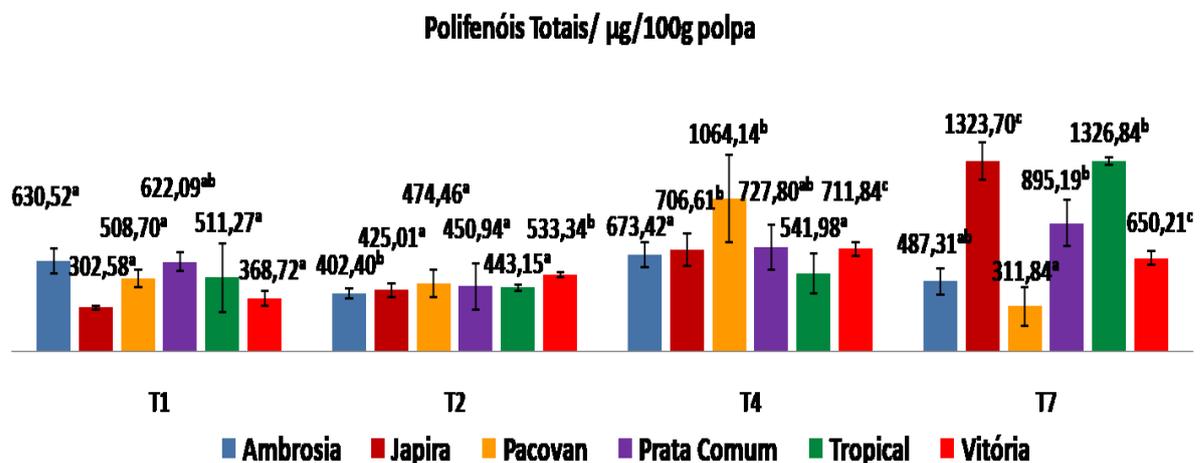


**Figura 19.** Gráfico das razões das somas das intensidades absolutas dos sinais dos açúcares da fruta pela soma dos sinais do dopante (glicose deuterada). Letras iguais indicam que as amostras não apresentam diferenças significativas entre si e letras diferentes indicam que as amostras apresentam diferenças significativas entre si. A comparação foi realizada entre as amostras de uma mesma cultivar em seus estádios de maturação.

### 3.4.3 Análise de Polifenóis Totais

As amostras de banana analisadas apresentaram teores variando entre os diferentes estádios na faixa de 302,58 a 1323,70  $\mu\text{g}$  EqAG/100 g de polpa in natura (Figura 20). Para a cultivar Prata comum, os teores de polifenóis totais não foram diferentes entre os estádios 1, 2 e 4, porém o estágio 7 apresentou o maior teor de

polifenóis observado (Figura 20). Para a cultivar Vitória o teor de polifenóis aumentou do estágio 1 até o estágio 4 e se manteve constante até o estágio 7. Na cultivar Pacovan, o teor de fenóis foi maior no estágio de maturação 4 e na cultivar Ambrosia, ele foi maior no estágio 2. Na cultivar Tropical, o estágio de maturação 7 foi o mais rico em polifenóis. Na cultivar Japira o teor de polifenóis aumentou a partir do estágio 4 até o estágio 7. Os teores de polifenóis totais destas cultivares são menores que os descritos na literatura para as cultivares Terra, Mysore, Figo, Pacovan e Nanicão.<sup>100</sup> Entretanto, os dados da literatura são relativos a amostras secas de polpa e os resultados deste trabalho são relativos à polpa *in natura*.



**Figura 20.** Concentração de Polifenóis Totais, em  $\mu\text{g}$  ác.gálico / 100 g polpa *in natura*.

#### 3.4.4 Perfil Fenólico por ESI(-)FT-ICR MS

Espectros de ESI(-)FT-ICR MS foram adquiridos dos extratos polifenólicos das seis cultivares de bananas em quatro estádios de maturação e os resultados para o estágio 7, por exemplo, são mostrados na Figura 21.

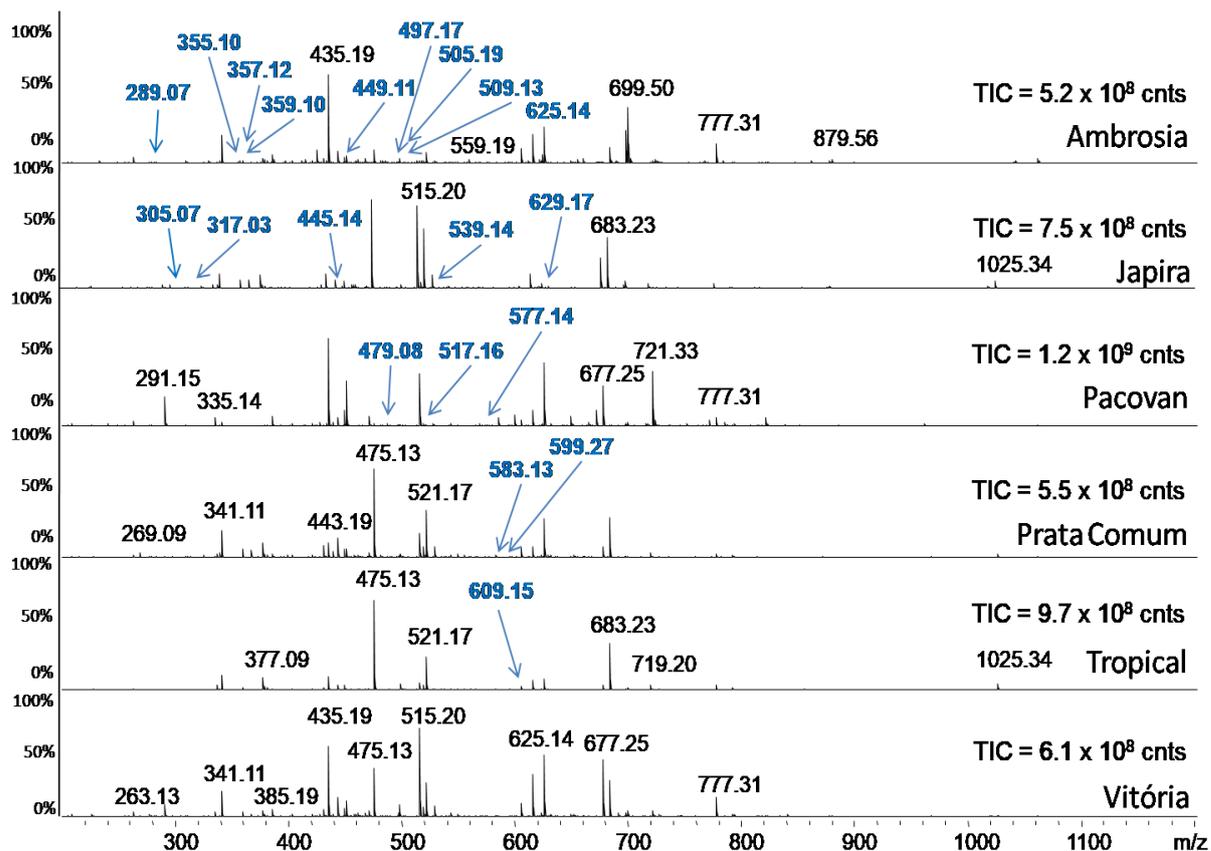


Figura 21. Espectros de ESI(-)FT-ICR MS das seis cultivares de bananas no estágio de maturação 7.

A Tabela 5 mostra os valores de  $m/z$ , DBE, erros de massas (em ppm) dos vinte compostos polifenólicos identificados, sendo treze deles, não reportados na literatura para a banana.

O composto 1, íon  $[C_{15}H_{13}O_6]^-$  de  $m/z$  289 foi identificado como epicatequina. Seu perfil de fragmentação mostrou fragmento de  $m/z$  245, relativo à perda da fração  $C_2H_4O$  (-44 Da) (Anexo 3a). O composto 2, íon  $[C_{15}H_{13}O_7]^-$  de  $m/z$  305 foi identificado como galocatequina. O composto 3, íon  $[C_{15}H_9O_8]^-$  de  $m/z$  317, foi identificado como uma flavona. Seu perfil de fragmentação mostrou fragmentos de  $m/z$  289, relativo à perda de  $CO$  (-28 Da) e  $m/z$  273, relativo à perda de  $CO_2$  (-44 Da) (Anexo 3b). O composto 4, íon  $[C_{16}H_{19}O_9]^-$  de  $m/z$  355, foi identificado como ácido ferúlico hexosídeo. Seu perfil de fragmentação mostrou fragmentos de  $m/z$  309, oriundo da perda de  $CH_2O_2$  (-46 Da),  $m/z$  193 (-162 Da) e  $m/z$  175 (-180 Da) relativos às fragmentações na fração hexosídeo (Anexo 3c). O composto 5, íon  $[C_{16}H_{21}O_9]^-$  de  $m/z$  357, foi atribuído como derivado do ácido cinâmico hexosídeo. Os resultados de ESI(-)MS/MS gerou íon  $m/z$  283 (-74 Da), oriundo da perda de fração do anel hexosídeo ( $C_3H_6O_2$ ) (Anexo 3d).

O composto 6, íon  $[C_{15}H_{19}O_{10}]^-$  de  $m/z$  359 foi identificado como derivado do ácido gálico hexosídeo. Seu perfil de fragmentação mostrou fragmentos de  $m/z$  284 (-75 Da),  $m/z$  239 (-120 Da) e  $m/z$  197 (-164 Da), relativo às fragmentações no anel hexosídeo (Anexo 3e). O composto 7, íon  $[C_{19}H_{25}O_{12}]^-$  de  $m/z$  445 foi identificado como um derivado do acetil hidroxifenilhexosídeodeoxihexosídeo. O experimento de CID gerou o fragmento de  $m/z$  265 (-180 Da), relativo à perda da fração hexosídeo (Anexo 3f). O composto 8, íon  $[C_{21}H_{21}O_{11}]^-$  de  $m/z$  449 foi identificado como derivado do ácido cafeico. Seu perfil de fragmentação mostrou fragmentos de  $m/z$  287 (-162 Da),  $m/z$  269 (-180 Da), oriundos das fragmentações no anel hexosídeo (Anexo 3g). O composto 9, íon  $[C_{21}H_{19}O_{13}]^-$  de  $m/z$  479, foi identificado como um Flavonol hexosídeo. Seu perfil de fragmentação mostrou fragmentos de  $m/z$  317 (-162 Da),  $m/z$  273 (-44 Da), oriundos da perda do anel hexosídeo e  $CO_2$ , respectivamente (Anexo 3h). O composto 10, íon  $[C_{23}H_{29}O_{12}]^-$  de  $m/z$  497, foi identificado como um derivado do ácido gálico. O experimento de ESI(-)MS/MS gerou íon  $m/z$  453 (-44 Da), relativo à perda de  $CO_2$  da fração carboxílica (Anexo 3i).

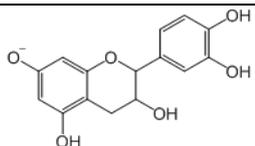
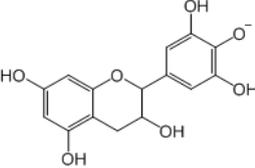
O composto 11, íon  $[C_{22}H_{33}O_{13}]^-$  de  $m/z$  505 foi identificado como um derivado do dihidroxifenildihexosídeo. Seu perfil de fragmentação mostrou fragmentos de  $m/z$  325 (-180 Da), oriundos da perda da fração hexosídeo (Anexo 3j). O composto 12, íon  $[C_{23}H_{25}O_{13}]^-$  de  $m/z$  509, foi identificado como um Flavonol hexosídeo hidratado. O experimento de ESI(-)MS/MS gerou o fragmento de  $m/z$  347 (-162 Da) e  $m/z$  329 (-180 Da) relativo à fragmentações no anel hexosídeo (Anexo 3k). O composto 13, íon  $[C_{22}H_{29}O_{14}]^-$  de  $m/z$  517 foi identificado como ácido ferúlico dihexosídeo. O composto 14, íon  $[C_{24}H_{27}O_{14}]^-$  de  $m/z$  539 foi identificado como um Flavonol hexosídeo hidratado. Seu perfil de fragmentação mostrou fragmentos de  $m/z$  449 (-90 Da),  $m/z$  435 (-104 Da),  $m/z$  359 (-180 Da), oriundos de perdas de fração do anel hexosídeo e  $m/z$  287 (-252 Da), relativo à fragmentação do flavonol hidratado (Anexo 3l).

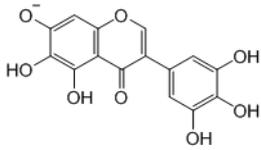
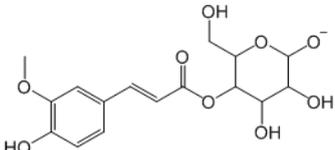
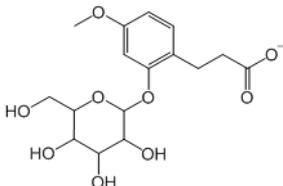
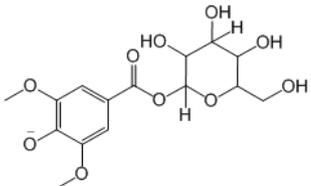
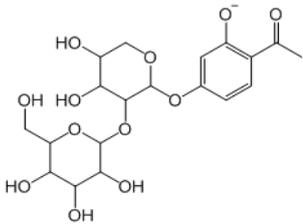
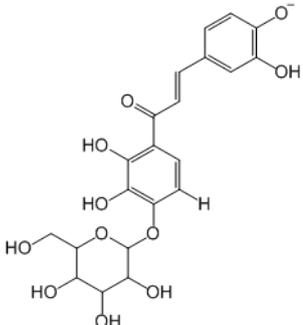
O composto 15, íon  $[C_{30}H_{25}O_{12}]^-$  de  $m/z$  577 foi identificado como proantocianidina. O composto 16, íon  $[C_{25}H_{27}O_{16}]^-$  de  $m/z$  583 foi identificado como uma xantona dihexosídeo. Seu perfil de fragmentação mostrou fragmentos de  $m/z$  421 (-162 Da), oriundos de perdas de fração do anel hexosídeo (Anexo 3m). O composto 17, íon  $[C_{29}H_{43}O_{13}]^-$  de  $m/z$  599 foi identificado como Hidroximetilfenil substituído. O experimento de ESI(-)MS/MS gerou o fragmento de  $m/z$  581 (-18 Da), oriundo à perda de  $H_2O$ . Além desse, os fragmentos à  $m/z$  567 (-32 Da),  $m/z$  579 (-

120 Da),  $m/z$  437 (-162 Da) correspondem às fragmentações no anel hexosídeo. Finalmente, o fragmento  $m/z$  419 (-180 Da) é produzido a partir da perda da fração hexosídeo (Anexo 3n). O composto 18, íon  $[C_{27}H_{29}O_{16}]^-$  de  $m/z$  609, foi identificado como quercetina deoxihexosehexosídeo. Seu perfil de fragmentação mostrou fragmentos de  $m/z$  300 (-309 Da), oriundo da perda dos anéis hexosídeos e  $m/z$  279 (-330 Da) relativo a fragmentação na fração deoxihexose. (Anexo 3o). O composto 19, íon  $[C_{27}H_{29}O_{17}]^-$  de  $m/z$  625, foi identificado como miricetina deoxihexosehexosídeo. O experimento de ESI(-)MS/MS gerou íon  $m/z$  316 (-309 Da), oriundo à perda dos anéis hexosídeos (Anexo 3p). O composto 20, íon  $[C_{27}H_{33}O_{17}]^-$  de  $m/z$  629 foi identificado como leucodelfinidina deoxihexopiranosilhexopiranose. Seu perfil de fragmentação mostrou fragmentos de  $m/z$  449 (-180 Da), oriundo da perda de um anel glicídico (Anexo 3q).

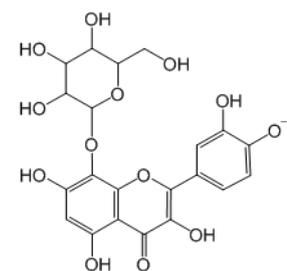
Os compostos epicatequina e galocatequina já haviam sido reportados em bananas das cultivares Figo, Nanicão, Terra, Mysore e Pacovan.<sup>100</sup> Além disso, Galocatequina já foi identificado na cultivar Cavendish (Someya, Yoshiki, Okubo, 2002).<sup>117</sup> Os compostos ácido ferúlico hexosídeo, ácido ferúlico dihexosídeo, quercetina deoxihexosehexosídeo e miricetina deoxihexosehexosídeo já foram identificados em bananas das cultivares RedYade<sup>118</sup>, Mbeta 1, RedYade, Essang, Moto Ebanga, Mbouroukou N°1 e um híbrido F568.<sup>119</sup> O composto proantocianidina já foi identificado em banana em outros trabalhos.<sup>120</sup>

**Tabela 5.** Identificação por ESI(-)FT-ICR MS de compostos fenólicos presentes em amostras de banana.

	$m/z$ (exp.)	Fórmula Molecular (M-H <sup>+</sup> ) <sup>-</sup>	DBE	Erro (ppm)	MS/MS	Molécula
1	289.07201	C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> O <sub>6</sub>	9	-0,86	245, 202	 <p>Epicatequina</p>
2	305.06686	C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> O <sub>7</sub>	9	3,79	-	 <p>Galocatequina</p>

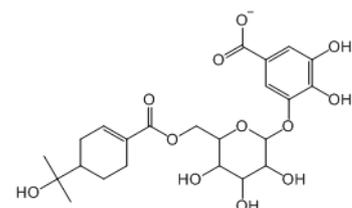
3	317.03050	$C_{15}H_9O_8$	11	-0,66	289, 273, 229	 <p>Flavona</p>
4	355.10370	$C_{16}H_{19}O_9$	7	-0,69	309, 193, 175, 160	 <p>Ácido Ferúlico hexosídeo</p>
5	357.11928	$C_{16}H_{21}O_9$	6	-0,49	283, 202	 <p>Derivado do ácido cinamico hexosídeo</p>
6	359.09893	$C_{15}H_{19}O_{10}$	6	-1,57	284, 239, 197	 <p>Derivado do ácido gálico hexosídeo</p>
7	445.13548	$C_{19}H_{25}O_{12}$	7	-0,74	265	 <p>Derivado do acetil hidroxifenilhexosídeoodeoxih exosídeo</p>
8	449.10938	$C_{21}H_{21}O_{11}$	11	-1,00	287, 269	 <p>Derivado do ácido cafeico</p>

9 479.08363 C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>O<sub>13</sub> 12 -1,07 443, 341, 317, 273



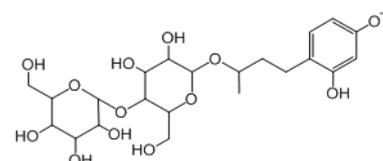
Flavonol hexosídeo

10 497.16767 C<sub>23</sub>H<sub>29</sub>O<sub>12</sub> 9 -2,46 453



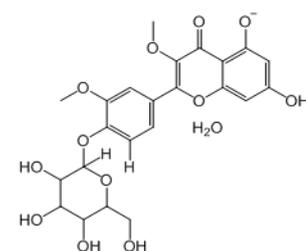
Derivado do ácido gálico

11 505.19373 C<sub>22</sub>H<sub>33</sub>O<sub>13</sub> 6 -2,11 325



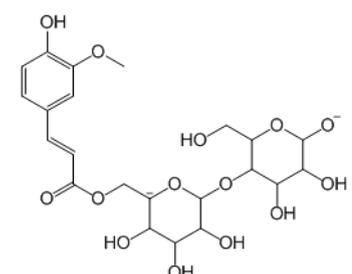
Derivado do  
Dihidroxifenildihexosídeo

12 509.13054 C<sub>23</sub>H<sub>25</sub>O<sub>13</sub> 11 -0,94 347, 329, 280, 253, 202



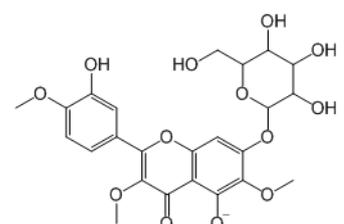
Flavonol hexosídeo hidratado

13 517.15732 C<sub>22</sub>H<sub>29</sub>O<sub>14</sub> 8 -2,01 -



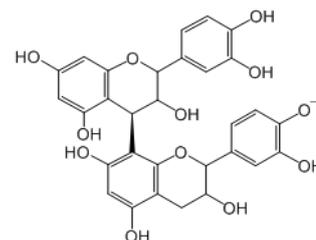
Ácido ferúlico dihexosídeo

14 539.14124 C<sub>24</sub>H<sub>27</sub>O<sub>14</sub> 11 -1,13 449, 435, 359, 287, 283, 255



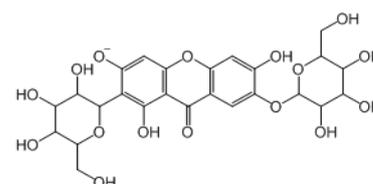
Flavonol hexosídeo hidratado

15 577.13586 C<sub>30</sub>H<sub>25</sub>O<sub>12</sub> 18 -1,22 -



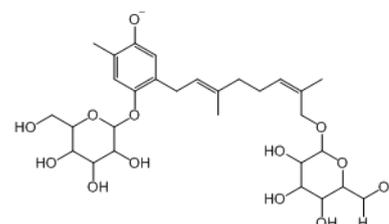
Proantocianidina

16 583.13134 C<sub>25</sub>H<sub>27</sub>O<sub>16</sub> 12 -1,51 421



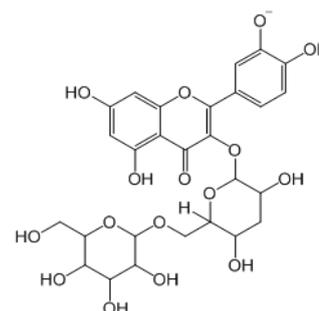
Xantona dihexosídeo

17 599.27163 C<sub>29</sub>H<sub>43</sub>O<sub>13</sub> 8 -1,19 581, 567, 479, 437, 419, 331



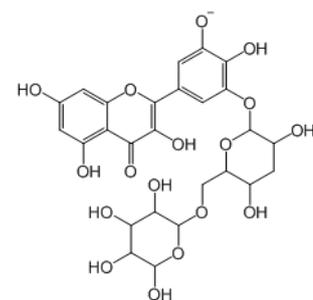
Hidroximetilfenil substituído

18 609.14724 C<sub>27</sub>H<sub>29</sub>O<sub>16</sub> 13 -1,85 435, 300, 279, 255



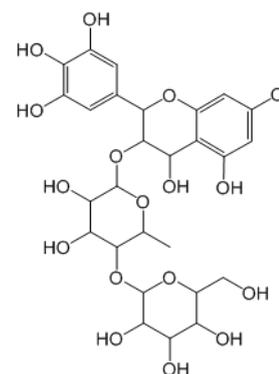
Quercetina  
deoxihexosehexosídeo

19 625.14178 C<sub>27</sub>H<sub>29</sub>O<sub>17</sub> 13 -1,21 316



Miricetina  
deoxihexosehexosídeo

20 629.17330 C<sub>27</sub>H<sub>33</sub>O<sub>17</sub> 11 -1,56 449

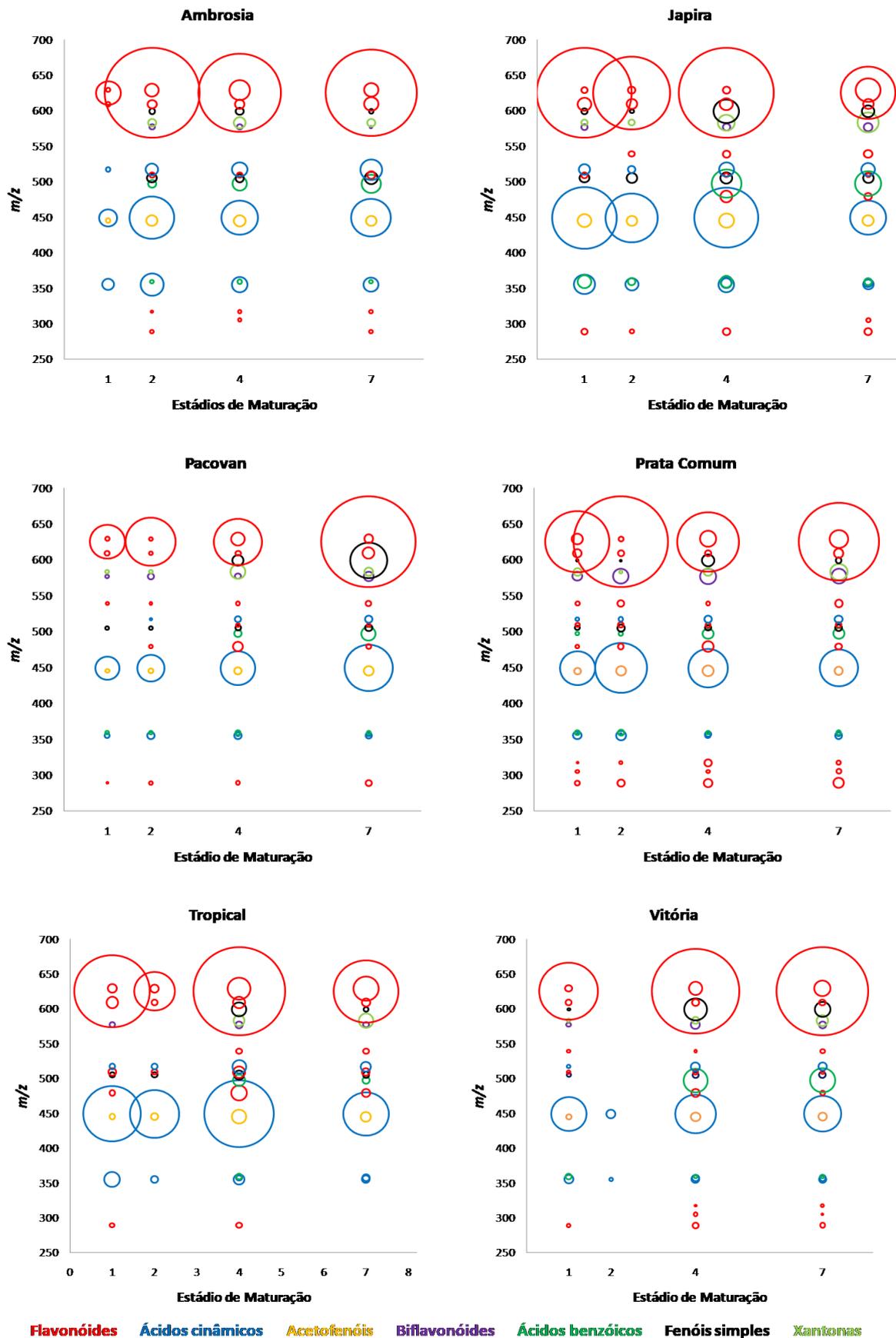


Leucodelphinidina  
Deoxihexopiranosil  
hexopiranosil

Para traçar o perfil fenólico das seis cultivares de bananas em quatro estádios de maturação, foram construídos gráficos de bolhas utilizando os vinte sinais de polifenóis detectados nos espectros de FT ICR-MS. Na abscissa foram plotados os valores de  $m/z$  e nas ordenadas os estádios de maturação. As intensidades relativas dos sinais de cada polifenol foram representadas pelo tamanho das bolhas, ou seja, quanto maior a bolha maior a intensidade do sinal. Além disso, os polifenóis foram classificados, utilizando cores diferentes, de acordo com suas classes fitoquímicas, conforme legenda mostrada na Figura 22.

Em todas as amostras, os flavonóides foram os compostos mais abundantes, tanto em quantidade e abundância de compostos identificados (bolhas vermelhas) (Figura 22). O flavonóide mais abundante foi o Miricetina deoxihexosehexosídeo, de  $m/z$  625. A Miricetina é um poderoso antioxidante e anti-inflamatório. Além disso, estudos comprovaram sua capacidade de inibir as principais enzimas envolvidas na iniciação e progressão do câncer.<sup>121</sup>

A classe dos ácidos cinâmicos foi à segunda classe identificada com os sinais de maior intensidade relativa, em todas as amostras (bolhas azuis). Dentre os ácidos cinâmicos encontrados, o que apresentou maior intensidade, foi o íon de  $m/z$  449, que foi identificado como um derivado do ácido cafeico. Trabalhos anteriores comprovaram que o ácido cafeico apresentaram boas atividades antioxidante e anticarcinogênese.<sup>122</sup>



**Figura 22.** Classes de polifenóis de seis cultivares de banana em quatro estádios de maturação. O tamanho das bolhas é diretamente proporcional à intensidade relativa dos picos no espectro.

### 3.4.5 Atividade Quimiopreventiva de Câncer

Os resultados dos ensaios de indução da Quinona Redutase (QR), inibição de produção de óxido nítrico (iNOS), inibição de NF- $\kappa$ B e inibição de aromatase são mostrados na Tabela 6.

A redução de quinonas eletrofílicas por ação de enzimas quinonas redutase é uma importante via de detoxificação que reduz o ciclo oxidativo.<sup>15</sup> As amostras foram avaliadas em termos de sua capacidade de indução de formação de enzima quinona redutase. Das amostras testadas, apenas a cultivar Tropical no estágio de maturação 2 apresentou boa indução da quinona redutase (IR = 2). Ensaios de inibição da quinonaredutase já haviam sido realizados em amostras de bananas selvagens da espécie *Musa balbisiana*. Alguns compostos extraídos destas frutas apresentaram atividade na indução da QR.<sup>23</sup>

Alguns trabalhos demonstram que NF- $\kappa$ B é superexpressado e ativado em vários tipos de câncer.<sup>123</sup> NF- $\kappa$ B foi identificado como um importante marcador em células tumorais de Hodgkin<sup>124</sup> e câncer de mama.<sup>125</sup> O extrato da cultivar Pacovan, estágio de maturação 2, apresentou 87 % de inibição de NF- $\kappa$ B, os demais extratos apresentaram baixa taxa de inibição (Tabela 6).

A iNOs tem sido associada a muitos tumores e à progressão<sup>34</sup>, como por exemplo câncer de próstata<sup>126</sup> e mama.<sup>127</sup> Em todos os extratos testados, houve alta inibição da iNOs, o que mostra alta capacidade de quimioprevenção.

Os extratos das bananas Japira, nos estágios de maturação 2, 4 e 7 e Ambrosia, estágio 4, apresentaram inibição de aromatase superior a 50%. Os tecidos do câncer de mama expressam a aromatase e produzem níveis mais elevados de estrogênios do que as células saudáveis.<sup>128</sup> Desta forma, a inibição da aromatase é importante à saúde humana.

**Tabela 6.** Atividades quimiopreventivas de seis cultivares de banana.

<b>Cultivar – Estádio de Maturação</b>	<b>Quinona Redutase (IR)</b>	<b>Nf-KB % Inibição</b>	<b>iNOS % Inibição</b>	<b>Aromatase % Inibição</b>
Pacovan - T1	1±0,1	0,0±0,0	95.4±13.5	0,0±0,0
Pacovan - T2	1 ±0,0	87,38±2,5	108.0±18.6	10 ±1,5
Pacovan - T4	1±0,3	6,14±3,0	107.5±17.3	0,0±0,0
Pacovan - T7	1±0,0	3,36±0,0	78.3±7.5	0,0±0,0
Japira - T1	1±0,0	0,0±0,0	96.8±16.3	0,0±0,0
Japira - T2	1±0,0	0,0±0,0	105.8±21.7	77,2±3,3
Japira - T4	1±0,2	2,0±0,5	98.3±14.4	116,7±35,3
Japira - T7	1±0,0	0,0±0,0	83.6±2.8	55,2±24,0
Vitória - T1	1±0,0	5,6±1,5	91.6±3.6	0,0±0,0
Vitória - T2	1±0,0	14,3±5,8	116.1±29.7	43,2±20,5
Vitória - T4	1±0,4	0,0±0,0	100.1±11.1	0,0±0,0
Vitória - T7	1±0,0	11,9±2,5	87.9±2.8	0,0±0,0
Tropical - T1	1 ±0,0	0,0±0,0	88.6±11.0	0,0±0,0
Tropical - T2	2±0,2	3,8±0,9	98.4±21.4	0,0±0,0
Tropical - T4	1±0,0	4,8±1,4	86.4±16.6	0,0±0,0
Tropical - T7	1±0,3	0,0±0,0	69.6±12.2	0,0±0,0
Ambrosia - T1	1±0,0	16,2±0,7	87.7±7.2	0,0±0,0
Ambrosia - T2	1±0,0	0,0±0,0	90.8±17.3	0,0±0,0
Ambrosia - T4	1±0,1	0,0±0,0	86.8±17.2	95,3±1,3
Ambrosia - T7	1±0,0	0,0±0,0	82.4±7.7	19 ±1,5
Prata Comum -T1	1±0,4	0,0±0,0	98.8±16.47	19 ±2,1
Prata Comum -T2	1±0,1	0,0±0,0	105.6±21.9	30,9±1,5
Prata Comum -T4	1 ±0,7	5,49±2,1	103.3±13.5	43,3±20,5
Prata Comum -T7	1 ±0,3	0,0±0,0	85.7±5.4	0,0±0,0

### 3.5 CONCLUSÕES

Ainda são escassos os trabalhos que investigam a nível molecular o perfil fenólico e glicídico associado à maturação destes cultivares de banana. A partir dos dados deste trabalho foi possível observar que o aumento do teor de carboidratos nos frutos, durante a maturação, ocorre de forma diferente a depender da cultivar da banana. As bananas do subgrupo Prata (Japira, Vitória, Prata Comum e Pacovan) apresentaram teor de monossacarídeos superior ao teor de dissacarídeos e as dos subgrupos Gros Michel (Ambrosia) e Maçã (Tropical) apresentaram teor de dissacarídeos superior ao teor de monossacarídeos. O perfil polifenólico destas amostras indicou uma predominância de flavonóides e ácidos cinâmicos, sendo vinte polifenóis detectados. Todas as amostras avaliadas apresentaram potencial quimiopreventivo de câncer, associada à capacidade de inibição da produção de óxido nítrico. Além disso, a cultivar Pacovan, estágio de maturação 2, apresentou alta inibição de NF- $\kappa$ B enquanto a cultivar Japira, nos estádios de maturação 2, 4 e 7 e Ambrosia, estágio 4, apresentaram inibição de aromatase superior a 50%.

## 4. PERFIL FENÓLICO DE FRUTOS DA PALMEIRA JUÇARA (*Euterpe edulis* MARTIUS)

### 4.1 INTRODUÇÃO

#### 4.1.1 Os Frutos da Palmeira Juçara

A juçara é um fruto de cor violeta e com propriedades sensoriais e nutricionais semelhantes ao açaí nativo da região amazônica (*Euterpe oleracea* Martius). A juçara é uma fruta oriunda da palmeira juçara (*Euterpe edulis* Martius) e é uma planta nativa da Mata Atlântica (Figura 23).<sup>129 - 131</sup>



**Figura 23.** Fotografia de um cacho de juçara.<sup>134</sup>

A palmeira juçara é vastamente explorada para a colheita de palmito, uma vez que esse possui alto valor comercial. Até a década de 40 a exploração da palmeira era feita de modo controlado, entretanto a partir desta época a exploração aumentou e com a instalação de indústrias de conserva de palmito no Espírito Santo, na

década de 60, essa exploração se tornou predatória. Para essa exploração é necessário cortar o tronco da palmeira matando-a, pois não há rebrota nesta planta. Desta forma, seu extrativismo acarretou em ameaça de extinção da espécie.<sup>132 - 134</sup>

Os frutos da palmeira juçara servem de alimento para diversos animais da Mata Atlântica, como por exemplo, tucanos, jacus, jacutingas, mutuns, arapongas, sabiás, bem-te-vis, marsupiais, primatas e morcegos.<sup>134, 135</sup> Além disso, a palmeira juçara por ser resistente a umidade é importante para formação de vegetação ciliar, proporcionando diminuição de açoreamento de rios da Mata Atlântica.<sup>134, 136</sup>

Por essa razão a estimulação de substituição da extração do palmito pela extração e consumo da polpa é importante, uma vez que a extração da fruta não mata a palmeira e possibilita o plantio das sementes após o despulpamento.<sup>129, 137</sup> Sendo assim, trabalhos voltados a investigar a composição química e propriedades benéficas à saúde desta fruta são importantes.

## 4.2 OBJETIVO

Estudar o perfil fenólico dos frutos da palmeira juçara (*Euterpe edulis* Martius).

## 4.3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.3.1 Amostras

O Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER) coletou, na Reserva Biológica Santa Lucia, Santa Teresa e Domingos Martins (Reserva Particular) ES, Brasil, sete populações de juçara. Os frutos foram congelados a -20 °C até o despulpamento. Dos sete genótipos coletados seis possuem genótipo do tipo selvagem (J1 – J6) e um deles é relativo a uma espécie diferente denominada *Euterpe spiritosantense* (J7). Para futuro cultivo e preservação da informação genética, as amostras foram depositadas no Banco de Germoplasma de juçara do INCAPER.

Frutos maduros foram deixados em banho-maria a 40 °C por 30 minutos. Em seguida os frutos foram amassados manualmente com adição de água para o despulpamento.<sup>138</sup> A polpa foi liofilizada e material foi guardado ao abrigo da luz e refrigerados a -20 °C.<sup>139, 140</sup>

### 4.3.2 ESI-FT-ICR MS e ESI-FT-ICR MS / MS

Para extração de polifenóis e injeção no FT-ICR MS, foram adicionados 10 mL de uma mistura de metanol, etanol e acetona (1:1:1 V/V) a 1 g de polpa liofilizada e deixadas em banho ultrassônico com frequência de 40 KHz por 1 h. Posteriormente, o extrato foi filtrado em papel Unifil<sup>®</sup> faixa preta. Em seguida, 250 µL do extrato *E. edulis* e 1 µL da solução de NH<sub>4</sub>OH PA (Vetec Química Fina Ltda, Brasil) foram injetados no FT-ICR MS.

Os espectros foram obtidos no modo negativo em uma faixa de massa  $m/z$  200-2000. As condições da fonte ESI foram: pressão do gás nebulizador de 2,0 Bar, voltagem capilar de 2,5 kV e temperatura de transferência no capilar de 280 °C. O tempo de acumulação dos íons foi de 0,001 s. Cada espectro foi adquirido pelo acúmulo de 100 varreduras.

Os espectros de massa foram adquiridos e processados utilizando o software Compass Data Analysis (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). As fórmulas estruturais dos compostos foram obtidas através do software da base de dados chemspider ([www.chemspider.com](http://www.chemspider.com)).

Para os experimentos de MS/MS, a janela do quadrupolo foi fechada em um intervalo de 1 Da, proporcionando o isolamento do íon de interesse. Posteriormente, o íon é conduzido para o interior de uma cela de colisão (hexapolo) com energia de colisão variando entre 3 - 20 V, sendo Argônio o gás de colisão utilizado. A fim de aumentar a quantidade de íons na cela ICR, o tempo de acumulação de íons no hexapolo (ionaccumulation time) foi 0,1 s. Cada espectro foi adquirido a partir da acumulação de 100 scans.<sup>139, 140</sup>

### 4.3.3 LCQ Fleet Ion Trap MS / MS

Para experimentos de MS/MS, 100 uL foram diluídos em 1,4 mL de metanol e adicionados 10 uL de NH<sub>4</sub>OH. As condições do equipamento foram: tensão da fonte 3.5 kV, temperatura do vaporizador 170 °C, tensão capilar -10 V, temperatura capilar 275 °C e tensão da lente do Tubo -50 V.<sup>139, 140</sup>

## 4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.4.1. Perfil Fenólico

Foram adquiridos espectros de ESI(-)FT-ICR MS de todas as amostras de juçara (Figura 24).

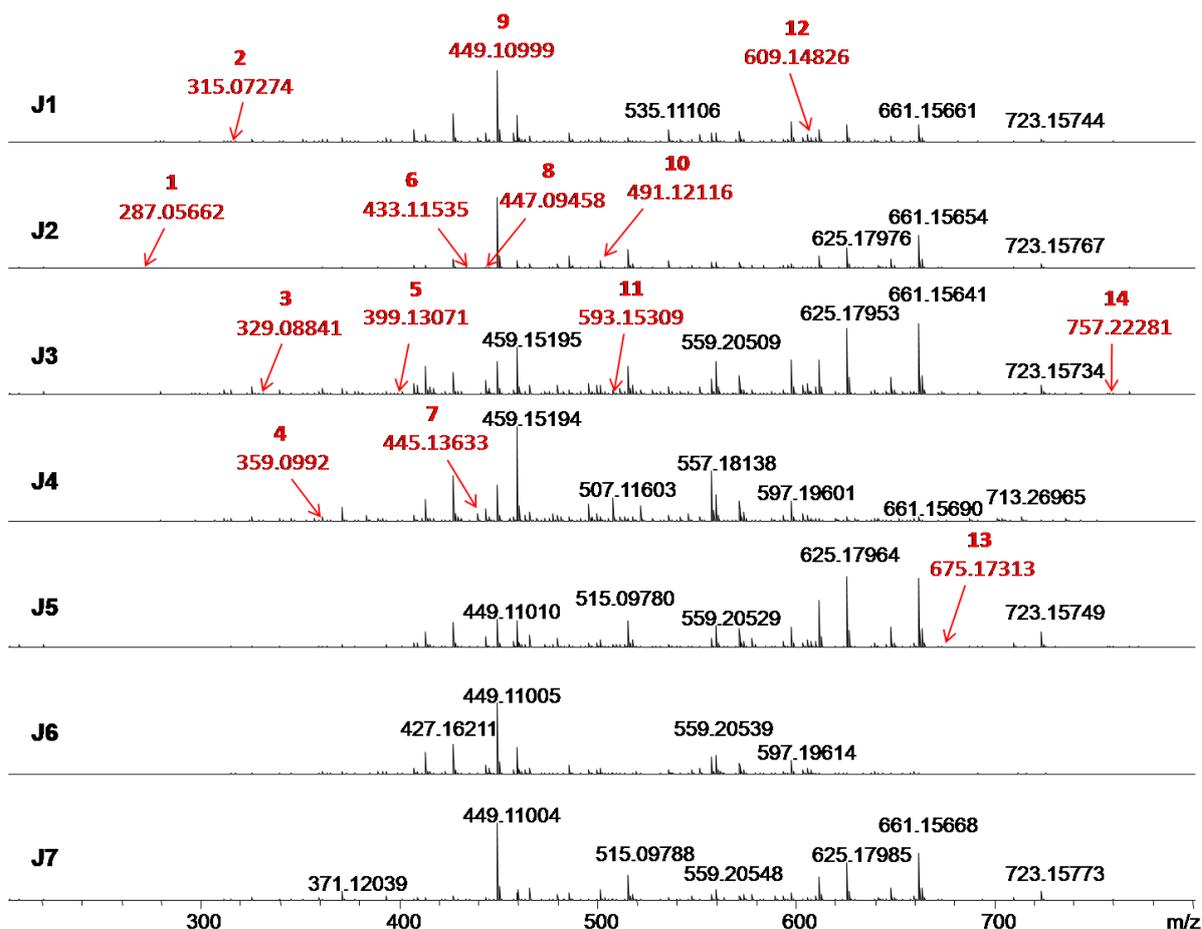


Figura 24. Perfil ESI (-) - FT-ICR MS de sete populações de juçara.<sup>139, 140</sup>

A altíssima resolução e exatidão do FT-ICR MS permitiu a identificação de 14 polifenóis (Tabela 7).

O composto 1, de  $m/z$  287, íon  $[C_{15}H_{11}O_6]^+$ , foi atribuído como dihidrokaempferol. O experimento de fragmentação mostrou fragmentos de  $m/z$  259 (perda de  $CO$ , - 28 Da) (Anexo 4a). O Dihidrokaempferol já havia sido reportado em amostras de açai.<sup>141, 142</sup> O composto 2, de  $m/z$  315, íon  $[C_{13}H_{15}O_9]^+$ , foi atribuído como ácido protocatecuico hexosídeo. Experimento de fragmentação  $MS^2$  mostrou fragmentos de  $m/z$  271 (- 44 Da), oriundo da perda de  $CO_2$  e fragmento de  $m/z$  153 (- 163 Da), oriundo da perda da fração hexosídeo (Anexo 4b1). A fragmentação  $ms^3$  do íon de  $m/z$  271, mostrou perda de 73, 45 e 30 Da, oriundos de fragmentações ocorridas no anel hexosídeo (Anexo 4b2) e a fragmentação  $ms^3$  do íon de  $m/z$  153, mostrou perda de 44 Da, referente a perda de  $CO_2$  (Anexo 4b3). Ácido protocatecuico hexosídeo já havia sido reportado em amostras de açai.<sup>141</sup> O

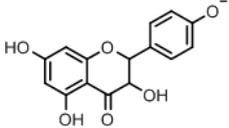
composto 3, de  $m/z$  329, íon  $[C_{14}H_{17}O_9]^-$  foi atribuído como hidroxibenzoato de metila hexosídeo. Experimento de fragmentação  $MS^2$  mostrou fragmentos de  $m/z$  314 (-15 Da) oriundo da perda de radical metila da porção éster,  $m/z$  270 (-60 Da) devido a perda da porção éster ligada ao anel fenólico e  $m/z$  242 (-59 Da e -29 Da) oriundo a perda da porção éster ligada ao anel fenólico e fragmento da fração hexosídeo, respectivamente (Anexo 4c1). A fragmentação  $MS^3$  do íon de  $m/z$  242 gerou fragmento de  $m/z$  213 (-31 Da) devido a perda de fragmento da fração hexosídeo (Anexo 4c2). Este ácido fenólico não havia sido descrito em amostras de açaí amazônico ou juçara. O composto 4, de  $m/z$  359, íon  $[C_{15}H_{19}O_{10}]^-$ , foi atribuído como ácido siríngico hexosídeo. O experimento de fragmentação gerou sinais com  $m/z$  197 (-162 Da) e  $m/z$  182 (-181 Da), oriundos de fragmentações na fração hexosídeo (Anexo 4d). Este ácido fenólico já havia sido reportado em açaí.<sup>143</sup> O composto 5, de  $m/z$  399, íon  $[C_{18}H_{23}O_{10}]^-$ , foi atribuído como um derivado do ácido feruloil sinápico, que já havia sido reportado em amostra de açaí.<sup>141</sup> O ensaio de fragmentação gerou íons de  $m/z$  382 (-17 Da) oriundo da perda de hidroxila da porção hexosídeo,  $m/z$  236 (-163 Da) e  $m/z$  223 (-177 Da) oriundos de perdas da fração hexosídeo (Anexo 4e). O composto 6, de  $m/z$  433, íon  $[C_{21}H_{21}O_{10}]^-$ , foi atribuído como um flavonóide glicosídeo. Este íon já havia sido reportado em amostras de açaí.<sup>144</sup> Sua fragmentação  $MS^2$  gerou sinal de  $m/z$  269 (-164 Da) oriundo de perda da fração glicosídeo (Anexo 4f1) e o experimento de fragmentação  $MS^3$  do íon de  $m/z$  269 gerou fragmento de  $m/z$  225 (-44 Da) oriundo da perda de  $C_2H_4O$  (Anexo 4f2), conforme demonstrado em trabalho anterior.<sup>139, 145</sup>

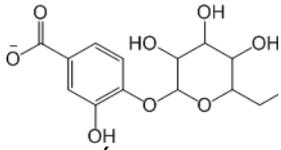
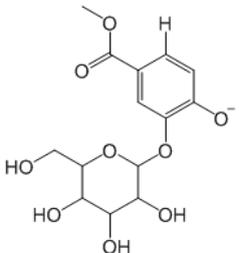
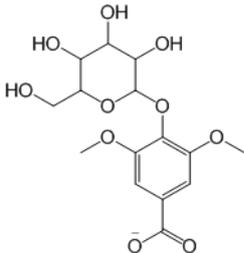
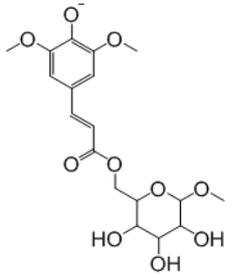
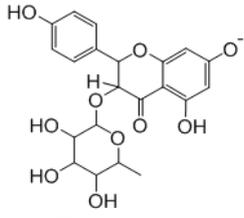
O composto 7, de  $m/z$  445, íon  $[C_{19}H_{25}O_{12}]^-$ , foi identificado como um derivado do sinapoil hexosídeo e já havia sido identificado em açaí.<sup>141</sup> Sua fragmentação gerou íons de  $m/z$  427 (-18 Da) relativo à perda de  $H_2O$ ,  $m/z$  383 (-62 Da) e  $m/z$  341 (-104 Da) oriundos de fragmentações no substituinte da fração hexosídeo e  $m/z$  283 (-162 Da) relativos a perda de fração sinapoil (Anexo 4g). O composto 8, de  $m/z$  447, íon  $[C_{21}H_{19}O_{11}]^-$ , foi identificado como orientina e já havia sido reportado em diversos trabalhos.<sup>141, 144, 146-149</sup> Seu perfil de fragmentação mostrou íon de  $m/z$  285 (-162 Da) oriundo a perda da fração hexosídeo (Anexo 4h). O composto 9, de  $m/z$  449, íon  $[C_{21}H_{21}O_{11}]^-$ , foi atribuído como dihidrokaempferol glucosídeo e já havia sido reportado em açaí.<sup>149</sup> O experimento de fragmentação  $MS^2$  gerou íon de  $m/z$  269 (-180 Da) oriundo da perda da fração glucosídeo (Anexo 4i1) e a fragmentação  $MS^3$

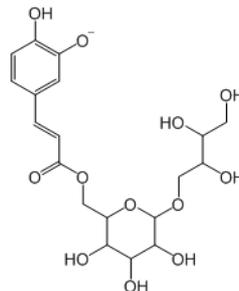
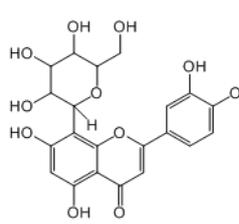
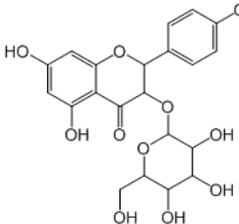
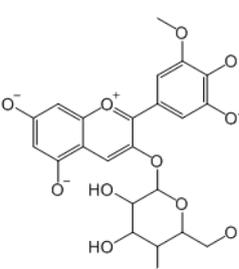
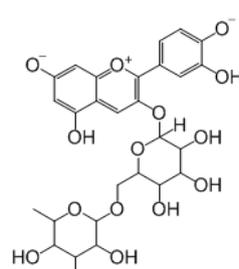
do íon de  $m/z$  269 gerou íon de  $m/z$  225 (-44 Da) oriundo da perda de  $C_2H_4O$  (Anexo 4i2), conforme demonstrado em trabalho anterior.<sup>145</sup> O composto 10, de  $m/z$  491, íon  $[C_{23}H_{23}O_{12}]^-$ , foi identificado como Malvidin-glucoside. Esta antocianina já havia sido reportada em açaí.<sup>150</sup> Seu perfil de fragmentação gerou íons de  $m/z$  473 (-18 Da),  $m/z$  459 (-32 Da),  $m/z$  447 (-44 Da) e  $m/z$  387 (-104 Da) provenientes de fragmentações na fração glucoside e íon de  $m/z$  179 (-312 Da) proveniente da perda da fração glucosídeo (Anexo 4j).<sup>139, 140</sup>

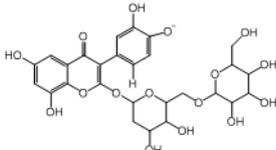
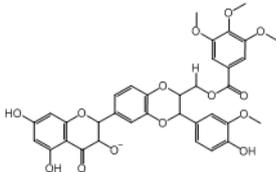
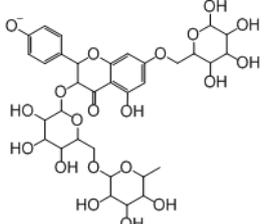
O composto 11, de  $m/z$  593, íon  $[C_{27}H_{29}O_{15}]^-$ , foi identificado como cianidina-3-rutinosídeo que já havia sido reportado em diversos estudos sobre açaí.<sup>144 146 - 148</sup> Seu perfil de fragmentação gerou íons de  $m/z$  285 (-308 Da) característico de perda da fração rutinosídeo (Anexo 4k). O composto 12, de  $m/z$  609, íon  $[C_{27}H_{29}O_{16}]^-$ , foi identificado como rutina e já havia sido reportado em açaí.<sup>141</sup> Seu perfil de fragmentação mostrou íons de  $m/z$  300 (-309 Da) e  $m/z$  285 (-310 Da) oriundos de perdas da fração hexosídeo (Anexo 4l). O composto 13, de  $m/z$  675, íon  $[C_{35}H_{31}O_{14}]^-$ , foi identificado como um flavonóide ainda não reportado na literatura para a juçara ou açaí amazônico. Seu perfil de fragmentação mostrou íons de  $m/z$  643 (-32 Da) e  $m/z$  507 (-168 Da) característicos de perda da metoxila e anel benzeno trimetoxilado, respectivamente (Anexo 4m). O composto 14, de  $m/z$  757, íon  $[C_{33}H_{41}O_{20}]^-$ , foi identificado como um flavonóide ainda não reportado para juçara ou açaí amazônico. Seu perfil de fragmentação mostrou íons de  $m/z$  611 (-146 Da) e  $m/z$  593 (-164 Da) característicos de perda de anel hexosídeo e  $m/z$  447 (-310 Da) característicos de perda de dois anéis hexosídeo (Anexo 4n).<sup>139, 140</sup>

**Tabela 7.** Moléculas identificadas por ESI-FT-ICR MS em sete populações de juçara.<sup>139, 140</sup>

	$m/z$ (exp.)	Fórmula Molecular ( $M-H^+$ ) <sup>-</sup> ou ( $M-2H^+$ ) <sup>-</sup>	DBE	Erro (ppm)	MS/MS	Molécula
1	287.05662	$C_{15}H_{11}O_6$	10	-1,76	(b) MS <sup>2</sup> 259, 243, 201	 Dihidrokaempferol

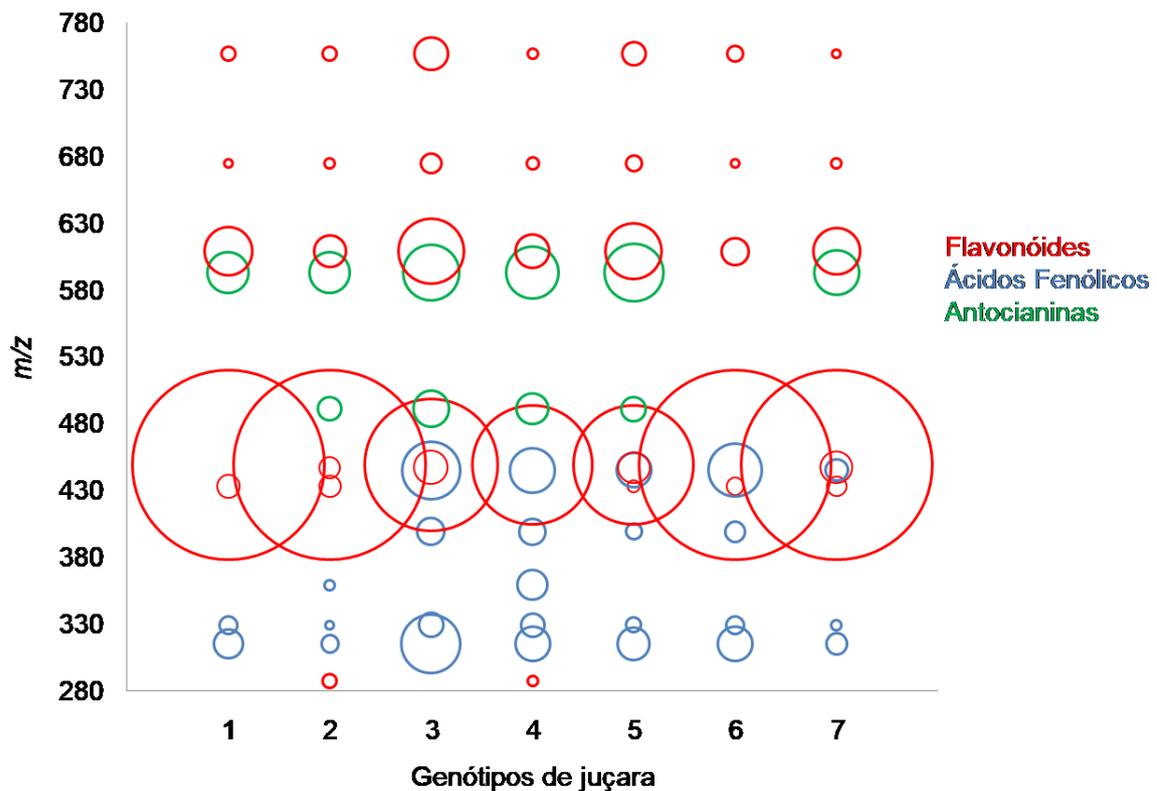
2	315.07274	$C_{13}H_{15}O_9$	6	-1,87	(b) $MS^2$ 287, 283, 279, 277, 271, 153 $MS^3$ (271) 243, 227, 199, 173 $MS^3$ (153) 109	 Ácido protocatecuico hexosídeo
3	329.08841	$C_{14}H_{17}O_9$	6	-1,85	(b) $MS^2$ 314, 301, 285, 269, 258, 242, 201, 167	 Hidroxibenzoato de metila hexosídeo
4	359.0992	$C_{15}H_{19}O_{10}$	6	-2,31	(b) $MS^2$ 340, 322, 312, 301, 279, 257, 237, 197, 191, 181, 153, 151, 135,	 Ácido siringico hexosídeo
5	399.13071	$C_{18}H_{23}O_{10}$	7	-2,61	(b) $MS^2$ 382, 363, 341, 331, 309, 297, 281, 263, 236, 223, 205, 189	 Derivado do Ácido feruloil sinápico
6	433.11535	$C_{21}H_{21}O_{10}$	11	-3,06	(b) $MS^2$ 413, 401, 352, 325, 300, 269, 179, 151 $ms^3$ (269) 225, 197, 151, 107	 Flavonóide Glicosídeo

7	445.13633	$C_{19}H_{25}O_{12}$	7	-2,64	(b) MS <sup>2</sup> 427, 401, 387, 384, 360, 341, 301, 283	 <p>Derivado do Sinapoil hexosídeo</p>
8	447.09458	$C_{21}H_{19}O_{11}$	12	-2,90	(b) MS <sup>2</sup> 321, 285	 <p>Orientina</p>
9	449.11007	$C_{21}H_{21}O_{11}$	11	-2,53	MS <sup>2</sup> 269 ms <sup>3</sup> (269) 225, 197, 183, 151, 149	 <p>Dihidrokaempferol glicosídeo</p>
10	491.12116	$C_{23}H_{23}O_{12}$	12	-3,39	(b) MS <sup>2</sup> 473, 459, 447, 445, 402, 387, 361, 329, 299, 280, 258, 225, 179, 167	 <p>Malvidin-glicosídeo</p>
11	593.15309	$C_{27}H_{29}O_{15}$	13	-3,19	(b) MS <sup>2</sup> 574, 503, 438, 327, 299, 285	 <p>Cianidina-3-rutinosídeo</p>

12	609.14826	$C_{27}H_{29}O_{16}$	13	-3,54	(a) $MS^2$ 523, 300, 283, 271, 257, 215	
						Rutina
13	675.17313	$C_{35}H_{31}O_{14}$	20	-1,78	(b) $MS^2$ 643, 507	
						Flavonóide
14	757.22281	$C_{33}H_{41}O_{20}$	13	-4,15	(a) $MS^2$ 727, 625, 611, 593, 479, 447, 285, 202	
						Flavonóide

Os polifenóis foram classificados em três classes fitoquímicas: flavonóides, ácidos fenólicos e antocianinas (Figura 25). Em todas as sete amostras a classes com sinais de maiores intensidades foram a dos flavonóides, sendo o dihidroxikaempferol glicosídeo o composto de sinal mais intenso. O genótipo J1 apresentou cinco variedades de flavonóides, duas de ácidos fenólicos e uma de antocianinas. Já o genótipo J2 apresentou sete variedades de flavonóides, três de ácidos fenólicos e duas de antocianinas. O genótipo J3 apresentou cinco variedades de flavonóides, quatro de ácidos fenólicos e duas de antocianinas. O genótipo J4 apresentou quatro variedades de flavonóides, cinco de ácidos fenólicos e duas de antocianinas. O genótipo J5 apresentou cinco variedades de flavonóides, quatro de ácidos fenólicos e duas de antocianinas. O genótipo J6 apresentou cinco variedades de flavonóides, quatro de ácidos fenólicos e nenhuma de antocianinas. Já o genótipo J7 apresentou seis variedades de flavonóides, três de ácidos fenólicos e uma de antocianinas.

Sendo assim, as populações mais ricas em variedades de flavonóides foram J2, e J7. As populações J1, J2 e J7 foram os que apresentaram menor variedade de sinais relativos a ácidos fenólicos e o genótipo J4 o mais rico. As populações J1, J6 e J7 foram os que apresentaram menor variedade de sinais relativos a antocianinas e as populações J2, J3, J4 e J5 os com mais sinais relativos a antocianinas.



**Figura 25.** Identificação de compostos químicos por classes fitoquímicas identificadas em substâncias. O tamanho das bolhas é diretamente proporcional à intensidade relativa dos picos no espectro.<sup>139, 140</sup>

#### 4.5 CONCLUSÃO

As sete populações de *E. edulis* avaliados apresentaram composição diferente para ácidos fenólicos, flavonóides e antocianinas. Entretanto, todos eles apresentaram-se ricos em polifenóis. As populações que possuem maior diversidade de flavonóides são J2 e J7, o mais rico em ácidos fenólicos é o J4 e os mais ricos em antocianinas J2, J3, J4 e J5. Sendo assim, a ingestão de juçara é altamente recomendada, visto sua riqueza em substâncias polifenólicas. Logo, este trabalho serve de incentivo ao cultivo da palmeira juçara (*E. edulis*) com fins de exploração do fruto, evitando o corte da palmeira para exploração do palmito.<sup>139, 140</sup>

Obs: O capítulo 4 foi publicado em *Food Research International*. O trabalho foi executado em equipe ficando o aluno Bruno Gomes de Oliveira responsável pelas análises de espectrometria de massas (presentes na integra nesta tese e parcialmente na dissertação de Maria Eduarda Barroso) e Maria Eduarda Barroso responsável pelos ensaios de quimiprevenção de câncer (que não foram utilizados nesta tese e utilizados na dissertação de Maria Eduarda Barroso).

## 6. REFERÊNCIAS

1. GASQUES, J. G.; BASTOS, E. T.; TUBINO, M. A. A.; ARAUJO, W. V. Projeções do Agronegócio - Brasil 2017/18 a 2027/28 Projeções de Longo Prazo. 9° Ed. Brasília: MAPA, 2018. 69p.
2. Plano Nacional de Desenvolvimento da Fruticultura. Disponível em: [www.agricultura.gov.br/noticias/mapa-lanca-plano-de-fruticultura-em-parceria-com-o-setorprivado/PlanoNacionaldeDesenvolvimentodaFruticulturaMapa.pdf](http://www.agricultura.gov.br/noticias/mapa-lanca-plano-de-fruticultura-em-parceria-com-o-setorprivado/PlanoNacionaldeDesenvolvimentodaFruticulturaMapa.pdf). Acessado em 15 de maio de 2019.
3. KIST, B. B.; CARVALHO, C.; TREICHEL, M.; SANTOS, C. E. Anuário Brasileiro da Fruticultura 2018. 1° ed. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2018. 18p.
4. Fruticultura. Disponível em: <https://incaper.es.gov.br/fruticultura>. Acessado em 15 de maio de 2019.
5. COSTA, E. B.; ALVARENGA, A. B.; CADE, A. M. E. Boletim da Conjuntura Agropecuária Capixaba. 16° Ed. Vitória: INCAPER, 2018. 7-8p.
6. GROSS, J. H. Mass Spectrometry. A Textbook. 3° Ed. Heidelberg, Germany: Springer, 2017. 151-277p.
7. SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. Spectrometric identification of Organic Compounds. 7° Ed. Danvers: John Wiley & Sons, 2005. 2-60p.
8. HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. Mass Spectrometry: Principles and Applications. 3° Ed. London: John Wiley & Sons, 2007. 85-164p.
9. ROMÃO, W. **Novas Aplicações da Esctrometria de Massas em Química Forense**. Tese de Doutorado. Departamento de Química da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010, 3p.

10. OLIVEIRA, B. G; COSTA, H. B; VENTURA, J. A; KONDRATYUK, T. P; BARROSO, M. E; CORREIA, R. M; PIMENTEL E. F; PINTO F. E; ENDRINGER D. C; ROMÃO, W. Chemical profile of mango (*Mangifera indica* L.) using electrospray ionisation mass spectrometry (ESI-MS). *Food chem.*, **204**, 37-45, 2016.
11. COSTA, H. B.; SOUZA, L. M.; SOPRANI, L. C.; OLIVEIRA, B. G.; OGAWA, E. M.; KORRES, A. M.; VENTURA, J. A.; ROMÃO, W. Monitoring the physicochemical degradation of coconut water using ESI-FT-ICR MS. *Food chem.*, **174**, 139-146, 2015.
12. CORREIA, R. M; LOUREIRO, L. B; RODRIGUES, R. R; COSTA, H. B; OLIVEIRA, B. G; FILGUEIRAS, P. R; THOMPSON C. J; LACERDA V. Jr; ROMÃO, W. Chemical profiles of Robusta and Arabica coffee by ESI (-) FT-ICR MS and ATR-FTIR: a quantitative approach. *Analytical Methods*, **8(42)**, 7678-7688, 2016.
13. O que é o câncer? Disponível em: [www.inca.gov.br/o-que-e-cancer](http://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer). Acessado em 15 de maio de 2019.
14. TANAKA, T. Role of apoptosis in the chemoprevention of cancer. *J. Exp. Clin. Med.*, **5**, 89-91, 2013.
15. CUENDET, M.; OTEHAM, C. P.; MOON, R. C.; PEZZUTO, J. M. Quinone reductase induction as a biomarker for cancer chemoprevention. *J. Nat. Prod.*, **69**, 460-463, 2006.
16. ENDRINGER, D. C. Química e atividades biológicas de *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae):: inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) e efeito na quimioprevenção de câncer. Tese de Doutorado. Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007. 50p.

17. PROCHASKA, H. J.; SANTAMARIA, A. B. Direct measurement of NAD(P)H: quinone reductase from cell cultured in microtiter wells: a screening assay for anticarcinogenic enzymes inducers. *Anal. Biochem.*, **169**, 328 - 336, 1988.
18. KANG; Y. H.; PEZZUTO, J. M. Induction quinone reductase as a primary screen for natural product anticarcinogens. *Methods Enzymol.*, **382**, 380 - 415, 2004.
19. WANG, X.; ZHANG, J. Z.; ZHOU, J. C.; SHEN, T.; LOU, H. X. Terpenoids from *Diplophyllum taxifolium* with quinone reductase-inducing activity. *Fitoterapia*, **109**, 1-7, 2016.
20. LOPEZ-MARTINEZ, L. X.; PARKIN, K. L.; GARCIA, H. S. Antioxidant and quinone reductase inducing activities of ethanolic fractions from purple maize. *LWT-Food Science and Technology*, **59**, 270-275, 2014.
21. LI, N.; ZHANG, G.; XIONG, Y.; MAKHABEL, B.; LI, X.; JIA, X. New isoflavonolignan with quinone reductase inducing activity from *Alhagi pseudalhagi* (MB). *Fitoterapia*, **81**, 1058-1061, 2010.
22. UDA, Y.; PRICE, K. R.; WILLIAMSON, G.; RHODES, M. J. Induction of the anticarcinogenic marker enzyme, quinone reductase, in murine hepatoma cells in vitro by flavonoids. *Cancer Lett.*, **120**, 213-216, 1997.
23. JANG, D. S.; PARK, E. J.; HAWTHORNE, M. E.; VIGO, J. S.; GRAHAM, J. G.; CABIESES, F.; SANTARSIERO, B. D.; MESECAR, A. D.; FONG, H. H. S.; MEHTA, R. G.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, D. Constituents of *Musax paradisiaca* cultivar with the potential to induce the phase II enzyme, quinone reductase. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 6330-6334, 2002.
24. DOLCET, X.; LLOBET, D.; PALLARES, J.; MATIAS-GUIU, X. NF- $\kappa$ B in development and progression of human cancer. *Virchows Arch.*, **446**, 475 - 482, 2005.

25. NAKANISHI, C.; TOI, M. Nuclear factor- $\kappa$ B inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. *Nat. Rev. Cancer*, **5**, 297 - 309, 2005.
26. ARSURA, M.; CAVIN, L. G. Nuclear factor- $\kappa$ B and liver carcinogenesis. *Cancer Lett.*, **229**, 157 - 169, 2005.
27. SHI, M. D.; SHIAO, C. K.; LEE, Y. C.; SHIH, Y. W. Apigenin, a dietary flavonoid, inhibits proliferation of human bladder cancer T-24 cells via blocking cell cycle progression and inducing apoptosis. *Cancer Cell. Int.* **15**, 33, 2015.
28. PAN, M. H.; CHIOU, Y. S.; CHEN, W. J.; WANG, J. M.; BADMAEV, V.; HO, C. T. Pterostilbene inhibited tumor invasion via suppressing multiple signal transduction pathways in human hepatocellular carcinoma cells. *Carcinogenesis*. **30**, 1234–1242, 2009.
29. LEE, K. W.; CHUN, K. S.; LEE, J. S.; KANG, K. S.; SURH, Y. J.; LEE, H. J. Inhibition of cyclooxygenase-2 expression and restoration of gap junction intercellular communication in H-ras-transformed rat liver epithelial cells by caffeic acid phenethyl ester. *Ann. NY Acad. Sci.* **1030**, 501–507, 2004.
30. RECANATINI, M.; CAVALLI, A.; VALENTI, P. Nonsteroidal aromatase inhibitors: recent advances. *Med. Res. Rev.*, **22**, 282 - 304, 2002.
31. KELLOFF, G. J.; LUBET, T. R. A.; LIEBERMAN, R.; EISENHAUER, K.; STEELE, V. E.; CROWELL, J. A.; HAWK, E. T.; BOONE, C. W.; SIGMAN, C. C. Aromatase inhibitors as potential cancer chemopreventives. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **7**, 65 - 78, 1998.
32. MAYHOUB, A. S.; MARLER, L.; KONDRATYUK, T. P.; PARK, E. J.; PEZZUTO, J. M.; CUSHMAN, M. Optimizing thiadiazole analogues of resveratrol versus three chemopreventive targets. *Bioorg. Med. Chem.* **20**, 510-520, 2012.
33. LUQMAN, S.; MEENA, A.; SINGH, P.; KONDRATYUK, T. P.; MARLER, L. E.;

- PEZZUTO, J. M.; NEGI, A. S. Neoflavonoids and tetrahydroquinolones as possible cancer chemopreventive agents. *Chem. Biol. Drug. Des.* **80**, 616-624, 2012.
- 34.VANNINI, F.; KASHFI, K.; NATH, N. The dual role of iNOS in cancer. *Redox Biol.* **6**, 334-343, 2015.
- 35.TSAI, M. L.; LAI, C. S.; CHANG, Y. H.; CHEN, W. J.; HO, C. T.; PAN, M. H. Pterostilbene, a natural analogue of resveratrol, potently inhibits 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (dmba)/12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate (tpa)-induced mouse skin carcinogenesis. *Food Funct.*, **3**,1185-1194, 2012.
- 36.BISHAYEE, A.; BARNES, K. F.; BHATIA, D.; DARVESH, A. S.; CARROLL, R. T. Resveratrol suppresses oxidative stress and inflammatory response in diethylnitrosamine-initiated rat hepatocarcinogenesis. *Cancer Prev. Res.*, **3**, 753-763, 2010.
- 37.FERREIRA, M. M. C. Quimiometria: conceitos, métodos e aplicações. 1º Ed. Campinas: Editora Unicamp, 2015. 16p.
- 38.FERREIRA, M. M.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. *Quím. Nova*, **22**, 724-731, 1999.
- 39.FERREIRA, M. M. C. Multivariate QSAR. *J. Braz. Chem. Soc.*, **13**, 742-753, 2002.
- 40.HAENLEIN, M.; KAPLAN, A. M. A beginner's guide to partial least squares analysis. *Understanding statistics*, **3**, 283-297, 2004.
- 41.SASSI, C. P. F.; PEREZ, G.; MYAZATO, L.; YE, X.; FERREIRA-SILVA, P. H.; LOUZADA NETO, F. Modelos de regressão linear múltipla utilizando os softwares R e STATISTICA: uma aplicação a dados de conservação de frutas. 2012.

42. FRANKEL, E. N.; BOSANEK, C. A.; MEYER, A. S.; SILLIMAN, K.; KIRK, L. L. Commercial grape juices inhibit the in vitro oxidation of human low-density lipoproteins. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 834-838, 1998.
43. BRASIL. Leis, Decretos, etc. Instrução Normativa nº 1, de 7 jan. 2000, do Ministério da Agricultura. Diário Oficial da União, Brasília, n. 6, 10 jan. 2000. Seção I, p. 54-58. Aprova os Regulamentos Técnicos para fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpas e sucos de frutas.
44. SPINELLI, F. R.; DUTRA, S. V.; CARNIELI, G.; LEONARDELLI, S.; DREHMER, A. P.; VANDERLINDE, R. Detection of addition of apple juice in purple grape juice. *Food control*, **69**, 1-4, 2016.
45. SILVA, B. M.; SEABRA, R. M.; ANDRADE, P. B.; OLIVEIRA, M. B.; FERREIRA, M. A. Adulteração por adição de açúcares a sumos de frutos: uma revisão adulteration of fruit juice by addition of sugars: A review adulteración por adición de azúcares a zumos de frutas: Una revisión. *CYTA-Journal of Food*, **2**, 184-191, 1999.
46. THAVARAJAH, P.; LOW, N. H. Adulteration of apple with pear juice: emphasis on major carbohydrates, proline, and arbutin. *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 4861-4867, 2006.
47. PANCERZ, M.; PTASZEK, A.; SOFIŃSKA, K.; BARBASZ, J.; SZLACHCIC, P.; KUCHARZEK, M.; ŁUKASIEWICZ, M. Colligative and hydrodynamic properties of aqueous solutions of pectin from cornelian cherry and commercial apple pectin. *Food Hydrocoll.*, **89**, 406-415, 2019.
48. QIU, N. X.; TIAN, Y. X.; QIAO, S. T.; HONG, D. Apple pectin behavior separated by ultrafiltration. *Agric. Sci. China*, **8**, 1193-1202, 2009.
49. FIGUEIRA, R.; NOGUEIRA, A. M. P.; DUCATTI, C.; MISCHAN, M. M. Análise isotópica ( $\delta^{13}C$ ) e legalidade em néctares de uva. *Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, 233-246, 2010.

50. ANON. Corn syrup in apple juice by carbon ratio mass spectrometry method. *AOAC Official Methods of Analysis*, **981**, 926, 1990.
51. PATRICE, T.; LACOMBE, T.; THOMAS, M. R. Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *Trends Genet.* **22**, 511-519, 2006.
52. MCGOVERN, P. E. Ancient wine: the search for the origins of viticulture. *Princeton University Press*, 2013.
53. FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Non alcoholic products of the vitivinicultural sector intended for human consumption, 2016.
54. LUO, L.; CUI, Y.; ZHANG, S.; LI, L.; LI, Y.; ZHOU, P.; SUN, B. Preparative separation of grape skin polyphenols by high-speed counter-current chromatography. *Food chem.*, **212**, 712-721, 2016.
55. CHO, Y. J.; HONG, J. Y.; CHUN, H. S.; LEE, S. K.; MIN, H. Y. Ultrasonication-assisted extraction of resveratrol from grapes. *J Food Eng.*, **77**, 725-730, 2006.
56. Sistema de produção de uvas rústicas para processamento em regiões tropicais do Brasil. Embrapa Uva e Vinho. Disponível em: <https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/UvasRusticasParaProcessamento/index.htm>. Acessado em 02 de fevereiro de 2019.
57. MARTÍNEZ-ESTESO, M. J.; VILELLA-ANTÓN, M. T.; PEDREÑO, M. Á.; VALERO, M. L.; BRU-MARTÍNEZ, R. iTRAQ-based protein profiling provides insights into the central metabolism changes driving grape berry development and ripening. *BMC plant. Biology.*, **13**, 167, 2013.
58. "Panorama da produção de uvas e vinhos no Brasil." Embrapa Uva e Vinho. Disponível em: [ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/159111/1/Mello-CampoNegocio-V22-N142-P54-56-2017.pdf](http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/159111/1/Mello-CampoNegocio-V22-N142-P54-56-2017.pdf). Acessado em 02 de fevereiro de

- 2019.
59. Suco de uva. Embrapa Informação Tecnológica. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/11888/2/00081370.pdf>. Acessado em 02 de fevereiro de 2019.
60. FREIRE, C. D. S.; CAMELATTO, D.; CANTILLANO, R. F. F.; KOVALESKI, A.; FORTES, J. F. A cultura da maçã. 1º Ed. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994, 9 p.
61. BRACKMANN, A.; SESTARI, I.; STEFFENS, A. C.; HETTWER, R. F. G. Qualidade da maçã cv. Gala tratada com 1-metilciclopropeno. *Ciênc Rural*, **34**, 2004.
62. FROMM, M.; BAYHA, S.; CARLE, R.; KAMMERER, D. R. Characterization and quantitation of low and high molecular weight phenolic compounds in apple seeds. *J. agric. food chem.*, **60**, 1232-1242, 2012.
63. BALDWIN, E. A.; NISPEROS-CARRIEDO, M. O.; BAKER, R. A. Use of edible coatings to preserve quality of lightly (and slightly) processed products. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **35**, 509-524, 1995.
64. PAGANINI, C.; NOGUEIRA, A.; DENARDI, F.; WOSIACKI, G. Análise da aptidão industrial de seis cultivares de maçãs, considerando suas avaliações físico-químicas (dados da safra 2001/2002). *Ciênc. agrotec., Lavras*, **28**, 1336-1343, 2004.
65. NOGUEIRA, A.; DE PAULA, S. B.; DENARDI, F.; WOSIACKI, G. (2006). Características físico-químicas e sensoriais de suco de maçã clarificado e fermentado. *Publicatio UEPG: Ciências Exatas e da Terra, Agrárias e Engenharias*, **12**, 2006.
66. SILVA, B. M. Parâmetros de autenticidade dos derivados de alguns frutos: polpas, doces, compotas, geleias, sumos e néctares. Seminário do Mestrado em Controlo de Qualidade, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Porto, 1999.

67. SILVA, B. M.; SEABRA, R. M.; ANDRADE, P. B.; OLIVEIRA, M. B.; FERREIRA, M. A. Adulteração por adição de açúcares a sumos de frutos: uma revisão adulteration of fruit juice by addition of sugars: a review adulteración por adición de azúcares a zumos de frutas: una revisión. *CYTA-j food*, **2**, 184-191, 1999.
68. LANZA, E.; LI, B. W. Application of near infrared spectroscopy for predicting the sugar content of fruit juices. *J. Food Sci.*, **49**, 995-998, 1984.
69. FIGUEIRA, R.; NOGUEIRA, A. M. P.; DUCATTI, C.; MISCHAN, M. M. Análise isotópica ( $\delta^{13}\text{C}$ ) e legalidade em néctares de uva. *Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, 233-246, 2010.
70. NOGUEIRA, A. M. P. **Análise isotópica ( $\delta^{13}\text{C}$ ), físico-química e energética de bebidas não-alcoólicas de manga (*Mangifera indica*, L.) e de goiaba (*Psidium guajava*, L.)**. Tese de Doutorado. Departamento de Química da Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012. 40 p.
71. GUYON, F.; AUBERGER, P.; GAILLARD, L.; LOUBLANCHES, C.; VIATEAU, M.; SABATHIÉ, N.; MARIE-HELENE, S.; MÉDINA, B.  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  isotope ratios of organic acids, glucose and fructose determined by HPLC-co-IRMS for lemon juices authenticity. *Food chem.*, **146**, 36-40, 2014.
72. QUEIROZ, E. C.; DUCATTI, C.; VENTURINI FILHO, W. G. SILVA, E. T.; NOJIMOTO, T. Determinação da razão isotópica delta  $^{13}\text{C}$  em bebidas comerciais a base de laranja. *Ciênc. Agrotec.*, 1085-1094, 2009.
73. DI MARCO, G.; GREGO, S.; TRICOLI, D.; TURI, B. Carbon isotope ratios ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) in fractions of field-grown grape. *Physiologia Plantarum, Copenhagen*, **41**, 139-141, 2006.
74. DIFONZO, G.; VOLLMER, K.; CAPONIO, F.; PASQUALONE, A.; CARLE, R.; STEINGASS, C. B. Characterisation and classification of pineapple (*Ananas*

- comosus [L.] Merr.) juice from pulp and peel. *Food Control*, **96**, 260-270, 2019.
75. VIGNEAU, E.; THOMAS, F. Model calibration and feature selection for orange juice authentication by <sup>1</sup>H NMR. *Spectroscopy. Chemometr Intell Lab Syst*, **117**, 22-30, 2012.
76. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008, 2007.
77. FILZMOSE, P.; LIEBMANN, B.; VARMUZA, K. Repeated double cross validation. *J. Chemom.*, **23**, 160-171, 2009.
78. FILGUEIRAS, P. R.; ALVES, J. C. L.; SAD, C. M.; CASTRO, E. V.; DIAS, J. C.; POPPI, R. J. Evaluation of trends in residuals of multivariate calibration models by permutation test. *Chemometr. Intell. Lab. Syst.*, **133**, 33-41, 2014.
79. SOUZA, A. M.; FILGUEIRAS, P. R.; COELHO, M. R.; FONTANA, A.; WINKLER, T. C. B.; VALDERRAMA, P.; POPPI, R. J. Validation of the near infrared spectroscopy method for determining soil organic carbon by employing a proficiency assay for fertility laboratories. *J. Near Infrared Spec.*, **24**, 293-303, 2016.
80. OLIVEIRA, B. G.; TOSATO, F.; FOLLI, G. S.; DE LEITE, J. A.; VENTURA, J. A.; ENDRINGER, D. C.; FILGUEIRA P.R.; ROMÃO, W. Controlling the quality of grape juice adulterated by apple juice using ESI (-) FT-ICR mass spectrometry. *Microchemical Journal*, 104033, 2019.
81. WROLSTAD, R. E.; SHALLENBERGER, R. S. Free sugars and sorbitol in fruits--a complication from the literature. *J. Assoc. Off Anal. Chem.*, **64**, 91-103, 1981.
82. D. A. HAMMOND Authenticity of fruit juices, jams and preserves. Food

- Authentication, London, eds. Ashurst, P. R. e Dennis, M. J., Blackie Academic & Professional, 1996. 15-59p.
- 83.FAO. (2018) Banana Statistical compendium. Rome. Disponível em: [www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM\\_MARKETS\\_MONITORING/Bananas/Documents/Banana\\_Statistical\\_Compndium\\_2017.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Bananas/Documents/Banana_Statistical_Compndium_2017.pdf). Acessado em 13 de março de 2019.
- 84.FAO. (2018). Banana market review Preliminary results for. Disponível em: [www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM\\_MARKETS\\_MONITORING/Bananas/Documents/Banana\\_Market\\_Review\\_Prelim\\_Results\\_2018.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Bananas/Documents/Banana_Market_Review_Prelim_Results_2018.pdf) Acessado em 13 de março de 2019.
- 85.COOK, N. C.; SAMMAN, St. Flavonoids—chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J. Nutr. Biochem.*, **7**, 66-76, 1996.
- 86.SOMEYA, S., YOSHIKI, Y., OKUBO, K. Antioxidant compounds from bananas (*Musa cavendish*). *Food Chem.*, **79**, 351–354, 2002.
- 87.HEIM, K.E., TAGLIAFERRO, A.R., BOBILYA, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.*, **13**, 572–584.
- 88.HAVSTEEN, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Ther.*, **96**, 67–202, 2002.
- 89.SPORN, M. B. Approaches to prevention of epithelial cancer during the preneoplastic period. *Cancer research*, **36**, 2699-2702, 1976.
- 90.PEZZUTO, J. M.; KOSMEDER, J. W.; PARK, E. J.; LEE, S. K.; CUENDET, M.; BAHT, K.; GRUBJESIC, S.; PARK, H. S.; MATA-GREENWOOD, E.; TAN, Y.; YU, R.; LANTVIT, D. D.; KINGHORN, A. D. Characterization of Natural Product Chemopreventive Agents. *Cancer Chemo.*, **2**, 3-37, 2005.

91. EMBRAPA. Banana 500 perguntas. (2003). Disponível em: [www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/104897/1/500PBananaed012003.pdf](http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/104897/1/500PBananaed012003.pdf) Acessado em 13 de março de 2019.
92. Banana: Governo ES realiza 2º edição do Dia de Mercado na Ceasa. Disponível em [www.incaper.es.gov.br/noticia\\_completa.php?id=3210](http://www.incaper.es.gov.br/noticia_completa.php?id=3210). Acessado em 13 de março de 2019.
93. Tropical. Cultivar de Banana tipo Maçã para o Espírito Santo. Disponível em [www.incaper.es.gov.br/sistemas/servicos/images/Folder\\_Banana\\_Tropical\\_223.pdf](http://www.incaper.es.gov.br/sistemas/servicos/images/Folder_Banana_Tropical_223.pdf) Acessado em 13 de março de 2019.
94. INCAPER recomenda nova variedade de banana para o Espírito Santo. Disponível em [www.incaper.es.gov.br/noticia\\_completa.php?id=3073](http://www.incaper.es.gov.br/noticia_completa.php?id=3073). Acessado em 13 de março de 2019.
95. ADÃO, R. C.; GLÓRIA, M. B. A. Bioactive amines and carbohydrate changes during ripening of Prata banana (*Musa acuminata* × *M. balbisiana*). *Food Chem.* **90**, 705-711, 2005.
96. VILAS BOAS, E. V. B.; ALVES, R. E.; FILGUEIRAS, H. A. C.; MENEZES, J. B. Características da fruta. Banana: pós-colheita. Brasília. Embrapa, 2001. p. 15-19.
97. MOKBEL, M. S.; HASHINAGA, F. Antibacterial and antioxidant activities of banana (*Musa*. AAA cv. Cavendish) fruits peel. *Am. J. Biochem. Biotechnol.* **1**. 126–132, 2005.
98. GONZÁLEZ-MONTELONGO, R.; LOBO, M. G.; GONZÁLEZ, M. Antioxidant activity in banana peel extracts: Testing extraction conditions and related bioactive compounds, *Food Chem.* **119**. 1030 - 1039, 2010.
99. BALASUNDRUM, N.; SUNDRUM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in

- plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence and potential uses. *Food Chem.* **99**, 191-203. 2006.
100. BENNETT, R. N.; SHIGA, T. M.; HASSIMOTTO, N. M. A.; ROSA, E. A. S.; LAJOLO, F. M.; CORDENUNSI, B. R. Phenolics and Antioxidant Properties of Fruit Pulp and Cell Wall Fractions of Postharvest Banana (*Musa acuminata* Juss.) Cultivars. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 7991–8003, 2010.
101. BEST, R.; LEWIS, D. A.; NASSER, N. The antiulcerogenic activity of the unripe plantain banana (*Musa species*). *Br. J. Pharmacol.* **82**, 107-116, 1984.
102. EMERY, E. A.; AHMAD, S.; KOETHE, J. D.; SKIPPER, A.; PERLMUTTER, S.; PASKIN, D. L. Banana flakes control diarrhea in enterally fed patients. *Nutr. Clin. Pract.* **12**, 72-75, 1997.
103. ONO, H.; TESAKI, S.; TANABE, S.; WATANEBE, M. 6-Methylsulfinylhexyl isothiocyanate and its homologues as food-originated compounds with antibacterial activity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 363-365. 1998.
104. CHITARRA, M. I. F; CHITARRA, A. B. Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio. 2º Ed. Lavras: ESAL; FAEPE, 1990. 320 p.
105. CANO C. B., NAGATO L. A. F., MELLO M. R. P. A., DURAN M. C., TAVARES M. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: IV-Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 1º Ed. São Paulo – SP, Secretária de Estado da Saúde, Coordenadoria dos Serviços Especializados, 2005. 571 – 591p.
106. KREPSKY, P. B.; ISIDÓRIO, R. G.; SOUZA, FILHO J. D.; CÔRTEZ, S. F.; BRAGA, F. C. Chemical composition and vasodilatation induced by *Cupheacarthagenensis* preparations. *Phytomed.*, **19**, 953–957, 2012.
107. RUBINSTEIN, L. V.; SHOEMAKER, R. H.; PAULL, K. D.; SIMON, R. M.;

- TOSINI, S.; SKEHAN, P.; MONKS, A.; BOYD, M. R. Comparison of in vitro anticancer-drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. *J. Natl. Cancer Inst. Institute*, **82**, 1113-1117, 1990.
108. WU, C. D.; KUO, Y. S.; WU, H. C.; LIN, C. T. MicroRNA-1 induces apoptosis by targeting prothymosin alpha in nasopharyngeal carcinoma cells. *Journal of biomedical science*, **18**, 80, 2011.
109. HOMHUAL, S.; BUNYAPRAPHATSARA, N.; KONDRATYUK, T. P.; SANTARSIERO, B. D.; MESECAR, A. D.; HERUNSALEE, A.; CHAUKUL, W.; PEZZUTO, J. M.; FONG, H. H. S.; ZHANG, H. J. Bioactive Dammarane triterpenes from the mangrove plant *Bruguieragymnorhiza*. *J. Nat. Prod.*, **69**, 421-424, 2006.
110. PARK, E. J.; KONDRATYUK, T. P.; MORRELL, A.; KISELEV, E.; CONDA-SHERIDAN, M.; CUSHMAN, M. A .H. N.; CHOI, S. Y.; WHITE, J. J.; VAN BREEMEN, R. B.; PEZZUTO, J. M. Induction of retinoid X receptor activity and consequent upregulation of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> by indenoisoquinolines in MCF7 cells. *Cancer Prev. Res.*, **4**, 592-607, 2011.
111. NAMBI V. E.; THANGAVEL. D.; JESUDAS M. Scientific classification of ripening period and development of colour grade chart for Indian mangoes (*Mangifera indica* L.) using multivariate cluster analysis. *Sci. Hortic.*, **193**, 90–98, 2015.
112. CARVALHO, A. V.,; SECCADIO, L. L.; Mourão Júnior, M.; NASCIMENTO, W. M. O. Qualidade pós-colheita de cultivares de bananeira do grupo 'maçã', na região de Belém-PA. *Embrapa Amazônia Oriental-Artigo em periódico indexado (ALICE)*. 2011.
113. DITCHFIELD C; TADINI C. C. Acompanhamento do processo de amadurecimento da banana nanicão (*Musa cavendishii* Lamb). *XVIII Congresso brasileiro de ciência e tecnologia de alimentos*. 2016.

114. BARNELL, H. R. Studies in Tropical Fruits: XI. Carbohydrate Metabolism of the Banana Fruit during Ripening under Tropical Conditions. *Ann. Bot.*, **5**, 217-247, 1941.
115. BERTRAND, E.; EL BOUSTANY, P.; FAULDS, C. B.; BERDAGUÉ, J.-L. The Maillard Reaction in Food: An Introduction. Reference Module in Food Science. 2018.
116. PONTES, S. F. O. Processamento e qualidade de banana da terra (musa sapientum) desidratada. Itapetinga, BA. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. 2009.
117. SOMEYA, S; YOSHIKI, Y; OKUBO, K. Antioxidant compounds from bananas (Musa Cavendish). *Food Chem.*, **79**, 351-354, 2002.
118. TSAMO, C. V. P.; HERENT, M. F.; TOMEKPE, K.; EMAGA, T. H.; QUETIN-LECLERCQ, J.; ROGEZ, H.; LARONDELLE, Y.; ANDRE, C. Phenolic profiling in the pulp and peel of nine plantain cultivars (*Musa* sp.). *Food Chem.*, **167**, 197-204, 2015.
119. TSAMO, C. V. P., HERENT, M. F., TOMEKPE, K., EMAGA, T. H., QUETIN-LECLERCQ, J., ROGEZ, H., LARONDELLE, Y., ANDRE, C. M. Effect of boiling on phenolic profiles determined using HPLC/ESI-LTQ-Orbitrap-MS, physico-chemical parameters of six plantain banana cultivars (*Musa* sp). *J. Food Compost. Anal.*, **44**, 158-169, 2015.
120. GUINÉ, R. P.; BARROCA, M. J.; GONÇALVES, F. J.; ALVES, M.; OLIVEIRA, S.; MENDES, M. Artificial neural network modelling of the antioxidant activity and phenolic compounds of bananas submitted to different drying treatments. *Food Chem.*, **168**, 454-459, 2015.
121. SEMWAL, D.; SEMWAL, R.; COMBRINCK, S.; VILJOEN, A. Myricetin: A dietary molecule with diverse biological activities. *Nutrients*, **8**, 90, 2016.

122. HIROSE, M.; TAKESADA, Y.; TANAKA, H.; TAMANO, S.; KATO, T.; SHIRAI, T. Carcinogenicity of antioxidants BHA, caffeic acid, sesamol, 4-methoxyphenol and catechol at low doses, either alone or in combination, and modulation of their effects in a rat medium-term multi-organ carcinogenesis model. *Carcinogenesis*, **19**, 207-212, 1998.
123. KARIN, M. Nuclear factor- $\kappa$ B in cancer development and progression. *Nature*, **441**, 431, 2006.
124. BARGOU, R. C.; EMMERICH, F.; KRAPPMANN, D.; BOMMERT, K.; MAPARA, M. Y.; ARNOLD, W.; ROYER, H. D.; GRINSTEIN, E.; GREINER, A.; SCHEIDEREIT, C.; DÖRKEN, B. Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J. Clin. Invest.*, **100**, 2961-2969, 1997.
125. NAKSHATRI, H.; BHAT-NAKSHATRI, P.; MARTIN, D. A.; GOULET, R. J.; SLEDGE, G. W. Constitutive activation of NF-kappaB during progression of breast cancer to hormone-independent growth. *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 3629-3639, 1997.
126. VAKKALA, M.; KAHLOS, K.; LAKARI, E.; PÄÄKKÖ, P.; KINNULA, V.; SOINI, Y. Inducible nitric oxide synthase expression, apoptosis, and angiogenesis in in situ and invasive breast carcinomas. *Clin. Cancer Res.*, **6**, 2408-2416, 2000.
127. SWANA, H. S.; SMITH, S. D.; PERROTTA, P. L.; SAITO, N.; WHEELER, M. A.; WEISS, R. M. Inducible nitric oxide synthase with transitional cell carcinoma of the bladder. *J. Urol.*, **161**, 630-634, 1999.
128. CHUMSRI, S., HOWES, T., BAO, T., SABNIS, G., & BRODIE, A. Aromatase, aromatase inhibitors, and breast cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **125**, 13-22, 2011.

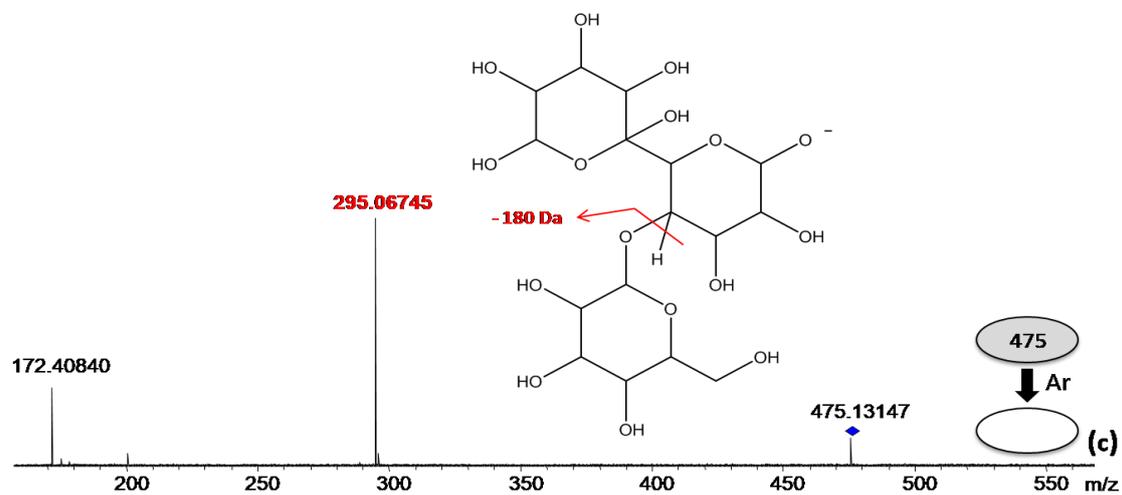
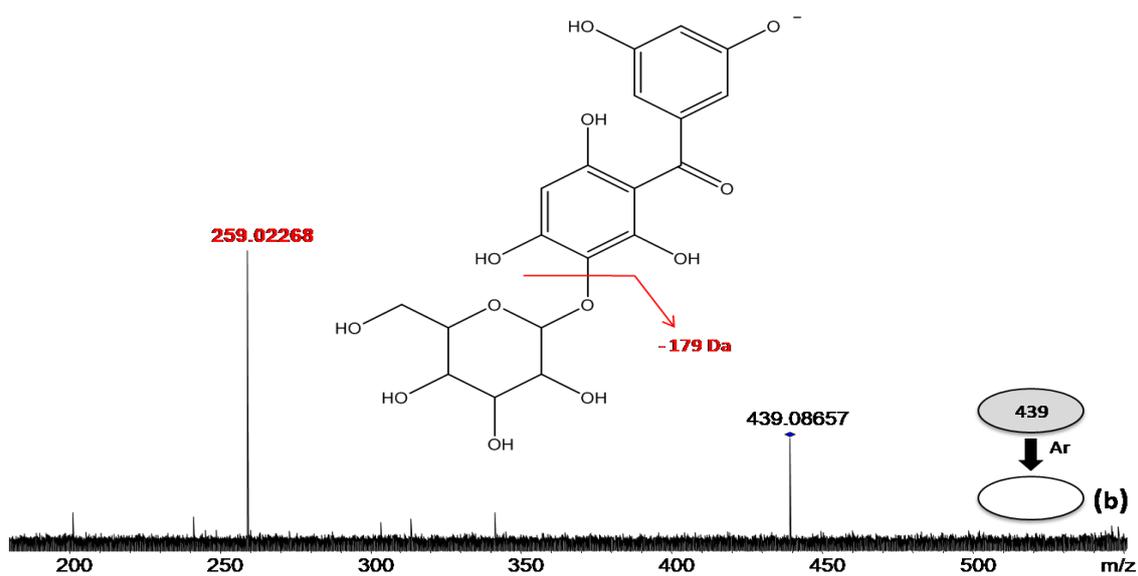
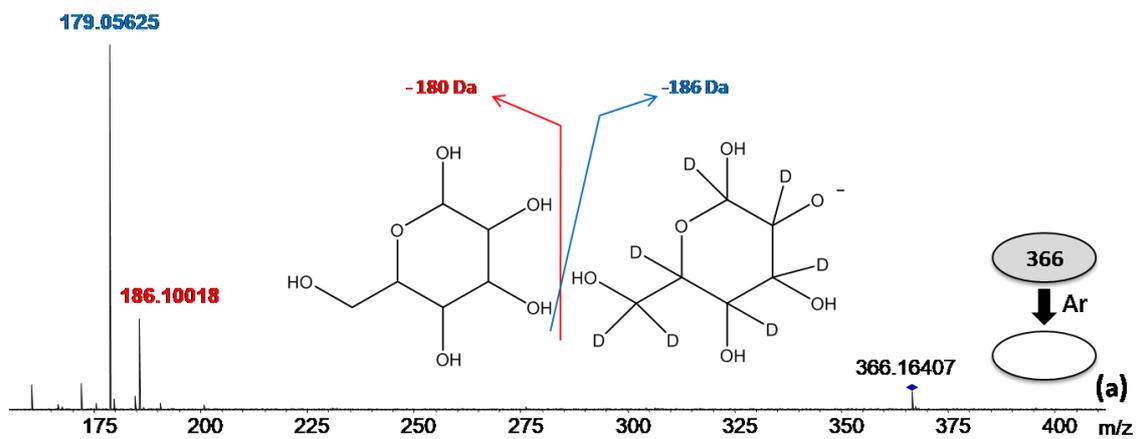
129. REIS, M. S.; FANTINI, C. A.; NODARI, R. O.; REIS A., GUERRA, M. P. Management and Conservation of Natural Populations in Atlantic Rain Forest: The Case Study of Palm Heart (*Euterpe edulis* Martius). *Biotropica*, **32**, 894-902, 2000.
130. RAUPP, S. V.; BRACK, P.; LEITE, S. L. C. Aspectos demográficos de palmitero (*Euterpe edulis* Mart.) em uma área da Floresta Atlântica de Encosta, em Maquiné, Rio Grande do Sul. *Iheringia Série Zoologia*, **64**, 57-61, 2009.
131. MARTO, G. B. T.; BARRICHELO, L. E. G.; MÜLLER, P. H. *Euterpe edulis* (Palmito-juçara). Disponível em <https://www.ipef.br/identificacao/euterpe.edulis.asp>. Acessado em 03 de Março de 2019.
132. REIS, A. Dispersão de sementes de *Euterpe edulis* Martius – (Palmae) em uma Floresta Ombrófila Densa Montana da encosta atlântica em Blumenau, SC. Tese de Doutorado. UNICAMP. Campinas, 1995. 154p.
133. MORTARA, M.O.; VALERIANO, D.M. Modelagem da distribuição potencial do palmitero (*Euterpe edulis* Martius) a partir de variáveis topográficas. Anais X SBSR, Foz do Iguaçu, 21-26 abril 2001, INPE, p. 459-471, Sessão Técnica Oral .
134. GUIMARÃES, L. D. O.; de SOUZA, R. G. Palmeira juçara: patrimônio natural da Mata Atlântica no Espírito Santo. 1º Ed. Vitória, ES : Incaper, 2017. 68 p.
135. GALETTI, M.; ALEIXO, A. Effects of palm heart harvesting on frugivores in the Atlantic forest of Brazil. *J. Appl. Ecol.*, **35**, 286-293, 1998.
136. MARTINS, S. V.; SOUZA, M. N. Cultivo do palmitero-juçara (*Euterpe edulis* Mart.): Produção de palmito e restauração florestal. 1º Ed. Viçosa, MG: Aprenda Fácil Editora, 2009. 107p.

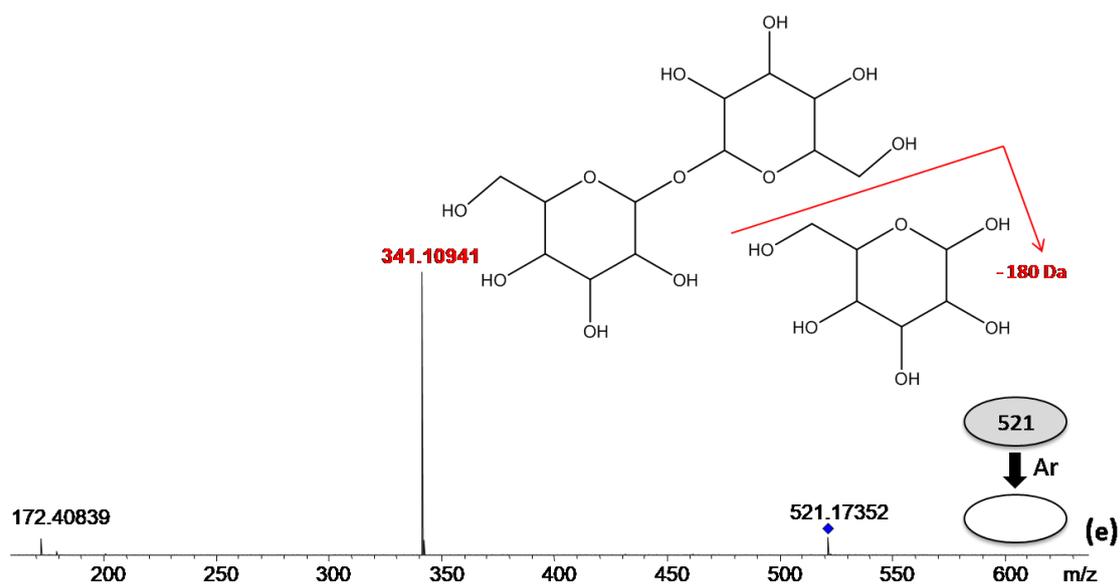
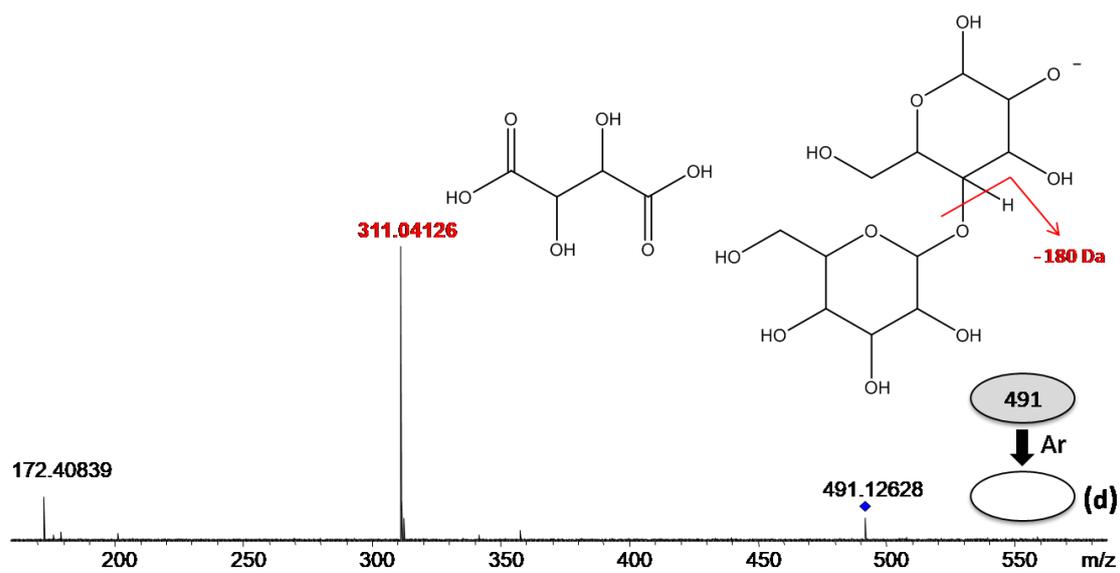
137. BRITO, E. S.; ARAÚJO, M. C. P.; ALVES, R. E.; CARKEET, C.; CLEVIDENCE, C. A.; NOVOTNY, J. A. Anthocyanins Present in Selected Tropical Fruits: Acerola, Jambolão, Jussara, and Guajiru. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 9389–9394, 2007.
138. FADDEN, J.; SEOANE, C.; PAOLINETTI, V.; LIMA, A.; ZANATTA, R.; AMÊNDOLA, D.; DERETI, R. Extração caseira de polpa de juçara: *Euterpe edulis* Martius. Embrapa Florestas-Fôlder/Folheto/Cartilha. 2008.
139. BARROSO, M. E.; OLIVEIRA, B. G.; PIMENTEL, E. F.; PEREIRA, P. M.; RUAS, F. G.; ANDRADE, T. U.; LENZ, D.; SCHERER, R.; FRONZA, M. J.; VAZ, B. G.; KONDRATYUK, T. P.; ROMÃO, W.; ENDRINGER, D. C. Phytochemical profile of genotypes of *Euterpe edulis* Martius–Juçara palm fruits. *Food Research International*, 116, 985-993, 2019.
140. BARROSO, M. E. **Antioxidant and chemopreventive activities of fruits of *euterpe edulis martius* – juçara palm.** Dissertação de Mestrado. Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade de Vila Velha, Vila Velha, 2017.
141. GARZÓN, G. A.; NARVÁEZ-CUENCA, C. E.; VINCKEN, J. P.; GRUPPEN, H. Polyphenolic composition and antioxidant activity of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) from Colombia. *Food chem.*, **217**, 364-372, 2017.
142. KANG, J.; LI, Z.; WU, T.; JENSEN, G. S.; SCHAUSS, A. G.; WU, X. Antioxidant capacities of flavonoid compounds isolated from acai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.). *Food Chem.*, **122**, 610-617, 2010.
143. REZAIRE, A.; ROBINSON, J. C.; BEREAU, D.; VERBAERE, A.; SOMMERER, N.; KHAN, M. K.; FILS-LYCAON, B. Amazonian palm *Oenocarpus bataua* (“patawa”): Chemical and biological antioxidant activity–Phytochemical composition. *Food chem.*, **149**, 62-70, 2014.

144. MULABAGAL, V.; CALDERÓN, A. I. Liquid chromatography/mass spectrometry based fingerprinting analysis and mass profiling of *Euterpe oleracea* (açai) dietary supplement raw materials. *Food chem.*, **134**, 1156-1164, 2012
145. GALAVERNA, R. S.; SAMPAIO, P. T.; BARATA, L. E.; EBERLIN, M. N.; FIDELIS, C. H. V. Differentiation of two morphologically similar Amazonian *Aniba* species by mass spectrometry leaf fingerprinting. *Anal. Methods*, **7**, 1984-1990, 2015.
146. BICUDO, M. O. P.; RIBANI, R. H.; BETA, T. Anthocyanins, phenolic acids and antioxidant properties of juçara fruits (*Euterpe edulis* M.) along the on-tree ripening process. *Plant Foods Hum Nutr*, **69**, 142-147, 2014.
147. GORDON, A.; CRUZ, A. P. G.; CABRAL, L. M. C.; FREITAS, S. C.; TAXI, C. M. A. D.; DONANGELO, C. M.; MARX, F. Chemical characterization and evaluation of antioxidant properties of Açai fruits (*Euterpe oleracea* Mart.) during ripening. *Food chem.*, **133**, 256-263, 2012.
148. PACHECO-PALENCIA, L. A.; HAWKEN, P.; TALCOTT, S. T. Phytochemical, antioxidant and pigment stability of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) as affected by clarification, ascorbic acid fortification and storage. *Food Res. Int.*, **40**, 620-628, 2007.
149. KANG, J.; XIE, C.; LI, Z.; NAGARAJAN, S.; SCHAUSS, A. G.; WU, T.; WU, X. Flavonoids from açai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp and their antioxidant and anti-inflammatory activities. *Food Chem.*, **128**, 152-157, 2011.
150. POULOSE, S. M.; FISHER, D. R.; BIELINSKI, D. F.; GOMES, S. M.; RIMANDO, A. M.; SCHAUSS, A. G.; SHUKITT-HALE, B. Restoration of stressor-induced calcium dysregulation and autophagy inhibition by polyphenol-rich açai (*Euterpe spp.*) fruit pulp extracts in rodent brain cells in vitro. *Nutrition*, **30**, 853-862, 2014.

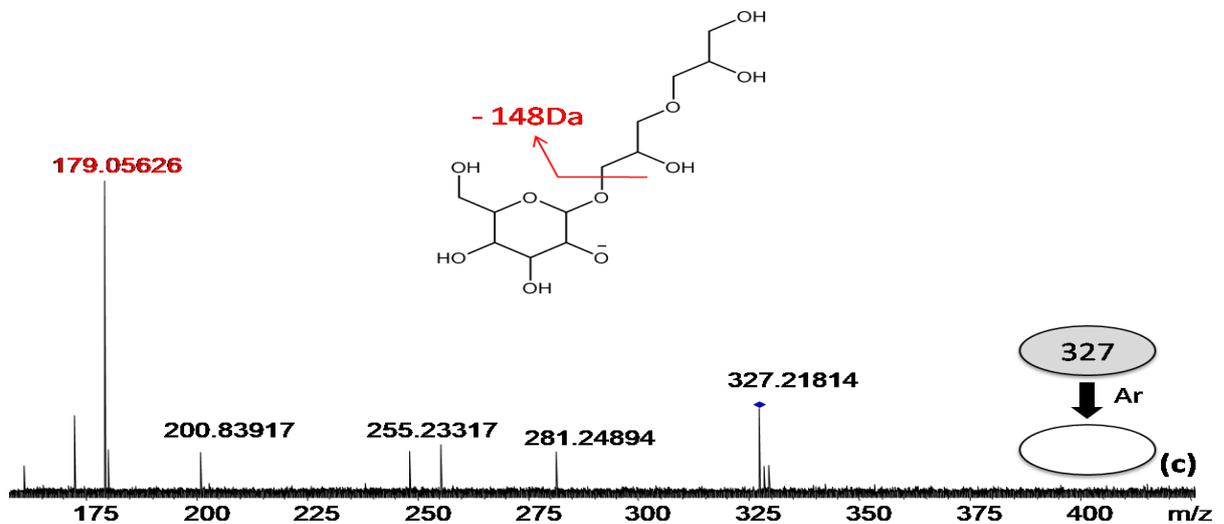
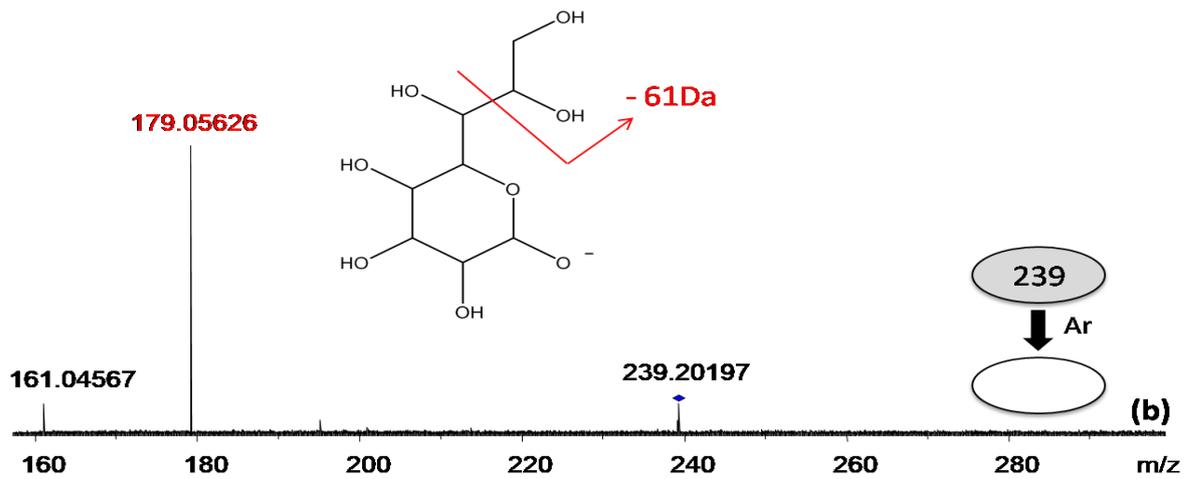
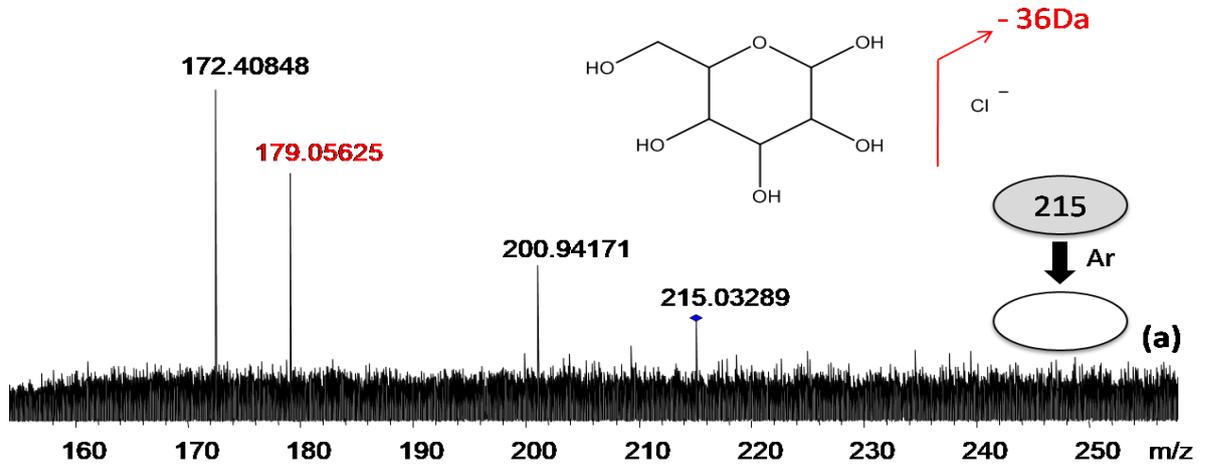
## ANEXOS

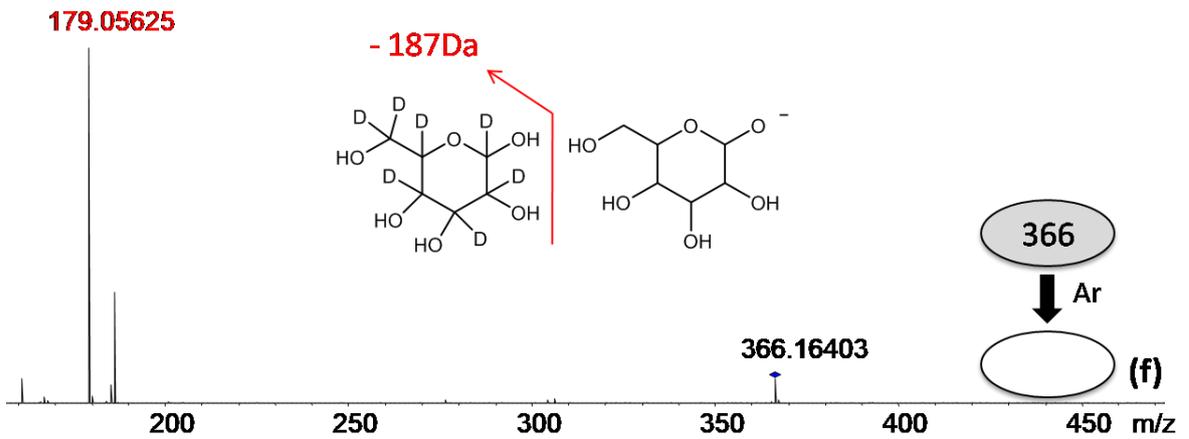
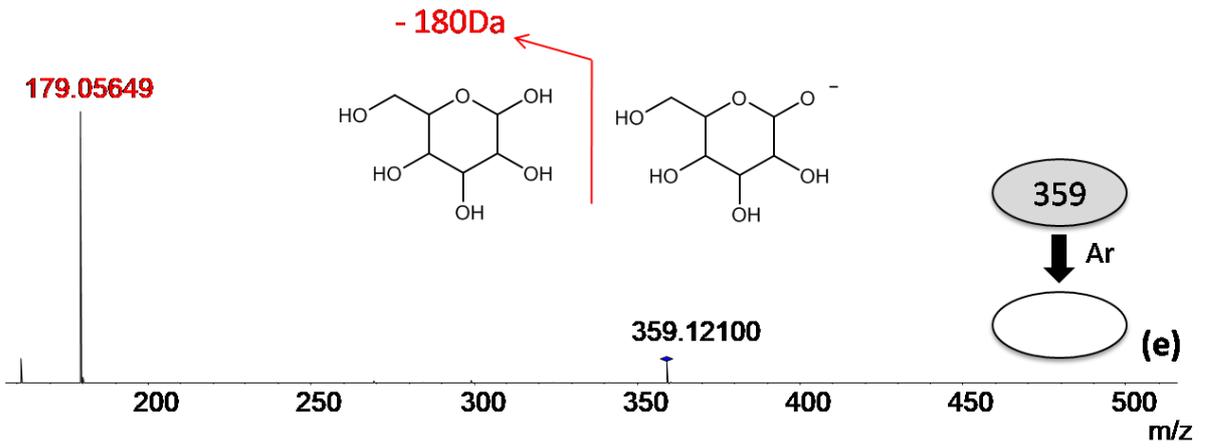
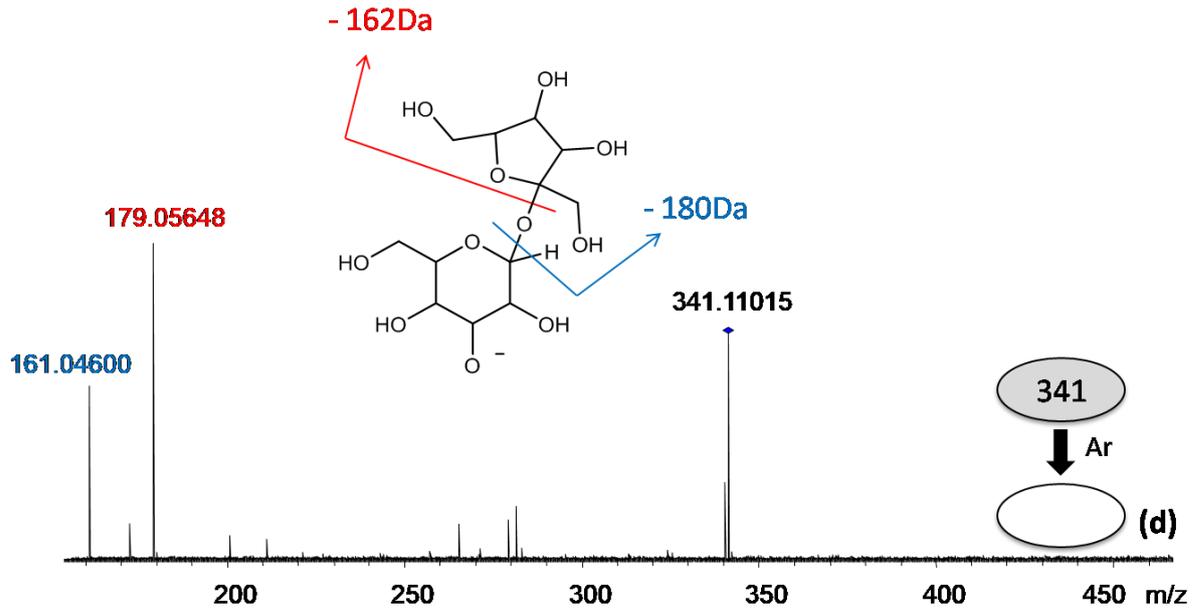
## Anexo 1. Espectros de FT-ICR MS/MS de muestras de suco de uva.

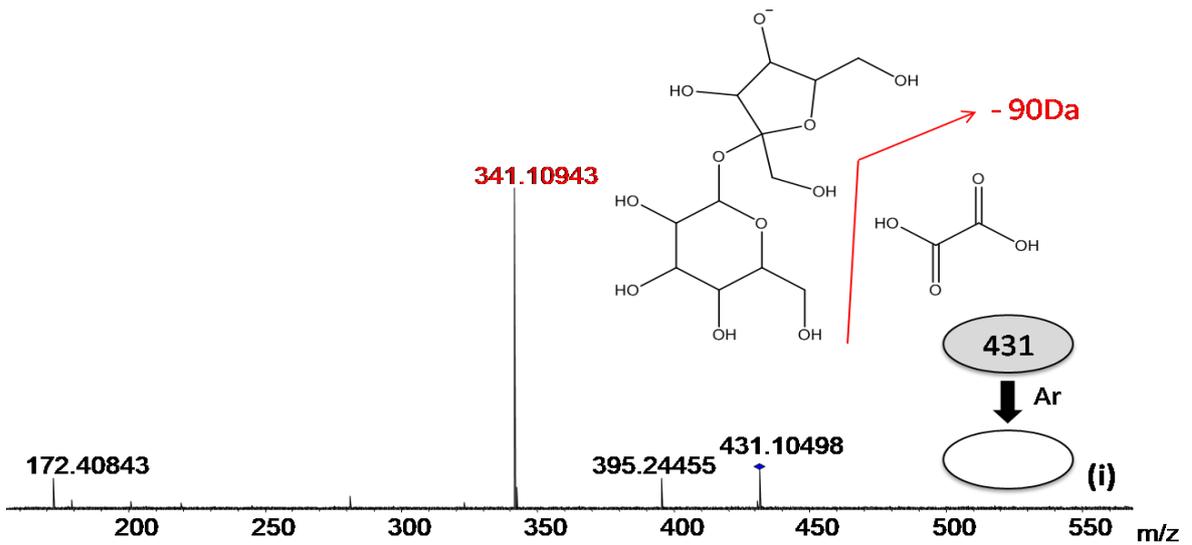
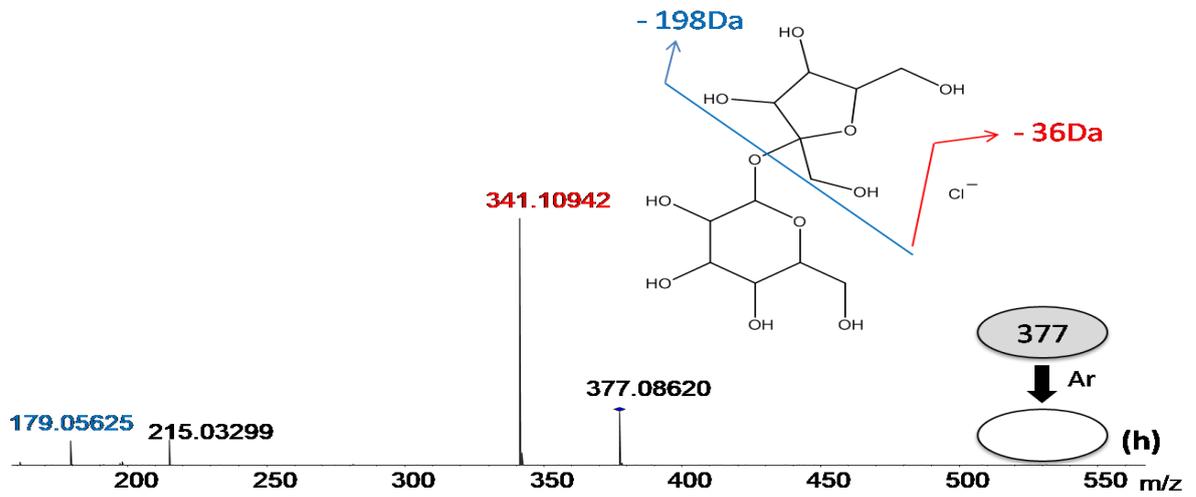
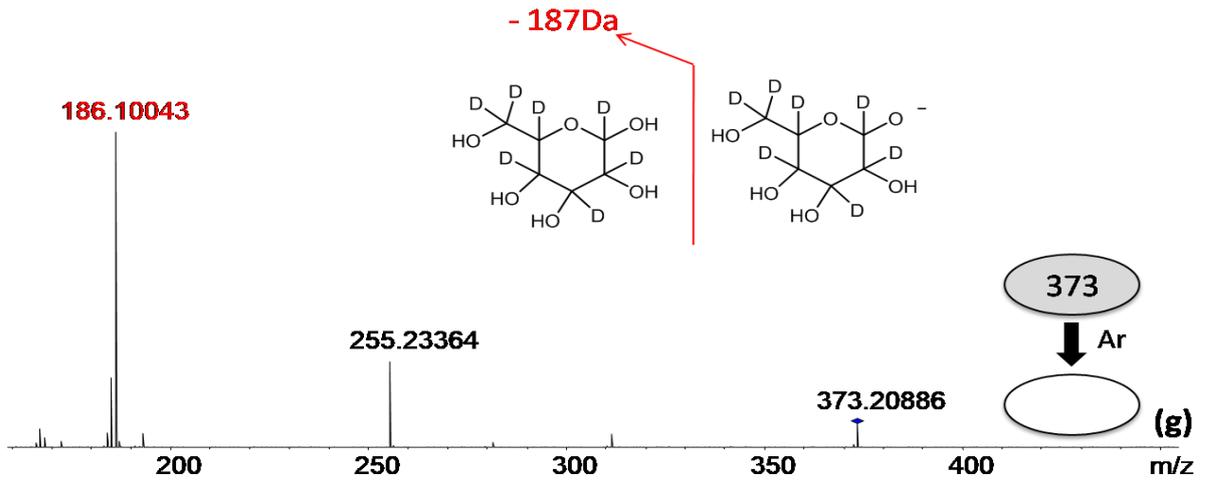


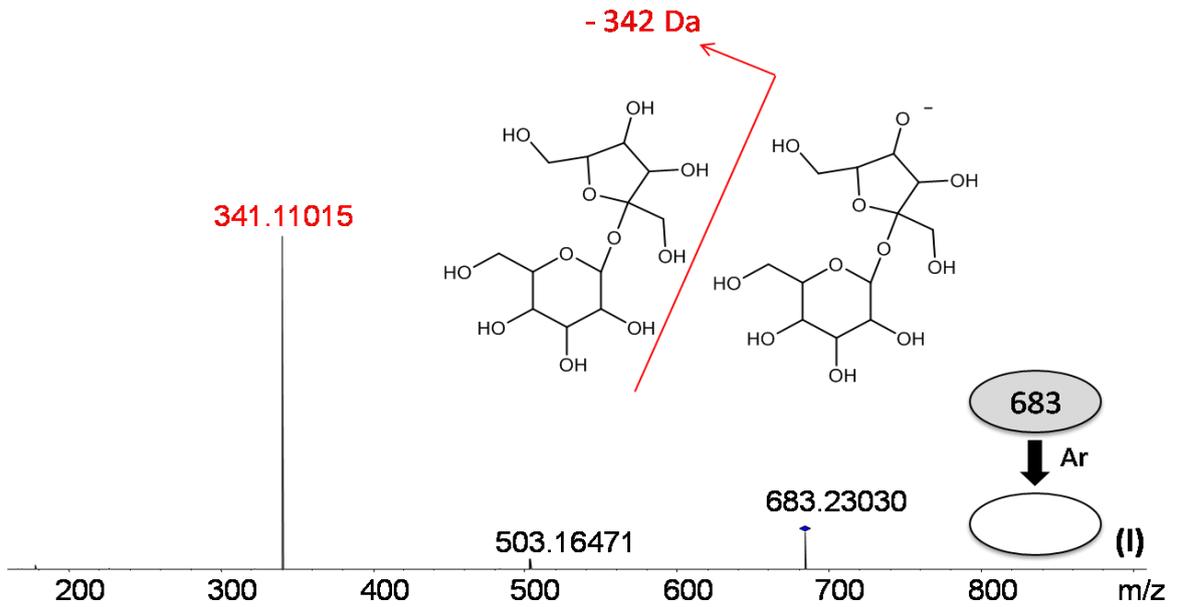
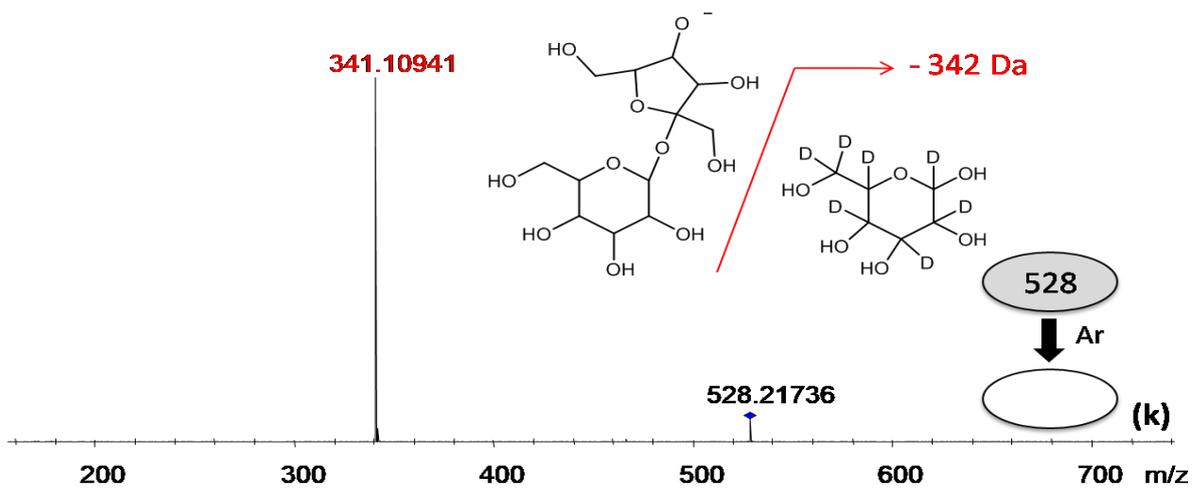
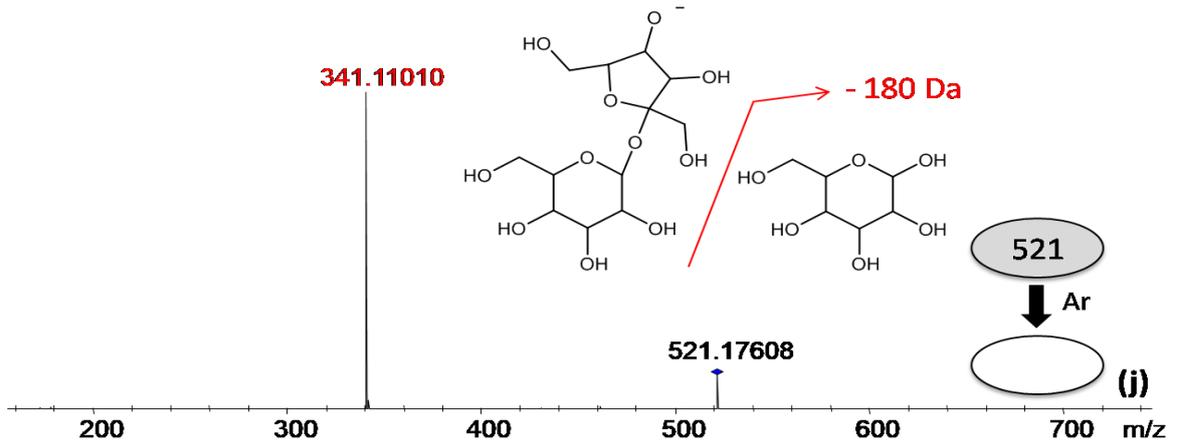


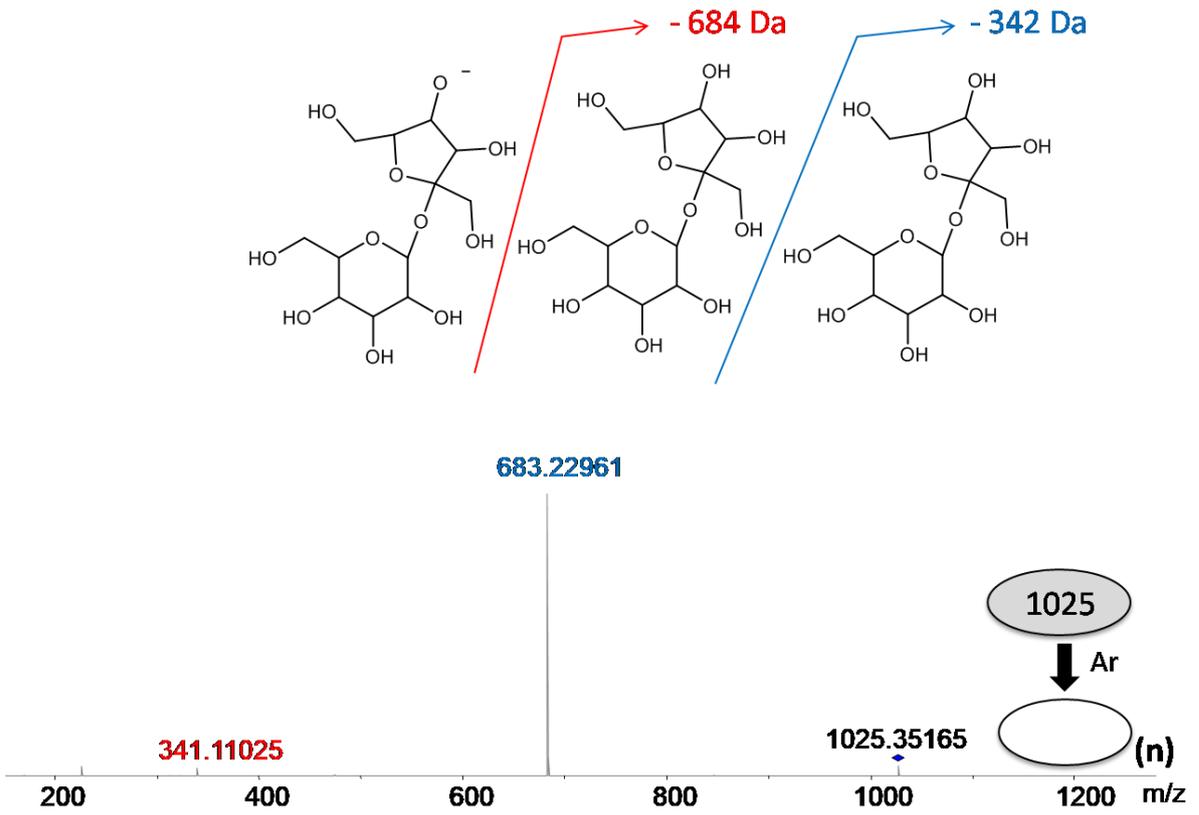
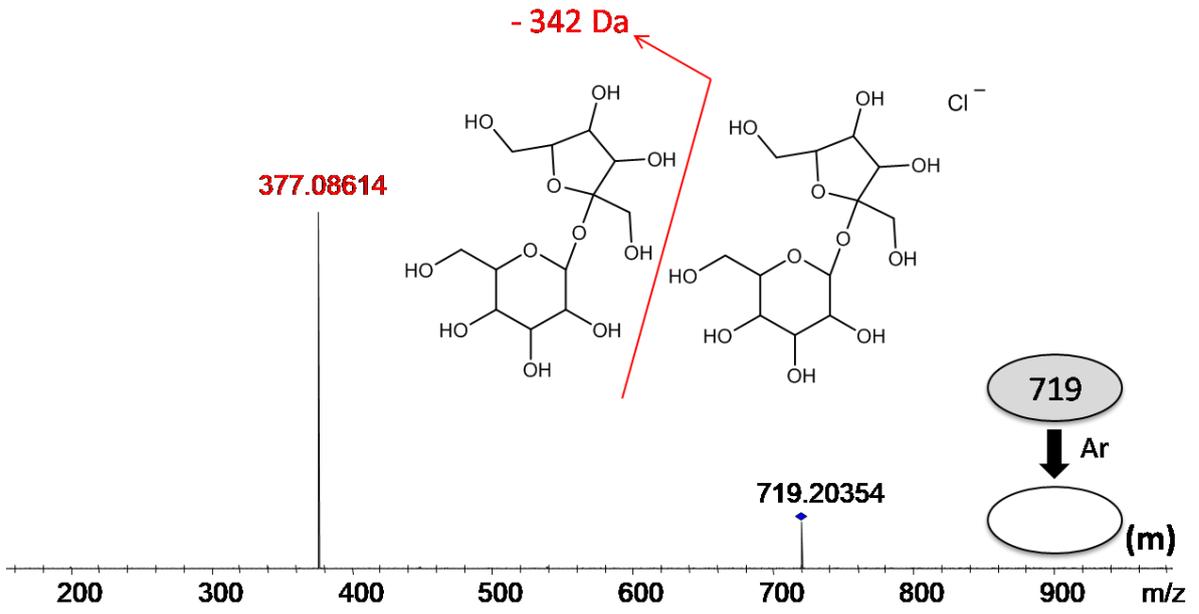
Anexo 2. Espectros de FT-ICR MS/MS dos extratos glicídicos de amostras de banana.



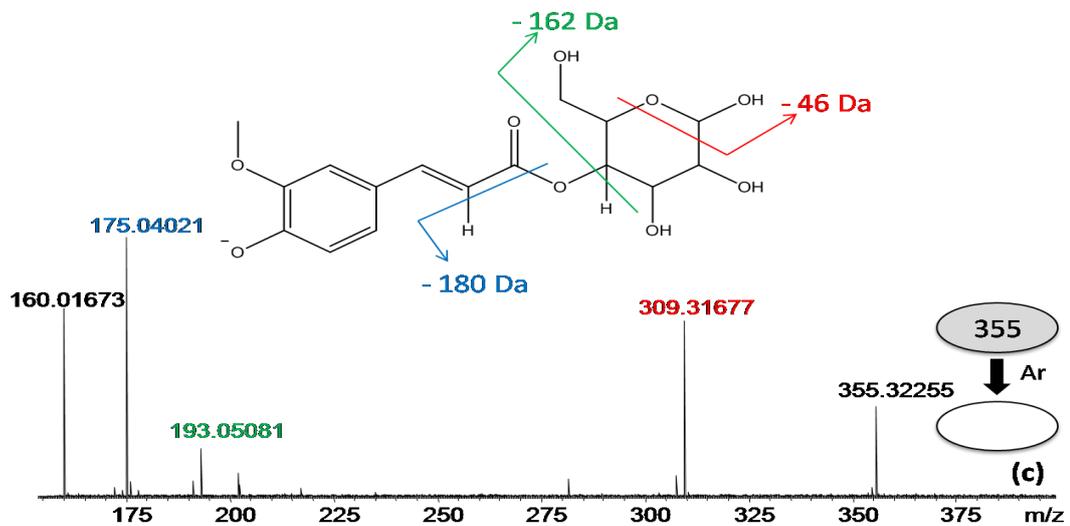
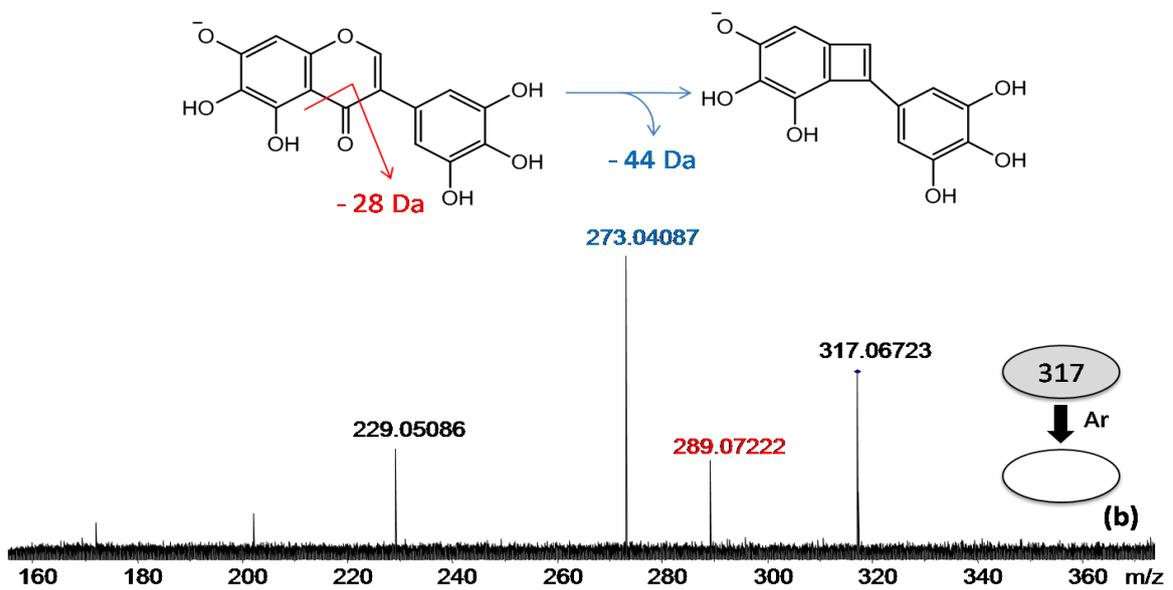
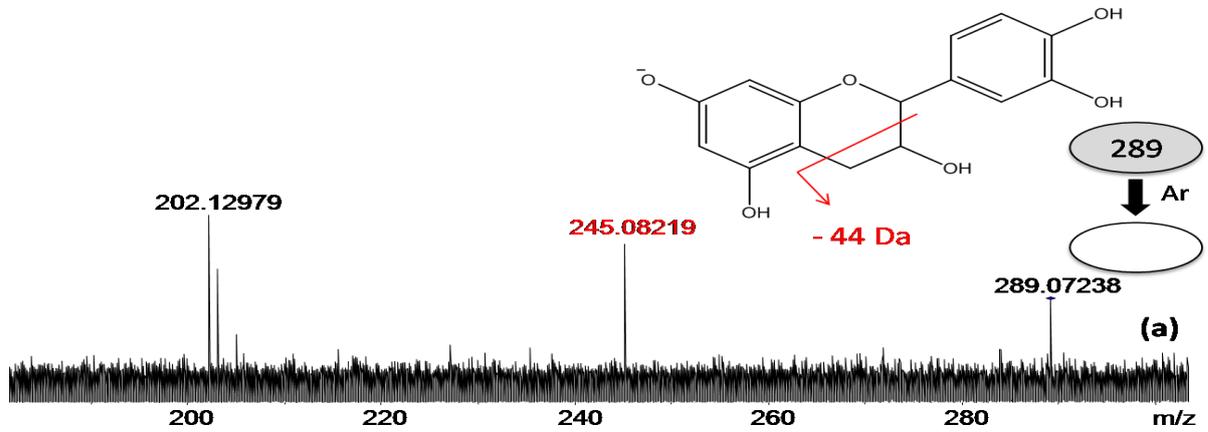


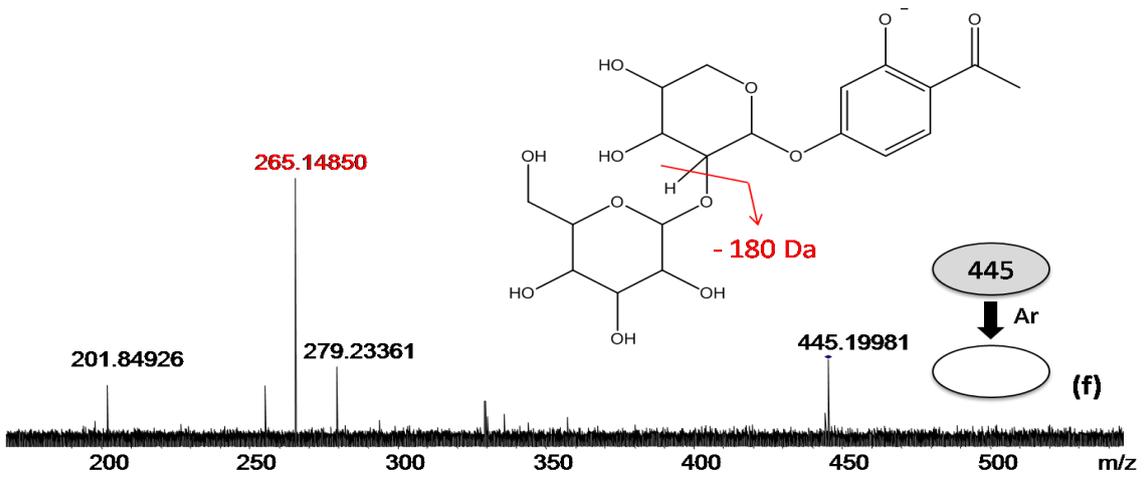
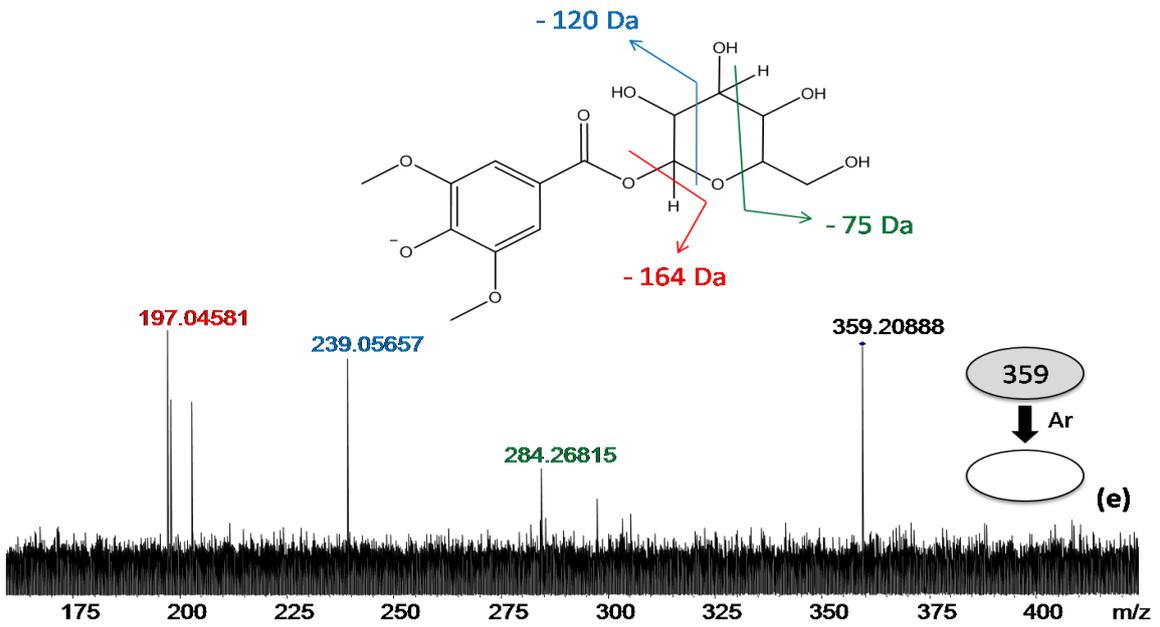
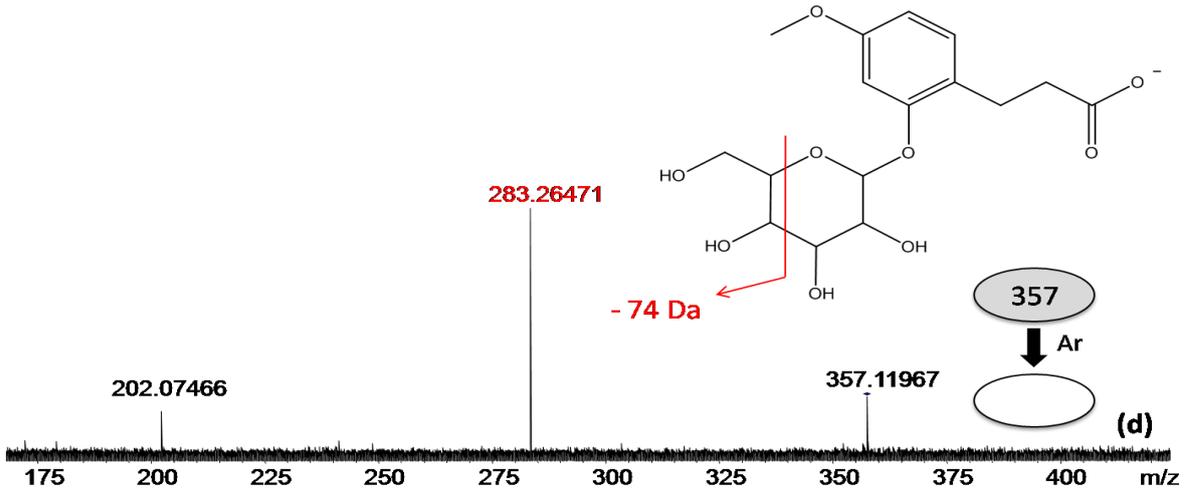


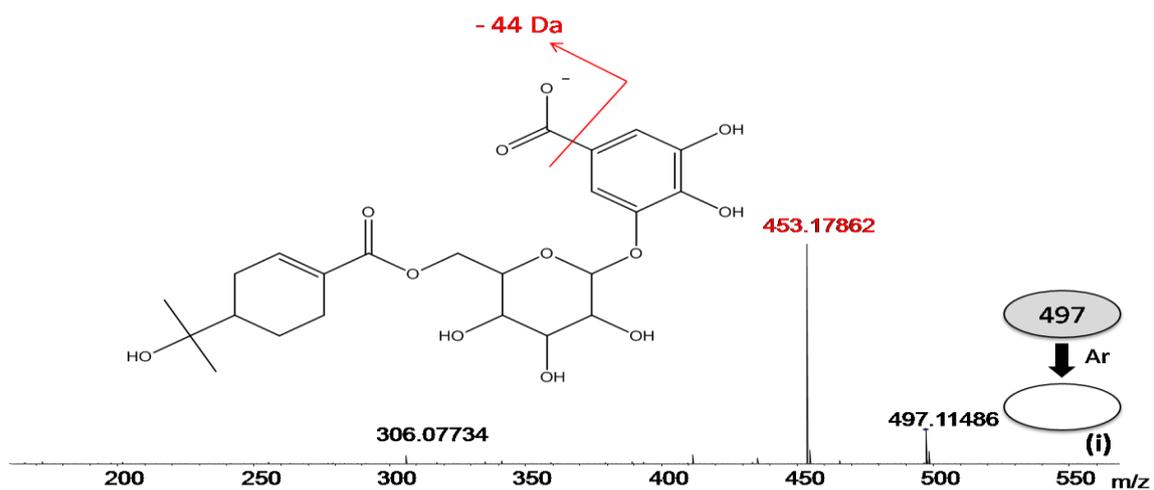
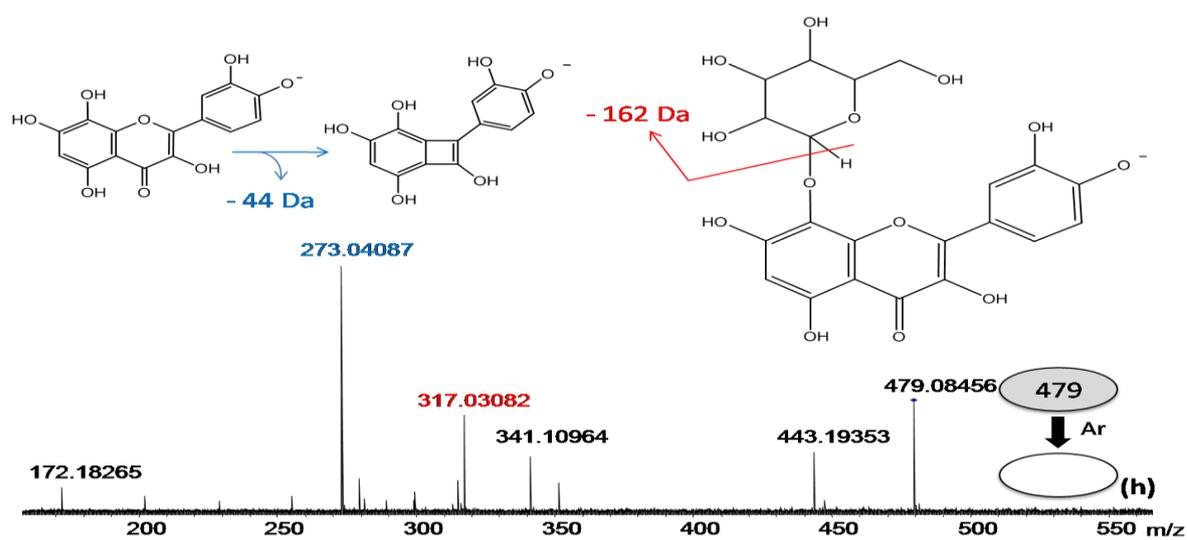
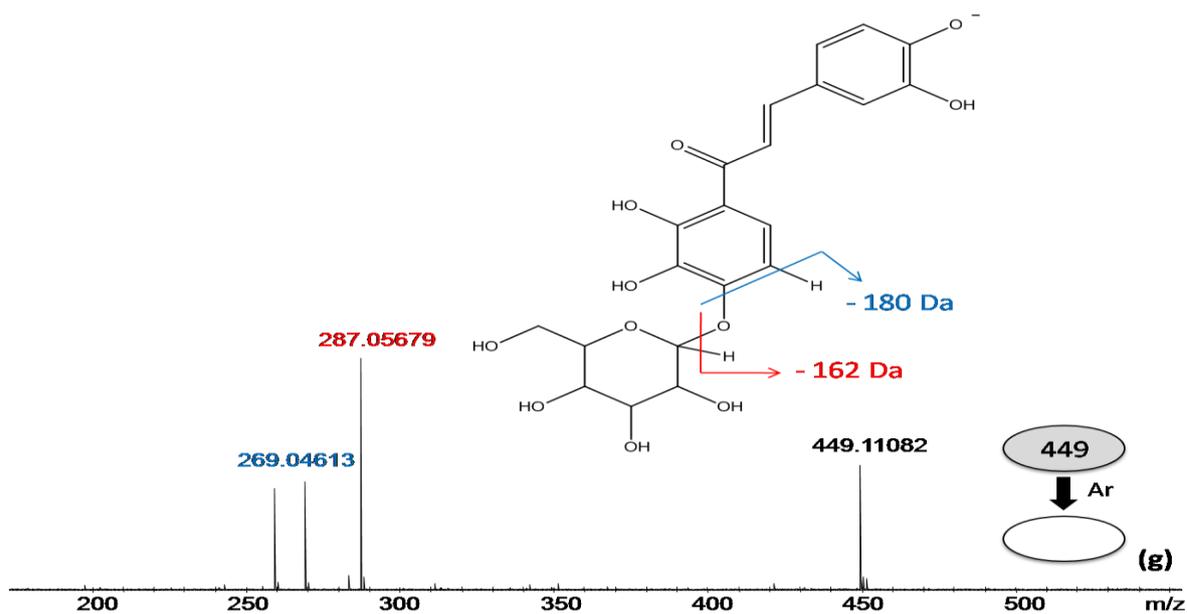


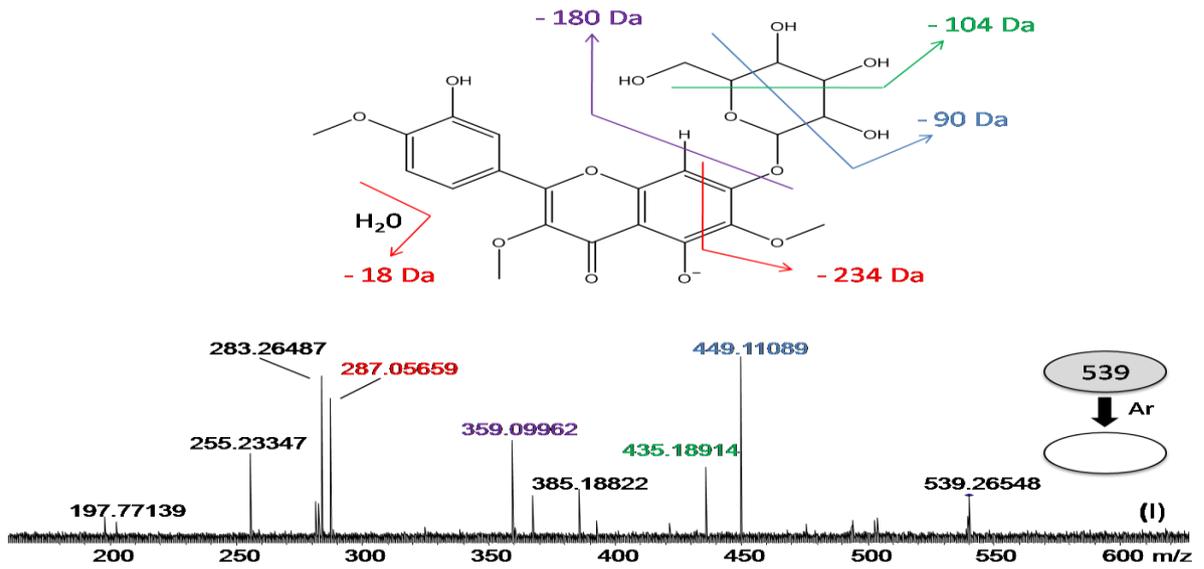
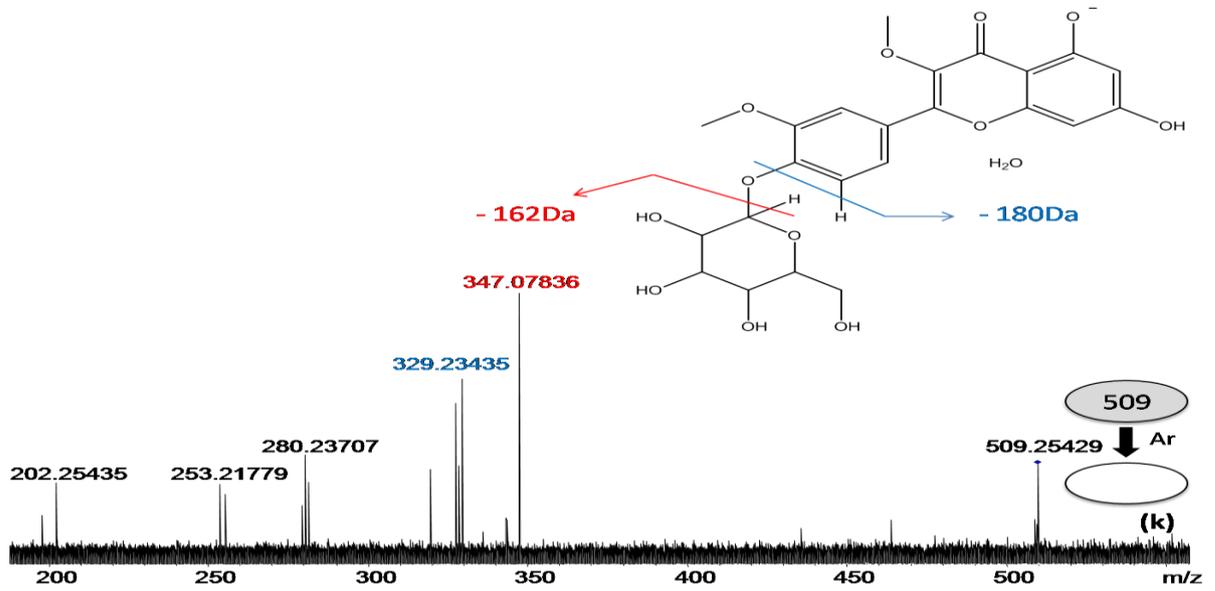
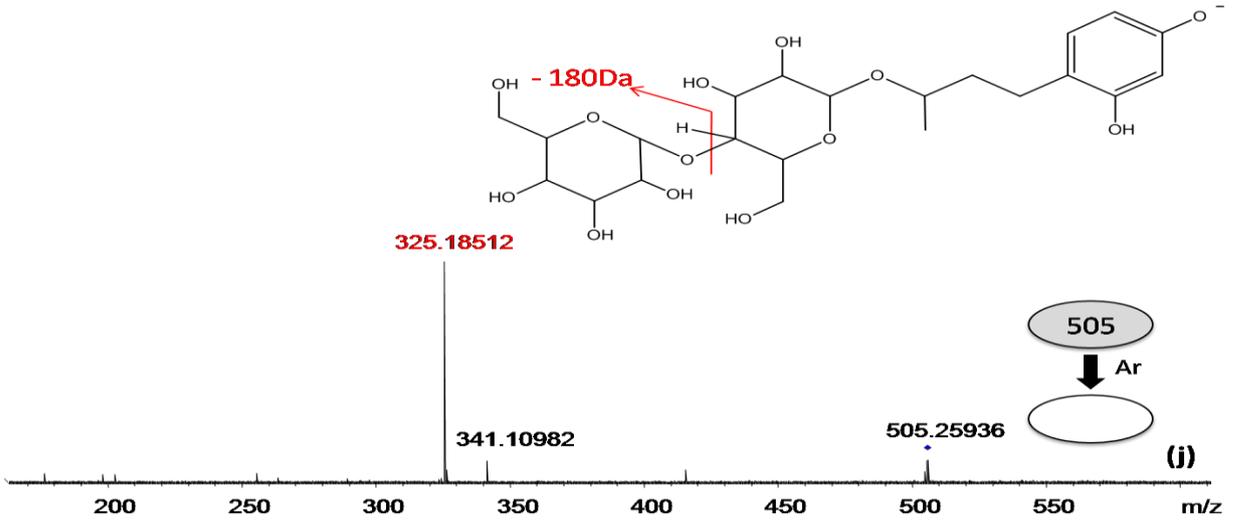


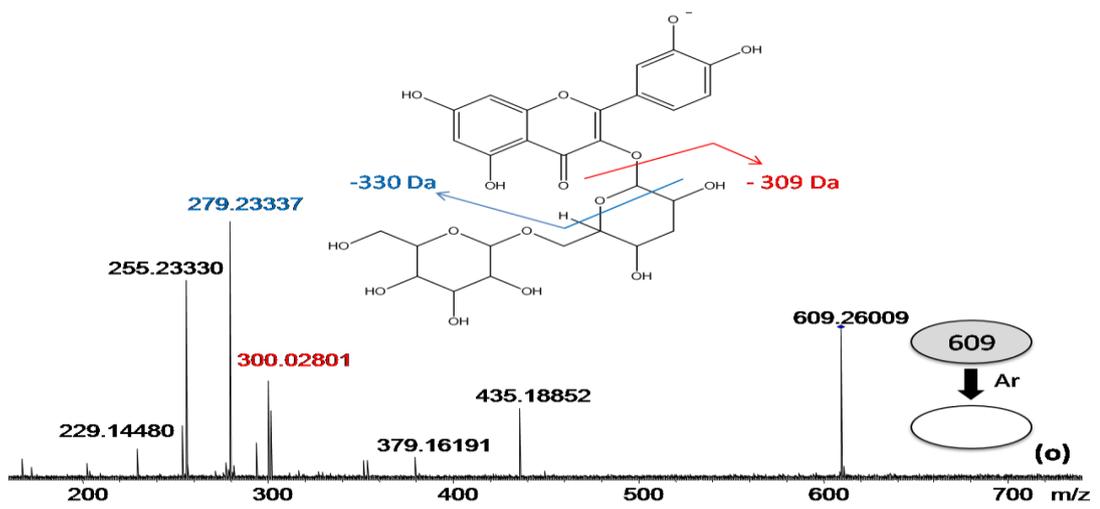
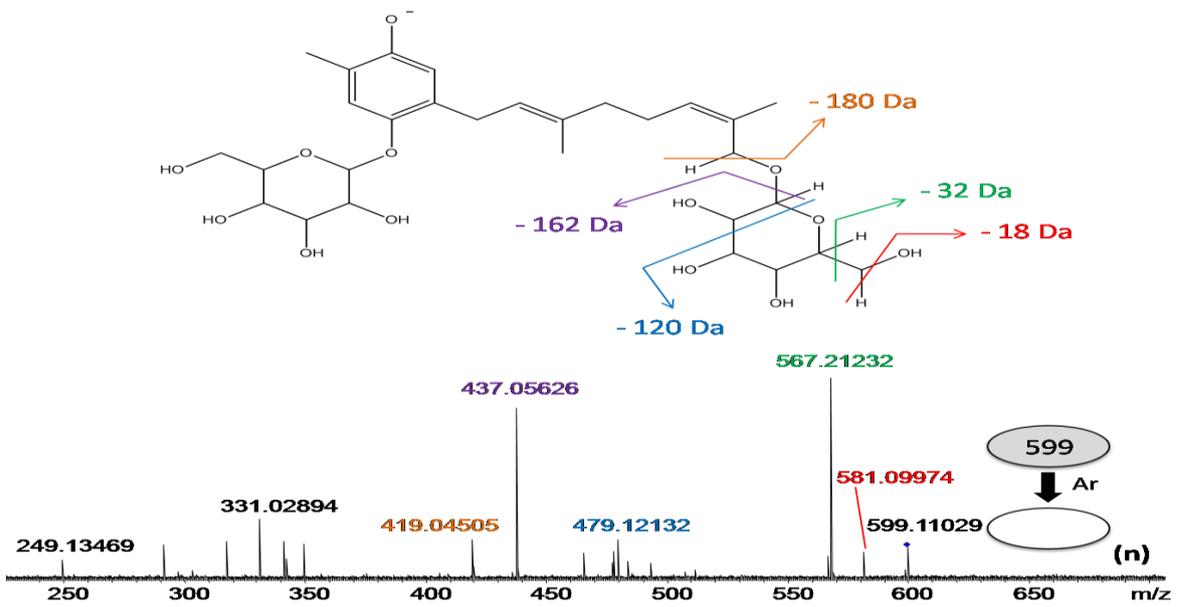
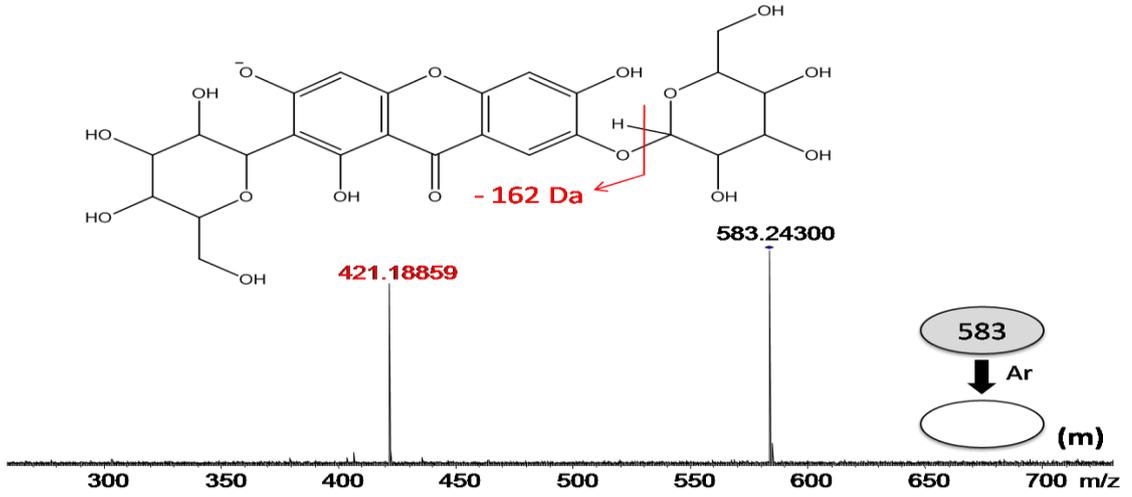
Anexo 3. Espectros de FT-ICR MS/MS dos extratos fenólicos de amostras de banana.

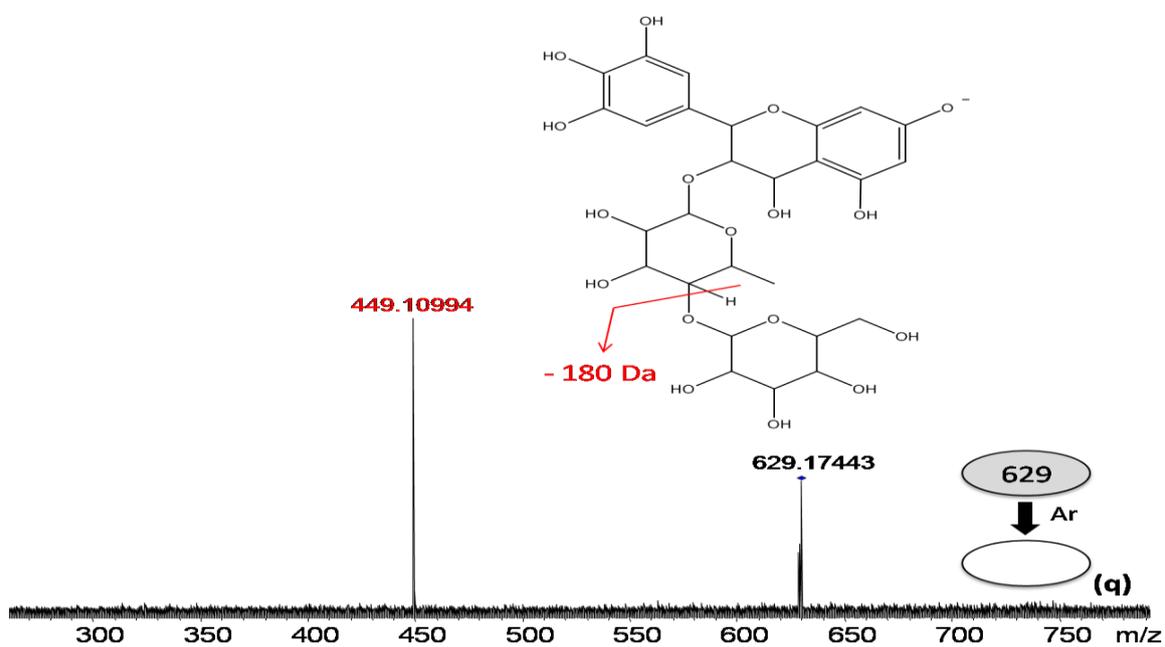
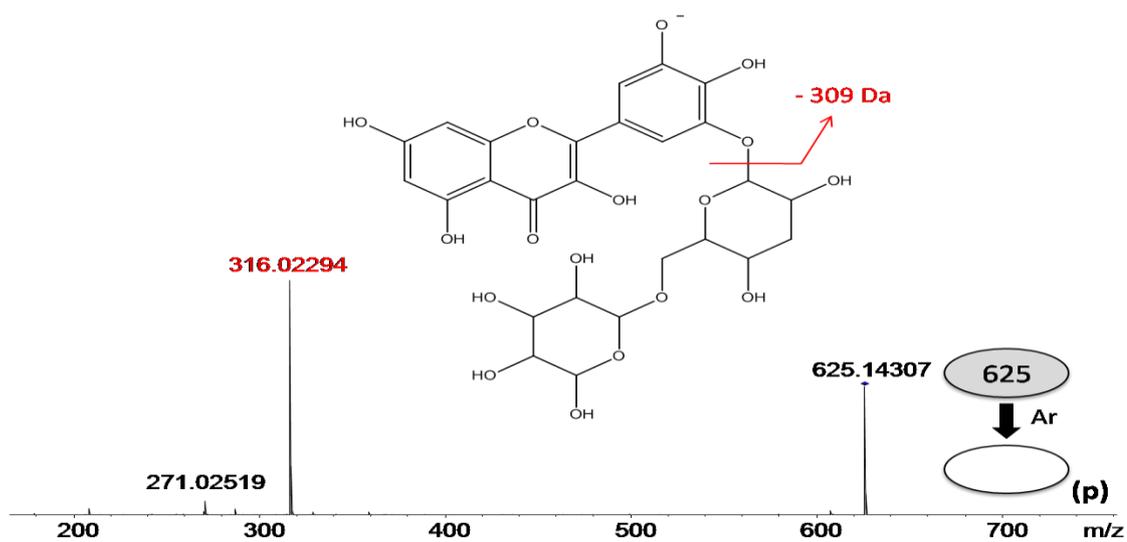












### Anexo 4. Espectros de FT-ICR MS/MS dos extratos fenólicos de amostras de juçara.

