UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA

Ressonância Magnética Nuclear e quimiometria como ferramentas de distinção e quantificação de metabólitos de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) e feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*)

ELENILSON DE GODOY ALVES FILHO

Orientador: Prof. Dr. Luciano Morais Lião

Goiânia-GO

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA

Ressonância Magnética Nuclear e quimiometria como ferramentas de distinção e quantificação de metabólitos de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) e feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*)

ELENILSON DE GODOY ALVES FILHO

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Morais Lião

Goiânia-GO

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
GPT/BC/UFG

A474r

Alves Filho, Elenilson de Godoy.
Ressonância Magnética Nuclear e quimiometria como ferramentas de distinção e quantificação de metabólitos de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) e feijão-comum (*Phaseolus vulgaris)* [manuscrito] / Elenilson de Godoy Alves Filho. - 2010.
40 f. : il., figs, tabs.

Orientador: Prof. Dr. Cleomar de Sousa Rocha.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química, 2010.
Bibliografia.
Inclui lista de figuras, tabelas, abreviaturas e símbolos.

1. Ressonância Magnética Nuclear. 2. Cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*). 3. Feijão comum *Phaseolus vulgaris)*. I. Título.

CDU:543.429.23:633.35

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora de Dissertação de Mestrado em Química, apresentada ao Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, em 11/06/2010.

Comissão Julgadora:

_____
Prof. Dr. Luciano Morais Lião / UFG

_____
Prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira **/** UFSCar

_____
Prof. Dr. Priscila Zaczuk Bassinello **/** EMBRAPA

DEDICATÓRIA

Presto uma homenagem e dedico este estudo a minha avó *Maria Stival Campos*, “Nem sei por que você se foi, quantas saudades eu senti, e de tristeza vou viver, e aquele adeus que não pude dar. Você marcou em minha vida, viveu, morreu na minha história...”

“*Só aquele que domina as dificuldades alcança progresso grandioso*.”
minha avó Elvira Alves de Godoy

AGRADECIMENTOS

Agradeço primordialmente a Deus, pela chance e caminho guiado. Penhoradamente aos meus pais Elenilson e Rosângela, irmãos Danuza e Pedro e afilhado Luiz Henrique por todo amor, carinho, auxílio, dedicação e atenção que me ascendeu nesta caminhada. A minha avó Elvira, que sempre se dedicou aos meus estudos, com toda atenção, inspiração e vontade de minha vitória. A minha noiva Lorena, pelo grandioso amor e a imprescindível contribuição e apoio nas horas de necessidade. Aos meus orientadores, por tudo que me transmitiram e pelo que ainda me ajudam a crescer. Aos meus colegas do laboratório de RMN pela contribuição nas pesquisas e conhecimento. Espero que o carinho, respeito, amizade que dedico a vocês evidenciem minha eterna gratidão. Fico grato também, ao MCT/FINEP/CT-INFRA, CNPq e a CAPES pelo apoio financeiro, a EMBRAPA Arroz e Feijão e a ESALQ pela aquisição das amostras.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVEATURAS E SÍMBOLOS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACTS	xi
	v
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Feijão comum e seu consumo na alimentação humana	2
1.2. Produção e aspectos econômicos da cana-de-açúcar	5
1.3. Histórico e aplicações da Ressonância Magnética Nuclear	8
1.4. Análises Estatísticas Multivariadas	12
2. OBJETIVOS	17
PARTE I – Feijão	18
3. EXPERIMENTAL	18
3.1. Origem e preparo das amostras	18
3.2. Espectros de RMN de ^{1}H	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1. Dados espectrais	22
4.2. Quantificação dos oligossacarídeos	34
PARTE II – Cana-de-açúcar	42
5. EXPERIMENTAL	42
5.1. Origem e preparação das amostras	42
5.2. Espectros de RMN de ^{1}H	42
5.3. Análise dos dados	43
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
6.1. Dados espectrais para a análise multivariada	45
6.2. Análise quimiométrica dos dados de RMN de ^{1}H para distinção dos cultivares de cana-de-açúcar	48
7. CONCLUSÃO	60
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Relação estrutural dos oligossacarídeos. 5

Figura 2. Plantio da cana-de-açúcar. 6

Figura 3. Linhas de força devidas a um núcleo magnético. 9

Figura 4. Pré-processamento dos dados para cada variável que estão representadas por uma barra de variância e seu centro, com (A) dados sem tratamento, (B) resultado após a centralização em torno da média, (C) resultado após o escalonamento. 16

Figura 5. Feijões em estudo. 18

Figura 6. Cozedor de Mattson de 25 hastes. 20

Figura 7. A: espectros do feijão Jalo Precoce cru, após imersão e após cozimento, adquiridos na sonda HR-MAS; espectros dos extratos da imersão e processamento doméstico de cocção (cozimento), adquiridos na sonda TBI. 23

Figura 8. A: espectros do feijão Pérola cru, após imersão e após cozimento, adquiridos na sonda HR-MAS; B: espectros dos extratos da imersão e processamento doméstico de cocção (cozimento), adquiridos na sonda TBI. 24

Figura 9. A: espectros do feijão Radiante cru, após imersão e após cozimento, adquiridos na sonda HR-MAS; B: espectros dos extratos da imersão e processamento doméstico de cocção (cozimento), adquiridos na sonda TBI. 25

Figura 10. A: espectros do feijão Supremo cru, após imersão e após cozimento, adquiridos na sonda HR-MAS; B: espectros dos extratos da imersão e processamento doméstico de cocção (cozimento), 26

adquiridos na sonda TBI.

Figura 11. A: espectros do feijão Tesouro cru, após imersão e após cozimento, adquiridos na sonda HR-MAS; B: espectros dos extratos da imersão e processamento doméstico de cocção (cozimento), adquiridos na sonda TBI. 27

Figura 12. HSQC, espectro de correlações heteronucleares, carbono e hidrogênio, a uma ligação, da rafinose. 29

Figura 13. HMBC, espectro de correlações heteronucleares, carbono e hidrogênio, a longa distância, da rafinose. 30

Figura 14. Espectros dos padrões de rafinose, estaquiose e verbascose. 32

Figura 15. Espectros de feijão Jalo Precoce sem e com a adição do padrão de verbascose. 33

Figura 16. Espectro de RMN de ^{1}H do feijão Jalo Precoce com o $H_{anomérico}$ da rafinose (δ 5.42), que integra para 1.93, estaquiose e verbascose (δ 5.44), que integram para 1.00, proporcionais ao sinal do TMSP-d_4 (δ 0.00), com a integral igual a 1.00 para todos os espectros. 33

Figura 17. Quantidade dos oligossacarídeos em diferentes formas de extração. 36

Figura 18. Ampliações e comparações dos sinais nos espectros dos feijões no estado cru e após o cozimento. 38

Figura 19. Comparação dos sinais dos hidrogênios anoméricos dos feijões (a) em seu estado cru e (b) após o cozimento (ampliação em oito vezes). 39

Figura 20. Curva de calibração com a concentração da rafinose na solução de D_2O/TMSP-d_4 versus $\mathbf{I}_{rafinose}$. 41

Figura 21. Comparação da resolução espectral entre as sequências de pulsos ZGCPPR e CPMG para a cana-de-açúcar. 46

Figura 22. Espectro de RMN das folhas da cana-de-açúcar obtidos nas sonda HR-MAS (A) e na sonda TBI – em solução (B). 47

Figura 23. Visualização dos espectros de RMN HR-MAS empregados 48

na análise quimiométrica para cana-de-açúcar.

Figura 24. Visualização dos espectros de RMN em solução empregados na análise quimiométrica para cana-de-açúcar. 49

Figura 25. Gráfico de HCA de todas as amostras de cana no estado semi-sólido, com um índice de similaridade de 0.140. 50

Figura 26. Gráfico de HCA de todas as amostras de cana no estado líquido, com um índice de similaridade de 0.240. 51

Figura 27. Escores da PCA das oito cultivares de cana-de-açúcar adquiridos pelas sondas (A) HR-MAS e (B) TBI – em solução (B). 53

Figura 28. Expansão dos espectros de RMN de ^{1}H dos sinais dos anoméricos das amostras de cana-de-açúcar (A) RB855453, (B) RB835054 e (C) RB835486 obtidos na sonda HR-MAS, específica para análises de semi-sólidos. 55

Figura 29. Expansão dos espectros de RMN de ^{1}H dos sinais dos anoméricos das amostras de cana-de-açúcar (A) RB855453, (B) RB835054 e (C) RB835486 obtidos na sonda TBI, específica para análises em solução. 57

Figura 30. Curva de variância *versus* componentes principais, extraída da análise de PCA de todas as amostras de cana estudadas através da sonda HR-MAS. 58

Figura 31. Curva de variância *versus* componentes principais, extraída da análise de PCA de todas as amostras de cana estudadas através da sonda TBI. 59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características nutricionais do feijão comum. 3

Tabela 2. Concentrações dos oligossacarídeos nos feijões em seus estados cru e após a imersão. 35

Tabela 3. Concentrações dos oligossacarídeos adquiridas dos extratos aquosos oriundos da imersão e cozimento. 36

Tabela 4. Medidas dos tempos médios de cocção das cultivares de feijão obtidas no cozedor de Mattson de 25 hastes. 40

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

2D	Bidimensional
AQ	Tempo de aquisição
B_0	Campo magnético estático de um espectrômetro
CPMG	Sequência Carr-Purcell-Meiboom-Gill
d_1	Tempo de espera entre cada aquisição
D_2O	Água deuterada
DMSO-d_6	Dimetilsulfóxido hexadeuterado
FID	Decaimento Livre de Indução
HCA	Análise Hierárquica de Cluster
HR-MAS	High Resolution – Magic Angle Spinning
Hz	Hertz
δ	Deslocamento químico
IV	Infravermelho
Lb	Fator utilizado na multiplicação exponencial
NS	Número de espectros acumulados
PC	Componentes Principais
PCA	Analise dos Componentes Principais
R	Coeficiente de Correlação Linear
RB	República do Brasil
Rf	Radiofreqüência
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SI	Número de pontos no processamento
T	Tesla
T_2	Tempo de relaxação transversal ou spin-spin
TBI	Triple Broad Band Inverse
TD	Número de pontos na aquisição
TMSP-d_4	Propianato de trimetilsilil tetradeuterado
UV	Ultravioleta
ZGCPPR	Sequência de pulso para supressão de sinal
ASCII	American Standart Code for Information Interchange

RESUMO

O estudo de cinco diferentes cultivares de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) nas condições crua, após a imersão em água (molho) e após o processamento doméstico de cocção (cozimento), através da RMN em solução e RMN HR-MAS, foi realizado com vistas ao estabelecimento de um protocolo de quantificação dos oligossacarídeos rafinose, estaquiose e verbascose em sementes de feijão. Esse estudo vem ao encontro dos objetivos da Embrapa – Arroz e Feijão que busca a produção de sementes de feijão com baixo teor desses oligossacarídeos.

Essa dissertação descreve ainda a potencialidade das análises quimiométricas aplicadas em RMN de ^{1}H adquiridas nas sondas para análises de amostras semi-sólidas (heterogêneas) e em solução, para a investigação de variedades de cana. A cana-de-açúcar é a matéria primordial utilizada no Brasil para a produção do biocombustível etanol. Várias tecnologias para o desenvolvimento de novos cultivares de cana centram-se, principalmente, no aumento de produtividade e maior resistência a doenças. Cultivares de cana-de-açúcar são normalmente identificadas pela organografia das folhas e caules, bem como a análise das atividades da peroxidase e da isoenzima esterase, proteínas solúveis totais e teor de sólidos solúveis. Nesse estudo, oito diferentes folhas de variadas cultivares de cana-de-açúcar foram estudadas: RB72454, RB835054, RB835486, RB855113, RB855156, RB855453, RB855536 e RB867515. A RMN e as análises quimiométricas se mostraram como ferramentas úteis para a distinção de cultivares de cana. Além disso, estas técnicas demonstraram, com sucesso, as diferenças químicas sobre as cultivares investigadas, especialmente no teor de açúcar.

ABSTRACTS

Five different common beans cultivars (*Phaseolus vulgaris*) in the raw conditions, after water immersion (soaking) and after domestic processing (cooking), were studied by NMR in solution and HR-MAS NMR, to obtain a protocol that quantify the oligosaccharides raffinose, stachyose and verbascose contents in bean seeds. The looking for low contents of these oligosaccharides in bean seeds is inserted in Embrapa – Arroz e Feijão objectives.

This study describes yet the potentiality of chemometric analysis applied in ^{1}H HR-MAS NMR and in solution NMR for investigation of sugarcane varieties. Sugarcane is a primordial material used in Brazil for production of ethanol biofuel. Several technologies to development of new sugarcane cultivars have mainly focused the increase of productivity and greater disease resistance. Sugarcane cultivars are usually identified by organography of leaves and stems, as well as the analysis of peroxydase and esterase isoenzyme activities, soluble total protein and soluble solids content. In this work eight different cultivars of sugarcane leaves were analyzed: RB72454, RB835054, RB835486, RB855113, RB855156, RB855453, RB855536 and RB867515. NMR and chemometric analysis showed useful tools for distinction of the different sugarcane cultivars. In addition, these techniques successfully demonstrated the chemical differences about the investigated cultivars, specially the sugar contents.

INTRODUÇÃO

Nos últimos tempos, tem-se realizado uma grande variedade de pesquisas com o objetivo de melhorar geneticamente vegetais de grande interesse comercial, visando uma maior qualidade e aumento de produção. Esse melhoramento genético é importante, pois estudos têm correlacionado a alimentação da população com problemas causados no funcionamento do sistema gastrintestinal, originários de uma dieta de baixa qualidade ou ingestão de alimentos de baixa digestão. Com isso, muitos alimentos são classificados como portadores de compostos que levam pessoas a intolerâncias, como por exemplo: azia, náusea, vômito, regurgitação, gastrite, úlcera péptica, dor abdominal, prisão de ventre, incontinência fecal, apendicite, diarréia, inflamação hemorroidal, fezes ácidas e flatulências (POTER, *et al*., 2008). A produção de cultivares mais resistentes a fatores externos, como clima e insetos predadores, ou mais apropriados para produção industrial é ainda um outro benefício causado pelo melhoramento genético, pois resultará em diminuição dos custos de produção, aumentando o acesso da população de baixa renda (HARRISON & DAVIS, 1986).

Dentre esses alimentos, podem ser citados os grãos de leguminosas, que possuem um importante papel na dieta tradicional de muitos povos em todo mundo. Entretanto, uma parte dos nutrientes existentes nestes grãos nem sempre é aproveitada pelo consumidor devido à presença de fatores antinutricionais, como por exemplo, os fitatos e os taninos. Este tipo de alimento contém uma variedade de fatores antinutricionais que podem provocar efeitos fisiológicos adversos ou diminuir a biodisponibilidade de certos nutrientes (ALLI, 1981).

O papel dos antinutrientes tem sido rediscutido, em função de descobertas recentes que evidenciam o potencial de algumas dessas substâncias em exercer funções benéficas no organismo humano. Como exemplo, cita-se a habilidade do ácido 1,2,3,4,5,6-hexaquis (diidrogênio fosfato) mio-inositol, o ácido fítico, em atuar como anticarcinogênico, antioxidante e prestar contribuição nutricional no tratamento de diabetes, através da ação inibidora de α-amilases, mostrando a diversidade de

atuação dessas substâncias. Porém, este ácido possui forte potencial quelante, podendo complexar-se com minerais, como cálcio, ferro e zinco, e com proteínas, comprometendo a digestibilidade das mesmas. Os taninos são antioxidantes, inibidores de determinadas enzimas e influenciam negativamente a digestibilidade de proteínas (OLIVEIRA, 2001; GUILLON, 2002).

1.1 – Feijão comum e seu consumo na alimentação humana

Das sementes da família das leguminosas, o feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é classificado como um alimento básico em vários países, constituindo-se em uma importante fonte de proteína, carboidrato, fibra e micronutrientes (DESHPANDE, 1992). Pode-se afirmar que é uma das principais fontes de proteínas, especialmente para a população mais carente. Contudo, tornam-se imprescindíveis pesquisas para se determinar a qualidade nutricional das cultivares de feijão comum disponíveis no mercado, ou daquelas que ainda estão em fase de testes, viabilizando, com isso, o lançamento de novas cultivares deste tipo de feijão (FARIA *et al*., 1988).

O gênero *Phaseolus* compreende todas as espécies do feijão, sendo que a mais conhecida é a *Phaseolus vulgaris* L., possuindo várias variedades, como o feijão preto, mulatinho, carioca, roxo, comum, dentre inúmeras outras. Os países orientais utilizam o feijão tipo Adzuki, que pertence à espécie *Phaseolus angularis*, e vários países do continente africano e asiático consomem a variedade Lima, pertencentes às espécies *Phaseolus lunatos* e *Phaseolus limenses* (KANAMORI *et al*., 1982).

O feijão comum é um vegetal anual, propagado pela semente e cultivado com fins alimentares desde a pré-história. Esta qualidade de feijão é a espécie mais difundida no Brasil, possuindo seu caule fino e ereto, podendo atingir até 60 centímetros de altura, ou trepadeira de até três metros de comprimento, com folhas alternadas, pecioladas, estipuladas de três folíolos peciolados, e flores podendo ser brancas, branco-amareladas, lilacíneas ou roxas, de até 25 milímetros, dispostas em ramos axilares. Seu

fruto é uma vagem linear de até 15 centímetros de comprimento, contendo numerosas sementes reniformes, tendo coloração uniforme (variedade *unicolor*) ou com mácula de outra cor (*maculatus*), ou com manchas pequenas (*pardimus*) ou com linhas desiguais cruzadas (*variegatus*) (DESHPANDE, 1992).

No entanto, o feijão comum possui alguns atributos indesejáveis, os quais podem ser removidos ou eliminados para sua melhor utilização (SATHE *et al.*, 1984). Na Tabela 1 apresentam-se algumas das principais características nutricionais dessa qualidade do feijão.

Tabela 1 – Características nutricionais do feijão comum.

FATORES POSITIVOS	Alto conteúdo de proteína Alto conteúdo de lisina Excelente complementação protéica para os grãos de cereais
FATORES LIMITANTES	Fatores físicos: difícil cozimento Substâncias antifisiológicas: compostos polifenólicos, hemaglutininas, inibidores de tripsina, ácido fítico, fatores de flatulência Fatores nutricionais: deficiência de aminoácidos sulfurados, baixa digestibilidade protéica

Fonte: Bressani, 1981 *apud* Chiaradia, 1997.

Estudos mostraram que além dos fatores antinutricionais, a conformação da estrutura primária das proteínas do feijão também contribui para redução do seu valor biológico (NIELSEN, 1991). A baixa digestibilidade das proteínas dos feijões foi explicada por várias causas,

existindo fatores ligados à casca, onde estão os taninos, e aos cotilédones, onde existem as proteínas, taninos, fitatos e inibidores de proteases, e ao processamento de armazenamento (BRESSANI, 1993). Acredita-se que com a retirada da casca, aumenta-se a digestibilidade protéica do feijão, pois alguns desses fatores antinutricionais são eliminados (PEREIRA, 1982).

Centenas de variedades do feijão comum já foram criadas com a fecundação cruzada para produção de cultivares aperfeiçoadas e por sua ampla difusão por todo mundo. Suas sementes são compostas basicamente de proteínas (21 a 25%), de carboidratos, como oligossacarídeos e fitatos (58 a 64%), cerca de 11% de gordura, dentre outros. Com isso, afirma-se que esse alimento contém uma quantidade expressiva de carboidratos, que são formados pela ligação de dois a dez monossacarídeos covalentemente ligados através de ligações glicosídicas, sendo, neste caso, os chamados oligossacarídeos (BARAMPAMA & SIMARD, 1993; MEHRA & KELLY, 2006).

Em geral, as leguminosas são ricas em α-galactosídeos, constituindo oligossacarídeos como a rafinose, estaquiose e verbascose, cujas concentrações podem variar conforme o grau de maturação da planta, condições de cultivo, composição do solo, clima e variedade genética das sementes. Essas substâncias estão localizadas, preferencialmente, no tegumento das sementes, em concentrações que variam de 2 a 10% (matéria seca). Esses oligossacarídeos – esquematizados na Figura 1 – para serem hidrolisados necessitam de uma enzima específica, a α-galactosidase, ausente no trato gastrintestinal humano. Assim, não são completamente metabolizados e permanecem no intestino grosso sendo fermentados anaerobicamente por bactérias presentes, gerando gases (CO_2, H_2, CH_4 e traços de H_2S), causadores da flatulência e desconfortos abdominais. Nosso organismo, entretanto, possui enzimas para promover a hidrólise de outros oligossacarídeos ou polissacarídeos (REDDY & SALUNKHE, 1980).

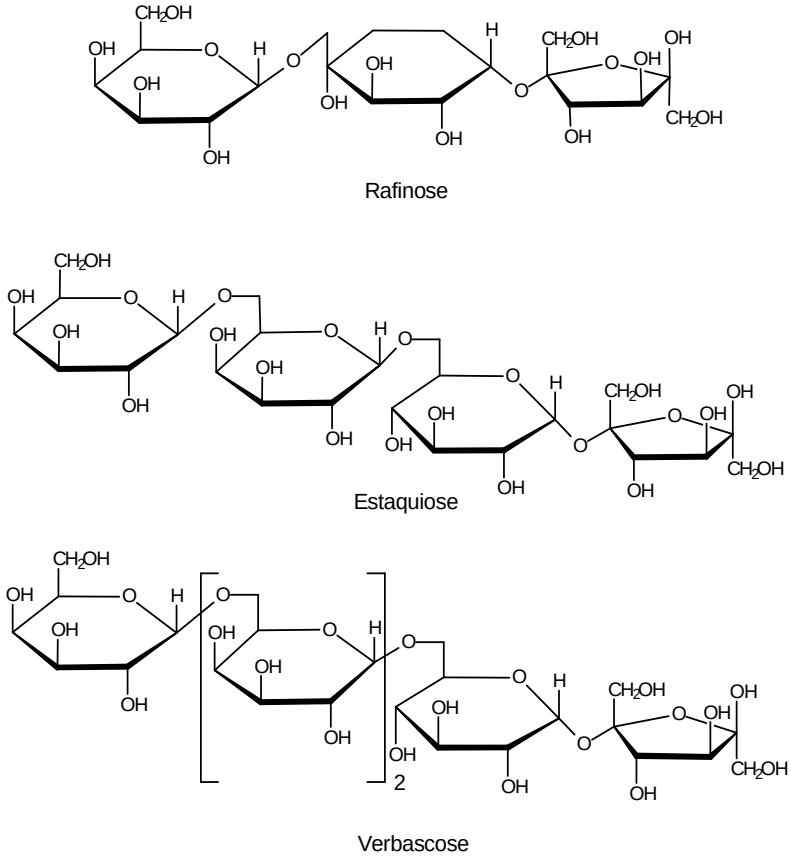

Figura 1 – Relação estrutural dos oligossacarídeos.

Estudos têm demonstrado que deixar os feijões em descanso em água parada e descartando essa água posteriormente, ou mesmo cozinhá-los em alta pressão são estratégias que minimizam a concentração desses oligossacarídeos causadores de problemas gastrintestinais (OLIVEIRA, 2001).

Existem fármacos que diminuem a intensidade da produção destes gases, que agem como um suplemento da α-galactosidase e sucrase, duas enzimas necessárias para a completa hidrólise dos oligossacarídeos. Desta forma, há a diminuição total ou parcial da fermentação anaeróbica e, consequentemente, inibindo a formação dos gases (HARDEE, 2002).

1.2 – Produção e aspectos econômicos da cana-de-açúcar

O melhoramento genético pode beneficiar ainda o aumento da produtividade de biocombustíveis, através do cultivo de cultivares de cana-

de-açúcar mais resistentes e melhores para produção. A cana-de-açúcar, ilustrada na Figura 2, é uma gramínea que pertence ao gênero *Saccharum* L., espécie *Saccharum officinarum*, sendo a principal matéria-prima para a fabricação do açúcar e para produção do biocombustível etanol. É uma planta da família *Poaceae*, possuidora de muitas outras culturas, como o milho, o sorgo, o arroz, dentre outras gramíneas. As principais características dessa família são a forma da inflorescência (espiga), o crescimento do caule (colmo), suas folhas como lâminas e bainha aberta. (LARSEN, 1969). A cana-de-açúcar é uma das culturas agrícolas de maior impacto econômico do mundo tropical, gerando centenas de milhares de empregos diretos e, com isso, sendo uma extraordinária fonte de renda e desenvolvimento, além de exercer um proeminente papel, tanto no mercado interno quanto no mercado externo. Pode ser afirmado que o Estado de São Paulo responde por cerca de 60% de todo o açúcar e álcool produzidos no país, além de representar aproximadamente 70% das exportações nacionais de açúcar (BRITO *et al*., 2009).

Figura 2 – Plantio da cana-de-açúcar.

Fonte - Instituto Agronômico de Campinas (IAC).

Movimentos políticos e econômicos revelaram entusiasmo pela utilização de biocombustíveis a partir de uma perspectiva global de redução de emissões de carbono causadas por fatores antropogênicos (GOLDEMBERG, 2007; NASS *et al*., 2007). O etanol, em particular, é o produto desse movimento devido ao balanço positivo de energia (GOLDEMBERG, 2007; BLOTTNITZ & CURRAN, 2007; MACEDO, 1998). Neste contexto, o Brasil implementou o programa de produção de etanol a partir da cana-de-açúcar (*Saccharum hybrid* SP.), o Pro-álcool, como uma resposta do governo militar para a crise do petróleo em 1973 (MOREIRA & GOLDEMBERG, 1999), que culminou no aumento da produção de álcool em trinta vezes, por meio da redução do custo de produção em 75%, aumentando o rendimento por hectare em 60% e a produção em 6% no ano (GOLDEMBER *et al*., 2004). Além disso, enquanto o etanol produzido a partir de outras fontes naturais, nos Estados Unidos e Europa, tem um custo de U$ 80 e U$ 55 por barril de óleo equivalente, respectivamente, este custo no Brasil foi de cerca de U$ 30 a U$ 35 (HAZELL, 2006).

Uma tonelada de cana-de-açúcar pode produzir até 80 litros de etanol, sendo que um hectare de terreno produz aproximadamente 88 toneladas de cana-de-açúcar, resultando num total de 7040 litros de etanol por hectare (RIDESA, 2009). O crescente sucesso do cultivo da cana-de-açúcar está relacionado, principalmente, ao programa de melhoramento genético de cultivares, onde um dos objetivos é desenvolver variedades adaptadas às características gerais e as condições edafoclimáticas de cultivo, para contornar problemas de ataque de patógeno que podem limitar a sua produção, bem como melhorar as características de produção industrial de variedades (HARRISON & DAVIS, 1986), por meio, por exemplo, do aumento da quantidade de açúcar (LESLIE & WILSON, 1997). Consequentemente, no final da década de 60, os programas de melhoramento genético foram instituídos no Brasil, que mais tarde, deram origem a um setor da rede inter-universitária para o desenvolvimento do etanol da cana (RIDESA, 2009). Estes programas têm desenvolvido e lançado novas cultivares de cana híbrida, com as iniciais RB (República do Brasil), dentre outras (LARSEN, 1969).

No entanto, com o advento do melhoramento genético, diversas variedades surgiram e a identificação botânica tornou-se cada vez mais difícil. Em 1969, Larsen mostrou que a manipulação genética representa a minimização da característica morfológica evidente e ampliação na diferenciação bioquímica para a planta. No caso da cana, esses cultivares são, geralmente, identificados visualmente pela organografia das folhas e caules, bem como a análise da relevância da atividade da esterase e solubilidade da peroxidase, proteínas totais e conteúdo de sólidos solúveis. Contudo, uma grande variedade de tecnologias para o desenvolvimento de novas cultivares da cana têm focado, principalmente, no aumento da produtividade e maior resistência às doenças (ALMEIDA *et al*., 1995).

1.3 – Histórico e aplicações da Ressonância Magnética Nuclear

Para o progresso dessas pesquisas citadas acima, a ressonância magnética nuclear (RMN) tem se configurado como uma valiosa ferramenta, uma vez que tem contribuído significativamente nas análises de misturas complexas em várias áreas, como alimentos, produtos industriais e biocombustíveis (WELJIE *et al*., 2008; MONTEIRO *et al*., 2009). Desde meados da década de 1990, a RMN vem demonstrando ser uma poderosa técnica para a determinação de propriedades estruturais, quantificações e identificações de vários compostos, sem alguns inconvenientes, como a decomposição, modificação da amostra, sua oxidação durante as análises, ou até perda total da matriz (MACOMBER, 1998). Além disso, quando comparada a outros métodos analíticos, como ultravioleta (UV), infravermelho (IV) ou cromatografia, a RMN de ^{1}H se apresenta como uma maneira rápida para análises, fornecendo mais informações sobre a amostragem, sem perda total ou parcial da amostra como, por exemplo, em análises cromatográficas (VALVERDE, J. & THIS, H., 2008).

A espectroscopia de RMN é semelhante às outras formas de espectroscopias, como IV e UV, sendo basicamente, outra forma de emissão de energia. (SILVERSTEIN *et al*., 2006). Esta forma de analisar, estudar e desvendar a estrutura atômica ou molecular foi verificada na década de 20,

por Gerlach e Stern, que com um feixe de átomos em um campo magnético não homogêneo constataram um desvio deste feixe conforme a orientação dos momentos magnéticos, devido aos elétrons. Com isso, Pauli sugeriu a existência de núcleos magnéticos, que se comportam como íntimos ímãs, como demonstrado na Figura 3 (GIL & GERALDES, 2002).

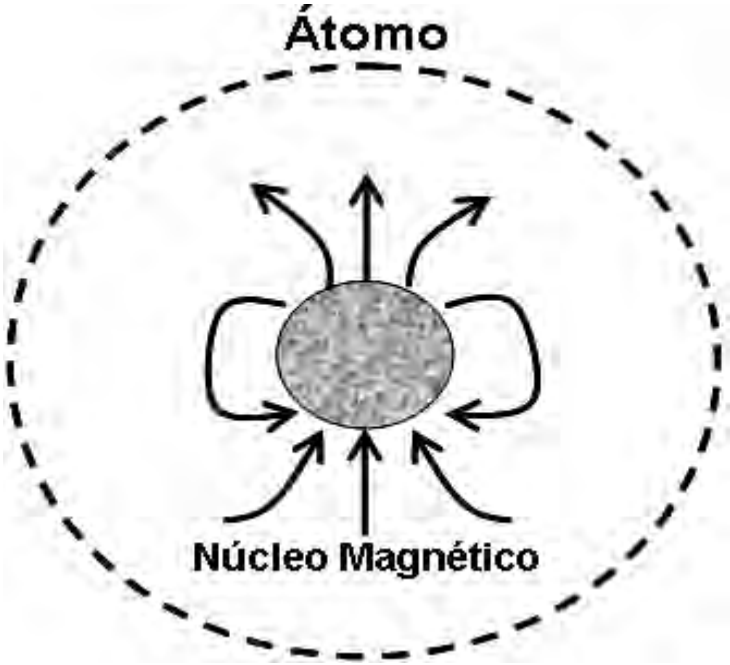

Figura 3 – Linhas de força geradas por um núcleo magnético.

Já nos anos 30, os aperfeiçoamentos da técnica de Stern e Gerlach permitiram a determinação de momentos magnéticos nucleares. Após este estudo, Rabi e seus colaboradores submeteram um feixe de hidrogênio, primeiro a um campo magnético não homogêneo e, depois, a um homogêneo, tudo ao mesmo tempo em que se aplicava radiação na radiofrequência (rf). Para certo valor da freqüência, foi observado que este feixe molecular absorvia energia e sofria um pequeno desvio (GIL & GERALDES, 2002).

Com isso, foi verificado que, sob condições apropriadas em um campo magnético, uma amostra pode absorver radiação eletromagnética em uma freqüência regida pelas características estruturais de cada amostra, tudo na região de *rf*. Esta absorção é função de determinados núcleos de molécula, o que se pode assegurar que espectros de RMN são resultados

demonstrados graficamente, com as frequências dos picos de absorção *versus* suas intensidades (SILVERSTEIN *et al*., 2006).

Este fenômeno veio a interessar os químicos no início dos anos 50, quando foi substituída água por etanol, como amostra. O desapontamento que Parckard e sua equipe sentiram quando foram verificados três sinais (devido aos núcleos de hidrogênios) ao invés de um só – como H_2O – foi a primeira indicação do enorme potencial da técnica RMN para estudos estruturais químicos (PAVIA *et al*., 1996).

Nos últimos tempos, a espectroscopia de RMN tem sido associada às técnicas de automação e, por outro lado, na associação com dados de outras técnicas e formação de hipóteses de estrutura e composição de amostras. Esta técnica tem se mostrado muito importante para a análise de misturas complexas em diversas áreas, como análises de características de combustíveis e biocombustíveis aliadas a quimiometria (MONTEIRO *et al*., 2009), estudo da qualidade alimentícia, para análise de metabólitos e de produtos industriais (WELJIE *et al*., 2008; LIN & SHAPIRO, 1996; WINDIG, *et al*., 2002), além do subsídio para classificação taxonômica de espécies de diversos reinos, já que diferentes espécies produzem diferentes metabólitos (SCHNEIDER, 2007; ALCANTARA *et al*., 2007). Portanto, a RMN representa tecnologia e recursos suficientes para análises reprodutíveis nas quais a identificação e quantificação de moléculas podem ser alcançadas.

Atualmente, esta técnica encontra diversas aplicações, tanto no que diz respeito à identificação, como na elucidação estrutural de substâncias, sendo incluso: as macromoléculas (polímeros e biopolímeros); o estudo da mobilidade e flexibilidade de moléculas; a cinética de reações químicas; no esclarecimento da estrutura de superfície de sólidos, especialmente em sua atuação como catalisadores; na determinação da composição e distribuição isotópica de elementos em relação à origem de amostras de interesse alimentar (COATES *et al*., 1999).

Pode-se afirmar que esta técnica se apresenta como único e versátil capaz de medir amostras no estado sólido, líquido e em seu estado heterogêneo (semi-sólido ou em suspensão) e gasoso (MITCHELL & COSTISELLA, 2007). Nenhum outro método espectroscópico contém informações detalhadas sobre a dinâmica estrutural e uma investigação

química em sistemas ou conjuntos de amostras. As vantagens também estão na preparação de amostras, que é rápida e simples, não é uma técnica destrutiva e é capaz de detecção simultânea de um grande número de componentes de baixa massa molecular em misturas complexas. Ainda, a RMN possibilita detectar diferentes núcleos espaciais em diferentes ambientes eletrônicos, tendo como resultado sua preferência para determinação de estruturas moleculares, bem como o estudo de interações moleculares em solução (ALCANTARA *et al*., 2006)

Com o desenvolvimento de espectrômetros de RMN de alto campo (500-1000 MHz) e a possibilidade de gerar espectros em duas (2D) ou várias dimensões, a RMN tornou-se um poderoso método de análise a nível molecular. O estudo de RMN em 2D de moléculas homo e heteronucleares, sequências de pulso para a supressão dos sinais mais fortes e sondas especiais, permitiu a caracterização de compostos menores ainda (SACCO *et al*., 1998)**.**

Existem técnicas distintas que são empregadas para o estudo de amostras nos seus diferentes estados físicos – líquidos, sólidos, semi-sólidos e gasoso. Para o caso de análises de amostras no estado semi-sólido, a técnica de RMN de Alta Resolução com Giro no Ângulo Mágico (HR-MAS) apresenta vantagens, como a de resolução do espectro de sólidos semelhante a dos líquidos. Contudo, a técnica de HR-MAS pode ser utilizada para o estudo de amostras heterogêneas, como análise direta de tecidos animais, vegetais e alimentos. A análise de RMN para estes tipos de materiais é difícil, devido à restrição na sua movimentação física e heterogeneidade da amostra, que pode degradar severamente a resolução espectral. No entanto, na HR-MAS, características típicas observadas para materiais sólidos, tais como: acoplamento dipolar entre *spins* nucleares, deslocamento químico anisotrópico e diferença de susceptibilidade magnética entre núcleos, são significativamente minimizados. Isto é atribuído à rápida rotação da amostra no ângulo mágico (54.7º), o que torna os espectros com resoluções semelhantes à de espectros de RMN de líquidos (ALCANTARA *et al*., 2007; SACCO *et al.*, 1998).

Entretanto, os experimentos de RMN são obtidos em termos de sequências de pulsos, que descrevem as séries de pulsos ou gradientes de

pulsos utilizados para interferir no estado de *spins* do núcleo atômico (CLARIDGE, 1999). Existem diferentes sequências nos pulsos compostos, como a sequência CPMG e ZGCPPR. A sequência de pulsos CPMG, foi desenvolvida para se determinar os tempos de relaxação transversal (T_2), possibilitando eliminar sinais alargados procedentes de moléculas com T_2 curto (macromoléculas), e assim, melhorando a visualização de seus sinais (CLARIDGE, 1979; PAVIA, 1996). Já na sequência ZGCPPR, acontece uma pré-saturação do sinal irradiado mediante uma contínua e seletiva irradiação de radiofreqüência e, com isso, eliminando a diferença de população dos estados de *spin* (JAMES, 1998).

A determinação do valor de d_1 para análises quantitativas de RMN é o fator mais importante, pois a relaxação insuficiente de alguns hidrogênios resulta na subestimação da quantidade de compostos presente nas amostras. Para um pulso de 90°, o d_1 somado ao tempo de aquisição (AQ) do sinal deve ser de até cinco vezes o T_1 máximo, onde T_1 máximo refere-se aos núcleos com o maior tempo de relaxação presentes na amostra, mas não necessariamente a partir da substância alvo (PAULI *et al*., 2005).

Contudo, um sério desafio em análises de RMN fica entre a capacidade técnica para geração de dados e a capacidade de interpretá-los. Com uma grande quantidade de informações fica difícil a sua interpretação, pois essa técnica possui muitos relacionamentos difíceis de serem observados, e para se encontrar e visualizar esses dados, são necessárias relações mais complexas, como técnicas quimiométricas para análises exploratórias e classificação das informações (PINTO, 2009, WARD, 2003).

1.4 – Análises Estatísticas Multivariadas

Aliadas a RMN, as técnicas quimiométricas têm sido usadas como uma ferramenta adicional para exploração de dados, como a análise exploratória (PCA – Principal Component Analysis), que permite a verificação dos dados originais e o consequente reconhecimento de amostras que não seguem certo padrão, determinação do conteúdo de informação de dados e busca das variáveis que definem os agrupamentos

melhores (PIROUETTE, 1990-2001; BEEBE *et al*., 1998). A análise multivariada é, a rigor, qualquer abordagem analítica que considere o comportamento de duas ou mais variáveis concomitantemente, num vasto campo do conhecimento, que envolve uma ampla multiplicidade de conceitos estatísticos e matemáticos (PEREIRA, 1999).

A quimiometria é uma ferramenta matemática para análise multivariada de dados, utilizando modelos estatísticos para se calcular e extrair informações a partir de um conjunto de dados. O desenvolvimento de modelos quimiométricos para uma variedade de resultados, basicamente, implica em uma intuitiva visualização dos dados ilustrados por meio de gráficos (MANLY, 1994).

Os primeiros espectros de RMN avaliados quimiometricamente foram em 1983, por Johnels. No início dos anos noventa, Gartland *et al*. introduziu a PCA para classificar prótons de RMN, feitos em espectros de urina. A quimiometria também foi aplicada desde o início de estudos de RMN em amostras no estado sólido (KOONS & ELLIS, 1995). Agora, esta ferramenta está, rapidamente, ganhando ímpeto em análises nestes tipos de espectros (KEUN *et al*., 2003; HALOUSKA & POWERS, 2006; STOYANOVA & BROWN, 2001).

A PCA, fundamentalmente, envolve um procedimento matemático que transforma um número de variáveis, possivelmente correlacionadas, em um número menor de variáveis descorrelacionadas, chamadas de componentes principais. Ela foi idealizada em 1901, por Karl Pearson, e agora, é mais utilizada como uma ferramenta de análise exploratória dos dados e para tornar modelos preditivos. Este modelo de análise envolve o cálculo do autovalor e uma decomposição de uma matriz de dados, normalmente, após centralização dos dados para cada atributo (SHAW, 2000; HIBBERT, 1993). Portanto, foi definida a PCA como uma transformação linear ortogonal que transporta os dados para um novo sistema de coordenadas, tal que a maior variância será definida como componente principal. Frequentemente, sua operação revela a estrutura interna dos dados de uma forma que mais bem explica a variância destes resultados. A análise de um conjunto de dados multivariados, visualizados como um conjunto de coordenadas com varias dimensões (um eixo por

variável), fornece ao usuário uma imagem de menor dimensão, mantendo as características de um conjunto de dados que mais contribuem para a sua variância, sendo mais fácil de adquirir informações reais (JOLLIFFE, 2002; GOLDBARG, 2000).

Na formação das componentes principais (PC), ocorre a decomposição da matriz original pela PCA, gerando duas matrizes menores, a matriz de escores e de pesos. A matriz de escores relaciona-se com a disposição das amostras no novo espaço vetorial e revela correlações entre as variáveis e a informação de quanto determinada variável contribui para a composição do novo eixo, bem como relações entre as variáveis originais estão embutidas nos pesos (MARTENS, 1989; OTTO, 1999).

Dentro da quimiometria, também foi criada a análise de agrupamentos, também conhecida como análise de conglomerados, classificação ou de Cluster (HCA – Hierarchic Clusters Analysis), que consiste em agrupar dados em conjuntos que têm atributos similares, apresentando-os de uma maneira que enfatize os agrupamentos naturais, analogamente à categorização taxonômica, realizada em ciências biológicas (VALENTIN, 2000). Assim, as distâncias entre pares de amostras são calculadas e comparadas e, quando as distâncias entre as amostras são relativamente pequenas, isto implica que as mesmas são similares. Já as amostras diferentes serão separadas por distâncias relativamente grandes (MANLY, 2005).

A apresentação dos resultados dessa classificação hierárquica se dá na forma de um gráfico, chamado dendograma, o que facilita o reconhecimento visual de tais categorias. As técnicas hierárquicas aglomerativas partem do princípio de que na abertura do processo de agrupamento cada elemento do conjunto de dados observados é considerado como sendo um conglomerado isolado. A cada estágio do algoritmo, estes elementos amostrais vão se agrupando e formando novos conjuntos, até que todos os elementos considerados estejam em um único conjunto (MANLY, 1994).

Para efetuar este agrupamento, é necessário definir matematicamente o conceito de similaridade, ou seja, a distância entre dois objetos. Entre as medidas mais usuais para estabelecer o conceito de

distância entre duas amostras, destacam-se o coeficiente de correlação de Pearson, a distância Euclidiana e a distância de Manhattan. Williams (1987) apresentou aplicações destes métodos na modelagem de propriedades químicas e físicas de sistemas simples e complexos a partir de seus dados espectroscópicos.

Para análises exploratórias, grandes e complexos conjuntos de dados são reduzidos, por algoritmos matemáticos, a conjuntos mais simples. As correlações existentes entre as amostras com as variáveis dependentes, que são algumas das importantes informações extraídas, são fornecidas em poucas variáveis, e estas sendo derivadas dos conjuntos originais de dados. As informações são organizadas em matrizes “n” *versus* “m”, onde os dados dispostos nas linhas são inerentes às amostras e as colunas são as variáveis medidas. No caso de um conjunto de dados de RMN, as amostras são os espectros obtidos e as variáveis são os pontos em que o conjunto espectral foi processado (SI) que, em seguida, são submetidos a tratamentos específicos, como a análise por componentes principais (PCA) e análise de Cluster (HCA).

Além da transformação dos dados espectrais em matrizes e antes das análises propriamente ditas, faz-se necessário a aplicação de certas manipulações matemáticas denominadas de pré-processamentos, podendo ser sob as variáveis ou dados espectrais das amostras, objetivando-se na redução ou até remoção de informações irrelevantes (randômicas ou sistemáticas) ao conjunto de dados. Há diversas possíveis maneiras de tratar os dados antes de encontrar os componentes principais e realizar a regressão, como ilustrado na Figura 4. As mais utilizadas são: a remoção de artefatos e/ou linearização, para minimizar o ruído, como aplicação do *smooth*, ou para melhorar a definição de picos que se encontram sobrepostos em uma mesma região e para correção de linha base, como aplicação da primeira derivada; a centralização dos dados em torno da média que, simplesmente tem como objetivo, prevenir que os pontos mais distantes do centro dos dados tenham maior influência que os mais próximos; escalonar ou ponderar os dados, que implica em ajustar o conjunto de dados de modo a igualar a variância de cada variável, ou seja,

igualar a influência de cada variável sobre o conjunto de dados. (BEEBE *et al*., 1998).

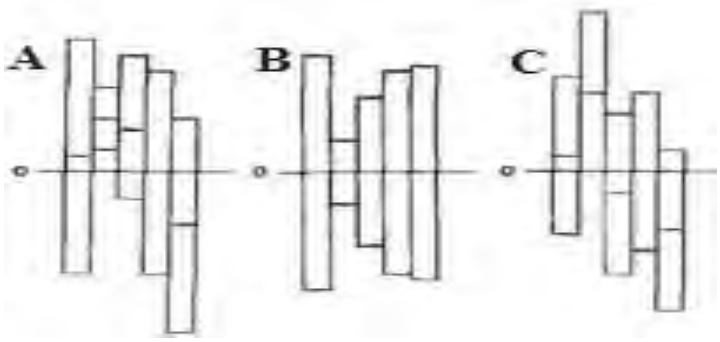

Figura 4 - Pré-processamento dos dados para cada variável que estão representados por uma barra de variância e seu centro, com (A) dados sem tratamento, (B) resultado após a centralização em torno da média, (C) resultado após o escalonamento.

2. OBJETIVOS

Os principais objetivos do presente estudo são:

- Identificar o perfil químico e quantificar os oligossacarídeos rafinose, estaquiose e verbascose, componentes antinutricionais do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), pela técnica de Alta Resolução com Giro no Ângulo Mágico, em cinco cultivares distintas.

- Extração desses oligossacarídeos do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) e obtenção dos espectros de RMN na sonda de líquidos TBI, a partir dos extratos aquosos, para comparação entre as técnicas espectroscópicas.

- Comparar o teor desses oligossacarídeos no feijão *in natura*, após a imersão e o processamento doméstico de cocção (cozimento), por meio da RMN, utilizando cálculos diretos (proporcionalidade das integrais) e a curva de calibração, pelo método dos mínimos quadrados.

- Avaliar o potencial da técnica de RMN para discriminação de oito diferentes cultivares da cana-de-açúcar híbrida.

- Promover uma comparação dos resultados obtidos para cana-de-açúcar, pela técnica de RMN de Alta Resolução com Giro no Ângulo Mágico, frente às duas diferentes sequências de pulsos utilizadas – CPMG e ZGCPPR.

- Aplicação de métodos quimiométricos de análise exploratória e de classificação para os dados de RMN, obtidas a partir das sondas HR-MAS e TBI, para as cultivares da cana-de-açúcar, correlacionando às qualidades de cada grupo formado.

PARTE I – Feijão

3. EXPERIMENTAL

3.1 – Origem e preparo das amostras

As análises foram realizadas com cinco diferentes cultivares de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) de diferentes grupos comerciais de cor já lançadas no mercado, todas adquiridas sob as mesmas condições e época de plantio (mês de setembro do ano de 2009), cultivadas em uma lavoura experimental da EMBRAPA Arroz e Feijão no município de Santo Antônio de Goiás, a saber: BRSMG Tesouro, Radiante, Pérola, Jalo Precoce e BRS 7762 Supremo, ilustrados na Figura 5. Para as análises através da sonda HR-MAS, específica para materiais “semi-sólidos”, as cascas desses feijões foram retiradas e os mesmos pulverizados, com o auxílio de um almofariz e nitrogênio líquido.

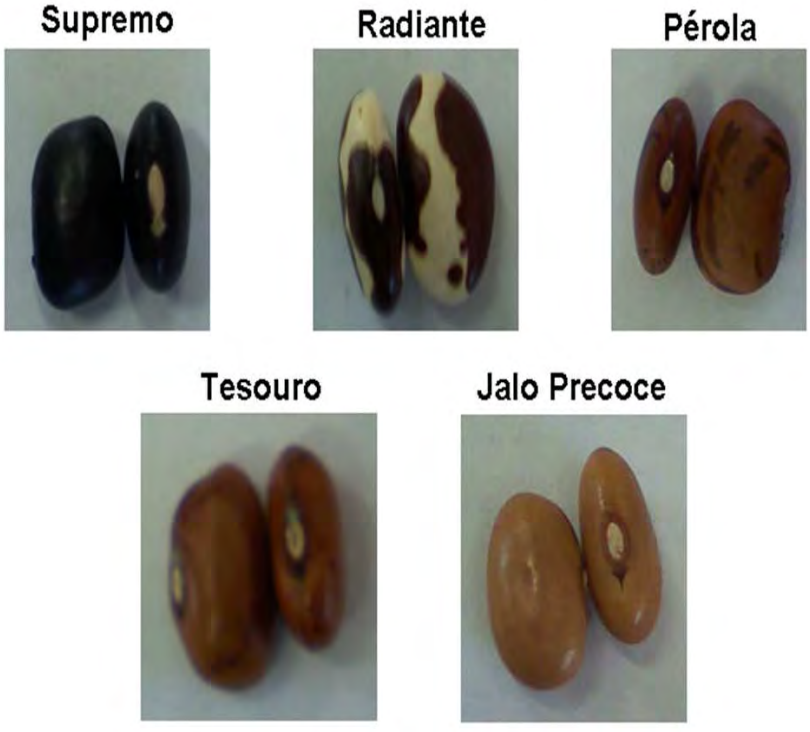

Figura 5 – Feijões em estudo.

Para o preparo das amostras analisadas na sonda HR-MAS (semi-sólidos), foram combinados 50,0 mg de cada feijão macerado com, aproximadamente, 230,0 mg de D_2O/TMSP-d_4 de uma solução preparada com 5,60 mg de TMSP-d_4 (propianato de trimetilsil de sódio) diluídos em 5,0 mL de D_2O, como referência interna. Tudo isso para serem obtidas amostras homogêneas com graus semelhantes de inchaço, e posterior adição no rotor.

Por outro lado, foram ainda realizados extratos aquosos para retirada dos componentes de interesse de cada feijão estudado, avaliando-se, com isso, o efeito da imersão e do processamento doméstico de cocção (cozimento). Para tanto, 100,0 g das sementes foram imersas em água destilada (600 mL) por um período de 16 horas (à temperatura ambiente). Posteriormente, retirou-se a água colocada para imersão dos grãos, e novamente foram adicionados 600 mL de água destilada (feijão e água 1:6). Os feijões foram cozidos em uma panela de pressão doméstica com saída constante de vapor pela válvula de pressão, de acordo com o tempo de cozimento de cada cultivar de feijão. Foram coletadas tanto a água de imersão quanto a água do cozimento, para posterior liofilização e diluição de 20,0 mg de cada extrato em 0,6 mL da solução D_2O/TMSP-d_4, para análise na sonda TBI (Triple Broad Band Inverse).

As medidas do tempo de cocção (cozimento) dos grãos foram efetuadas com o emprego do aparelho cozedor de Mattson de 25 hastes situado no Laboratório de Grãos e Subprodutos da Embrapa Arroz e Feijão (Figura 6). As sementes foram colocadas na placa suporte do aparelho ficando, cada haste, sobre um grão. O aparelho foi colocado em um becker, com 2 L de água destilada fervente, mantendo-se o aquecimento. À medida que ocorre o cozimento, as hastes caem atravessando os grãos, e assim, obtendo-se o tempo de queda de 13 hastes, ou o tempo de cozimento de cada cultivar de feijão. Esta avaliação foi realizada em duplicata, pois a triplicata apenas é feita quando a diferença entre os dois tempos de cozimento do feijão excede quatro minutos. Propõe-se a utilização do tempo médio acumulado até a décima terceira haste como critério adotado para caracterizar o cozimento dos grãos de feijão, quando se utiliza o cozedor de Mattson de 25 hastes. A utilização do tempo de queda das treze primeiras

hastes do cozedor de Mattson de 25 pinos proporciona maior precisão experimental e deve ser adotado como critério para o cálculo do tempo de cozimento de grãos de feijão (RIBEIRO *et al*., 2007).

Figura 6 – Cozedor de Mattson de 25 hastes

3.2 – Espectros de RMN de ^{1}H

Os espectros de RMN de ^{1}H foram adquiridos em um espectrômetro Bruker Avance III 500 (11,75 T), equipado com uma sonda HR-MAS de 4 mm e uma sonda TBI (Triple Band Inverse) de 5 mm com detecção inversa e gradiente de campo, situado no Laboratório de RMN, no Instituto de Química (IQ-1) da Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia-GO. Utilizou-se o software Bruker TopSpin (versão 2.1) para aquisição e processamento dos dados.

Para as análises na sonda HR-MAS, cada amostra foi acondicionada em um rotor cilíndrico de 50 µL, com uma de suas cavidades esférica, que foi girado a 5 kHz no ângulo mágico (54,7°). Foram acumulados 128

espectros, com 2,0 s de tempo de espera entre cada aquisição (d_1), 4,1 s de tempo de aquisição (AQ) e 64 k de números de pontos na aquisição (TD) para uma largura espectral de 8012,820 Hz. Os espectros foram adquiridos utilizando-se a sequência de pulsos compostos ZGCPPR (Composite Pulse Presaturation Sequence), para pré-saturação do sinal do solvente. Para análise dos extratos aquosos, na sonda TBI, os parâmetros utilizados foram os mesmos.

As análises de semi-sólidos e em solução foram feitas em triplicatas e processadas com zero para o fator utilizado na multiplicação exponencial, referenciadas usando TMSP-d_4 como uma referência interna.

Com o fim de se obter uma curva de calibração, foram preparadas cinco soluções contendo 650 mg de D_2O/TMSP-d_4 e quantidades do padrão de rafinose pentahidratada variando de 1,0 a 5,0 mg em cada tubo de ressonância. A curva foi construída utilizando pontos para faixas de concentração apropriadas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Dados espectrais

Os espectros de RMN de ^{1}H das amostras obtidas em ambas as sondas apresentaram-se muito parecidos, embora os espectros das amostras *in natura* (apenas pulverizadas), obtidos através da sonda HR-MAS, tenham destacado os metabólitos primários, tais como: carboidratos e aminoácidos. Por outro lado, nos espectros de RMN de ^{1}H dos extratos aquosos, obtidos através da sonda TBI, os metabólitos secundários, tais como polifenóis, foram destacados. Esse fato se deve ao aumento na concentração dos metabólitos hidrossolúveis, como demonstrado nas Figuras 7 a 11, a seguir.

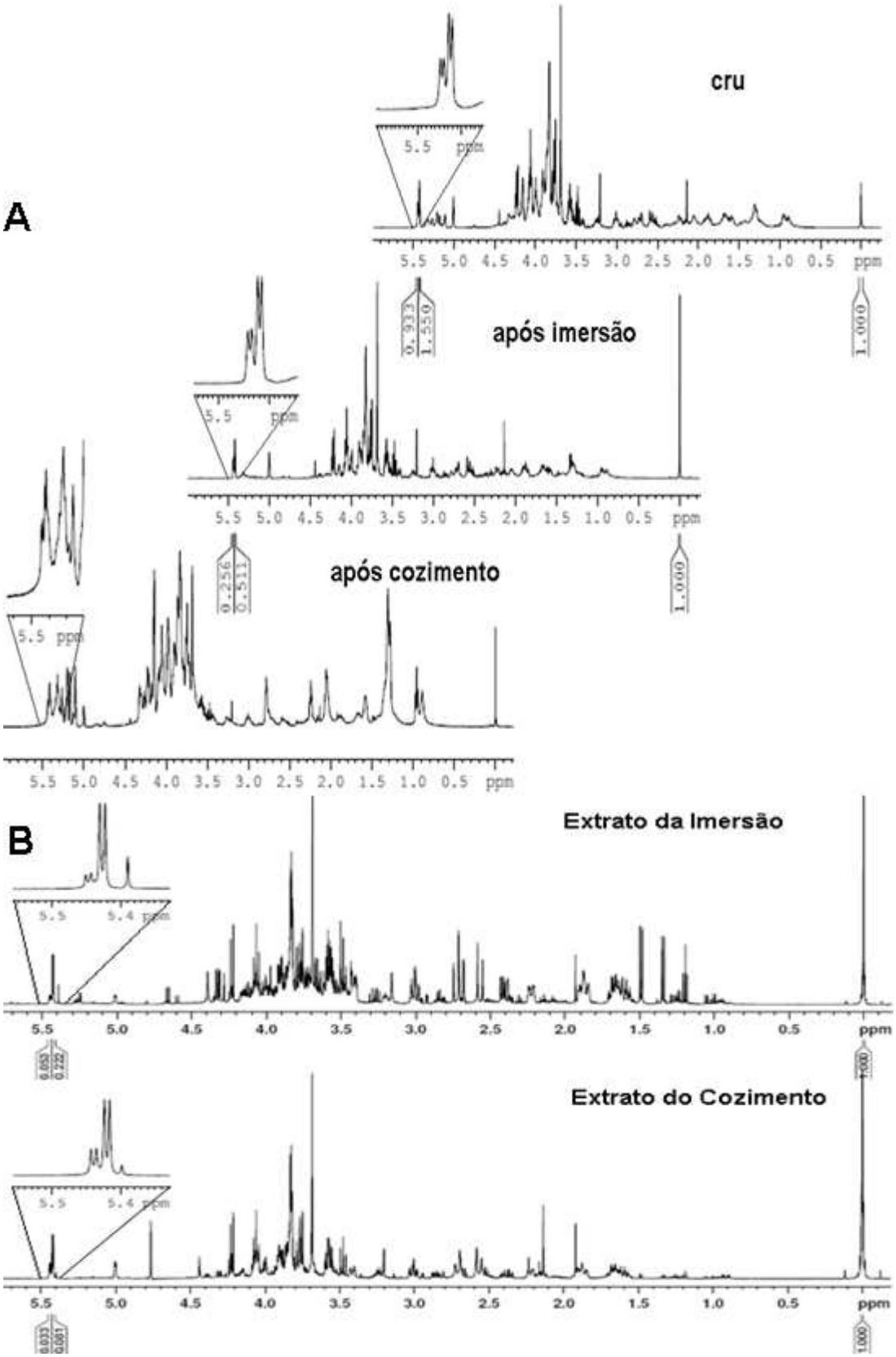

Figura 7 – A: espectros do feijão Jalo Precoce cru, após imersão e após cozimento, adquiridos na sonda HR-MAS; B: espectros dos extratos da imersão e processamento doméstico de cocção (cozimento), adquiridos na sonda TBI.

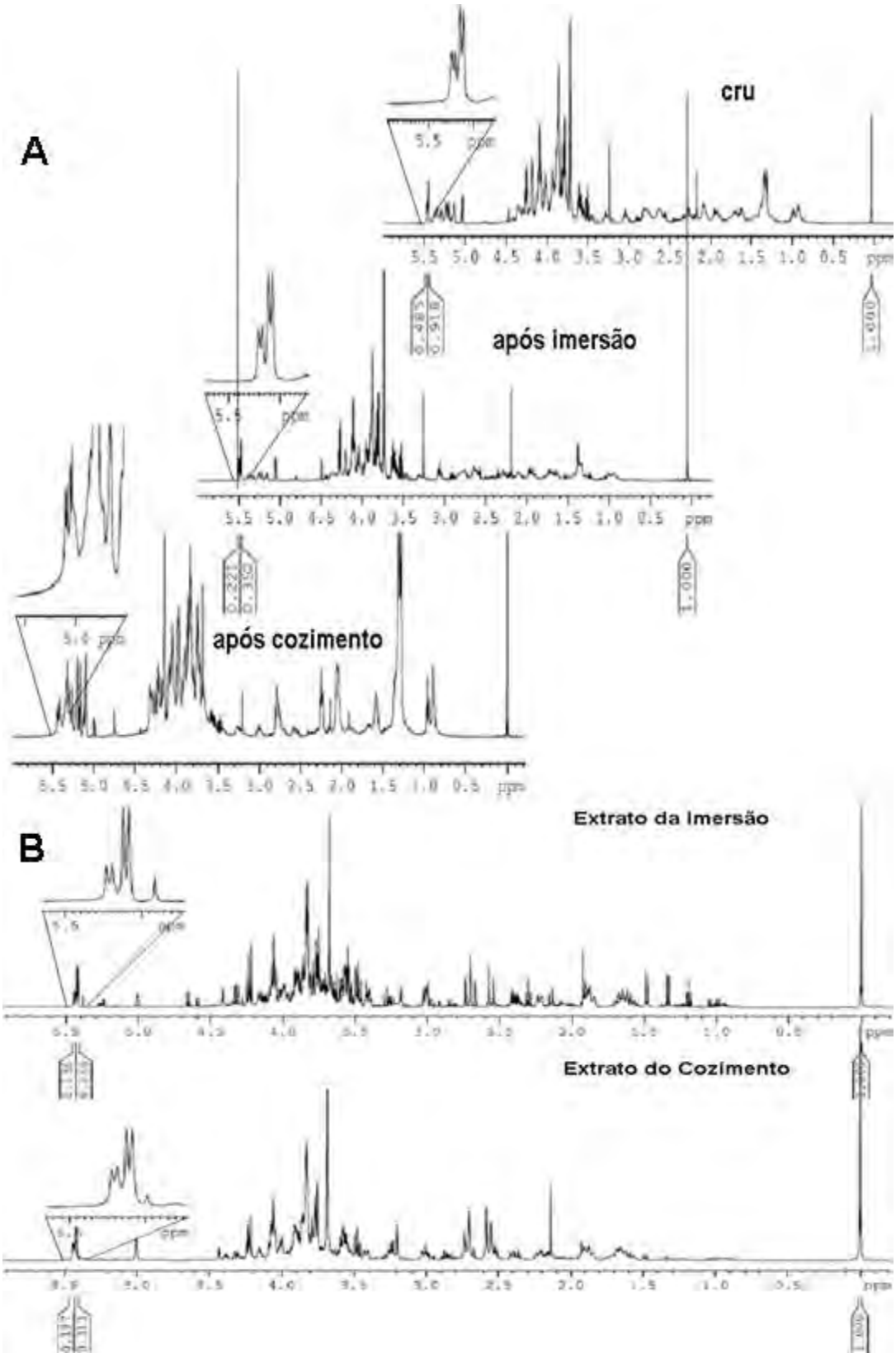

Figura 8 – A: espectros do feijão Pérola cru, após imersão e após cozimento, adquiridos na sonda HR-MAS; B: espectros dos extratos da imersão e processamento doméstico de cocção (cozimento), adquiridos na sonda TBI.

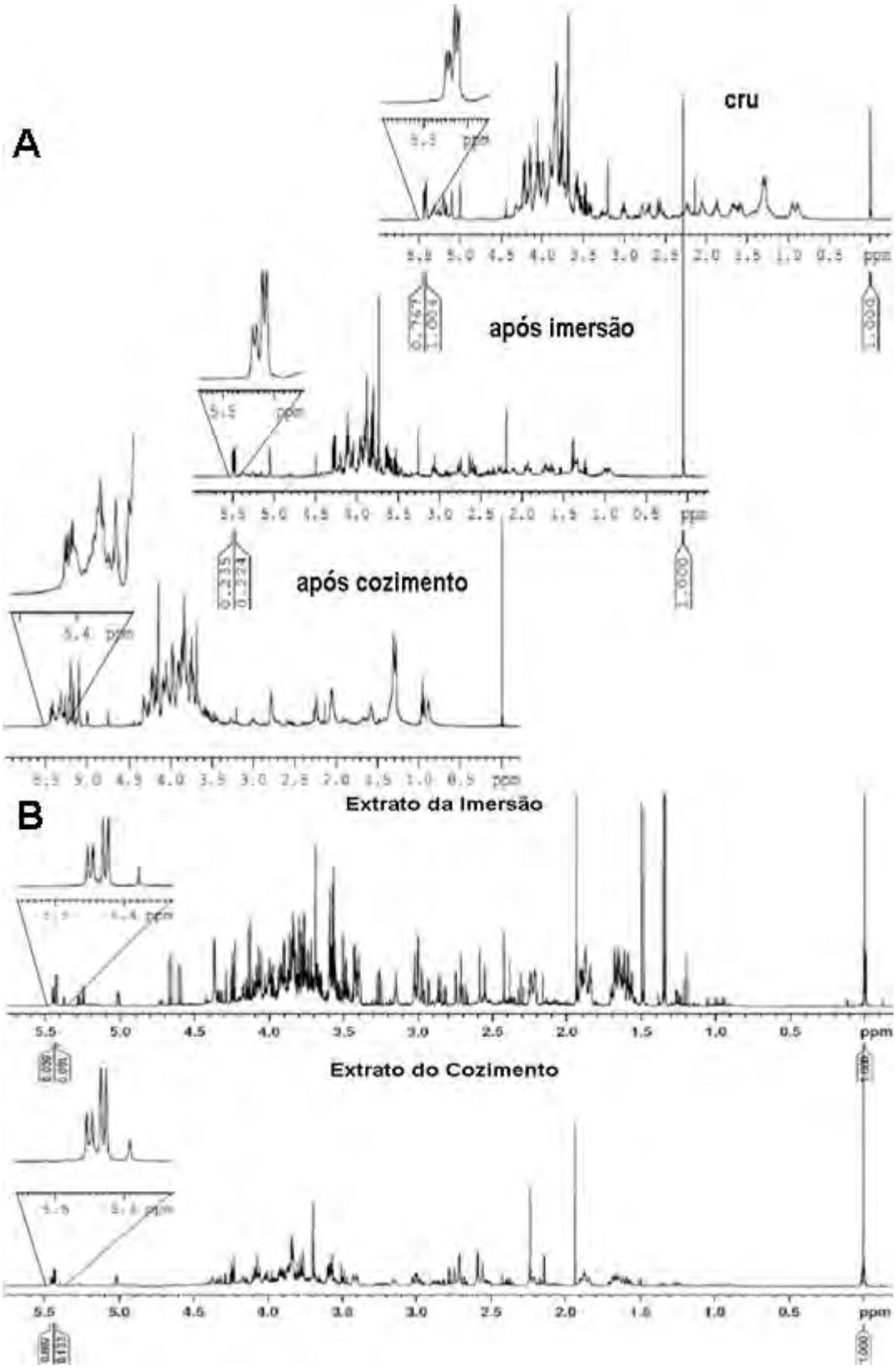

Figura 9 – A: espectros do feijão Radiante cru, após imersão e após cozimento, adquiridos na sonda HR-MAS; B: espectros dos extratos da imersão e processamento doméstico de cocção (cozimento), adquiridos na sonda TBI.

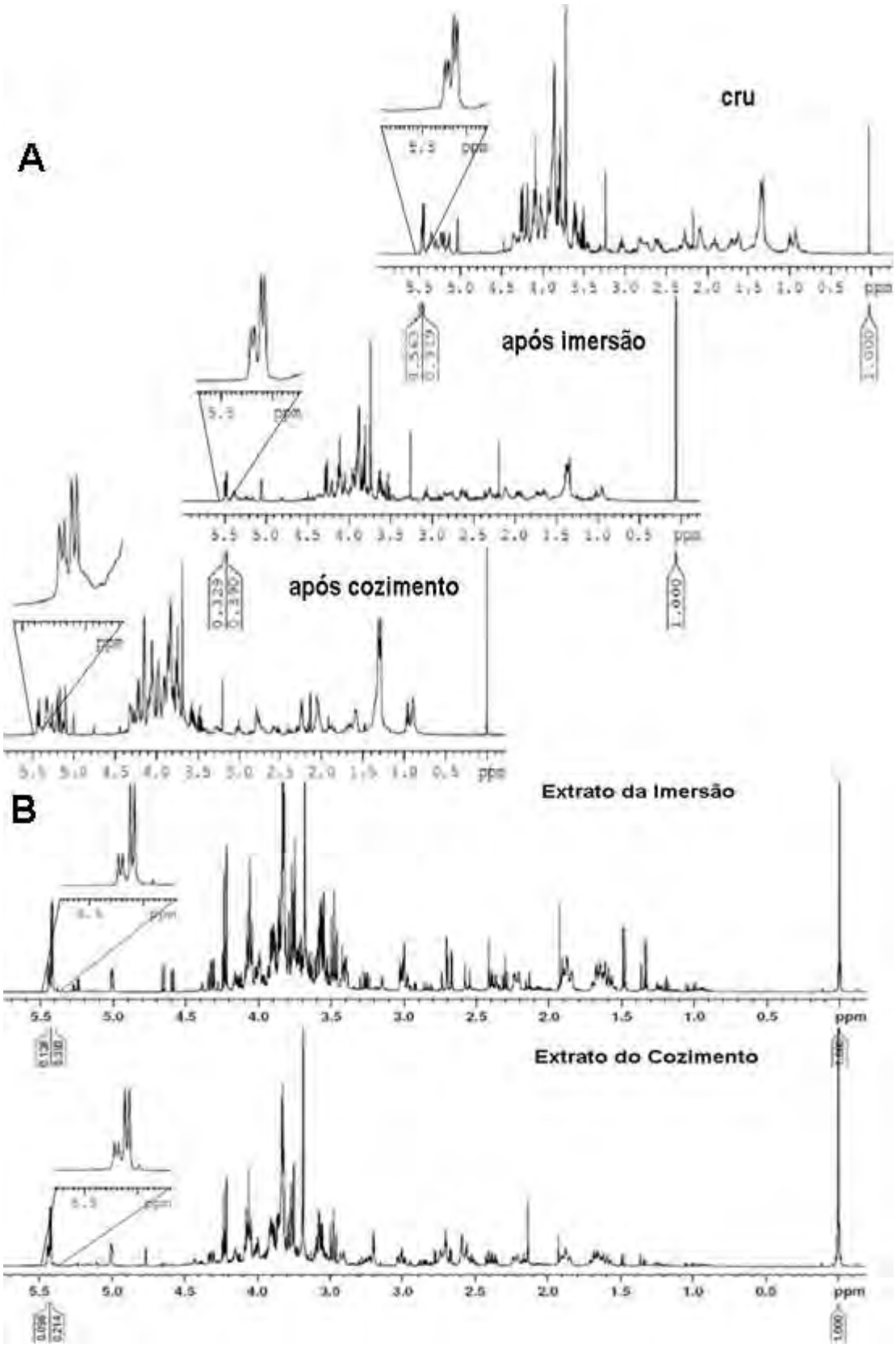

Figura 10 – A: espectros do feijão Supremo cru, após imersão e após cozimento, adquiridos na sonda HR-MAS; B: espectros dos extratos da imersão e processamento doméstico de cocção (cozimento), adquiridos na sonda TBI.

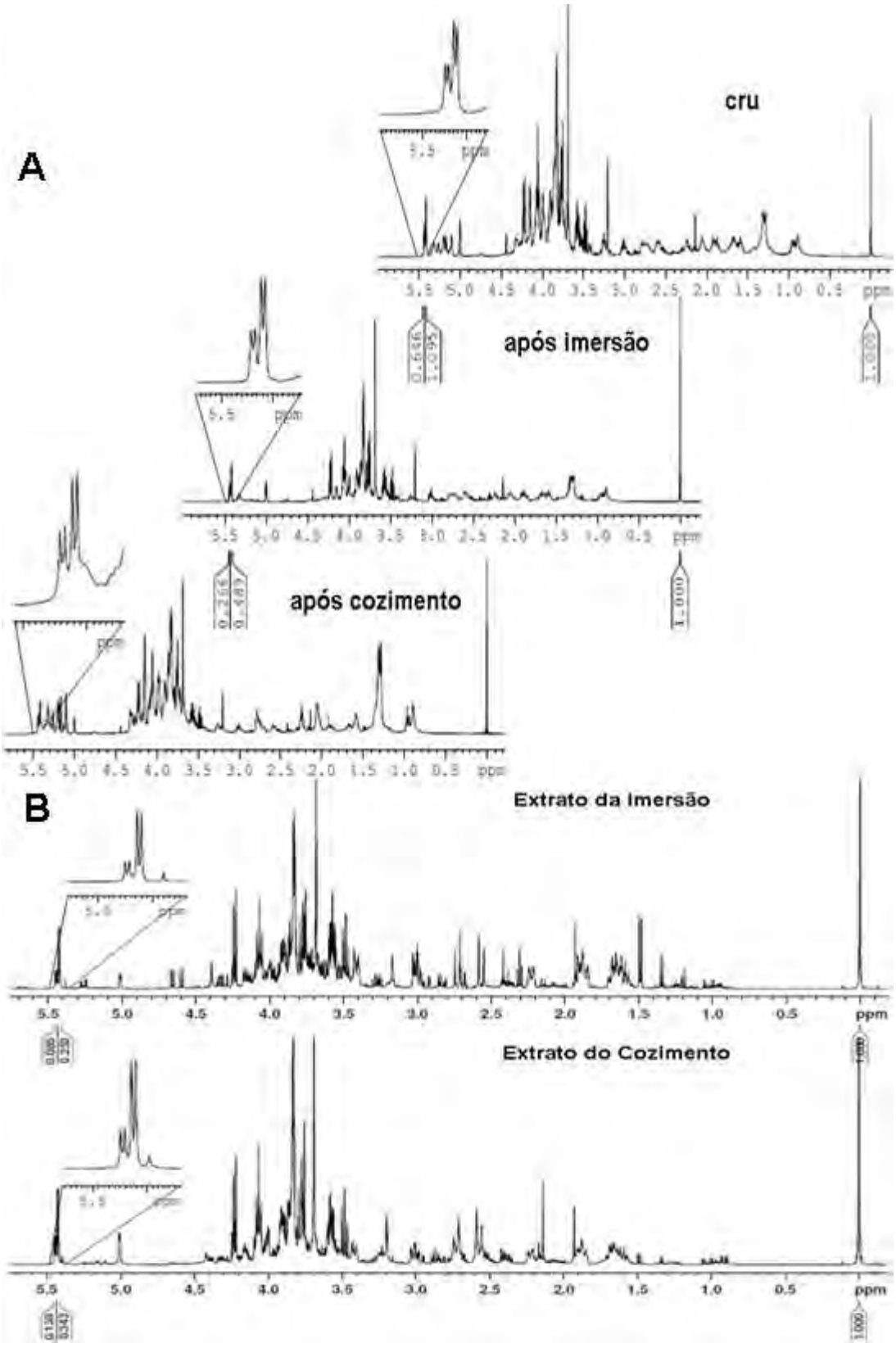

Figura 11 – A: espectros do feijão Tesouro cru, após imersão e após cozimento, adquiridos na sonda HR-MAS; B: espectros dos extratos da imersão e processamento doméstico de cocção (cozimento), adquiridos na sonda TBI.

A comparação entre os espectros demonstrou, ainda, que a resolução do espectro em solução foi muito semelhante à obtida para o material semi-sólido na sonda HR-MAS, confirmando assim a potencialidade dessa sonda. O uso de materiais sem pré-tratamento é um dos motivos pelos quais a RMN tem sido cada vez mais utilizada na análise de alimentos, uma vez que minimiza o tempo de análise e evita o pré-tratamento das amostras, comumente realizado em outras técnicas analíticas, e que pode causar alterações na composição química do material em análise.

Para este estudo, optou-se por sinais de RMN de ^{1}H para determinação mais adequada na quantificação dos oligossacarídeos presentes em amostras de feijão. Na análise quantitativa de compostos orgânicos via RMN, o sinal mais apropriado é, geralmente, um singleto que não está sujeito a fenômenos relacionados ao deslocamento químico e bem resolvido a partir de qualquer outro sinal decorrente da amostra. A intensidade do pico selecionado deve ser maior do que a maioria dos outros sinais de compostos a fim de melhorar o limite de detecção e sensibilidade (SHAMSIPUR *et al*., 2002). Portanto, foi selecionado o singleto do TMSP-d_4, pois a quantificação por RMN exige a adição de um padrão interno para calcular a quantidade de analitos presente na amostra por comparação dos valores das integrais. O sinal do TMSP-d_4, além de ser bem definido, não se sobrepõe a qualquer outro sinal do extrato, apresentando seu sinal em δ 0,00 – com nove hidrogênios equivalentes – é solúvel e estável e, com isso, representou uma boa escolha para esta análise (SILVERSTEIN *et al*., 2006).

Partindo-se da informação que cada um desses oligossacarídeos possui apenas uma unidade de glicose, os espectros de RMN de ^{1}H de suas amostras padrão de rafinose, estaquiose e verbascose indicaram o deslocamento químico do hidrogênio anomérico glicosídico em cada um dos feijões para promover a quantificação, pois se encontram em uma região desobstruída do espectro, como exemplificado na Figura 16. A atribuição desse deslocamento químico foi ainda confirmada através do experimento de correlações heteronucleares, carbono e hidrogênio – HSQC (a uma ligação) e HMBC (a longa distância) – da rafinose, uma vez que esse hidrogênio é o

único que correlaciona a longa distância com o carbono quaternário da frutose, como representado nas Figuras 12 e 13.

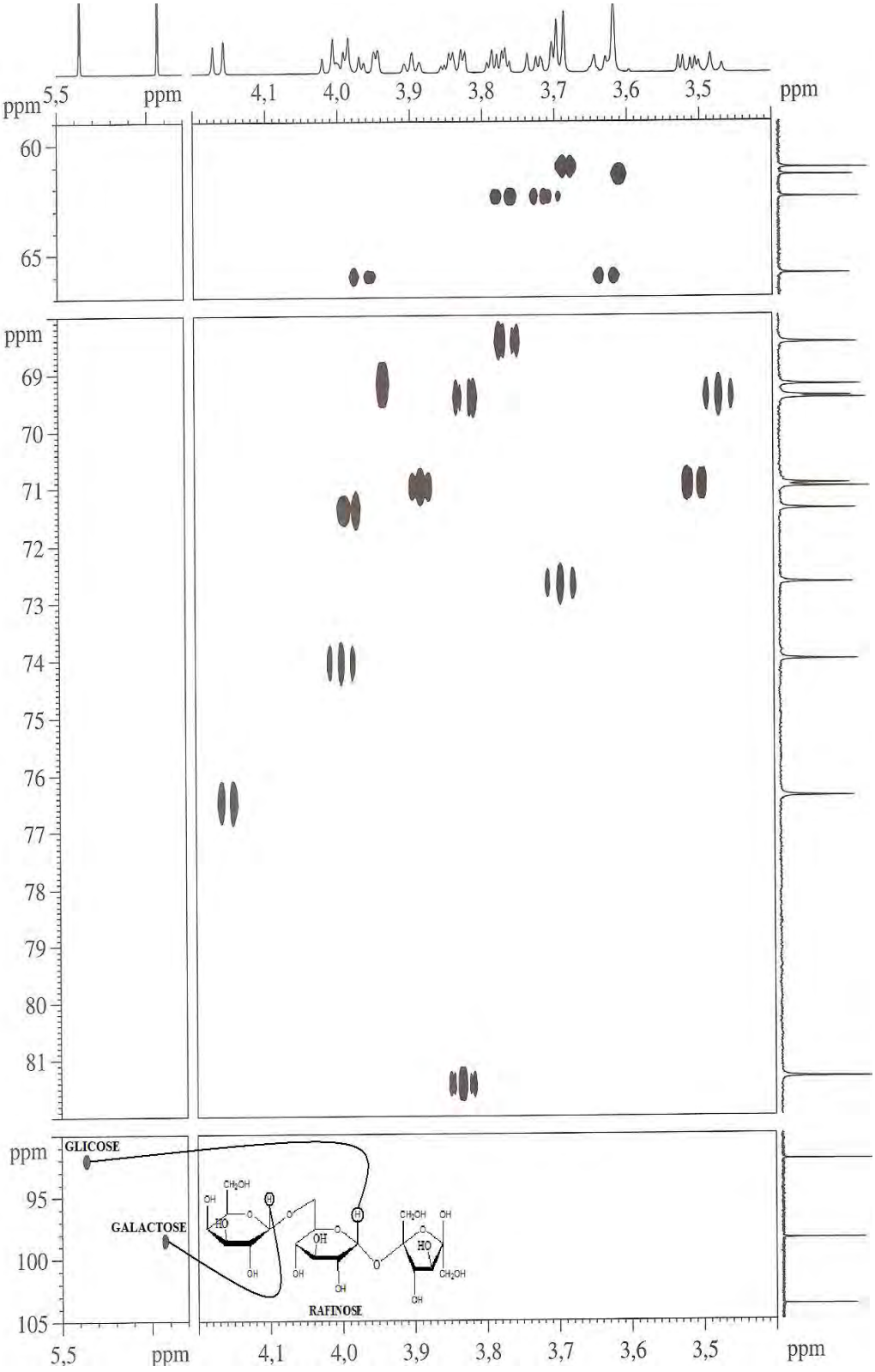

Figura 12 – HSQC, espectro de correlações heteronucleares, carbono e hidrogênio, a uma ligação, da rafinose.

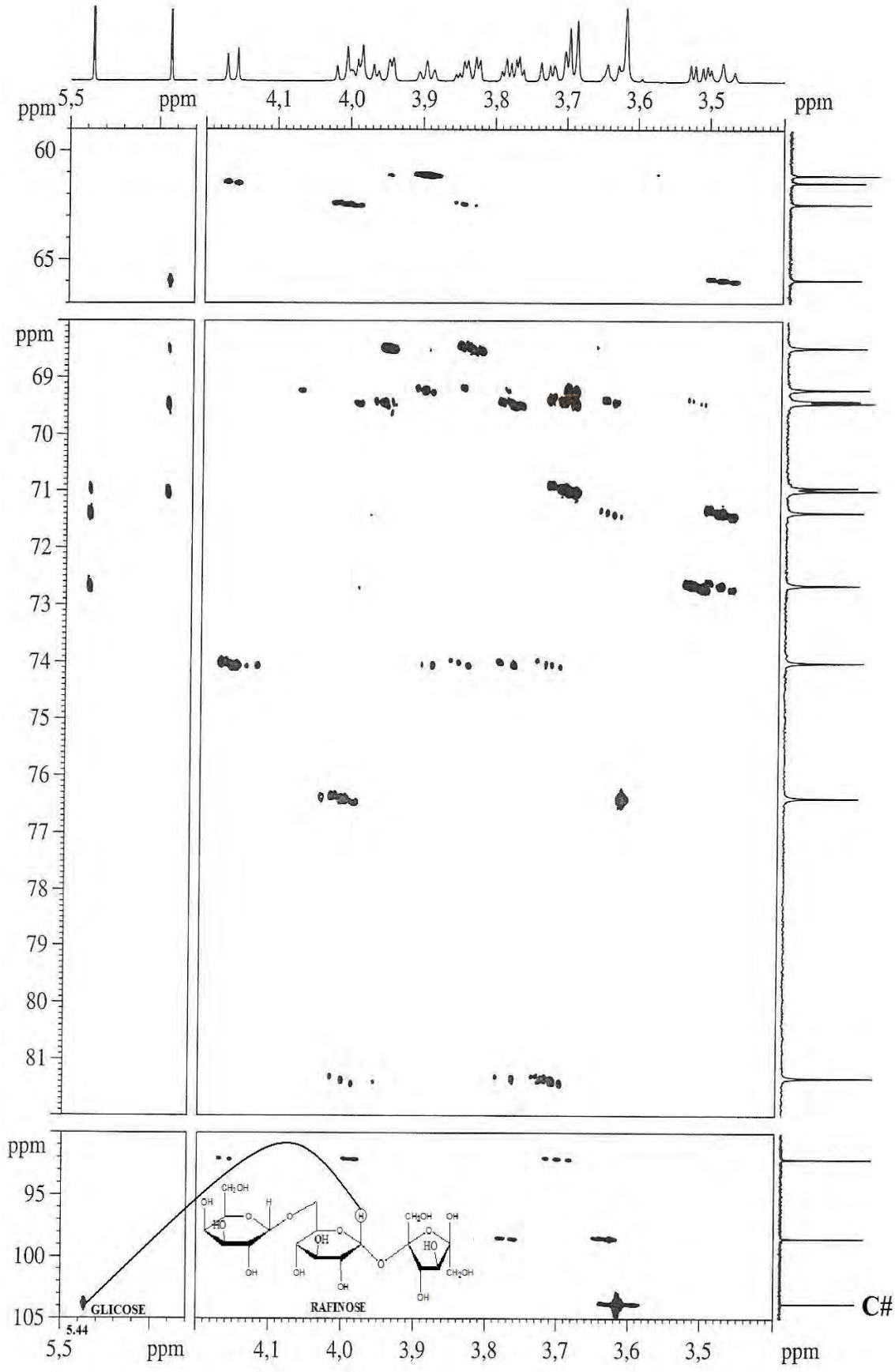

Figura 13 – HMBC, espectro de correlações heteronucleares, carbono e hidrogênio, a longa distância, da rafinose.

O passo seguinte foi a avaliação dos sinais dos oligossacarídeos rafinose, estaquiose e verbascose para quantificação, onde foram selecionados dois dubletos, um em δ 5,42 para o primeiro composto, e o outro em δ 5,44 para os dois últimos, levando em consideração que os sinais se localizam em uma região descongestionada do espectro. Para estas atribuições, foram analisados os espectros de RMN ^{1}H de amostras padrão de rafinose, estaquiose e verbascose (Figura 14), promovendo, posteriormente, a adição do padrão de verbascose as amostras de feijão, exemplificado na Figura 15, confirmando os sinais para cada composto. A escolha final dos sinais está destacada na Figura 16, exemplificando um espectro de feijão com seus sinais indicados para a quantificação.

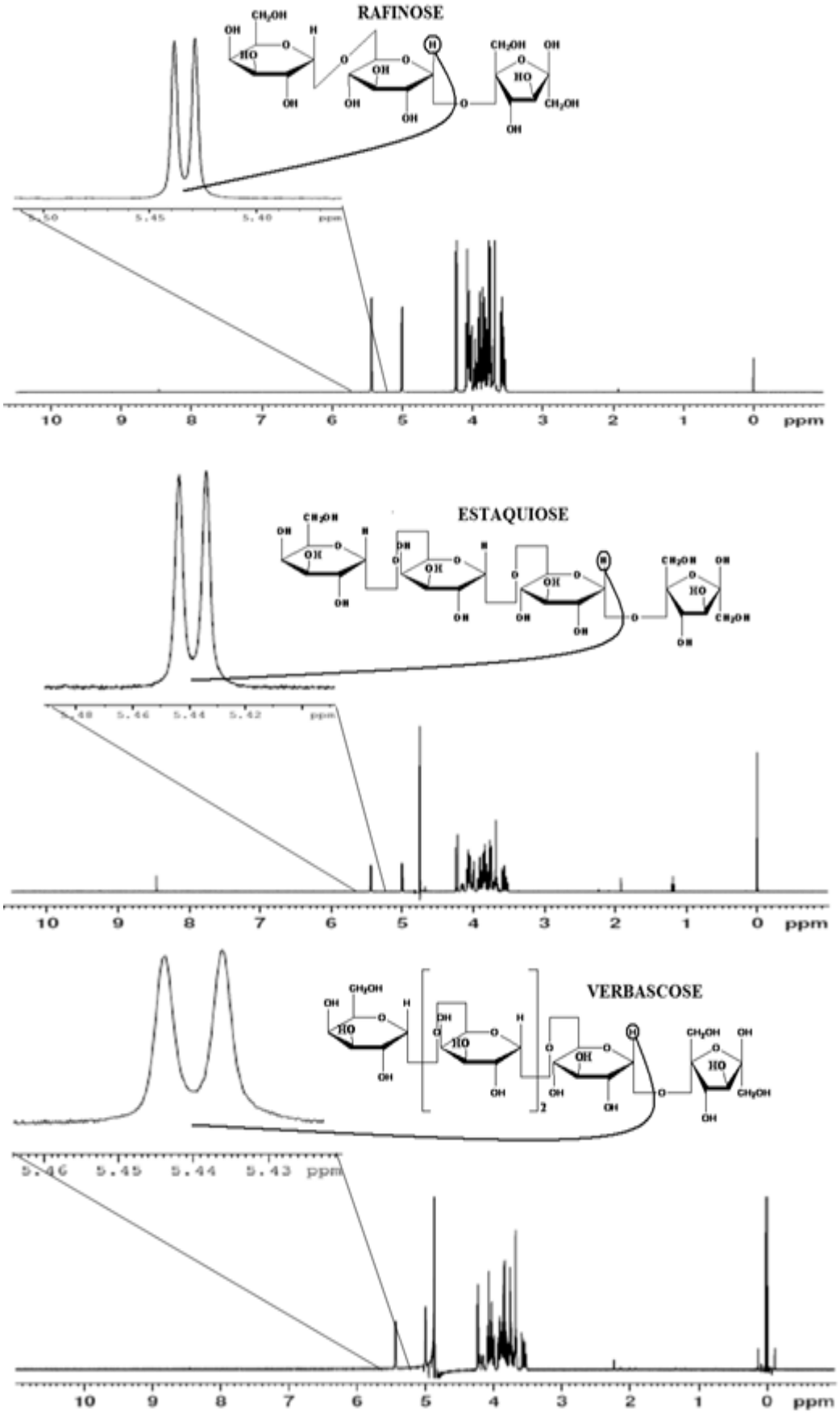

Figura 14 – Espectros dos padrões de rafinose, estaquiose e verbascose.

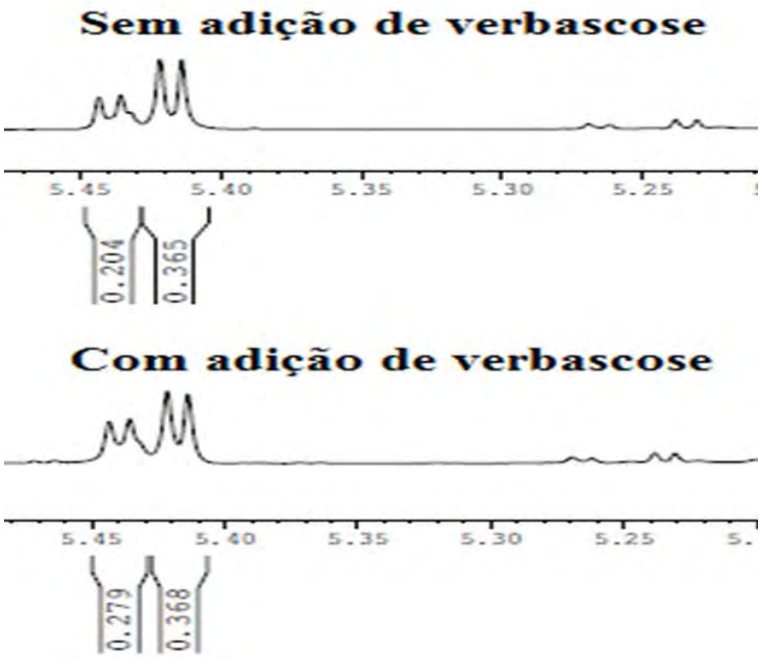

Figura 15 – Espectros de feijão Jalo Precoce sem e com a adição do padrão de verbascose.

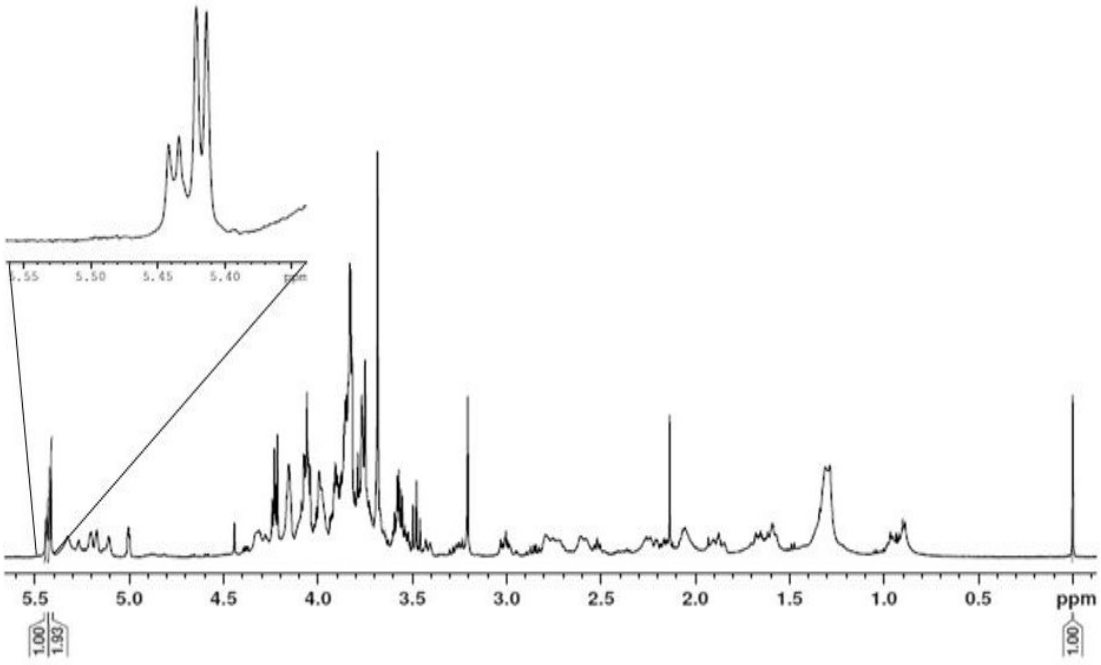

Figura 16 – Espectro de RMN de ^{1}H do feijão Jalo Precoce com o $H_{anomérico}$ da rafinose (δ 5,42), que integra para 1,93, estaquiose e verbascose (δ 5,44), que integram para 1,00, proporcionais ao sinal do TMSP-d_4 (δ 0,00), com a integral igual a 1,00 para todos os espectros.

4.2 – Quantificação dos oligossacarídeos

A quantificação da rafinose, estaquiose e verbascose em cada amostra de feijão, foi feita a partir da massa de TMSP-d_4 utilizado como padrão interno nas análises. Conhecendo a quantidade de TMSP-d_4 utilizada, a integração de seu sinal e o valor da integral dos sinais de cada hidrogênio anomérico da unidade glicose de cada uma das moléculas dos oligossacarídeos, podem ser calculadas, por proporcionalidade, as concentrações destes açúcares. Nos espectros das amostras de feijão, foram nitidamente observados os sinais característicos do hidrogênio anomérico da rafinose. Por outro lado, observou-se uma sobreposição dos sinais dos hidrogênios anoméricos da verbascose e da estaquiose, inviabilizando assim, o cálculo em separado, das concentrações desses dois oligossacarídeos.

Evidenciou-se que a cultivar BRS 7762 Supremo contem a maior concentração de rafinose por grama de feijão, e as cultivares BRSMG Tesouro e Pérola as menores concentrações. Em relação à presença de estaquiose e verbascose, o feijão Radiante apresentou a maior concentração e as menores concentrações destes oligossacarídeos estão presentes nos cultivares BRSMG Tesouro e Pérola, conforme descritos na Tabela 2. Os níveis de rafinose, estaquiose e verbascose observado no presente estudo encontraram-se na faixa de concentração superior quando comparados aos valores relatados anteriormente na literatura – 0,5 a 4,1 % para estaquiose e 0,3 a 1,3 % para rafinose e verbascose (REDDY, 1984). Pode-se observar também na Tabela 2, o decréscimo na concentração desses açúcares após a imersão. Nos feijões após o cozimento, o cálculo das concentrações dos oligossacarídeos foi inviável, visto que foram observados sinais de outros carboidratos, na mesma região, provenientes da degradação causada pelo aquecimento.

Tabela 2 – Concentrações dos oligossacarídeos nos feijões em seus estados cru e após a imersão.

Cultivares	*Tratamentos*	*Oligossacarídeos em 1g de feijão*			
		Estaquiose e Verbascose (g)	**(%)**	**Rafinose (g)**	**(%)**
Jalo Precoce	*In natura*	0,1418 ± 0,0035	14,2	0,1253 ± 0,0032	12,5
	Após imersão	0,0470 ± 0,0009	4,7	0,0300 ± 0,0008	3,0
Pérola	*In natura*	0,1012 ± 0,0027	10,1	0,1117 ± 0,0026	11,2
	Após imersão	0,0520 ± 0,0009	5,2	0,0560 ± 0,0009	5,6
Radiante	*In natura*	0,2146 ± 0,0052	21,5	0,1180 ± 0,0037	11,8
	Após imersão	0,0650 ± 0,0010	6,5	0,0520 ± 0,0009	5,2
Supremo	*In natura*	0,1969 ± 0,0048	19,7	0,2204 ± 0,0056	22,0
	Após imersão	0,0710 ± 0,0010	7,1	0,0750 ± 0,0011	7,5
Tesouro	*In natura*	0,0960 ± 0,0022	9,6	0,1110 ± 0,0027	11,1
	Após imersão	0,0640 ± 0,0009	6,4	0,0730 ± 0,0010	7,3

* medidas feitas na sonda HR-MAS.

Avaliando-se a Tabela 3, a seguir, verificam-se as concentrações dos oligossacarídeos extraídos após cada um dos tratamentos (imersão e cozimento). Portanto, nota-se a maior concentração no extrato após o cozimento, posterior a imersão. Ainda pode-se observar a elevada composição dos oligossacarídeos nos extratos aquosos, confirmando assim, a grande solubilidade desses compostos em água. Esse fato é corroborado pela comparação desses dados com os dados obtidos para a extração realizada com 80% água e 20% metanol, durante a otimização dos experimentos, demonstrado na Figura 17. Notou-se um aumento de 73% de estaquiose e verbascose quando a extração foi realizada apenas com H_2O e uma mínima diminuição no valor da integral da rafinose decorrente da proximidade entre os sinais.

Tabela 3 – Concentrações dos oligossacarídeos adquiridas dos extratos aquosos oriundos da imersão e cozimento.

Cultivares	*Tratamentos*	*Oligossacarídeos em 1g de feijão*			
		Estaquiose e Verbascose (g)	**(%)**	**Rafinose (g)**	**(%)**
Jalo Precoce	Imersão	0,0144 ± 0,0003	1,4	0,0052 ± 0,0002	0,5
	Cozimento	0,0101 ± 0,0003	1,0	0,0020 ± 0,0001	0,2
Pérola	Imersão	0,0071 ± 0,0003	0,7	0,0060 ± 0,0003	0,6
	Cozimento	0,0080 ± 0,0003	0,8	0,0072 ± 0,0003	0,7
Radiante	Imersão	0,0103 ± 0,0003	1,0	0,0016 ± 0,0001	0,2
	Cozimento	0,0097 ± 0,0003	1,0	0,0029 ± 0,0001	0,3
Supremo	Imersão	0,0135 ± 0,0003	1,4	0,0089 ± 0,0002	0,9
	Cozimento	0,0093 ± 0,0002	0,9	0,0047 ± 0,0001	0,5
Tesouro	Imersão	0,0035 ± 0,0001	0,4	0,0058 ± 0,0002	0,6
	Cozimento	0,0040 ± 0,0001	0,4	0,0076 ± 0,0002	0,8

* extratos resultantes da água de imersão e cozimento – sonda TBI.

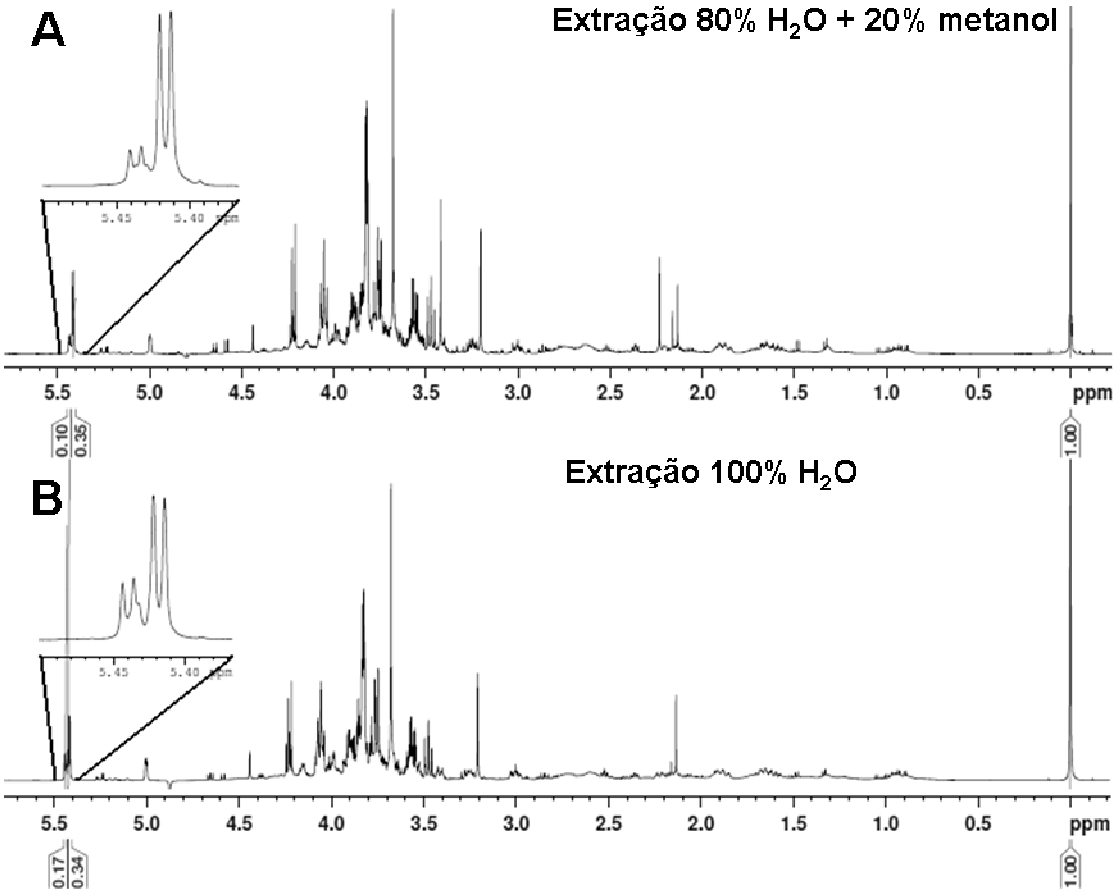

Figura 17 – Quantidade dos oligossacarídeos em diferentes formas de extração em feijão.

Efeito da imersão

A imersão em água diminuiu os níveis dos açúcares nos cultivares de diferentes formas (Tabela 2 e 3), devido à disponibilidade de cada um nas amostras, resultando em uma diminuição, em média, de 43,6% para a rafinose e 43,5 % para estaquiose e verbascose, por grama de feijão. MULIMANI (1997) relatou que a imersão de sementes de soja por 16 horas levou a uma diminuição média de 80,3% para rafinose e 44,8% para a estaquiose. VIJAYAKUMARI *et al*. (1996) relataram que a imersão das sementes de mucuna em água destilada e em solução de bicarbonato de sódio também diminuiu os níveis de açúcares da família da rafinose. Eles observaram que a remoção destes açúcares foi maior com a imersão em solução de bicarbonato de sódio do que com a imersão realizada em água destilada. SOMIARI e BALOGH (1993) relataram que a imersão de sementes de ervilha em água destilada, reduziu os níveis dos açúcares da família rafinose. PRICE *et al*. (1988), propuseram que o processo de lixiviação pode ser um dos mecanismos para esta sua remoção. UPADHYAY e GARCIA (1988) demonstraram que esta remoção, na semente de ervilha durante a embebição, pode ser atribuída a solubilidade individual de cada um dos oligossacarídeos citados acima.

Efeito do cozimento

O cozimento trouxe uma diminuição para a rafinose, estaquiose e verbascose. Pode ser afirmado que a composição dos oligossacarídeos nos extratos dos feijões foi intensamente afetada pelo cozimento, podendo ser explicada por alguma degradação destes açúcares (TRUGO *et al*., 1990). Para isso, foram avaliados os experimentos de RMN de ^{1}H HR-MAS para os feijões após o cozimento (Figura 18). A partir da comparação espectral entre o feijão cru (Figura 19a) e o feijão após o cozimento (Fig. 19b), se pode observar uma alteração nos padrões espectrais de RMN de ^{1}H, havendo uma variação de sinais inerentes aos sinais dos hidrogênios de segmentos alifáticos (δ 1 – 3), policarbinólicos (δ 3 – 6) e aromáticos (δ 6 – 9) (LE GALL

et al., 2001). Tal variação pode ser atribuída a processos de degradação que podem estar ocorrendo durante o processo de cozimento do feijão. Desse modo, sabe-se que o processamento térmico deve conferir a inativação de fatores antinutricionais e prevenir a degradação de aminoácidos essenciais (POEL *et al*., 1992), além de provocar a degradação de açúcares (SAT & KELES, 2002), amido (RODRIGUES *et al*., 2005), vitaminas e minerais (DESHPANDE *et al.*, 1989). Contudo a degradação de açúcares e em especial, os oligossacarídeos em questão, é devido à perda de uma de suas unidades fundamentais, a sacarose (BARAMPAMA & SIMARD, 1994).

Sendo assim, os cálculos das concentrações dos oligossacarídeos nos feijões após o cozimento foram comprometidos em função do aparecimento de sinais de hidrogênios que se sobrepõem aos sinais dos anoméricos da rafinose, estaquiose e verbascose, impossibilitando tal processo, já que a realização da integração do pico fica comprometida.

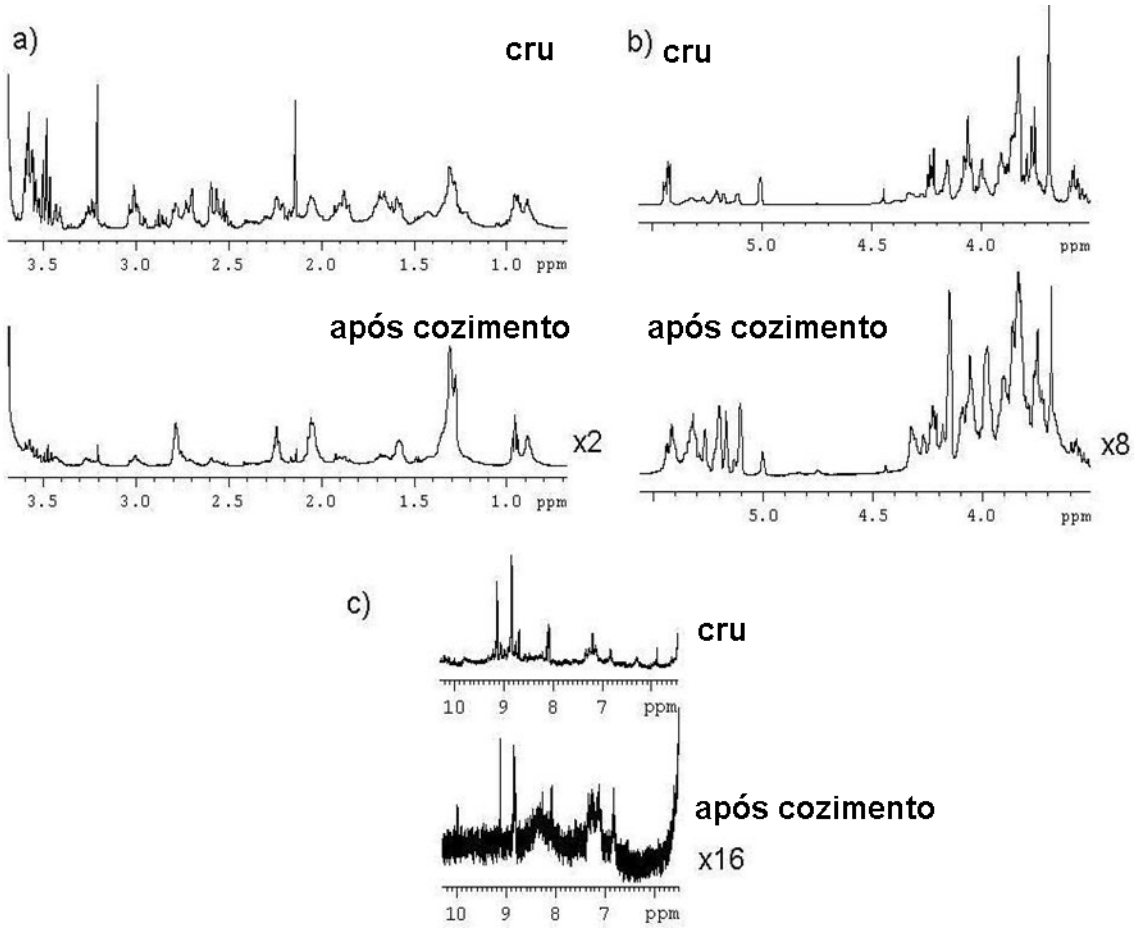

Figura 18 – Ampliações e comparações dos sinais nos espectros dos feijões no estado cru e após o cozimento.

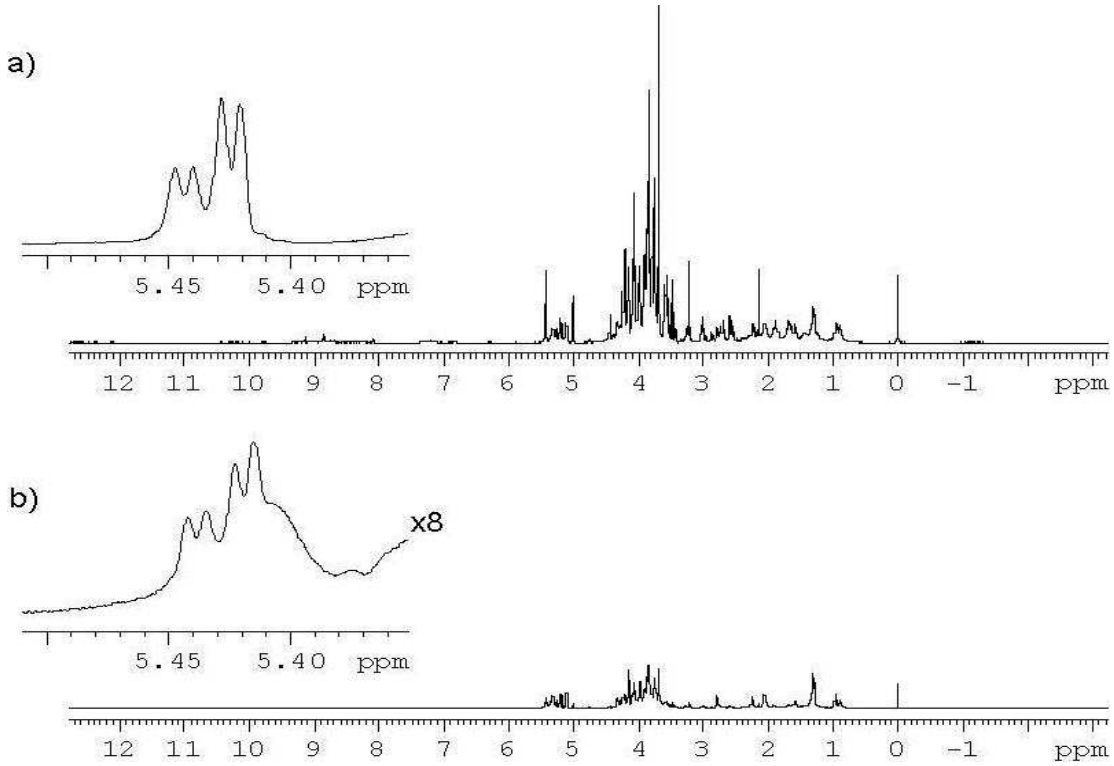

Figura 19 – Comparação dos sinais dos hidrogênios anoméricos dos feijões (a) em seu estado cru e (b) após o cozimento (ampliação em oito vezes).

SOMIARI e BALOGH (1993) relataram que o cozimento de ervilha, por 50 minutos, reduziu o teor de rafinose em 44,0% e estaquiose em 28,6%. RAO e BELAVADY (1978) relataram que os níveis dos açúcares da família rafinose aumentaram durante o cozimento. MULIMANI (1997) relataram uma diminuição nos níveis de açúcares da família rafinose após o cozimento de soja, por 60 minutos. ONIGBINDE e AKINYELE (1993) propuseram que a diminuição dos níveis de rafinose, estaquiose e verbascose durante o cozimento pode ser atribuída a hidrólise dos oligossacarídeos e formação de outros compostos. PRICE (1988) relatou que o cozimento em si não é suficiente para provocar qualquer redução significativa na composição dos oligossacarídeos no feijão-caupi. TRUGO (1990) relatou uma redução de 15,0% nos níveis destes compostos α-galactosídeos durante o cozimento do feijão, por um período de 60 minutos.

Com base nos tempos de cozimento avaliados no cozedor de Mattson de 25 hastes, a variação experimental de cada duplicata foi de, aproximadamente, 3% no tempo de cocção de todas as qualidades de feijão.

Como observado na Tabela 4, notam-se os maiores tempos médios para o cozimento dos feijões Pérola e Radiante, os demais feijões com tempos relativamente bem próximos. Tal fato está relacionado aos diferentes graus de dureza dos grãos, originários das trocas que acontecem nos cotilédones, que são a lignificação e a formação de pectatos insolúveis, resultantes da complexação de íons Ca^{2+} e Mg^{2+} com substâncias pécticas na lamela média. Contudo, o tempo de cocção dos feijões está diretamente ligado a dureza dos grãos, sendo dependente da capacidade destas sementes em absorver água, pois com o aumento da dureza, maior a resistência na absorção de água, dificultando o cozimento (BRESSANI, 1993; KILMER, 1994), resultando na menor extração de oligossacarídeos dos grãos dos feijões.

Tabela 4 – Medidas dos tempos médios de cocção das cultivares de feijão obtidas no cozedor de Mattson de 25 hastes.

FEIJÕES	**Jalo Precoce**	**Radiante**	**Supremo**	**Pérola**	**Tesouro**
Tempo de cocção (minutos)	27,63 ± 0,63	30,83 ± 0,31	30,88 ± 0,52	48,94 ± 0,57	56,21 ± 0,06

Para confirmar o procedimento de quantificação utilizado nos espectros de RMN de ^1H, uma curva de calibração foi obtida, a partir da adição de rafinose padrão, em quantidades determinadas. A relação foi expressa pela concentração de rafinose na solução de D_2O/TMSP-d_4 *versus* o valor da integral do hidrogênio anomérico da rafinose ($\mathbf{I}_{rafinose}$), e esta correlação permitiu a criação da curva de calibração para este composto, apresentada na Figura 20.

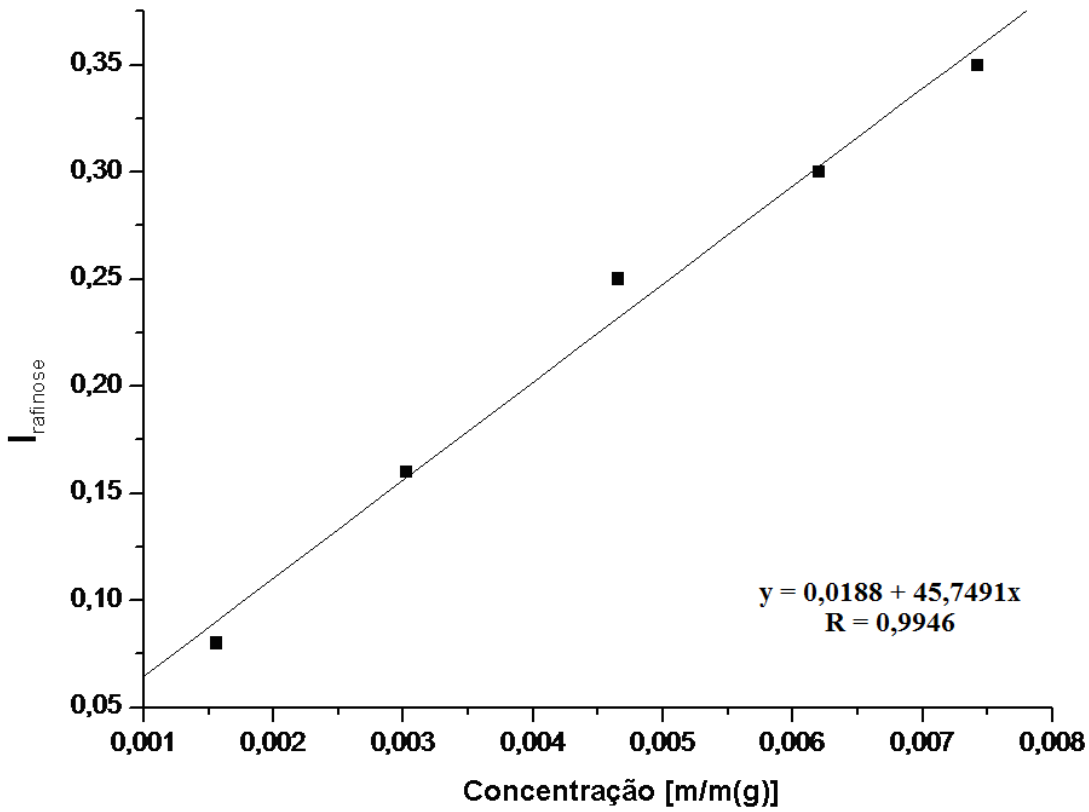

Figura 20 – Curva de calibração com a concentração da rafinose na solução de D_2O/TMSP-d_4 *versus* $I_{rafinose}$.

A linearidade da resposta foi determinada a partir do coeficiente de correlação linear (R), sendo de 0,9946 (δ 5,42), suportando dessa forma a metodologia utilizada. O pico do hidrogênio anomérico foi escolhido, pois esse sinal está em uma região menos congestionada do espectro (Figura 16). Os espectros de RMN de ^1H dos extratos de feijão em D_2O/TMSP-d_4 foram obtidos nas mesmas condições experimentais do padrão de rafinose, e os resultados indicaram que a quantificação desse composto, por RMN de ^1H, pode ser realizada com o uso de espectros adquiridos através dos parâmetros selecionados. Os resultados foram bastante semelhantes e, com este estudo, pode-se afirmar que os dois métodos de quantificação oferecem resultados reprodutíveis.

PARTE II – Cana-de-açúcar

5. EXPERIMENTAL

5.1 – Origem e preparação das amostras

Oito diferentes cultivares de cana-de-açúcar foram obtidas em uma lavoura experimental, localizada em Dourados/MS, como parte do estado da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ-USP), Piracicaba/SP: RB72454, RB835054, RB835486, RB855113, RB855156, RB855453, RB855536 e RB867515. As folhas foram obtidas a partir das amostras de campo, utilizando métodos de agricultura convencional. Todas as cultivares foram plantadas por mudas, na mesma época do ano, e a água foi aplicada por um sistema de irrigação de aspersão, nas mesmas condições naturais.

As folhas secas foram pulverizadas em um moinho de facas, de potência 390 W, ½ HP, fabricado pelo Comércio e Indústria de Aparelhos Científicos e Técnicos LTDA, e peneiradas em 150 Mesh para se obter partículas de tamanho uniforme. O material em pó e extratos metanólicos, foram, respectivamente, analisados por RMN de semi-sólido (HR-MAS) e RMN em solução.

Para as análises de amostras em solução, 300,0 mg de folha triturada de cada cultivar de cana foram suspensos em 15,0 mL de metanol (PA), submetidos a ultra-som por cinco minutos e percolação durante 24 horas. Os extratos foram filtrados, secos e dissolvidos em 0,6 mL de DMSO-d_6 (99,9%) para aquisição de espectros de RMN.

5.2 – Espectros de RMN de ^1H

Os espectros de RMN de ^{1}H foram adquiridos em um espectrômetro Bruker Avance III 500 (11,75 T), equipado com uma sonda HR-MAS de 4 mm e uma sonda TBI (Triple Band InverseI) de 5 mm com detecção inversa e gradiente de campo, situado no Laboratório de RMN, no Instituto de Química (IQ-1) da Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia-GO. Utilizou-se o software Bruker TopSpin (versão 2.1) para aquisição e processamento dos dados.

Para as análises de semi-sólidos – obtida em sonda de HR-MAS – cada amostra foi suspensa em gotas da solução de D_2O/TMSP-d_4, e colocada em um rotor cilíndrico de 50 µL, com uma de suas cavidades esférica, sendo girada a 5 kHz no ângulo mágico (54,7º), usando a sequência de pulsos compostos ZGCPPR para a pré-saturação do sinal de água. Foram acumulados 128 espectros, com 2,0 s de tempo de espera entre cada aquisição (d1), 4,1 s de tempo de aquisição (AQ) e 64 k de números de pontos na aquisição (TD) para uma largura espectral de 8012,820 Hz. Para as análises de líquidos, foram coletados 128 FIDs, com 2,0 s de tempo de espera entre cada aquisição (d1), 4,1 s de tempo de aquisição (AQ) e 64 k de números de pontos na aquisição (TD) para uma largura espectral de 8012,820 Hz.

As análises do material semi-sólido e em solução foram feitas em triplicata para quatro preparações de cada amostra (12 análises) e processadas com zero para o fator utilizado na multiplicação exponencial e referenciados usando TMSP-d_4 como uma referência interna. Todos os espectros de RMN de ^{1}H foram utilizados como variável de entrada do software Pirouette® para realizar análises quimiométricas, pela análise de componentes principais (PCA).

5.3 – Análise dos dados

Todos os dados espectrais foram convertidos para o American Standard Code for Information Interchange (ASCII) e exportados para as análises quimiométricas. As análises de componentes principais (PCA)

foram realizadas utilizando o software Pirouette® 4.0 (Infometrix, Inc., Seattle, WA).

Os ruídos de RMN e os sinais do solvente utilizado para as análises foram eliminados e, com isso, as regiões entre δ 0,70-4,30 e δ 5,10-7,50 foram selecionadas para análises estatísticas das amostras semi-sólidas, pois apresentam os sinais utilizados para a distinção quimiométrica em RMN. Da mesma forma, as regiões entre δ 0,70-2,40; δ 2,60-3,35; δ 3,45-8,10 foram selecionadas na RMN em solução.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 – Dados espectrais para a análise multivariada

Preliminarmente, os espectros de cana obtidos na sonda HR-MAS foram adquiridos utilizando duas sequências de pulso, promovendo uma comparação na sensibilidade e resolução espectral: a ZGCPPR, para pré-saturação do sinal do solvente – H_2O presente no D_2O e na amostra – eliminando a diferença populacional dos estados de *spin* e, com isso, não se dando o ajuste do ganho do receptor deste equipamento pelo sinal do solvente (H_2O), o que prejudicaria a visualização dos sinais referentes à amostra; a CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill), para uma supressão de todos os sinais que possuem um tempo de relaxação transversal (T_2) curto – macromoléculas – para uma melhor visualização dos sinais de moléculas de baixa massa molecular. Com isso, existe uma diminuição na relação sinal/ruído da amostra, pois existe uma diminuição na intensidade dos sinais correspondentes às moléculas com T_2 longo. Esta redução se dá pela consecutiva diminuição da intensidade de cada sinal oriundo das moléculas de massa molecular pequena.

Contudo, pode-se perceber uma resolução similar e melhor sensibilidade (sinal-ruído) e, com isso, melhor visualização dos sinais de cada amostra de cana quando feita a sequência de pulsos ZGCPPR, como pode ser notado na Figura 21. O ganho na intensidade pode ser verificado quando se observa uma melhor relação sinal/ruído de todo o espectro, com apenas uma pequena perda dos sinais situados entre δ 1,2 e 1,8, onde se localizam os sinais mais blindados existentes em cada amostra avaliada. Portanto, este estudo foi implementado com a sequência de pulsos ZGCPPR, para maximizar a sensibilidade e priorizar informações úteis para as análises multivariadas.

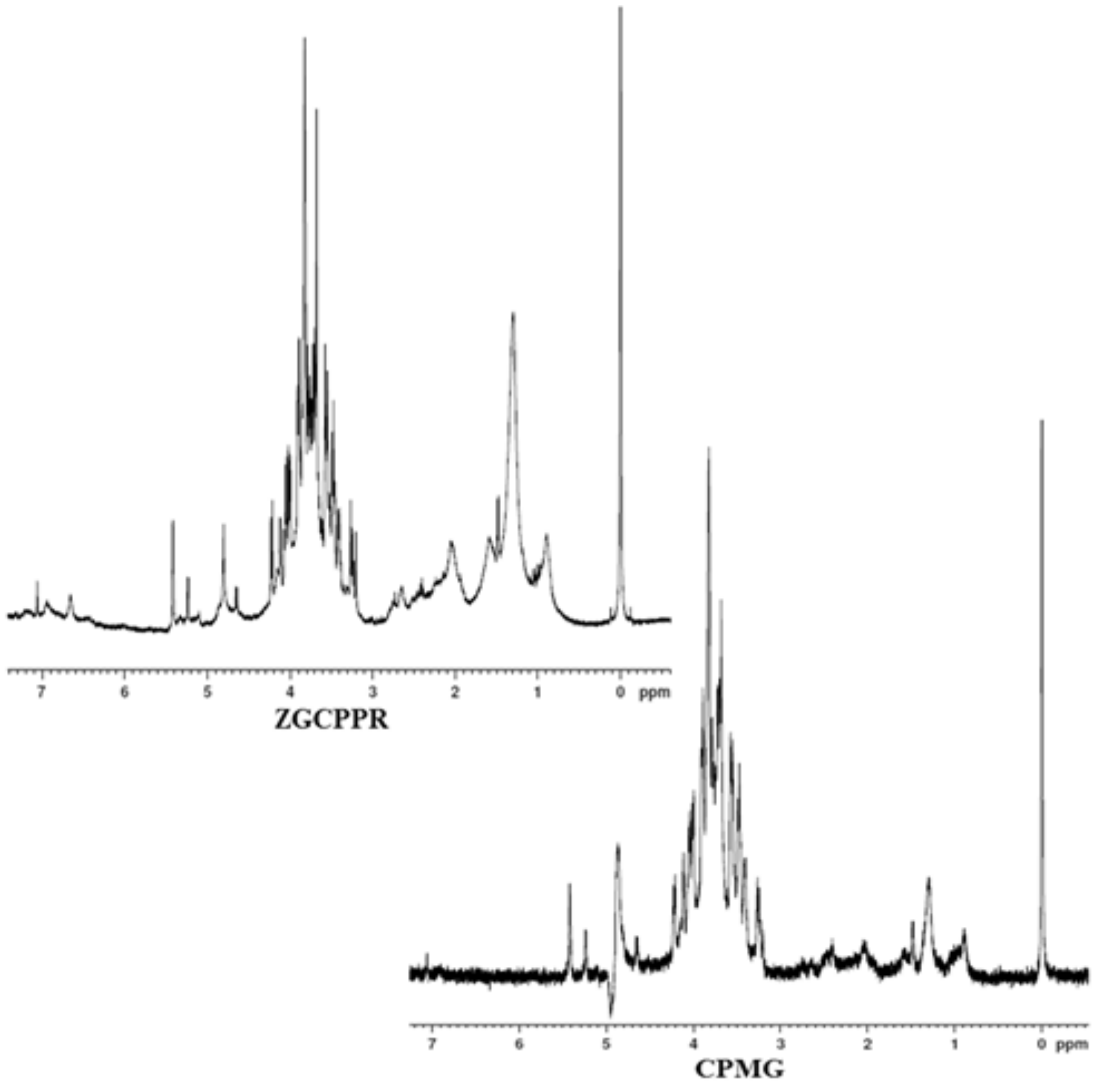

Figura 21 – Comparação da resolução espectral entre as sequências de pulsos ZGCPPR e CPMG para a cana-de-açúcar.

Os espectros de RMN de ^{1}H adquiridos com a sonda HR-MAS (Figura 22A), na sequência de pulsos ZGCPPR, mostraram sinais entre δ 0,70 e 7,50, com um perfil semelhante e apenas algumas diferenças em determinados deslocamentos químicos. Estas semelhanças são explicadas pelo fato de que as análises foram realizadas em amostras intactas, onde foram detectados, sobretudo, os metabólitos primários, e eles não mostraram uma grande variação entre os cultivares.

Espectros de RMN de ^{1}H de extratos metanólicos (Figura 22B) foram obtidos com a mesma sequência de pulsos ZGCPPR, adquiridos na sonda TBI, apresentando sinais entre δ 0,70 e 8,10. Uma grande semelhança

espectral foi encontrada entre as cultivares de cana e, principalmente, os carboidratos foram detectados, devido ao aumento de suas concentrações após a extração.

Portanto, ambos os dados espectrais de RMN de ^{1}H – em solução e semi-sólidos – mostraram, essencialmente, sinais de carboidratos (Figura 22).

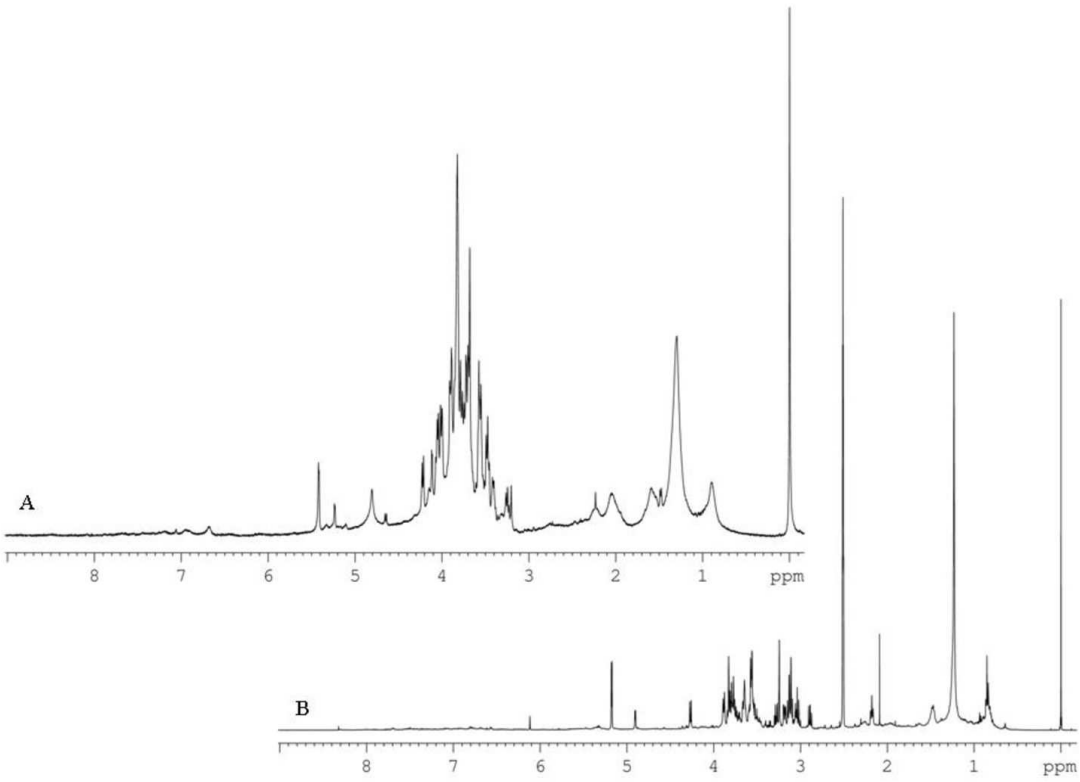

Figura 22 – Espectro de RMN das folhas da cana-de-açúcar obtidos na sonda HR-MAS (A) e na sonda TBI – em solução (B).

Os espectros de RMN de ^{1}H obtidos na sonda HR-MAS, para os materiais heterogêneos (semi-sólidos) e na sonda TBI, para amostras em solução, apresentaram uma resolução espectral comparável, confirmando o potencial da sonda HR-MAS. A utilização de materiais intactos é uma das razões pelas quais a RMN tem sido cada vez mais utilizada nos estudos de alimentos, o que minimiza o tempo de análise e descarta o pré-tratamento, geralmente realizado em outras análises técnicas, podendo provocar

alterações na composição química da amostras. No entanto, para efeitos de diferenciação das cultivares utilizando os espectros de RMN de ^{1}H, exige-se a análise quimiométrica dos dados espectrais, que torna mais fácil lidar com a grande quantidade de informação.

6.2 – Análise quimiométrica dos dados de RMN de ^{1}H para distinção dos cultivares de cana-de-açúcar

Cada matriz gerada possui 96 amostras e 7036 variáveis. A visualização de todos os espectros de RMN de ^{1}H adquiridos em ambas as sondas – HR-MAS e TBI – encontram-se destacadas nas Figuras 23 e 24, respectivamente.

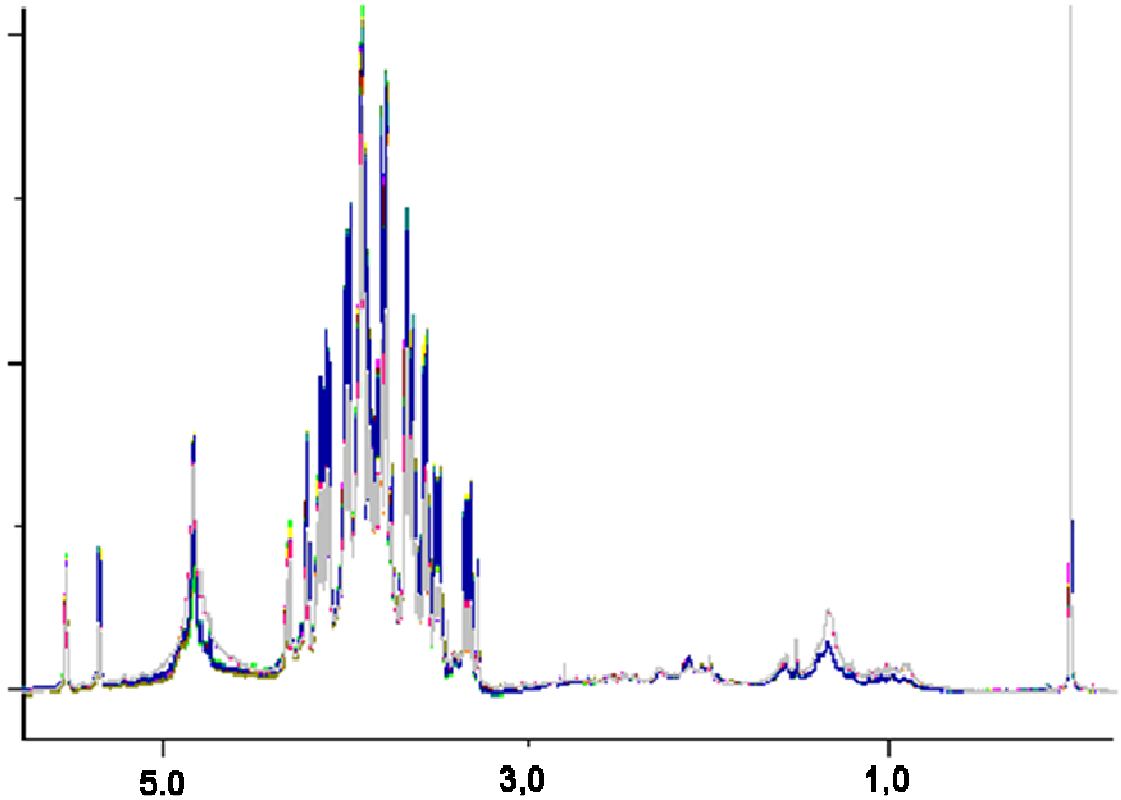

Figura 23 – Visualização dos espectros de RMN HR-MAS empregados na análise quimiométrica para cana-de-açúcar.

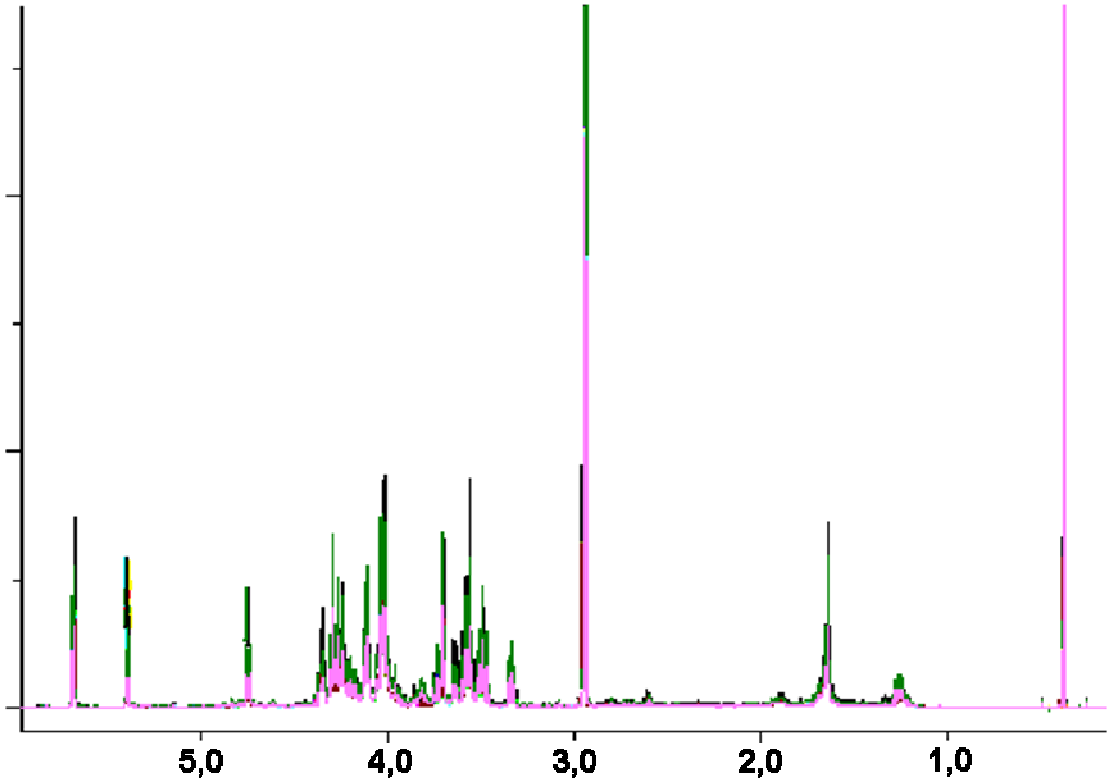

Figura 24 – Visualização dos espectros de RMN em solução empregados na análise quimiométrica para cana-de-açúcar.

Para as amostras analisadas na sonda HR-MAS, observou-se a discriminação entre as amostras de cana, conforme está apresentado no gráfico de HCA (Figura 25). Para este agrupamento hierárquico, as melhores condições foram, no pré-processamento, a centralização dos dados na média permitindo que ruídos não afetassem negativamente a análise, além de garantir que todas as variáveis fossem medidas na mesma magnitude, como é o caso das medidas espectroscópicas (RIBEIRO, 2001).

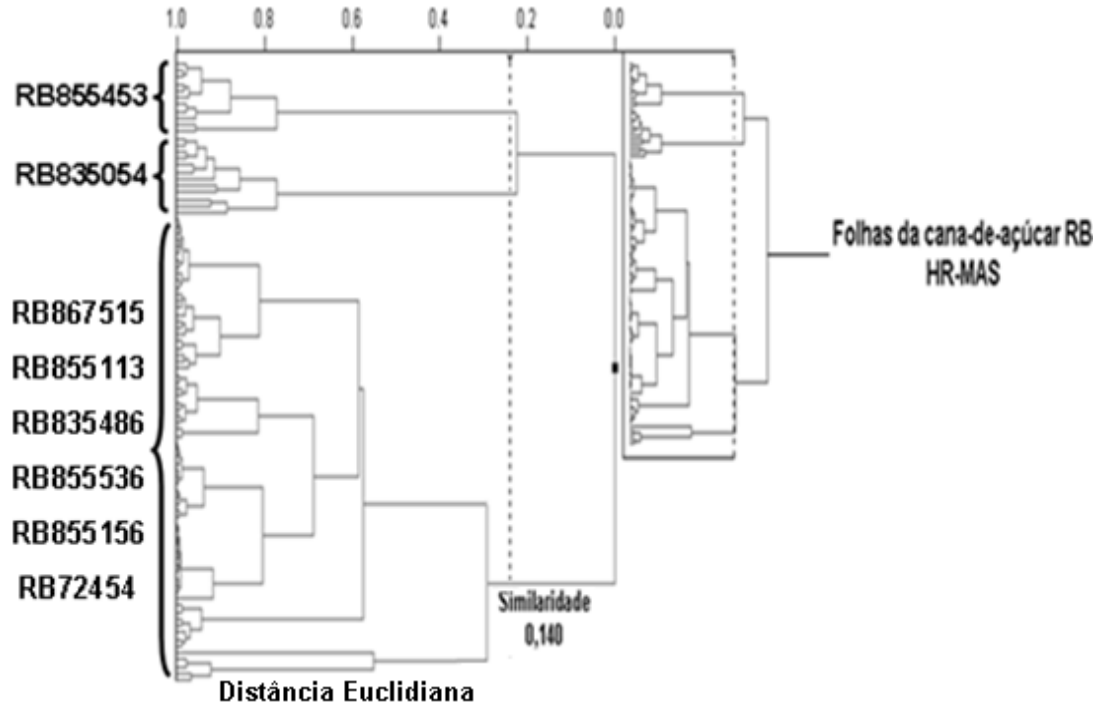

Figura 25 – Gráfico de HCA de todas as amostras de cana no estado semi-sólido, com um índice de similaridade de 0,140.

Para as amostras analisadas na sonda para amostras em solução TBI, também se observou a discriminação entre as amostras de cana, conforme está apresentado no gráfico de HCA (Figura 26). Para o agrupamento hierárquico destas amostras, as melhores condições do pré-processamento foram as mesmas feitas para as amostras semi-sólidas.

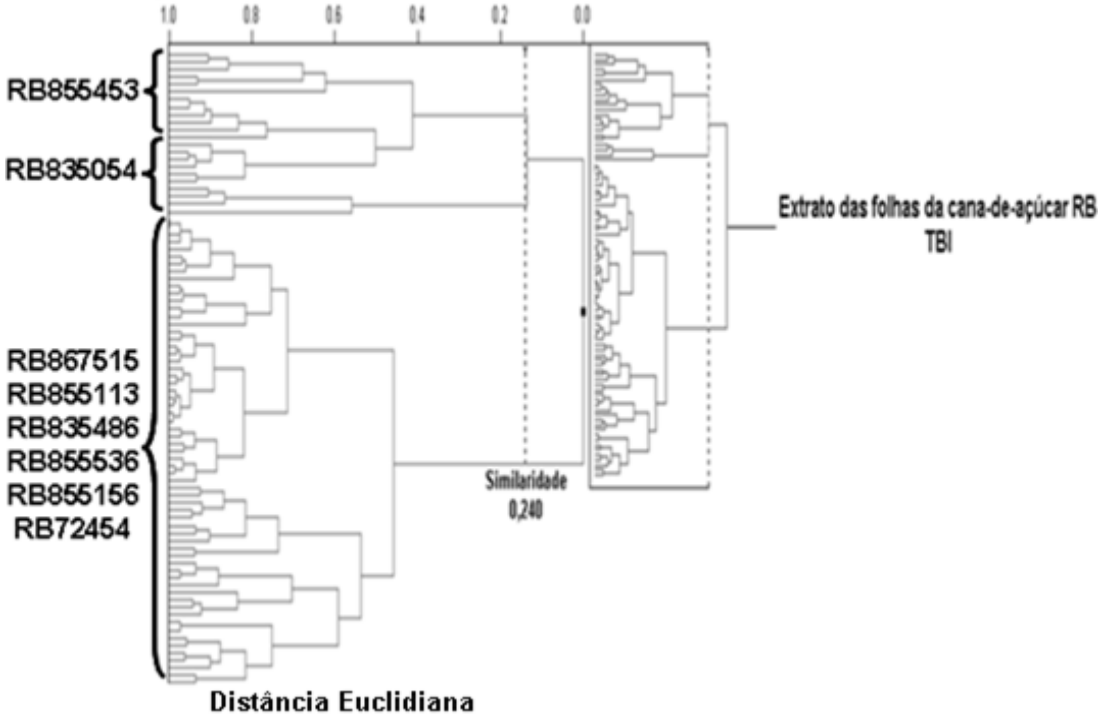

Figura 26 – Gráfico de HCA de todas as amostras de cana no estado líquido, com um índice de similaridade de 0,240.

Apesar das duas análises exploratórias terem fornecido informações relevantes quanto à distinção das variedades de cana, as amostras analisadas pela sonda HR-MAS apresentaram um comportamento mais semelhante quando comparadas às amostras analisadas na sonda de líquidos, pois para essas amostras não houve um pré-tratamento antes das análises, predominando assim, os metabólitos primários, que possuem quantidades semelhantes entre cada cultivar, apresentando com isso, uma proximidade maior entre as amostras de cana. Contudo, o estudo indica que a discriminação entre os cultivares de cana utilizando a espectroscopia de RMN de ^{1}H, tanto com a sonda HR-MAS como na sonda de líquidos TBI, é bastante viável, apesar do melhores resultados se mostrarem via sonda de líquidos, com as amostras em solução.

A análise de componentes principais (PCA) foi realizada na matriz de dados da RMN de ^{1}H HR-MAS e em solução. Vários pré-tratamentos foram testados, com os melhores resultados para ambas as matrizes de dados de RMN quando obtidos na centralização destes dados na média com

posterior aplicação da primeira derivada. O pré-processamento de centralização dos dados na média aplicado sobre as variáveis para as informações espectroscópicas foi utilizado devido ao fato de que as relações entre as amostras foram mais facilmente visualizadas, colocando a origem do grupo no centro do conjunto de dados (WOLD, 1987). Assim, os pontos de RMN foram centrados em torno da média.

Ambos os dados espectrais (RMN HR-MAS e em solução) distinguem as oito cultivares de cana (Figura 27). Entretanto, o melhor agrupamento na RMN em solução foi observado, embora os resultados tenham sido excelentes para ambas as técnicas de RMN.

Os escores da PCA das informações adquiridas de amostras semi-sólidas – sonda HR-MAS (Figura 27A) – com 85,0% do total variância em PC1 e PC2, apresentaram uma tendência na separação das cultivares de cana. Três agrupamentos naturais foram formados neste espaço bidimensional: o primeiro, com a cultivar RB835054 no lado positivo do eixo PC2 e negativo de PC1, outro com a cultivar RB855453 no lado negativo do PC2 e PC1 e outro, com as cultivares restantes (RB72454, RB835486, RB855113, RB855156, RB855536 e RB867515), ao centro dos eixos.

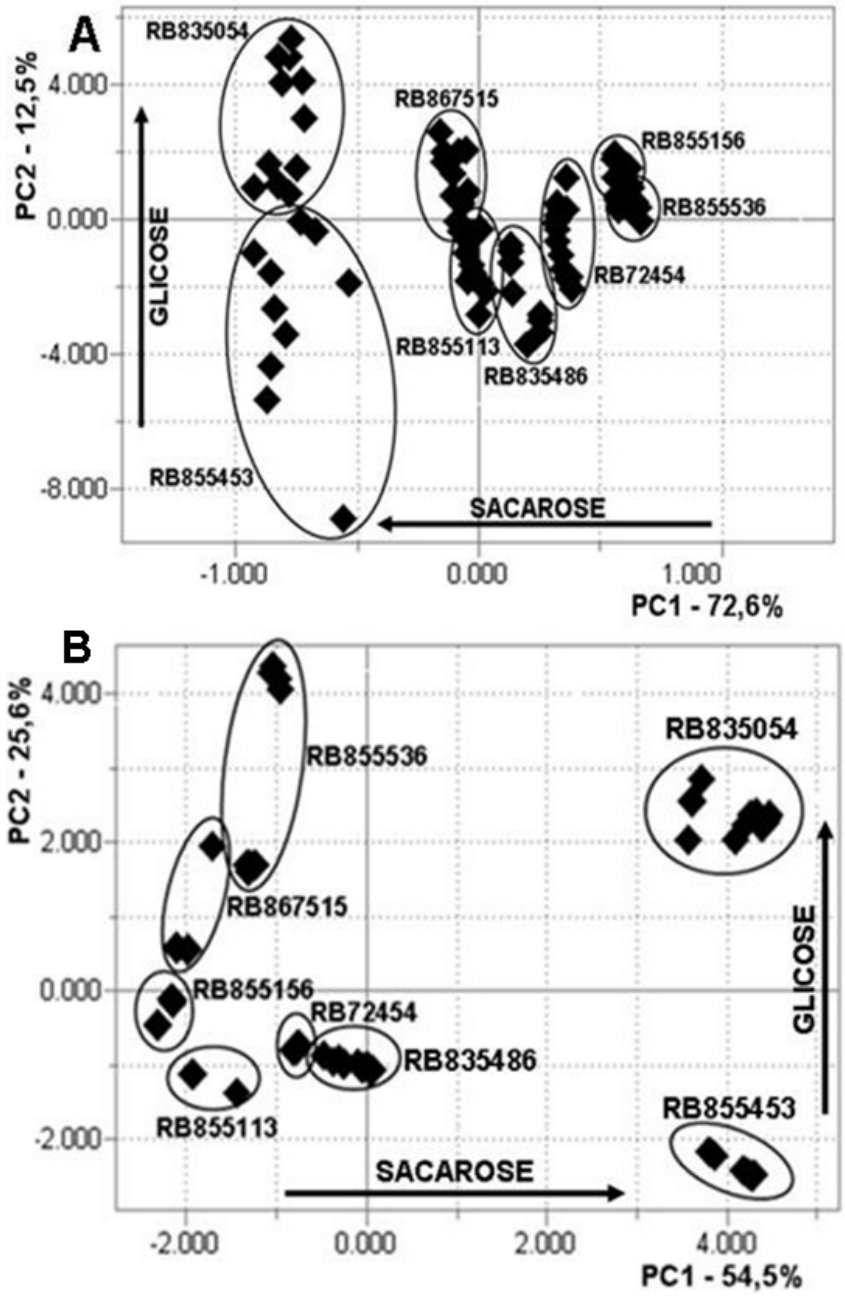

Figura 27 – Escores da PCA das oito cultivares de cana-de-açúcar adquiridos pelas sondas (A) HR-MAS – amostras heterogêneas e (B) TBI – amostras em solução.

A análise dos pesos de PC1 e PC2 dos espectros de RMN de ^{1}H adquiridos na sonda HR-MAS sugeriu que a tendência da separação em PC1 ocorreu devido aos domínios espectrais situados em δ 5,36-5,53 (sacarose). A avaliação das características das cultivares propõe a RB855453 e RB835054 como as cultivares com o maior conteúdo de sacarose, como anteriormente determinado por HOFFMANN *et al*. (2008). O

exame dos pesos negativos em PC1 corroborou para esta separação devido à diferença na proporção dos sinais em δ 5,42, correspondente ao sinal do hidrogênio anomérico de sacarose, a ser 5:1 para RB855453, em comparação aos sinais de hidrogênio anomérico de glicose (α e β) com δ 5,24 e δ 4,65, que se revelaram o teor mais expressivo de sacarose (Figura 28A).

Em PC2, os pesos responsáveis foram atribuídos na proporção dos sinais em δ 4,60-4,70 (β-glicose) e δ 5,19-5,29 (α-glicose). Uma diferença especial foi observada entre a proporção dos sinais dos hidrogênios anoméricos de sacarose e glicose para cultivar RB835054. Ambos os sinais dos açúcares apresentaram uma proporção análoga (sacarose:glicose - 1:1), correspondendo a informações adicionais sobre estas características (Figura 28B). Ao contrário desse comportamento, as cultivares restantes (RB72454, RB835486, RB855113, RB855156, RB855536 e RB867515) apresentaram a relação sacarose:glicose em torno de 3:1, como o exemplo da RB835486 (Figura 28C), e estava localizada no centro do PC2. Portanto, esse procedimento, além de distinguir as diferentes cultivares, apontou a diferença no conteúdo de glicose e sacarose entre eles.

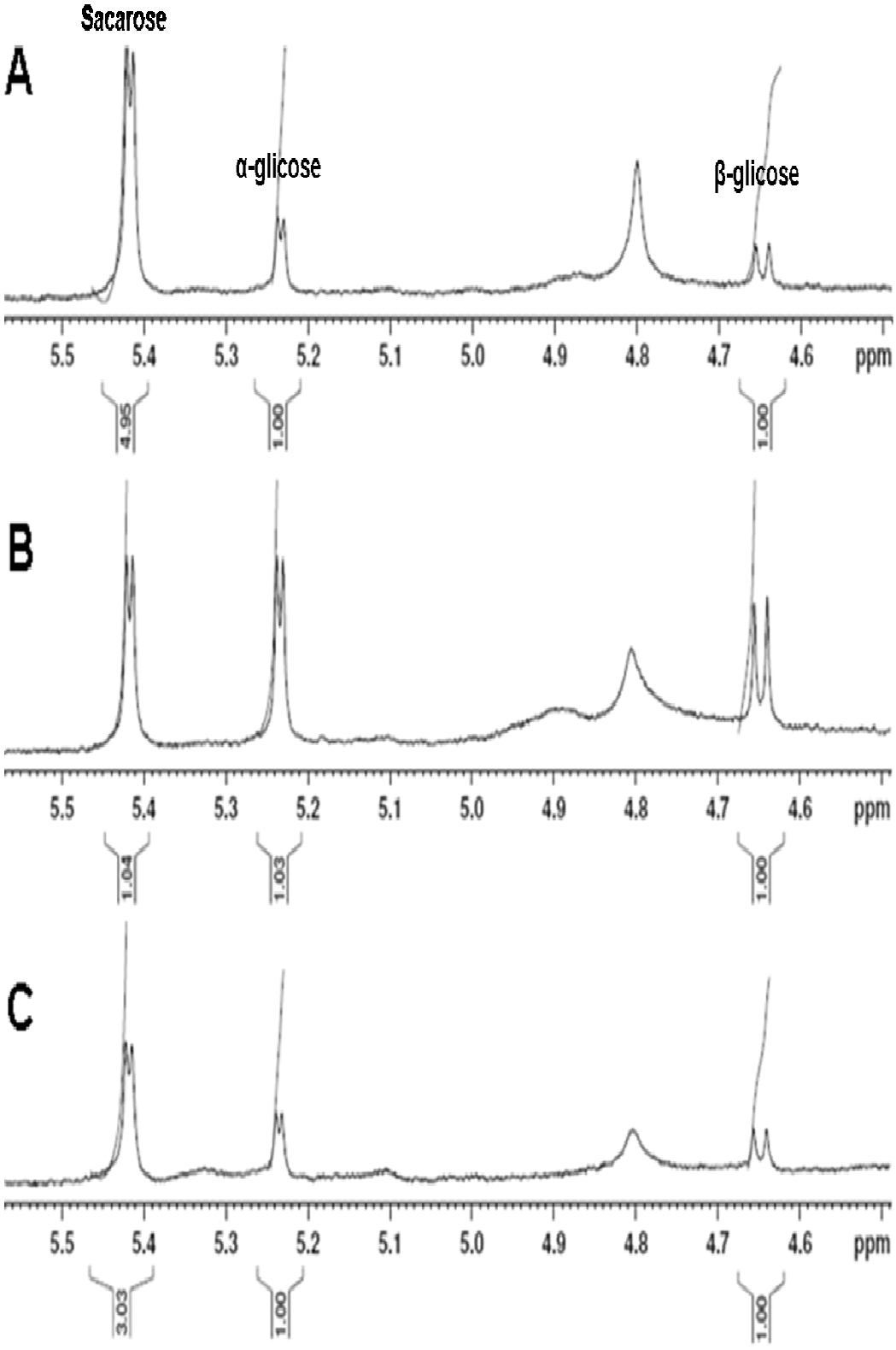

Figura 28 – Expansão dos espectros de RMN de ^{1}H dos sinais dos anoméricos das amostras de cana-de-açúcar (A) RB855453, (B) RB835054 e (C) RB835486 obtidos na sonda HR-MAS, específica para análises de semi-sólidos.

Nos espectros de RMN em solução observou-se um aumento significativo nos sinais dos metabólitos secundários, devido ao procedimento de extração. A separação entre as oito variedades de cana foi encontrada na RMN em solução, de acordo com os escores da PCA (Figura 27B), com 80,1% da variância total em PC1 e PC2. Três agrupamentos foram formados neste espaço bidimensional: o primeiro foi composto pela cultivar RB855453 no lado positivo do eixo em PC1 e negativo de PC2, o outro foi composto pela cultivar RB8355054 ao lado positivo de PC1 e PC2 e o último grupo com as cultivares restantes (RB72454, RB855156, RB835486, RB855113, RB855536 e RB867515), localizadas nos escores negativos de PC1.

A inspeção dos pesos a partir dos dados de RMN, o eixo em PC1 sugeriu que o sinal em δ 5,18 foi o responsável pela pontuação mais positiva em PC1, atribuindo às cultivares RB855453 e RB835054, de acordo com a proeminência do sinal do hidrogênio anomérico da sacarose e da minimização dos sinais da glicose (Figura 29A). Um agrupamento semelhante foi observado para as análises realizadas na sonda HR-MAS, quando RB855453 foi posicionada no lado mais negativo da PC1. No entanto, o procedimento de extração também destacou a cultivar RB855536 como um cultivar com alta quantidade de glicose, de acordo com a RMN em solução e as análises quimiométricas (Figura 27B).

A avaliação dos pesos em PC2 a partir dos dados de RMN em solução apresenta no eixo de PC2 a relevância dos sinais de RMN de ^{1}H em δ 4,90 (α-glicose) e δ 4,26 (β-glicose), correspondentes aos hidrogênios anoméricos das glicoses. Desta forma, as cultivares RB835054 e RB855536 foram apontadas como aquelas que possuem o maior conteúdo de glicose (Figura 27B e 29B), como observado nas análises realizadas na sonda HR-MAS (Figura 27A). No entanto, a RB867515 também mostrou uma quantidade expressiva de glicose, quando a extração metanólica foi processada, explicando a localização dessa cultivar próxima a RB835054 e RB855536. Outras cultivares foram localizadas no lado mais negativo do PC1, de acordo com o esperado, considerando o fato de que as quantidades de sacarose e a glicose foram observadas na região intermediária, como a RB835486 (Figura 29C).

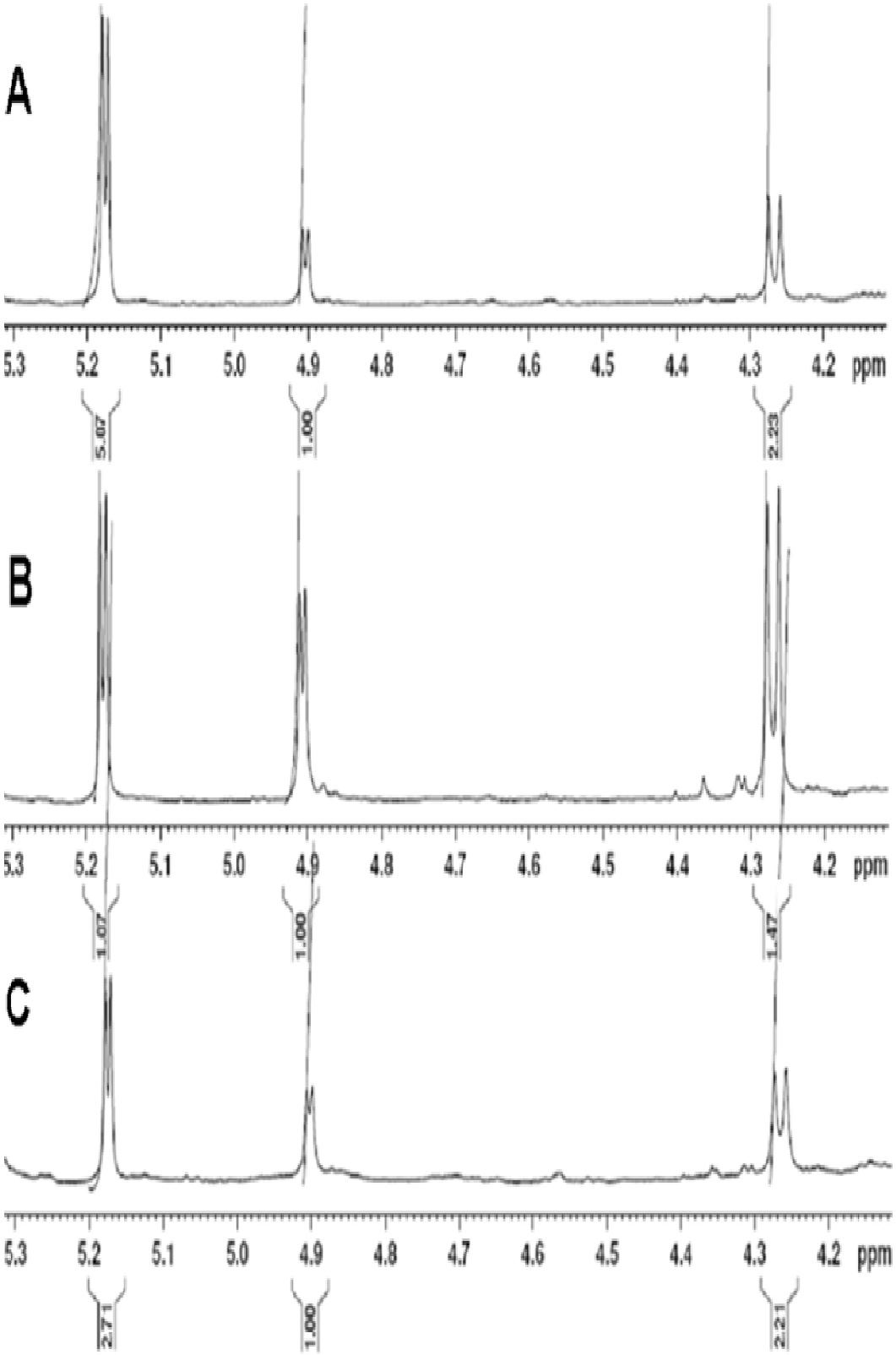

Figura 29 – Expansão dos espectros de RMN de ^{1}H dos sinais dos anoméricos das amostras (A) RB855453, (B) RB835054 e (C) RB835486 obtidos na sonda TBI, específica para amostras em solução.

Os gráficos de PC1 *versus* PC2 para as análises feitas nas sondas HR-MAS e em solução (Figura 27) representaram, concomitantemente, 85,0% e 80,1% das informações contidas nestas duas componentes principais de cada sistema. Esses valores de porcentagem cumulativa foram extraídos das curvas de variância de cada um destes sistemas (Figura 30 e 31, respectivamente), obtidas nas PCAs, somando os valores de PC1 e PC2.

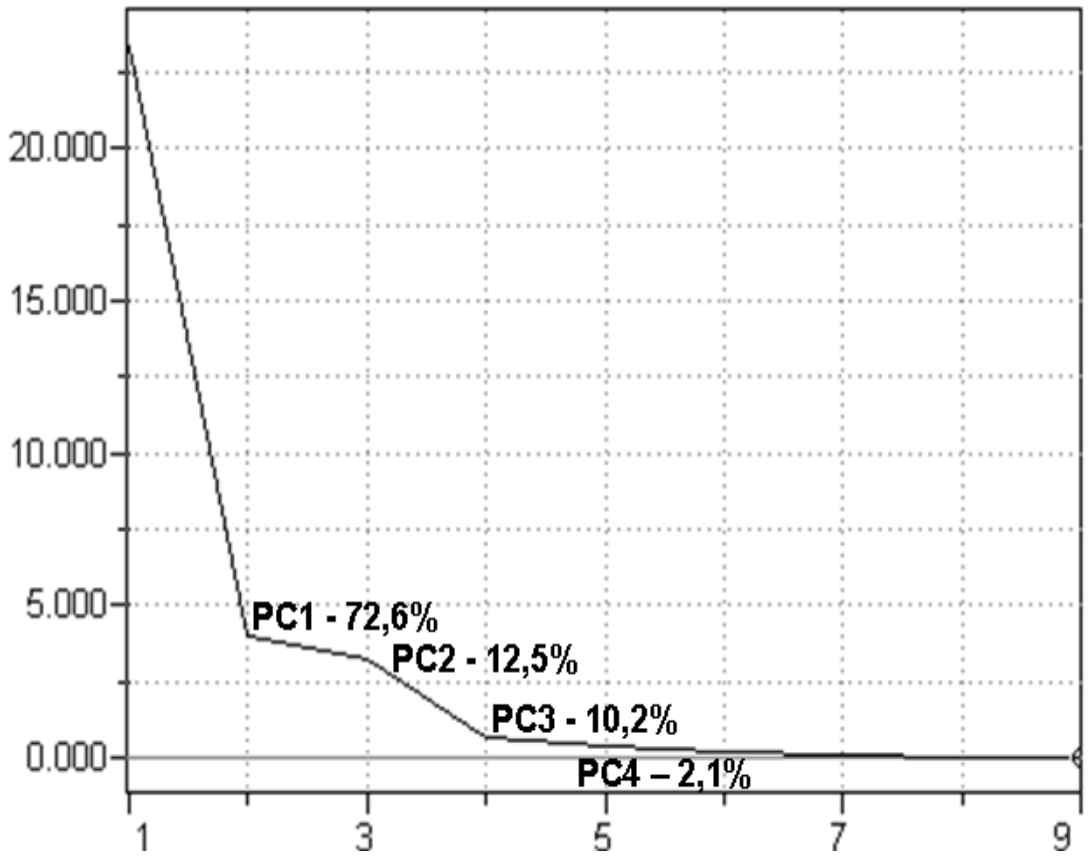

Figura 30 – Curva de variância *versus* componentes principais, extraída da análise de PCA de todas as amostras de cana estudadas através da sonda HR-MAS.

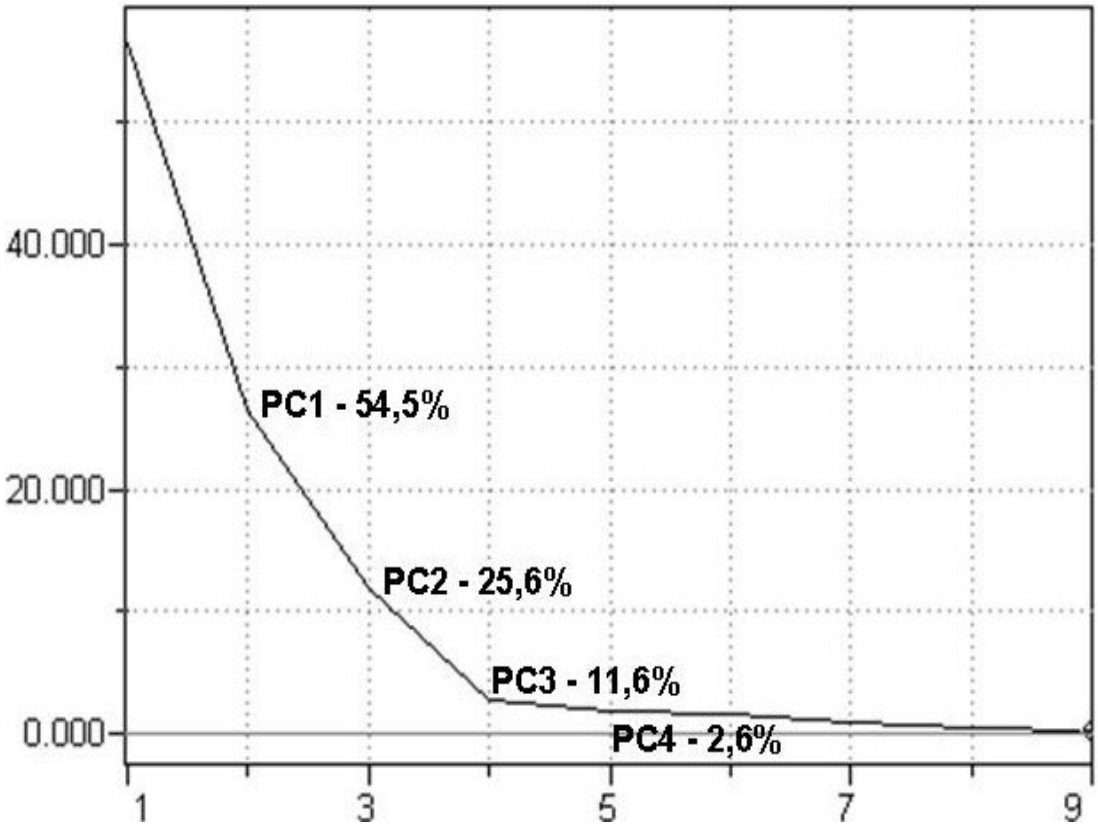

Figura 31 – Curva de variância *versus* componentes principais, extraída da análise de PCA de todas as amostras de cana estudadas através da sonda TBI.

A discriminação dos cultivares de cana-de-açúcar pela RMN HR-MAS de ^{1}H e quimiometria foi aceitável, embora resultados mais interessantes tenham sido deparados com a técnica de RMN de ^{1}H em solução. A análise do material intacto é, sem dúvida, um amplo atrativo da técnica de HR-MAS, no entanto, as dificuldades de aglomeração das replicatas implicam no menor percentual de disposição dos grupos de similaridade quando comparadas as duas técnicas utilizadas.

Uma vez que os produtores de cana podem necessitar de vários fatores para escolherem as melhores variedades para o cultivo, tais como: resistência a doenças, cultivo e ciclos de colheita, a resistência ao estresse hídrico, dentre outros, as informações sobre o conteúdo de sacarose pode ser especialmente útil para a seleção destas cultivares (MELO *et al*., 2006) e o presente trabalho pode fornecer este conhecimento.

7. CONCLUSÃO

Os grãos das cinco diferentes amostras de feijão analisadas apresentam diferenças na composição da verbascose, estaquiose e rafinose. Portanto, os conteúdos destes compostos apresentam variações em função do genótipo. Destaca-se, que os feijões Pérola e Tesouro, analisados sem pré-tratamento (sonda HR-MAS), foram os que apresentaram os menores teores de estaquiose e verbascose, e de rafinose, respectivamente. Esse fato vem de encontro aos objetivos da EMBRAPA Arroz e Feijão, que está desenvolvendo variedades de feijões que possuam teores desses oligossacarídeos que os classifiquem como alimentos funcionais e não antinutricionais.

A análise dos extratos realizada na sonda para análises em solução – TBI – demonstrou que colocar o feijão de molho, antes do cozimento, é uma estratégia interessante para eliminar parte desses oligossacarídeos, desde que a água seja descartada. O processamento doméstico de cocção do feijão também ocasionou uma redução nos níveis dos compostos antinutricionais rafinose, estaquiose e verbascose, porém, a remoção foi mais efetiva no tratamento onde a água da imersão não absorvida foi rejeitada.

Os dados referentes aos feijões após a imersão (molho) ou o processamento doméstico de cocção (cozimento) são relevantes, pois demonstram que a técnica é efetiva na redução dos compostos anti-nutricionais. Os efeitos observados na composição centesimal variaram com as cultivares de feijão comum e com os processamentos aplicados, assim, generalizações não devem ser feitas para todas as qualidades de feijão, havendo diferenças nas respostas de extração.

Embora alguns feijões tenham apresentado um conteúdo elevado dos oligossacarídeos estudados (rafinose, estaquiose e verbascose), a presença destes fatores antinutricionais exige estudos subsequentes de sua biodisponibilidade.

Destaca-se que a técnica de HR-MAS, por avaliar a amostra *in natura*, é aquela que apresenta os valores mais próximos do conteúdo total

desses oligossacarídeos, uma vez que nenhum processo de extração foi utilizado. O mesmo resultado só pode ser obtido na sonda de amostras em solução (TBI) se a extração dos compostos avaliados for completa, o que dificilmente ocorre.

Nas análises feitas para a cana-de-açúcar, o perfil dos metabólitos realizado pela RMN de ^{1}H em amostras heterogêneas e em solução associada a análises quimiométricas contribuiu para a caracterização e discriminação dos cultivares quanto aos teores de açúcares. Ambos os métodos foram úteis para análises da cana e permitiram uma satisfatória distinção entre as variedades, embora melhores resultados foram alcançados nas informações de RMN de ^{1}H em solução.

Em comparação a outras técnicas tradicionais, a combinação da espectroscopia de RMN com análise quimiométrica mostrou ser um método rápido e eficaz para diferenciação e caracterização de cultivares de cana-de-açúcar, podendo ser útil para classificar amostras desconhecidas ou selecionar melhores genótipos para cultivo. Além disso, o teor de açúcar foi determinado por estas técnicas, permitindo sua indicação como uma possível ferramenta analítica para estudos de cultivares de cana em relação aos açúcares.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCANTARA, G. B.; BARISON, A.; FERREIRA, A. G. Chemotaxonomic Discrimination of Lichens by 1H NMR, solution and HR-MAS, and Chemometric Analysis, *Ann. Magn. Reson*., v. 5, p. 1-4, 2006.

ALCANTARA, G. B.; HONDA, N. K.; FERREIRA, M. M. C.; FERREIRA, A. G. Chemometric analysis applied in 1H HR-MAS NMR and FT-IR data for chemotaxonomic distinction of intact lichen samples, *Analytica Chimica Acta*, v. 595, p. 3-8, 2007.

ALLI, I., BAKER, B. E. Constitution of leguminous seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 32, n. 6, p. 588-592, 1981.

ALMEIDA, M; ROCHELLE, L. A.; CROCOMO, O. Chave analítica para determinação de dez variedades de cana-de-açúcar *(Saccharum* spp.), *Journal of Agricultural Science*, Piracicaba, **v.** 52, n. 1, p. 16-19, 1995.

BARAMPAMA, Z., & SIMARD, R. E. Nutrient composition, protein quality and antinutritional factors of some varieties of dry beans (*Phaseolus vulgaris*) grown in Burundi, *Food Chemistry,* v. 47, n. 2, p. 159-167, 1993.

BARAMPAMA, Z. & SIMARD, R.E. Oligosaccharide, antinutritional factors, and protein digestibility of dry beans as affected by processing, *Journal of Food Science*, vol. 59, p. 833-838, 1994.

BEEBE, K. R.; PELL, R. J.; SEASHOLTZ, M. B. Chemometrics: A pratical guide, New York, John Wiley & Sons, 1998.

BLOTTNITZ, H. V. & CURRAN, M. A. A review of assessments conducted on bio-ethanol as a transportation fuel from a net energy, greenhouse gas, and environmental life cycle perspective, *Journal of Cleaner Production*, v. 15, p. 607-619, 2007.

BRESSANI, R. Grain quality of common beans, *Food Reviews International***,** v. 9, p. 237-297, 1993.

BRITO, A. S.; LIBARDI, P. L.; GHIBERTO, P. J. Componentes do balanço de água no solo com cana-de-açúcar, com e sem adubação nitrogenada, *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 33, n. 2, p. 295-303, 2009.

CLARIDGE, T. D. W. High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry, Oxford, Tetrahedron Organic Chemistry Series, v. 19, p.382, 1999.

COATES, G.; XIAO, L.; PRAMMER, M. G. NMR Logging Principles and Applications, Halliburton Energy Services, 1°e dição, 1999.

DESHPANDE, S. S. Food legumes in human nutrition: a personal perspective. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 32, n. 4, p. 333-363, 1992.

DESHPANDE, S. S.; KADAM, S. S.; SALUNKHE, D. K. Soaking, p. 135. *In* D.K. Salunkhe and S.S. Kadam. CRC Handbook of World Food Legumes: Nutritional Chemistry, *Processing Technology and Utilization*, vol. III, CRC Press, Florida, 1989.

FARIA, A. Y. K.; ALBUQUERQUE, M. C. F.; CASSETARI, D. N., *Revista Brasileira de Sementes,* v. 10, n. 2, p. 55-65, 1988*.*

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

GIL, V. M. S.; GERALDES, C. F. G. C. Ressonância Magnética Nuclear, Fundamentos, métodos e aplicações, Fundação Calouste Gulbekian, 2°edição, p. 22-60, 2002.

GOLDBARG, M. C. & LUNA, H. P. L. Otimização Combinatória e Programação Linear: Modelos e Algoritmos, Rio de Janeiro: Campus, 2000.

GOLDEMBERG J; COELHO, S. T.; NASTARI, P. M.; LUCON, O. Ethanol learning curve-the Brazilian experience, *Biomass Bioenergy*, v. 26, p. 301-304, 2004.

GOLDEMBERG, J. Ethanol for a Sustainable Energy Future**,** *Science* v. 315, p. 808, 2007.

GUILLON, F. C., Carbohydrate fractions of legumes: uses in human nutrition and potential for health, *Britain Journal Nutritional*, v. 88, n. 3, p. 293-306, 2002.

HALOUSKA, S.; POWERS, R. Negative impact of noise on the principal component analysis of NMR data, *Journal Magnetic Resonance*, v. 178, p. 88-95, 2006.

HARDEE, J. R., Chemistry and Flatulence: an introductory enzyme experiment, *Journal of Chemical Education,* v. 77, p. 498**,** 2002.

HARRISON, J. & DAVIS, M. J. Infectivity titrations of *Clavibacter xyli* susbp. xyli and sugarcane cultivars differing in susceptibility t ratoon stunting disease *Plant Disease*, v. 70, p. 556-558, 1986.

HAZELL, P. A win–win approach that can serve the poor and the environment *Developing bioenergy*, *International Food Policy Research Institute*, v. 14, 2006.

HIBBERT, D. B. Genetic Algorithms in Chemistry, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems,* v. 19, p. 277-293, 1993.

HOFFMANN, H. P.; SANTOS, E. G. D.; BASSINELO, A. I.; VIEIRA, M. A. S. Variedades RB de Cana-de-açúcar, Araras, 1° e dição, CCA/UFSCar, 2008.

JAMES, T. Fundamentals of NMR, *Department of Pharmaceutical Chemistry*, University of California San Francisco, p. 52-88, 1998.

JOHNELS, D.; EDLUND, U.; GRAHN, H.; HELLBERG, S.; SJOSTROM, M.; WOLD, S.; CLEMENTI, S.; DUNN, W. J. Clustering of aryl C-13 nuclear magnetic-resonance substituent chemical-shifts a multivariate data-analysis using principal components**,** *Journal of Chemical Society***,** v. 2, p. 863-871, 1983.

JOLLIFFE, I. T. Principal Component Analysis, Series: Springer Series in Statistics, Springer, Nova Iorque, p. 487, 2002.

KANAMORI M.; IKEUCHI, T.; KOTARU, M.; Aminoacid composition of protein fractions extrated from Phaseolus beans on the Field beans, *Journal of Food Science*, v. 47**,** n. 6, p. 1991-1994, 1982.

KEUN, H.C.; EBBELS, T.M.D.; ANTTI, H.; BOLLARD, M.E.; BECKONERT, O.; HOLMES, E.; LINDON, J.C.; NICHOLSON, J.K., Improved analysis of multi-variate data by variable stability scaling: application to NMR-based metabolic profiling, *Analitica Chimica Acta*, v. 490, p. 265-276, 2003.

KILMER, O.L.; SEIB, P.A.; HOSENEY, R.C., Effects of minerals and apparent phytase activity in the development of the hard to cook state of beans, *Cereal Chemistry*, v. 71**,** p. 476-482, 1994.

KOONS, J.M.; ELLIS, P.D., Applicability of factor-analysis in solid-state NMR, *Analitical Chemistry,* v. 67, p. 4309-4315, 1995.

LARSEN, A. L., Isoenzymes and varietal identification, *Seed World*, v. 104, n. 8, p. 5-6, 1969.

LE GALL, G.; PUAUD, M.; COLQUHOUN, I. J. Discrimination between Orange Juice and Pulp Wash by ^{1}H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: Identification of Marker Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, p. 580-588, 2001.

LESLIE, J. K. & WILSON, G. L., Productivity trends in sugarcane in the wet tropics, *Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technology,* v. 19, p. 21-29, 1997.

LIÃO, L. M.; CHOZE, R; CAVALCANTE, P. P. A.; SANTOS, S. C.; FERRI, P. H.; FERREIRA, A. G., Perfil Químico de Cultivares de Feijão (Phaseolus vulgaris) pela Técnica de High Resolution Magic Angle Spinning (HR-MAS), *Química Nova*, paper in press.

LIN, M; SHAPIRO, M. J., Mixture analysis in combinatorial chemistry. Application of diffusion-resolved NMR spectroscopy, *Journal Organic Chemistry*, v. 61, p. 7617-7619, 1996.

MACEDO, I. C., Greenhouse gas emissions and energy balance in bioethanol production and utilization in Brazil, *Biomass and Bioenergy*, v. 14, n. 1, p. 77-81, 1998.

MACOMBER, R. S., A complete Introduction to Modern NMR Spectroscopy, John Wiley and Sons, 1° edição, p. 16 -38, 1998.

MANLY, B. J. F. Métodos Estatísticos Multivariados: uma introdução, 3° edição, Porto Alegre, Bookman, p. 80, 2005.

MANLY, B. F. J. Multivariate statistical methods, 2° edição, Nova Iorque, Chapman & Hall, p. 215, 1994.

MARTENS, H; NAES, T., Multivariate Calibration, John Wiley & Sons, Nova Iorque, p. 28-42, 1989.

MEHRA, R.; KELLY, P. Milk oligosaccharides: structural and technological aspects, *International Dairy Journal*, v. 16, n. 11, p. 1334-1340, 2006.

MELO, L. J. O. T.; OLIVEIRA, F. J.; BASTOS, G. Q.; FILHO, C. J. A.; REIS, O. V., Interação Genótipo x ciclos de colheita de cana-de-açúcar da zona da mata norte de Pernambuco, *Bragantina*, v. 65**,** n. 2, p. 197-205, 2006.

MITCHELL, T. N.; COSTISELLA, B., NMR – From Spectra to Structures, 2°edição, Springer Berlin Heidelberg, p. 11-34, 2007.

MONTEIRO, M.R.; AMBROZIN, A.R.P.; LIÃO, L.M.; BOFFO, E.F.; TAVARES, L.A.; FERREIRA, M.M.C.; FERREIRA, A.G., Study of Brazilian Gasoline Quality Using Hydrogen Nuclear Magnetic Resonance (^{1}H NMR) Spectroscopy and Chemometrics, *Energy & Fuels*, v. 23. p. 272-279, 2009.

MONTEIRO, M.R.; AMBROZIN, A.R.P.; LIÃO, L.M.; FERREIRA, A.G., Determination of biodiesel blend levels in different diesel samples by ^{1}H NMR, *Fuel,* Guildford, v. 88, p. 691-696, 2009.

MOREIRA, J. R. & GOLDEMBERG, J., The alcohol Program, *Energy Policy,* v. 27p. 229, 1999.

NASS, L. L.; PEREIRA, P. A. A,; ELLIS, D., Biofuels in Brazil: an overview, Crop Science, v. 47, p. 2228–2237, 2007.

NIELSEN, S. S., Digestibility of legume proteins, *Food Technol*ogy, v. 45**,** n. 6, p. 112-114, 1991.

OLIVEIRA, A.C., The elimination of the not absorved water during common bean soaking resulted in weight gain in rats*, Revista Nutricional de Campinas*, v. 14**,** n. 2, p. 153-155, 2001.

OTTO, M., Chemometrics – Statistics and computer application in Analytical chemistry, Willey-VCH, v. 2, 1999.

PAVIA, D. L., LAMPMAN, G. M., KRIZ, G. S., Introduction to spectroscopy: a guide for students of organic chemistry, 2° edição, Nova Iorque, Harcourt Brace College Publishers, p. 511, 1996.

PAULI, G. F.; JAKI, B.U., LANKIN, D.C., Quantitative ^{1}H NMR: development and potential of a method for natural products analysis, *Journal Natural Products,* v. 68, p. 133-149, 2005.

PEARSON, K., On Lines and Planes of Closest Fit to Systems of Points in Space, *Philosophical Magazine,* v. 2, n. 6, p. 559-572, 1901.

PEREIRA, J. C. R., Análise de Dados Qualitativos: Estratégias Metodológicas para as Ciências da Saúde, Humanas e Sociais, 2° edição, São Paulo, p. 17-28, 1999.

PEREIRA, P.A.A., Fixação biológica de nitrogênio do feijoeiro, *Informe Agropecuário*, v. 8, n. 90, p. 41-46, 1982.

PINTO, D. O. S., Emaranhamento Térmico e Simulações Quânticas de Sistemas Magnéticos por Ressonância Magnética Nuclear, *Tese de Doutorado*, Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas, Rio de Janeiro, 2009.

PIROUETTE, Manual do software, versão 3.02. Infometrix, Woodinville, 1990-2001.

POTER, R.S.; KAPLAN, J.L.; HOMEIER, B.P.; BEERS, M.H., The Merck Manual of Patient Symptoms, Division of Merck & Co., Whitehouse Station, Nova Iorque, p. 415-418, 2008.

REEDY, N. R. R., PIERSON, M. D., & SATHE, S. K., Chemical, nutritional and physiological aspects of dry bean carbohydrates – a review, *Food Chemistry*, v. 13, p. 25-68, 1984.

REDDY, N. R.; SALUNKHE, D. K., Changes in oligosaccharides during germination and cooking of black gram and fermentation of black gram/rice blend, *Cereal Chemistry*, v. 57, p. 354-360, 1980.

RIDESA – Rede Interuniversitária de Desenvolvimento do Setor ucroalcooleiro, Histórico do RIDESA. Acesso http://www.ridesa.com.br/, October 1st 2009, 9:32 a.m.

RIBEIRO, F. A. L., Aplicação de métodos de análise multivariada no estudo de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, *Dissertação de Mestrado*, IQ-UNICAMP, p. 5-18, 2001.

RIBEIRO, N. D.; CARGNELUTTI FILHO, A.; NERISON, L. P.; ROSA, S. S., Padronização de metodologia para avaliação do tempo de cozimento dos grãos de feijão, *Tecnologia de Pós-colheita*, v. 66**,** n. 2, p. 335-346, 2007.

RODRIGUES, J. A.; RIBEIRO, N. D.; LONDERO, P. M. G.; CARGNELUTTI-FILHO, A; GARCIA, D. C. Correlação entre absorção de água e tempo de cozimento de cultivares de feijão. *Ciência Rural,* v. 35, n. 1, p. 209-214, 2005.

SACCO, A.; BOLSI, I. N.; MASSINI, R.; SPRAUL, M.; HUMPFER, E.; GHELLI, S., Preliminary investigation on the characterization of durum wheat flours coming from some areas of south Italy by means of ^{1}H high-resolution

magic angle spinning nuclear magnetic resonance, *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* v. 46, n. 10, p. 4242–4249, 1998.

SAT, I. G.; KELES, F. The effect of soaking and cooking on the oligosaccharide content of seker a dry bean variety (*Phaseolus vulgaris, L*) grown in Turkey, Pakistan, *Journal of Nutrition*, v. 5, n. 1**,** p. 206-208, 2002.

SATHE, S.K., DESHPANDE, S.S., SALUNKHE, D.K., Dry beans of *Phaseolus, Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 20**,** n. 1, p. 1-46, 1984.

SCHNEIDER, B., Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy in biosynthetic studies, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, v. 51, p. 155-198, 2007.

SILVERSTEIN, R. M.: WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J., Identificação espectrométrica de compostos orgânicos, LCT – Livros técnicos e científicos, editora S.A., 7°edição, p. 460, 2006.

SHAMSIPUR, M.; TALEBPOUR, Z.; BIJANZADEH, H.R.; TABATBAEI, S., Monitoring of ampicillin and its related substances by NMR, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* v. 30, p.1075-1085, 2002.

SHAW, J.; DULLY, M.; STARK, F. Interdependence and performance for group work: Main and congruence affects on satisfaction and performance of group members, *Journal of Management*, v. 26, p. 259-297, 2000.

STOYANOVA, R.; BROWN, T.R., NMR spectral quantitation by principal component analysis, *NMR in Biomedicine,* v. 14, p. 271-277, 2001.

TRUGO, L. C., Oligosaccharide composition and trypsin inhibitory activity of *Phaseolus vulgaris* and the effect of germination on the a-

galactoside composition and fermentation in the human colon, *Food Chemistry*, v. 36, p. 53-61, 1990.

VALENTIN, J.L., Ecologia Numérica: Uma Introdução à Análise Multivariada de Dados Ecológicos, Rio de Janeiro, p. 117, 2000.

VALVERDE, J. & THIS, H., ^{1}H NMR Quantitative Determination of Photosynthetic Pigments from Green Beans (*Phaseolus vulgaris* L.), *Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.* 56, p. 314-320, 2008.

VAN DER POEL, A. F., DELAERT, l. M., NOREL van, A., HELSPER, J. P. The digestibility in piglets of faba bean (*Vicia faba* L.) as affected by breeding towards the absence of condensed tannins. *British of Journal Nutrition*, vol. 68 (3), p. 793-800, 1992.

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

WELJIE, A. M.; NEWTON, J.; JIRIK, F. R.; VOGEL, H. J., Evaluating low-intensity unknown signals in quantitative proton NMR mixture analysis, *Analytical Chemistry*, v. 80, p. 8956-8965, 2008.

WILLIAMS, P.C., Commercial Near-infrared Reflectance Analyzers. In: Near-infrared Technology in the Agricultural and Food Industries, *American Association of Cereals Chemists*, Saint Paul, 1987.

WINDIG, W.; ANTALEK, B.; LIPPERT, J. L.; BATONNEAU, Y.; BREMARD, C., Combined use of conventional and second-derivative data in the SIMPLISMA self-modeling mixture analysis approach, *Analytical Chemistry*, v. 74, p. 1371–1379, 2002.

WOLD, S., Principal Component Analysis, *Chemometrics and Intelligent Laboratory System*, v. 2, p. 37-52, 1987.

CURRICULUM VITAE

Elenilson de Godoy Alves Filho

Dados Pessoais

Nome Elenilson de Godoy Alves Filho

Filiação Elenilson de Godoy Alves e Rosângela Dias Alves

Nascimento 25/07/1979 - Goiânia/GO - Brasil

Carteira de Identidade 3691940 SSP - GO - 18/10/1994

CPF 886932951-87

Endereço residencial Alameda Coronel Joaquim Bastos, n.169
Setor Marista - Goiânia
74175-150, GO - Brasil
Telefone: (62) 33562176

Endereço profissional Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química I, Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear.
Campus Samambaia
74001-970, Goiânia, GO - Brasil
Telefone: (62) 96491827

Endereço eletrônico
E-mail para contato: elenilson.godoy@yahoo.com.br

Formação Acadêmica/Titulação

2008 - 2010 Mestrando em Química.
Universidade Federal de Goiás, UFG, Goiânia, Brasil
Título: Ressonância Magnética Nuclear e quimiometria como ferramentas de distinção e quantificação de metabólitos de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) e feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*).
Orientador: Luciano Morais Lião
Bolsista do(a): Universidade Federal de Goiás

2004 - 2008 Graduação em Química - Bacharelado
Universidade Federal de Goiás – UFG – Goiânia, Brasil

Formação complementar

2010 - 2010 Curso de curta duração em Teoria básica de RMN.
Universidade de Brasília, UnB, Brasília, Brasil
Palavras-chave: RMN

2010 - 2010 Curso de curta duração em RMN para Determinação da Conformação de Moléculas.
Universidade de Brasília, UnB, Brasília, Brasil
Palavras-chave: RMN

2007 - 2007 Curso de curta duração em Cromatografia Líquida (HPLC).
Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial, SENAI, Brasil
Palavras-chave: HPLC

2006 - 2006 Curso de curta duração em Sistemática e Identificação da Família Rubiaceae.
Universidade Federal de Goiás – UFG – Goiânia, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade Federal de Goiás - UFG

Vínculo institucional

2008 - Atual Vínculo: Mestrado Acadêmico, Enquadramento funcional: Desenvolvimento de Pesquisas, Carga horária: 40, Regime: Dedicação Exclusiva

2008 - 2008 Vínculo: Monitor, Enquadramento funcional: Monitoria, Carga horária: 12, Regime: Parcial

2007 - 2008 Vínculo: Iniciação Científica, Enquadramento funcional: Desenvolvimento de pesquisa, Carga horária: 17, Regime: Parcial

2007 - 2007 Vínculo: Iniciação Científica Voluntária, Enquadramento funcional: Desenvolvimento de pesquisa, Carga horária: 40, Regime: Integral

Atividades

11/2007 - 07/2008 Pesquisa e Desenvolvimento, Instituto de Química

Linhas de Pesquisa: Análise Espectrofotométricas

04/2007 - 06/2007 Pesquisa e Desenvolvimento, Instituto de Química , Departamento de Química Orgânica

Linhas de Pesquisa:

RMN aplicada a Quantificação e Quimiometria

02/2007 - 11/2007 Pesquisa e Desenvolvimento, Instituto de Química

Linhas de Pesquisa:

Bioatividade Molecular

Linhas de pesquisa

1. Análise Espectrofotométrica

2. Bioatividade Molecular

3. RMN aplicada a Quantificação e Quimiometria

Áreas de atuação

1. Monitoria em Química Orgânica

2. Química de Produtos Naturais (CG-EM)

3. Instrumentação Analítica (Espectrofotometria)

4. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Idiomas

Inglês Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Escreve Razoavelmente, Lê Bem

Produção em C, T& A

Produção bibliográfica

Artigos aceitos para publicação

1. ALVES FILHO, E. G., SILVA, L. M. A., CHOZE, R., LIAO, L. M., HONDA, N. K., ALCANTARA, G. B.

Cultivar Distinction by 1H HR-MAS and in Solution NMR and Chemometric. *Applied Spectroscopy*, 2010.

Palavras-chave: NMR, sugarcane, chemometric analysis

Áreas do conhecimento: RMN

Setores de atividade: Pesquisa e desenvolvimento científico

Referências adicionais: Inglês.

2. COSTA da, D. P., ALVES FILHO, E. G., SILVA, L. M. A., SANTOS, S. C., Passos, X. P., Silva, M. R. R., Seraphin, J. C., FERRI, P. H.

Influence of Fruit Biotypes on the Chemical Composition and Antifungal Activity of the Essential. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2010.

Palavras-chave: Eugenia uniflora, essential oil, chemical variability, antifungal activity, Paracoccidioides brasiliensis
Áreas do conhecimento: Química dos Produtos Naturais
Setores de atividade: Pesquisa e desenvolvimento científico
Referências adicionais: Inglês.

3. ALVES FILHO, E. G.*; SILVA, L. M. A.; MARTINS, A. O.;SOUZA, P. S.

Variabilidade de Cachaças do Estado de Goiás frente à Composição de Sais Minerais. *Revista Analytica,* 2010.

Palavras-chave: Cachaça, Sais Mineraisl, Análises dos Componentes Principais, Análises de Discriminação Canônica.
Áreas do conhecimento: Química Analítica
Setores de atividade: Pesquisa e desenvolvimento científico

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. SILVA, L. M. A., ALVES FILHO, E. G., LIÃO, L. M., ALCANTARA, G. B.

Análises Preliminares de Folhas e Sucos de Laranja Afetada por Cancro Cítrico Através de RMN e Ferramentas Quimiométricas In: VI CONPEEX - Congresso de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2009, Goiânia - GO.

VI CONPEEX - Congresso de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2009.

Palavras-chave: Laranja, Cancro Cítrico, RMN, Quimiometria
Áreas do conhecimento: RMN
Setores de atividade: Pesquisa e desenvolvimento científico
Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio magnético

2. ALVES FILHO, E. G., CHOZE, R., SILVA, L. M. A., ALCANTARA, G. B., LIAO, L. M.

Aplicação das Técnicas Espectroscópicas de RMN para Quantificação dos Oligossacarídeos Presentes no Feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) In: VI CONPEEX - Congresso de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2009, Goiânia - GO.

VI CONPEEX - Congresso de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2009.

Palavras-chave: Feijão comum, Quantificação, Oligossacarídeos, RMN
Áreas do conhecimento: RMN
Setores de atividade: Pesquisa e desenvolvimento científico
Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio magnético

3. ALVES FILHO, E. G., SILVA, L. M. A., LIAO, L. M., ALCANTARA, G. B.

Cultivars Discrimination by 1H NMR (HR-MAS and in Solution) and Chemometric Analysis Applied to Sugarcane Leaves In: AUREMN, 2009, Angra dos Reis - RJ.

AUREMN, 2009.

Palavras-chave: NMR, sugarcane, chemometric analysis
Áreas do conhecimento: RMN
Referências adicionais: Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso

4. SILVA, L. M. A., ALVES FILHO, E. G., LIAO, L. M., ALCANTARA, G. B.
Preliminary Assessment of Orange Leaves Affected by Citrus Canker Through NMR and Chemometric Analysis In: AUREMN, 2009, Angra dos Reis - RJ.
AUREMN, 2009.

Palavras-chave: NMR, citrus canker, chemometric analysis
Áreas do conhecimento: RMN
Referências adicionais: Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso

5. COSTA da, D. P., ALVES FILHO, E. G., SILVA, L. M. A., SANTOS, S. C., FERRI, P. H.
Influência da coloração dos frutos na composição química dos óleos essenciais de *Eugenia uniflora* In: 31° reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química - SBQ, 2008, Águas de Lindóia - SP.

Palavras-chave: Eugenia uniflora, óleos essencial
Áreas do conhecimento: Química
Setores de atividade: Outros Setores
Referências adicionais: Brasil/Português. Home page: [http://www.sbq.org.br]
Trabalho promovido no laboratório de Bioatividade do Instituto de Química

6. ALVES FILHO, E. G., SILVA, L. M. A., FERRI, P. H., SANTOS, S. C.
CICLIZAÇÃO DO CITRONELAL COM CARBOXEN 569 – CATALIZADOR DIASTEREOSELETIVO PARA A SÍNTESE DE ISOPULEGOL In: IV Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão - Ciência Educação e Compromisso Social, 2007, Goiânia.
http://www.eventos.ufg.br/conpeex2007/page.php, 2007.

Referências adicionais: Brasil/Português.
Meio de divulgação: Meio magnético

7. ALVES FILHO, E. G., SILVA, L. M. A., FERRI, P. H., SANTOS, S. C.
Compostos Orgânicos Voláteis Biogênicos (BVOCs) em uma população de Eucaliptus citriodora In: VIII Congresso de Ecologia do Brasil - Ecologia no Tempo de Mudanças Globais, 2007, Caxambú - MG.
Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil, 23 a 28 de Setembro de 2007, Caxambu - MG, 2007.

Palavras-chave: BVOCs, Eucaliptus citriodora
Áreas do conhecimento: Química dos Produtos Naturais
Setores de atividade: Outros Setores, Produtos e Serviços Voltados Para A Defesa e Proteção do Meio Ambiente, Incluindo O Desenvolvimento Sustentado
Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio magnético

Apresentação de Trabalho

1. ALVES FILHO, E. G., SILVA, L. M. A., CHOZE, R., ALCANTARA, G. B., LIAO, L. M.
Aplicação das Técnicas Espectroscópicas de RMN para Quantificação dos Oligossacarídeos Presentes no Feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.), 2009. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
Palavras-chave: Feijão comum, Quantificação, Oligossacarídeos, RMN
Áreas do conhecimento: RMN
Setores de atividade: Outras atividades profissionais, científicas e técnicas
Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio magnético; Local: UFG; Cidade: Goiânia; Evento: VI CONPEEX - Congresso de Ensino, Pesquisa e Extensão; Inst.promotora/financiadora: Universidade Federal de Goiás - UFG

2. ALVES FILHO, E. G., SILVA, L. M. A., LIAO, L. M., ALCANTARA, G. B.
Cultivars Discrimination by 1H NMR (HR-MAS and Solution) and Chemometric analysis Applied to Sugarcane Leaves, 2009. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
Palavras-chave: NMR, sugarcane, chemometric analysis
Áreas do conhecimento: RMN
Referências adicionais: Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso; Local: Hotel do Frade; Cidade: Angra dos Reis - RJ; Evento: AUREMN

3. SILVA, L. M. A., ALVES FILHO, E. G., LIAO, L. M., ALCANTARA, G. B.
Preliminary Assessment of Orange Leaves Affected by Citrus Canker Through NMR and Chemometric Analysis, 2009. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
Palavras-chave: NMR, citrus canker, chemometric analysis
Áreas do conhecimento: RMN
Referências adicionais: Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso; Local: Hotel do Frade; Cidade: Angra dos Reis - RJ; Evento: AUREMN

4. COSTA da, D. P., ALVES FILHO, E. G., SILVA, L. M. A., SANTOS, S. C., FERRI, P. H.
Influência da coloração dos frutos na composição química dos óleos essenciais de *Eugenia uniflora*, 2008. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
Palavras-chave: Eugenia uniflora, óleos essencial
Áreas do conhecimento: Química
Setores de atividade: Outros Setores
Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio magnético, Home page: www.sbq.org.br
Pesquisa desenvolvida no Laboratório de Bioatividade do Instituto de Química; Local: Águas de Lindóia; Cidade: São Paulo; Evento: 31° Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química - SBQ; Inst.promotora/financiadora: SBQ

5. ALVES FILHO, E. G., SILVA, L. M. A., FERRI, P. H., SANTOS, S. C.
CICLIZAÇÃO DO CITRONELAL COM CARBOXEN 569 – CATALIZADOR DIASTEREOSELETIVO PARA A SÍNTESE DE ISOPULEGOL, 2007. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio magnético; Local: Goiás; Cidade: Goiânia; Evento: IV Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão - Ciência Educação e Compromisso Social; Inst.promotora/financiadora: Universidade Federal de Goiás

6. ALVES FILHO, E. G., SILVA, L. M. A., FERRI, P. H., SANTOS, S. C.

Compostos Orgânicos Voláteis Biogênicos (BVOCs) em uma população de *Eucaliptus citriodora*, 2007. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

Palavras-chave: BVOCs, Eucaliptus citriodora

Áreas do conhecimento: Química dos Produtos Naturais

Setores de atividade: Produtos e Serviços Voltados Para A Defesa e Proteção do Meio Ambiente, Incluindo O Desenvolvimento Sustentado, Outros Setores

Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro, Home page: http://www.viiiceb.org.br/site/trabalhos/segunda_lista.html; Local: Minas Gerais; Cidade: Caxambú; Evento: VIII Congresso de Ecologia do Brasil - Ecologia em tempos de Mudanças Globais; Inst.promotora/financiadora: SEB - Sociedade de Ecologia do Brasil

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação Oral no (a) **VI CONPEEX - Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão**, 2009. (Congresso)
Aplicação das técnicas espectroscópicas de RMN para quantificação dos oligossacarídeos presentes no feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.).

2. **32° Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Químic a - SBQ**, 2009. (Congresso)

3. Apresentação de Poster / Painel no (a) **31° Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química - SBQ**, 2008. (Congresso)
Influência da coloração dos frutos na composição química dos óleos essenciais de *Eugenia uniflora*.

4. **1° Workshop em Síntese Orgânica do Norte e Nordeste - 1° WSO** , 2008. (Encontro)

5. **3° Escola de Verão em Química na Bahia - Analítica, Alimentos, Ambiental**, 2008. (Congresso)

6. **Mini-curso: Biotransformações em Química Orgânica**, 2008. (Outra)

7. **Associação Brasileira de Química - Semana da Química Integrada**, 2008. (Congresso)

8. **V CONPEEX - Produção de Conhecimento e Transformação Social**, 2008. (Congresso)

9. **Minicurso: Gerenciamento de Resíduos Químicos Institucionais**, 2008. (Outra)

10. Apresentação de Poster / Painel no (a) **IV CONPEEX - Ciência Educação e Compromisso Social**, 2007. (Congresso)
CICLIZAÇÃO DO CITRONELAL COM CARBOXEN 569 – CATALIZADOR DIASTEREOSELETIVO PARA A SÍNTESE DE ISOPULEGOL.

11. Apresentação de Poster / Painel no (a) **VIII Congresso de Ecologia do Brasil - Ecologia no Tempo de Mudanças Globais**, 2007. (Congresso)
Compostos Orgânicos Voláteis Biogênicos (BVOCs) em uma população de *Eucaliptus citriodora*.

12. **Mini-curso: Ecologia química das plantas**, 2007. (Outra)

13. **Mini-curso: Utilização de Marcadores Moleculares em Estudos Populacionais**, 2007. (Outra)

14. **Mini-curso: Educação Empreendedora, o caso do INATEL**, 2007. (Outra)

15. **Mini-curso: Ressonância Paramagnética Eletrônica em Membranas e Proteínas da Pele**, 2007. (Outra)

16. **XV Semana da Química**, 2007. (Congresso)

17. **1° Workshop para cooperações em química farmacêutic a medicinal**, 2006. (Simpósio)

18. **XIII Semana de Química - "Em defesa da Universidade Pública"**, 2006. (Seminário)

19. **XXIII Semana da Física**, 2006. (Congresso)

20. **1°Congresso de Goiânia Sobre o Acidente do Césio 1 37**, 2006. (Congresso)

21. **III CONPEEX - Uma História Favor da Educação**, 2006. (Congresso)

22. **Mini-curso: Novos avanços na química de produtos naturais**, 2006. (Outra)

23. **Mini-curso: Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa**, 2006.

24. **Mini-curso: Eletroanalítica aplicada na detecção de metais em amostras ambientais**, 2005.

25. **XXIV ENEQUI - Encontro Nacional dos Estudantes de Química**, 2005. (Encontro)

26. **Aplicação de métodos de reconhecimento de padrões na classificação de soja transgênica e convencional**, 2005. (Seminário)

27. **Mini-curso: Espectrometria de absorção atômica**, 2005.

28. **Mini-curso: Controle de qualidade microbiológico em uma indústria de bebidas**, 2005.

29. **XII Eneq, III Ecoq, XIII Ecodeq, V Semana do químico (UFG, UEG, UnB, CEFET-GO)**, 2004. (Congresso)

30. **Mini-curso: Alimentos - Uma questão de sobrevivência**, 2004. (Outra)

Totais de produção

Produção bibliográfica

Artigos aceitos para publicação	3
Trabalhos publicados em anais de eventos	7
Apresentações de Trabalhos (Congresso)	6

Eventos

Participações em eventos (congresso)	13
Participações em eventos (seminário)	2
Participações em eventos (simpósio)	1
Participações em eventos (encontro)	2
Participações em eventos (outra)	12

Outras informações relevantes

1. Experiência na atuação em GC-MS. Curso de HPLC. Experiência na atuação com Espectrofotômetro de Absorção Atômica com Chama. Experiência na atuação em Ressonância Magnética Nuclear.