

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

**Perfil Químico de Manga Ubá (*Mangifera indica* L.)  
por Espectrometria de Massas de Altíssima  
Resolução e Exatidão (FT-ICR-MS)**

**Bruno Gomes de Oliveira**

**Dissertação de Mestrado em Química**

**VITÓRIA - ES  
2015**

Bruno Gomes de Oliveira

**Perfil Químico de Manga Ubá (*Mangifera indica* L.) por  
Espectrometria de Massas de Altíssima Resolução e Exatidão  
(FT - ICR MS)**

Dissertação 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 Mestre em Química, na área de Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Wanderson Romão

Coorientador: Prof. Dr. Helber B.Costa

**VITÓRIA - ES  
2015**

**Perfil Químico de Manga Ubá (*Mangifera indica* L.) por  
Espectrometria de Massas de Altíssima Resolução e  
Exatidão (FT-ICR-MS)**

Bruno Gomes de Oliveira

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

Aprovado em 18/12/2015 por:

---

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

---

**Prof. Dr. Helber Barcellos Costa**  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Co-orientador

---

**Prof. Dr. Ricardo Machado Kuster**  
Universidade Federal do Espírito Santo

---

**Profa. Dra. Denise Coutinho Endringer**  
Instituto Federal do Espírito Santo

---

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

**Universidade Federal do Espírito Santo**  
Vitória - ES, Dezembro de 2015

Aos meus pais, Rogério Santos de  
Oliveira e Elizabel Gomes 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, pelo apoio, carinho, paciência.

Aos Professores Wanderson Romão e Helber Barcellos da Costa, pela orientação, paciência e pelo conhecimento transmitido.

Ao Professores Ricardo Machado Kuster, Denise Coutinho Endringer e José Aires Ventura por aceitarem participar da banca de dissertação, 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 em especial a professora Denise Endringer pelo auxílio na pesquisa.

Aos amigos de Laboratório de Petroleômica e Forense: Lindamara, Heloisa, Letícia, Elizangela, Radigya, Fabiano, Flávia, Aryanne, Daniel, Eliane, Gabriela, Izabela, Jade, Larissa, Lilian, Natwrie, Silvana, Vitor, Eloilson e Fernanda.

A CAPES, CNPQ e FAPES pelo auxílio nesse período.

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

“Derrota após derrota até a vitória final”

Che Guevara

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Participação, em %, dos grupos de produção no valor total da produção agrícola do ES em 2014. ....	17
Figura 2. Etapas do desenvolvimento de frutas climatéricas. ....	18
Figura 3. Figura esquemática de um espectrômetro de massas.....	22
Figura 4. Figura esquemática de uma fonte de ionização por electrospray.....	23
Figura 5. Figura esquemática de um espectrômetro de massas FT-ICR. ....	24
Figura 6. Figura esquemática de uma célula de ICR. ....	26
Figura 7. Figura esquemática da sílica modificada com C18. ....	27
Figura 8. Fundamento químico do ensaio de indução da quinona redutase. Mecanismo de redução da menadiona para menadiol, pela NAD(P)H: quinona redutase (QR). Modificado de Li et al. (1995).....	30
Figura 9. Fotografias de amostras de manga Ubá em quatro estádios de maturação. ....	38
Figura 10. Ensaios Físico-químicos utilizando metodologias convencionais: (a) SST, (b) pH, (c) AT e (d) Razão SST/AT.....	39
Figura 11. ESI (-) FT - ICR MS: (a) estágio 1, (b) estágio 2, (c) estágio 3 e (d) estágio 4. ....	40
Figura 12. ESI (-) MS/MS dos íons de m/z (a) 341, (b) 377, (c) 521, (d) 683 e (e) 1025. ....	44
Figura 13. Variação do conteúdo de sacarose e ácidos orgânicos em função dos estádios de maturação. Intensidade relativa de sacarose e ácidos orgânicos. Intensidades relativas seguidas de letras diferentes diferem significativamente entre si, a nível de 5%. ....	46
Figura 14. Espectros de Massas ESI (-) FT-ICR: (a) estágio 1, (b) estágio 2, (c) estágio 3 e (d) estágio 4. ....	48
Figura 15. ESI (-) MS/MS dos íons m/z (a) 335, (b) 421, (c) 483, (d) 635 e (e) 787. ....	51
Figura 16. Variação do conteúdo de ácido chiquímico e compostos fenólicos em função dos estádios de maturação. As letras a e b indica que os teores dos compostos diferem significativamente entre si, a nível de 5%, pelo teste de Tukey. ....	53
Figura 17. Intensidade Relativa dos compostos fenólicos em função dos estádios de maturação. ....	56
Figura 18. Curva de calibração obtida utilizando soluções do padrão de ácido gálico. ....	61

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação de compostos fenólicos conforme tipo de cadeia. ....	21
Tabela 2. Tabela de elementos necessários ao cálculo da ANOVA.....	28
Tabela 3. Ensaio Físico–químicos utilizando metodologias convencionais: SST, AT, pH e Razão SST/AT.....	39
Tabela 4. Compostos Químicos propostos dos Espectros de Massas ESI (-) FT-ICR dos estádios de maturação. ....	41
Tabela 5. Análise de variância para as intensidades relativas dos sinais de ácidos orgânicos.....	46
Tabela 6. Análise de variância e teste de Tukey para as intensidades relativas dos sinais de ácidos orgânicos. ....	47
Tabela 7. Compostos Químicos propostos dos Espectros de Massas ESI (-) FT-ICR dos estádios de maturação. ....	48
Tabela 8. Análise de variância e teste de Tukey para as intensidades relativas dos sinais de compostos fenólicos.....	53
Tabela 9. Análise de variância e teste de Tukey para as intensidades relativas dos sinais de ácido chiquímico.....	54
Tabela 10. Análise de variância e teste de Tukey para as intensidades relativas dos sinais de Galato de metila. ....	57
Tabela 11. Análise de variância e teste de Tukey para as intensidades relativas dos sinais de Ácido Elágico. ....	57
Tabela 12. Análise de variância e teste de Tukey para as intensidades relativas dos sinais de Galoil glicose.....	58
Tabela 13. Análise de variância e teste de Tukey para as intensidades relativas dos sinais de Digalato de metila éster.....	58
Tabela 14. Análise de variância e teste de Tukey para as intensidades relativas dos sinais de Mangiferina. ....	59
Tabela 15. Análise de variância e teste de Tukey para as intensidades relativas dos sinais de Digaloil glicose. ....	59
Tabela 16. Análise de variância e teste de Tukey para as intensidades relativas dos sinais de Trigaloil glicose.....	60
Tabela 17. Análise de variância e teste de Tukey para as intensidades relativas dos	

sinais de Tetragaloil glicose.....	61
Tabela 18. Concentração de polifenóis totais em termos de ácido gálico. ....	62
Tabela 19. Análise de variância e teste de Tukey para as Concentrações de polifenóis totais em termos de ácido gálico.....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APCI - Ionização química a pressão atmosférica

APPI - Fotoionização a pressão atmosférica

AS - Atividade específica.

AT - Acidez total titulável.

BSA - Albumina sérica bovina

C18 – Octadecil.

CD - Concentração necessária para duplicar a atividade da enzima em relação a atividade basal.

CI - Índice de quimioprevenção.

CI - ionização química

CI<sub>50</sub> - Concentração inibitória.

dms - Diferença mínima significativa.

DMSO – Dimetilsulfóxido.

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

EI - Ionização por elétrons

ESI (-) - Eletrospray no modo negativo.

FAD - Dinucleótido de flavina e adenina.

FT-ICR MS - Espectrometria de Massas de Ressonância Ciclôtrica de Íons com Transformada de Fourier.

G-6-P - Glicose-6-fosfato

G-6-PH - Glicose-6-fosfato-desidrogenase

GLD - Grau de liberdade dentro do grupo.

GLE - Grau de liberdade entre grupos.

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

IR - Índice de indução.

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.

PBS - Tampão fosfato salina.

pH - Potencial hidrogeniônico.

ppm – Partes por milhão.

QR - Quinona-redutase

SDS - Dodecil-sulfato de sódio

SEAG - Secretaria de Estado da Agricultura, Abastecimento, Aquicultura e Pesca.

SST - Sólidos solúveis totais.

ST - Sólidos totais

TOF – Tempo de vôo.

UV/Vis - Ultravioleta-visível.

## LISTA DE SÍMBOLOS

$C_6$  - Anel benzênico

$C_n$  - Cadeia substituinte com “n” átomos de carbono.

$B$  - Campo magnético uniforme.

$q$  – Carga do íon.

$F$  – Força.

$r$  - Raio.

$V$  – Velocidade.

$a_c$  - Aceleração centrípeta.

$m$  - Massa do íon.

$\omega$  - Frequência ciclôtrônica.

$\mu$  - Média.

$T_k$  - Soma dos valores de certo tratamento  $k$ .

$n_k$  - Número de observações no tratamento  $k$ .

$T^2$  - Soma de todos os valores amostrados elevada ao quadrado.

$N$  - Número total de observações.

$k$  - Número de repetições de cada tratamento.

$A_1$  - Absorbância da solução na presença do indutor, lido na placa “QR ensaio”.  $AT$  - Absorbância da solução na presença do indutor, lido na placa “Proteína”.

$SA_i$  - Atividade específica de células tratadas com indutores.

$SA_n$  - Atividade específica de células tratadas com o controle de solvente (controle negativo).

$AA$  - Absorbância da solução na presença da amostra, lida na placa “Proteína”.

$Ac$  - Absorbância da solução na presença do controle negativo, lido na placa “Proteína”.

## RESUMO

A manga (*Mangifera indica* L.) é um alimento rico em compostos benéficos à saúde. A Manga Ubá é amplamente utilizada na indústria alimentar. O principal objetivo deste estudo foi determinar o perfil químico da manga Ubá em quatro diferentes estádios de maturação para avaliar o perfil químico da manga Ubá durante o processo de crescimento e maturação utilizando Espectrometria de Massas de Ressonância Ciclotrônica de Íons com Transformada de Fourier (FT-ICR MS) e análises físico-químicas (acidez total titulável (AT), sólidos solúveis totais (SST), razão (SST/AT), e conteúdo total de polifenóis). Os dados foram adquiridos e metabólitos primários (ácidos orgânicos e açúcares) e metabólitos secundários (compostos polifenólicos) foram identificados principalmente no terceiro estágio de maturação, sendo, portanto, a melhor fase para a colheita e consumo da fruta. Além disso, a quimioprevenção do câncer de metabólitos secundários (extratos fenólicos obtidos a partir de amostras de manga) foi avaliada utilizando ensaios de indução da atividade da quinona redutase.

**Palavras-chave:** Manga. Polifenóis. Espectrometria de Massas. ESI (-) FT-ICR MS.

## ABSTRACT

*Mangifera indica* L., mango fruit, is consumed as a food or dietary supplement with purported health benefits. Ubá mango is widely used in the food industry. The main aim of this study was to determine the chemical profile of Ubá mango in four distinct maturation stage i.e. to evaluate the chemical variation of the Ubá mango during the process of growth and maturity using negative-ion mode electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (ESI(-)FT-ICR MS) and physicochemical characterization analysis (total titratable acidity (TA), total soluble solids (TSS), TSS/TA ratio, and total polyphenolic content). The data were acquired and correlated. Primary (organic acids and sugars) and secondary metabolites (polyphenolic compounds) were primarily identified in third maturation stage, being therefore, the better stage for the harvest and consumption of fruit. Besides, the potential cancer chemoprevention of the secondary metabolites (phenolic extracts obtained from mango samples) were evaluated using the induction of quinone reductase activity.

**Keyword:** Mango. Polyphenols. Mass spectrometry. ESI (-) FT-ICR MS.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>1.1 A importância do agronegócio para o Brasil e Espírito Santo</b> .....	16
<b>1.2 A fruticultura capixaba</b> .....	16
1.2.1 O cultivo da manga no espírito santo.....	17
<b>1.3 Desenvolvimento e amadurecimento de frutas</b> .....	18
<b>1.4 A cultivar ubá</b> .....	19
<b>1.5 Açúcares, ácidos orgânicos e compostos polifenólicos em mangas</b> .....	20
<b>1.6 Espectrometria de massas</b> .....	22
1.6.1 Ionização por electrospray (ESI).....	23
1.6.2 Espectrometria de massas de ressonância ciclôtrônica de íons com transformada de fourier (FT-ICR MS).....	24
<b>1.7 Extração e concentração de polifenóis utilizando sílica c18</b> .....	26
<b>1.8 Análise de variância (Anova) e teste de Tukey</b> .....	27
<b>1.9 Ensaio de atividade da quinona – redutase</b> .....	29
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	31
<b>3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL</b> .....	31
<b>3.1 Amostras</b> .....	31
<b>3.2 Análises físico-químicas</b> .....	31
<b>3.3. Preparo da fração glicídica</b> .....	32
<b>3.4. Preparo da fração fenólica</b> .....	32
<b>3.5 ESI (-) FT - ICR MS</b> .....	32
<b>3.6 ESI (-) FT - ICR MS/MS</b> .....	33
<b>3.7 Quantificação de polifenóis totais</b> .....	34
<b>3.8 Ensaio de atividade da quinona – redutase</b> .....	34
3.8.1 Re-estabelecimento das linhagens celulares mantidas em n <sub>2</sub> líquido.....	34
3.8.2 Preparo das células para ensaio.....	34
3.8.3 Determinação da indução da quinona - redutase.....	35
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	37
<b>4.1 Análises físico – químicas</b> .....	37
<b>4.2 ESI-FT-ICR MS E ESI (-) FT - ICR MS/MS</b> .....	39
4.2.1 Análise da fração glicídica.....	39

4.2.2 Análise da fração fenólica.....	47
<b>4.3 Polifenóis totais .....</b>	<b>61</b>
<b>4.4 Determinação da indução da quinona - redutase .....</b>	<b>63</b>
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>63</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>65</b>

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 A IMPORTÂNCIA DO AGRONEGÓCIO PARA O BRASIL E ESPÍRITO SANTO**

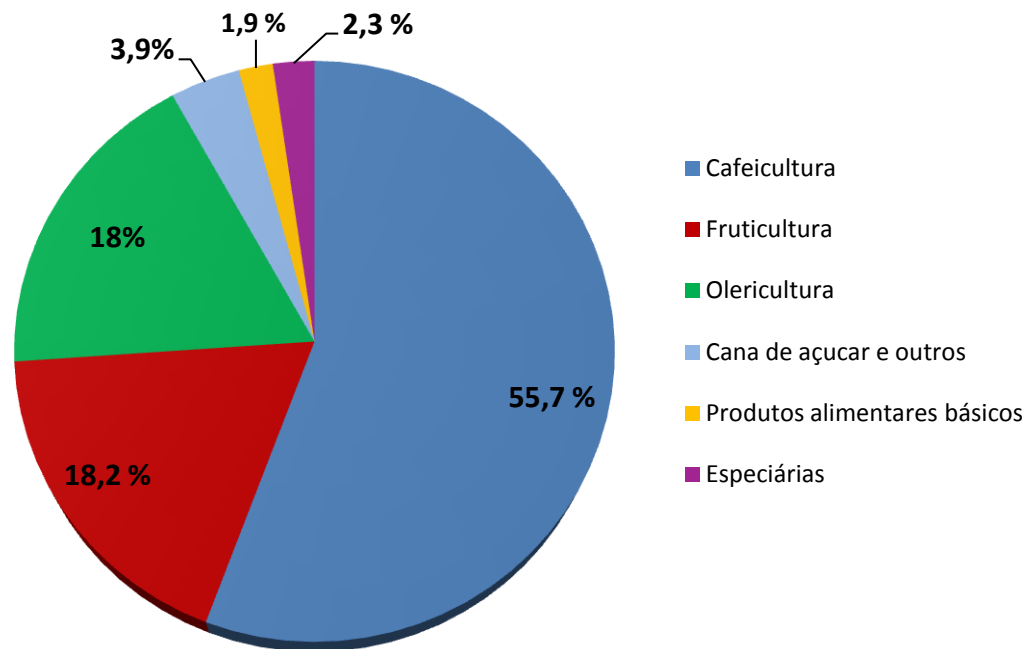
O agronegócio é um importante seguimento da economia brasileira, pois representa grande parcela do capital gerado no país e, além disso, agrega grande fatia dos trabalhadores brasileiros. O valor bruto da produção agropecuária brasileira, em 2015, é estimado em mais de 470 bilhões de reais.<sup>1</sup> Em 2013, as exportações da agricultura e das indústrias agroalimentares totalizaram 36% de toda exportação do país.<sup>2</sup>

A fruticultura é um importante ramo da agricultura, em 2014, cerca de 750 mil toneladas de frutas frescas foram exportadas, totalizando mais de 870 milhões de dólares de arrecadação. As projeções indicam que até 2025 a fruticultura aumentará sua produção. As frutas que terão os maiores aumentos de produção serão melão em 39,3%, mamão em 31,2% e manga em 25,0%, em relação a 2014/15.<sup>3</sup>

O Agronegócio é de extrema importância para o Estado do Espírito Santo, pois é uma importante fonte de receita. Esse seguimento foi responsável por cerca de 6% do PIB estadual em 2014. A produção agrícola do Espírito Santo, que engloba a produção de grãos, cereais, frutas, leguminosas e oleaginosas foi estimada em mais de 7 milhões de toneladas e a área colhida foi em torno de 650 mil hectares em 2014. Além disso, a agricultura absorve grande parte da população economicamente ativa do Espírito Santo.<sup>4</sup>

### **1.2 A FRUTICULTURA CAPIXABA**

Um dos seguimentos de grande importância para o agronegócio capixaba é a fruticultura que representa grande parcela do capital gerado pela agropecuária estadual. A fruticultura, em 2014, ocupou a segunda posição em termos de valor bruto de produção agropecuária (18,2%) (Figura 1), perdendo apenas para a cafeicultura (55,7%). Ao todo a área colhida de fruticultura foi de aproximadamente 70000 hectares e a produção atingiu mais de 1,2 milhões de toneladas.<sup>4</sup>



**Figura 1.** Participação, em %, dos grupos de produção no valor total da produção agrícola do ES em 2014.<sup>4</sup>

As principais frutas cultivadas no estado são o mamão, banana, coco, abacaxi, maracujá, tangerina, laranja e manga.<sup>4</sup> A expansão da fruticultura capixaba foi acompanhada pela instalação de indústrias processadoras de frutas e investimentos do Governo do Estado e do INCAPER na implantação e a consolidação de Pólos Especializados de Frutas.<sup>5</sup>

De acordo com o INCAPER, um dos fatores que dificultam a produção e elevação da qualidade da fruticultura é a desestruturação das ações de pesquisa, assistência técnica e extensão rural.<sup>6</sup> O presente trabalho visa contribuir para esta melhora na qualidade das frutas produzidas no estado.

### 1.2.1 O CULTIVO DA MANGA NO ESPIRITO SANTO

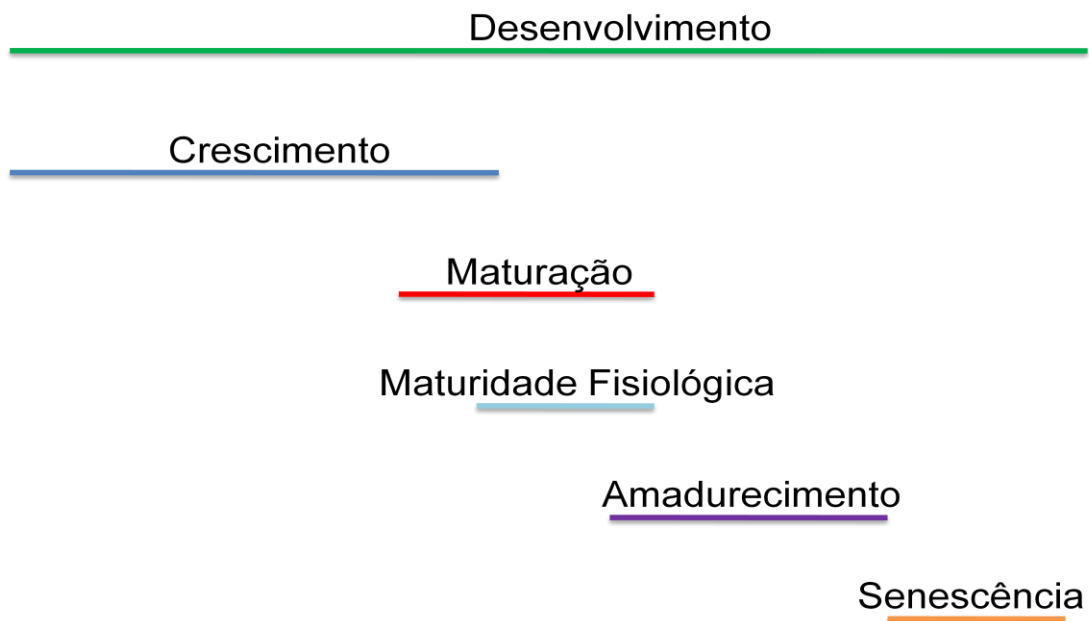
O cultivo da manga no Espírito Santo é realizado por agricultores familiares. Foram estabelecidos pelo Governo do Estado do Espírito Santo, com o apoio da Secretaria de Estado da Agricultura, Abastecimento, Aquicultura e Pesca (SEAG) e do INCAPER, alguns pólos de fruticultura no Estado. O pólo produtor de manga fica localizado nos municípios de Água Doce do Norte, Barra de São Francisco, Águia Branca, São Gabriel da Palha, São Domingos do Norte, Mantenópolis, Alto Rio

Novo, Pancas, Marilândia, Colatina, Baixo Guandu, Laranja da Terra, São Roque do Canaã, Itarana, Itaguaçu, Santa Teresa e Governador Lindenberg.<sup>5</sup>

A produção da manga Ubá é reconhecida como ramo da fruticultura de grande importância. Além de gerar muitos postos de trabalho (mais de 700 famílias) ela representa significativa produção de renda para o Estado. Em 2014, foram produzidos mais de treze mil toneladas de manga. A manga produzida é vendida *in natura*, como polpa ou como suco para pronto consumo.<sup>4, 5, 7</sup>

### 1.3 DESENVOLVIMENTO E AMADURECIMENTO DE FRUTAS

O processo de desenvolvimento dos frutos envolve etapas como crescimento, maturação, amadurecimento e senescência (Figura 2).



**Figura 2.** Etapas do desenvolvimento de frutas climatéricas.<sup>9</sup>

O crescimento dos frutos é caracterizado por mudanças físicas no fruto, nesta fase o fruto aumenta consideravelmente seu volume. Neste período há divisão e expansão celular causando assim o aumento de volume do fruto.<sup>8,9</sup>

Na fase maturação ocorrem algumas transformações fisiológicas no fruto. Neste estágio o fruto tem um aumento nos teores de açúcares, pigmentos da casca e polpa e compostos voláteis, além do decréscimo nos teores de ácidos orgânicos e amido. Ao fim da maturação, o fruto atinge a maturidade fisiológica. As frutas climatéricas, como a manga, ao serem colhidas antes do seu completo

amadurecimento continuam amadurecendo pós-colheita, desde que sejam colhidas com maturidade fisiológica.<sup>10</sup>

O amadurecimento é uma fase em que as propriedades organolépticas do fruto são modificadas até o ponto de consumo. As alterações em diversas vias metabólicas culminam em alterações em atributos como sabor, aroma, textura e cor.<sup>11</sup>

Após o amadurecimento, inicia-se a senescência, que é o período em que as reações catabólicas sobrepõem as anabólicas. Nesta etapa há degradação das células do fruto e os conteúdos de compostos voláteis, açúcares, amido e ácidos orgânicos diminuem.<sup>9</sup>

#### **1.4 A CULTIVAR UBÁ**

Uma das variedades de manga produzida no Brasil é a Manga Ubá. Esta variedade é cultivada principalmente no Estado de Minas Gerais, na Região da Zona da Mata<sup>12</sup> e no Estado do Espírito Santo, onde foi desenvolvido um Pólo de Manga.<sup>13</sup> Em 2014, haviam mais de 1000 hectares de área colhida, com produção que ultrapassou treze mil toneladas anuais só no Espírito Santo.<sup>4</sup> As perspectivas da produção da manga Ubá para fins de processamento são bastante positivas para o Espírito Santo em razão do parque agroindustrial instalado e da tendência de expansão do mercado mundial da polpa e do suco da fruta.<sup>5</sup>

A manga Ubá é uma fruta pequena, que pode chegar a 150g, apresenta cerca de 13% de casca, que é amarelada e fina, quando madura. Sua polpa possui fibras finas, curtas e macias.<sup>14</sup> Além disso, a fruta mantém a coloração amarelo-claro após o processamento, possui viscosidade apropriada para o consumo e possui boa conservação do *flavor*. Devido a essas qualidades sensoriais a Manga Ubá vem sendo largamente utilizada pela indústria para a produção de polpa e sucos, além de ser consumida *in natura* pela população.<sup>15</sup>

A colheita da manga Ubá é uma etapa decisiva, podendo comprometer toda a produção. É uma fruta climatérica, ou seja, completa seu amadurecimento após a colheita. No entanto, se for colhida em um estágio de maturação muito verde, ou seja, antes da maturidade fisiológica, o resultado será uma fruta com alta acidez. Se colhida em estágio avançado de maturação, sofrerá danos mecânicos durante colheita e transporte. No caso da manga Ubá, não existem estudos sobre o ponto ideal de colheita. Sua colheita é executada analisando a mudança de cor da casca e polpa, aparecimento de ombro no fruto, teor de sólidos solúveis totais, densidade do

fruto e aparência do látex. <sup>16</sup>

Não existem estudos relacionados ao desenvolvimento e amadurecimento da manga Ubá ao nível molecular. Os estudos já desenvolvidos, tratam de análises microbiológicas (contagem de aeróbios mesófilos, grupo coliformes, fungos filamentosos e leveduras e *Salmonella* sp), análises físico-químicas (pH, SST, ATT, ratio, ST, açúcares totais e coordenadas de cores) de mangas maduras <sup>17</sup>, estabilidade de dois antioxidantes naturais  $\beta$ -caroteno e ácido ascórbico em sucos de manga Ubá <sup>18</sup>, controle do teor de  $\beta$ -caroteno e vitamina C durante o amadurecimento <sup>19</sup> e análise do perfil de polifenóis em Manga Ubá madura. <sup>20</sup>

## **1.5 AÇÚCARES, ÁCIDOS ORGÂNICOS E COMPOSTOS POLIFENÓLICOS EM MANGAS**

O balanço de conteúdos de açúcares e ácidos orgânicos em mangas é um importante indicativo da qualidade da fruta. A aceitabilidade tanto para consumo *in natura*, quanto para produção de sucos concentrados e néctares está diretamente relacionada aos teores destes compostos. <sup>21</sup>

Os açúcares solúveis comumente encontrados em mangas são glicose, frutose e sacarose. Estudos indicam que durante o desenvolvimento e amadurecimento da fruta as reservas de amido são convertidas em açúcares e que ao fim do processo de amadurecimento ocorre o período de senescência da fruta, fase em que há degradação de açúcares. <sup>22, 23</sup>

Uma das formas de se avaliar o teor de açúcares em mangas é a medição de sólidos solúveis totais por refratometria. Estas medidas indicam a quantidade de sólidos solúveis na polpa da fruta. No caso de mangas, o teor de sólidos solúveis é muito influenciado pela quantidade de açúcar presente na fruta, portanto podemos considerar as medidas de SST um bom indicador do teor de açúcar no fruto. Durante o amadurecimento do fruto, como os teores de açúcares aumentam e depois caem durante a senescência, também é esperado que essa tendência ocorra com os valores de SST. <sup>17, 20, 24</sup>

Em mangas, o ácido orgânico predominante é o ácido cítrico. O teste físico-químico utilizado para avaliar os teores de ácidos orgânicos em frutas é a acidez titulável. As pesquisas indicam que o teor de ácidos em mangas decresce durante seu desenvolvimento e amadurecimento. <sup>17, 20, 24</sup>

As frutas são fontes de vitaminas, minerais, fibras e compostos polifenólicos e por isso são alimentos importantes para uma boa nutrição. Estudos têm mostrado que o consumo regular de frutas está associado à redução da incidência de doenças crônicas. O efeito protetor destes alimentos tem sido atribuído à presença de compostos polifenólicos.<sup>25, 26, 27</sup>

Compostos polifenólicos são produtos do metabolismo secundário de plantas. Existem duas rotas principais para a síntese destes compostos: a via do acetato e a via do ácido chiquímico.<sup>28</sup>

Os compostos fenólicos podem ser classificados conforme o tipo de esqueleto principal (tabela 1), em que  $C_6$  corresponde ao anel benzênico e  $C_n$  à cadeia substituinte com “n” átomos de carbono.<sup>29</sup>

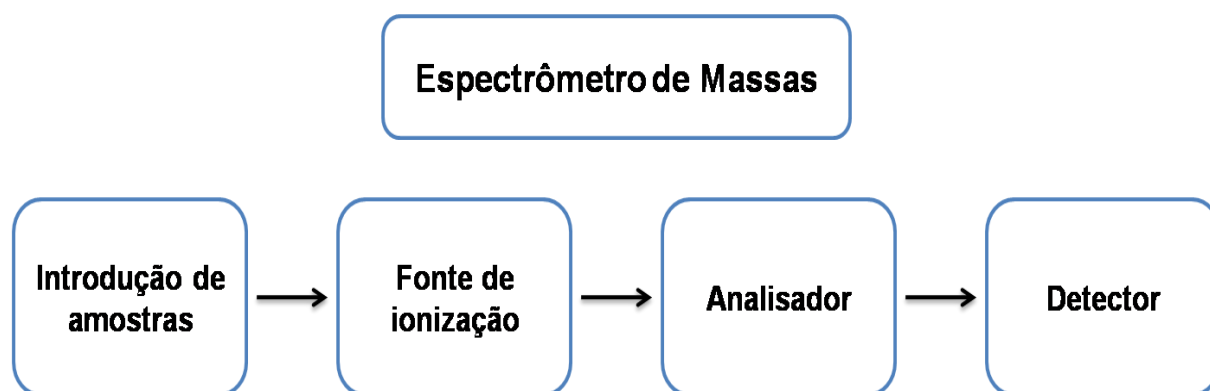
**Tabela 1.** Classificação de compostos fenólicos conforme tipo de cadeia.<sup>29</sup>

<b>Esqueleto básico</b>	<b>Classe de compostos fenólicos</b>
$C_6$	Fenóis simples e benzoquinonas
$C_6-C_1$	Ácidos fenólicos
$C_6-C_2$	Acetofenonas e ácidos fenilacéticos
$C_6-C_3$	Fenilpropanóides: ácidos cinâmicos e compostos análogos, fenilpropenos, cumarinas, isocumarinas e cromonas
$C_6-C_4$	Naftoquinonas
$C_6-C_1-C_6$	Xantonas
$C_6-C_2-C_6$	Estilbenos e antraquinonas
$C_6-C_3-C_6$	Flavonóides e isoflavonóides
$(C_6-C_3)_2$	Lignanas
$(C_6-C_3-C_6)_2$	Biflavonóides
$(C_6)_n$	Melaninas vegetais
$(C_6-C_3)_n$	Ligninas
$(C_6-C_1)_n$	Taninos hidrolisáveis
$(C_6-C_3-C_6)_n$	Taninos condensados

Alguns dos polifenóis encontrados em mangas são taninos hidrolisáveis<sup>30</sup>, xantonas<sup>30, 31</sup>, derivados da benzofenona<sup>30</sup> e flavonóides<sup>31</sup>. O presente estudo identificou oito polifenóis: ácido elágico, galato de metila, digalato de metila, galoil glicose, digaloil glicose, digalato de metila éster, trigaloil glicose, tetragaloil glicose e mangiferina.

## 1.6 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A espectrometria de massas é uma técnica que consiste na ionização de moléculas e detecção dos íons com base em suas diferentes razões massa carga ( $m/z$ ). O espectrômetro de massas consiste em um equipamento que possui as seguintes partes: i) sistema de introdução de amostras; ii) fonte de ionização; iii) analisador de massas; iv) e detector (Figura 3).<sup>32</sup>



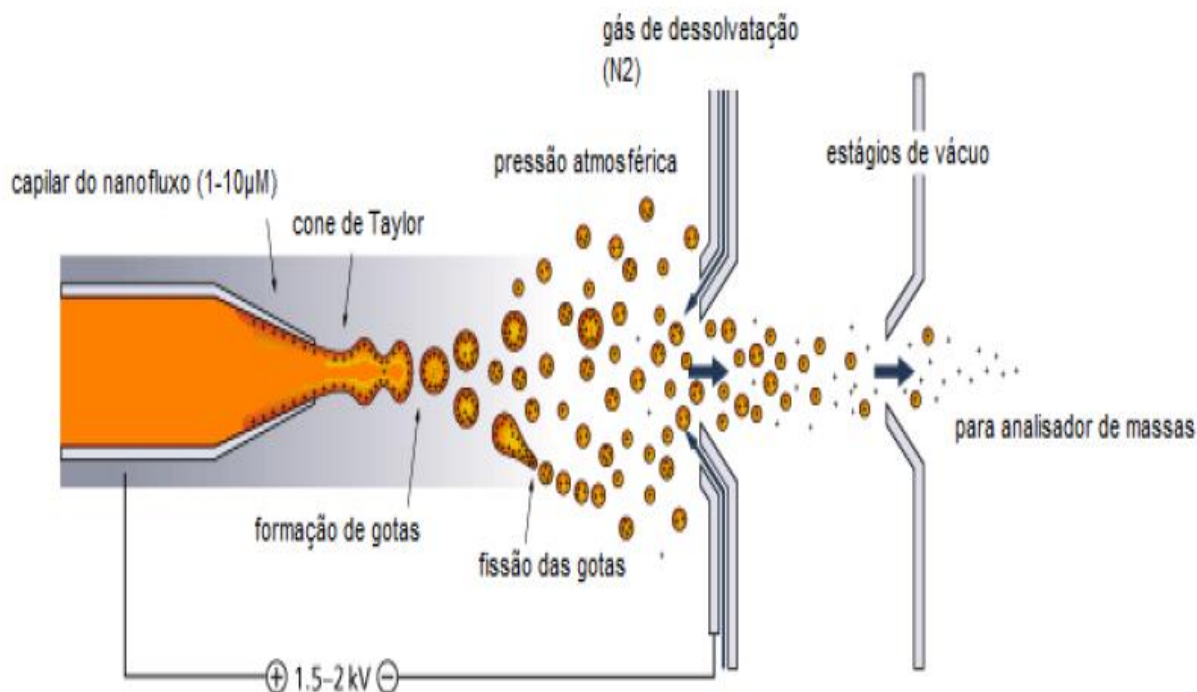
**Figura 3.** Esquema de um espectrômetro de massas.

A introdução de amostra pode ser feita por cromatografia líquida, cromatografia gasosa ou bomba com seringa. As fontes de ionização variam de acordo com tipo de molécula a ser analisada, alguns exemplos são: ionização por elétrons (EI); ionização química (CI); ionização por electrospray (ESI); ionização química a pressão atmosférica (APCI); fotoionização a pressão atmosférica (APPI) e dessorção/ionização por matriz assistida por laser (MALDI). Os analisadores de massas separam os íons, formados na fonte de ionização, de acordo com sua razão massa carga ( $m/z$ ), alguns exemplos de analisadores são: i) setor magnético; ii) quadrupolo; iii) aprisionamento de íons (do inglês: *íon trap*); iv) tempo de voo (do inglês: *time-of-flight* – TOF); v) *orbtrap*; e vi) ressonância ciclotrônica de íons (do inglês: *íon cyclotron resonance* – ICR). Os diferentes princípios físicos utilizados em

cada analisador são o que os diferem e levam a espectros de massas com resolução e exatidão distintos. Após serem separados os íons são detectados pelo detector e os sinais são processados por softwares adequados.<sup>32, 33</sup>

### 1.6.1 IONIZAÇÃO POR ELECTROSPRAY (ESI)

Antes de ser injetada na fonte de ionização por eletrospray a amostra é ionizada quimicamente com adição de base para desprotonar as moléculas ou adição de ácido para protonar as moléculas, gerando íons. Posteriormente, a amostra é injetada com fluxo constante por um capilar. Uma diferença de potencial é aplicada entre o capilar e um contra eletrodo, gerando um campo elétrico sobre a amostra. Este campo elétrico induz acumulação de cargas na superfície do líquido na ponta do capilar, formando gotas altamente carregadas. Sobre as gotas é injetado um gás aquecido que remove os solventes ejetando os íons para dentro do analisador de massas (Figura 4).<sup>33</sup>



**Figura 4.** Esquema de uma fonte de ionização por electro spray.<sup>34</sup>

### 1.6.2 ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE RESSONÂNCIA CICLOTRÔNICA DE ÍONS COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-ICR MS)

Os espectrômetros de massas FT-ICR são equipamentos híbridos que além da célula de ICR podem apresentar em sua configuração um quadrupolo/hexapolo (Solarix, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) (Figura 5) ou um *ion trap* linear (LTQ FT Ultra, Thermo Scientific, Bremen, Germany).<sup>33</sup>

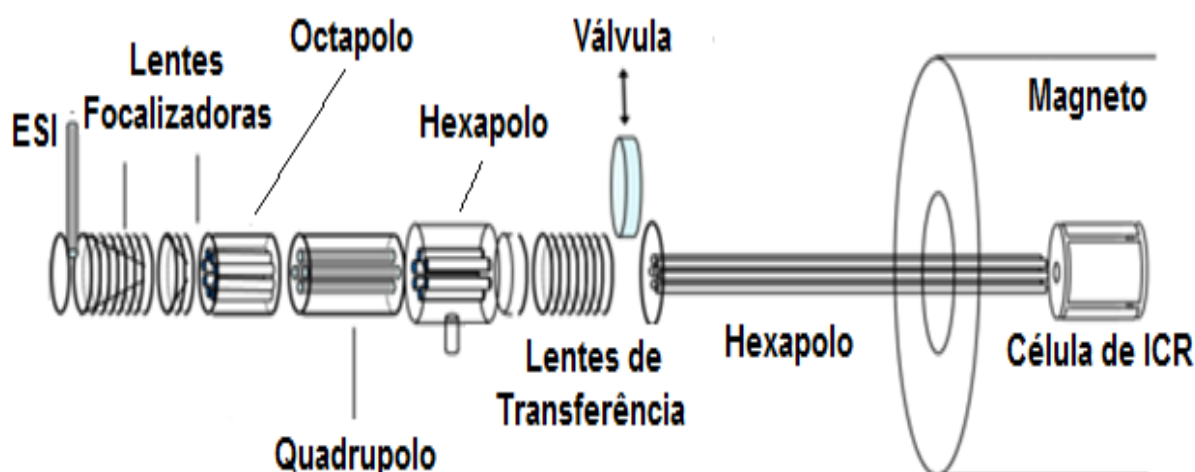


Figura 5. Esquema de um espectrômetro de massas FT-ICR.

Após serem gerados os íons são injetados para dentro dos analisadores de massas. Os analisadores do tipo quadrupolo, hexapolo e octapolo são construídos com hastes cilíndricas metálicas ou cerâmicas posicionadas paralelamente. A estas hastes são aplicados potenciais, de modo que os pólos diagonalmente opostos apresentem o mesmo potencial, mas contrário ao outro par. Os quadrupolos, hexapolos e octapolos são formados por quatro, seis e oito hastes, respectivamente. São aplicados uma corrente contínua e um potencial de radio frequência nos cilindros paralelos, de modo que íons de determinada razão massa carga ( $m/z$ ) apresentem trajetória estável no campo elétrico resultante. Desta forma, esses analisadores funcionam como filtro de íons, controlando os íons que alcançarão a célula de ICR.<sup>33, 35</sup>

Os quadrupolos funcionam como filtro de íons e possuem ótima focalização. Entretanto, nesses analisadores o potencial efetivo é alto, resultando em uma baixa transmissão de íons. Para melhorar a transmissão de íons e sensibilidade são utilizados analisadores com maior número de multipolos, como hexapolo e octapolo,

que possuem um menor potencial efetivo, aumentando a sensibilidade dos espectrômetros de massas.<sup>33, 35</sup>

No interior da célula de ICR há um campo magnético uniforme  $\mathbf{B}$  que gera nos íons, com carga  $q$ , uma força  $\mathbf{F}$ , dada pela equação 1, fazendo com que estes tenham uma trajetória circular com raio  $r$  e velocidade  $v$ , ou seja, um movimento ciclotrônico.<sup>33</sup>

$$F = qv \times B \quad \text{Eq. 1}$$

Substituindo as equações 2 e 3, onde  $a_c$  é a aceleração centrípeta e  $m$  é a massa do íon, na equação 1, tem-se a equação 4.

$$F = m a_c \quad \text{Eq. 2}$$

$$v = v^2 / r \quad \text{Eq. 3}$$

$$r = mv / qB \quad \text{Eq. 4}$$

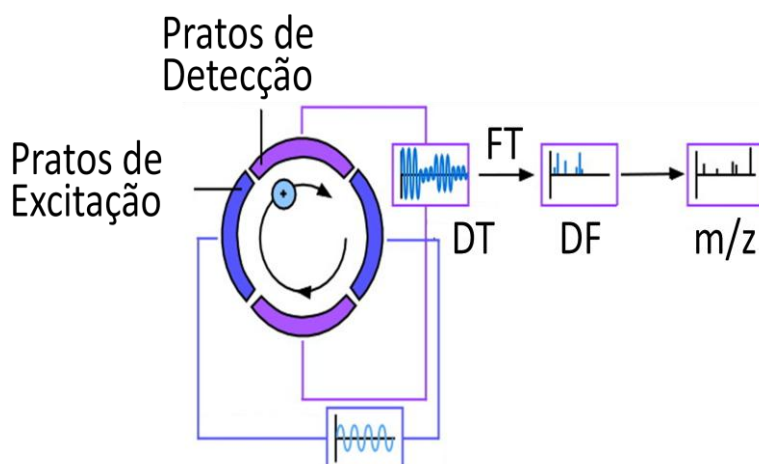
A partir da equação 4, percebe-se uma relação inversamente proporcional entre o raio da trajetória do íon e o campo magnético, indicando que em campos magnéticos altos o raio de trajetória do íon é pequeno, fazendo com que os íons fiquem presos dentro da célula de ICR.<sup>33</sup>

Substituindo a equação 5, onde  $\omega$  é a frequência ciclotrônica, na equação 4, temos equação 6.

$$\omega = v/r \quad \text{Eq. 5}$$

$$\omega = qB / m \quad \text{Eq. 6}$$

A partir da equação 6, percebe-se que íons de mesma razão massa carga terão a mesma frequência ciclotrônica para um determinado valor do campo magnético. Sendo assim, vários pacotes de íons de frequência ciclotrônicas dependentes de suas razões massa carga entram em movimento circular dentro da célula de ICR (Figura 6).<sup>33</sup>



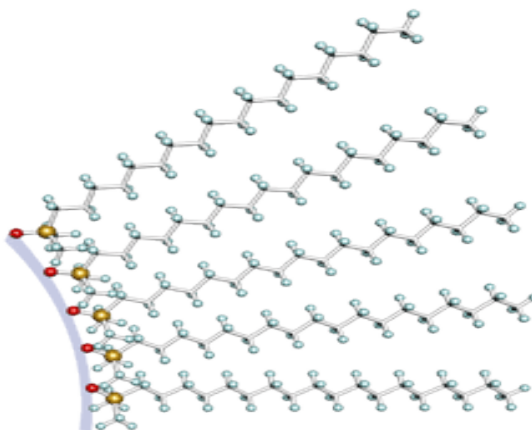
**Figura 6.** Esquema de uma célula de ICR.<sup>36</sup>

Para aproximar os íons das placas detectoras da célula de ICR são aplicados pulsos de rádio frequência aumentando o raio de trajetória dos íons, fazendo com que os íons induzam uma corrente nas placas detectoras. A frequência desta corrente é a mesma que a frequência ciclotrônica dos íons e a intensidade é proporcional ao número de íons. O sinal de ICR no domínio do tempo é convertido então, através da Transformada de Fourier, para o domínio da frequência que depois é convertido em um espectro de massas.<sup>33</sup>

### 1.7 EXTRAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE POLIFENÓIS UTILIZANDO C18.

A extração em fase sólida é uma técnica utilizada para concentração e separação de compostos químicos de uma matriz complexa ou não. Sílicas modificadas têm sido produzidas com grupos funcionais diversos ligados ao substrato da sílica. As sílicas modificadas são quimicamente estáveis em todos solventes orgânicos e possuem partículas de 15 a 100 microns.<sup>37, 38</sup>

Um exemplo de sílica modificada é a sílica modificada com octadecil (C18) (Figura 7), este tipo de sílica modificada é chamado de sílica de fase reversa, pois apresenta afinidade com substâncias apolares ou levemente apolares, ao contrário das sílicas de fase comum.<sup>37, 38</sup>



**Figura 7.** Esquema da sílica modificada com C18.

A utilização de sílicas modificadas C18 para a extração e concentração de compostos de interesse consiste basicamente nas seguintes etapas: i) condicionamento da sílica; ii) Injeção da amostra; iii) lavagem e iv) eluição.

O condicionamento consiste na passagem com fluxo lento de solvente pela sílica de modo que o solvente entre em contato com toda a massa de sílica.<sup>37, 38</sup>

A injeção da amostra deve ser feita lentamente, de modo que os analitos a serem extraídos e concentrados interajam com a fase estacionária. A solução a ser injetada na coluna de sílica deve conter solvente polar, para garantir que a interação entre o analito e a fase estacionária seja maior que a interação entre o analito e a fase móvel. A lavagem da amostra consiste em extrair substâncias com alta polaridade utilizando solventes polares. Finalmente, a eluição consiste em extrair os compostos apolares ou levemente apolares, que estavam fixados à fase estacionária devido a interações do tipo Van der Waals.<sup>37, 38</sup>

## 1.8 ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) E TESTE DE TUKEY

A análise de variância (ANOVA) permite que vários grupos sejam comparados a um só tempo, utilizando variáveis contínuas. Para comparar médias de mais de duas populações aplica-se a ANOVA o teste F.<sup>39</sup>

As hipóteses testadas são:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \dots = \mu_k.$$

$$H_1: \text{pelo menos um par } \mu_i \neq \mu_j, \text{ para } i \neq j.$$

Os elementos necessários ao cálculo da ANOVA são representados na tabela 2.

**Tabela 2.** Tabela de elementos necessários ao cálculo da ANOVA.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F
Entre grupos (tratamentos)	SQE	GLE	QME	QME/QMD
Dentro do grupo (resíduos)	SQD	GLD	QMD	
Total	SQT	GLT		

Em que:

$$SQE = \sum ((T_k^2/n_k) - (T^2/N)) \quad \text{Eq. 7}$$

$$SQT = \sum_{i=1}^n \sum_{k=1}^k (X^2 - (T^2/N)) \quad \text{Eq. 8}$$

$$SQD = SQT - SQE \quad \text{Eq. 9}$$

$$GLE = k - 1 \quad \text{Eq. 10}$$

$$GLD = N - k \quad \text{Eq. 11}$$

$$GLT = N - 1 \quad \text{Eq. 12}$$

$$QME = SQE / (k - 1) \quad \text{Eq. 13}$$

$$QMD = SQD / (N - k) \quad \text{Eq. 14}$$

$T_k$  é a soma dos valores de certo tratamento  $k$ ;

$n_k$  é o número de observações no tratamento  $k$ ;

$T^2$  é a soma de todos os valores amostrados elevada ao quadrado;

$N$  é o número total de observações;

$X$  é cada observação amostrada;

$k$  é o número de repetições de cada tratamento.

O valor de  $F$  calculado é comparado ao valor de  $F$  tabelado, que é determinado de acordo com o nível de significância estabelecido, o grau de liberdade entre grupos ( $GLE$ ) e o grau de liberdade dentro do grupo ( $GLD$ ). Se o valor de  $F$  calculado for maior ou igual ao  $F$  tabelado (crítico) a hipótese  $H_0$  é rejeitada, então a hipótese  $H_1$  é aceita e se  $F$  calculado for menor que o  $F$  tabelado a hipótese  $H_0$  é aceita. <sup>39</sup>

A análise de variância ANOVA indica se há diferença significativa entre os grupos analisados, mas não indica quais grupos são diferentes ou semelhantes. Sendo

assim, sempre que as diferenças são significativas, e só nesse caso, temos que proceder às comparações posteriores. O teste de Tukey se torna necessário para indicar quais são os grupos semelhantes ou diferentes.<sup>40</sup>

O teste de Tukey permite estabelecer a diferença mínima significativa (d.m.s.) entre tratamentos, em determinado nível. Em que:

$$d.m.s. = q \sqrt{QMD/k} \quad \text{Eq. 15}$$

O valor de q é tabelado e depende do nível de significância do teste, do número de tratamentos (k) e do grau de liberdade dentro do grupo (QLD). Se o módulo da diferença da média amostral de dois tratamentos for maior ou igual a d.m.s., pode-se concluir que há diferença significativa entre os dois tratamentos. Se o módulo da diferença da média amostral de dois tratamentos for menor que a d.m.s., pode-se concluir que não há diferença significativa entre os dois tratamentos.<sup>40</sup>

### **1.9 ENSAIOS DE ATIVIDADE DA QUINONA – REDUTASE**

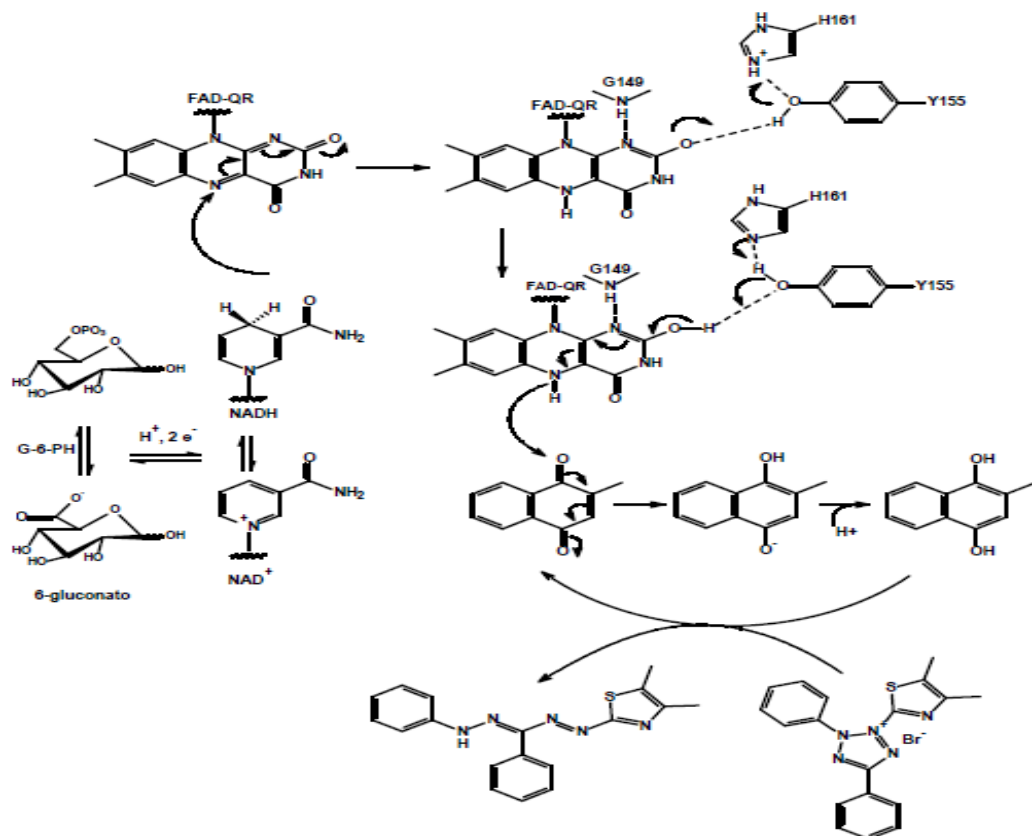
O câncer é o nome dado ao conjunto de mais de cem doenças que tem em comum o crescimento desordenado de células que invadem tecidos e órgãos<sup>41</sup>. Medidas para evitar o surgimento dessas doenças são necessárias. A prevenção primária consiste em evitar o contato com agentes carcinogênicos, como radiação e substâncias carcinogênicas<sup>42, 43, 44, 45</sup>. Sendo assim, em alguns casos é possível evitar a formação destas doenças. Entretanto, na maioria dos casos as causas da doença são desconhecidas e por isso a quimioprevenção (prevenção secundária) é importante<sup>42</sup>.

A quimioprevenção de câncer envolve prevenção, atraso ou reversão de processos carcinogênicos através da ingestão de substâncias oriundas da alimentação ou fármacos sintéticos<sup>42, 43, 44, 46</sup>. Muitos produtos naturais, como flavonóides, cumarinas, tiocarbamatos, fenólicos e isotiocianatos, são capazes de alterar o metabolismo de carcinógenos através da indução de enzimas envolvidas na destoxificação do organismo. A propriedade comum entre esses compostos é elevar a atividade enzimática por um aumento na síntese destas enzimas<sup>47</sup>.

A redução de quinonas pela quinona-redutase (QR) é uma via importante de detoxificação e o seu grau de atividade pode ser inferido através da indução em células da linhagem de hepatocarcinoma murino (Hepa 1c1c7) <sup>48, 49, 50</sup>.

O ensaio da quinona redutase (QR) é um método simples e rápido para avaliação de indução de produção dessa enzima, baseando-se na medida direta da atividade da QR em células de hepatocarcinoma murino (Hepa 1c1c7) cultivadas em placas com 96 poços <sup>49</sup>.

Neste teste, a enzima glicose-6-fosfato-desidrogenase (G-6-PH), catalisa a conversão de glicose-6-fosfato (G-6-P) a 6-gluconato, transferindo dois elétrons e um próton para o NADP, gerando NADPH. O NADPH transfere o hidreto para o complexo FAD-QR, com subsequente redução à FADH<sub>2</sub> pela ação da enzima QR. A quinona menadiona (Vitamina K3), substrato para a QR, é reduzida a menadiol pela transferência de dois elétrons da FADH<sub>2</sub>-QR. O brometo de 3-(4,5- dimetiltiazolo-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) é então reduzido não enzimaticamente pelo menadiol, resultando na formação de em sal precipitado com cor azul (azul de formazana) que pode ser quantificado em leitor de absorvância de micro placas no comprimento de onda de 595 nm (Figura 8) <sup>49, 50, 51, 52, 53</sup>.



**Figura 8.** Fundamento químico do ensaio de indução da quinona redutase. Mecanismo de redução da menadiona para menadiol, pela NAD(P)H: quinona redutase (QR). Modificado de Li et al. (1995).

## **2. OBJETIVOS**

Avaliar o perfil químico da manga Ubá em termos de açúcares, ácidos orgânicos e compostos polifenólicos em quatro estádios de maturação, utilizando métodos convencionais como ensaios de acidez titulável (AT) em termos de ácido cítrico; determinação do teor de sólidos solúveis totais (SST) por refratometria; medição do pH; determinação da razão SST/AT; determinação de polifenóis totais utilizando o método de Folin-Ciocalteu e por método não convencional como o FT – ICR MS. Além disso, determinar o estágio ótimo para colheita em termos qualidades nutracêuticas e atributos sensoriais e aplicar o ensaio de atividade de quinona – redutase nos diversos estádios de maturação.

## **3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL**

### **3.1 AMOSTRAS**

Mangas cv Ubá em quatro estádios de maturação foram colhidas em pomar demonstrativo do INCAPER, localizada em Colatina – ES, Brasil, na safra 2014/15. A colheita das mangas foi realizada pela equipe técnica com experiência em colheita de mangas. Para diferenciar os quatro estádios de maturação foram levados em consideração características do fruto como: cor da casca, maciez do fruto, existência de ombro no fruto e aparência do látex. Todas as amostras foram lavadas com água clorada e posteriormente água destilada. As frutas tiveram suas características físico-químicas medidas e foram armazenadas à – 20°C até análise no FT-ICR MS. Três frutas em cada estágio de maturação foram analisadas neste trabalho.

### **3.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS**

Foram realizadas análises de pH, acidez titulável em termos de ácido cítrico, sólidos solúveis totais (SST, expresso em °Brix) e cálculo da razão SST/AT. As análises de pH e sólidos solúveis totais (SST) foram realizadas utilizando-se respectivamente, pHmetro (Metron modelo 827 pH Lab) e refratômetro de bancada (Abbé com escala de refração de 1,300-1,72 nD de 0 - 95°Brix modelo 2 WAJ). A acidez titulável (AT) foi determinada por titulação utilizando solução de NaOH 0,1 molL<sup>-1</sup> (SIGMA®) padronizada (expressos em g de ácido cítrico por 100 g da polpa). A razão SST/AT foi calculada dividindo-se o valor da leitura de SST pelos valores de AT. Todos os

procedimentos foram realizados de acordo com metodologias descritas pelo Instituto Adolfo Lutz.<sup>56</sup>

### **3.3. PREPARO DA FRAÇÃO GLICÍDICA**

Para análise do conteúdo de açúcares e ácidos orgânicos, as polpas das frutas foram homogeneizadas em liquidificador doméstico na proporção de 1 g de polpa para 1,5 mL de solução metanol/água (50% V/V). O homogeneizado foi então filtrado em gaze para extrair a parte fibrosa e posteriormente foi filtrado em papel de filtro Unifil<sup>®</sup> faixa preta para extrair possíveis materiais não solubilizados.

### **3.4. PREPARO DA FRAÇÃO FENÓLICA**

Para extrair e concentrar compostos fenólicos foi utilizado metodologia descrita por Talcott e Talcott<sup>57</sup> com modificações. Porções de 20 gramas de polpa foram trituradas em liquidificador doméstico, colocadas em um recipiente âmbar juntamente com 60 mL de uma solução de metanol, etanol e acetona (1:1:1) e deixadas em banho ultrassônico com frequência de 40 KHz por 1 hora. 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 45 e 30 mL de solução de metanol, etanol e acetona (1:1:1), consecutivamente. 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 30 mL adicionando-se metanol e centrifugado à 2500 x g por 10 minutos, para precipitação de pectina. Ao precipitado foi adicionado 20 mL de metanol e novamente centrifugado por mais 10 minutos. Os extratos metanólicos foram reunidos e o metanol foi totalmente evaporado em rota evaporador à temperatura menor que 40°C. O extrato de manga foi lavado com 15 mL de água em um cartucho Sep-pak Waters com 360 mg de C18, previamente condicionado pela injeção de 30 mL de metanol e seguidamente 50 mL de água, 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 rota evaporados e avolumados até 8 mL.

### **3.5 ESI (-) FT - ICR MS**

Para injeção do extrato rico em açúcares e ácidos orgânicos, 10 µL do

homogeneizado, 5µL 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 solução de NH<sub>4</sub>OH PA (Vetec Química Fina Ltda, Brazil) foi adicionado a 1mL de solução de metanol/água (50% V/V).

Para injeção do extrato rico em compostos fenólicos, 500 µL do extrato, 10µL 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 solução de NH<sub>4</sub>OH PA (Vetec Química Fina Ltda, Brazil) foi adicionado a 500 µL de metanol (SIGMA).

Foi utilizado espectrômetro FT-ICR MS (modelo 9.4 T Solarix, BrukerDaltonics, Bremen, Alemanha). Os espectros foram obtidos no modo negativo em uma faixa de massa  $m/z$  150-1250. As condições da fonte de ESI foram: pressão de gás nebulizador de 1,4 Bar, voltagem capilar de 3,8 kV, e a temperatura de transferência capilar de 200° C. O tempo de acumulação dos íons foi de 0,010 s. Cada espectro foi adquirido pela acumulação de 32 varreduras (*scans*). Os espectros foram obtidos com alta resolução (16 M) e erros de massas próximos a 1 ppm, fornecendo fórmulas moleculares inequívocas para os íons moleculares de carga única.

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 chemspiderdatabase ([www.chemspider.com](http://www.chemspider.com)).

A avaliação estatística dos resultados de ESI-FT-ICR MS, foi realizada, por meio do programa ASSISTAT 7.7 BETA, empregando-se a análise de variância ANOVA e o teste de Tukey para comparação de médias entre os quatro estádios de maturação a 5% de significância.

### 3.6 ESI (-) FT - ICR MS/MS

Para os experimentos de MS/MS, a janela do quadrupolo foi fechada em um intervalo de 1 Da; ou seja, a corrente contínua e o potencial de radio frequência aplicado às hastes do quadrupolo foram ajustados para possibilitar a passagem de íons com  $m/z$  selecionado  $\pm 1$ , 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 (analisador do FTMS), o tempo de acumulação de íons no hexapolo (ion accumulation time) foi aumentado

de 0.02 para 1 s. Cada espectro foi adquirido a partir da acumulação de 32 scans com um domínio de tempo de 4M (mega-point).

### **3.7 QUANTIFICAÇÃO DE POLIFENÓIS TOTAIS**

As análises foram realizadas em um espectrofotômetro de UV/Vis 482 (Femto). A concentração total de polifenóis foi determinada utilizando-se reação com reagente de Folin-Ciocalteu, sendo o produto quantificado no comprimento de onda de 715nm, de acordo com o método descrito na Farmacopéia Brasileira<sup>58</sup>. Uma curva de calibração de cinco pontos foi obtida, utilizando soluções com concentração (1.1 a 17.4 µg mL<sup>-1</sup>) do padrão de ácido gálico anidro (VETEC®).

### **3.8 ENSAIOS DE ATIVIDADE DA QUINONA – REDUTASE**

#### **3.8.1 RE-ESTABELECIMENTO DAS LINHAGENS CELULARES MANTIDAS EM N<sub>2</sub> LÍQUIDO**

As células (Hepa 1c1c7) foram descongeladas em banho-maria a 37°C e o conteúdo do frasco criogênico foi transferido para um frasco estéril contendo 15 mL de meio de cultura α-MEM suplementado com soro bovino fetal (10%) e antibiótico antimicótico (Gibco®). A incubação de 24h ocorreu em estufa de CO<sub>2</sub> e o meio de cultura foi renovado de 3 em 3 dias. Manteve-se o frasco em estufa de CO<sub>2</sub> até que a cultura primária se apresentasse como uma monocamada 90% confluenta.

#### **3.8.2 PREPARO DAS CÉLULAS PARA ENSAIO**

Após a cultura primária apresentar-se 90% confluenta, removeu-se o meio de cultura e lavou-se a monocamada celular com 10 mL de tampão fosfato salina (PBS) pH 7,4. Adicionou-se 1 mL de solução de tripsina-EDTA (Gibco®), e incubou-se, em estufa de CO<sub>2</sub>, por 10 minutos para remover as células aderidas ao frasco e umas das outras. Acrescentou-se, então, 10 mL de meio de cultura e procedeu-se com a contagem celular. Após a contagem, transferiu-se, para um novo frasco estéril, utilizando razão de passagem de 1:10, quantidade suficiente da suspensão celular para obter a concentração de 5 x 10<sup>3</sup> células/mL, seguido da adição de 15 mL de meio de cultura.

Incubou-se o frasco com a cultura de célula em estufa de CO<sub>2</sub>, renovando o meio de cultura de 3 em 3 dias até que a cultura se apresentasse como uma monocamada 90% confluenta. Repetiu-se essa etapa três vezes, ou até que se obtivesse o número de células necessário para o ensaio.

Após atingir o número necessário de células, procedeu-se conforme descrito anteriormente realizando-se, então, a contagem celular. Na seqüência, a suspensão foi diluída com meio de cultura até a concentração de  $1 \times 10^4$  células/mL. As células foram semeadas na placa de micro titulação, empregando-se 200 µL/poço, seguindo-se incubação em estufa de CO<sub>2</sub> por 24h.

### **3.8.3 DETERMINAÇÃO DA INDUÇÃO DA QUINONA - REDUTASE**

O ensaio de indução da quinona redutase foi realizado segundo método descrito por PROCHASKA; SANTAMARIA (1988) e modificado por GERHAUSER *et al.* (1997). Semearam-se as células em duas placas estéreis, transparentes, de 96 poços, marcadas como “Proteína” e “QR ensaio”, respectivamente. O cultivo e a semeadura foram realizados utilizando meio de cultura  $\alpha$ -MEM suplementado com soro bovino fetal (10%) e antibiótico antimicótico (Gibco) e concentração celular de  $1 \times 10^4$  célula/poço.

Após pré-incubação de 24 h, removeu-se o meio de cultura inicial e adicionou-se nova alíquota (190 µL) de meio de cultura. Adicionaram-se, em seguida, a poços diferentes: 10 µL dos extratos fenólicos, 10 µL das soluções da curva de diluição de 4'-bromoflavona (concentrações finais de 50,0 µM a 0,4 µM) (controle positivo), e 10 µL de solução de DMSO a 10% em PBS (controle negativo). As placas foram, então, incubadas, por 48 h, em estufa de CO<sub>2</sub>.

Após a incubação, removeu-se o meio de cultura da placa “Proteína”. Na seqüência, adicionaram-se 200 µL de solução de cristal violeta a 0,2% m/V, inclusive no branco. Incubou-se, à temperatura ambiente, por 10 min, decantou-se o cristal violeta e lavou-se a placa em água corrente, com fluxo baixo, por 2 min. Deixou-se secar em capela. Quando seca, adicionaram-se, a cada poço da placa “Proteína”, 200 µL de solução de SDS. Incubou-se, à temperatura ambiente, sob agitação, 10 ciclos/min, por 5 a 10 min. Em seguida, a absorbância foi determinada em leitor de microplacas no comprimento de onda de 595 nm.

De maneira semelhante, após 48 h de incubação, removeu-se o meio de cultura da microplaca “QR ensaio”. Adicionaram-se, em seguida, 50 µL de solução de

digitonina a 0,8% m/V, exceto no branco. Incubou-se, em estufa comum, a 37 °C, por 10 min, seguida de incubação à temperatura ambiente, sob agitação, 10 ciclos/min, por 10 min. Adicionaram-se, então, 200 µL da mistura reacional composta por 28 ml de H<sub>2</sub>O; 1,5 mL de Tris-HCl, 0,5 M, pH 7,4; 200 µL Tween 20 a 1,5% V/V; 20 µL FAD 7,5 mM; 200 µL G-6-P 150 mM; 18 µL NADP 50 mM; 20 mg BSA; 9 mg MTT; 60 U G-6-PH; e 30 µL Menadions 50 mM. Incubou-se, à temperatura ambiente, a placa “QR ensaio” sob agitação, 10 ciclos/min, por 5 min. A absorbância foi determinada em leitor de microplacas no comprimento de onda de 595 nm.

A atividade específica (SA) de QR é expressa como nmol de sal azul de formazana formado por mg de proteína por minuto. Para seu cálculo aplicou-se a equação 16.

$$SA = ( (A1/ 5) / AT ) 3247 \quad \text{Eq. 16}$$

Em que A1 é a absorbância da solução na presença do indutor, lido na placa “QR ensaio” e AT é absorbância da solução na presença do indutor, lido na placa “Proteína”. O denominador **5** refere-se ao tempo de incubação à temperatura ambiente e o denominador **3247** é a razão entre a constante de proporcionalidade do cristal violeta pelo coeficiente de extinção do MTT no comprimento de onda 595nm <sup>49</sup>.

O índice de indução (IR) foi calculado utilizando a equação 17 em que SA<sub>i</sub> é a atividade específica de células tratadas com indutores e SA<sub>n</sub> é a atividade específica de células tratadas com o controle de solvente (controle negativo) <sup>54</sup>.

$$IR = SA_i / SA_n \quad \text{Eq. 17}$$

Para o cálculo da porcentagem de células sobreviventes aplicou-se a equação 18, em que AA é absorbância da solução na presença da amostra, lida na placa “Proteína” e Ac é absorbância da solução na presença do controle negativo, lido na placa “Proteína”.

$$\% \text{ células sobreviventes} = (AA \times 100/Ac) \quad \text{Eq. 18}$$

Ensaio de dose dependência foi executado para amostras que obtiveram IR > 2. Foi repetido o teste com diluições do extrato fenólico gerando oito novas soluções. O

gráfico do índice de indução (IR) em função da concentração do indutor, gerado pelo *software TablecurveTM2D* (AISN Software, EUA, 1996), demonstrou o valor da concentração necessária para duplicar a atividade da enzima (CD) em relação a atividade basal.

Para o cálculo da  $CI_{50}$  (concentração inibitória) foi utilizado o *software TablecurveTM2D* (AISN Software, EUA, 1996), usando os valores resultantes da equação 18, aplicado a cada valor de absorbância lido na placa “Proteína”.

Algumas substâncias possuem o índice de indução enzimático muito próximo da concentração citotóxica. Para contornar esse problema, calculou-se o índice de quimioprevenção (CI) dessas substâncias dividindo a  $CI_{50}$  pelo CD<sup>55</sup>.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 ANÁLISES FÍSICO – QUÍMICAS**

Foram analisados quatro estádios de maturação da manga Ubá. As mangas foram agrupadas conforme seu teor de sólidos solúveis, acidez titulável em termos de ácido cítrico, coloração da casca, coloração da polpa e firmeza da polpa. Foram agrupadas como Estádio 1, mangas com casca de coloração verde escura, polpa rígida com coloração amarelo claro e pouca umidade; no Estádio 2, mangas com casca de coloração verde clara, polpa rígida com coloração amarelo claro e úmidas; no Estádio 3, mangas com casca de coloração verde amarelada, polpa macia amarelada e com grande quantidade de umidade e no Estádio 4, mangas com casca amarelada, tecido interno amarelo, muito macio e se desintegrando (Figura 9).



**Figura 9.** Fotografias de amostras de manga Ubá em quatro estádios de maturação.

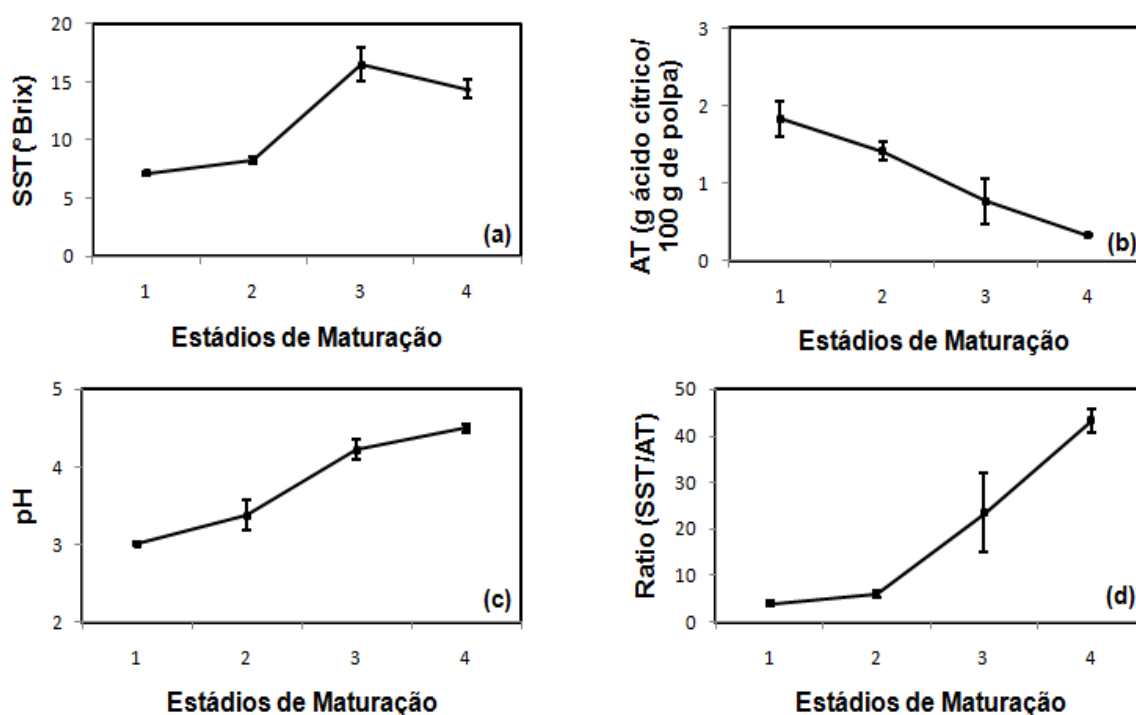
Os resultados das análises físico-químicas são apresentados na Tabela 3. A manga no Estádio 1 foi a que apresentou o menor teor de SST, em torno de 7,1° Brix. Esse valor aumentou até o Estádio 3, quando atingiu valores em torno de 16,5° Brix, que estão próximos aos relatados na literatura para a mesma cultivar<sup>17, 20</sup> e para as cultivares Tommy e Palmer<sup>24</sup>. O aumento do teor de SST ocorre em virtude da formação de sacarose, glicose e frutose, que podem ser originados devido à degradação do amido por ação da enzima amilase<sup>22, 60</sup>. Após o aumento dos teores de SST, no estágio 4, houve um decréscimo para valores próximos a 14,5°Brix (Figura 10a). Esta queda pode ser atribuída ao processo de senescência que ocorre nas frutas em estágio 4. O período de senescência se caracteriza como o período em que há morte dos tecidos e degradação da sacarose<sup>22</sup>.

Os frutos no estágio 1, apresentaram os maiores valores de acidez titulável em termos de ácido cítrico, em torno de 1,83 g/100g de polpa e consequentemente os menores valores de pH, em torno de 3,01. Durante o desenvolvimento e amadurecimento a AT diminuiu, para valores próximos de 0,33 g/100g de polpa (Figura 10b), no estágio 4, o pH aumentou para 4,22 (Figura 10c), valores condizentes com os descritos para a mesma cultivar<sup>17, 59</sup> e para as cultivares Tommy e Palmer<sup>24</sup>. A acidez é atribuída a ácidos orgânicos que se encontram tanto na forma livre como combinada com sais, ésteres e glicosídeos. A redução da concentração desses ácidos é comum durante o amadurecimento e desenvolvimento de frutas<sup>9, 60, 61</sup>. Com o aumento do teor de SST e diminuição da

AT houve um aumento da razão SST/AT (Figura 10d).

**Tabela 3.** Ensaio Físico-químicos utilizando metodologias convencionais: SST, AT, pH e Razão SST/AT.

Estádios	Sólidos Solúveis (°Brix)	Acidez Titulável (g ac. cítrico/100g polpa)	Ratio (SST/AT)	pH
1	7,1 ± 0,2 <i>b</i>	1,83 ± 0,23 <i>a</i>	3,90 ± 0,49 <i>c</i>	3,01 ± 0,02 <i>c</i>
2	8,3 ± 0,3 <i>b</i>	1,41 ± 0,12 <i>a</i>	5,90 ± 0,70 <i>c</i>	3,38 ± 0,20 <i>b</i>
3	16,5 ± 1,5 <i>a</i>	0,77 ± 0,29 <i>b</i>	23,50 ± 8,56 <i>b</i>	4,22 ± 0,13 <i>a</i>
4	14,4 ± 0,8 <i>a</i>	0,33 ± 0,02 <i>b</i>	43,37 ± 2,51 <i>a</i>	4,50 ± 0,05 <i>a</i>



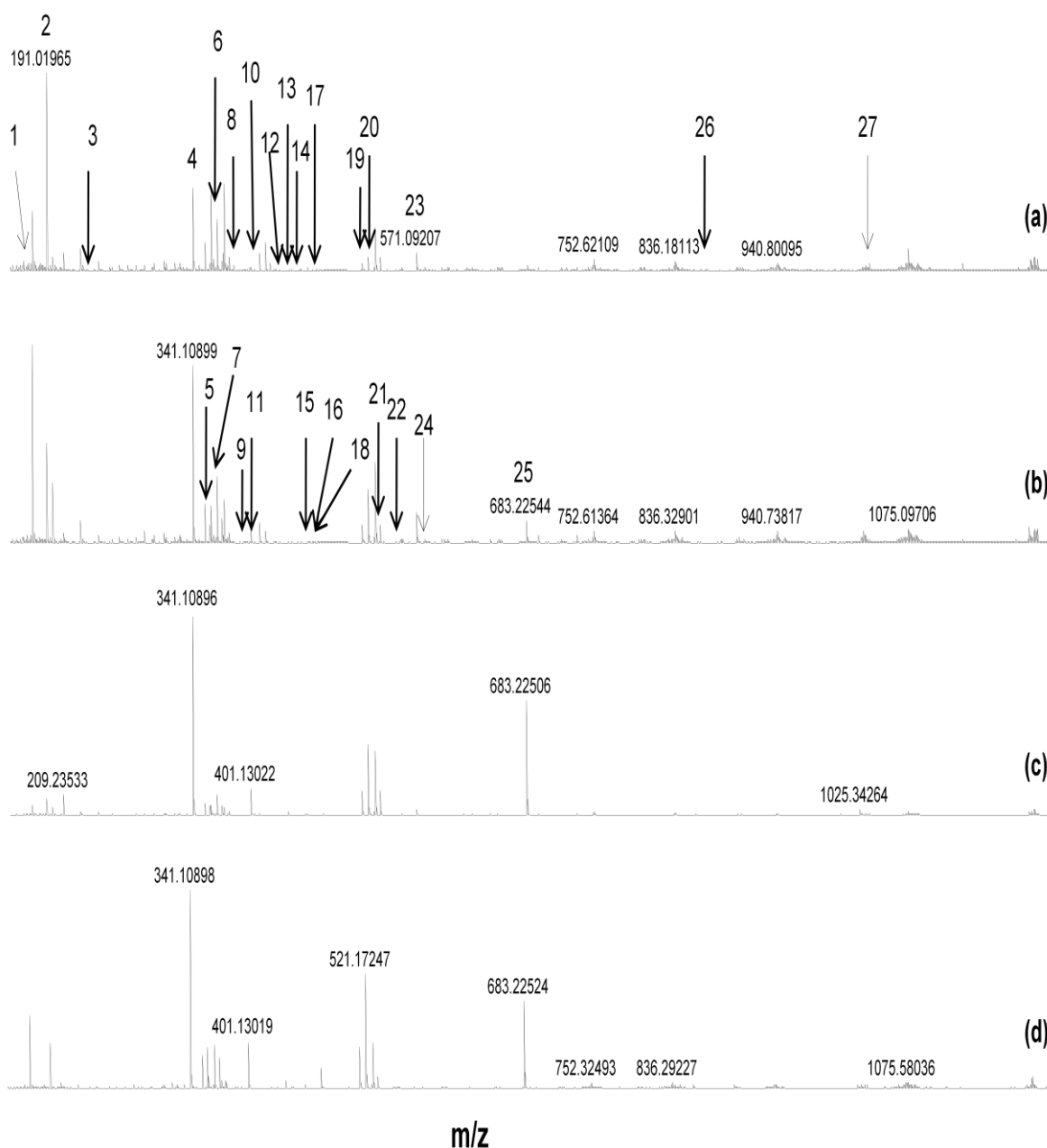
**Figura 10.** Ensaio Físico-químicos utilizando metodologias convencionais: (a) SST, (b) pH, (c) AT e (d) Razão SST/AT.

## 4.2 ESI-FT-ICR MS E ESI (-) FT - ICR MS/MS

### 4.2.1 ANÁLISE DA FRAÇÃO GLICÍDICA

Os espectros de ESI (-) FT - ICR MS possibilitaram a avaliação das características químicas das amostras de manga Ubá em função de quatro estádios de maturação

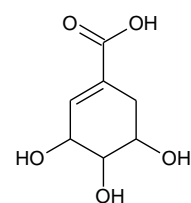
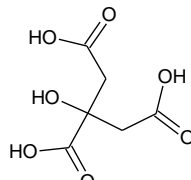
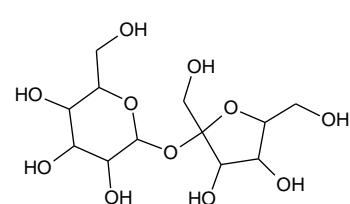
(Figura 11). As condições de aquisição na fonte de ESI foram mantidas constantes em todas as análises. O dopante adicionado em todas as análises foi detectado como aducto de duas moléculas de glicose deuterada, íon  $[C_{12}H_8D_{14}O_{12}]^-$  de  $m/z$  373. Sacarose ou seus isômeros foram detectados em sua forma desprotonada, íon  $[C_{12}H_{21}O_{11}]^-$   $m/z$  341, aducto com cloro  $[C_{12}H_{22}O_{11}+Cl]^-$   $m/z$  377, aducto de moléculas de sacarose e glicose ou seus isômeros, íon  $[C_{18}H_{33}O_{17}]^-$   $m/z$  521, aducto de duas moléculas de sacarose ou seus isômeros, íon  $[C_{24}H_{43}O_{22}]^-$   $m/z$  683 e aducto de três moléculas de sacarose ou seus isômeros, íon  $[C_{36}H_{65}O_{33}]^-$ ,  $m/z$  1025.



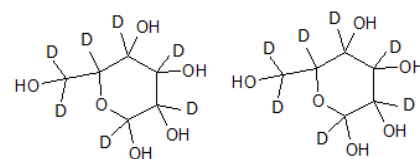
**Figura 11.** ESI (-) FT - ICR MS: (a) estágio 1, (b) estágio 2, (c) estágio 3 e (d) estágio 4.

Para confirmar as identificações dos íons, o espectro de ESI (-) FT - ICR MS de uma solução 20% m/V do padrão de sacarose  $C_{12}H_{22}O_{11}$  dopada com 5  $\mu$ l de solução dopante de glicose deuterada D-Glicose-1,2,3,4,5,6-d<sub>7</sub> ( $5 \times 10^{-3}$  mol/l) foi adquirido e os sinais encontrados foram comparados aos sinais dos espectros das frações provenientes das frutas (Anexo 1). Além disso, a altíssima exatidão do FT-ICR MS, nos permitiu identificar íons com erros de massa próximos de 1ppm (Tabela 4), o que possibilitou a identificação das fórmulas moleculares dos íons de forma inequívoca.

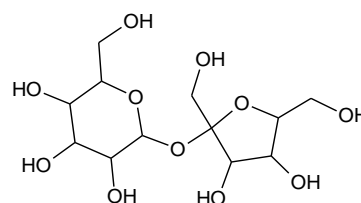
**Tabela 4.** Compostos Químicos propostos dos Espectros de Massas ESI (-) FT-ICR dos estádios de maturação.

	<b>m/z</b> experimental	<b>Fórmula</b> <b>Molecular</b> <b>(M – H)<sup>-</sup></b>	<b>IDH</b>	<b>Erro</b> <b>(ppm)</b>	<b>Moléculas Propostas</b>
<b>1</b>	173.04549	$C_7H_9O_5$	3	0,31	 <b>Ácido Chiquímico</b>
<b>2</b>	191.01966	$C_6H_7O_7$	3	0,37	 <b>Ácido Cítrico</b>
<b>3</b>	239.07731	$C_8H_{15}O_8$	1	-0,28	<b>Não Identificado</b>
<b>4</b>	341.10895	$C_{12}H_{21}O_{11}$	2	-0,05	 <b>Sacarose ou seus isômeros</b>
<b>5</b>	353.10904	$C_{13}H_{21}O_{11}$	3	-0,30	<b>Não Identificado</b>
<b>6</b>	371.11967	$C_{13}H_{23}O_{12}$	2	-0,47	<b>Não Identificado</b>

<b>7</b>	373.20747	-	-	-	
<b>8</b>	377.08575	$C_{12}H_{22}ClO_{11}$	1	-0,37	
<b>9</b>	387.11465	$C_{13}H_{23}O_{13}$	2	-0,61	
<b>10</b>	401.13022	$C_{14}H_{25}O_{13}$	2	-0,38	
<b>11</b>	409.03916	$C_{11}H_{18}ClO_{14}$	2	-0,26	
<b>12</b>	421.00278	$C_{11}H_{14}ClO_{15}$	4	0,25	
<b>13</b>	431.14093	$C_{15}H_{27}O_{14}$	2	-0,69	
<b>14</b>	439.08612	$C_{13}H_{24}ClO_{14}$	1	-0,26	
<b>15</b>	445.1202	$C_{15}H_{25}O_{15}$	3	-0,69	
<b>16</b>	447.13585	$C_{15}H_{27}O_{15}$	2	-0,69	
<b>17</b>	459.13585	$C_{16}H_{27}O_{15}$	3	-0,68	
<b>18</b>	475.13078	$C_{16}H_{27}O_{16}$	3	-0,69	
<b>19</b>	515.16193	$C_{19}H_{31}O_{16}$	4	-0,33	

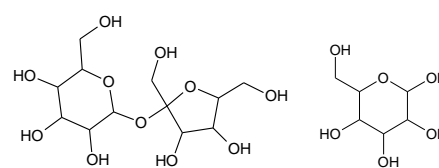


Aducto de duas moléculas de glicose deuterada



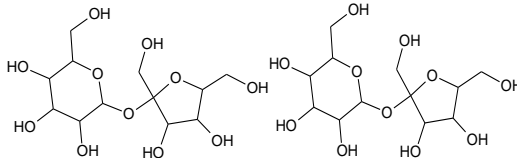
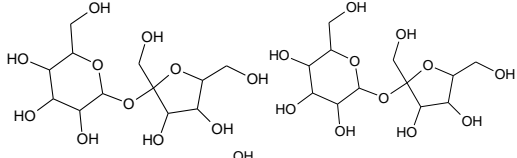
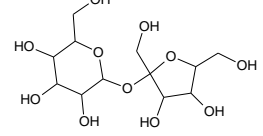
Sacarose ou seus isômeros

<b>20</b>	521.1725	$C_{18}H_{33}O_{17}$	2	-0,33	
<b>21</b>	533.13621	$C_{18}H_{29}O_{18}$	4	-0,51	
<b>22</b>	551.14695	$C_{18}H_{31}O_{19}$	3	-0,81	
<b>23</b>	571.09226	$C_{17}H_{28}ClO_{19}$	3	-0,66	
<b>24</b>	578.959	$C_{14}H_{11}O_{25}$	9	0,84	

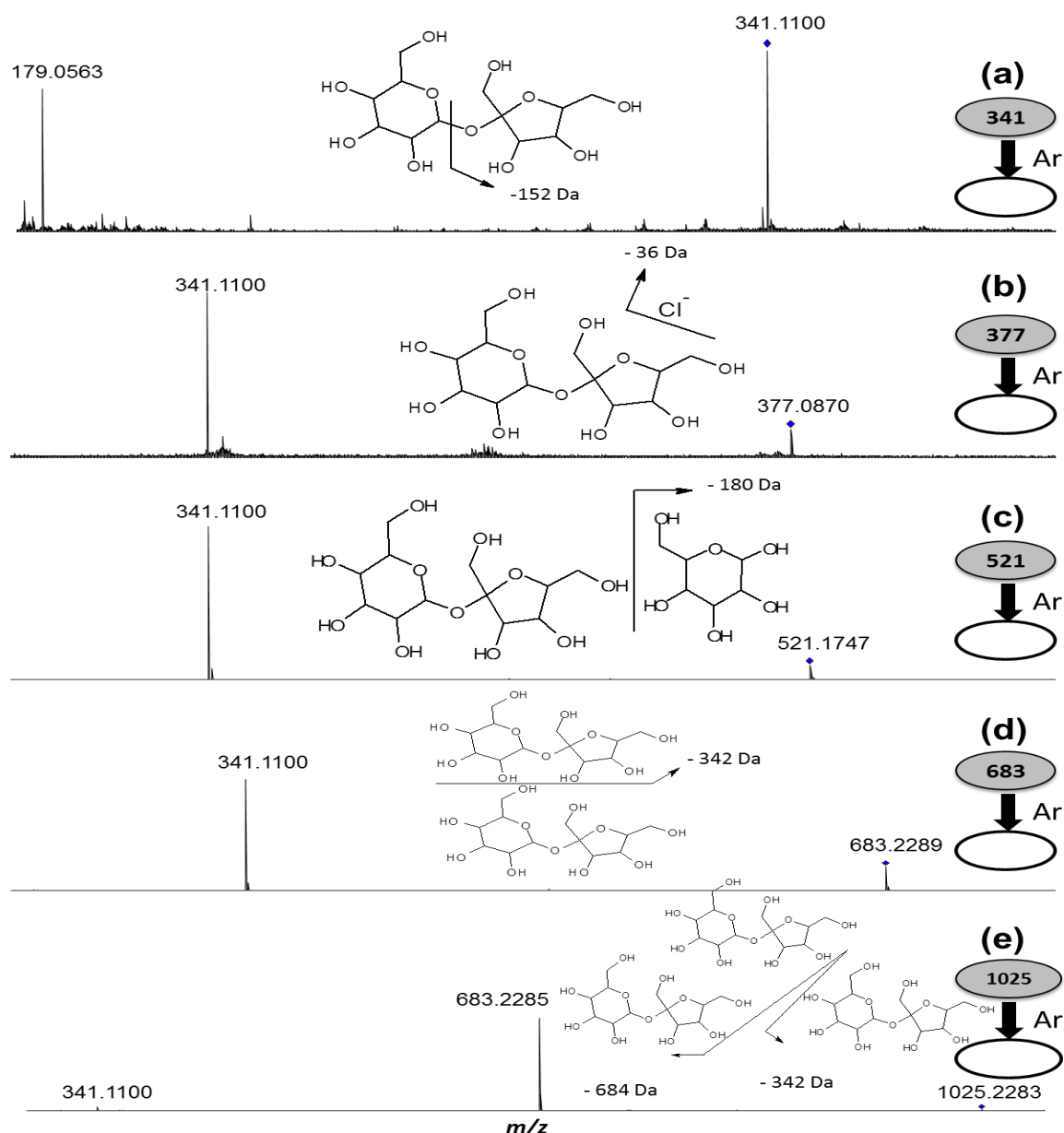


Aducto de sacarose e glicose ou seus isômeros

Não Identificado  
 Não Identificado  
 Não Identificado  
 Não Identificado

<b>25</b>	683.22506	$C_{24}H_{43}O_{22}$	3	0,12	 <p>Aducto de duas moléculas de sacarose ou seus isômeros</p>
<b>26</b>	857.27876	$C_{31}H_{53}O_{27}$	5	-0,92	<p>Não Identificado</p> 
<b>27</b>	1025.34264	$C_{36}H_{65}O_{33}$	4	-1,25	 <p>Aducto de três moléculas de sacarose ou seus isômeros</p>

Para confirmar as estruturas dos íons de  $m/z$  341, 377, 521, 683 e 1025, os espectros ESI (-) MS / MS foram adquiridos (Figura 12). O composto 4 ( $m/z$  341) gerou o fragmento  $[C_5H_{12}O_6]^-$  ( $m/z$  179), relativo à perda de hexose devido a fragmentação da ligação glicosídica. O composto 8 ( $m/z$  377) gerou o íon  $[C_{12}H_{21}O_{11}]^-$ , relativo à perda de cloro e desprotonação. O composto 20 ( $m/z$  521) gerou íon  $[C_{12}H_{21}O_{11}]^-$  de  $m/z$  341 relativo à perda de glicose ou seus isômeros. O composto 25 ( $m/z$  683) gerou íon  $[C_{12}H_{21}O_{11}]^-$   $m/z$  341 relativo à perda de sacarose ou seus isômeros. O composto 27 ( $m/z$  1025) gerou íon  $[C_{24}H_{43}O_{22}]^-$   $m/z$  683 relativo à perda de sacarose ou seus isômeros e íon  $[C_{12}H_{21}O_{11}]^-$   $m/z$  341, relativo à perda de duas moléculas de sacarose ou seus isômeros.



**Figura 12.** ESI (-) MS/MS dos íons de  $m/z$  (a) 341, (b) 377, (c) 521, (d) 683 e (e) 1025.

Os ácidos chiquímico e cítrico foram identificados nas formas desprotonadas, íons de  $m/z$  173 e  $m/z$  191 com erro de 0,31 e 0,37 ppm, respectivamente. O ácido cítrico é o ácido predominante em mangas<sup>62</sup> e o ácido chiquímico é um dos precursores na formação de compostos fenólicos<sup>63</sup>.

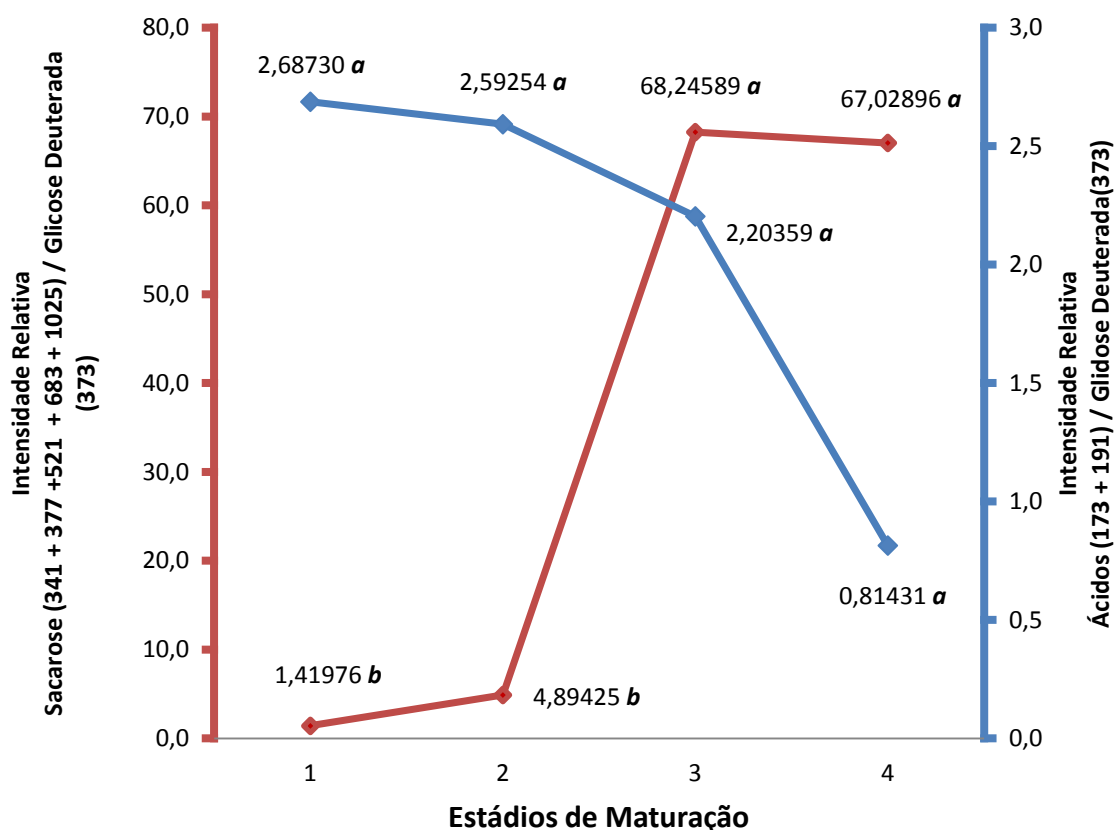
As mudanças nos conteúdos de açúcares e ácidos orgânicos são importantes para atributos sensoriais em mangas, sendo o sabor quase que inteiramente o balanço entre o conteúdo de açúcares e ácidos orgânicos<sup>64</sup>. As variações dos teores de sacarose ou seus isômeros e ácidos orgânicos foram demonstrados graficamente (Figura 13). A intensidade relativa de sacarose ou seus isômeros foi expressa como

uma função da soma das intensidades absolutas dos sinais dos dissacarídeos ( $m/z$  341,377,521, 683 e 1025) dividido pela intensidade absoluta do sinal da glicose deuterada ( $m/z$  373), já a intensidade relativa de ácidos orgânicos é função da soma das intensidades absolutas dos sinais do ácido chiquímico ( $m/z$  173) e ácido cítrico ( $m/z$  191) dividido pela soma da intensidade absoluta do sinal da glicose deuterada ( $m/z$  373). Os dados de ESI (-) FT - ICR MS que foram tratados estatisticamente com a aplicação da análise de variância ANOVA e teste de Tukey (Tabela 5 e 6), são capazes de indicar se há diferença significativa, em termos de sacarose ou seus isômeros e ácidos orgânicos, em função do desenvolvimento e amadurecimento da Manga Ubá.

A análise de variância, aplicada aos dados de ESI (-) FT - ICR MS mostrou que apesar de haver uma redução no conteúdo de ácido chiquímico e cítrico, estatisticamente o conteúdo de ácidos orgânicos nas amostras analisadas, não diferem significativamente entre os estádios de maturação. Isso pode ser justificado pelo fato de outros ácidos não detectados influenciarem na variação da acidez dos frutos. O decréscimo do teor de ácidos (Figura 13) pode ser explicado pelo fato de o ácido cítrico ser oxidado durante o amadurecimento para produzir energia necessária a outras transformações químicas<sup>65</sup>.

Além disso, foi possível monitorar que o conteúdo de sacarose ou seus isômeros aumentou durante o desenvolvimento e amadurecimento do fruto até o estágio 3 e posteriormente diminuiu até o estágio 4. O incremento da concentração de sacarose pode ser explicado pela conversão de amido em açúcares que ocorre durante o amadurecimento do fruto<sup>22, 60</sup> e a redução do teor de sacarose no estágio 4 pode ser atribuída ao processo de senescência, em que o fruto sofre rompimento dos tecidos e degradação dos açúcares<sup>22, 60, 61</sup>. O tratamento com análise de variância e teste de Tukey mostrou estatisticamente que os estádios 3 e 4 são significativamente mais ricos em açúcares que os estádios 1 e 2.

Em geral, a partir dos dados de ESI (-) FT - ICR MS foi possível prever, ao nível molecular, os resultados dos ensaios físico-químicos convencionais, que são limitados, uma vez que não diagnosticam a espécie química responsável pela variação dos resultados. A técnica utilizada neste trabalho apontou as moléculas responsáveis pela variação de SST, AT, pH e razão SST/AT e indicou que os estádios 3 e 4 apresentaram maior quantidade de sacarose e por isso a fruta pode ser classificada como mais doce.



**Figura 13.** Variação do conteúdo de sacarose e ácidos orgânicos em função dos estádios de maturação. Intensidade relativa de sacarose e ácidos orgânicos. Intensidades relativas seguidas de letras diferentes diferem significativamente entre si, a nível de 5%.

**Tabela 5.** Análise de variância para as intensidades relativas dos sinais de ácidos orgânicos.

	Estádio 1	Estádio 2	Estádio 3	Estádio 4	
Repetição 1	3,1696830	2,8973590	3,8715140	0,8051373	
Repetição 2	2,5105910	2,5669210	0,7456934	1,0022790	
Repetição 3	2,3816190	2,3133300	1,9935470	0,6355170	
Fonte de Variação	SQ	GL	QM	F calculado	Conclusão
Entre grupos (tratamento)	6,74587	3	2,24862	3,2425	Não existem diferenças significativas entre os tratamentos.
Dentro do grupo (resíduos)	5,54782	8	0,69348	F crítico	
Total	12,29369	11	-	4,0662	

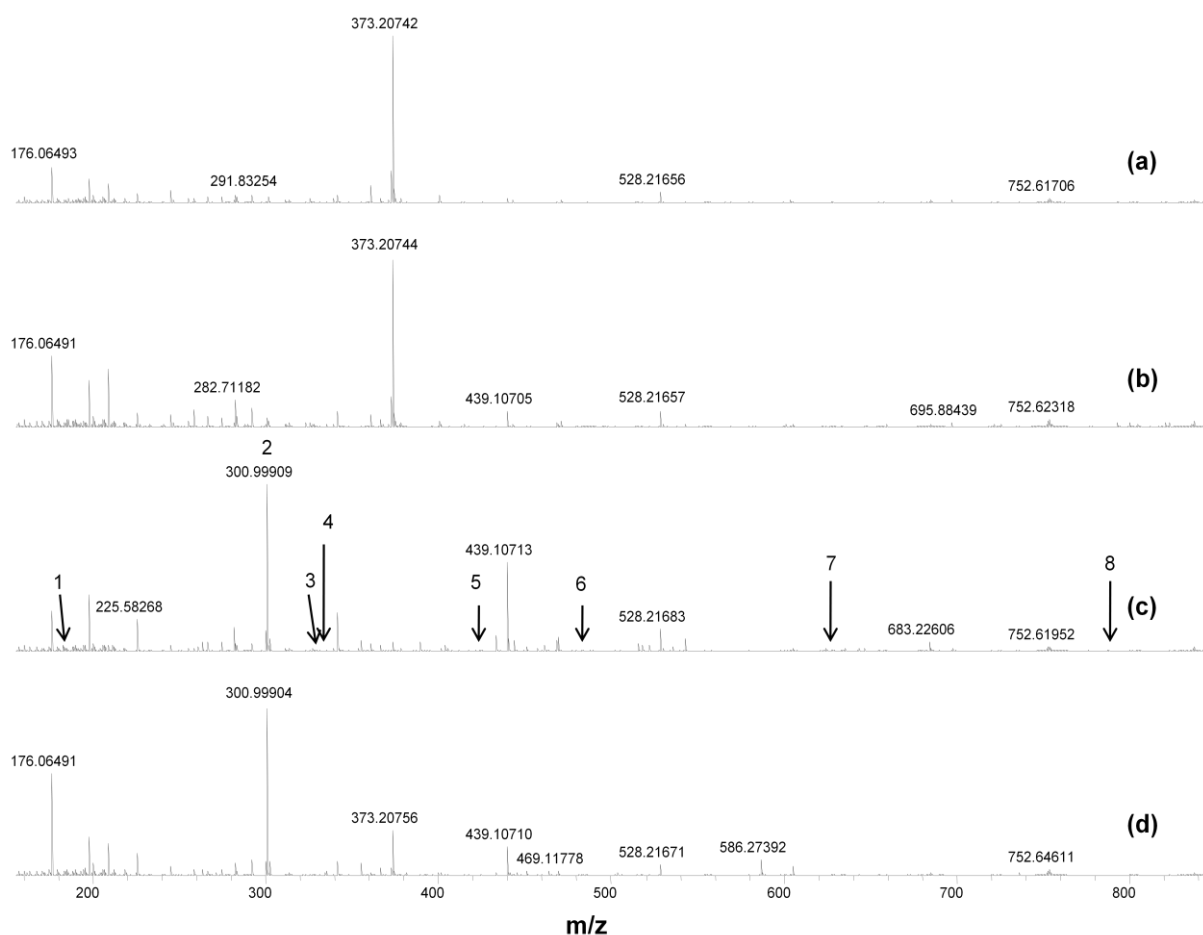
**Tabela 6.** Análise de variância e teste de Tukey para as intensidades relativas dos sinais de sacarose.

	Estádio 1	Estádio 2	Estádio 3	Estádio 4	
Repetição 1	1,516838	6,613490	92,332950	88,765820	
Repetição 2	1,570465	2,290910	64,234620	58,756290	
Repetição 3	1,171973	5,778363	48,170090	53,564770	
Fonte de Variação	SQ	GL	QM	F calculado	Conclusão
Entre grupos (tratamento)	12493,50201	3	4164,50067	19,2341	Existe pelo menos uma diferença significativa entre os tratamentos.
Dentro do grupo (resíduos)	1732,13541	8	216,51693	F crítico	
Total	14225,63742	11	-	7,591	
Estádios	Módulo da diferença da média amostral	d.m.s	Conclusão		
1 e 2	3,474496	38.48429	$\mu_1 = \mu_2$		
1 e 3	66,82613	38.48429	$\mu_1 \neq \mu_3$		
1 e 4	65,6092	38.48429	$\mu_1 \neq \mu_4$		
2 e 3	63,35163	38.48429	$\mu_2 \neq \mu_3$		
2 e 4	62,13471	38.48429	$\mu_2 \neq \mu_4$		
3 e 4	1,21693	38.48429	$\mu_3 = \mu_4$		

#### 4.2.2 ANÁLISE DA FRAÇÃO FENÓLICA

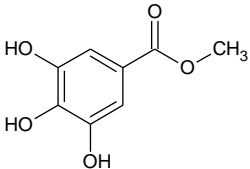
Os espectros de ESI (-) FT - ICR MS foram adquiridos para avaliar o conteúdo de compostos fenólicos das amostras de manga Ubá em função de quatro estádios de maturação (Figura 14). Ao todo oito compostos fenólicos foram identificados na forma desprotonada. São eles: galato de metila ou derivados do ácido gálico, íon  $[C_8H_7O_5]^-$  de  $m/z$  183, ácido elágico ou seus isômeros, íon  $[C_{14}H_5O_8]^-$  de  $m/z$  300, galoil glicose ou seus isômeros, íon  $[C_{13}H_{15}O_{10}]^-$  de  $m/z$  331, digalato de metila éster ou seus isômeros, íon  $[C_{15}H_{11}O_9]^-$  de  $m/z$  335, mangiferina, íon  $[C_{19}H_{17}O_{11}]^-$  de  $m/z$  421, digaloil glicose ou seus isômeros, íon  $[C_{20}H_{19}O_{14}]^-$  de  $m/z$  483, trigaloil glicose ou seus isômeros, íon  $[C_{27}H_{23}O_{18}]^-$  de  $m/z$  635 e tetragaloil glicose ou seus isômeros, íon  $[C_{34}H_{27}O_{22}]^-$  de  $m/z$  787. A altíssima exatidão do FT - ICR MS permitiu identificar íons com erros de massa próximos de 1ppm e foi possível notar que com o aumento da massa molar dos compostos fenólicos, os valores de DBE variaram de 5 a 21

correspondendo de 1 a 4 anéis fenólicos (Tabela 7) o que possibilitou a identificação das moléculas de forma inequívoca.

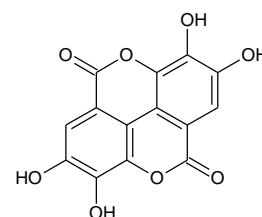


**Figura 14.** Espectros de Massas ESI (-) FT-ICR: (a) estágio 1, (b) estágio 2, (c) estágio 3 e (d) estágio 4.

**Tabela 7.** Compostos Químicos propostos dos Espectros de Massas ESI (-) FT-ICR dos estádios de maturação.

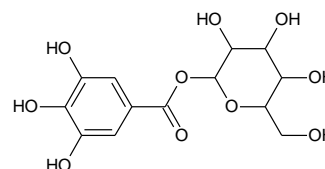
	<b>m/z</b> Experimental	<b>Molecular Fórmula (M - H)<sup>-</sup></b>	<b>IDH</b>	<b>Erro (ppm)</b>	<b>Moléculas propostas</b>
<b>1</b>	183.02991	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>5</sub>	5	-0,05	 Galato de metila

2 300.99909 C<sub>14</sub>H<sub>5</sub>O<sub>8</sub> 12 -0,33



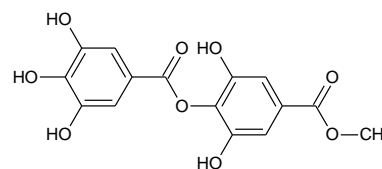
Ácido Elágico

3 331.06738 C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>O<sub>10</sub> 6 -0,93



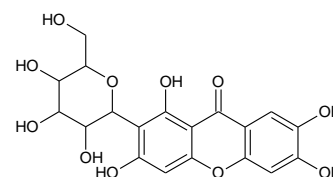
Galoil glicose

4 335.04117 C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>O<sub>9</sub> 10 -0,94



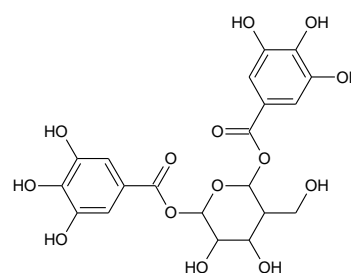
Digalato de metila éster

5 421.07807 C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>O<sub>11</sub> 11 -1,04



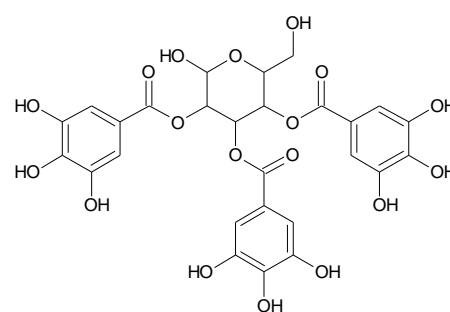
Mangiferina

6 483.07861 C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>O<sub>14</sub> 11 -1,19



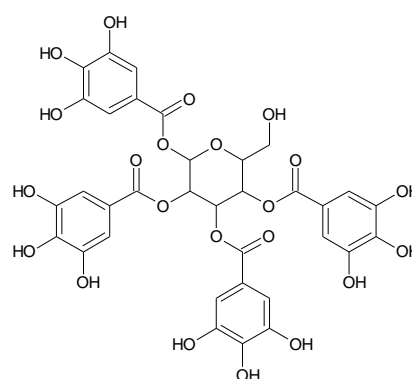
Digaloil glicose

7 635.08996  $C_{27}H_{23}O_{18}$  16 -1,53



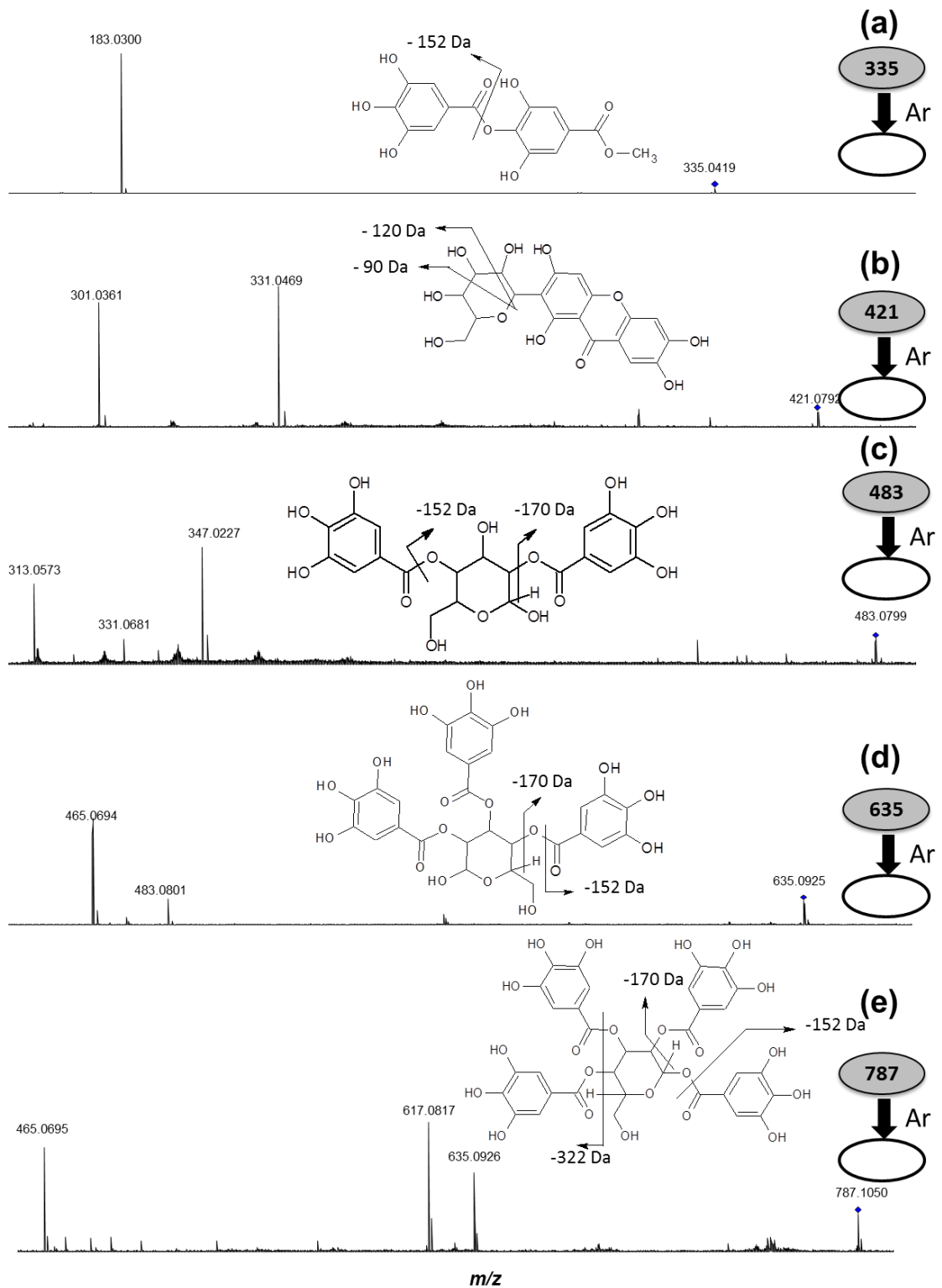
Trigaloil glucose

8 787.10140  $C_{34}H_{27}O_{22}$  21 -1,85



Tetragaloil glucose

Experimentos de ESI (-) MS/MS identificaram a estrutura dos compostos fenólicos (Figura 15). O composto 4 (m/z 335) mostrou perda de uma fração galoil (-152 Da), o composto 5 (m/z 421) apresentou perda de 90 e 120 Da, característico da clivagem de açúcares, como já descrito em outros trabalhos . Os compostos 6 (m/z 483) e 7 (m/z 635) mostraram perda de ácido gálico (-170 Da) e perda de uma fração galoil (-152 Da), o composto 8 (m/z 787) apresentou perda de ácido gálico (-170 Da), perda de uma fração galoil (-152 Da) e perda de duas frações galoil (-322 Da). O perfil de fragmentação encontrado para estes compostos polifenólicos já havia sido observado na elucidação de compostos fenólicos de mangas<sup>30, 31, 66, 67</sup>.



**Figura 15.** ESI (-) MS/MS dos íons  $m/z$  (a) 335, (b) 421, (c) 483, (d) 635 e (e) 787.

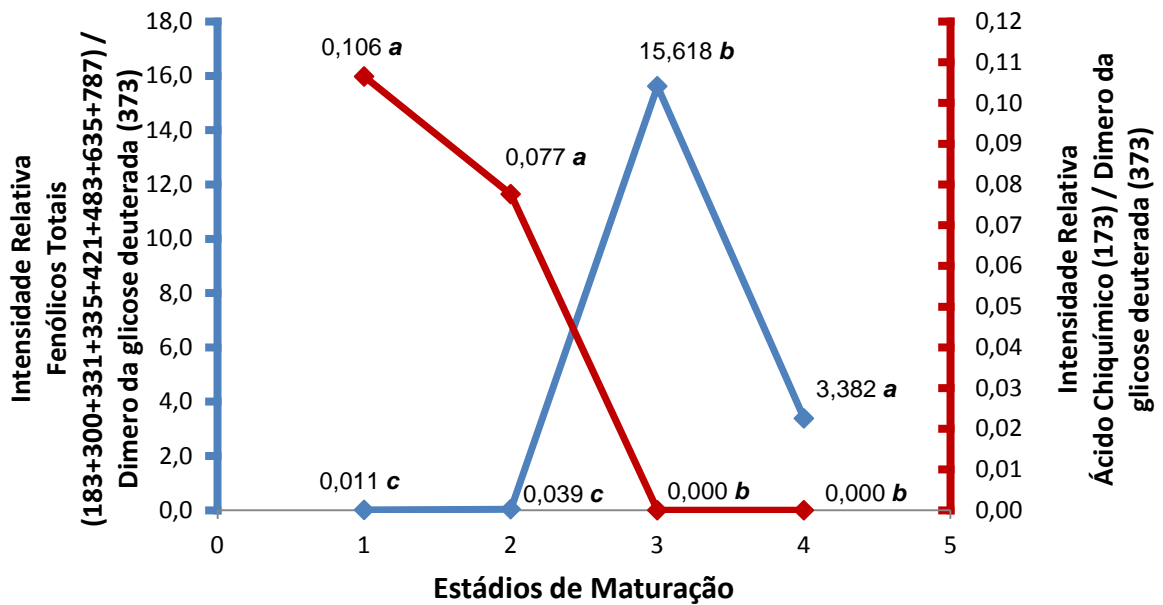
O presente trabalho identificou sete taninos e uma xantona glicosilada. O ácido elágico é um composto comum em mangas e já havia sido identificado em variedades como *Ikanekpo*<sup>68</sup>, *KensingtonPride* e *Irwin*<sup>67</sup>, que apresenta atividades

anti-inflamatórias<sup>69</sup>, gastroprotetoras<sup>70</sup>, cardioprotetoras<sup>71</sup> e antioxidantes<sup>72</sup>. De modo geral, taninos como galato de metila, galoil glicose, digalato de metila éster, digaloil glicose, trigaloil glicose e tetragaloil glicose estão presentes em outras variedades como *KensingtonPride*, *Irwin*<sup>67</sup>, *Keitt*, *Sensation* e *Gomera 3*<sup>73</sup>, possuem atividade antimicrobianas<sup>74</sup>, antibacterianas<sup>75</sup> e antifúngicas<sup>76</sup>. A mangiferina é uma xantona glicosilada encontrada em diversas variedades de manga e possui atividades farmacológicas em diversos órgãos e tecidos, com atividade preventiva e terapêutica, protegendo coração, neurônios, fígado e rins, prevenindo ou retardando o surgimento de doenças<sup>77</sup>.

A presença dos compostos fenólicos foi avaliada em função dos estádios de maturação. A intensidade relativa da soma dos sinais dos compostos fenólicos foi calculada dividindo-se a soma das intensidades absolutas de todos compostos fenólicos pela intensidade absoluta do sinal do dímero da glicose deuterada (Figura 16).

O ácido chiquímico ( $m/z$  173), detectado na fração glicídica das frutas (Tabela 4), é um dos precursores de compostos fenólicos através da via do ácido chiquímico<sup>63, 78</sup>. As informações da técnica de ES (-) FT - ICR MS demonstraram queda no conteúdo de ácido chiquímico enquanto a intensidade dos sinais de moléculas fenólicas aumentam em função do estágio de maturação (1→4), confirmando a conversão do ácido chiquímico em compostos fenólicos (Figura 16).

Os dados de ESI (-) FT - ICR MS avaliados estatisticamente pela análise de variância e teste de Tukey (tabela 8 e 9) indicaram que o conteúdo de fenólicos dos estádios 3 e 4 diferem significativamente entre si e também dos estádios 1 e 2. Foi possível concluir que os estádios 1 e 2 são estádios pobres em compostos fenólicos e que durante o desenvolvimento e amadurecimento das mangas a quantidade destas moléculas aumentou até o estágio 3, e posteriormente diminuindo (estádio 4). Essa variação no conteúdo de compostos fenólicos já havia sido observado para a cultivar Ataulfo<sup>79</sup>.



**Figura 16.** Variação do conteúdo de ácido chiquímico e compostos fenólicos em função dos estádios de maturação. As letras a, b e c indicam que os teores dos compostos diferem significativamente entre si, a nível de 5%, pelo teste de Tukey.

**Tabela 8.** Análise de variância e teste de Tukey para as intensidades relativas dos sinais de compostos fenólicos.

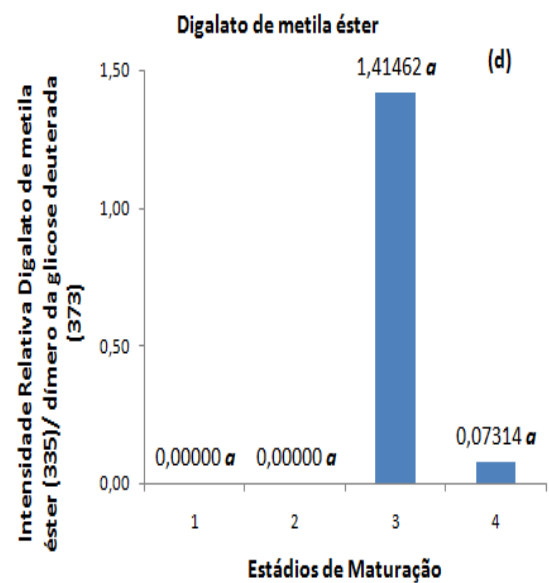
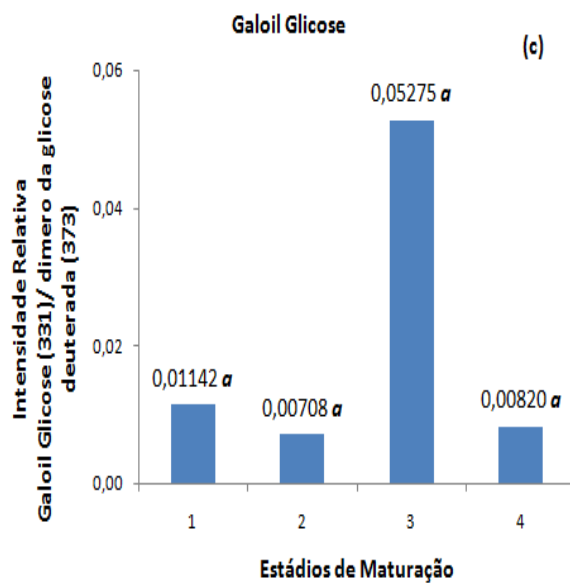
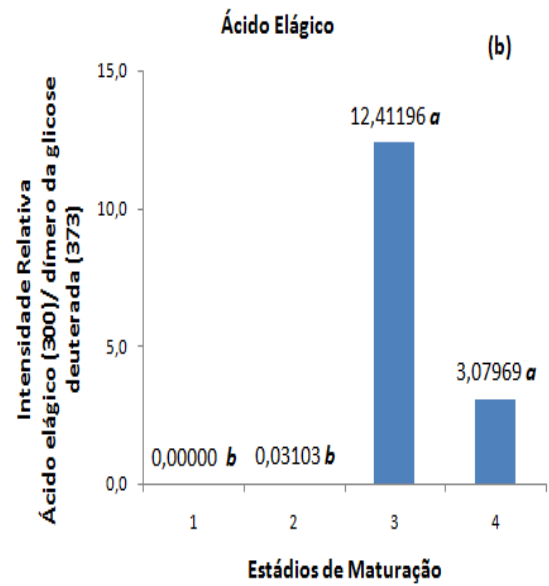
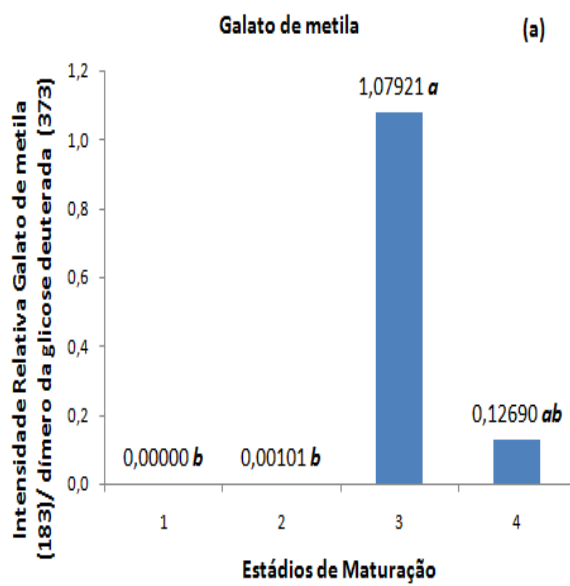
	Estádio 1	Estádio 2	Estádio 3	Estádio 4	
Repetição 1	0,00871	0,02362	14,04102	3,39705	
Repetição 2	0,01188	0,03051	15,09692	2,96741	
Repetição 3	0,01367	0,06323	17,71479	3,78299	
Fonte de Variação	SQ	GL	QM	F calculado	Conclusão
Entre grupos (tratamento)	493,86074	3	164,62025	175,8593	Existe pelo menos uma diferença significativa entre os tratamentos.
Dentro do grupo (resíduos)	7,48873	8	0,93609	F crítico	
Total	501,34947	11	-	7,591	
Estádios	Módulo da diferença da média amostral	d.m.s	Conclusão		
1 e 2	0,0277	2,53044	$\mu_1 = \mu_2$		
1 e 3	15,6061	2,53044	$\mu_1 \neq \mu_3$		
1 e 4	3,37106	2,53044	$\mu_1 \neq \mu_4$		
2 e 3	15,57846	2,53044	$\mu_2 \neq \mu_3$		
2 e 4	3,34336	2,53044	$\mu_2 \neq \mu_4$		
3 e 4	12,2351	2,53044	$\mu_3 \neq \mu_4$		

**Tabela 9.** Análise de variância e teste de Tukey para as intensidades relativas dos sinais de ácido chiquímico.

	Estádio 1	Estádio 2	Estádio 3	Estádio 4	
Repetição 1	0,12781	0,07271	0,00000	0,00000	
Repetição 2	0,09619	0,10209	0,00000	0,00000	
Repetição 3	0,09552	0,05808	0,00000	0,00000	
Fonte de Variação	SQ	GL	QM	F calculado	Conclusão
Entre grupos (tratamento)	0,02668	3	0,00889	42,2112	Existe pelo menos uma diferença significativa entre os tratamentos.
Dentro do grupo (resíduos)	0,00169	8	0,00021	F crítico	
Total	0,02836	11	-	7,591	
Estádios	Módulo da diferença da média amostral	d.m.s		Conclusão	
1 e 2	0,02888	0,03796		$\mu_1 = \mu_2$	
1 e 3	0,1065	0,03796		$\mu_1 \neq \mu_3$	
1 e 4	0,1065	0,03796		$\mu_1 \neq \mu_4$	
2 e 3	0,07762	0,03796		$\mu_2 \neq \mu_3$	
2 e 4	0,07762	0,03796		$\mu_2 \neq \mu_4$	
3 e 4	0	0,03796		$\mu_3 = \mu_4$	

A intensidade relativa de cada composto fenólico foi determinada através da razão entre a intensidade absoluta do sinal de cada composto fenólico e a intensidade absoluta do sinal do dímero da glicose deuturada (figura 17). Os dados de ESI (-) FT - ICR MS foram avaliados estatisticamente pela análise de variância e teste de Tukey (tabela 10 - 18). Galoil glicose e digalato de metila éster (Figura 17 c e 17 d), apesar de apresentarem seus sinais com maiores intensidades relativas no estágio 3, 0,05275 e 1,41462 respectivamente, estatisticamente não tiveram os seus teores diferenciados em função dos estádios de maturação. Galato de metila (figura 17 a) apresentou sinal com maior intensidade relativa, 1,07921, no estágio 3 e estatisticamente diferem dos estádios 1 e 2, o que indica maiores concentrações do composto no estágio 3. Já o ácido elágico (figura 17 b) apresentou sinal com maior intensidade relativa no estágio 3, 12,41196, seguido pelo estágio 4, 3,07969 e estatisticamente, diferiram significativamente dos estádios 1 e 2, o que indica

maiores concentrações do composto nos estádios 3 e 4. Mangiferina, digaloiil glicose, trigaloiil glicose e tetragaloiil glicose (figura 17 e - h, respectivamente) apresentaram seus sinais com maiores intensidades relativas no estágio 3, 0,9486, 0,15317, 0,25450 e 0,15651, respectivamente e estatisticamente os valores para o estágio 3 diferem significativamente dos estádios 1, 2 e 4, o que indica maiores concentrações do composto no estágio 3.



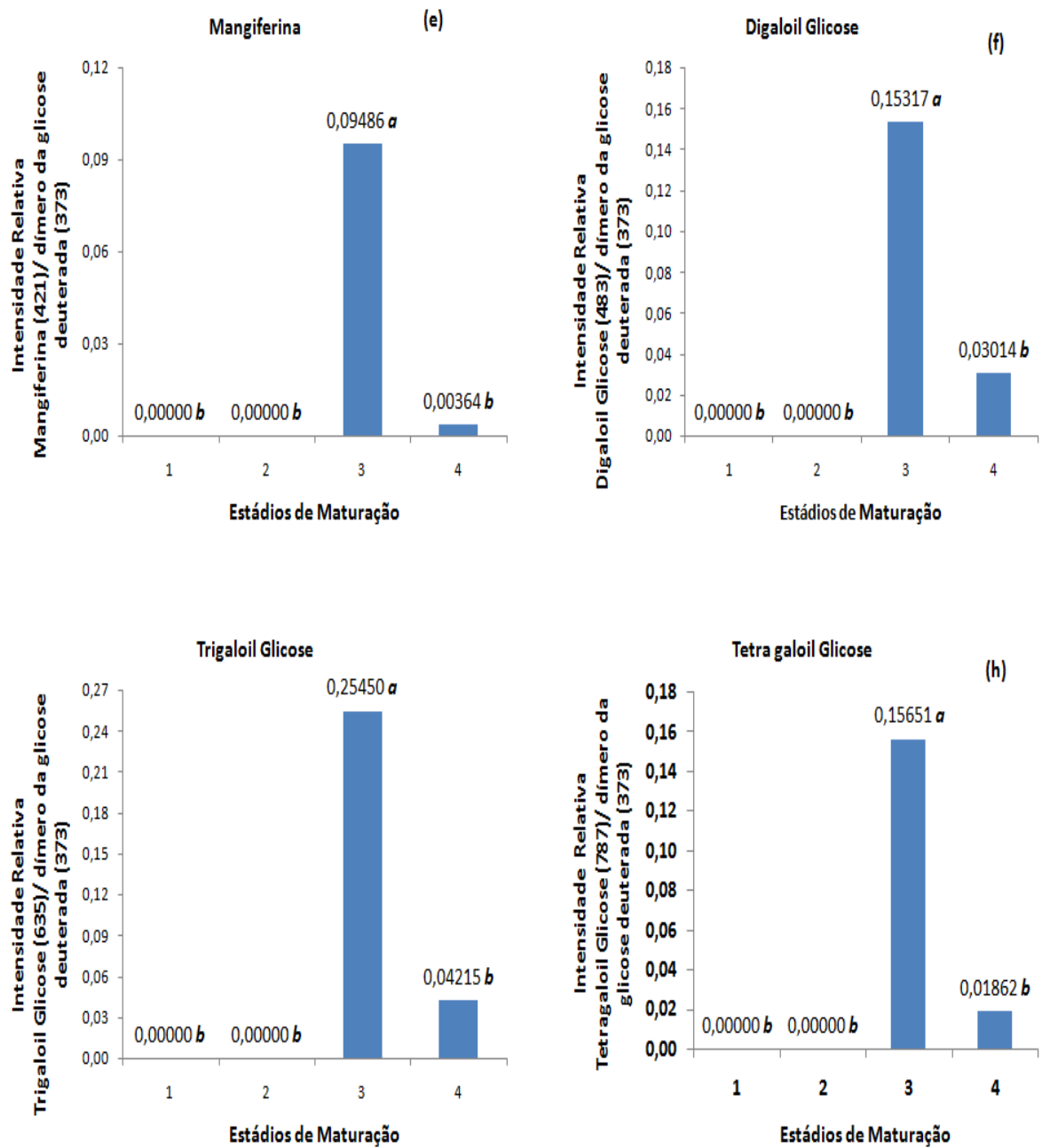


Figura 17. Intensidade Relativa dos compostos fenólicos em função dos estádios de maturação.

**Tabela 10.** Análise de variância e teste de Tukey para as intensidades relativas dos sinais de Galato de metila.

	Estádio 1	Estádio 2	Estádio 3	Estádio 4	
Repetição 1	0,00000	0,00302	1,88378	0,38070	
Repetição 2	0,00000	0,00000	0,71881	0,00000	
Repetição 3	0,00000	0,00000	0,63505	0,00000	
Fonte de Variação	SQ	GL	QM	F calculado	Conclusão
Entre grupos (tratamento)	2.44956	3	0.81652	6.0984	Existe pelo menos uma diferença significativa entre os tratamentos.
Dentro do grupo (resíduos)	1.07113	8	0.13389	F crítico	
Total	3.52069	11	-	4.0662	
Estádios	Módulo da diferença da média amostral	d.m.s	Conclusão		
1 e 2	0,0010	0,95700	$\mu_1 = \mu_2$		
1 e 3	1,0792	0,95700	$\mu_1 \neq \mu_3$		
1 e 4	0,1269	0,95700	$\mu_1 = \mu_4$		
2 e 3	1,0782	0,95700	$\mu_2 \neq \mu_3$		
2 e 4	0,1258	0,95700	$\mu_2 = \mu_4$		
3 e 4	0,95231	0,95700	$\mu_3 = \mu_4$		

**Tabela 11.** Análise de variância e teste de Tukey para as intensidades relativas dos sinais de Ácido Elágico.

	Estádio 1	Estádio 2	Estádio 3	Estádio 4	
Repetição 1	0,00000	0,01333	7,86995	2,67802	
Repetição 2	0,00000	0,02458	13,26665	2,85758	
Repetição 3	0,00000	0,05518	16,09927	3,70346	
Fonte de Variação	SQ	GL	QM	F calculado	Conclusão
Entre grupos (tratamento)	309,91126	3	103,30375	23,2422	Existe pelo menos uma diferença significativa entre os tratamentos.
Dentro do grupo (resíduos)	35,55730	8	4,44466	F crítico	
Total	345,46857	11	-	7,591	

Estádios	Módulo da diferença da média amostral	d.m.s	Conclusão
1 e 2	0,03103	5,51388	$\mu_1 = \mu_2$
1 e 3	12,41196	5,51388	$\mu_1 \neq \mu_3$
1 e 4	3,079687	5,51388	$\mu_1 = \mu_4$
2 e 3	12,38093	5,51388	$\mu_2 \neq \mu_3$
2 e 4	3,048657	5,51388	$\mu_2 = \mu_4$
3 e 4	9,33227	5,51388	$\mu_3 \neq \mu_4$

**Tabela 12.** Análise de variância e teste de Tukey para as intensidades relativas dos sinais de Galoil glicose.

	Estádio 1	Estádio 2	Estádio 3	Estádio 4	
Repetição 1	0,00871	0,00727	0,00000	0,00000	
Repetição 2	0,01188	0,00593	0,07920	0,01225	
Repetição 3	0,01367	0,00804	0,07904	0,01235	
Fonte de Variação	SQ	GL	QM	F calculado	Conclusão
Entre grupos (tratamento)	0,00436	3	0,00145	2,7084	Não existem diferenças significativas entre os tratamentos.
Dentro do grupo (resíduos)	0,00429	8	0,00054	F crítico	
Total	0,00865	11	-	4,0662	

**Tabela 13.** Análise de variância e teste de Tukey para as intensidades relativas dos sinais de Digalato de metila éster.

	Estádio 1	Estádio 2	Estádio 3	Estádio 4	
Repetição 1	0,00000	0,00000	3,73700	0,19403	
Repetição 2	0,00000	0,00000	0,32405	0,02539	
Repetição 3	0,00000	0,00000	0,18282	0,00000	
Fonte de Variação	SQ	GL	QM	F calculado	Conclusão
Entre grupos (tratamento)	4,35945	3	1,45315	1,4313	Não existem diferenças significativas entre os tratamentos.
Dentro do grupo (resíduos)	8,12237	8	1,01530	F crítico	
Total	12,48181	11	-	4,0662	

**Tabela 14.** Análise de variância e teste de Tukey para as intensidades relativas dos sinais de Mangiferina.

	Estádio 1	Estádio 2	Estádio 3	Estádio 4	
Repetição 1	0,00000	0,00000	0,09514	0,00000	
Repetição 2	0,00000	0,00000	0,08824	0,01092	
Repetição 3	0,00000	0,00000	0,10121	0,00000	
Fonte de Variação	SQ	GL	QM	F calculado	Conclusão
Entre grupos (tratamento)	0,01976	3	0,00659	321,8402	Existe pelo menos uma diferença significativa entre os tratamentos.
Dentro do grupo (resíduos)	0,00016	8	0,00002	F crítico	
Total	0,01992	11	-	7,591	
Estádios	Módulo da diferença da média amostral	d.m.s		Conclusão	
1 e 2	0	0,01183		$\mu_1 = \mu_2$	
1 e 3	0,094863	0,01183		$\mu_1 \neq \mu_3$	
1 e 4	0,00364	0,01183		$\mu_1 = \mu_4$	
2 e 3	0,094863	0,01183		$\mu_2 \neq \mu_3$	
2 e 4	0,00364	0,01183		$\mu_2 = \mu_4$	
3 e 4	0,09122	0,01183		$\mu_3 \neq \mu_4$	

**Tabela 15.** Análise de variância e teste de Tukey para as intensidades relativas dos sinais de Digaloiil glicosé.

	Estádio 1	Estádio 2	Estádio 3	Estádio 4	
Repetição 1	0,00000	0,00000	0,06915	0,02081	
Repetição 2	0,00000	0,00000	0,16766	0,03282	
Repetição 3	0,00000	0,00000	0,22271	0,03678	
Fonte de Variação	SQ	GL	QM	F calculado	Conclusão
Entre grupos (tratamento)	0,04791	3	0,01597	10,4347	Existe pelo menos uma diferença significativa entre os tratamentos.
Dentro do grupo (resíduos)	0,01224	8	0,00153	F crítico	
Total	0,06015	11	-	7,591	

Estádios	Módulo da diferença da média amostral	d.m.s	Conclusão
1 e 2	0	0,10232	$\mu_1 = \mu_2$
1 e 3	0,15317	0,10232	$\mu_1 \neq \mu_3$
1 e 4	0,03013	0,10232	$\mu_1 = \mu_4$
2 e 3	0,15317	0,10232	$\mu_2 \neq \mu_3$
2 e 4	0,03013	0,10232	$\mu_2 = \mu_4$
3 e 4	0,12304	0,10232	$\mu_3 \neq \mu_4$

**Tabela 16.** Análise de variância e teste de Tukey para as intensidades relativas dos sinais de Trigaloil glicose.

	Estádio 1	Estádio 2	Estádio 3	Estádio 4
Repetição 1	0,00000	0,00000	0,20166	0,06762
Repetição 2	0,00000	0,00000	0,31300	0,02844
Repetição 3	0,00000	0,00000	0,24883	0,03040

Fonte de Variação	SQ	GL	QM	F calculado	Conclusão
Entre grupos (tratamento)	0,13364	3	0,04455	49,3492	Existe pelo menos uma diferença significativa entre os tratamentos.
Dentro do grupo (resíduos)	0,00722	8	0,00090	F crítico	
Total	0,14086	11	-	7,591	

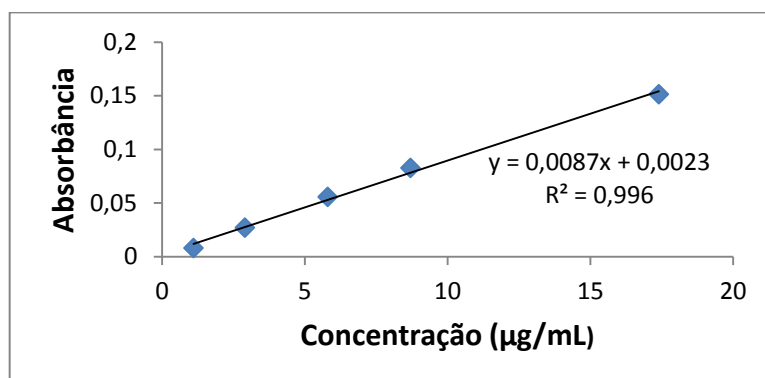
Estádios	Módulo da diferença da média amostral	d.m.s	Conclusão
1 e 2	0	0,07858	$\mu_1 = \mu_2$
1 e 3	0,25449	0,07858	$\mu_1 \neq \mu_3$
1 e 4	0,04215	0,07858	$\mu_1 = \mu_4$
2 e 3	0,25449	0,07858	$\mu_2 \neq \mu_3$
2 e 4	0,04215	0,07858	$\mu_2 = \mu_4$
3 e 4	0,21234	0,07858	$\mu_3 \neq \mu_4$

**Tabela 17.** Análise de variância e teste de Tukey para as intensidades relativas dos sinais de Tetragaloil glicose.

	Estádio 1	Estádio 2	Estádio 3	Estádio 4	
Repetição 1	0,00000	0,00000	0,18435	0,05586	
Repetição 2	0,00000	0,00000	0,13932	0,00000	
Repetição 3	0,00000	0,00000	0,14586	0,00000	
Fonte de Variação	SQ	GL	QM	F calculado	Conclusão
Entre grupos (tratamento)	0.05152	3	0.01717	42.0915	Existe pelo menos uma diferença significativa entre os tratamentos.
Dentro do grupo (resíduos)	0.00326	8	0.00041	F crítico	
Total	0.05479	11	-	7.591	
Estádios	Módulo da diferença da média amostral	d.m.s	Conclusão		
1 e 2	0	0,05283	$\mu_1 = \mu_2$		
1 e 3	0,15651	0,05283	$\mu_1 \neq \mu_3$		
1 e 4	0,01862	0,05283	$\mu_1 = \mu_4$		
2 e 3	0,15651	0,05283	$\mu_2 \neq \mu_3$		
2 e 4	0,01862	0,05283	$\mu_2 = \mu_4$		
3 e 4	0,13789	0,05283	$\mu_3 \neq \mu_4$		

### 4.3 POLIFENÓIS TOTAIS

Uma curva de calibração (Figura 18) de cinco pontos foi obtida, utilizando soluções com concentração do padrão de ácido gálico anidro (VETEC) variando de 1,1 a 17,4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . A curva mostrou linearidade com  $r^2 = 0,996$ .



**Figura 18.** Curva de calibração obtida utilizando soluções do padrão de ácido gálico.

Os resultados do experimento de quantificação de fenóis totais em termos de ácido gálico (Tabela 18) tratados estatisticamente pela análise de variância e teste de Tukey (Tabela 19), confirmaram que os estádios 3 e 4 são mais ricos em compostos fenólicos que os estádios 1 e 2.

**Tabela 18.** Concentração de polifenóis totais em termos de ácido gálico.

Estádios de Maturação	Concentração ( $\mu\text{g}$ de fenóis/100g de polpa)
1	1,125 <b>b</b>
2	2,326 <b>ab</b>
3	3,451 <b>a</b>
4	3,101 <b>a</b>

**Tabela 19.** Análise de variância e teste de Tukey para as Concentrações de polifenóis totais em termos de ácido gálico.

	Estádio 1	Estádio 2	Estádio 3	Estádio 4	
Repetição 1	132,28	278,20	392,20	355,72	
Repetição 2	136,84	145,96	310,12	264,52	
Repetição 3	68,44	273,64	332,92	310,12	
Fonte de Variação	SQ	GL	QM	F calculado	Conclusão
Entre grupos (tratamento)	95574,31680	3	31858,10560	11,6142	Existe pelo menos uma diferença significativa entre os tratamentos.
Dentro do grupo (resíduos)	21944,17920	8	2743,02240	F crítico	
Total	117518,49600	11	-	7,591	
Estádios	Módulo da diferença da média amostral	d.m.s	Conclusão		
1 e 2	120,08	136,97850	$\mu_1 = \mu_2$		
1 e 3	232,56	136,97850	$\mu_1 \neq \mu_3$		
1 e 4	197,60	136,97850	$\mu_1 \neq \mu_4$		
2 e 3	112,48	136,97850	$\mu_2 = \mu_3$		
2 e 4	77,52	136,97850	$\mu_2 = \mu_4$		
3 e 4	34,96	136,97850	$\mu_3 = \mu_4$		

#### 4.4 DETERMINAÇÃO DA INDUÇÃO DA QUINONA - REDUTASE

Os extratos polifenólicos dos quatro estádios de maturação foram avaliados quanto à ação de indução da quinona redutase. O estádio 1 apresentou IR igual a 2,51; o estádio 2, IR igual a 1,57; o estádio 3, IR igual a 1,51; e o estádio 4, IR igual a 0,86. Sendo assim, o estádio 1 foi o único a apresentar índice de indução (IR) maior que 2.

Ensaio de dose dependência foram executados utilizando os extratos de manga no estádio 1. A partir do gráfico do índice de indução (IR) em função da concentração do indutor, gerado pelo *software TablecurveTM2D* (AISN Software, EUA, 1996) pode-se concluir que os extratos do estádio 1 apresentaram CD igual a  $2,37 \pm 0,01$  ng polifenóis / g da fruta.

A concentração inibitória ( $IC_{50}$ ), ou seja, a concentração de polifenóis da solução necessário para matar 50% das células, foi superior a 62.4 ng polifenóis / g de fruta fresca e o índice de quimioprevenção (CI) foi superior a 26.

Os resultados dos ensaios de indução da quinona-redutase mostraram que o estádio 1 é o mais rico em compostos responsáveis pela indução da quinona-redutase. Deste modo, são necessários estudos posteriores para avaliar a natureza destes compostos, já que o estádio 1 se mostrou o estádio mais pobre em compostos polifenólicos de acordo com as análises de quantificação de polifenóis totais pelo método de Folin Ciocalteau e dados de ESI (-) FT – ICR MS.

#### 5. CONCLUSÃO

A Espectrometria de Massas de Ressonância Ciclotrônica de Íons com Transformada de Fourier (FT - ICR MS) possibilitou prever, ao nível molecular, as variações dos resultados obtidos através de ensaios físico-químicos convencionais como SST, AT, pH e razão SST/AT em função de quatro estádios de maturação da manga Ubá.

Os dados da ESI (-)FT-ICR MS demonstraram as variações nos conteúdos de ácidos orgânicos, açúcares e composto fenólicos em função de quatro estádios de maturação da manga Ubá. A partir destes resultados foi possível concluir que o estádio 3 apresentou mangas mais ricas em açúcares e com maior teor de compostos fenólicos, sendo um estádio ótimo para colheita e consumo.

As frações fenólicas foram avaliadas quanto ao seu poder de quimioprevenção

utilizando ensaios de indução da quinona redutase. Os resultados demonstraram que o estágio de maturação 1 apresentou melhores resultados. Deste modo, estudos posteriores são necessários para investigar os compostos responsáveis pela indução da quinona redutase.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Valor da produção agropecuária de 2015 é de R\$ 473,2 bilhões.** Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/> Acessado em 28 de setembro de 2015.
2. OECD-FAO. **OECD-FAO Agricultural Outlook 2015.** 21° Ed. Paris: OECD-FAO, 2015. 62 p.
3. MAPA. **Projeções do Agronegócio.** Brasil 2014/15 a 2024/25 Projeções de Longo Prazo. 6° Ed. Brasília, Brasil: MAPA, 2015. 79-80 p.
4. INCAPER. **Boletim da Conjuntura Agropecuária Capixaba.** Ano 1, nº 1. Brasil: INCAPER, 2015. 3-9 p.
5. INCAPER. **Informativo Especial do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural.** Ano 1, nº 1. Brasil: INCAPER, 2010. 60-61 p.
6. **A agricultura e o Espírito Santo.** Disponível em: [www.incaper.es.gov.br/pegead/diagnostico02.html](http://www.incaper.es.gov.br/pegead/diagnostico02.html). Acessado em 30 de setembro de 2015.
7. INCAPER. **Pólo de Manga para a Indústria no Estado do Espírito Santo.** 3° Ed. Brasil: DCM/INCAPER, 2009. 2-5 p.
8. KLUGE, R. A., NACHTIGAL, J. C., FACHINELLO, J. C.; BILHALVA, A. B. **Fisiologia e manejo pós-colheita de frutas de clima temperado.** 2° Ed. Campinas-SP: Livraria e Editora Rural Ltda, 2002. 214 p.
9. CHITARRA, M. L. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: Fisiologia e Manuseio.** 2° Ed. Lavras: Editora UFLA, 2005. 785 p.
10. SILVA J. S; FINGER F. L; CORREA P. C. **Secagem e armazenagem de produtos agrícolas.** 1° Ed. Viçosa: Aprenda Fácil, 2000. 475 p.
11. Etileno e amadurecimento. Disponível em: <http://www.usp.br/napan/posts.php?blog=3>. Acessado em 09 de outubro de 2015.
12. SILVA D. F. P. **Desenvolvimento e controle do amadurecimento da manga UBÁ.** Tese de Doutorado. Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009. 1 p.
13. **Manga diversifica atividades agrícolas no Espírito Santo.** Disponível em: [www.incaper.es.gov.br/noticia\\_completa.php?id=3229](http://www.incaper.es.gov.br/noticia_completa.php?id=3229). Acessado em 30 de

setembro de 2015.

14. RAMOS A. M.; COUTO F. A. A.; REZENDE P. M.; LELIS F. M. V.; BENEVIDES S. D.; PEREZ R. **Manga Ubá: Boas práticas agrícolas para produção destinada à agroindústria.** 1º Ed. Viçosa - MG: Editora UFV, 2005. 9 p.
15. GONÇALVES N. B.; CARVALHO V. D.; GONÇALVES J. R. A.; COELHO S. R. M.; SILVA T. G. Caracterização física e química dos frutos de cultivares de mangueira (*Mangifera indica* L.). *Cienc. Agrotec.*, **22**, 72-78, 1998. *apud* MATA G. M. S. C.; OLIVEIRA D. D. S.; DELLA L. C.; CAMPOS F. M., QUEIROZ J. H. D.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M. Teores de  $\beta$ -caroteno e vitamina C durante o amadurecimento da manga" UBÁ"(*Mangifera indica* L. var. Ubá). *Rev. Inst. Adolfo Lutz (Impr.)*, **70**, 225-229, 2011.
16. COSTA A. N.; COSTA A. F. S.; CAETANO L. C. S.; VENTURA J. A. **Recomendações técnicas recomendações técnicas para a produção de manga.** 1º Ed. Vitória – ES: INCAPER, 2008. 51-53 p.
17. BENEVIDES S. D.; RAMOS A. M.; STRINGHETA P. C.; CASTRO V. C. Qualidade da manga e polpa da manga Ubá. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, **28**, 571-578, 2008.
18. OLIVEIRA D. S.; MATA G. M. S. C.; LUCIA C. M. D.; CAMPOS F. M.; RIBEIRO S. M. R.; PINHEIRO-SANT'ANA H. M. Influência da embalagem e estocagem no conteúdo de betacaroteno e ácido ascórbico em suco de manga "Ubá" industrializado. *Acta. Sci. Health. Sci.*, **32**, 191-198, 2010.
19. MATA, G. M. S. C., OLIVEIRA, D. D. S., DELLA LUCIA, C., CAMPOS, F. M., QUEIROZ, J. H. D., & PINHEIRO-SANT'ANA, H. M. Teores de  $\beta$ -caroteno e vitamina C durante o amadurecimento da manga" UBÁ"(*Mangifera indica* L. var. Ubá). *Rev. Inst. Adolfo Lutz (Impr.)*, **70**, 225-229, 2011.
20. RIBEIRO S. M. R.; BARBOSA L. C. A.; QUEIROZ J. H.; KNÖDLER M.; SCHIEBER A. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango (*Mangifera indica* L.) varieties. *Food Chem.*, **110**, 620-626, 2008.
21. SIVAKUMAR D; JIANG Y; YAHIA E. M. Maintaining mango (*Mangifera indica* L.) fruit quality during the export chain. *Food Res. Int.*, **44**, n. 5, 1254-1263, 2011.
22. MEDINA J. C; BLEINROTH E. W; MARTIN Z. J; QUAST D. G; HASHIZUME T; FIGUEIREDO N. M. S; MORETTI V. A; CANTO W. L; NETO L. C. B. **Manga: da cultura ao processamento e comercialização.** 1ºEd. Campinas – SP:

- Instituto de tecnologia de alimentos (ITAL), 1981. In: DOLLHOJO E. T; ABREU C. M. P; ASMAR S. A; HOJO R. H; CÔRREA. A. D; BOAS E. V. B. V. Qualidade de mangas´ Palmer´ tratadas com 1-metilciclopropeno e armazenadas sob refrigeração. *Rev. Bras. Frutic.*, **31**, 28-38, 2009.
23. SILVA B; FIORAVANTE A. P; LAJOLO F. M; CORDENUNSI B. R. Evolução dos teores de amido e açúcares solúveis durante o desenvolvimento e amadurecimento de diferentes cultivares de manga. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **23**, 116-120, 2003.
  24. SANTOS L. O. **Conservação pós-colheita de mangas produzidas na região de Jaboticabal-SP.** Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Jaboticabal-SP, 2008. 40p.
  25. WANG, H; CAO, G; PRIOR, R.L. Total antioxidant capacity of fruits. *J. Agric. Food Chem.***44**.701-705, 1996.
  26. BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutr. Rev.* **56**(11). 317-333, 1998.
  27. KAUR C; KAPOOR H.C. Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *Int. J. Food Sci. Technol.* **37**. 153-161, 2002.
  28. GHOSH S; CHISTI Y; BANERJEE U. C. Production of shikimic acid. *Biotechnol. Adv.* **30**. 1425–1431, 2012.
  29. SIMÕES C. M. O; SCHENKEL E. P; GOSMANN G; MELLO J. C. P; MENTZ L. A; PETROVICK P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6° Ed. Porto Alegre – RS, Editora da UFRGS, 2010. 519p.
  30. BERARDINI N; CARLE R; SCHIEBER A. Characterization of gallotannins and benzophenone derivatives from mango (*Mangifera indica* L. cv.‘Tommy Atkins’) peels, pulp and kernels by high- performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **18**. 2208-2216, 2004.
  31. SCHIEBER A; BERARDINI N; CARLE R. Identification of flavonol and xanthone glycosides from mango (*Mangifera indica* L. Cv.‘Tommy Atkins’) peels by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **51**. 5006-5011, 2003.
  32. SILVERSTEIN R. M; WEBSTER F. X; KIEMLE D. J. **Spectrometric identification of Organic Compounds.** 7° Ed. Danvers: John Wiley & Sons, 2005. 2-60p.

33. HOFFMANN E; STROOBANT V. **Mass Spectrometry: Principles and Applications**. 3° Ed. London, John Wiley & Sons, 2007. 85-164p.
34. COLE R. B. Some tenets pertaining to electrospray ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, **35**. 763-772, 2000.
35. MILLER P. E; DENTON M. B. The quadrupole mass filter: basic operating concepts. *J. Chem. Educ.*, **63**. 617-22, 1986.
36. **Fourier Transform Ion Cyclotron – Mass Spectrometry**. Disponível em: [http://people.whitman.edu/~dunnivm/C\\_MS\\_Ebook/CH5/5\\_5\\_6.html](http://people.whitman.edu/~dunnivm/C_MS_Ebook/CH5/5_5_6.html). Acessado em 21 de outubro de 2015.
37. THURMAN, E.M.; MILLS, M.S. **Solid-phase Extraction: principles and practice**. 1° Ed. Nova York, John Wiley & Sons, 1998. 38-69p.
38. **Solid Phase Extraction Products**. Disponível em: [www.sigma-aldrich.com/spe](http://www.sigma-aldrich.com/spe). Acessado em 28 de outubro de 2015.
39. POCINHO M; FIGUEIREDO J. P. **Estatística e bioestatística**. 1° Ed. Coimbra–PT, Instituto Superior Miguel Torga, 2004. 119-124.
40. **Teste de Tukey (TSD-Tukey Significant Difference)**. Disponível em: <http://www.portalaction.com.br/anova/31-teste-de-tukey>. Acessado em 03 de setembro de 2015.
41. O que é o câncer? Disponível em: [http://www1.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=322](http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322). Acessado em 25 de novembro de 2015.
42. WATTEENBERG L. W. Chemoprevention of cancer. *Cancer Res.*, **45**. 1 - 8, 1985.
43. MORSE, M. A; STONER G. D. Cancer chemoprevention: principles and prospects. *Carcinogenesis*, **14**. 1737 - 1746, 1993.
44. SPORN M. B; SUH. N. Chemoprevention of cancer. *Carcinogenesis*. **21**. 525 - 530, 2000.
45. KINGHORN A. D; SU B. N; JANG D. S; CHANG L. C; LEE D; GU J. Q; CARCACHEBLANCO E. J; PAWLUS A. D; LEE S. K; PARK E. J; CUENDET M; GILLS J. J; BHAT K; PARK H. S; MATA-GREENWOOD E; SONG L. L; JANG M; PEZZUTO J. M. Natural inhibitors of carcinogenesis. *Planta Med.* **70**. 691 - 705, 2004.
46. KELLOFF G. J; BOONE C. W; STEELE V. E; FAY J. R; LUBET R. A; CROWELL J. A; SIGMAN C. C. Mechanistic consideration in chemopreventive

- drug development. *J. Cell. Biochem. Suppl.* **20**. 1 - 24, 1994.
47. 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.
48. TALALAY P. Mechanisms of induction of enzymes that protect against chemical carcinogenesis. *Adv. Enzyme Regul.* **26**. 237 - 250, 1989.
49. 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.
50. GERHÄUSER C; YOU M; LIU J; HAWTHORNE M; METHA R. G; MOON R; PEZZUTO J. M. Cancer chemopreventive potential of sulforamate, a novel analogue of sulforaphane that induces phase 2 drug-metabolizing enzymes. *Cancer Res.* **57**. 272 – 278, 1997.
51. LI R; BIANCHET M. A; TALALAY P; AMZEL L. M. The three-dimensional structure of NAD(P)H: quinone reductase, a flavoprotein involved in cancer chemoprevention and chemotherapy: mechanism of the two-electron reduction. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **92**. 8846 - 8850, 1995.
52. KANG Y. H; PEZZUTO J. M. Induction quinone reductase as a primary screen for natural product anticarcinogens. *Methods Enzymol.* **382**. 380 - 415, 2004.
53. 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 UFMG. Belo Horizonte – MG, 2007. 52p.
54. GROSS H. B; DALEBOUT T; GRUBB C. D; ABEL S. Functional detection of chemopreventive glucosinolates in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science.* **159**. 265–272, 2000.
55. FAHEY J. W; DINKOVA-KOSTOVA A. T; STEPHENSON K. K; TALALAY PAUL. The “Prochaska” Microtiter Plate Bioassay for Inducers of NQO1. *Quinones and Quinone Enzymes, Part B. Academic Press.* **382**. 243–258, 2004.
56. 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 - 591.

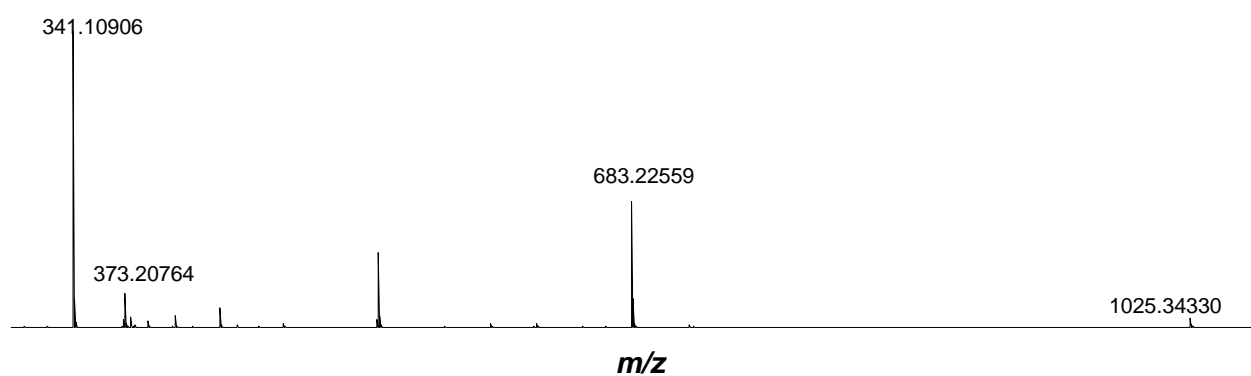
57. TALCOTT S. e TALCOTT S. **Phytochemical Attributes Contribute to the Health-Promoting Benefits of Mangos. Final Research Report to the National Mango Board.** Texas A&M University, Department of Nutrition and Food Science. 2009.
58. BRASIL. **Farmacopéia Brasileira IV.** São Paulo – SP, Atheneu, 2002.
59. BERNIZ, P. J. **Avaliação industrial de variedades de manga (*Mangifera indica* L.), para elaboração de néctar.** Dissertação de Mestrado. Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa - MG, 1984. 57p.
60. NAMBI V. E. K; 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.Hort.*, **193**. 90–98, 2015.
61. RIVERA N. V; BLASCO J; PÉREZ J. C; DOMÍNGUEZ G. C; PEREA-FLORES M. J. P; VÁZQUEZ I. A; CUBERO S; REBOLLO R. F. Computer Vision System Applied to Classification of “Manila” Mangoes During Ripening Process. *Food Bioprocess Technol.* **7**. 1183-1794, 2014.
62. NASSUR R. C. M. R. **Indicadores de qualidade em mangas durante o amadurecimento.** Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras. Lavras – MG, 2013. 15p.
63. PERES L. E. P. Metabolismo secundário das plantas. Disponível em: <http://www.oleos essenciais.org/metabolismo-secundario-das-plantas/Acessado em: 22/07/2015>.
64. SIVAKUMAR D; JIANG Y; YAHIA E. M. Maintaining mango (*Mangifera indica* L.) fruit quality during the export chain. *Food Res. Int.* **44**, n. 5, 1254-1263, 2011.
65. AINA J. O. Physico-chemical changes in African mango (*Irvingia gabonensis*) during normal storage ripening. *Food Chem.* **36**, n. 3, 205-212, 1990.
66. SALMINEN J. P; OSSIPOV V; LOPONEN J; HAUKIOJA E; PIHLAJA K. Characterization of hydrolysable tannins from leaves of *Betula pubescens* by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* **864**, n. 2, 283-291, 1999.
67. PIERSON J. T; MONTEITH G. R; ROBERTS T. S. J; DIETZGEN R. G; GIDLEY M. J; SHAW P. N. Phytochemical extraction, characterisation and comparative

- distribution across four mango (*Mangifera indica* L.) fruit varieties. *Food chem.*, **149**, 253-263, 2014.
68. AROGBA S. S. Mango (*Mangifera indica*) kernel: chromatographic analysis of the tannin, and stability study of the associated polyphenol oxidase activity. *J. Food Comp. Anal.*, **13**, n. 2, 149-156, 2000.
69. CORBETT S; DANIEL J; DRAYTON R; FIELD M; STEINHARDT R; GARRETT N. Evaluation of the anti-inflammatory effects of ellagic acid. *J Perianesth. Nurs.*, **25**, n. 4, 214-220, 2010.
70. BESERRA A. M. S. E. S; CALEGARI P. I; SOUZA M. D. C; DOS SANTOS R. A. N; LIMA J. C. D. S; SILVA R. M; MARTINS D. T. D. O. Gastroprotective and ulcer-healing mechanisms of ellagic acid in experimental rats. *J. Agric. Food Chem.*, **59**, n. 13, 6957 - 6965, 2011.
71. WARPE V. S; MALI V. R; ARULMOZHI S; BODHANKAR S. L; MAHADIK K. R. Cardioprotective effect of ellagic acid on doxorubicin induced cardiotoxicity in wistar rats. *Acute Med.*, **5**, n. 1, 1 - 8, 2015.
72. PRIYADARSINI K. I; KHOPDE S. M; KUMAR S. S; MOHAN H. Free radical studies of ellagic acid, a natural phenolic antioxidant. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, n. 7, 2200 - 2206, 2002.
73. DORTA E; GONZÁLEZ M; LOBO M. G; SÁNCHEZ-MORENO C; DE ANCOS B. Screening of phenolic compounds in by-product extracts from mangoes (*Mangifera indica* L.) by HPLC-ESI-QTOF-MS and multivariate analysis for use as a food ingredient. *Food Res.Int.*, **57**, 51 - 60, 2014.
74. ARBOS K. A; STEVANI P. C; DE FÁTIMA C. R. Atividade antimicrobiana, antioxidante e teor de compostos fenólicos em casca e amêndoa de frutos de manga. *Rev. Ceres*, **60**, n. 2, 161 - 165, 2013.
75. ENGELS C; GÄNZLE M. G; SCHIEBER A. Fast LC-MS analysis of gallotannins from mango (*Mangifera indica* L.) kernels and effects of methanolysis on their antibacterial activity and iron binding capacity. *Food Res. Int.*, **45**, n. 1, 422 - 426, 2012.
76. BRUNETON J.; Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia, Ed. Acribia, SA: Espanha, 1991. In: MONTEIRO J. M. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. *Quím. Nova*, **28**, n. 5, 892, 2005.
77. CANUTO, K. M. Propriedades químicas e farmacológicas de mangiferina: um composto bioativo de manga (*Mangifera indica* L.). Embrapa Semi-Árido.

Documentos, 2009.

78. GHOSH S; CHISTI Y; BANERJEE U. C. Production of shikimic acid. *Biotechnol. Adv.*, **30**, 1425–1431, 2012.
79. PALAFOX-CARLOS H; YAHIA E; ISLAS-OSUNA M. A; GUTIERREZ-MARTINEZ P; ROBLES-SÁNCHEZ M; GONZÁLEZ-AGUILAR G. A. Effect of ripeness stage of mango fruit (*Mangifera indica* L., cv. Ataulfo) on physiological parameters and antioxidant activity. *Sci. Hort.*, **135**, 7-13, 2012.

## ANEXO



**Anexo 1.** ESI (-) FT – ICR MS de uma solução com padrão de sacarose (20% m/V) dopada com 5  $\mu$ l de solução dopante de glicose deuterada D-Glicose-1,2,3,4,5,6,6-d<sub>7</sub> ( $5 \times 10^{-3}$  mol/l).