



Universidade Estadual de Maringá
Programa de Pós-Graduação em Física

Camilla Yara Langer Ogawa

**TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS NO UV-
VIS-IR PARA ANÁLISE DE COMPOSTOS
BIOATIVOS**

Orientadora: Prof^a. Dra. Francielle Sato

Coorientadora: Prof^a. Dra. Ana Claudia Nogueira Mulati

Maringá-PR
Janeiro de 2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS NO UV- VIS-IR PARA ANÁLISE DE COMPOSTOS BIOATIVOS

CAMILLA YARA LANGER OGAWA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Física, área de concentração: Física da matéria condensada
Orientadora: Prof^a. Dra. Francielle Sato
Coorientadora: Prof^a. Dra. Ana Claudia Nogueira Mulati

Maringá-PR

Janeiro/2021

CATALOGAÇÃO BIBLIOTECA

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

O34t

Ogawa, Camilla Yara Langer

Técnicas espectroscópicas no UV-Vis-IR para análise de compostos bioativos / Camilla Yara Langer Ogawa. -- Maringá, PR, 2021.
106 f.: il. color., figs., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Francielle Sato.

Coorientadora: Profa. Dra. Ana Claudia Nogueira Mulati.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Exatas, Departamento de Física, Programa de Pós-Graduação em Física, 2021.

1. Espectroscopia FTIR- ATR. 2. Espectrofotometria UV-Vis. 3. Espectroscopia fotoacústica. 4. Compostos bioativos. I. Sato, Francielle, orient. II. Mulati, Ana Claudia Nogueira, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Exatas. Departamento de Física. Programa de Pós-Graduação em Física. IV. Título.

CDD 23.ed. 537.5352

*"Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar
uma alma humana, seja apenas outra alma humana."*

Carl Jung

*Dedico este trabalho à aquela que deu um sentido especial à
minha existência, minha querida filha Livia Sayuri, minha
razão viver.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por guiar meus passos e abrir as portas necessárias para mais uma conquista.

À minha pequena Livia Sayuri, que me acompanhou muitas vezes na universidade, para não se privar da minha companhia. É impossível colocar em palavras o que sinto e o quanto sou grata por tê-la em minha vida. Muito obrigada por ser essa luz que me guia e que me incentiva a continuar.

À minha mãe, Lindamir, que sempre se sacrificou para que eu pudesse alcançar meus sonhos. Obrigada por seu apoio e por me acolher todas às vezes que fiquei sem chão. Quando caí foi seu abraço que me colocou em pé novamente e me mostrou que nunca estarei sozinha.

Ao meu pai, Seiti Ogawa “in memoriam”, pelo exemplo de dedicação e por me ensinar a valorizar a minha história e a fazer escolhas que no futuro me façam ter orgulho do que me tornei.

À minha irmã, Paula, por sempre torcer por mim, pela paciência, cumplicidade, por comprar minhas brigas e por ser a melhor madrinha que minha filha poderia ter. Eu agradeço a Deus pela ótima relação que temos. Eu sempre serei grata por poder contar com seu apoio em todos os momentos importantes da minha vida.

Ao meu cunhado, Hangel, que durante esses quase 15 anos de convivência se tornou um irmão querido, um tio amado e amigo de confiança. Obrigada por participar e me ajudar em todas as mudanças, por ser tão atencioso com a Sa e por todos os conselhos que nos momentos difíceis me ajudaram a encontrar uma saída.

À minha orientadora professora Dra. Francielle Sato. Muito obrigada por sua orientação e apoio.

Muito obrigada ao professor Dr. Antonio Medina Neto por todo o auxílio e contribuição neste trabalho. A ele expresso meu respeito.

À minha coorientadora, professora Dr. Ana Claudia Mulati, que mesmo à distância fez tudo que estava ao seu alcance para me auxiliar. Muito obrigada por seu apoio e dedicação.

À professora Dra. Paula Toshimi Matumoto-Pintro (DAG/PPC - UEM), e seus alunos Me. Fernando Anjo, Ma. Bianka Saraiva e Dra. Denise Felix. Pela parceria nos trabalhos com as amostras de canistel, resíduo de cerveja e de farinha de Konjac. Muito obrigada pela confiança, ensinamentos e pelas contribuições que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Dr. Otávio Akira Sakai (IFPR-Umuarama) e à professora Dra. Érica Marusa Pergo Coelho (UEM - Umuarama) pela parceria na pesquisa com os extratos de ginseng brasileiro e espinheira-santa. Agradeço pela confiança e pela oportunidade.

À professora Dra. Grasielle Scaramal Madrona (DAL/PPC - UEM) e suas alunas, Ma. Carolina Paraíso e Dra. Suelen dos Santos. Agradeço pela parceria ao longo desses 5 anos, e pela oportunidade de poder contribuir nos trabalhos dos extratos. Agradeço por todo conhecimento adquirido durante este tempo de convívio.

Aos professores Dr. Mauro Baesso e Dr. Luis Malacarne, por todo auxílio durante o período em que minha orientadora precisou se ausentar.

Aos meus amigos de longa data Dr. Robson Ferrari Muniz, Dra. Mayse Otofuiji, Dra. Mayara Kuroda, Jhionan Rian Santos e Jéssica Motta por estarem sempre ao meu lado nos piores e melhores momentos da minha vida. Obrigada pela presença constante, pelos conselhos, pela verdadeira amizade. Vocês são a prova que amizades verdadeiras sobrevivem à distância.

À minha amiga Dra. Adriane Nascimento, um dos presentes que recebi do PFI e que vou guardar no coração para sempre. Muito obrigada pelo auxílio, amizade sincera e por sempre me estender a mão quando precisei de ajuda.

Ao meu amigo Dr. Rafael Franco Ferreira, pelas horas de auxílio nos estudos, por sempre estender a mão quando precisei e pela amizade.

À Dra. Lidiane Vizioli, por todo auxílio nas medidas, pela paciência para esclarecer minhas dúvidas, e por ser a melhor parceira de laboratório.

À Ma. Raquel Palácios e a Ma. Mariana Sversut Gibin, minha dupla favorita. Muito obrigada pela amizade, por todo apoio e assistência no laboratório.

À todos os funcionários e professores do DFI/PFI-UEM, e em especial à Mônica.

Ao CNPq, CAPES, FINEP, Fundação Araucária e UEM pelo apoio financeiro.

Ao Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa e a Universidade Estadual de Maringá por toda infraestrutura disponível para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada a todos!

RESUMO

Neste estudo foram utilizadas a espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR-ATR), espectrofotometria por transmitância e espectroscopia fotoacústica, ambas na região do ultravioleta-visível, para identificação e investigação de compostos bioativos de diferentes vegetais. Por mais que os compostos bioativos sejam usualmente avaliados por técnicas de separação, as espectroscopias vêm ganhando um papel importante na análise destes compostos. Esta foi a principal motivação para este trabalho, cujo objetivo principal foi investigar três diferentes amostras: resíduo de fabricação de cerveja, a planta *Maytenus ilicifolia*, conhecida como Espinheira-santa, e o fruto *Pouteria campechiana* (Canistel), avaliando como as técnicas espectroscópicas poderiam contribuir primeiramente para identificação dos compostos, e posteriormente estudar como estes variam mediante ao processo de extração, no resíduo de cerveja, com a irradiação de luz visível, no Canistel, e em diferentes partes da Espinheira-santa. Por meio da espectroscopia FTIR-ATR identificou-se compostos fenólicos, proteínas totais e do triterpeno friedelina, além do conteúdo lipídico e a caracterização de outros grupos químicos nas diferentes partes da planta *Maytenus ilicifolia*: cotilédone, plântula e folhas, além disso com espectroscopia fotoacústica foi avaliado os níveis pigmentos presentes em cada parte da planta. No resíduo de fabricação de cerveja, região espectral atribuída as proteínas, os espectros de FTIR-ATR mostraram conformações de proteínas apresentando dominância das estruturas secundárias β -folha/volta. O Canistel foi estudado na região do ultravioleta-visível, utilizando as espectroscopias de transmitância e fotoacústica, avaliando os efeitos da incidência de radiação visível (420nm), por meio das bandas de absorção nos compostos bioativos presentes em sua polpa, mostrando ao menos dois processos de fotodegradação. As três técnicas utilizadas mostraram alta aplicabilidade para análise de compostos bioativos independentemente do tipo de amostra.

Palavras-chave: espectroscopia FTIR-ATR, espectrofotometria no UV-Vis, espectroscopia fotoacústica, compostos bioativos

ABSTRACT

In this study, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR-ATR), transmittance spectrophotometry and photoacoustic spectroscopy, both in the visible-ultraviolet region, were used to identify and investigate bioactive compounds from different plants. As much as bioactive compounds are usually evaluated by separation techniques, spectroscopy has gained an important role in the analysis of these compounds. This was the main motivation for this work, whose main objective was to investigate three different samples: brewing residue, the plant *Maytenus ilicifolia*, known as Espinheira-santa, and the fruit *Pouteria campechiana* (Canistel), evaluating how spectroscopic techniques could contribute firstly to identify the compounds, and later to study how they vary according to the extraction process, in the beer residue, with visible light irradiation, in Canistel, and in different parts of Espinheira-santa. Through FTIR-ATR spectroscopy, phenolic compounds, total proteins and friedelin triterpene were identified, in addition to the lipid content and the characterization of other chemical groups in different parts of the *Maytenus ilicifolia* plant: cotyledon, seedling and leaves, in addition to photoacoustic spectroscopy the pigment levels present in each part of the plant were evaluated. In the brewing residue, the spectral region assigned to proteins, the FTIR-ATR spectra showed protein conformations showing dominance of β -sheet/turn secondary structures. Canistel was studied in the ultraviolet-visible region, using transmittance and photoacoustic spectroscopy, evaluating the effects of the incidence of visible radiation (420nm), through the absorption bands in bioactive compounds present in its pulp, showing at least two processes of photodegradation. The three techniques used showed high applicability for the analysis of bioactive compounds regardless of the type of sample.

Keywords: ATR-FTIR spectroscopy, UV-Vis spectrophotometry, photoacoustic spectroscopy, bioactive compounds

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1-1: a, b e c) estruturas moleculares da clorofila A, clorofila B e β -caroteno, respectivamente. d) espectros de absorção na região do UV-Vis para as três moléculas descritas em a, b, e c. Os quadrados em vermelho destacam a diferença entre as clorofilas A e B. Adaptado de [38].20
- Figura 2.1-2 Espectros de transmitância na região do MIR: A) Clorofila e B) β -caroteno. Os grupos químicos estão mostrados junto aos espectros. Adaptada de [41], [42]......22
- Figura 2.2-1: Espectro da amostra A puro (linha preta), linha de base gerada (linha vermelha) e espectro A corrigido com a linha de base (linha azul).25
- Figura 2.2-2: À esquerda mostra a normalização dos espectros pela norma e à direita pela intensidade máxima. As linhas contínuas são os espectros sem tratamento matemático de A e B e os pontos são os espectros de A e B normalizados.27
- Figura 2.2-3: Espectros das amostras A e B. As linhas pontilhadas indicam a posição central das bandas. I_A e I_B são os valores das intensidades em cada ponto do espectro.28
- Figura 2.2-4: Espectros das amostras A e B. Em colorido estão mostradas as áreas sob as bandas em destaques. A linha pontilhada indica a posição do máximo de intensidade na banda. A_A e A_B são os valores das áreas obtidas sob a curva por método de integração.29
- Figura 2.2-5: A) Espectro da amostra A. B) Segunda derivada do espectro A, a linha em vermelho mostra a suavização da segunda derivada pelo método Savitzky-Golay com 20 pontos. As linhas verticais tracejadas indicam a posição de máximo no espectro e mínimo na segunda derivada.30
- Figura 2.2-6 Ilustração da forma da função gaussiana utilizada para a deconvolução dos espectros. sendo A a área sob a curva, w a largura, FWHM é a largura a meia altura, x_c a posição da máxima intensidade (posição do centro da função gaussiana em x) e y_0 a posição de offset com relação a intensidade.31
- Figura 2.2-7: Ilustração da deconvolução espectral com ajuste de funções gaussianas ao espectro da amostra A. G1, G2 e G3 são as curvas das funções gaussianas e a linha contínua em vermelho é a soma das três funções gaussianas. A tabela mostra os valores aproximados obtidos do ajuste teórico para cada gaussiana.32
- Figura 2.3-1: Estrutura química de alguns carotenoides. Adaptado de [54]......38
- Figura 2.3-2: Estrutura química de diferentes grupos de compostos fenólicos. Adaptado de [56]......39

Figura 2.3-3: Estrutura química da clorofila a e b. Adaptado de [58].	40
Figura 2.3-4: Estruturas químicas de alguns carboidratos. Adaptado de [61].	41
Figura 2.3-5: Estrutura primária de uma proteína. A) sequência linear de aminoácidos, não havendo nenhuma ramificação. B) Terminal amino (destacado em vermelho) e terminal carboxílico (destacado em verde). Adaptado de [67].	42
Figura 3.2.2-1: A) Montagem experimental para irradiação via LED das amostras de CP. B) Espectro de irradiância do LED utilizado para irradiar as amostras de CP.	53
Figura 4.1-1: A) Espectros de FTIR-ATR com destaque nas regiões da amida I (AmI), amida II (AmII) e amida III (AmIII). B) Segunda derivada dos espectros de FTIR-ATR nas regiões da amida I, II e III. As linhas pontilhadas verticais indicam as posições em destaques na segunda derivada e as setas indicam as variações dos centros das bandas. TBP: <i>trub</i> antes do processo de extração, 1 ^a – 4 ^a etapas dos processos de extração no <i>trub</i> e TAP: <i>trub</i> após o processo de extração.	60
Figura 4.2-1: Espectros de FTIR – ATR normalizados dos extratos de cotilédone, plântula e folhas da <i>espinheira-santa</i> e as principais atribuições vibracionais.	63
Figura 4.2-2: Comportamento das áreas das bandas referentes ao conteúdo proteico (1700 – 1480 cm ⁻¹), lipídico (2990 – 2775 cm ⁻¹), do triterpeno friedelina (1825 – 1700 cm ⁻¹) e dos compostos fenólicos (3680 – 3030 cm ⁻¹) do cotilédone, plântula e folhas da <i>Maytenus ilicifolia</i> .	65
Figura 4.2-3: (A) Espectros fotoacústicos do cotilédone, plântula e folhas. Ajuste com funções gaussianas dos espectros fotoacústicos: (B) plântula, (C) folhas e (D) cotilédone, G1-G9 indicam as funções gaussianas, os círculos são os espectros fotoacústicos e a linha sólida em vermelho é a soma de todas as funções gaussianas utilizadas em cada espectro.	67
Figura 4.2-4: Comportamento das áreas das bandas referentes clorofila A, clorofila B e carotenoides do cotilédone, plântula e folhas da <i>Maytenus ilicifolia</i> .	70
Figura 4.3-1: Espectro fotoacústico do canistel em pó (CP) em pó sem irradiação com deconvolução gaussiana. G1, G2 e G3 são as funções gaussianas.	72
Figura 4.3-2: Média dos espectros fotoacústicos do canistel em pó (CP) sem irradiação e sob irradiação de LED ($\lambda_{\text{máx}} = 420 \text{ nm}$) em diferentes períodos.	74
Figura 4.3-3: Espectros fotoacústicos de CP sem irradiação (0 min) e após 1 min e 15 min de irradiação de LED. Na legenda (a) indica a 1 ^a medida realizada, (b) 2 ^a medida realizada sem a remoção da amostra da célula fotoacústica e (c) 3 ^a medida realizada em outra amostra após irradiação.	75
Figura 4.3-4: Análise multivariada dos espectros de CP com e sem irradiação: (A) <i>Loading</i> das componentes PC1 e PC2 comparadas a um espectro fotoacústico de CP sem irradiar; (B) <i>Loading</i> PC1 versus PC2; (C) <i>Score plot</i> de PC1 versus PC2, as amostras 0 min são que não receberam irradiação de LED e (D) Comportamento de PC1 médio em função do tempo de irradiação. <i>Inset</i> :	

coeficientes que satisfazem o ajuste exponencial descendente fitado sobre os pontos experimentais.	77
Figura 4.3-5: Comportamento das áreas das gaussianas centradas em 470 e 410 nm em função do tempo de irradiação. Os pontos são as áreas das gaussianas e as linhas sólidas os ajustes matemáticos. Os parâmetros de ajuste obtidos estão ao lado das figuras. O tempo $t = 0$ min indica o CP sem irradiação.	78
Figura 4.3-6: (A) Espectro de absorção da solução de CP (50mg/L) sem irradiação e do óleo mineral utilizado como solvente. (B) Deconvolução gaussiana do espectro de CP sem irradiação de LED (0 h).....	80
Figura 4.3-7: Espectros de absorção na região UV-vis da (A) CPS (solução de CP em óleo mineral (50 mg/L)) e (B) óleo mineral para diferentes tempos de irradiação. (C) Comparação entre espectros consecutivos para a amostra não irradiada, mostrando que a irradiação pela fonte do espectrofotômetro não provoca efeito de fotodegradação.	81
Figura 4.3-8: Análise multivariada dos espectros de CP com e sem irradiação: (A) <i>Loading</i> das componentes PC1 e PC2 comparadas a um espectro de absorção de CP sem irradiar; (B) <i>Loading</i> PC1 versus PC2 e (C) <i>Score plot</i> de PC1 versus PC2, as amostras 0 h identificam as que não receberam irradiação de LED.	83
Figura 4.3-9: Comportamento de PC1 (A) e da soma das áreas das bandas de absorção dos carotenoides (B) em função do tempo de irradiação para CPS.....	84
Figura 4.3-10: Áreas das bandas de absorção normalizadas em função do tempo de irradiação por LED. A linha tracejada corresponde ao valor médio das áreas centradas em 382, 404, 454 e 478 nm. As linhas sólidas representam os ajustes com funções matemáticas.	86
Figura 4.3-11: Comportamento das áreas das gaussianas centradas em 273 e 428 nm em função do tempo de irradiação. Os pontos são as áreas das gaussianas e a linha sólida o ajuste matemático. Os parâmetros de ajuste obtidos estão no detalhe da figura. O tempo $t = 0$ h indica o CP sem irradiação.	87
Figura 4.3-12: À esquerda as soluções de CP em óleo mineral e a direita o CP em pó. 0 h ou 0 min são as amostras sem irradiar e 120 h e 15 min os últimos períodos de irradiação com LED.	89

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

IR	Infravermelho
UV-Vis	Ultravioleta - Visível
FTIR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>)
ATR	Reflexão total atenuada (<i>Attenuated total reflectance</i>)
PAS	Espectroscopia fotoacústica
LC-MS	Espectrometria de massa por cromatografia em fase líquida
MIR	Infravermelho médio (4000-200 cm ⁻¹)
NIR	Infravermelho próximo (12800-4000 cm ⁻¹)
FAR	Infravermelho longínquo (200-10 cm ⁻¹)
ppm	Partes por milhão
u.a.	Unidade arbitrária
λ	Comprimento de onda
PCA	Análise de componentes principais
FWHM	Largura a meia altura
DFT	Teoria do Funcional da Densidade
INBEB	Industrial Norte Paranaense de Bebidas
<i>Trub</i>	Sedimento da produção de cerveja, composto de lúpulo, proteínas e resíduos do malte
TBP	<i>Trub</i> antes da extração dos componentes amargos
TAP	<i>Trub</i> após a extração dos componentes amargos
W	Watts
Hz	Hertz
CP	Polpa de canistel em pó
CPS	Solução de canistel (CP) em óleo mineral
ν	Modo de vibração de estiramento
δ	Modo de vibração de deformação angular.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO.....	14
CAPÍTULO 2 - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	19
2.1 Espectroscopia de absorção	19
2.2 Métodos de análise de espectros.....	24
2.2.1 Pré-tratamentos:.....	24
2.2.2 Tratamentos de espectros de biomoléculas:	27
2.3 Compostos bioativos	36
CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
3.1 Técnicas espectroscópicas	44
3.1.1 Espectroscopia de absorção na região do UV-Vis	44
3.1.2 Espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	46
3.1.3 Espectroscopia Fotoacústica.....	47
3.2 Preparação das amostras e configurações experimentais	49
3.2.1 Resíduos da fabricação de cerveja (<i>Trub</i>).....	49
3.2.2 <i>Maytenus ilicifolia</i> - Espinheira-santa	50
3.2.3 <i>Pouteria campechiana</i> – Canistel.....	52
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
4.1 Resíduos da fabricação de cerveja (<i>Trub</i>).....	56
4.2 <i>Maytenus ilicifolia</i> - Espinheira-santa	62
4.3 Canistel (<i>Pouteria campechiana</i> (Kunth) Baehni).....	71
CAPÍTULO 5 - CONCLUSÃO.....	92
REFERÊNCIAS.....	95

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

Bons hábitos alimentares são umas das vertentes importantes para garantir a saúde, na qual uma dieta equilibrada com alimentos de alto valor nutricional acaba por promover aumento da imunidade [1]. Esse fato, também é conferido em uma citação famosa, frequentemente atribuída a Hipócrates (400 aC), "Deixe seu alimento ser o seu remédio e o remédio seja o seu alimento", usada para destacar a importância da alimentação para prevenir doenças. Dessa forma, com o crescente número de fatores que afetam a qualidade da vida moderna, pesquisas com o propósito de auxiliar a promoção da saúde são de grande importância científica para a conscientização da população [1],[2].

De forma geral, os alimentos podem ser classificados como alimentos *in natura* ou processados [3]. Os alimentos *in natura* podem ser obtidos diretamente na natureza sem que sofram qualquer alteração, tais como plantas, leite, ou carnes de animais. Já os alimentos processados são aqueles que passam por um ou mais processos pré-consumo, geralmente realizado por indústrias alimentícias, as quais adicionam conservantes, sal, açúcar dentre outros produtos que tem função de prolongar o prazo para consumo [3]. Os alimentos podem ainda ser subclassificações de acordo com o seu grau de processamento, tais como os alimentos minimamente processados, que correspondem a alimentos *in natura* que passaram por algum tipo de processo simples para consumo, seja lavagem, moagem, fermentação dentre outros processos. Outra classificação se dá aos alimentos ultraprocessados, os quais possuem diversos

conservantes, aromatizantes e corantes a fim de tornar o alimento pronto para consumo [4].

Alimentos *in natura* são sempre encontrados como item da lista em pesquisa de uma vida saudável, entretanto, nem sempre é possível ter esse tipo de alimento à mesa. O consumo de alimentos adquiridos de forma virtual ou rápidas visitas aos supermercados, tem feito com que os alimentos processados tomem cada vez mais o lugar na dieta da população. O tipo de processamento determina o perfil de nutrientes, em geral, quanto mais processados, menor o seu valor nutricional e maior a quantidade de substâncias nocivas à saúde [5], [6]. Alimentos minimamente processados são uma boa alternativa para manter os níveis nutricionais dos alimentos, e a extração pode ser incluída nas operações de processos. Maceração, infusão, extração contínua quente, extração assistida por ultrassom, fluido supercrítico, entre outras, são métodos de extração utilizados para obtenção de extratos vegetais [7]. Fatores como a parte do material vegetal, solvente, tempo e temperatura influenciam na extração, e consequentemente na composição final do produto [8], [9], até mesmo processos que não envolvam extração como a desidratação para obtenção de um produto concentrado, pode resultar em alteração dos compostos bioativos, quando comparados ao vegetal *in natura* [10], [11]. As plantas possuem alta atividade fisiológica, por isso os brotos bem como toda sua estrutura são ricos em compostos bioativos [12].

Compostos bioativos podem ser definidos como biomoléculas essenciais e não essenciais encontrados na natureza, fazem parte de nossa cadeia alimentar podendo ter efeito sobre a saúde humana. Os compostos bioativos podem ser de origem natural ou sintética, parcial ou total, e tem a habilidade de regular um ou mais processos metabólicos. Podem ser considerados compostos bioativos carotenoides, compostos fenólicos, ácido graxo poli-insaturado ômega-3, algumas proteínas e pigmentos [13]–[15]. Estes compostos são responsáveis por atividades biológicas como antioxidante, antibacteriana e redução de níveis de colesterol, entre outros [16], sendo de fundamental importância a realização de estudos que permitam sua identificação e quantificação em extratos vegetais, que possam vir a ser utilizados em produtos alimentícios ou como produtos fitoterápicos.

O número de estudos sobre compostos bioativos apresentou um aumento significativo nos últimos anos devido ao avanço dos métodos computacionais [17].

Estes tipos de compostos passaram a ser analisados cada vez mais em nível molecular, sendo possível a realização de modelagem e triagem das moléculas bioativas, processo este denominado "planejamento racional de compostos bioativos". Desta forma, com base no crescente volume de informações disponíveis para moléculas já conhecidas em banco de dados públicos, é cada vez mais fácil prever algum tipo de certos compostos com uma biomacromolécula associada [17]. Esta triagem computacional facilita a escolha dos compostos direcionando a escolha de alvos para estudos empíricos [17].

Compostos bioativos são comumente avaliados por métodos de separação, como cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS), pois muitos destes compostos são polares e não voláteis [18] ou não cromatográficos como imunoensaios que se baseiam na detecção da presença ou concentração de moléculas, em solução, utilizando marcadores [19]. Ambas as metodologias dependem da preparação da amostra utilizando solventes ou biomarcadores, que por muitas vezes dificultam a identificação dos compostos bioativos. Uma alternativa a estes métodos de avaliação muito utilizada são técnicas espectroscópicas, como a espectroscopia de absorção óptica ultravioleta-visível (UV-Vis) e a vibracional. Em especial a espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) tem sua utilização em ascensão em aplicações farmacêuticas, medicinais e alimentos na caracterização de compostos bioativos em plantas e microrganismos [19], [20]. Por se tratar de uma técnica cuja preparação das amostras é minimizada, não requer diluição das mesmas, portanto não há necessidade de utilização de solventes, e consequentemente sem a geração de resíduos. Neste contexto, no presente trabalho, estudou-se a aplicabilidade das espectroscopias fotoacústica, no UV-Vis e FTIR, com diferentes métodos de análise, para a identificação e caracterização de compostos bioativos, de compostos bioativos na planta espinheira-santa, na fruta Canistel e em resíduo de fabricação de cerveja (*trub*).

A espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*) é nativa da América do Sul, sendo uma planta amplamente utilizada por razões fitoterápicas [21]. No Brasil a espinheira-santa passa por risco de extinção devido ao extrativismo realizado para a utilização desta planta para o uso medicinal [22]. Além disto, esta planta tem um tempo de desenvolvimento de cerca de 3 a 4 anos, o que para muitos casos é um processo demoroso, aumentando assim o tempo de exposição à extração e dificultando a

obtenção de novas plantas maduras [23]. A espinheira-santa é atualmente a única planta fitoterápica aprovada pelo SUS para tratamentos fitoterápicos [24], destacando-se sua utilização como alternativa para tratamento de úlcera péptica e seus efeitos colaterais [24]–[26].

O canistel (*Pouteria campechiana*) é uma fruta nativa da América Central, sendo encontrada majoritariamente no México [27]. A polpa do canistel possui uma coloração amarelo-alaranjada que é rica em carotenoides com atividade provitamina A [28], [29], possuindo região em que possui maior absorção com máximo de 420 nm [30], [31].

Resíduos de fabricação de cerveja tem alto valor nutricional, e tem sido utilizado em alimentação animal, na produção de fertilizantes ou são descartados [32]. Entretanto, na alimentação humana, devido ao seu amargor, a aplicação destes resíduos ainda é restrita. Processos químicos e físicos podem ser utilizados para remoção ou redução do amargor, porém é necessário monitorar as alterações estruturais e químicas no produto final [33]. As proteínas, também consideradas como compostos bioativos, estão presentes nestes resíduos, e são amplamente estudadas por técnicas espectroscópicas, as quais podem identificar proteínas e avaliar as conformações proteicas [34].

Este trabalho tem como objetivo principal a identificação e caracterização de compostos bioativos presentes na espinheira-santa, no Canistel e no resíduo de fabricação de cerveja. Os objetivos específicos são:

- i) identificação e caracterização de compostos bioativos no cotilédono, plântula e folhas da espinheira-santa, utilizando as espectroscopias FTIR-ATR e Fotoacústica;
- ii) estudar os processos de fotodegradação por meio das bandas espectrais dos carotenoides com as espectroscopias Fotoacústica e de transmitância;
- iii) estudar os efeitos do processo de extração para remoção do amargor, sobre o conteúdo proteico do resíduo de fabricação de cerveja com a espectroscopia FTIR-ATR.

Para isto, nos capítulos que se seguem, serão apresentados os conceitos gerais de espectroscopia (com ênfase na espectroscopia de transição eletrônica e

vibracional), da instrumentação utilizada nas técnicas e dos principais métodos de análise utilizados. Em seguida serão apresentadas, sucintamente, as preparações das amostras. Na sequência, os resultados e discussão obtidos para cada amostra utilizando as diferentes técnicas e métodos de análises. E finalmente, as conclusões e perspectivas futuras do trabalho.

Capítulo 2

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Este capítulo apresenta uma breve revisão bibliográfica acerca das técnicas espectroscópicas de espectrofotometria e fotoacústica, na região do ultravioleta-visível, e da espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier, tratamentos matemáticos em espectros de absorção e compostos bioativos.

2.1 Espectroscopia de absorção

A espectroscopia pode fornecer informações acerca da estrutura molecular do material a ser investigado, quando submetido a interações com a radiação eletromagnética, resultando em efeitos de absorção, espalhamento ou emissão, que podem ocorrer simultaneamente dependendo da composição química do material e da região espectral de excitação [35], [36].

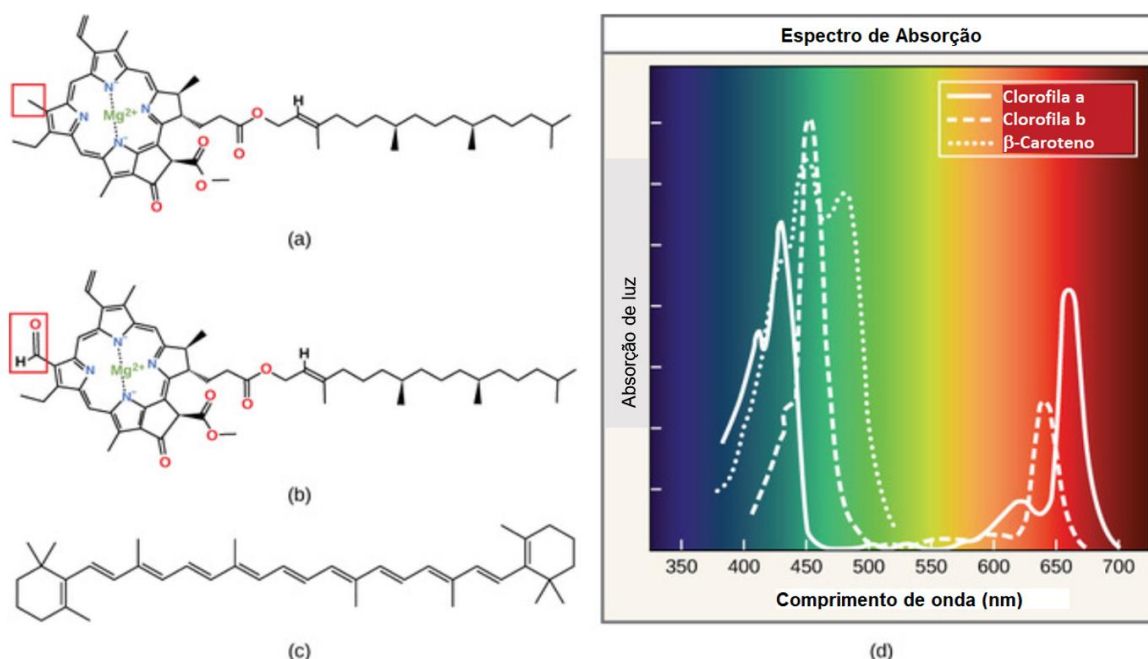
Moléculas são capazes de absorver certos comprimentos de onda, pois a luz absorvida tem o valor de energia necessário que seja excitada de um nível de energia para outro superior, assim, é possível obter informações sobre os seus níveis de energia, que por sua vez estão correlacionadas com detalhes específicos da estrutura molecular [37]. Dentre as diversas técnicas espectroscópicas vamos destacar as espectroscopias no ultravioleta visível (UV-Vis) e no infravermelho médio (MIR).

Moléculas com ligações do tipo σ absorvem em comprimentos de onda mais energéticos do que o ultravioleta, já os elétrons em ligações do tipo π podem ser promovidos para níveis de energia mais elevados por meio da radiação UV-Vis, com

comprimento de onda entre 200 a 800×10^{-9} m. Desta forma a espectroscopia nesta região no espectro de radiação eletromagnética fornece informações da transição eletrônica de moléculas que contém ligações π , além disso, se as ligações π forem conjugadas o espectro de absorção no UV-Vis apresenta absorções em maior número de diferentes comprimentos de onda, ou seja, maior número de picos de absorção. Geralmente os picos de absorção no UV-Vis se sobrepõem, produzindo um espectro de absorção contínuo. Os espectros podem ser visualizados por meio de gráficos no qual o eixo vertical é quantidade de luz absorvida por cada transição e o comprimento de onda da luz absorvida é representado no eixo horizontal [37].

Compostos orgânicos coloridos a olho nu, são de cor intensa o que configura um extenso sistema de ligações π conjugadas, tais como os pigmentos β -caroteno e clorofilas, que apresentam espectros de absorção na região do UV-Vis (Fig 2.1-1).

Figura 2.1-1: a, b e c) estruturas moleculares da clorofila A, clorofila B e β -caroteno,



respectivamente. d) espectros de absorção na região do UV-Vis para as três moléculas descritas em a, b, e c. Os quadrados em vermelho destacam a diferença entre as clorofilas A e B. Adaptado de [38].

Dois átomos ligados por ligações σ são mantidos juntos por atração mútua, devido ao par de elétrons compartilhado entre eles, separados por uma distância fixa, porém podem se movimentar periodicamente, se afastando ou se aproximando um do outro de forma simétrica ou assimétrica, estas são vibrações do tipo estiramento.

Quando a molécula não é linear pode executar vibrações angulares, no plano e fora do plano também de maneira simétrica ou assimétrica, estas são as vibrações do tipo deformação ou também chamadas de flexão. Ambas as vibrações de estiramento e deformação representam diferentes níveis de energia de uma molécula, as quais correspondem a comprimentos de onda na região do infravermelho médio (MIR) no espectro de radiação eletromagnético, entre $2,5$ a 25×10^{-6} m. Nas regiões de infravermelho próximo (NIR) ($0,8 \times 10^{-6}$ a $2,5 \times 10^{-6}$ m) estão os modos de vibração combinados e harmônicos e infravermelho longínquo (FAR) (25×10^{-6} a 300×10^{-6} m) os modos de rotação dos níveis de energia moleculares [39], [40]. Tal como na espectroscopia no UV-Vis os espectros podem ser analisados por meio de gráficos sendo as bandas referentes aos modos de vibração ou rotação da molécula.

Os espectros de absorção no infravermelho apresentam maior quantidade de bandas, as quais tem forma mais estreitas quando comparadas as bandas nos espectros de absorção no UV-Vis, a Fig. 2.1-2 mostra os espectros de transmitância para a clorofila e o β -caroteno.

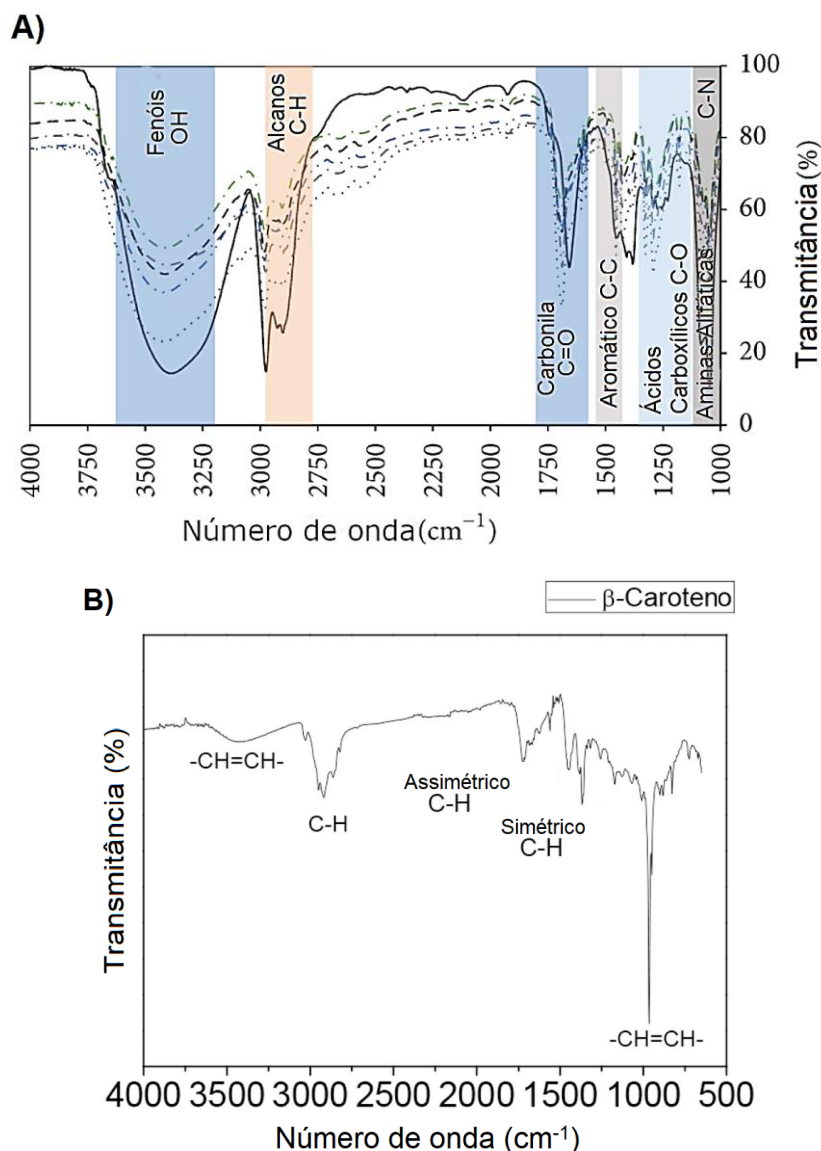


Figura 2.1-2 Espectros de transmitância na região do MIR: A) Clorofila e B) β-caroteno. Os grupos químicos estão mostrados junto aos espectros. Adaptada de [41], [42].

A aquisição do espectro de um material tanto na espectroscopia no UV-Vis quanto no MIR pode ser via montagem experimental construída pelo experimentador ou equipamentos comerciais, ambos podem ser chamados de espectrômetros, que são constituídos basicamente, por uma ou mais fontes de radiação eletromagnética, elementos ópticos, detectores e computador com programa computacional que coleta o dado espectral. Em geral os espectrômetros de UV-Vis são dispersivos, enquanto no MIR são interferométricos. Nos dispersivos, uma estreita faixa de comprimento de onda da radiação emitida pela fonte, com largura na ordem de nanômetros, excita o material, gerando a interação radiação-matéria a qual pode resultar em mecanismos

como absorção, espalhamento, reflexão ou absorção no comprimento de onda de excitação seguida de emissão em outro comprimento de onda. No caso dos espectrômetros interferométricos, todo o espectro eletromagnético da fonte incide no material sem ser separados, porém com intensidade ou fase, para diferentes comprimentos de onda, modulados pelo efeito de interferência. Da mesma forma que nos equipamentos dispersivos também podendo ocorrer a interação radiação-matéria por um ou mais mecanismos, a diferença fundamental é que para obter a resposta dos sensores a esta interação é necessário o tratamento matemático utilizando a transformada de Fourier.

A posição e tipo de sensor utilizado para coletar a resposta da interação radiação-matéria depende do tipo de mecanismo que ocorreu entre o material e a radiação emitida pela fonte. Quando ocorre a absorção, o detector é posicionado após a amostra coletando o que não foi absorvido pela amostra, originando um espectro de transmissão. No espalhamento, reflexão ou emissão o detector ou detectores são posicionados em direção a superfície da amostra que sofreu a incidência da radiação da fonte, geralmente de forma que a luz incidente da fonte não retorne diretamente ao detector, ou seja, o feixe incidente e o oriundo da interação não são colineares.

A resolução dos espectros obtidos com relação ao comprimento de onda detectado depende da qualidade ótica dos componentes óticos, forma e tamanho da abertura que delimita a área de detecção do sensor, bem como, da tecnologia empregada nos programas computacionais de aquisição de dados. Os algoritmos matemáticos utilizados para a aquisição de dados também contribuem para a melhora da relação sinal-ruído do sinal detectado.

A detecção da absorção ainda pode se dar de forma indireta, na qual é detectada a perturbação que causa na amostra, como no caso da espectroscopia fotoacústica. Nesta o feixe de luz da fonte, região do UV-Vis, é dispersado e modulado, e então direcionado à amostra que está condicionada em uma célula, chamada de célula fotoacústica, que pode ser aberta ou fechada. No caso da célula fechada há um microfone acoplado que é sensibilizado pela variação periódica da pressão do gás no interior da célula devido ao calor gerado na amostra em decorrência da absorção do comprimento de onda incidente.

Na região do MIR é mais comum espectrômetros constituídos de interferômetros, nos quais, geralmente, a radiação da fonte é direcionada a um

interferômetro composto por um divisor de feixe e dois espelhos, um fixo e um móvel. O feixe de luz da fonte incide primeiramente no divisor de feixe, que reflete e transmite parte dele, e os feixes refletidos e transmitidos são direcionados cada um para um espelho, são refletidos novamente, atingindo o divisor de feixe, e a parte da radiação que foi transmitida incide na amostra. Quando o espelho móvel de movimento os feixes refletidos pelos espelhos podem estar em fase ou fora de fase, como o movimento do espelho é periódico há a formação de um interferograma, ou seja, sinal que atinge o sensor após atravessar amostra, no caso da absorção, apresenta variação de intensidade periódica. Este interferograma é então transformado em um espectro por meio de uma transformada de Fourier, que ocorre nos programas computacionais de aquisição de dados. Nesta região é comum encontrarmos espectros expressos em número de onda, com unidade cm^{-1} , ao invés de comprimento de onda, isso porque a energia associada a um fóton em um comprimento de onda específico é necessária para correlacionar o espectro com nível energético molecular.

2.2 Métodos de análise de espectros

Muitas vezes os espectros obtidos tanto na espectroscopia no UV-Vis ou IR apresentam contribuições de condições experimentais ou de algum outro mecanismo de interação radiação-matéria que não é o alvo da detecção, estes fatores podem dificultar a análise do espectro. Após fazer uma configuração adequada para a coleta do espectro minimizando as contribuições experimentais, pode se optar por fazer tratamentos matemáticos no espectro, entretanto é muito importante ressaltar que o tratamento matemático não pode alterar a característica do espectro, principalmente com relação a posição das bandas. Vamos apresentar alguns dos tratamentos matemáticos, os quais foram utilizados neste trabalho, que podem ser aplicados em espectros da espectroscopia no UV-Vis e IR.

2.2.1 Pré-tratamentos:

i) Correção da linha de base

Há vários métodos para correção de linha de base, tais como, ajuste por função polinomial, interpolação ou derivação em 1ª ordem, que podem ser realizadas de forma manual ou por programas computacionais especializados. A correção de linha de base consiste em subtrair as contribuições não desejáveis do espectro. A subtração de uma função polinomial é comumente usada em correção de linha de espectros tanto no UV-Vis quanto no IR, consiste na escolha de pontos (comprimentos de onda) como base e de uma função polinomial que se ajusta através destes pontos, a função gerada é subtraída do espectro eliminando ou minimizando as contribuições indesejáveis [43], [44]. Dependendo da contribuição que manipula o espectro da amostra pode-se optar por outras funções como gaussianas. A Fig. 2.2-1 ilustra a correção de linha de base de um espectro de uma amostra fictícia A.

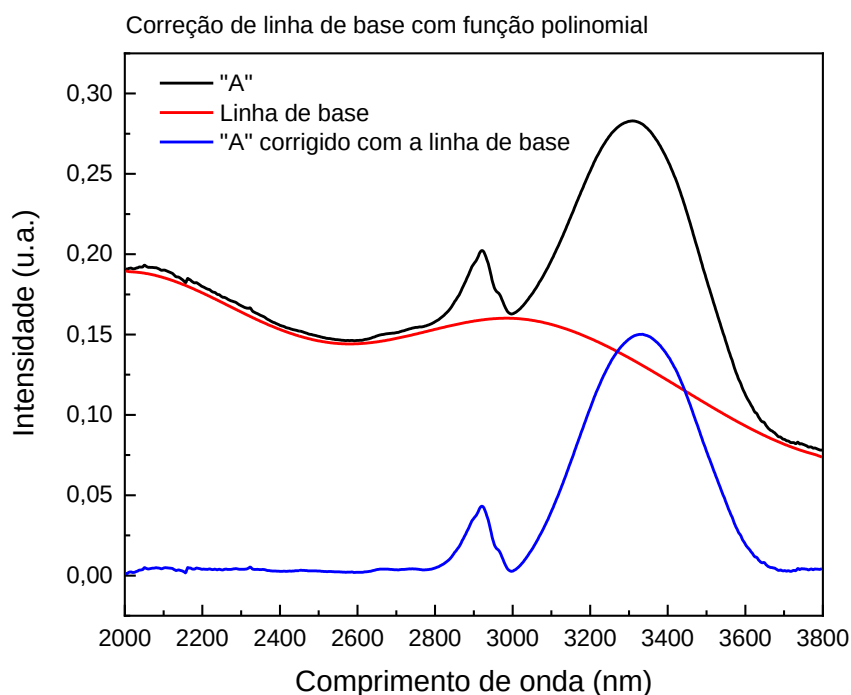


Figura 2.2-1: Espectro da amostra A puro (linha preta), linha de base gerada (linha vermelha) e espectro A corrigido com a linha de base (linha azul).

ii) Normalização

A normalização em espectros auxilia na investigação de diferentes espectros, que geralmente se trata de uma mesma amostra alvo, porém com algum parâmetro variante, tal como, concentração, temperatura, tempo de exposição, potência da fonte de excitação, entre outros. Estes fatores podem acarretar diferentes níveis de intensidade aos espectros. Existem diferentes maneiras de normalizar um espectro, tais como por vetor, máximo-mínimo, utilizando o desvio padrão e normalização na banda [44]. Vamos destacar entre eles a normalização na banda e por vetor de normalização.

Na normalização na banda a intensidade correspondente a frequência (comprimento de onda) central da banda, ou seja, a frequência na qual se tem a máxima intensidade é usada como referência, e todas as intensidades do espectro são divididas pela intensidade de referência,

$$In_i = \frac{I_i}{P}; i = 1, 2, \dots, N \quad (1)$$

sendo In_i a intensidade normalizada, I_i a intensidade do espectro e P a intensidade de referência.

Já na normalização pelo vetor, deve-se inicialmente calcular a norma do espectro, definida como:

$$norma = \sqrt{I_1^2 + I_2^2 + \dots + I_N^2} \quad (2)$$

e depois dividir cada intensidade correspondente a cada comprimento de onda do espectro pela norma

$$In_i = \frac{I_i}{norma}; i = 1, 2, \dots, N \quad (3)$$

A Fig. 2.2-2 ilustra a diferença entre as duas metodologias de normalização para duas amostras A e B fictícias.

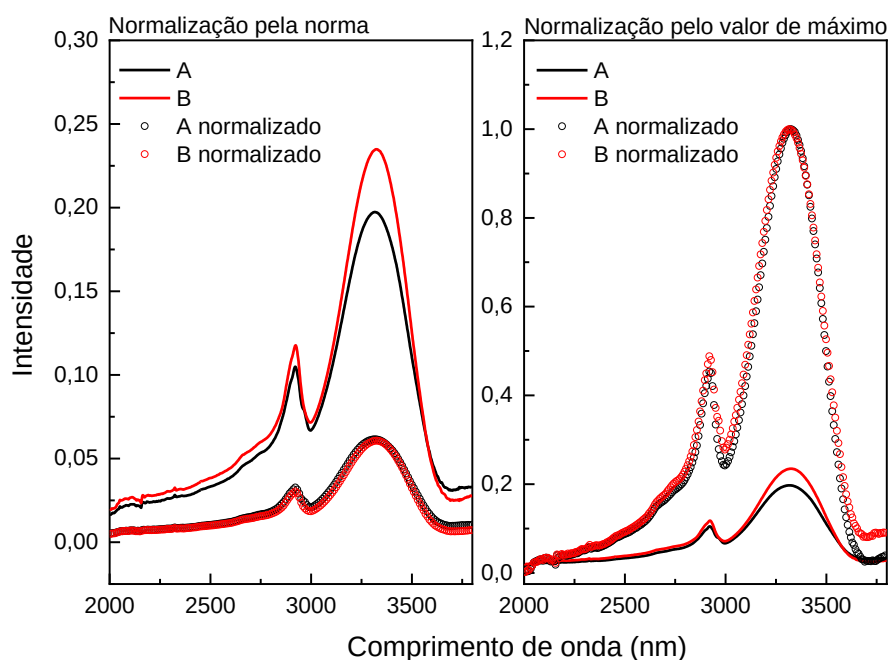


Figura 2.2-2: À esquerda mostra a normalização dos espectros pela norma e à direita pela intensidade máxima. As linhas contínuas são os espectros sem tratamento matemático de A e B e os pontos são os espectros de A e B normalizados.

2.2.2 Tratamentos de espectros de biomoléculas:

Apresentaremos alguns tratamentos matemáticos que podem ser realizados em espectros de biomoléculas, considerando que possuem estruturas moleculares muito complexas que em trabalhos científicos, geralmente, estuda-as sob algumas variações, tais como de iluminação, temperatura ou concentração, entre outras possibilidades. Os parâmetros obtidos por meio dos tratamentos podem ser avaliados em função destas variações.

iii) Avaliação da Intensidade da banda

A maior intensidade se localiza na posição central de uma banda, esta posição é a energia referente a uma transição entre dois níveis, sejam eletrônicos, vibracionais ou rotacionais, em se tratando de UV-Vis e IR podendo ser de uma molécula ou de átomos. A intensidade relativa à transição energética é proporcional a quantidade de moléculas ou átomos que estão sofrendo essa transição. Entretanto por se tratar de

uma banda com largura determinada, isto implica que a vizinhança química referente a esta transição está contribuindo com a forma da banda, assim, quanto maior a quantidade de moléculas ou átomos, maior é a interação química entre eles. Porém essa vizinhança química não transita entre os mesmos níveis energéticos da posição central da banda, e sim com “pequenas” diferenças entre o nível mais baixo e o mais alto, ocasionando em uma largura, a qual configura a banda em um espectro [45]. A Fig. 2.2-3 mostra as intensidades em algumas posições dos espectros das amostras fictícias A e B.

Desta maneira, avaliar de forma direta somente a intensidade de uma banda pode não fornecer a informação precisa sobre a quantidade ou concentração de uma determinada espécie química.

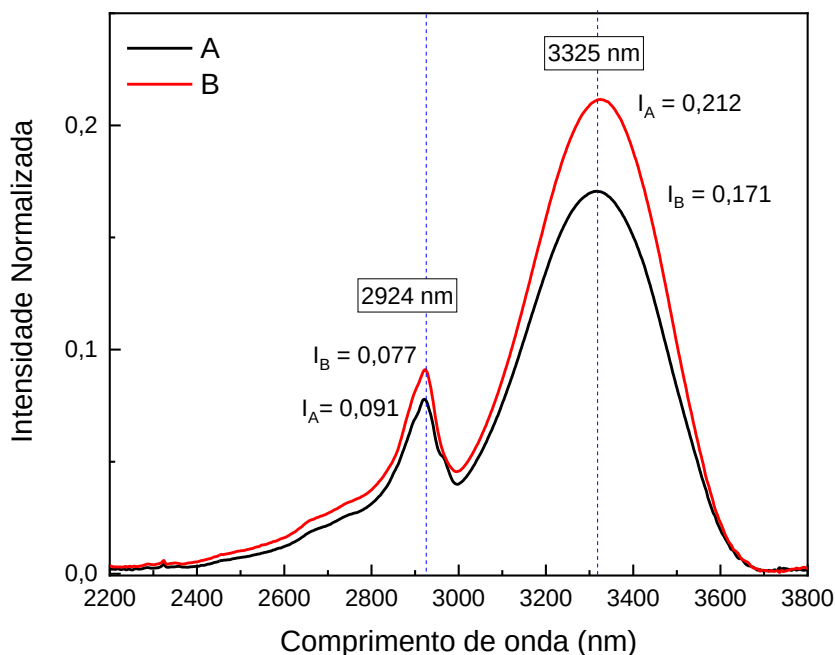


Figura 2.2-3: Espectros das amostras A e B. As linhas pontilhadas indicam a posição central das bandas. I_A e I_B são os valores das intensidades em cada ponto do espectro.

iv) Avaliação da área da banda:

Diante da dificuldade na investigação da intensidade da banda, pode-se optar pela avaliação da área da banda, sendo este parâmetro mais representativo da quantidade ou concentração da espécie química alvo do estudo, pois tanto a intensidade quanto a largura contribuem para área da banda. A área pode ser obtida

por meio do cálculo por integração da área sob a curva ou ajustando uma função matemática que corresponda ao dado experimental, e que um ou mais de seus parâmetros forneçam de forma direta ou indireta a área da banda, como no caso de funções gaussianas ou lorentzianas, as quais discutiremos mais à frente. A Fig. 2.2-4 ilustra a área calculada sob a banda dos espectros das amostras fictícias A e B.

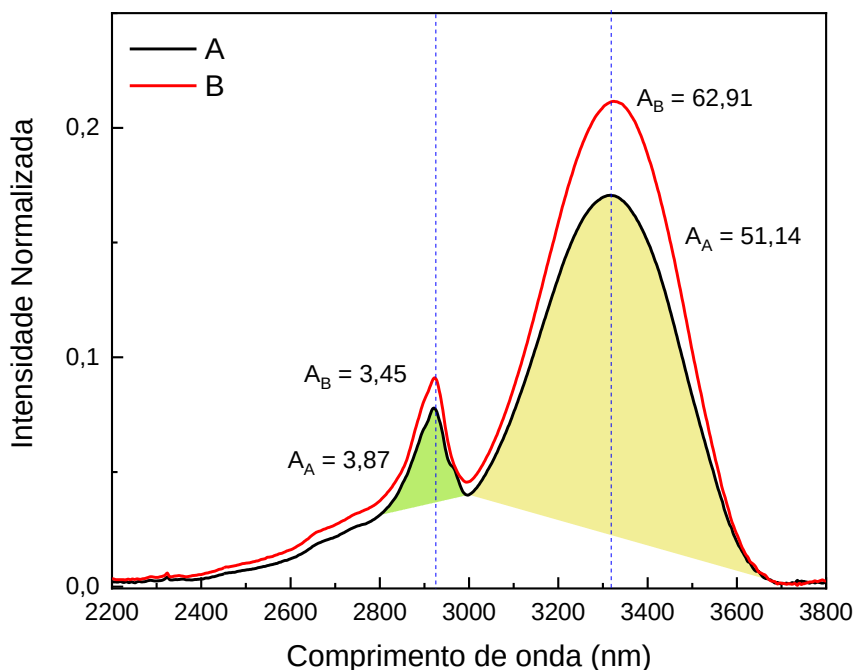


Figura 2.2-4: Espectros das amostras A e B. Em colorido estão mostradas as áreas sob as bandas em destaque. A linha pontilhada indica a posição do máximo de intensidade na banda. A_A e A_B são os valores das áreas obtidas sob a curva por método de integração.

v) Segunda derivada no espectro

Outra ferramenta matemática bastante utilizada na espectroscopia é a aplicação da segunda derivada nos espectros que fornece com maior exatidão o valor da posição central da banda. A Fig. 2.2-5A mostra o espectro e Fig. 2.2-5B a sua segunda derivada. Os pontos de mínimo na segunda derivada indicam os máximos no espectro. Nota-se que há mais pontos de mínimo na segunda derivada do que máximos no espectro da amostra “A”, da mesma maneira que há uma intensificação da posição central da banda, também há para o ruído. A posição central da banda mais evidente na 2ª derivada é para a banda centrada em 2924 nm, já para a banda

em 3325 nm não fica tão evidente o mínimo. Esta é uma propriedade da derivada quando aplicada em bandas mais alargadas. Outra ferramenta utilizada junto com a 2ª derivada para minimizar os ruídos que se maximizam é aplicação do método de suavização para eliminar componentes de alta frequência.

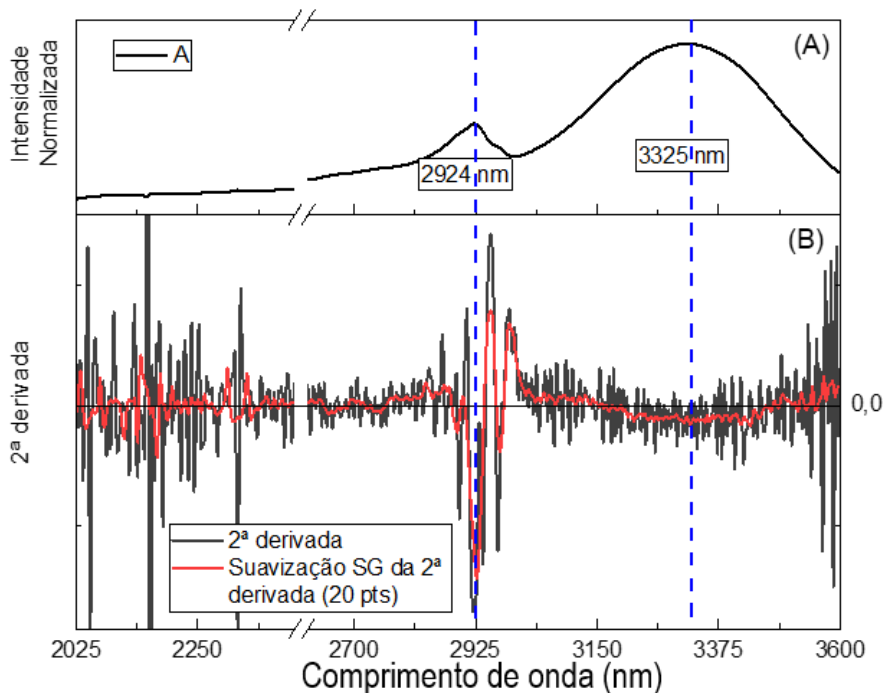


Figura 2.2-5: A) Espectro da amostra A. B) Segunda derivada do espectro A, a linha em vermelho mostra a suavização da segunda derivada pelo método Savitzky-Golay com 20 pontos. As linhas verticais tracejadas indicam a posição de máximo no espectro e mínimo na segunda derivada.

vi) Deconvolução espectral

Em muitos espectros, há a sobreposição de contribuições que não são possíveis de serem visualizadas em uma simples inspeção visual, nestes casos podemos utilizar a deconvolução espectral. Este método tem por hipótese que os espectros estão convolucionados (sobrepostos). As funções matemáticas utilizadas, possuem forma da curva similar a banda espectral, que quando combinadas resultam em uma curva que sobreponha ao dado experimental. Cada uma das funções

utilizadas representa uma contribuição espectral, que de modo geral, apresentam-se sobrepostas, o que torna esse método de deconvolução muito útil desde a caracterização até posterior análise espectral. Neste procedimento, as funções matemáticas mais utilizadas na espectroscopia UV-Vis e IR são gaussianas, lorentzianas ou pseudo-voigt [46]. Como exemplo, destacamos a função gaussiana descrita matematicamente por:

$$y = y_0 + \frac{A}{\omega\sqrt{\pi/2}} e^{-2\left(\frac{x-x_c}{\omega}\right)^2} \quad (10)$$

sendo A a área sob a banda, ω a largura da banda, x_c a posição da máxima intensidade (posição do centro da função gaussiana em x) e y_0 a posição de *offset* com relação a intensidade. A Fig. 2.2-6 ilustra a forma de função gaussiana.

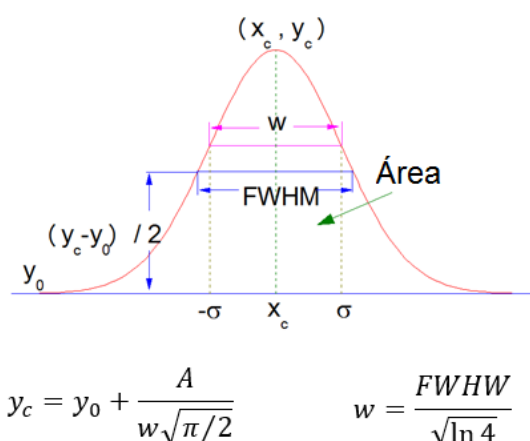
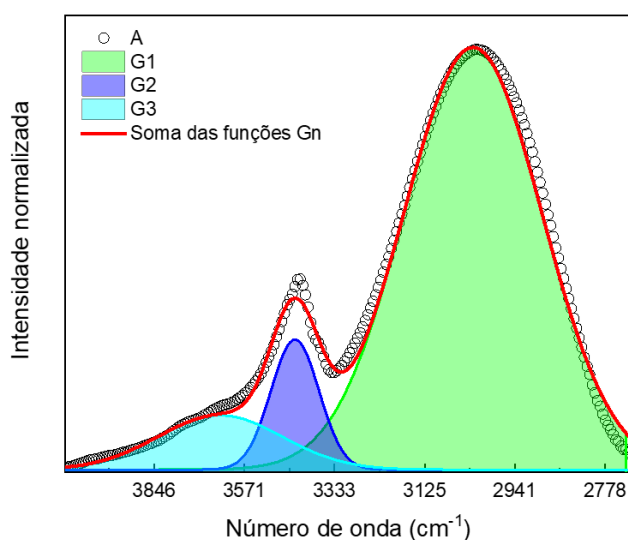


Figura 2.2-6 Ilustração da forma da função gaussiana utilizada para a deconvolução dos espectros. sendo A a área sob a curva, w a largura, $FWHM$ é a largura a meia altura, x_c a posição da máxima intensidade (posição do centro da função gaussiana em x) e y_0 a posição de *offset* com relação a intensidade.

Como já mencionado, é comum na espectroscopia no UV-Vis que os espectros (interferômetros) sejam exibidos em gráficos com o eixo horizontal em comprimento de onda – domínio dos espaços (x), com unidades nm ou μm -, porém ao se utilizar a deconvolução espectral o ideal é utilizar em número de onda com unidades em (cm^{-1}) , devido à simetria da distribuição de energia de transição eletrônica.

A Fig. 2.2-7 ilustra a deconvolução com funções gaussianas do espectro da amostra fictícia A. As gaussianas estão indicadas por G1, G2 e G3, as quais corresponderiam a componentes da amostra A que contribuem no espectro. É importante ressaltar que quanto maior o número de funções matemáticas utilizadas, mais representativa será a soma delas com relação ao dado experimental, entretanto à cada uma das funções deve-se atribuir sua contribuição com relação a composição da amostra ou ao efeito gerado mediante alguma alteração na mesma. A tabela que acompanha a Fig. 2.2-7 mostra os valores aproximados obtidos do ajuste, e com esses valores é possível investigar variações nos espectros em um conjunto de amostras.



	<i>Área</i> (u. a.)	<i>FWHM</i> (u. a.)	<i>Centro</i> (cm ⁻¹)
G1	64,8	361,0	3307
G2	7,0	126,0	2912
G3	7,6	325,4	2746

Figura 2.2-7: Ilustração da deconvolução espectral com ajuste de funções gaussianas ao espectro da amostra A. G1, G2 e G3 são as curvas das funções gaussianas e a linha contínua em vermelho é a soma das três funções gaussianas. A tabela mostra os valores aproximados obtidos do ajuste teórico para cada gaussiana.

vii) Análise multivariada

Análise de área, intensidade ou razões de intensidade ou áreas obtidos dos espectros são considerados dados univariados, porém muitas vezes, a literatura refere-se aos espectros constituídos por milhares variáveis (comprimentos de onda) e medidas (objetos ou observações) como dados multivariados, e como método de

investigação utiliza-se a análise multivariada. Este método estatístico, analisa mais de uma variável por vez com o objetivo de redução, agrupamento e classificação das observações e modelando possíveis relações com as variáveis. Dentre os diferentes métodos de análise multivariada aplicados à espectroscopia, destaca-se a Análise de Componentes Principais (PCA) [47]. Busca-se na PCA reduzir o conjunto de variáveis em um grupo menor de componentes ortogonais entre si e, portanto, independentes na direção de maior variação. Assim, há a redução da dimensionalidade e se mantém as informações mais significantes para as análises. Estas componentes são chamadas de componentes principais (PCs) [47], [48].

A PCA tem como principais vantagens: retirar a multicolinearidade das variáveis, pois permite transformar um conjunto de variáveis originais intercorrelacionadas em um novo conjunto de variáveis não correlacionada (PC). Além disso, reduz muitas variáveis a eixos que representam algumas variáveis, sendo estes eixos perpendiculares (ortogonais) explicando a variação dos dados de forma decrescente e independente. As desvantagens da PCA são: os *outliers* (pontos fora da curva), não recomendado quando se tem duplas ausência (muitos zeros na matriz) e dados ausentes. A PCA também não é recomendada quando se tem mais variáveis do que unidades amostrais [48], [49].

Para dar continuidade sobre a compreensão da PCA, considere as variáveis $x_1, x_2, \dots, x_m$ em cada n indivíduo (amostras) em uma população. Este conjunto, $m \times n$ medidas, origina uma matriz de dados $X(m \times n)$, escrita da seguinte forma:

$$X = \begin{pmatrix} x_{11} & \dots & x_{1n} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ x_{m1} & \dots & x_{mn} \end{pmatrix} \quad (11).$$

Deseja-se transformar linearmente a matriz X em uma matriz Y com as mesmas dimensões $m \times n$, para isso multiplica-se por uma matriz $P(m \times m)$:

$$Y = PX \quad (12)$$

A equação (11) apresenta uma mudança de base. Se interpretar as linhas de P como vetores $p_1, p_2, \dots, p_m$ e as colunas de X com vetores $x_1, x_2, \dots, x_n$, tem-se a matriz Y

$$Y = PX \rightarrow Y = \begin{pmatrix} p_1 x_1 & \dots & p_1 x_n \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ p_m x_1 & \dots & p_m x_n \end{pmatrix} \quad (13)$$

O produto interno $\mathbf{p}_i \mathbf{x}_j$, representa que os dados originais presentes na matriz $\mathbf{X}$ estão sendo projetados para a matriz $\mathbf{P}$, ou seja, os vetores $\mathbf{p}_1, \mathbf{p}_2, \dots, \mathbf{p}_m$ são as novas bases para representar as colunas de $\mathbf{X}$. A PCA define independência considerando a variância dos dados na base original. Ela procura não correlacionar os dados originais, mas encontrando as direções nas quais a variância é maximizada. Em seguida, utiliza essas direções para definir uma nova base. Então, a matriz transformada $\mathbf{Y}$ deve exibir as características da matriz de covariância $\mathbf{C}_Y$ [48],[49]. A matriz de covariância dos dados originais, $\mathbf{C}_X$, é dada pelo seguinte produto matricial:

$$\mathbf{C}_X = \frac{1}{n-1} \mathbf{X} \mathbf{X}^T \quad (14)$$

$$\mathbf{C}_X = \frac{1}{n-1} \begin{pmatrix} \mathbf{x}_1 \mathbf{x}_1^T & \cdots & \mathbf{x}_1 \mathbf{x}_m^T \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ \mathbf{x}_m \mathbf{x}_1^T & \cdots & \mathbf{x}_m \mathbf{x}_m^T \end{pmatrix} \quad (15)$$

Na qual n na matriz, equação (15), representa o número de medidas. Nessa matriz é possível observar que no produto $\mathbf{x}_i \mathbf{x}_j^T$ que se encontram na diagonal, tem-se a medida da variância enquanto fora da diagonal apresenta a medida da covariância. Essa medida pode ser compreendida como a correlação que existe entre duas variáveis. O método PCA tem por hipótese fundamental de que as variáveis na matriz transformada $\mathbf{Y}$ devem ser menos correlacionadas possível. Isso equivale a dizer que as covariâncias de diferentes variáveis na matriz $\mathbf{C}_Y$ devem ser o mais próximo possível de zero. Por outro lado, grandes valores de variância nos interessam, uma vez que correspondem a dinâmicas interessantes no sistema. Portanto, tem-se os seguintes requisitos para construir a matriz de covariância, $\mathbf{C}_Y$:

1. Maximize o sinal, medido pela variação (maximize as entradas diagonais).
2. Minimize a covariância entre as variáveis (minimize as entradas fora da diagonal).

Assim, chega-se à conclusão de que com a covariância mínima (quase zero), busca-se a matriz diagonal, $\mathbf{C}_Y$, logo se deseja ter uma matriz transformação $\mathbf{P}$ que diagonalize $\mathbf{C}_Y$. Assim, é possível obter os seguintes resultados:

$$\mathbf{C}_Y = \frac{1}{n-1} \mathbf{Y} \mathbf{Y}^T \rightarrow \mathbf{C}_Y = \frac{1}{n-1} (\mathbf{P} \mathbf{X}) (\mathbf{P} \mathbf{X})^T \rightarrow \mathbf{C}_Y = \frac{1}{n-1} (\mathbf{P} \mathbf{X}) (\mathbf{P}^T \mathbf{X}^T)$$

$$\mathbf{C}_Y = \frac{1}{n-1} \mathbf{P}(\mathbf{X}\mathbf{X}^T) \mathbf{P}^T \rightarrow \mathbf{C}_Y = \frac{1}{n-1} \mathbf{P}\mathbf{S}\mathbf{P}^T \quad (16)$$

Em que $\mathbf{S} = \mathbf{X}\mathbf{X}^T$ é uma matriz simétrica de $m \times m$. Utilizando do teorema da álgebra linear que afirma que toda matriz quadrada é ortogonalmente diagonalizável. Logo $\mathbf{S}$ fica:

$$\mathbf{S} = \mathbf{E}\mathbf{D}\mathbf{E}^T \quad (17)$$

Na qual $\mathbf{E}$ é uma matriz ortonormal, $m \times m$, com as colunas sendo os autovetores de $\mathbf{S}$ e $\mathbf{D}$ é uma matriz diagonal possuindo os autovalores de $\mathbf{S}$.

Tendo esses conceitos em consideração, pode-se fazer a escolha da matriz de transformação $\mathbf{P}$, sendo esta a matriz de autovetores de $\mathbf{S}$, assim:

$$\mathbf{P} = \mathbf{E}^T \quad (18)$$

Substituindo as equações (18) e (17) em (16) tem-se:

$$\mathbf{C}_Y = \frac{1}{n-1} \mathbf{P}\mathbf{S}\mathbf{P}^T \rightarrow \mathbf{C}_Y = \frac{1}{n-1} \mathbf{E}^T (\mathbf{E}\mathbf{D}\mathbf{E}^T) \mathbf{E} \quad (19)$$

Como $\mathbf{E}\mathbf{E}^T = \mathbf{I}$, com $\mathbf{I}$ sendo a matriz identidade, encontra-se o seguinte resultado:

$$\mathbf{C}_Y = \frac{1}{n-1} \mathbf{D} \quad (20)$$

A matriz $\mathbf{D}$ fornece as componentes principais PC. Com esse método, obtemos informações sobre a importância relativa de cada componente principal das variações. A maior variação corresponde ao primeiro componente principal, a segunda maior ao segundo componente principal e assim por diante. Isso, portanto, nos dá um método para organizar os dados na diagonal. Uma vez que se obtém os autovalores e autovetores de $\mathbf{S} = \mathbf{X}\mathbf{X}^T$, classifica-se os autovalores em ordem decrescente e os coloca na ordem da diagonal de $\mathbf{D}$. Os componentes principais (as linhas de $\mathbf{P}$) são os autovetores da matriz de covariância, $\mathbf{X}\mathbf{X}^T$, e as linhas estão em ordem de 'importância', dizendo como é "principal" cada componente. Estas componentes são chamadas de componentes principais (PCs) [49].

A PCA aplicada a espectroscopia requer que a matriz $\mathbf{X}$ seja organizada de modo que as linhas sejam as amostras e as colunas as variáveis, ou seja, as intensidades das bandas dos espectros, neste caso é necessário transpor os espectros transformando colunas em linhas. A primeira componente principal (PC1)

apresenta maior variação no conjunto de dados, a segunda (PC2) é ortogonal a primeira, descrevendo o maior percentual de variação não explicada pela PC1, e assim por diante. Outro parâmetro fornecido pela PCA são os escores que representam as coordenadas das amostras no sistema de eixos formados pelos componentes principais, mostrando a similaridade entre as amostras. O parâmetro peso, também fornecido pela PCA, são os cossenos dos ângulos entre as variáveis originais e os PC's, que permitem avaliar quais variáveis mais contribuem para o agrupamento das amostras [50]. Esta análise multivariada permite agrupar amostras por meio das bandas presentes nos espectros, e ainda observar qual a região espectral que mais contribuiu para este agrupamento.

É importante salientar que anterior aos tratamentos matemáticos aos espectros o ideal é que se tenha a identificação das bandas do espectro, o que geralmente é feito por meio de revisão bibliográfica. O método da segunda derivada também auxilia na visualização de contribuições nos espectros que estejam sobrepostas. Além disso, a utilização de modelagens moleculares, como a Teoria do Funcional da Densidade (DFT) tem sido muito utilizada na espectroscopia para identificação das contribuições espectrais de compostos complexos.

Com os tratamentos matemáticos apresentados foi possível estudar diferentes amostras, em sua grande parte plantas, extratos de plantas, frutos e resíduos da indústria alimentícia. A correlação entre as diferentes amostras foi a utilização de técnicas espectroscópicas na região do UV-Vis e MIR buscando avaliar componentes similares em suas composições, assim chegamos aos compostos bioativos.

2.3 Compostos bioativos

Compostos bioativos variam bastante em estrutura química, bem como, em suas funções biológicas, sendo em sua maioria substâncias orgânicas presentes no reino vegetal. Carotenoides, flavonoides, esteróis vegetais, ácidos graxos, ômega-3 e compostos fenólicos, são alguns exemplos de compostos bioativos [15]. Em geral, não tem funções essenciais como os nutrientes, porém desempenham papéis como

atividade antioxidante, antibacteriano, antiviral, atua no equilíbrio do nível hormonal e estimulação do sistema imune [51]. A busca por conhecimento sobre eficácia de dietas alimentares e seu impacto em nossa saúde, em níveis moleculares, tem mudado as estratégias alimentares dos seres humanos, não há a procura somente por nutrientes adequados para suprir as necessidades metabólicas, mas também para melhora da saúde humana.

Neste viés, estudos em compostos bioativos tem sido alvo de diferentes áreas do conhecimento, sendo uma grande parte com o objetivo de detectar os compostos em alimentos *in natura*, extratos ou até mesmo em alimentos processados. A seguir fazemos uma breve apresentações sobre alguns compostos bioativos, que foram estudados por meio das técnicas espectroscópicas empregadas neste trabalho.

Os principais compostos bioativos relevantes para a dieta humana são os carboidratos não digeríveis, esteroides vegetais e fito estrógenos bem como os compostos antioxidantes, dentre eles os carotenoides [33], [52].

Os carotenoides podem ser divididos em duas subclasses: xantofilas e carotenos (Fig. 2.2-9). Carotenos contém somente átomos de carbono e hidrogênio enquanto as xantofilas possuem oxigênio nos grupos funcionais. Estão presentes em plantas como pigmentos e antioxidantes, e estudos epidemiológicos sugerem que uma dieta rica em carotenoides diminui a incidência de doenças cardiovasculares, catarata, câncer e outras doenças degenerativas [53].

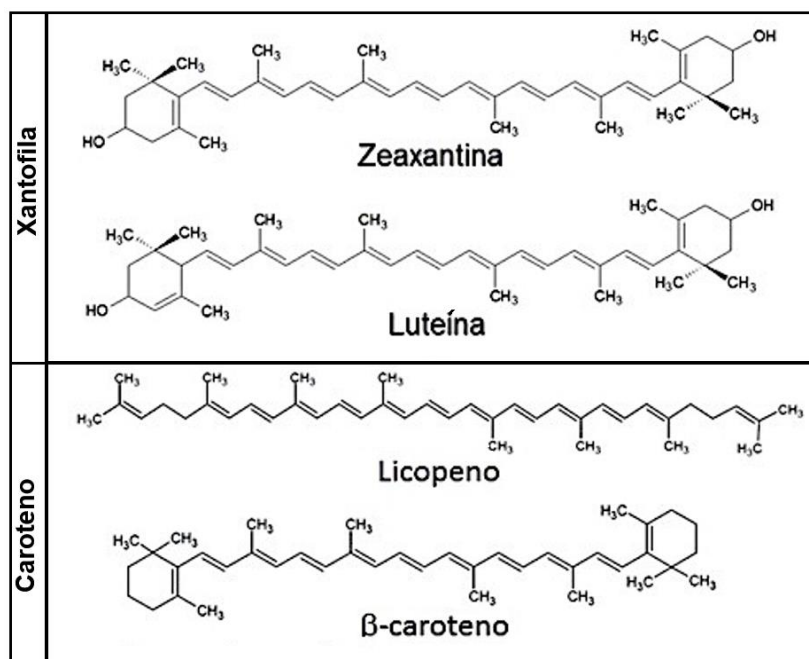


Figura 2.3-1: Estrutura química de alguns carotenoides. Adaptado de [54].

A estrutura química dos compostos fenólicos consiste em ao menos um anel de benzeno, o qual está ligado a um ou mais grupo hidroxila (Fig. 2.2-10). Outros grupos funcionais, tais como, ésteres ou ácidos carboxílicos podem também estar ligados. Dependendo da configuração química os compostos fenólicos podem ser agrupados em várias famílias, por exemplo, ácidos fenólicos, flavonoides e taninos. Estes compostos são conhecidos por suas propriedades antioxidantes, redução do risco de doenças cardiovasculares, atua como agente antibacteriano, antiviral e anti-inflamatório [55].

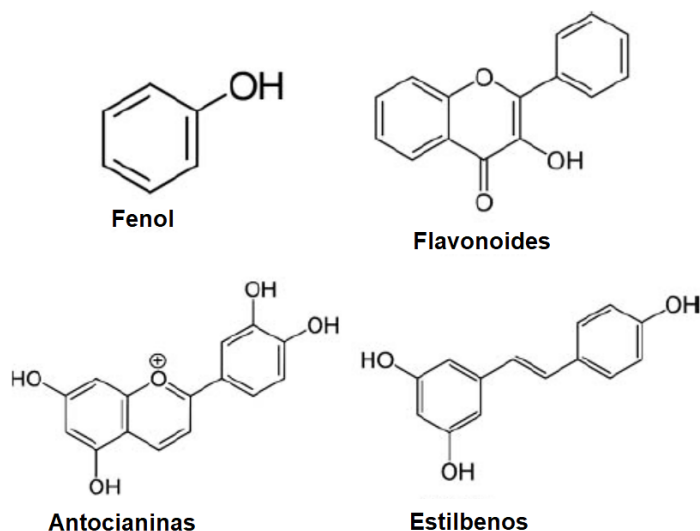


Figura 2.3-2: Estrutura química de diferentes grupos de compostos fenólicos.
Adaptado de [56].

A clorofila é um dos mais valiosos compostos bioativos que pode ser extraído da maioria das plantas e algas. É utilizada como corante natural em alimentos e tem propriedades antioxidantes e antimutagênica. Há dois tipos principais de clorofila, conhecidas como *a* e *b*, a estrutura química de ambas é constituída de um macrociclo tetrapirrólico (formado por quatro anéis pirrólicos), ligados por ligações metínicas (-CH-), que possui no seu centro um íon de Mg^{2+} (Fig. 2.2-11). Na clorofila *b* o grupo metil existente no anel II da clorofila *a* é substituído por um grupo aldeído. Com diferença estrutural a clorofila *a* apresenta cor azul/verde enquanto a clorofila *b* é um pigmento verde/amarelo [57].

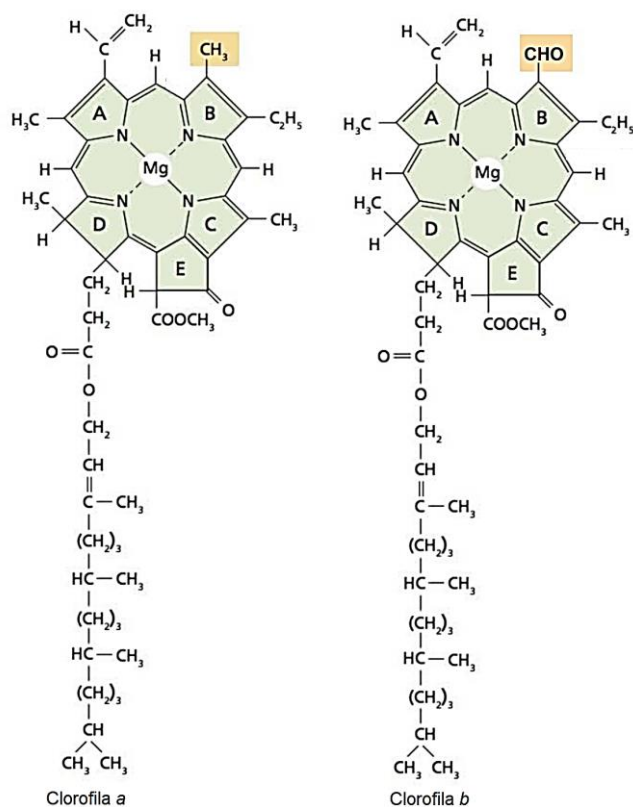


Figura 2.3-3: Estrutura química da clorofila a e b. Adaptado de [58].

Carboidratos desempenham um papel essencial na biologia humana e na prevenção do desenvolvimento de doenças, porém ainda são poucos explorados como fonte de compostos bioativos para uso como alimentos funcionais ou farmacêuticos. Os carboidratos tem formula química geral $C_x(H_2O)_y$ e são classificados em monossacarídeos, mais simples e oligossacarídeos e polissacarídeos, mais complexos (Fig.2.2-12). Pesquisas em carboidratos bioativos indicam que polissacarídeos como quitina e a quitosana utilizadas com alimentos funcionais mostraram eficiência contra a obesidade, propriedades anticoagulantes e efeitos probióticos, ou seja, por não serem digeridos estimulam a proliferação ou atividade de populações de bactérias desejáveis no cólon [59], [60].

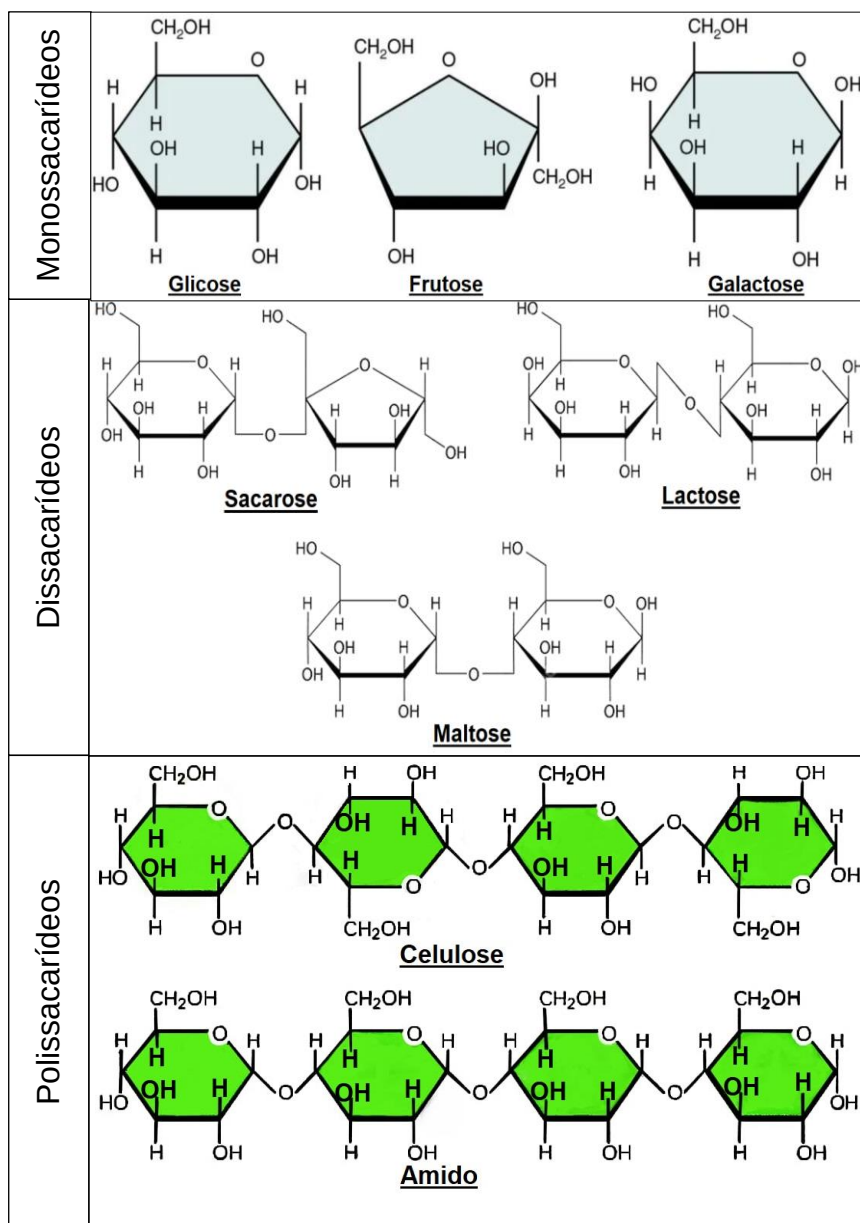


Figura 2.3-4: Estruturas químicas de alguns carboidratos. Adaptado de [61].

As proteínas, junto com carboidratos e gorduras, são três compostos bioativos classificados como macronutrientes obtidos em alimentos. São fonte de energia e aminoácidos, essenciais para nosso crescimento e manutenção do corpo. Do ponto de vista funcional afetam as propriedades físico-químicas e sensoriais de vários produtos alimentícios, pois são utilizadas, como por exemplo, como emulsificantes ligando-se a água ou gordura e alterando textura, sabor e aparência. São macromoléculas formadas pela união sucessiva de aminoácidos, compostos que possuem em sua cadeia principal uma ligação peptídica entre um grupo amino e um

grupo carboxílico, e uma cadeia lateral na qual se situa um radical (Fig. 2.2-13). Uma dieta proteica é uma fonte de peptídeos biologicamente ativos, que são liberados durante a digestão gastrointestinal ou no processamento de produtos alimentícios, e que vez liberados em nosso corpo, podem atuar como reguladores de hormônios, obesidade, entre outros. As proteínas bioativas podem ter origem animal, como as imunoglobulinas presentes no leite, ou vegetal, como na soja [62], [63]. As proteínas são fontes de peptídeos bioativos uma vez que estes podem ser obtidos por efeitos proteolíticos. A proteose de proteínas à peptídeos menos complexos podem acontecer por diversas formas diferentes no interior celular, entretanto muitos processos industriais simulam estes processos com a finalidade de obter peptídeos bioativos. Estes por sua vez podem possuir diversas atividades importantes para nosso organismo, agindo como agentes neurotransmissores, hormonais e reguladores, além de outras funções não apresentadas pelas proteínas originais, tais como atividade antioxidante, atividade antimicrobiana (AMPs), atividade anti-hipertensiva. [64]–[66].

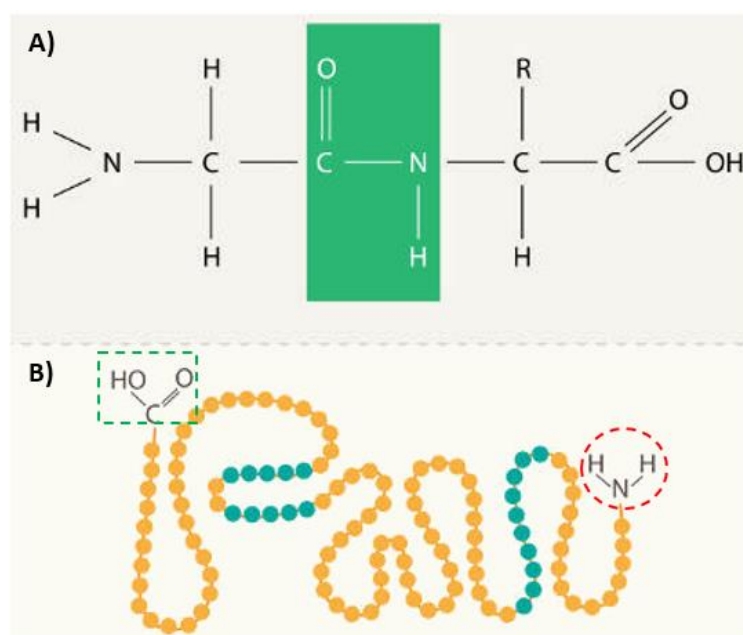


Figura 2.3-5: Estrutura primária de uma proteína. A) sequência linear de aminoácidos, não havendo nenhuma ramificação. B) Terminal amino (destacado em vermelho) e terminal carboxílico (destacado em verde). Adaptado de [67].

Para determinação dos compostos bioativos de gêneros alimentícios, comumente, são utilizados métodos químicos analíticos, ou técnicas de separação como as cromatográficas, ou até mesmo espectrofotômetros em comprimento de onda fixo na qual se monitora a intensidade do sinal em função do tempo, em todas

as metodologias citadas há o emprego de reagentes químicos para solubilização ou extração do componente alvo, o que requer preparação prévia da amostra, seja um extrato, um produto processado ou alimento *in natura*.

As técnicas espectroscópicas têm sido muito utilizadas como métodos de análise de compostos bioativos, principalmente com relação identificação das diferentes moléculas, bem como, na avaliação antioxidante e na determinação de compostos fenólicos totais. Dentre as vantagens da espectroscopia podemos destacar as que operam na região do infravermelho médio, nesta região é possível detectar os modos vibracionais moleculares de grupos químicos, e assim determinar diferentes compostos da amostra em estudo. Na região do ultravioleta-visível, intervalo espectral mais energético que a do infravermelho, as ligações π conjugadas apresentam absorção nesta região, como no caso dos compostos fenólicos que contêm o anel fenólico, também permitindo que no ultravioleta-visível os compostos bioativos possam ser identificados [68], [69]. Além disso, a instrumentação para espectroscopia também favorece o estudo dos compostos bioativos, pois podem ser estudados na forma de pó, *bulk* e líquida, com exceção das amostras líquidas, as demais, geralmente, não demandam de preparo prévio, além disso, as técnicas espectroscópicas são minimamente destrutivas. As versatilidades das técnicas espectroscópicas para estudo dos compostos bioativos nos motivaram a este trabalho.

Capítulo 3

MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo está descrito de forma sucinta sobre a preparação das amostras, as quais foram preparadas pelos discentes e professores dos departamentos e programas de pós-graduação que trabalharam conosco em colaboração científica. Além disso, há uma breve descrição, acerca das técnicas empregadas neste trabalho, as espectroscopias de absorção no UV-Vis, FTIR-ATR e Fotoacústica.

3.1 Técnicas espectroscópicas

3.1.1 Espectroscopia de absorção na região do UV-Vis

A espectroscopia de absorção analisa a dependência da intensidade da onda eletromagnética absorvida pelo material em função do comprimento dessa onda, quando se trata de análises na região espectral do UV-Vis compreende o intervalo entre 190 e 800 nm [70].

Sendo a radiação eletromagnética constituída por um fluxo de fótons incidindo em um objeto, uma fração da sua energia pode ser refletida na superfície, espalhada em seu interior ou absorvida por suas moléculas. Assim, de acordo com a lei de conservação da energia, podemos apresentar a intensidade do campo eletromagnético incidente como a soma dessas frações de intensidade. O processo de absorção ocorrerá quando o fóton for capturado pela partícula absorvedora, o que pode ser descrito como uma colisão perfeitamente inelástica, a seção transversal em

que a colisão pode acontecer é chamada de seção de choque. Ao incidir um objeto absorvedor a radiação eletromagnética incidente tem sua intensidade atenuada, sendo a intensidade de luz transmitida pela amostra dependente da sua espessura, da seção de choque de partículas absorvedoras e da sua concentração (número de partículas por volume), que matematicamente é descrita pela lei de Beer-Lambert.

As colisões que ocorrem na seção de choque da amostra dependem da frequência, e essa dependência chama-se espectro de absorção, composto por linhas ou bandas de absorção que mostram as transições eletrônicas entre os níveis de energia da molécula excitada [70]. Usualmente os espectros podem ser obtidos por meio de espectrômetros comerciais, que essencialmente, são compostos por uma fonte ou mais fonte de excitação, para abranger diferentes intervalos da radiação do espectro de radiação eletromagnético. A radiação da fonte então é direcionada e focalizada, por meio de espelhos e lentes, para um elemento dispersivo, geralmente um monocromador, que dispersa a radiação oriunda da fonte em diferentes comprimentos de onda, a resolução do espectro final dependerá da precisão na separação do monocromador. A luz dispersa então é direcionada a amostra, geralmente, em espectrômetros comerciais o compartimento da amostra é compatível com módulos que permitem medida por transmitância ou reflectância. No caso do modo de transmitância, a luz direcionada atravessa a amostra, e a intensidade de luz não absorvida e/ou espalhada pela amostra é então direcionada um detector. Por fim, o sinal detectado é processado resultando no espectro de absorção da amostra. Um esquema dos componentes de um espectrômetro pode ser visualizado na Fig. 3.1.1-1.

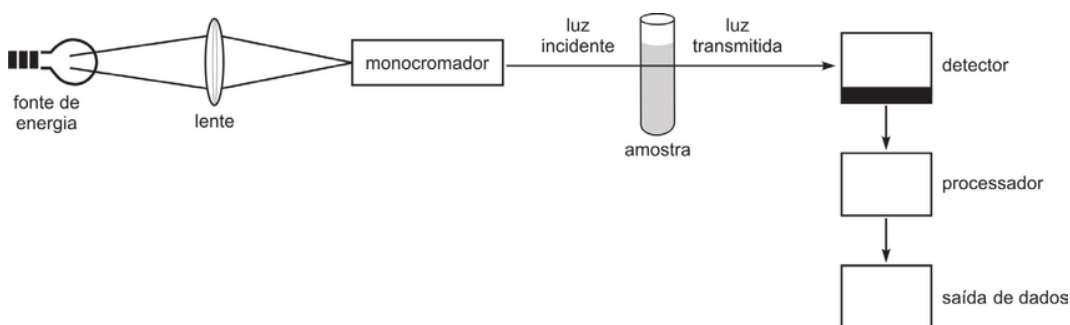


Figura 3.1.1-1. Esquema dos componentes elementares de um espectrômetro para medidas no modo de transmitância. Adaptado de [71],[72].

3.1.2 Espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A absorção na região espectral do infravermelho, entre 1 μm a 1000 μm , ocorre quando a frequência da radiação incidente estiver em ressonância com a frequência de vibração da molécula, desde que haja variação periódica de seu momento de dipolo elétrico. Quando uma molécula vibra, o momento de dipolo pode sofrer variação. A equação (XX) representa o momento de dipolo elétrico, responsável pelas vibrações no infravermelho [73]:

$$\mu = \mu_0 + (r - r_e) \frac{d\mu}{dr} + \dots \text{termos mais elevados} \quad (21)$$

Sendo μ_0 o momento de dipolo permanente e $\frac{d\mu}{dr}$ é a derivada da posição de equilíbrio. Para que exista a variação do momento de dipolo, e assim a absorção no infravermelho, a derivada $\frac{d\mu}{dr}$ deve ser diferente de zero. Para pequenas vibrações os termos mais elevados podem ser desprezados [73].

O instrumento fundamental em um espectrômetro de FTIR é o interferômetro, que pode ser conferido na Fig. 3.1.2-1 (A). Um interferômetro é constituído de um divisor de feixes que reflete e transmite parcialmente a radiação que o atinge e de dois espelhos, sendo um fixo e outro que se movimenta constante com uma frequência fixa. A fonte de excitação emite radiação no infravermelho composta de várias frequências, esta radiação incide no divisor de feixes, sendo parcialmente refletida ao espelho fixo, e parcialmente transmitida ao espelho móvel, após as reflexões nos espelhos estas se recombina novamente no divisor de feixes e se propagam até a amostra, e posteriormente a radiação não absorvida pela amostra é direcionada ao detector. A utilização do interferômetro ao invés de elementos dispersivos dinamiza o processo de medida, já que todas as frequências transmitidas pela amostra são detectadas simultaneamente [73], [33].

Com a variação constante da posição do espelho móvel os feixes combinados podem estar em fase ou defasados resultando em um interferograma com máximos e mínimos de intensidade. Entretanto o interferograma é uma função descrita no espaço temporal, não fornecendo diretamente informações com relação aos modos vibracionais das moléculas da amostra correlacionadas a frequência, sendo assim é

realizada a transformada de Fourier no sinal detectado convertendo o interferograma em espectro no espaço das frequências, que mostra a variação da intensidade transmitida pela amostra em função da frequência, sendo esta proporcional a energia. Cada banda em um espectro de infravermelho (considerando o espectro convertido de transmitância para em absorção) indica um modo vibracional da amostra, que pode ser chamado de infravermelho ativo, nem todas as ligações químicas presentes na amostra mostram picos no espectro de infravermelho, pois para isso é necessário que o momento de dipolo da ligação entre os átomos varie durante a interação com o campo elétrico da radiação incidente [74], [33].

A utilização de um método espectroscópico por meio da utilização de interferômetro permite que todas as frequências sejam detectadas simultaneamente fornecendo espectros em menor tempo comparados aos métodos dispersivos e não há equivalente à luz espúria, pois cada frequência é modulada individualmente.

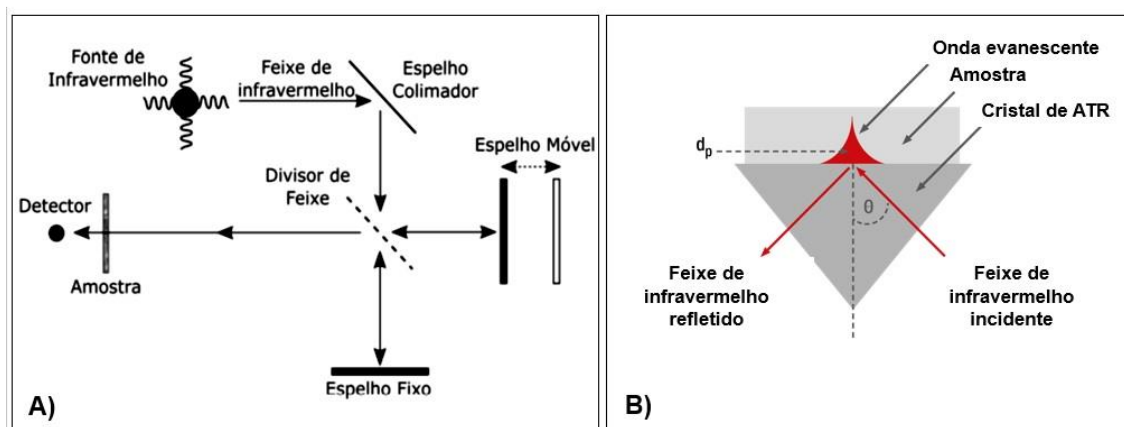


Figura 3.1.1-2: A) Representação dos componentes principais que compõem um espectrômetro de FTIR. Adaptado de [75]. B) Esquema da reflexão interna total única em um cristal do acessório de ATR. Adaptado de [76].

3.1.3 Espectroscopia Fotoacústica

A espectroscopia fotoacústica é baseada no fenômeno fotoacústico, no qual a depende da incidência periódica de radiação eletromagnética e absorção de diferentes comprimentos de onda pela amostra, gerando ondas de calor na mesma,

que se propagam em seu no interior retornando a superfície de incidência e assim, causando uma variação periódica de pressão no gás adjacente a sua superfície.

Experimentalmente, a montagem da técnica utiliza como de fonte de luz uma lâmpada de arco de Xenônio, 1000W, (Oriel, modelo 68820) que abrange uma região espectral com emissão desde o ultravioleta até o infravermelho próximo. Este intervalo espectral, principalmente a região do ultravioleta ao visível, é o qual se encontram os principais cromóforos dos compostos bioativos. A radiação eletromagnética emitida pela fonte é então dispersada em diferentes comprimentos de onda por um monocromador (Oriel, modelo 77250) e modulada, com frequência fixa, por modulador mecânico (Stanford Research System, modelo SR 540), sendo direcionada por espelhos e focada por lentes, não absorvedores nos comprimentos de onda emitidos, à amostra, que foi condicionada em uma célula fotoacústica fechada [77]. Um esquema do aparato experimental é mostrado na Fig. 3.1.3-1 (B) e da célula fotoacústica fechada na 3.1.3-1 (A).

Neste experimento a célula fotoacústica foi preenchida com ar ambiente e acoplado a um microfone capacitivo (Brüel and Kjaer, modelo 2669), que detecta da variação de pressão da camada adjacente a amostra, devido à sua absorção em diferentes comprimentos de onda. O sinal detectado foi então, amplificado por um amplificador (EG&G Instruments, modelo 5110). O resultado final é um espectro fotoacústico, no qual é observado o sinal fotoacústico detectado pelo microfone em função do comprimento de onda da radiação incidente. A frequência de modulação foi selecionada sendo a mínima, experimentalmente possível, para atingir camadas abaixo da superfície da amostra. Esta é uma característica que diferencia a espectroscopia fotoacústica das demais espectroscopias, pois o sinal fotoacústico tem dependência com a frequência de modulação e com a difusividade térmica da amostra, quanto maior a frequência o sinal é gerado em regiões mais próximas a superfície de incidência, ao passo que quanto menor a frequência o sinal é gerado em regiões mais profundas do material [78]. Maiores detalhes sobre a montagem da espectroscopia fotoacústica utilizada podem ser encontrados nas referências [78] e [79].

Outra vantagem do emprego da espectroscopia fotoacústica neste estudo é a que a técnica fornece um sinal proporcional ao coeficiente de absorção óptica da amostra, sem que efeitos de emissão ou espalhamento contribuam no sinal final [80].

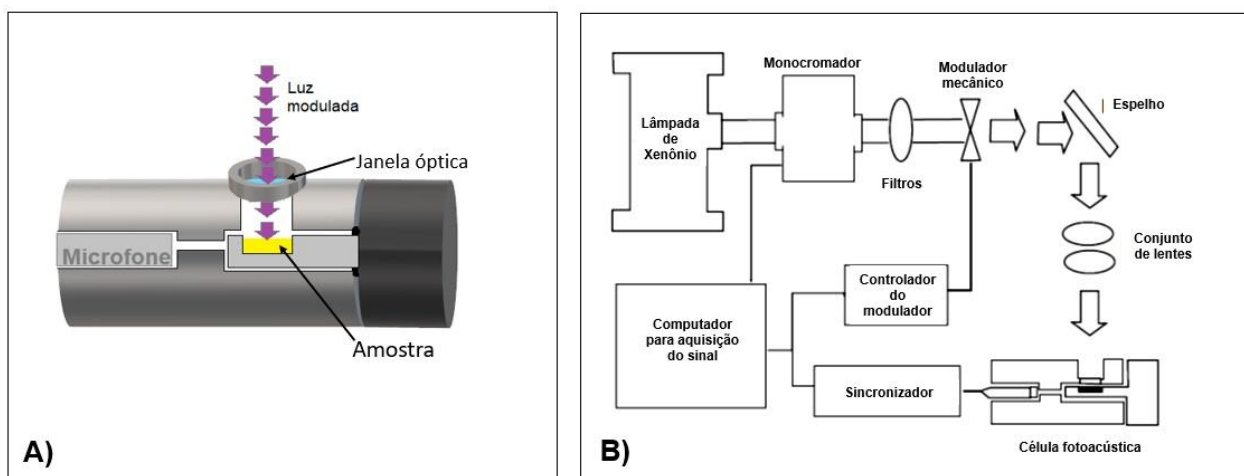


Figura 3.1.3-1: A) Representação da célula fotoacústica fechada. B) Representação do aparato experimental da Espectroscopia Fotoacústica utilizada neste trabalho. Adaptado de [78].

3.2 Preparação das amostras e configurações experimentais

3.2.1 Resíduos da fabricação de cerveja (*Trub*)

Este estudo foi uma colaboração científica com a professora Dra. Paula Toshimi Matumoto-Pintro do Departamento de Agronomia da UEM (DAG) / Programa de Pós-graduação em Ciências de Alimentos (PPC-UEM) e sua orientada Bianka Rocha Saraiva (PPC-UEM). Os dados e análises espectroscópicos também fazem parte da dissertação de Mestrado de Bianka Saraiva [81].

Preparação da amostra:

O *trub* úmido, resíduo da fabricação de cerveja, foi obtido de uma produção de cerveja do tipo Pilsen da fábrica de bebidas Industrial Norte Paranaense de Bebidas (INBEB) localizada na cidade de Londrina-PR, logo após o estágio de fervura do mosto, e armazenado a -18 °C até as análises e a extração de seus compostos amargos.

Para o procedimento de extração dos componentes amargos do *trub*, a amostra foi submetida a homogeneização, à 25 °C do resíduo em água destilada (25 g/L) por 10 min, depois foi aquecido durante 60 min à 100 °C, e então foi realizada uma filtragem, resultando em duas frações; uma sólida e outra líquida.

A fração sólida que ficou retida no filtro foi homogeneizada novamente em água destilada e repetido todo processo de aquecimento e filtração. Após a amostra passar 5 vezes pelo processo descrito, a fração sólida da filtragem resultante da quinta etapa foi liofilizada, a granulometria foi padronizada (60 Mesh) e a amostra foi armazenada a 5 °C protegida da luz, esta amostra foi denominada de TAP. A amostra de *trub* sem ser submetida ao processo de extração dos componentes amargos foi denominada de TBP [82]. Maiores detalhes sobre as amostras e suas preparações podem ser encontrados nas referências [81] e [82].

A obtenção das amostras e preparação delas foram realizadas pela Profa. Paula Pinto, Bianka Saraiva e demais colaboradores. As medidas e análises espectrais da espectroscopia vibracional foram realizadas neste trabalho de tese.

Configuração experimental:

As amostras TBP, as resultantes dos 4 processos de extração dos compostos amargos e a TAP foram submetidas a análise de espectroscopia FTIR, com o objetivo de identificar e acompanhar as mudanças na estrutura química da amostra. As medidas foram realizadas no espectrômetro FTIR-ATR (Bruker, Vertex 70v – Platinum ATR, Alemanha) pertencente ao COMCAP-UEM. As amostras foram dispostas sobre a superfície do diamante, cobrindo-o completamente, e então pressionadas contra ele. As análises foram realizadas em triplicatas. Cada espectro foi uma média de 128 varreduras, com resolução de 4 cm⁻¹, no espaço espectral de 400 à 4000 cm⁻¹.

3.2.2 *Maytenus ilicifolia* - Espinheira-santa

Este estudo foi uma colaboração científica com o professor Dr. Otávio Akira Sakai do Departamento de Física do Instituto Federal do Paraná, Campus de Umuarama (IFPR-Umuarama) / Programa de Pós-graduação em Sustentabilidade

(PSU - IFPR/UEM) e, o então discente de mestrado Wolfran Aparecido De Alvarenga (PSU - IFPR/UEM). Os dados e análises espectroscópicas também fazem parte da dissertação de mestrado de Wolfran Aparecido De Alvarenga. apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sustentabilidade, Umuarama-PR, 2019 [25].

Preparação da amostra:

Foram utilizadas folhas da fase adulta, assim como cotilédones e plântulas da fase inicial de desenvolvimento da planta, popularmente conhecida como espinheira-santa, *Maytenus ilicifolia*.

As folhas foram obtidas em parceria com o Horto da Universidade Paranaense – UNIPAR (Umuarama/PR), posteriormente trituradas, congeladas, liofilizadas e maceradas à seco. As sementes utilizadas para obtenção das plântulas foram adquiridas na cidade de Campo Largo/PR, as quais foram selecionadas quanto ao tamanho e forma, semeadas em caixas gerbox, e posteriormente levadas à câmara de germinação em ciclos de 12 h claro e 12 h escuro à 27 °C, durante 21 dias. Os cotilédones (sem os tegumentos) que restaram das plântulas e as plântulas, de no máximo 8 cm, foram macerados a seco no graal, congelados por aproximadamente 7 horas à -34 °C, e finalmente liofilizados. Os extratos liofilizados, tanto das folhas da fase adulta quanto os cotilédones e plântula da fase inicial de desenvolvimento, foram utilizados nas análises espectroscópicas. Maiores detalhes podem ser encontrados nas referências [25] e [83].

A obtenção das amostras e preparação delas foram realizadas pelo Prof. Otávio Sakai, Wolfran Aparecido de Alvarenga e demais colaboradores. As medidas e análises espectrais da espectroscopia vibracional e algumas da espectroscopia fotoacústica foram realizadas neste trabalho de tese.

Configuração experimental:

As medidas de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier via reflectância total atenuada (FTIR-ATR) foram realizadas no Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP) da UEM, em um espectrômetro FTIR (Bruker, Vertex 70v, Alemanha) equipado com o acessório de ATR diamante de reflexão única (Bruker, Platinum, Alemanha). Foram registrados os espectros na região espectral

entre 4000 a 400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} , sendo cada espectro uma média de 128 varreduras.

As amostras dos extratos liofilizados dos cotilédones, plântulas e folhas foram posicionados sobre o cristal de ATR, de forma a preencher toda sua superfície de contato com a amostra.

As amostras dos extratos também foram submetidas a Espectroscopia Fotoacústica utilizando a seguinte configuração experimental: lâmpada de Xênonio com potencial nominal de 800 W, frequência de modulação de 25 Hz e aquisição no intervalo entre 200 a 800 nm. Todos os espectros obtidos foram normalizados pelo espectro da amostra de referência.

3.2.3 Pouteria campechiana – Canistel

A amostra estudada é polpa em pó da fruta canistel, produzido pela professora Dr^a. Paula Toshimi Matumoto-Pintro do Departamento de Agronomia (DAG/UEM) e seu orientando de doutorado Me. Fernando Antônio Anjo (PPC-UEM). Os dados e análises espectroscópicos também fazem parte da dissertação de mestrado de Fernando Anjo [84].

Preparação da amostra:

A fruta foi obtida na Estação Experimental de Citros de Bebedouro (Bebedouro, São Paulo, Brasil). Para a preparação da amostra, primeiramente foi realizada a higienização das frutas em água corrente, e sanitizando em solução de hipoclorito de sódio (200 ppm) por 10 minutos, e depois para a retirar possíveis resíduos do hipoclorito de sódio, foram lavadas em água destilada. Em seguida, as frutas foram descascadas, a polpa fatiada, congeladas com nitrogênio líquido e levadas ao liofilizador (Christ Alpha 1-4 LD plus, Marin Christ, Alemanha). Após liofilização, a amostra foi triturada e a granulometria padronizada em 60 Mesh. A amostra final foi denominada CP (canistel em pó).

Para as medidas utilizando o espectrofotômetro o CP foi solubilizado em óleo mineral (Nujol®, Hypera Pharma) obtendo-se soluções de CP com concentração de 50 g/L. As soluções foram filtradas utilizando filtro de seringa de 0,22 μm de poro (Millex, membrana de PTFE), para que o espalhamento causado pelas partículas em suspensão não prejudicasse as medidas. As amostras foram denominadas canistel em pó solubilizado (CPS).

Configuração experimental:

Para a estudar da fotossensibilidade do CP utilizou-se a Espectroscopia Fotoacústica. Um LED de comprimento de onda máximo em 420 nm (Fig 3.2.2-1) (Thorlabs, Estados Unidos, M420L2). Este comprimento de onda foi escolhido para excitação por ser a região de maior absorção na amostra de canistel na região do UV-Vis.

Este LED foi acoplado a uma lente convergente de 15 cm de distância focal, e fixado à mesa de maneira que o feixe fosse focalizado sobre toda amostra condicionada no interior da célula fotoacústica (Fig. 3.2.2-1 (A)), submetendo-as à potência máxima durante 0,5; 1, 5; 10 e 15 min. Após o tempo irradiação as amostras foram medidas na Espectroscopia Fotoacústica, sem a incidência do LED. A configuração para a Espectroscopia Fotoacústica foi a mesma que a utilizada para as medidas da espinheira-santa, porém com frequência de modulação de 17 Hz.

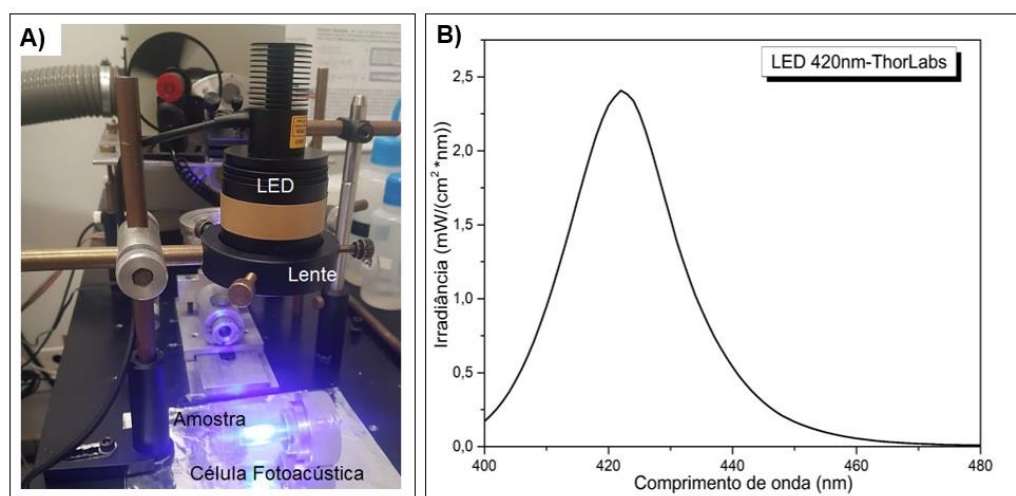


Figura 3.2.2-1: A) Montagem experimental para irradiação via LED das amostras de CP. B) Espectro de irradiância do LED utilizado para irradiar as amostras de CP.

Para determinar a densidade de potência a qual as amostras foram submetidas, foi mantido as mesmas distâncias e configurações empregadas para irradiar as amostras, e obtido o espectro de irradiância do LED, fixando o sensor do espectrorradiômetro (Gooch & Housego, OL 756, Estados Unidos) na mesma posição que as amostras. Entretanto o limite de sensibilidade do sensor não permite a realização da medida com a potência em 100 %, por isso foi necessário realizar uma curva utilizando os espectros de irradiância com as potências de 50, 60, 70 e 80 % (Fig. 3.2.2-2 (A)), que foi o limite para a saturação do sinal. Utilizando as áreas dos espectros e uma extrapolação linear, foi possível estimar a densidade de potência em 544,5 W/m² (Fig. 3.2.2-2 (B)).

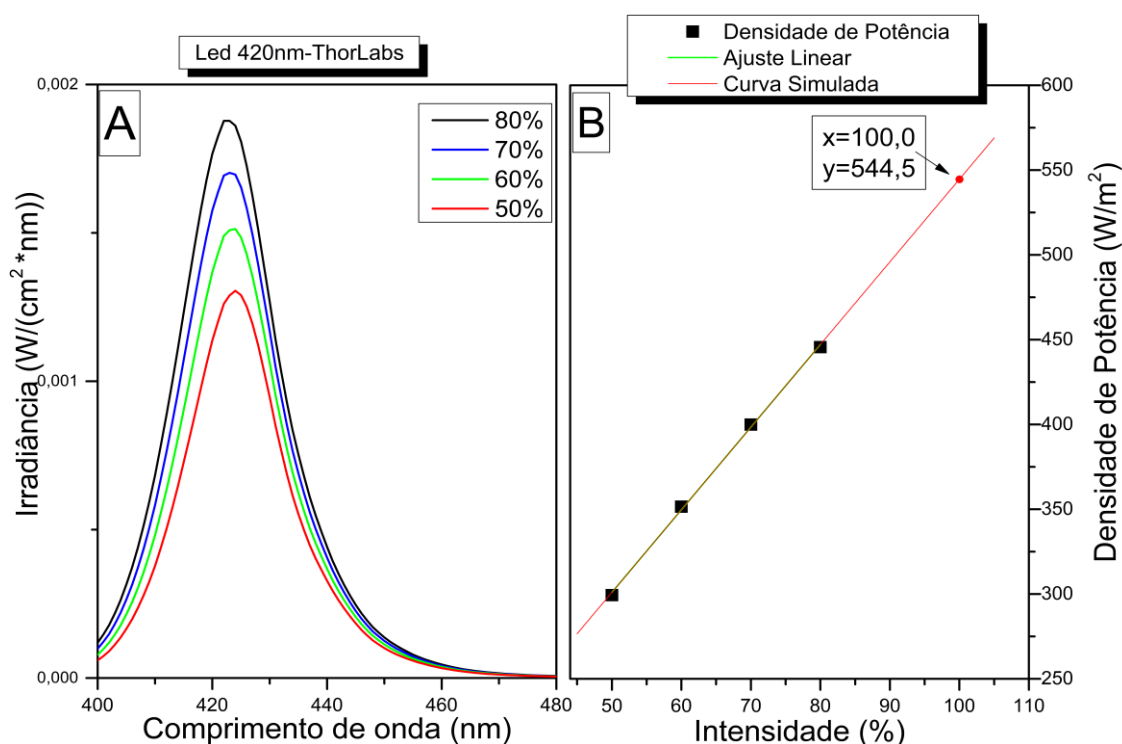


Figura 3.2.2-2: A) Espectro de irradiância do LED utilizado para irradiar as amostras de CP, com potência ajustada em 50, 60, 70 e 80%; B) Curva dos valores de densidade de potência calculados e ajustados com função linear de primeiro grau.

As amostras CPS também foram submetidas ao estudo de fotossensibilidade utilizando o espectrômetro UV-Vis no modo de transmitância. As soluções foram condicionadas em uma cubeta de quartzo com caminho ótico de 1 cm e posicionadas no espectrofotômetro, para medidas no modo de transmitância. As amostras foram irradiadas com LED sem serem removidas do interior do espectrofotômetro, para

minimizar erros experimentais, nos períodos de 0,5; 1; 2; 4; 8; 12; 20; 28; 36; 48; 60; 72; 84; 96; 108 e 120 h. O mesmo arranjo experimental junto ao LED foi utilizado na irradiação das amostras CPS, de modo que o feixe incidente ficasse focado no centro da cubeta. A distância entre a lente e a amostra foi de 13 cm, a Fig. 3.2.2-3 mostra uma foto da montagem para irradiação. Foram obtidos espectros de absorção em todos os períodos, em triplicata.

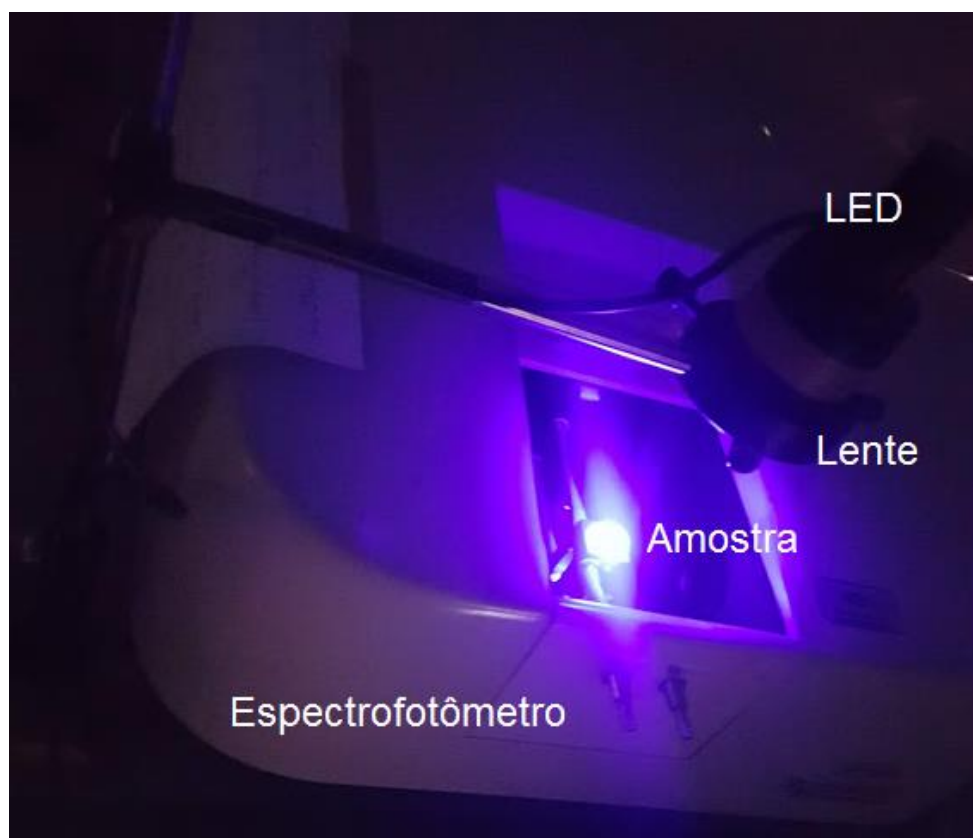


Figura 3.2.2-3: Montagem experimental para irradiação via LED das amostras de CPS.

Capítulo 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

*A espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier acoplado ao módulo de reflectância total atenuada (FTIR-ATR), espectroscopia fotoacústica (PAS) e espectrofotometria no UV-Vis foram utilizadas para avaliar os compostos bioativos em: resíduos da fabricação de cerveja, planta *Maytenus ilicifolia* e na fruta canistel (*Pouteria campechiana* (Kunth) Baehni). Neste capítulo há a discussão dos resultados obtidos para as três amostras. Cabe ressaltar que o objetivo principal deste trabalho de tese é aplicação das técnicas espectroscópicas para estudar os compostos bioativos nas amostras descritas acima, sem um detalhamento sobre as mesmas.*

4.1 Resíduos da fabricação de cerveja (*Trub*)

O resíduo em processo de produção de cerveja tem importantes nutrientes como proteínas e carboidratos, porém apresenta sabor amargo, fator este que minimiza a sua utilização no enriquecimento nutricional de produtos alimentícios [85]. Para estudar os efeitos da redução do sabor amargo, o *trub*, resíduo sedimentado deixado pelo lúpulo após a fervura, foi estudado [86]. Além das análises de suas propriedades físico-químicas e tecnológicas do *trub* antes e após o processo de extração para redução do sabor amargo, foram realizadas análises espectroscópicas por FTIR-ATR para caracterizar a amostra de *trub*, e avaliar o comportamento das bandas atribuídas ao conteúdo proteico e de carboidratos, antes e durante o processo de extração dos componentes amargos da amostra [83], [86].

A figura 4.1-1 apresenta o espectro do resíduo antes da extração dos componentes amargos e a cada etapa da extração. A região hachurada entre 3600 e 3150 cm^{-1} é atribuída ao estiramento da ligação O-H do grupo hidroxila e de grupos de NH.

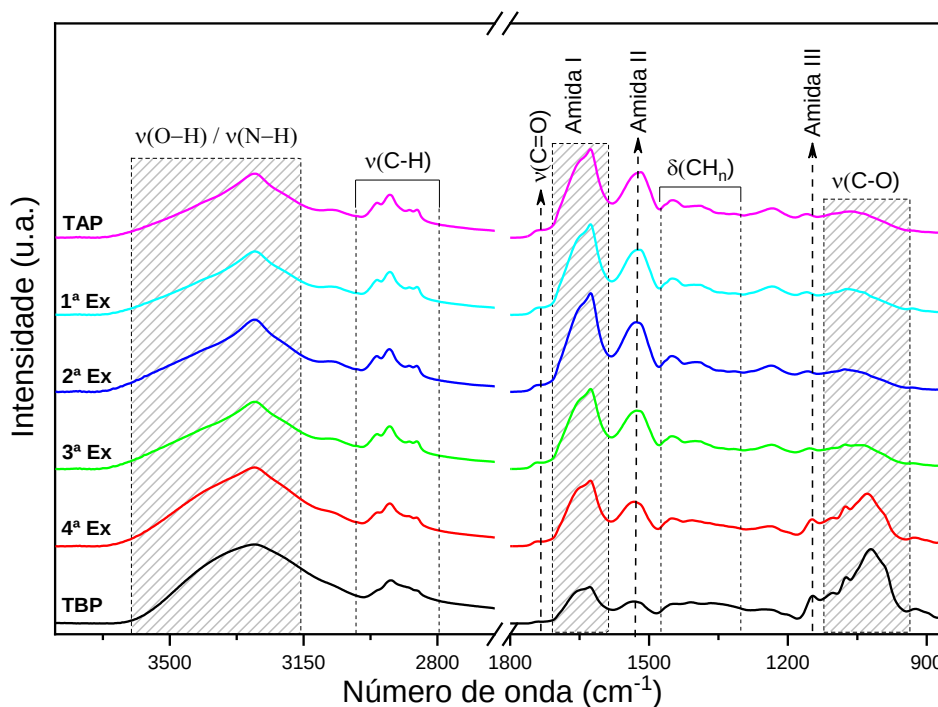


Figura 4.1-1: Espectros de FTIR-ATR do *trub* antes do processo de extração (TBP), após o 1º, 2º, 3º e 4º, (1ª Ex, 2ª Ex, 3ª Ex e 4ª Ex, respectivamente) e após a 5ª extração (TAP). Adaptado de [67]. ν : modo de vibração de estiramento e δ : modo de vibração de deformação angular.

As bandas em ~ 2960 e ~ 2920 cm^{-1} podem ser associados à vibração assimétrica de estiramento das ligações de CH_3 e CH_2 , respectivamente, enquanto em ~ 2850 cm^{-1} temos estiramento de CH_2 simétrico. Em ~ 1742 cm^{-1} a banda é atribuída ao estiramento de $\text{C}=\text{O}$, a região hachurada entre ~ 1650 e ~ 1620 cm^{-1} está relacionada ao grupo funcional Amida I e em ~ 1530 cm^{-1} vibrações da Amida II. No intervalo entre 1470 e 1300 cm^{-1} estão associados aos modos de vibração de deformação do CH_3 e CH_2 , seguida pela banda em 1245 cm^{-1} da Amida III. A região entre ~ 1160 e ~ 1000 cm^{-1} representam o estiramento de CO dos polissacarídeos [55] e [56].

A banda da amida I é formada por bandas sobrepostas que são resultado das estruturas secundárias dos níveis de organização da proteína (α -hélice, β -folha e

estruturas não ordenadas), o que resulta em uma banda larga. Portanto, para o estudo da proteína total utilizamos a área calculada por integração sob banda da amida I, até uma linha de base definida por uma função linear entre 1780 e 1580 cm^{-1} , desse modo todas as estruturas secundárias foram incluídas.

Os resultados obtidos das áreas da amida I foram comparados aos resultados obtidos de proteína bruta do *trub* [27]. Os espectros foram normalizados com relação a intensidade da banda em 2920 cm^{-1} , e o resultado pode ser conferido na figura 4.1-2 a).

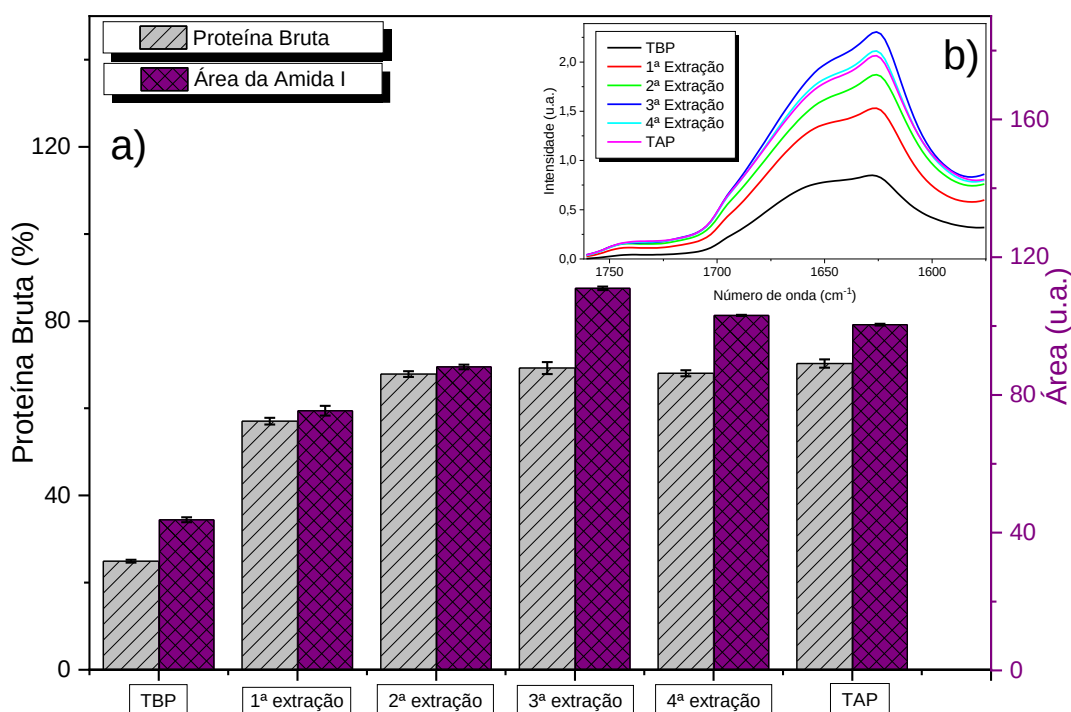


Figura 4.1-2: a) Comparação entre os valores encontrados para área da banda atribuída a amida I e a concentração de proteína bruta, antes (TBP), durante (1ª – 4ª extração) e após (TAP) o processo de extração. b) Espectro de FTIR entre 1750 a 1400 cm^{-1} , região da amida I. Adaptado de [82].

As áreas da amida I passam por um aumento significativo da amostra antes da extração (TBP) até a 3ª extração, como podemos conferir na figura 4.1-2. a), assim como o aumento da concentração de proteína bruta, obtido por Saraiva *et al.* (2019) [82] utilizando método Kjeldahl, o qual foi atribuído ao aumento do valor calórico do

trub quando submetido a alta temperatura durante o processo de extração. O trabalho ainda discute sobre mudanças conformacionais nas proteínas, as quais durante o processo de extração poderiam estar se desnaturando [82]. Geralmente, em processos de desnaturação proteica por aumento de temperatura há o desenovelamento das estruturas secundárias do tipo α -hélice, transformando-se em estruturas do tipo β -folha ou β -volta [87]. Sendo assim, analisamos as estruturas secundárias de proteínas nos espectros de FTIR.

De modo geral, a amida I é a banda no infravermelho médio a qual é mais representativa das estruturas conformacionais de proteínas, podendo ser encontradas as estruturas α -hélice, β -folha, β -volta e randômicas em $1650 - 1660\text{ cm}^{-1}$, $1640 - 1630\text{ cm}^{-1}$, $1670 - 1690\text{ cm}^{-1}$ e $1640 - 1660\text{ cm}^{-1}$, respectivamente, com a estrutura α -hélice de maior contribuição, quando a proteína se encontra no estado nativo. A amida II e III também podem ser utilizadas para estudo das estruturas proteicas, entretanto as contribuições são menores, isso porque as vibrações das cadeias laterais dos aminoácidos afetam significativamente as vibrações das proteínas, mais a amida II do que a amida I, o que desfavorece as análises de estrutura conformacional na amida II [34]. Na amida II podemos encontrar as conformações α -hélice (1540 cm^{-1}) e β -folha e β -volta ($1530 - 1520\text{ cm}^{-1}$) [88], e na amida III há as estruturas α -hélice, em $\sim 1280\text{ cm}^{-1}$ e β -folha em $\sim 1230\text{ cm}^{-1}$ [89].

Para melhor entender as possíveis conformações proteicas que ocorreram com o processo de extração dos compostos amargo no *trub*, foram analisadas as regiões da amida I, II e III antes, durante e após a extração, como pode ser verificado pela Fig. 4.1-1A. As contribuições das estruturas proteicas foram avaliadas por meio da segunda derivada nos espectros de FTIR-ATR, com este tratamento matemático é possível encontrar as posições das bandas que se encontram sobrepostas em uma determinada região espectral.

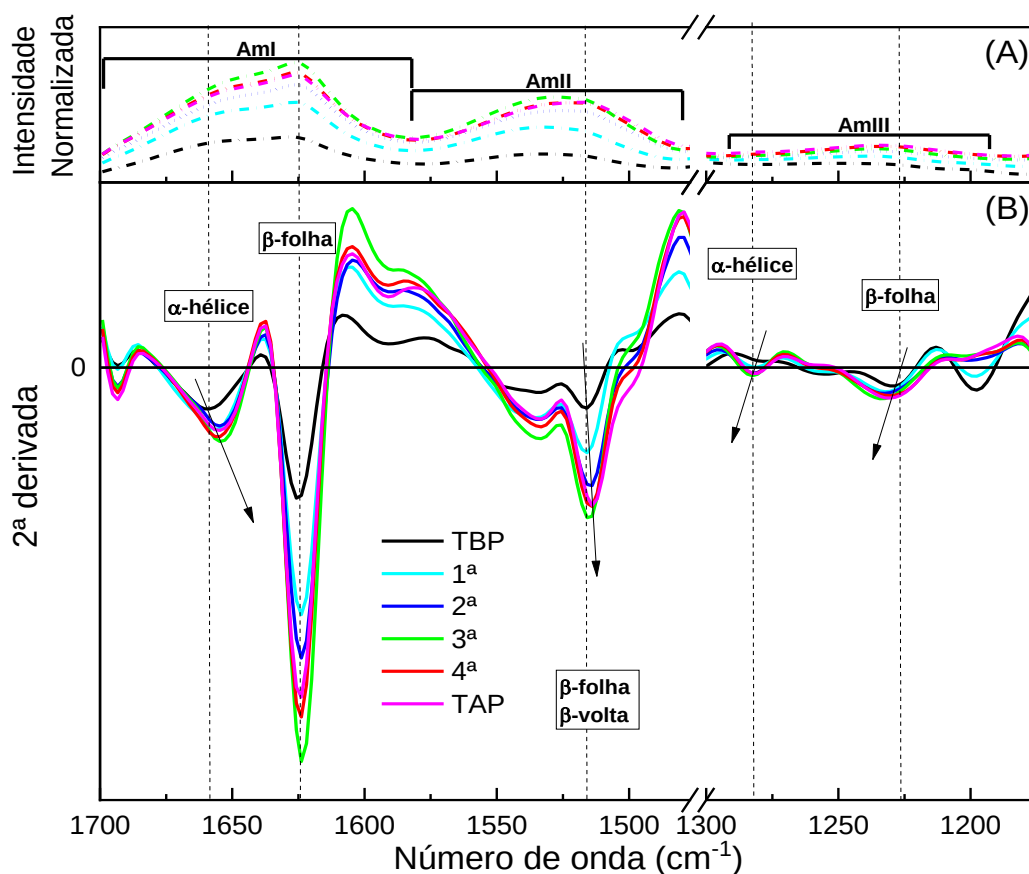


Figura 4.1-1: A) Espectros de FTIR-ATR com destaque nas regiões da amida I (Aml), amida II (AmII) e amida III (AmIII). B) Segunda derivada dos espectros de FTIR-ATR nas regiões da amida I, II e III. As linhas pontilhadas verticais indicam as posições em destaques na segunda derivada e as setas indicam as variações dos centros das bandas. TBP: *trub* antes do processo de extração, 1ª – 4ª etapas dos processos de extração no *trub* e TAP: *trub* após o processo de extração.

Apesar dos deslocamentos das bandas indicando a conformação proteica, há dominância da estrutura secundária β-folha (1624 cm^{-1}) na amida I, como é possível observar na intensidade espectros de FTIR-ATR. Nesta região não houve deslocamento significativo na 2ª derivada do espectro. Outro fato importante é que no processo de extração do *trub* as conformações β-folha são mais presentes após extração do que antes da extração. Não se pode afirmar que há um comportamento para formação da conformação α-hélice ou β-folha, entretanto a espectroscopia de FTIR-ATR permitiu estudar melhor as conformações proteicas no processo de extração.

A Fig. 4.1-1B mostra a segunda derivada dos espectros do *trub*. Enfatizamos algumas posições das contribuições das estruturas α -hélice, β -folha e β -volta com uma linha vertical pontilhada e as setas indicam a direção do deslocamento dos centros das bandas. Cabe ressaltar que os pontos de mínimo na segunda derivada são equivalentes aos pontos de máximo de intensidade nos espectros. É possível observar que as estruturas do tipo β -folha são majoritárias com relação a estrutura do α -hélice, possivelmente devido ao processo de aquecimento na indústria de cerveja que resultou no *trub*.

As bandas atribuídas as estruturas α -hélice, na região da amida I e III, apresentam deslocamento dos centros das bandas, o qual pode ser resultado do processo de desnaturação de proteínas. No caso da banda em 1659 cm^{-1} do TBP, na região da amida I, há um deslocamento do seu centro em direção a 1655 cm^{-1} em decorrência do processo de extração, no qual envolve aumento de temperatura, a banda de 1659 cm^{-1} é atribuída à estrutura 3_{10} - α -hélice, enquanto a de 1655 cm^{-1} é referente a α -hélice. A estrutura 3_{10} - α -hélice é considerada uma estrutura intermediária no processo de enovelamento ou desenovelamento da α -hélice [90].

A conformação α -hélice apresenta variação da 2ª derivada do espectro de TBP, na região da amida III em ~ 1280 não há ponto de mínimo, e para os espectros de *trub* após e durante a extração há o aparecimento de uma banda em $\sim 1282\text{ cm}^{-1}$, por mais que seja uma sutil variação também pode ser uma indicação de mudança de conformação, sendo o deslocamento na direção da estrutura α -hélice. Na região da amida III e II se observar o deslocamento de bandas referentes às conformações β -folha/ β -volta, sendo o deslocamento de 1228 cm^{-1} para 1230 cm^{-1} e 1516 cm^{-1} para 1514 cm^{-1} .

Ademais, foi realizada a análise de carboidratos por espectroscopia FTIR-ATR. O estudo dos carboidratos seguiu a mesma metodologia utilizada para a proteína, entretanto, a quantificação dos carboidratos foi realizada apenas para as amostras antes e após extração (Carboidratos totais (%): Res. antes $57,18 \pm 0,01$; 5ª ext. $3,68 \pm 0,15$). As áreas foram calculadas utilizando a integração da região entre 1180 e 945 cm^{-1} referente às vibrações das ligações de CO de carboidratos. Podemos observar na fig. 4.1-3 a) a redução da concentração de carboidratos, assim como o resultado encontrado na análise de composição química realizada por Saraiva *et al.* (2019) [82].

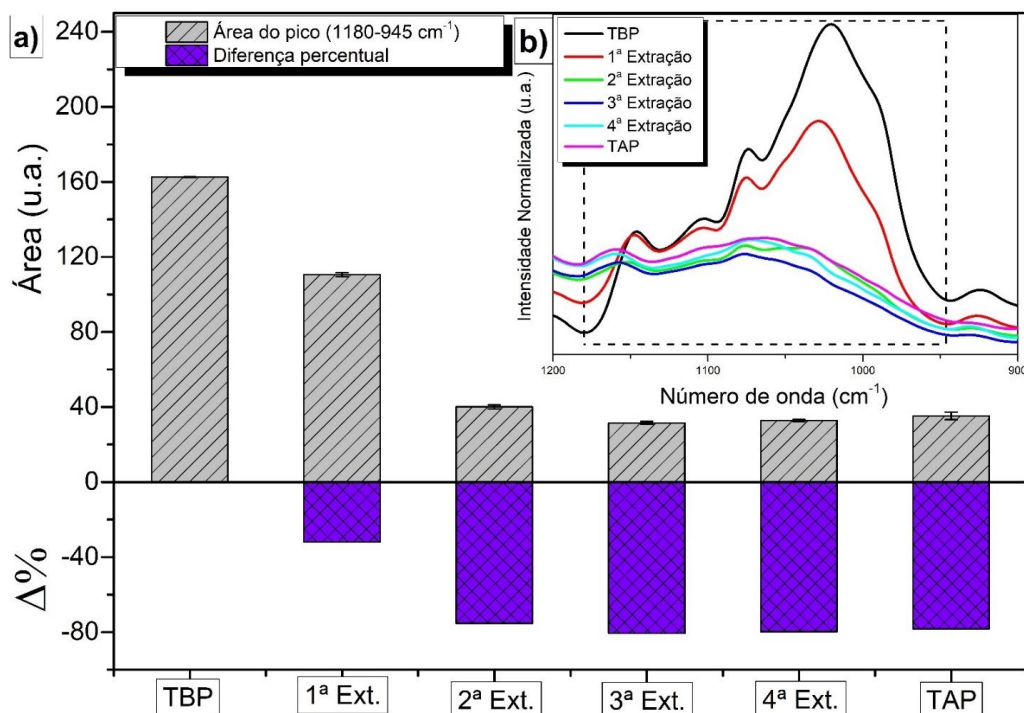


Figura 4.1-3: a) Área do pico calculado por integração, na região entre 1180 – 945 cm⁻¹ característica de dos carboidratos e a diferença percentual da área calculada em relação a área da amostra antes da extração (TBP). b) Espectro de FTIR-ATR de amostra de resíduo de cerveja antes, durante e após o processo de extração dos componentes amargos.

4.2 *Maytenus ilicifolia* - Espinheira-santa

As técnicas de FTIR-ATR e PAS foram utilizadas para caracterização dos espectros dos cotilédones e plântulas, em fase inicial de desenvolvimento, e de folhas em fase adulta da planta *espinheira-santa*. Saber dos compostos presentes na planta é de essencial importância para a viabilização da produção de produtos que possam ser utilizados pela população, principalmente os fitoterápicos, uma vez que já é utilizada popularmente como uma planta medicinal, no tratamento de problemas gástricos [91].

Fig.4.2-1 apresenta os espectros obtidos por meio da espectroscopia de FTIR-ATR para o cotilédone, plântula e folhas e as principais atribuições vibracionais. Na região entre 3500 – 3000 cm⁻¹ há sobreposição de bandas referentes a água livre e compostos fenólicos com modo de vibração do tipo estiramento entre o O e H (ν O-H)

e da amida A com exibindo estiramento de N-H (ν O-H), já entre 3030 – 2800 cm^{-1} há contribuição dos estiramentos de C-H (ν C-H) atribuídos a lipídios [92], [93]. A banda centrada em $\sim 1745 \text{ cm}^{-1}$ referente ao modo ν C=O, referente ao grupo éster que pode ser proveniente de triterpenos [94]. Entre 1700 e 1480 cm^{-1} é característica das amidas I e II, as quais estão correlacionadas ao conteúdo proteico total da amostra, seguida da região entre 1480 e 1340 cm^{-1} há os modos de vibração do tipo deformação de CH_3 e/ou CH_2 (δCH_n), podendo ser atribuídos a compostos fenólicos [92], [95]. A amida III é atribuída a região de 1290 – 1190 cm^{-1} , e por fim entre 1120 e $\sim 980 \text{ cm}^{-1}$ é característicos os modos de vibração ν C-C, geralmente atribuídos aos modos de vibração de anéis aromáticos [92], [93]. Os espectros estão normalizados pela norma, procedimento no qual a intensidade do espectro (I) é normalizada por $\sqrt{(I_1^2 + \dots + I_n^2)}$.

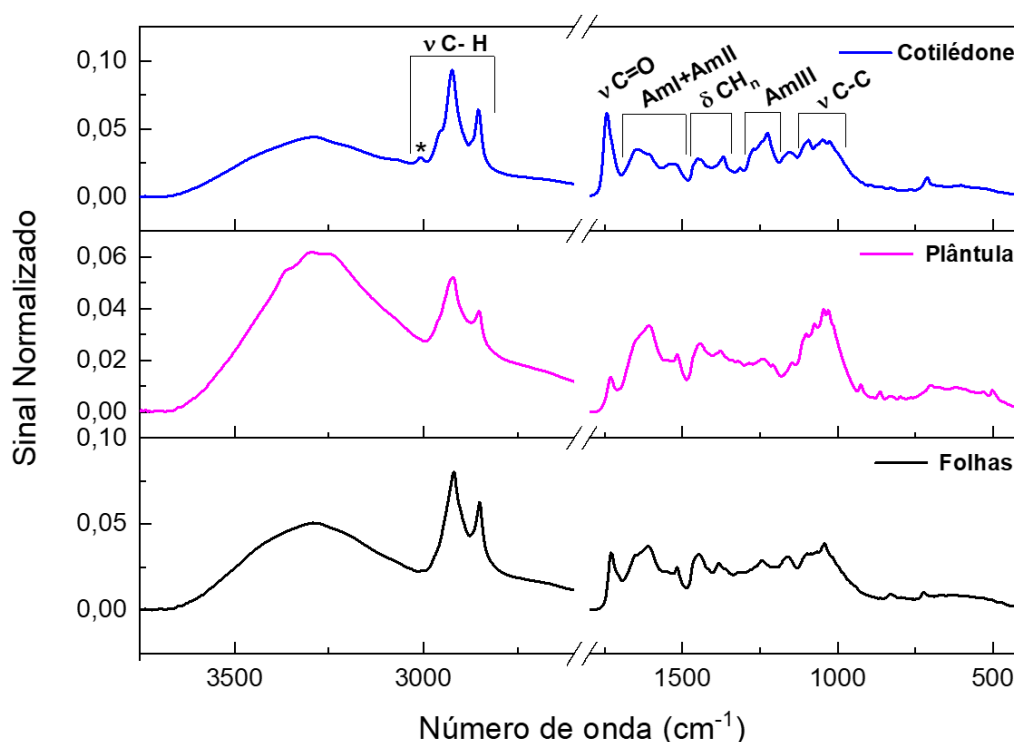


Figura 4.2-1: Espectros de FTIR – ATR normalizados dos extratos de cotilédone, plântula e folhas da *espinheira-santa* e as principais atribuições vibracionais.

De forma geral os três espectros apresentam os mesmos grupos químicos, entretanto é possível notar diferenças no formato das bandas e de intensidade, tal fato pode estar associado a diferentes moléculas na composição, porém possuem

atividade no infravermelho semelhante, ou seja, os modos vibracionais com energia de vibração próximas. Na Fig. 4.2-1 há um destaque no espectro do cotilédone, marcado por asterisco (*) na banda de baixa intensidade em 3009 cm^{-1} , a qual está ausente nos demais espectros, este poderia ser um marcado nos espectros de FTIR para caracterizar o cotilédone. Na literatura não se menciona a presença de oleofina na espinheira-santa, entretanto em cotilédone de outras plantas é relato na literatura a presença desta molécula [95]. Outras características como diferentes intensidades nas bandas da amida I, II e III, sendo o comportamento espectral mais semelhante entre as folhas e plântula, podem estar associadas a conformações proteicas, uma vez que possuem tempo de germinação diferente, além do processo de preparação das amostras.

Tendo em vista o potencial fitoterápico espinheira-santa é importante estimar a quantidade de proteína e lipídios que as diferentes partes da planta possuem, sendo assim, foi realizada a obtenção das áreas das bandas entre $1700 - 1480\text{ cm}^{-1}$ e $2990 - 2775\text{ cm}^{-1}$, referentes a amida I + amida II e os estiramentos de C-H, respectivamente, sendo o primeiro intervalo para avaliação do conteúdo proteico e o segundo do lipídico. Além disso, a banda em 1745 cm^{-1} também fornece uma informação importante com respeito a friedelina, um dos compostos considerado como responsável no tratamento de problemas gástricos, sendo assim, a área desta banda também foi calculada para todas as partes da planta. Todas as áreas foram calculadas por meio de integração sob a área da banda realizando previamente uma linha de base, definida por meio de uma função linear, nos intervalos mencionados acima, e para a banda em 1745 cm^{-1} foi integrada a área entre $1825 - 1700\text{ cm}^{-1}$. O resultado das integrações estão mostrados na Fig. 4.2-2.

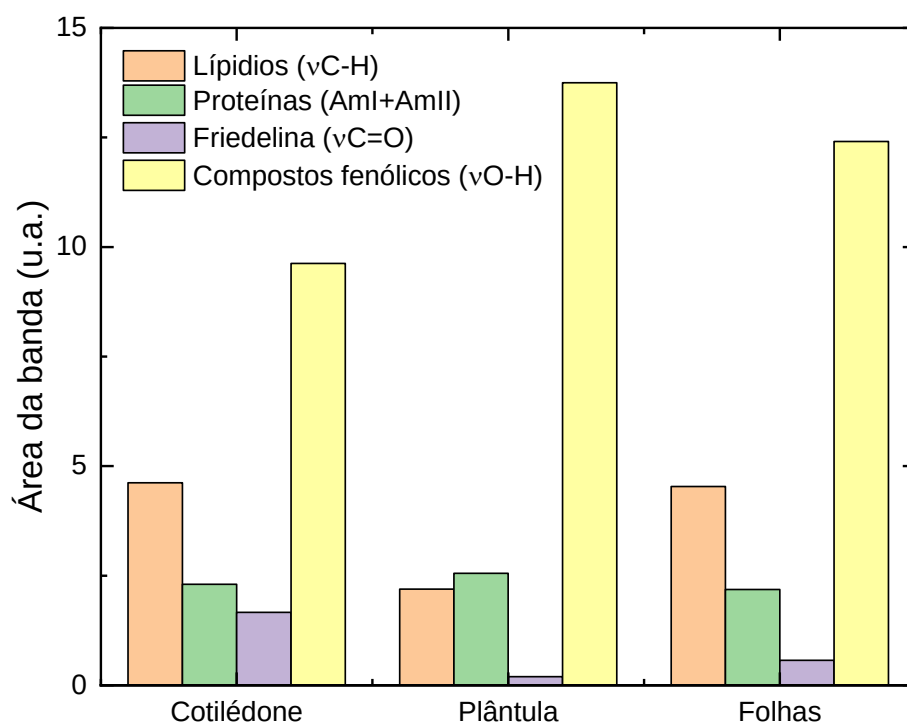


Figura 4.2-2: Comportamento das áreas das bandas referentes ao conteúdo proteico ($1700 - 1480 \text{ cm}^{-1}$), lipídico ($2990 - 2775 \text{ cm}^{-1}$), do triterpeno friedelina ($1825 - 1700 \text{ cm}^{-1}$) e dos compostos fenólicos ($3680 - 3030 \text{ cm}^{-1}$) do cotilédone, plântula e folhas da *Maytenus ilicifolia*.

Comparando as três partes da planta podemos observar que o cotilédone e as folhas apresentam maior conteúdo lipídico, em níveis equiparáveis, já a plântula em menor nível. Com relação ao conteúdo proteico todas as partes da espinheira-santa analisadas neste trabalho apresentam níveis próximos. Os compostos fenólicos podem ser avaliados por meio da banda de $\nu\text{O-H}$ [96], [97], entretanto sabemos da sobreposição nesta região espectral da água livre e de vibrações de amins, entretanto a água livre possui harmônicos do modo de vibração de O-H próximos a 1660 e 800 cm^{-1} , os quais apresentam comportamento de variação de intensidade diferentes da região entre $3680 - 3030 \text{ cm}^{-1}$, mostrando que esta região tem contribuição minoritária da água livre, podendo este intervalo ser atribuído a contribuição dos compostos fenólicos da planta. Nota-se que a plântula e as folhas possuem níveis de compostos fenólicos semelhantes e superiores ao cotilédone. Já o triterpeno friedelina pode ser avaliado por meio da banda em $\nu\text{C=O}$ (1745 cm^{-1}) [94], esta enzima tem propriedades de atuar no combate contra problemas gástricos [26],

o que motiva a investigar sua presença na espinheira-santa. É possível observar que a friedelina pode estar mais presente no cotilédone do que na plântula ou folhas.

Por meio destes resultados podemos inferir que o cotilédone, plântula e folhas podem ter diferentes aplicações para fins medicinais, devido aos diferentes níveis dos compostos avaliados em cada uma das partes da espinheira-santa. Cabe ressaltar que este estudo acerca dos compostos nas diferentes partes das plantas é uma estimativa por meio das bandas citadas na literatura como “marcadores” [94-97] dos compostos analisados, podendo haver variação de comportamento quando os compostos são associados a outras bandas, entretanto a espectroscopia FTIR é muito utilizada na identificação e avaliação de componentes de produtos naturais, e neste trabalho mostrou seu grande potencial nesta linha de pesquisa.

O cotilédone, plântula e folhas também foram estudados por meio da PAS na região do UV-Vis, entretanto de acordo com a literatura científica, as partes da espinheira-santa escolhidas para estudo nesta região apresentam maior contribuição dos pigmentos fotossintéticos, tais como clorofila e carotenoides. A Fig. 4.2-3A apresenta os espectros fotoacústicos do cotilédone, folhas e da plântula, observamos que os espectros das folhas e cotilédones apresentam características espectrais semelhantes, já o cotilédone não apresenta bandas intensas quanto os demais. Os espectros foram normalizados com relação a intensidade em 770 nm, região na qual os espectros não apresentam absorção. Diferentemente dos espectros na região infravermelho médio apresentados nos resultados com FTIR-ATR, na região do UV-Vis as bandas são mais largas e menos definidas, características de espectroscopia de transição eletrônica, na qual podemos estudar as transições entre níveis de energia, enquanto na espectroscopia no infravermelho observamos as transições entre os níveis vibracionais de menor energia.

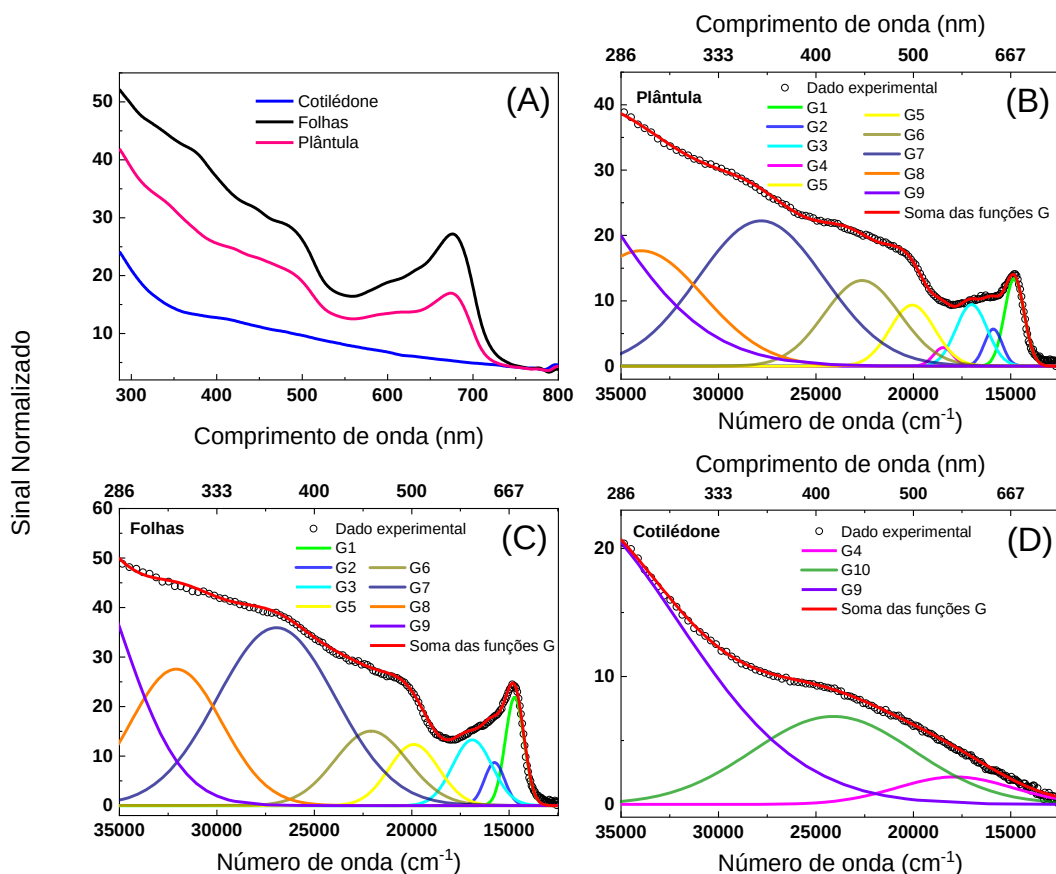


Figura 4.2-3: (A) Espectros fotoacústicos do cotilédone, plântula e folhas. Ajuste com funções gaussianas dos espectros fotoacústicos: (B) plântula, (C) folhas e (D) cotilédone, G1-G9 indicam as funções gaussianas, os círculos são os espectros fotoacústicos e a linha sólida em vermelho é a soma de todas as funções gaussianas utilizadas em cada espectro.

Por se tratar de bandas mais largas, consequentemente pode haver uma sobreposição de bandas dos compostos absorvedores. Uma ferramenta matemática muito utilizada na espectroscopia é a deconvolução na qual é feita uma decomposição dos espectros em funções matemáticas, que quando somadas resultem em uma curva que deve se sobrepor ao espectro do dado experimental [98], [99]. Devido à forma das bandas na região do UV-Vis e a simetria de distribuição de energia de transição eletrônica, as funções gaussianas são as que melhor se ajustam aos dados experimentais de espectroscopia no UV-Vis [90].

Com a deconvolução do espectro podemos obter os componentes absorvedores que estão sobrepostos sobre as largas bandas de absorção, por isso realizamos a deconvolução gaussiana dos espectros das três partes da planta

espinheira-santa, a Fig. 4.2-3D mostram as funções matemáticas ajustadas e suas somas sobre o dado experimental. Para o ajuste das funções gaussianas nos espectros foi feita uma revisão bibliográfica para obter a posição centros das bandas (x_c) na região do UV-Vis dos compostos da planta, assim este parâmetro ficou fixo para a realização dos ajustes, esta metodologia é de suma importância na espectroscopia, já que os centros das bandas determinam quais são os compostos absorvedores da amostra [69], [99], [100]–[102]. Entretanto, há uma vasta gama de trabalhos na literatura científica em espectroscopia, o que por muitas vezes traz informações desconhecidas com relação aos cromóforos e suas bandas absorvedoras nas diferentes regiões do espectro de radiação eletromagnética. Desta forma, o que se fez foi fazer uma intensa revisão bibliográfica pelos principais componentes da espinheira-santa e outras plantas que absorvem na região espectral estudada, e as posições dos centros das bandas são as que mais se repetiram no processo de busca de informação, o que pode acarretar variações na análise, caso outros trabalhos tenham optado por outros centros de bandas para um mesmo composto.

Podemos observar na Fig. 4.2-3 (B-D) que não há mesma quantidade de funções gaussianas em todos os espectros, o que revela que podem ser constituídos por diferentes componentes. Na região do ultravioleta-visível (200 – 800 nm) há sobreposição das bandas dos principais pigmentos fotossensíveis presentes em plantas, tais como, clorofilas e carotenoides [101], o que dificulta a caracterização dos espectros mesmo realizando a decomposição com funções matemáticas. Além disso, na literatura científica os pigmentos, geralmente estão solubilizados em solventes, outro fator que altera a posição dos centros das bandas.

Nos espectros com ajustes gaussianos podemos estimar os seguintes centros, em nm, para espinheira-santa: i) cotilédone: 560 (carotenoides e feofitina) e 415 (não identificada); ii) plântula: 294 (compostos fenólicos), 360 (clorofila A), 442 (clorofila A), 499 (clorofila B), 542 (carotenoides e feofitina), 589 (clorofila A e feofitina), 630 (clorofila B) e 675 (clorofila A); iii) folhas: 312 (compostos fenólicos), 372 (clorofila A), 453 (clorofila A), 502 (clorofila B), 592 (clorofila A e feofitina), 635 (clorofila B) e 679 (clorofila A) [101], [103], [104]. As gaussianas denominadas G9 na Fig. 4.2-3 (B-D) foram utilizadas para ajuste de linha de base para o ajuste gaussiano, por isso não foram caracterizadas.

A clorofila A é o pigmento majoritário na maioria das plantas, responsável pela realização da fotossíntese, já a clorofila B é considerado um pigmento acessório, pois atua na ampliação do intervalo da radiação eletromagnética utilizada na fotossíntese [105]. Ambas as clorofilas apresentam banda Soret, centrada entre 400 e 450 nm e banda Q entre 600 e 700 nm [101]. Os carotenoides atuam na fotossíntese como protetores da clorofila contra a oxidação com o excesso de luz. A feofitina é uma clorofila que não possui o íon de magnésio em seu centro e ocorre quando há degradação da clorofila A, promovendo cor marrom a planta.

As folhas e plântulas apresentam clorofila A e B pigmento majoritário na maioria das plantas, no cotilédone não foi possível identificar a clorofila, pois na região da banda Soret [22] a banda apresenta-se com forma diferente, gaussiana G10 da Fig. 4.2-3D, e não é possível observar a presença da banda Q, sendo estas duas bandas características da clorofila, por isso sua atribuição foi determinada como não identificada.

A ausência da clorofila no cotilédone pode estar associada ao período de germinação e a função do cotilédone na espinheira-santa[107]. De acordo com Zheng e colaboradores [108] os níveis de clorofila do cotilédone variam em função do período de germinação, sendo máximo em 13 dias, e em 21 dias foi o período germinação para obtenção do cotilédone da espinheira-santa, o trabalho indica há níveis mínimos. Cabe ressaltar que o trabalho de Zheng foi realizado em outra planta, o que nos leva ao segundo ponto com relação a função do cotilédone nas plantas, este pode ter função de armazenamento de reservas, utilizadas durante a germinação, ou seja, não necessitaria da clorofila, já que não teria função na fotossíntese da planta [109].

Para melhor avaliar os componentes presentes no cotilédone, plântula e folhas foi analisada a área das gaussianas ajustadas para as bandas de absorção em ~ 676, 630 e 550 nm, as quais são mais representativas da clorofila A, B e carotenoides, respectivamente, conforme mostra a Fig. 4.2-4.

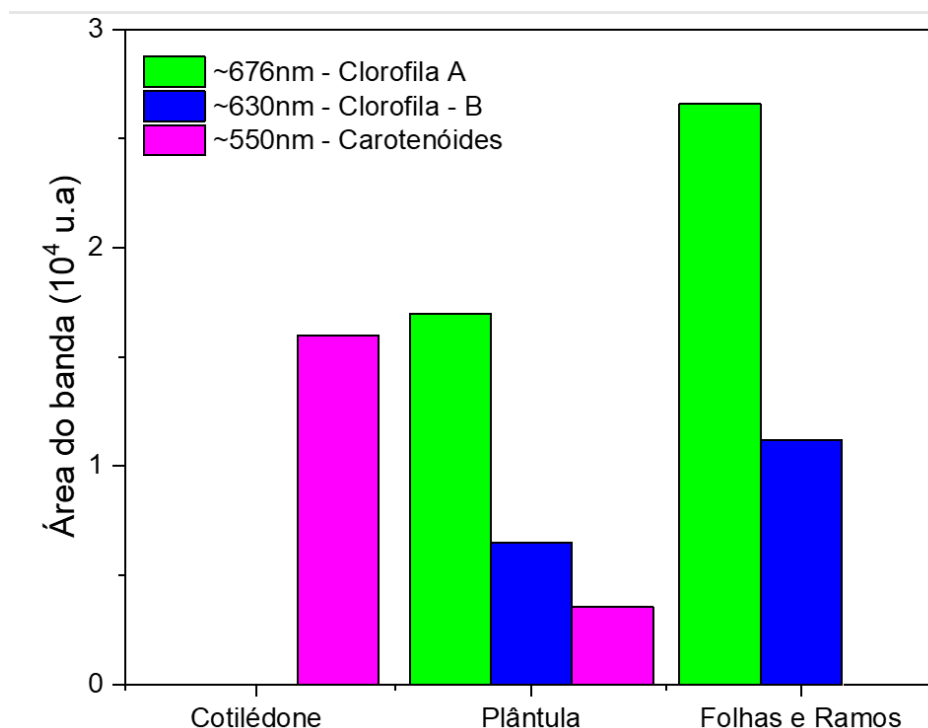


Figura 4.2-4: Comportamento das áreas das bandas referentes clorofila A, clorofila B e carotenoides do cotilédone, plântula e folhas da *Maytenus ilicifolia*.

Os carotenoides estão presentes no cotilédone e na plântula e ausente nas folhas [110]. Os carotenoides são pigmentos que exibem cor amarelo-laranja, possivelmente pela predominância da cor verde nas folhas da espinheira-santanão foi possível detectar estes pigmentos [107], [110]. Além destes pigmentos terem função oferecer proteção a clorofila durante a fotossíntese, ainda tendem a manter seu nível mais constante em função da idade do cotilédone [109], este fato poderia explicar a maior presença dos carotenoides no cotilédone da planta.

A clorofila A é mais expressiva nas folhas do que na plântula, já a clorofila B tem níveis próximos em ambas as partes [22], [108], lembrando que as folhas são de plantas adultas e as plântulas coletadas após 21 dias de germinação, sendo assim, possivelmente por sua função essencial na fotossíntese a clorofila A poderia ter seu teor em função da idade da planta, e clorofila B por ser um pigmento não essencial poderia possuir níveis mais constantes em função da idade da planta [22]. Condições de armazenamento e germinação são fatores que influenciam no teor dos pigmentos nas diferentes partes das plantas, o que podem também estar contribuindo nas análises deste trabalho, entretanto estes fatores não foram avaliados.

A espectroscopia fotoacústica apresentou grande potencial para análise de diferentes partes da planta espinheira-santa, indicando a diferença da composição entre elas, e fornecendo informações comparativas entre os níveis dos compostos avaliados.

4.3 Canistel (*Pouteria campechiana* (Kunth) Baehni)

A polpa da fruta canistel liofilizada foi estudada em forma de pó e solubilizada em óleo mineral para avaliar seu potencial com relação a fotodegradação via LED em 420 nm (região de máxima absorção), visto que esta fruta exibe coloração amarela intensa, o que a torna uma candidata para a produção de corante natural [30]. Não só a estabilidade da cor, mas também o seu valor nutricional necessita de investigação, já que seu emprego poderia ser em produtos alimentícios [28]. Sendo assim esta parte do trabalho tem como objetivo estudar os compostos bioativos mediante a irradiação via LED, verificando assim a fotoestabilidade do canistel em pó. Para avaliar a fotodegradação do canistel em pó (CP) foi utilizada a espectroscopia fotoacústica e pó solubilizado (CPS) foi avaliado por meio da espectrofotometria por transmitância, ambas as técnicas na região do ultravioleta-visível.

A Fig. 4.3-1 mostra o sinal fotoacústico do CP sem irradiação e a deconvolução gaussiana do espectro, o que permite estimar as contribuições espectrais que se encontram sobrepostas no espectro [33]. Para realizar o ajuste matemático, os valores de x_c foram fixados, conforme encontrados os centros das bandas de absorção de compostos existentes no canistel.

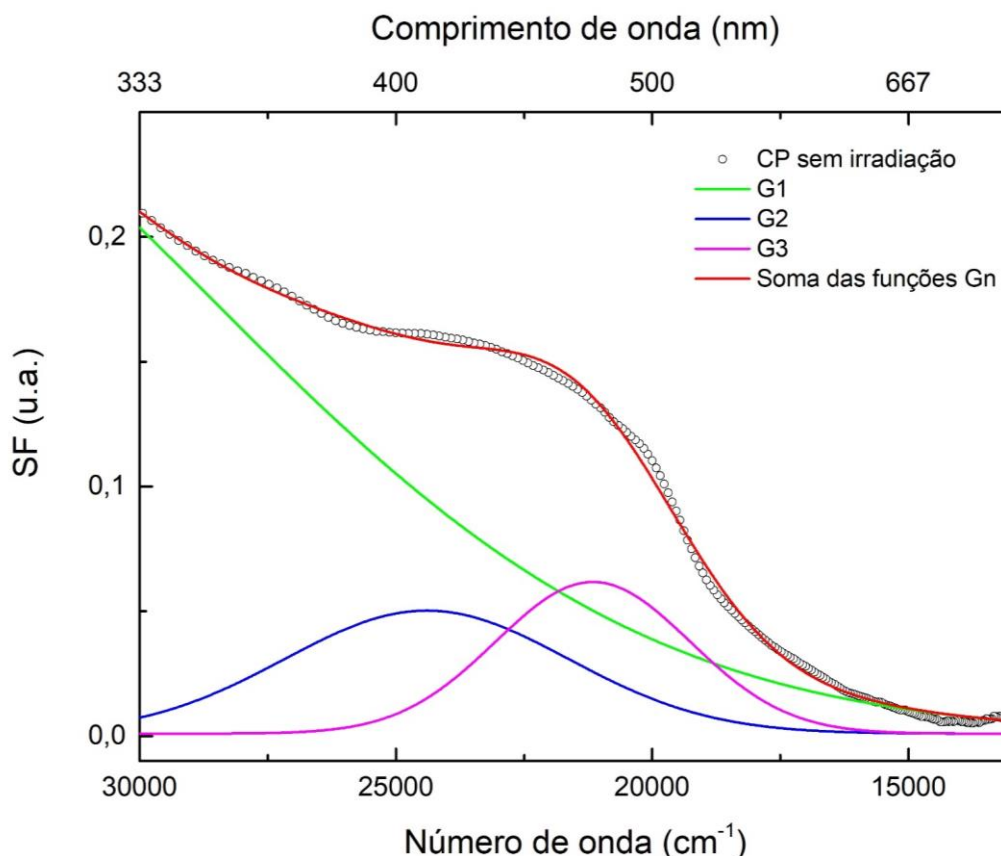


Figura 4.3-1: Espectro fotoacústico do canistel em pó (CP) em pó sem irradiação com deconvolução gaussiana. G1, G2 e G3 são as funções gaussianas.

O CP proveniente da polpa da fruta apresenta os seguintes compostos bioativos: compostos fenólicos, flavonoides e carotenoides, sendo os fenólicos majoritários em comparação aos demais [84]. Na literatura é possível encontrar o conteúdo total de flavonoides e compostos fenólicos do canistel, e maior detalhamento dos carotenoides, sendo a violaxantina e neoxantina predominantes [31], [111].

A violaxantina e a neoxantina apresentam bandas de absorção na região do ultravioleta-visível entre 400 e 550 nm [112], [113], entretanto demais carotenoides, tal como, o β -caroteno, também presente no canistel, apresentam bandas de absorção na mesma região espectral [112], [114]. Além disso, os compostos fenólicos, como o ácido gálico, presente na composição do canistel [115] apresenta bandas de absorção sobrepostas aos carotenoides [33].

Os processos de extração da polpa da fruta para preparação do extrato, bem como, os solventes envolvidos podem contribuir de maneira significativa nos

espectros de absorção, entretanto os trabalhos da literatura utilizados como referência neste trabalho de tese mostraram-se compatíveis aos dados experimentais obtidos para o CP. Utilizando a espectroscopia fotoacústica para medidas do CP em pó, foram encontrados os seguintes centros de bandas de absorção por meio da deconvolução gaussiana: 472 e 410 nm atribuídos aos carotenoides, violaxantina e ζ -caroteno, respectivamente [31] e 270 nm aos compostos fenólicos, em especial ao ácido gálico [33], entretanto esta última banda não será considerada neste trabalho como um dos componentes do CP, pois é possível observar que atua como uma linha de base para que a curva da soma das funções gaussianas se sobreponha ao dado experimental. Além disso, cabe ressaltar que no CP produzido é um produto bruto, no qual não houve processos químicos, somente a desidratação por liofilização o que pode ter resultado em um extrato bruto com diferentes componentes, tais como fibras, que podem possuir absorção na mesma região de análise e ser detectáveis pela espectroscopia fotoacústica, porém não foram caracterizadas na literatura.

Para estudo de fotodegradação do canistel foram obtidos espectros fotoacústicos do CP em diferentes períodos de irradiação de LED ($\lambda_{\text{máx}} = 420 \text{ nm}$), sendo uma triplicata para cada tempo. A Fig. 4.3-2 mostra as médias dos espectros de CP para cada tempo de irradiação, na qual é possível observar uma redução da intensidade das bandas entre 350 a 550 nm em função do tempo de irradiação, região com contribuição de carotenoides no CP.

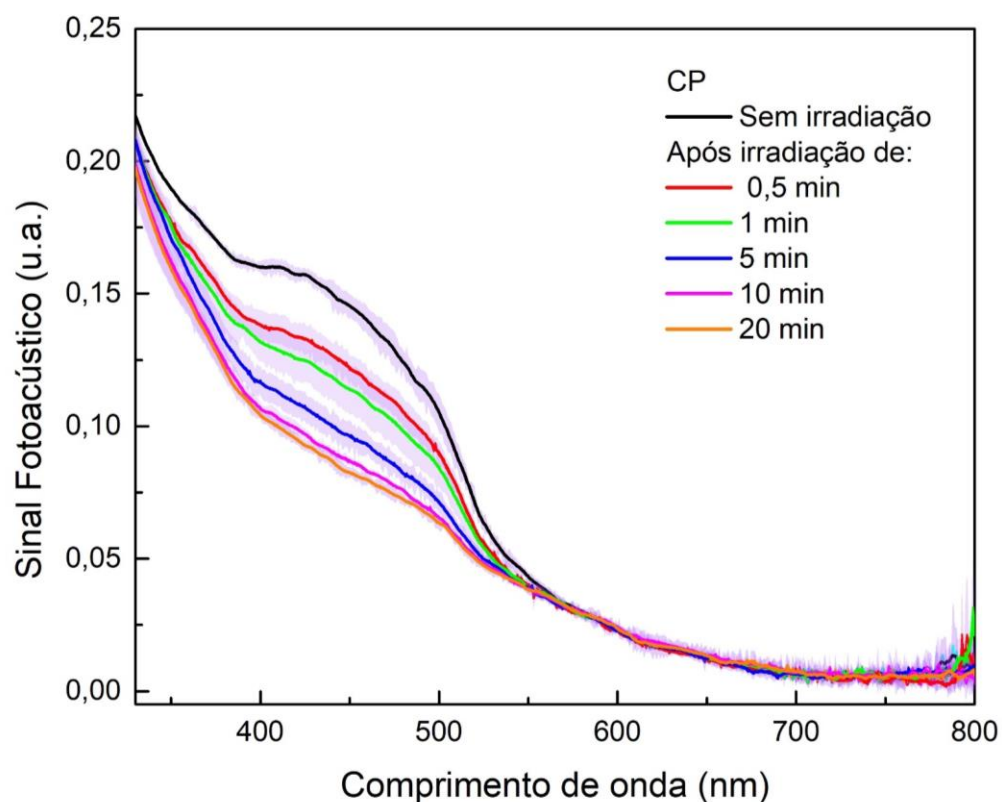


Figura 4.3-2: Média dos espectros fotoacústicos do canistel em pó (CP) sem irradiação e sob irradiação de LED ($\lambda_{\text{máx}} = 420 \text{ nm}$) em diferentes períodos.

Sabendo da fotossensibilidade do CP, e considerando que a região espectral na qual foi realizada a medida (ultravioleta-visível) foi investigado a contribuição da irradiação pela lâmpada de xenônio (Xe) durante a medida na fotodegradação do CP, como mostra a Fig. 4.3-3.

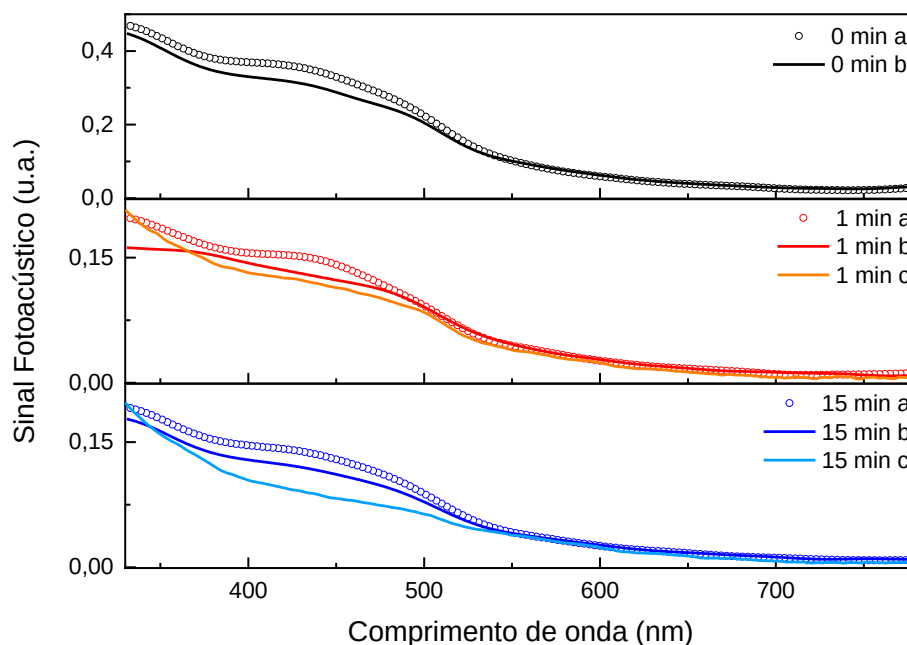


Figura 4.3-3: Espectros fotoacústicos de CP sem irradiação (0 min) e após 1 min e 15 min de irradiação de LED. Na legenda (a) indica a 1ª medida realizada, (b) 2ª medida realizada sem a remoção da amostra da célula fotoacústica e (c) 3ª medida realizada em outra amostra após irradiação.

Para avaliar a contribuição da irradiação pela lâmpada de Xe foram realizados três testes denominados por “a”, “b” e “c” na Fig. 4.3-3. No teste “a” foram avaliados o CP sem irradiação e com irradiação em diferentes períodos, na Fig. 4.3-3 estão mostrados somente para alguns períodos, porém os testes foram realizados em todos os períodos. Em seguida foi realizado o teste “b” no qual a amostra não foi removida da célula fotoacústica, para avaliar se irradiação pela lâmpada de Xe durante a execução do experimento contribuiu na fotodegradação do CP, ou seja, observar se haveria redução do sinal fotoacústico na mesma proporção que a irradiação por LED. Para as amostras irradiadas foi realizado o teste “c”, no qual uma segunda amostra irradiada (realizado em triplicata) foi medida pela espectroscopia fotoacústica, a fim de comparação da redução após o teste “b” e após o teste “c”. É possível observar na Fig. 4.3-3 que há contribuição da irradiação pela lâmpada de Xe, porém comparativamente ao processo de irradiação via LED é menor.

Para evitar a sobreposição desta contribuição ao efeito da irradiação pelo LED, adotou-se como procedimento utilizar amostras diferentes para cada tempo de irradiação, sendo realizada uma varredura em cada amostra da triplicata de cada

tempo e não o processo de irradiação acumulativo, comumente empregado nestes tipos de estudo.

Uma vez caracterizada as diferentes contribuições espectrais e definido o procedimento para irradiação e medida, iniciou-se a análise dos resultados por meio da análise de componentes principais (PCA) [47], na qual é possível identificar nos espectros as regiões que mais se alteram mediante a um tratamento, neste caso a irradiação do CP em diferentes tempos (Fig.4.3-4).

A Fig. 4.3-4A mostra a curva de *loading* das componentes principais PC1 e PC2 em função do comprimento de onda, nota-se que PC1 (com 94,3% da variância), apresenta maior variação entre 330 a 550 nm, já PC2 (com 2,1% da variância) entre 330 e 400 nm. A curva de *loading* de PC1 mostra, tal como observado na Fig. 4.3-3, que a região que mais varia com relação a irradiação é a dos carotenoides. A Fig. 4.3-4B mostra as curvas de *loading* de PC1 e PC2, nesta é possível verificar que os pontos mais distantes de $PC1 = PC2 = 0$ são referentes aos comprimentos de onda ~430 e 330 nm, já a região entre 530 – 600 nm é a região na qual é mais difícil de se identificar alterações espectrais devido à irradiação. Além disso, analisando todas as amostras medidas por espectroscopia fotoacústica nota-se que há agrupamentos entre os períodos de irradiação, na Fig. 4.3-4C as marcações em pontilhado indicam os agrupamentos. As amostras não irradiadas (0 min) apresentam maior variação em PC1 e PC2, já as amostras irradiadas durante 0,5 e 1 min apresentam características espectrais semelhantes, e após 5, 10 e 15 min de irradiação seria o terceiro grupamento, porém a distância entre as amostras é maior do que os dois outros grupos.

Observa-se que este agrupamento das amostras é predominantemente devido a variação de PC1, e este representa 94% da variação observada nos espectros, portanto o comportamento deste parâmetro em função do tempo deve refletir a evolução do processo de fotodegradação do CP.

A Fig. 4.3-4D mostra o valor médio para PC1 da triplicada em função do tempo de irradiação, na qual observa-se um decaimento de dupla exponencial. O primeiro decaimento rápido com tempo característico da ordem de 0,3 min e um segundo com tempo característico da ordem de 5,6 min. Este comportamento indica que a fotodegradação do CP não é um processo simples, e pode ser consequências de uma série de reações fotoquímicas.

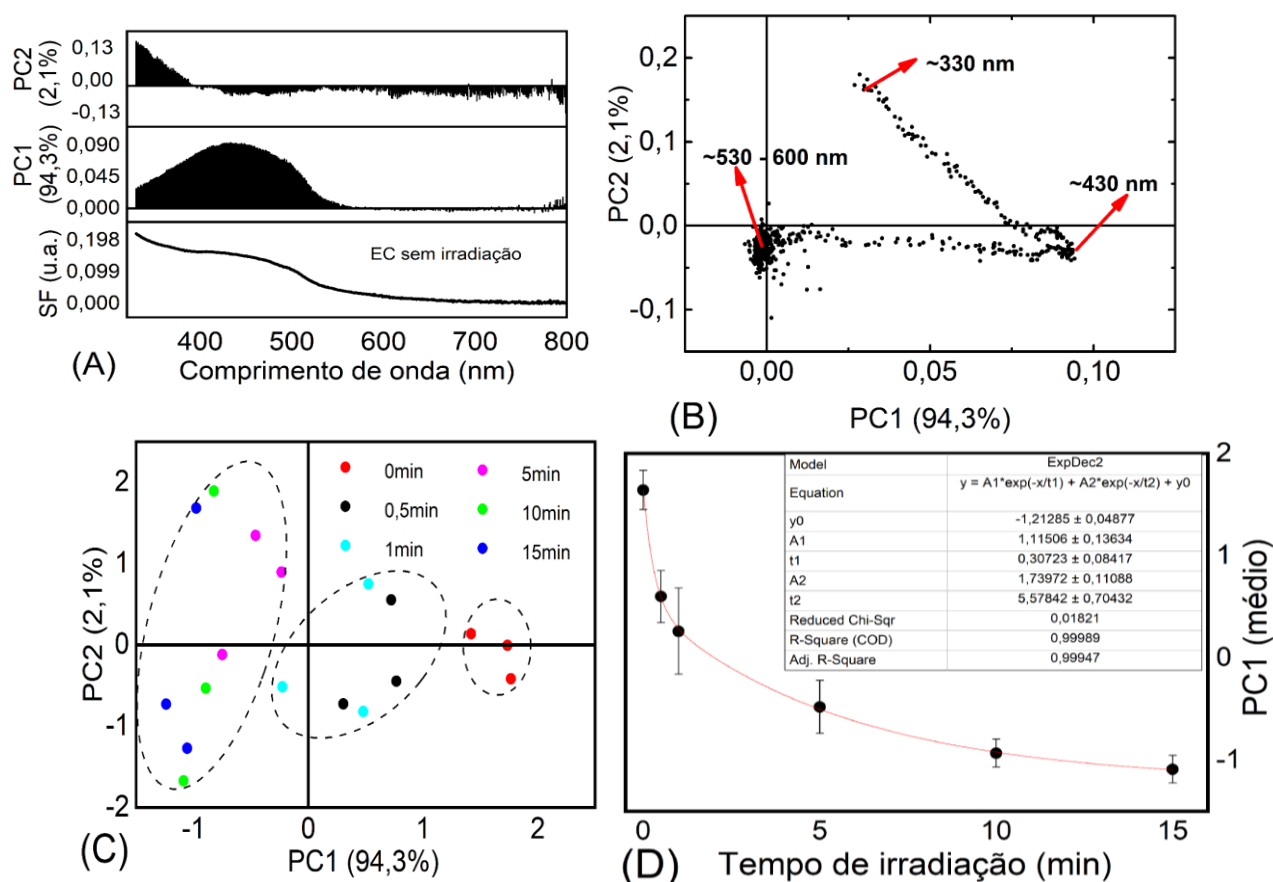


Figura 4.3-4: Análise multivariada dos espectros de CP com e sem irradiação: (A) *Loading* das componentes PC1 e PC2 comparadas a um espectro fotoacústico de CP sem irradiar; (B) *Loading* PC1 versus PC2; (C) *Score plot* de PC1 versus PC2, as amostras 0 min são que não receberam irradiação de LED e (D) Comportamento de PC1 médio em função do tempo de irradiação. *Inset*: coeficientes que satisfazem o ajuste exponencial descendente fitado sobre os pontos experimentais.

Com base na análise de PCA analisamos os comportamentos das áreas fornecidas pelos ajustes gaussianos, os quais foram realizados em todos os espectros, com e sem irradiação. Nos ajustes matemáticos os valores de x_c , descritos anteriormente, foram parâmetros fixos. As áreas das bandas centradas em 470 e 410 nm foram analisadas em função do tempo de irradiação, como mostra a Fig. 4.3-5. Ambas as gaussianas se encontram na região mais distante do gráfico de *loading* da Fig. 4.3-4B.

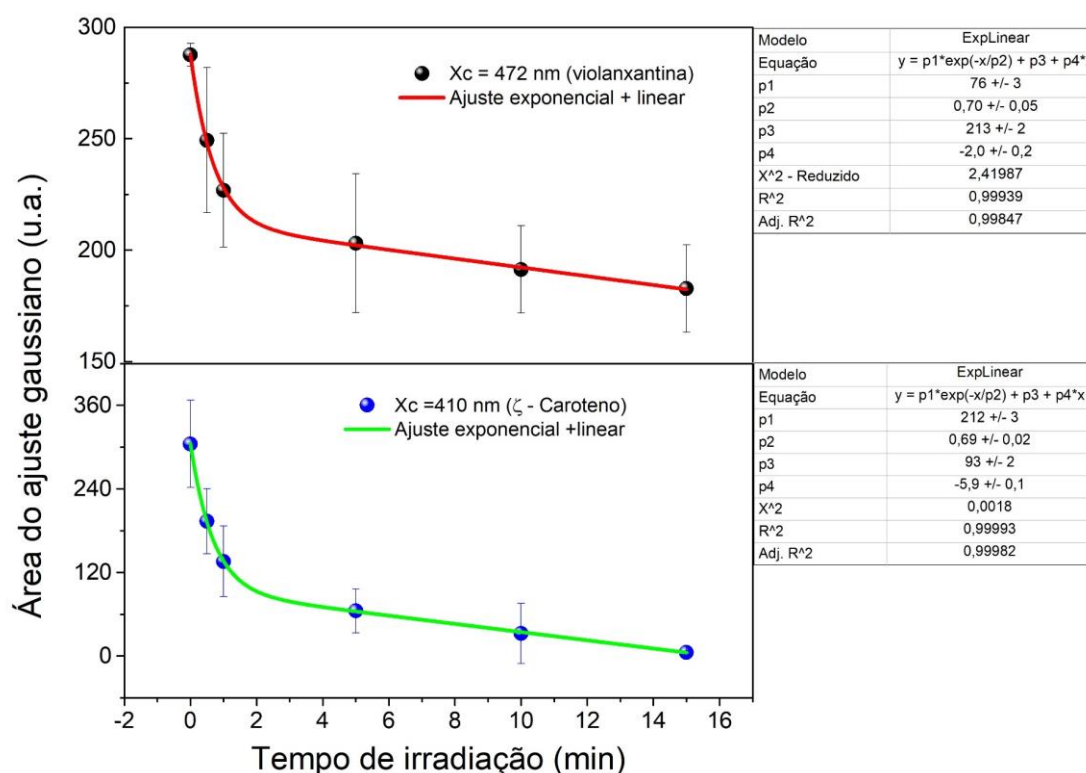


Figura 4.3-5: Comportamento das áreas das gaussianas centradas em 470 e 410 nm em função do tempo de irradiação. Os pontos são as áreas das gaussianas e as linhas sólidas os ajustes matemáticos. Os parâmetros de ajuste obtidos estão ao lado das figuras. O tempo $t = 0$ min indica o CP sem irradiação.

A Fig. 4.3-5 mostra que o comportamento dos carotenoides mediante a irradiação tem comportamento não linear. A linearização do gráfico não foi possível, utilizando funções logarítmicas. Assim como observado na análise de PCA, a redução das áreas apresenta dois processos, sendo o primeiro um decaimento rápido, descrito por uma exponencial com tempo característico $t = 0,69$ min e o segundo uma redução linear, com coeficientes angulares de $[2,0] \text{ min}^{-1}$ para a banda em $x_c = 472$ nm atribuída a violaxantina, componente majoritário do CP da polpa da fruta, e $[5,9] \text{ min}^{-1}$ para a banda em $x_c = 410$ nm, atribuída ao ζ -caroteno [29], [112].

Este comportamento indica que a irradiação pode estar causando pelo menos três reações químicas diferentes, sendo o primeiro descrito por uma lei exponencial com o mesmo tempo característico observado para as duas bandas, e o segundo de comportamento linear, no qual os coeficientes angulares fornecidos pelos ajustes lineares refletem a cinética das fotodegradações no CP. Sendo a velocidade da reação atribuída ao ζ -caroteno três vezes maior que para a violaxantina.

De acordo com Cvetković e Marković [102] mostraram que os carotenoides em solução de hexano, sob irradiação de UV (254, 300 e 350 nm), apresentam maior redução da intensidade da banda de absorção entre 380 e 550 nm, tal como em nosso estudo, entretanto a irradiação no CP foi com LED com $\lambda_{\text{máx}}$ em 420 nm, já na região do visível. Os autores descrevem que essa diminuição nas bandas de absorção está correlacionada a cinética de branqueamento dos carotenoides, exibindo comportamento do decaimento da intensidade de forma linear, enquanto nosso trabalho apresenta comportamento não linear. Os mecanismos de branqueamento propostos dos carotenoides estudados no trabalho, entre eles o β -caroteno e a violaxantina, envolvem adição de radicais ou formação de adutos (produto da adição direta de duas ou mais moléculas diferentes, resultando em um único produto de reação contendo todos os átomos de todos os componentes iniciais) ou reação de transferência de elétrons ou abstração de hidrogênio [53].

Comparando nosso estudo ao trabalho citado, temos que o comportamento de redução das bandas de absorção não tem dependência linear, nem quando analisados em escala logarítmica, o fato da irradiação ser no visível e do trabalho no ultravioleta é um fator importante nessa diferença de comportamento, além disso, o solvente envolvido também influencia nos mecanismo propostos pelos autores, outro fator importante é que nossa amostra trata-se de um extrato de polpa de fruta, enquanto que o outro trabalho utiliza os carotenoides isolados. Apesar das diferenças, fica evidente que o CP é fotodegradado devido às alterações nos carotenoides, possibilitando a formação de espécies químicas intermediárias, as quais poderiam ser resultado da inibição de espécies reativas de oxigênio, que é característica antioxidante dos carotenoides.

Visando a aplicabilidade do canistel em pó como um corante natural para ser utilizado em produtos alimentícios, também foi avaliada a fotodegradação do canistel em pó em solução (CPS) por meio da espectrofotometria por transmitância na região do ultravioleta-visível.

O CP foi solubilizado em óleo mineral devido à sua lipofilicidade. No mesmo viés que o estudo do CP por espectroscopia fotoacústica, a espectrofotometria foi realizada. Inicialmente obtendo-se os espectros da solução de CP (50mg/L) sem irradiação e do óleo mineral, seguido da avaliação da contribuição da fonte de

excitação do espectrofotômetro, e por fim as medidas nas amostras irradiadas com LED realizadas em triplicada.

A Fig. 4.3-6A mostra os espectros de absorção do CP sem irradiação e do óleo mineral utilizado para a preparação da solução de CP, nota-se que não há contribuição espectral do óleo na região entre ~ 300 e 525 nm, atribuída aos carotenoides, como pode ser visto na Fig. 4.3-6B.

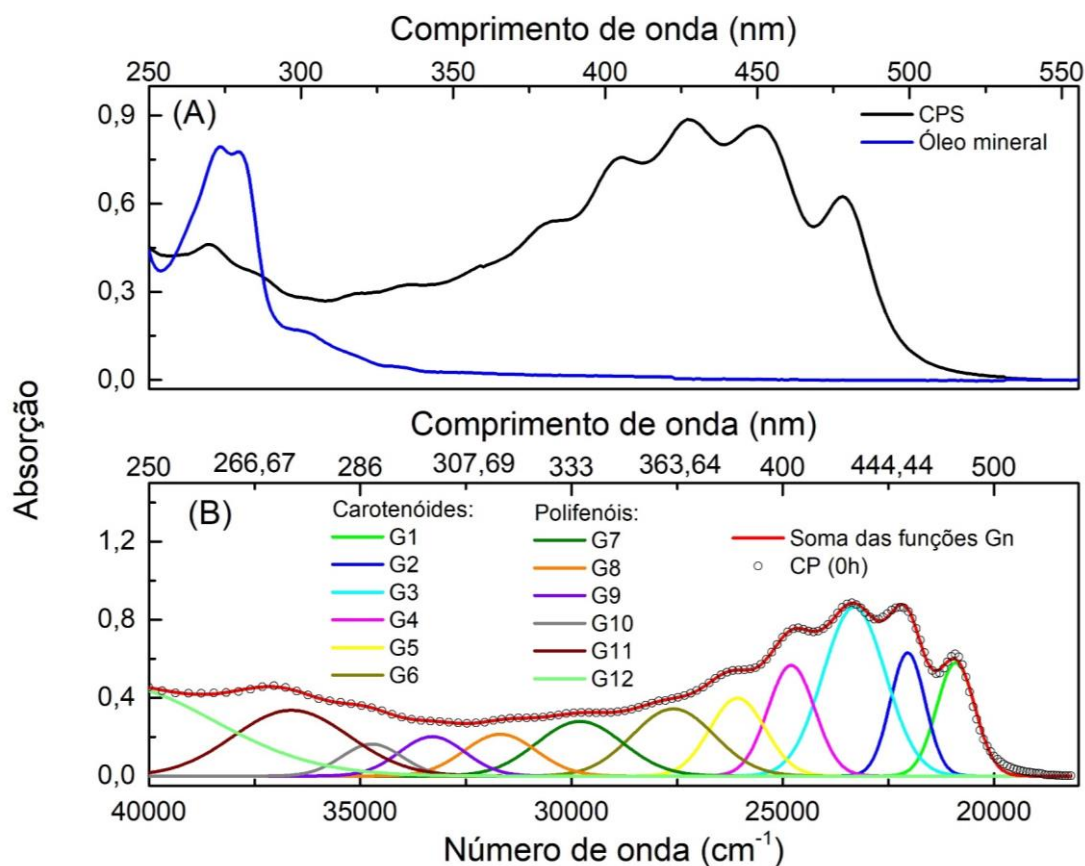


Figura 4.3-6: (A) Espectro de absorção da solução de CP (50mg/L) sem irradiação e do óleo mineral utilizado como solvente. (B) Deconvolução gaussiana do espectro de CP sem irradiação de LED (0 h).

Como dito anteriormente, dentre os carotenoides que podem estar presentes no CP da polpa, a violaxantina + neoxantina são majoritárias, seguidas por ζ -caroteno e β -caroteno, e outros carotenoides em menor quantidade [31]. Utilizando os ajustes matemáticos com funções gaussianas na tentativa de obter as contribuições dos carotenoides e compostos fenólicos, foram obtidos os seguintes centros de bandas: 244, 273, 288, 300, 316 e 336 nm, referentes aos compostos fenólicos, principalmente

ácido gálico [31], [115], e 362, 382, 404, 428, 454 e 478 nm atribuídos a carotenoides. [112], [114], [116]–[118].

Tal como na espectroscopia fotoacústica, na qual foram medidas as amostras de CP em pó, há a sobreposição de bandas no espectro obtido dificultando uma caracterização mais detalhada da solução de CP (CPS). No entanto, na região associada aos carotenoides foi possível identificar os compostos ζ -caroteno (picos: 362, 382, 404, 428 nm) e violaxantina (picos: 428, 454 e 478 nm) [119]. Ressaltando que a banda centrada em 428 nm é resultado da superposição das bandas de absorção de ambos os compostos.

Após cada tempo de irradiação de CPS foram obtidos seus respectivos espectros de absorção, em triplicata. A Fig. 4.3-7A mostra a média dos espectros obtidos em cada período. Para verificar a contribuição do óleo mineral no processo de fotodegradação, o mesmo foi irradiado nas mesmas condições experimentais que a solução de CP, os espectros estão mostrados na Fig. 4.3-7B.

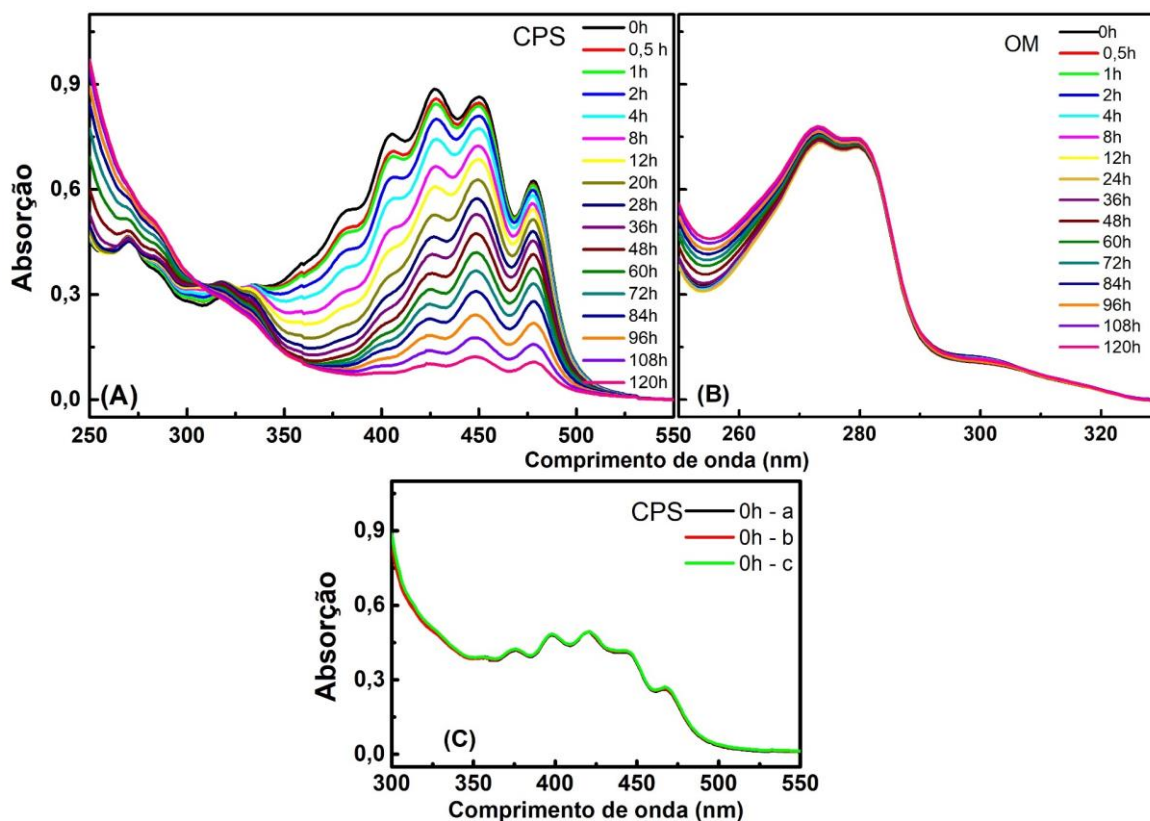


Figura 4.3-7: Espectros de absorção na região UV-vis da (A) CPS (solução de CP em óleo mineral (50 mg/L)) e (B) óleo mineral para diferentes tempos de irradiação. (C) Comparação

entre espectros consecutivos para a amostra não irradiada, mostrando que a irradiação pela fonte do espectrofotômetro não provoca efeito de fotodegradação.

Apesar de o óleo mineral apresentar sensibilidade a luz irradiada, a variação espectral não tem a mesma intensidade e não ocorre no mesmo intervalo espectral que o CPS, sendo assim seus efeitos fotossensíveis podem ser desprezados nos espectros das soluções. A Fig. 4.3-7C apresenta três medidas em uma mesma amostra de CPS sem ser submetido a irradiação de LED, sendo a medida “a” a primeira medida, e sem remover a amostra do equipamento foram realizadas na sequência as medidas “b” e “c”, observa-se que não há variação significativa nos espectros, mostrando que a contribuição da fonte de excitação do espectrofotômetro não contribui de forma significativa no processo de fotodegradação do CPS. Não foram realizadas medidas repetidas em amostras de CPS irradiadas, visto que a contribuição na amostra sem irradiar é desprezível para este experimento.

Tanto na espectroscopia fotoacústica, quanto na espectrofotometria as contribuições das fontes de excitação não foram significativas, quando comparadas ao efeito da irradiação por LED, entretanto nota-se que na espectroscopia fotoacústica houve um decréscimo na intensidade do sinal, o que não foi observado nos espectros obtidos pelo espectrofotômetro, possivelmente a potência nominal das fontes de excitação, sendo as do espectrofotômetro aproximadamente 4 vezes menor que a da espectroscopia fotoacústica, e a solubilização do CP, o qual diminui a concentração da fruta em pó, são fatores que contribuem para essa diferença entre as duas técnicas.

Na Fig. 4,3-7A observa-se uma inversão de comportamento nos espectros em função do tempo de irradiação na região entre 300 e 350 nm. Há diminuição da intensidade dos espectros na região acima de 350 nm e um aumento na intensidade na região abaixo de 300 nm, ambos os comportamentos conforme o aumento do período de irradiação. Este comportamento corrobora com a espectroscopia fotoacústica, na qual descrevemos que a diminuição das intensidades nos espectros está correlacionada ao branqueamento dos carotenoides. Além disso, a espectrofotometria traz uma informação adicional com a inversão das intensidades, ou seja, o desvio da absorção do visível para região do ultravioleta, na qual é relatado na literatura que este comportamento é devido às rupturas das duplas ligações conjugadas dos carotenoides [5].

Para melhor avaliar as variações espectrais em função do período de irradiação por LED de CPS, foi realizada a análise de PCA em todas as amostras irradiadas e não irradiadas, os resultados obtidos estão mostrados na Fig. 4.3-8. Nota-se que a região espectral que mais varia no período é entre ~ 300 e 500 nm, região atribuída aos carotenoides ($PC1 < 0$), seguida pela variação entre 250 e 300 nm ($PC2 > 0$), atribuída aos compostos fenólicos, como mostra a curva de *loading* de PC1 e PC2 em função do comprimento de onda (Fig.4.3-8A), sendo a componente PC1 dominante na análise 93,3% de variância. Nas regiões espectrais que mais variam no período de irradiação temos que, podemos destacar bandas próximas ao centro de 250 e 430 nm, os quais mais se distanciam de $PC1 = PC2 = 0$ (Fig.4.3-8B).

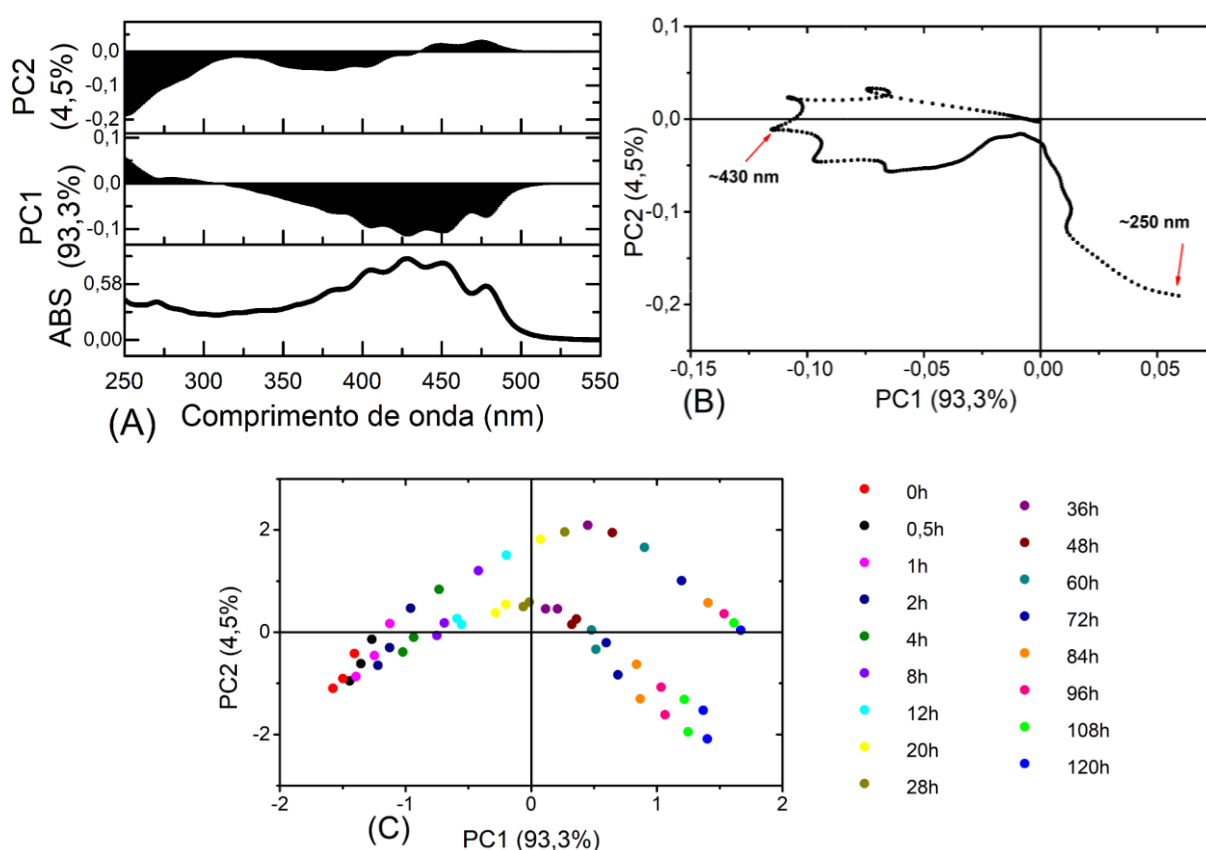


Figura 4.3-8: Análise multivariada dos espectros de CP com e sem irradiação: (A) *Loading* das componentes PC1 e PC2 comparadas a um espectro de absorção de CP sem irradiar; (B) *Loading* PC1 versus PC2 e (C) *Score plot* de PC1 versus PC2, as amostras 0 h identificam as que não receberam irradiação de LED.

Estes resultados mostram comportamento semelhante a espectroscopia fotoacústica. Já a Fig. 4.3-8C, gráfico *score plot*, mostra o comportamento de todas

as amostras medidas em triplicata, na qual observamos que para as amostras sem irradiação e para as irradiadas entre os períodos de 0,5 h até ~ 28 h a variação nos espectros é maior na região dos carotenoides ($PC1 < 0$), já para os períodos acima de 28 h a contribuição é maior na região dos compostos fenólicos ($PC2 < 0$ e $PC1 > 0$). Vemos que o comportamento dos espectros por espectrofotometria tem diferença com relação aos espectros fotoacústicos. Na espectroscopia fotoacústica as amostras agruparam-se em três grupos 0; 0,5 e 1 min, 5, 10 e 15 min, já na espectrofotometria não apresentaram a formação de grupos por período de irradiação.

Os períodos de irradiação por LED do CP foram diferentes nas duas espectroscopias, já que a fotoacústica foi utilizada para amostras em pó, amostras mais concentradas de CP, e a espectrofotometria para o CP diluído em óleo mineral, com menor concentração de CP, desta forma o tempo necessário para observar a degradação são diferentes, sendo mais rápido para as amostras mais concentradas.

Apesar desta diferença na escala de tempo, observa-se que o comportamento do parâmetro $PC1$ em função do tempo de irradiação, mostrado na Fig. 4.3-9A, é qualitativamente semelhante ao observado para análise da fotoacústica. Ou seja, observa-se que o processo tem dois regimes: para tempos iniciais uma acentuada variação exponencial, com tempo característico da ordem de 7,3 h, e para tempos de irradiação maiores que ~ 20 h uma variação mais lenta, que é dominada por uma variação linear com coeficiente linear de ~ $0,015 \text{ h}^{-1}$.

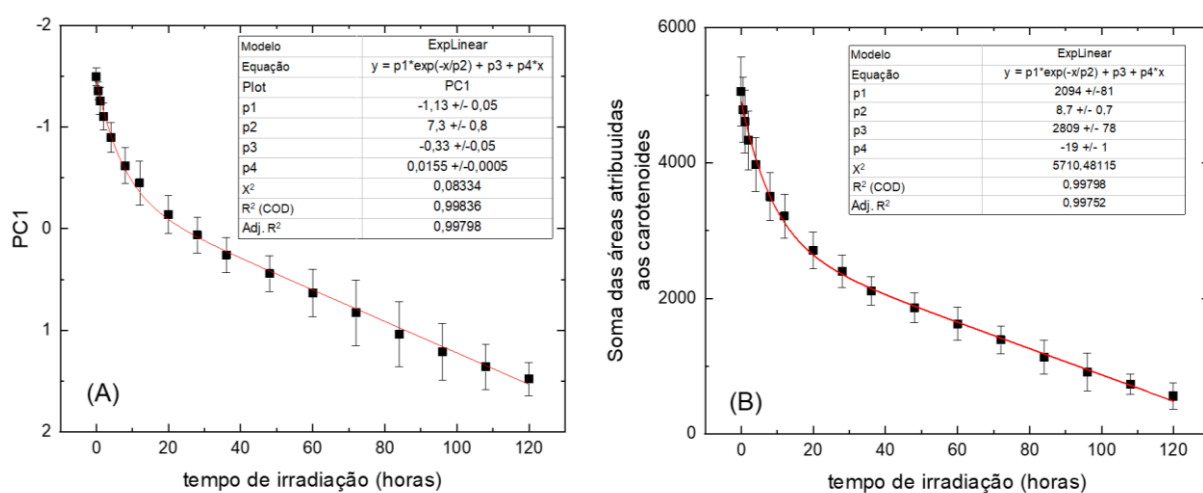


Figura 4.3-9: Comportamento de $PC1$ (A) e da soma das áreas das bandas de absorção dos carotenoides (B) em função do tempo de irradiação para CPS.

Para melhor investigarmos o comportamento da irradiação nas soluções dos extratos de canistel foram realizados ajustes com funções gaussianas, seguindo os mesmos procedimentos matemáticos que na espectroscopia fotoacústica, porém com um número maior de gaussianas, as quais tiveram seus centros descritos anteriormente. Os ajustes matemáticos foram realizados em todas as amostras, conforme mostra o exemplo da Fig. 4.3-6B.

A Fig. 4.3-9B mostra a soma das áreas das gaussianas centradas em 362, 382, 404, 428, 454 e 478 nm atribuídas aos carotenoides em função do tempo de irradiação, a qual apresenta comportamento análogo ao observado para PC1, ou seja, que o processo de fotodegradação apresenta dois regimes, um com caráter exponencial (tempo característico de ~ 8,8 h) e o segundo com comportamento linear para tempos mais longos de irradiação.

Como vimos na análise de PCA o parâmetro PC1 é governado pela variação do sinal na região entre 300 e 500 nm, portanto refletindo o comportamento médio da absorção dos carotenoides. Enquanto o ajuste matemático com as funções gaussianas permite acompanhar a evolução das bandas em função do tempo de irradiação separadamente, assim pode-se analisar a cinética da fotodegradação de cada composto.

Como mencionado anteriormente as bandas centradas em 382 e 404 nm são características do ζ -caroteno, enquanto as centras em 454 e 478 nm são oriundas da absorção da violaxantina, e a banda centrada em 428 nm possui contribuição da absorção de ambos os compostos. A distinção e atribuição destas bandas ficam ainda mais evidentes no comportamento da área das mesmas em função do tempo de irradiação, como mostrado na Fig. 4.3-10, a qual mostra as áreas normalizadas para auxiliar a visualização.

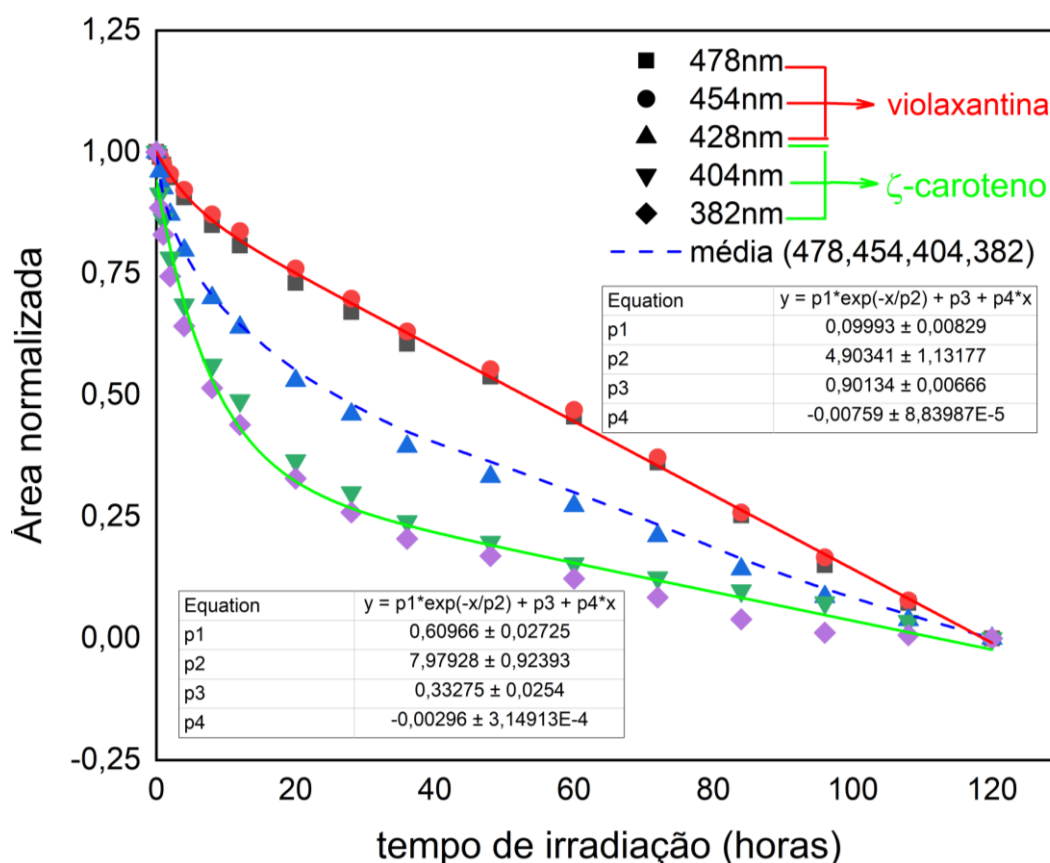


Figura 4.3-10: Áreas das bandas de absorção normalizadas em função do tempo de irradiação por LED. A linha tracejada corresponde ao valor médio das áreas centradas em 382, 404, 454 e 478 nm. As linhas sólidas representam os ajustes com funções matemáticas.

Observa-se claramente que as bandas do ζ -caroteno (382 e 404 nm) apresenta um decréscimo inicial mais acentuado, com um tempo característico de ~ 8 h, enquanto as bandas da violaxantina (454 e 478 nm) apresenta um pequeno decréscimo exponencial inicial, com tempo característico de ~ 4 h, seguido pelo comportamento linear acima de ~ 10 h.

A superposição das absorções para a banda de 428 nm fica evidente quando comparamos seu comportamento em função do tempo de irradiação com o valor médio das outras bandas associadas ao ζ -caroteno e à violaxantina, como mostrado na Fig. 4.3-10. Assim, a evolução temporal desta banda reflete a fotodegradação de ambos os compostos, o que justifica as maiores variações dos valores dos PC's observado na análise de PCA para este comprimento de onda.

Destacamos aqui o comportamento das bandas de absorção centradas em 273 e 428 nm, na região em que os comprimentos de onda mais se distanciaram de PC1 = PC2 = 0 (Fig.4.3-8B), mostrado na Fig. 4.3-11.

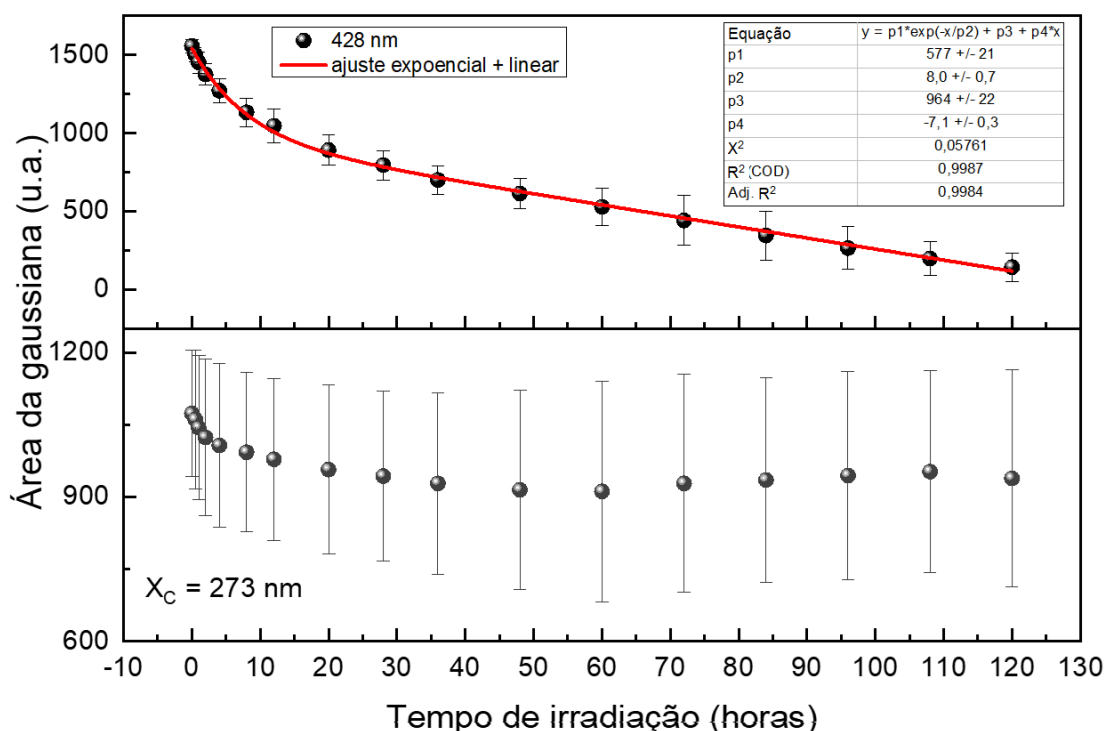


Figura 4.3-11: Comportamento das áreas das gaussianas centradas em 273 e 428 nm em função do tempo de irradiação. Os pontos são as áreas das gaussianas e a linha sólida o ajuste matemático. Os parâmetros de ajuste obtidos estão no detalhe da figura. O tempo $t = 0 \text{ h}$ indica o CP sem irradiação.

Tal como na espectroscopia fotoacústica temos comportamentos diferenciados nas diferentes regiões dos espectros, tal como proposto anteriormente, por se tratar de compostos diferentes, carotenoides e compostos fenólicos. Para a banda centrada em 428 nm, atribuída aos carotenoides (violaxantina e ζ -caroteno) majoritários entre os encontrados na polpa do canistel, observamos os dois comportamentos, até ~ 36 h descritos por uma exponencial, com tempo característico de $t = 8,0 \pm 0,7 \text{ h}$ e uma função linear, para os dados após 36 h de irradiação com coeficiente angular de $[7,1] \pm 0,3 \text{ h}^{-1}$. Já para a banda centrada em 273 nm, atribuída aos compostos fenólicos, não foi possível realizar um ajuste matemático, visto que o erro na média das áreas não permite diferenciar os dados em função do tempo. Porém, o comportamento dos dados experimentais, apresenta uma tendência também não linear. Os resultados da

espectroscopia fotoacústica também apresentaram comportamento não linear das áreas dos compostos do CP em pó, tal comportamento foi discutido como a formação de produtos do branqueamento. Os dados da espectrofotometria também temos a mesma interpretação, porém somente com os tempos característicos e a cinética da reação, por meio do coeficiente angular, oriundos dos ajustes matemáticos, não é possível elucidar quais seriam os compostos formados devido à irradiação em 420 nm.

Na literatura há uma vasta gama de trabalhos que estudam fotoreações em carotenoides e compostos fenólicos, até onde é do nosso conhecimento, a maioria dos trabalhos estudaram os compostos isolados e irradiaram na região do ultravioleta, já no nosso trabalho estamos analisando o extrato bruto do canistel e excitando em 420 nm (região de máxima absorção), região na qual o extrato exibe maior absorção. E complementam as análises dos produtos da reação por meio de técnicas de separação como cromatografias e espectrometria de massas.

Possivelmente esse comportamento não linear pode estar correlacionado a outros compostos do extrato, tais como fibras. Em outro trabalho com o CP foi tentado a separação de seus componentes por cromatografia líquida de alta eficiência, entretanto devido à complexidade do extrato não foi possível separar seus compostos. Cabe ressaltar, que o interesse em se utilizar menos processos químicos possíveis para extração do extrato do canistel foi no intuito de se obter um corante natural com o objetivo da aplicação em alimentos, de forma a ser menos agressivo a saúde do que os corantes artificiais [28], [30]. Entretanto estes testes de qualidade de alimento ainda não foram realizados.

A Fig. 4.3-12 mostra as fotos das amostras de CP em pó e em solução antes de irradiar e após o último tempo de irradiação e os diagramas de cromaticidade obtidos por meio dos espectros de absorção e fotoacústicos das amostras. Tanto por meio das fotos quanto dos diagramas é possível notar que as amostras em pó sofrem menor fotodegradação quando comparadas as amostras de CP em solução, pois o CP em solução está solubilizado em óleo mineral reduzindo a concentração de CP com relação as amostras em pó. O tempo irradiação para a fotoacústica foi determinado em 15 min, pois para tempos superiores não foram observadas mudanças significativas nos espectros. Já para a espectrofotometria o tempo de 120 h foi o tempo máximo dentro do limite de operação do aparato experimental.

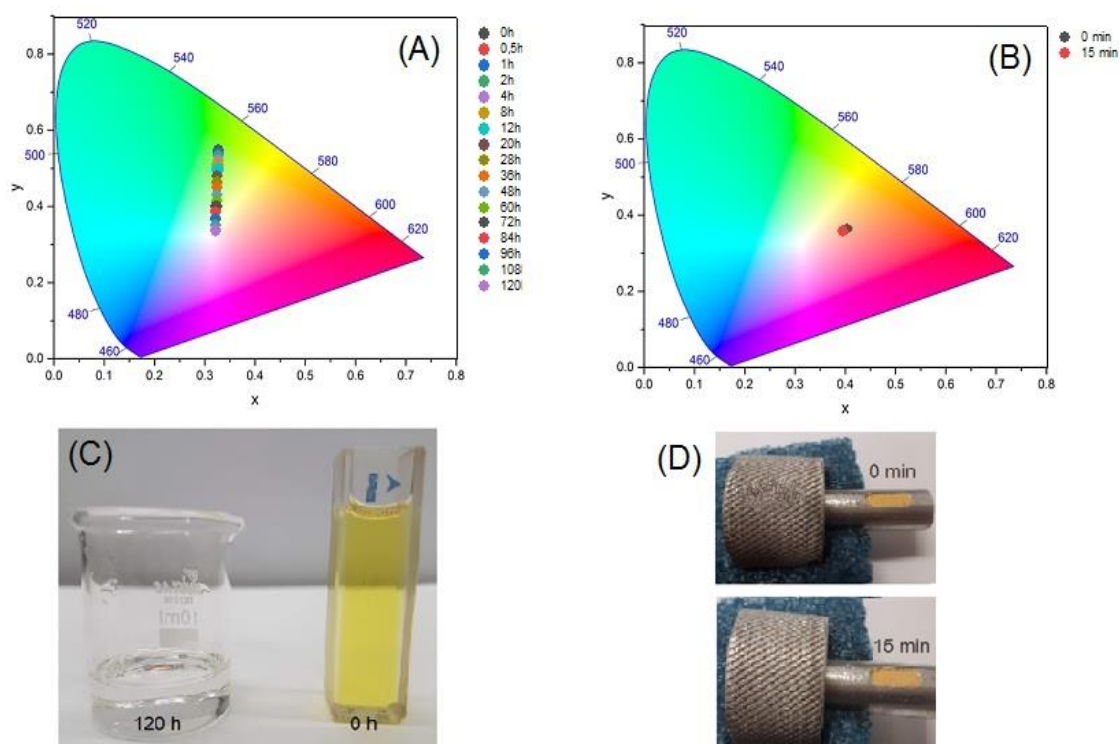


Figura 4.3-12: À esquerda as soluções de CP em óleo mineral e a direita o CP em pó. 0 h ou 0 min são as amostras sem irradiar e 120 h e 15 min os últimos períodos de irradiação com LED.

A espectrofotometria por transmitância e a espectroscopia fotoacústica forneceram informações valiosas para a fruta canistel, tanto em pó quanto em solução, pois foi possível saber que o CP é fotossensível à irradiação no visível, dado este que pode contribuir no método de armazenamento do corante. Além disso, a reação mediante a irradiação pode ser descrita como um branqueamento, devido à quebra das duplas ligações conjugadas dos carotenoides acarretando na diminuição das bandas entre 300 e 500 nm, e o deslocamento para regiões de maior energia, abaixo de 300 nm, principalmente para os períodos de irradiação acima de 28 h. Ademais, as espectroscopias forneceram informações importantes acerca do tempo de formação dos produtos da fotodegradação dos carotenoides, mostrando também uma contribuição de outros compostos da polpa do canistel, devido ao comportamento não linear das bandas dos carotenoides em função do tempo de irradiação. Nas amostras em solução, foi possível observar a quebra das ligações duplas na região de menor

energia, os produtos formados estão absorvendo na região do ultravioleta, mostrado no aumento da intensidade dos espectros nesta região.

Capítulo 5

CONCLUSÃO

As espectroscopias no UV-Vis, fotoacústica e FTIR-ATR se mostraram muito versáteis na investigação de compostos bioativos no resíduo de fabricação de cerveja, na planta *Maytenus ilicifolia* (espinheira-santa) e da fruta canistel.

Por meio da espectroscopia FTIR-ATR e a deconvolução gaussiana nos espectros foi possível identificar compostos fenólicos, proteínas totais e do triterpeno friedelina, além do conteúdo lipídico e a caracterização de outros grupos químicos nas diferentes partes da planta *Maytenus ilicifolia*: cotilédone, plântula e folhas, as quais possuíam diferentes idades. Não foi possível evidenciar qual parte da planta contém mais compostos bioativos, pois há uma alternância entre os seus níveis entre as diferentes partes, entretanto com relação à friedelina, composto que auxilia no tratamento de problemas gástricos, há uma tendência de maior quantidade no cotilédone quando comparada a plântula e folhas. No resíduo de fabricação de cerveja, a espectroscopia FTIR-ATR também possibilitou sua caracterização, bem como, após os processos de extração para remoção dos compostos amargos. Os resultados com relação a proteína total foram equivalentes à análise físico-química de proteína bruta, antes e após as extrações, mostrando que a técnica espectroscópica também pode ser utilizada para estimar conteúdo proteico. Ainda na região de proteínas dos espectros de FTIR-ATR foi investigado as conformações de proteínas antes e após os processos de extração, por meio da segunda derivada nos espectros, que mostrou uma dominância das estruturas secundárias β -folha/volta. Por fim, a espectroscopia FTIR-ATR pode complementar o estudo no resíduo de cerveja fornecendo uma análise do nível de carboidrato antes e após cada processo de

extração, mostrando redução no carboidrato, e após a 1ª etapa de extração os níveis permaneceram praticamente constantes.

A espectroscopia fotoacústica, na região do UV-Vis, foi aplicada para estudo da espinheira-santa e do canistel. Tanto para as análises de espinheira-santa como do canistel foi necessária a utilização da deconvolução gaussiana dos espectros, pois não houve nenhum processo químico de tratamento nas amostras, sendo apenas a planta e a fruta desidratada e macerada, o que atribui uma grande complexidade aos espectros devido à muitas contribuições de diferentes componentes orgânicos das amostras. Na espinheira-santa foi avaliado os níveis de pigmentos, clorofilas e carotenoides, nas diferentes partes da planta. O cotilédone mostrou ausência de clorofila, enquanto as folhas a dos carotenoides, somente a plântula apresentou todos os pigmentos avaliados. Esse comportamento, possivelmente, é devido à atuação de cada parte da planta no processo de fotossíntese associada a idade, sendo cada pigmento responsável por uma atividade com relação a captação de energia luminosa. Estes resultados tornam-se relevantes para o aprofundamento de estudos com a espinheira-santa, uma vez que mesmo que esta planta possua um tempo de desenvolvimento de 3 a 4 anos, os compostos bioativos característicos desta espécie estão presentes desde o início do desenvolvimento, o que facilita a extração destes compostos.

Na polpa do canistel irradiada com luz no visível em sua região de máxima absorção (420 nm) a espectroscopia fotoacústica mostrou a presença de ao menos dois processos de fotodegradação nos compostos bioativos avaliados, isso foi possível com o auxílio da análise multivariada que indicou as bandas que mais contribuíram para a variação nos espectros fotoacústicos. O tempo característico do 1º processo foi em torno de $\sim 0,7$ min, enquanto o 2º processo com uma taxa de variação de 2,0 e $5,9 \text{ min}^{-1}$ para a violanxantina e o ζ -caroteno, respectivamente. Não foi possível identificar os produtos formados em cada processo.

A espectrofotometria por transmitância, no UV-Vis, foi aplicada nas amostras de pó de canistel solubilizado em óleo mineral. Os espectros de absorção obtidos pela técnica também foram tratados matematicamente por meio da deconvolução gaussiana, para obtermos a identificação dos compostos bioativos e pela análise multivariada que indicou as bandas que mais variaram mediante a fotodegradação no visível. Assim como na espectroscopia fotoacústica, foi identificada a presença de dois

processos de fotodegradação nos carotenoides, o 1º com tempo característico de 7,3 h e o 2º com taxa de variação de 0,015 h⁻¹. Entretanto, nota-se que os processos são mais lentos do que nas amostras em pó.

As três técnicas espectroscópicas aplicadas neste trabalho apresentaram resultados positivos com relação a identificação e investigação dos compostos bioativos. Em técnicas padrão para análise destes compostos, usualmente se tem a utilização de solventes, essa é mais uma vantagem das espectroscopias estudadas aqui, que requerem o mínimo preparo da amostra, além de serem minimamente destrutiva, mostrando grande potencial para análises de compostos orgânicos.

PERSPECTIVAS FUTURAS

As perspectivas futuras estão direcionadas aos resultados do canistel, pois observamos que há a fotodegradação no pó da polpa desidrata, sendo assim utilizar um agente químico que o estabilize frente a irradiação externa é uma das perspectivas deste trabalho. O pó de canistel, já foi testado em complexação com a ciclodextrina, e seus resultados iniciais mostram-se promissores com relação a fotodegradação, entretanto é necessário avaliar qual a consequência aos níveis de compostos bioativos com a complexação.

REFERÊNCIAS

- [1] F. P. Moraes e L. M. COLLA. “Alimentos funcionais e nutraceuticos: definições, legislação e benefícios à saúde,” *Revista Eletrônica De Farmácia*, Goiânia, v.3, n.2, p.109-122, 2006.
- [2] R. F. Witkamp, K. van Norren. “Let thy food be thy medicine....when possible,” *Eur J Pharmacol*. 2018 Oct 5; 836:102-114. doi: 10.1016/j.ejphar.2018.06.026. Epub 2018 Jun 21. PMID: 29936236
- [3] R. B. Santos, *et al.*, “Qualidade Microbiológica De Alimentos in Natura Minimamente Processados,” pp. 43–52, 2019.
- [4] R. M. Bielemann, *et al.*, “Consumption of ultra-processed foods and their impact on the diet of young adults,” *Rev. Saude Publica*, vol. 49, 2015, doi: 10.1590/S0034-8910.2015049005572.
- [5] Harvard T. H. Chan. “The Nutrition Source: Processed Foods and Health.” <https://www.hsph.harvard.edu/nutritionsource/processed-foods/>. Acesso em 27 de novembro de 2021.
- [6] M. L. da C. Louzada *et al.*, “Ultra-processed foods and the nutritional dietary profile in Brazil,” *Rev. Saude Publica*, vol. 49, pp. 1–11, 2015, doi: 10.1590/S0034-8910.2015049006132.
- [7] V. B. Oliveira *et al.*, “Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento , atividade antioxidante , doseamentos totais e no perfil por clae-dad de dicksonia sellowiana (presl .). Hook , dicksoniaceae,” pp. 230–239, 2001.
- [8] B. L. Dinesha, *et al.*, “Effect of extraction methods on physicochemical, nutritional, antinutritional, antioxidant and antimicrobial activity of Moringa (Moringa oleifera Lam.) seed kernel oil,” *J. Appl. Nat. Sci.*, vol. 10, no. 1, pp. 287–295, 2018, doi: 10.31018/jans.v10i1.1619.
- [9] P. Putnik *et al.*, “Novel food processing and extraction technologies of high-added value compounds from plant materials,” *Foods*, vol. 7, no. 7, pp. 1–16, 2018, doi: 10.3390/foods7070106.
- [10] X. Mohammadi, *et al.*, “Impact of Three Different Dehydration Methods on Nutritional Values and Sensory Quality of Dried Broccoli, Oranges, and Carrots,”

- 2020.
- [11] C. Ratti, "Hot air and freeze-drying of high-value foods : A review Hot air and freeze-drying of high-value foods : a review," vol. 8774, no. September 2001, 2018, doi: 10.1016/S0260-8774(00)00228-4.
- [12] E. Ranieri, *et al.*, "Utilização de compostos bioativos de plantas medicinais na pós-colheita de tomate," *Sci. Agrar. Parana.*, vol. 14, no. 3, pp. 160–165, 2015.
- [13] H. K. Biesalski *et al.*, "Bioactive compounds: Definition and assessment of activity," *Nutrition*, vol. 25, no. 11–12, pp. 1202–1205, 2009, doi: 10.1016/j.nut.2009.04.023.
- [14] A. Guaadaoui, *et al.*, "What is a bioactive compound? A combined definition for a preliminary consensus," *Int. J. Food Sci. Nutr.*, vol. 3, no. 3, pp. 17–179, 2014, doi: 10.11648/j.ijnfs.20140303.16.
- [15] J. A. T. Pennington, "Food composition database for bioactive food components," *J. Food Compos. Anal.*, vol. 15, no. 4, pp. 419–434, 2002, doi: 10.1006/jfca.2002.1073.
- [16] A. Rohman, *et al.*, "Comprehensive Review on Application of FTIR Spectroscopy Coupled with Chemometrics for Authentication Analysis of Fats and Oils in the Food Products". *Molecules*. 2020 Nov 23;25(22):5485. doi: 10.3390/molecules25225485. PMID: 33238638; PMCID: PMC7700317.
- [17] C. M. R. Sant'Anna, "Molecular modeling methods in the study and design of bioactive compounds: An introduction," *Rev. Virtual Química*, vol. 1, no. 1, 2009, doi: 10.5935/1984-6835.20090007.
- [18] S. S. N. Purdue, Ed., *Food Science Text Series: Food Analysis*, 5th ed. University West Lafayette, IN, USA: Springer International Publishing.
- [19] C. H. C. Noh, N. F. M. Azmin, e A. L. Asnawi, "A review: Fourier Transform Infrared (FTIR) Application on Bioactive Compounds.," *4th Int. Conf. Biotechnol. Eng. 2016, Kuala Lumpur, Malaysia*, no. November, 2016.
- [20] C. H. C. Noh, N. F. M. Azmin, e A. Amid, "Principal Component Analysis Application on Flavonoids Characterization," vol. 2, no. 3, pp. 435–440, 2017.
- [21] L. Gama, "Uso medicinal popular da espinheira-santa estimula extrativismo e coloca a planta em risco de extinção," *Cienc. Cult.*, vol. 55, no. 3, pp. 6–7, 2003.
- [22] A. P. J. Maestrin, *et al.*, "Extração e purificação de clorofila a, da alga *Spirulina maxima*: um experimento para os cursos de química," *Quim. Nova*, vol. 32, pp.

- 1670–1672, 2009.
- [23] J. R. P. de Souza, *et al.*, “Desenvolvimento da espinheira-santa sob diferentes intensidades luminosas e níveis de poda,” *Hortic. Bras.*, vol. 26, pp. 40–44, 2008.
- [24] L. M. Batista e A. M. G. Valença, “A fitoterapia no âmbito da atenção básica no SUS: realidades e perspectivas,” *Pesqui. Bras. Odontopediatria Clin. Integr.*, vol. 12, no. 2, pp. 293–296, 2012.
- [25] W. A. de Alvarenga, “Caracterização de Compostos Presentes na Planta *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reissek Durante a Fase Inicial e Adulta de Desenvolvimento,” *Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sustentabilidade (PSU)*. UMUARAMA/PR, 2019.
- [26] M. D. Alberton, *et al.*, “Identificação de marcadores cromatográficos de *Zollernia ilicifolia* e *Sorocea bonplandii* para o controle de qualidade de espinheira-santa,” *Rev. Bras. Farmacogn.*, vol. 12, pp. 9–11, 2002, doi: 10.1590/s0102-695x2002000300005.
- [27] F. M. Chiamolera, *et al.*, “Clonagem de canistel por estaquia,” *Rev. Bras. Frutic.*, vol. 36, pp. 649–654, 2014.
- [28] S. R. Pertiwi, S. Nurhalimah, e A. Aminullah, “Otimização do processamento de farinha de canistel maduro (*Pouteria campechiana*) baseada em características de qualidade,” *Brazilian J. Food Technol.*, vol. 23, 2020.
- [29] T. da S. A. Costa, *et al.*, “Composição de carotenoides em canistel (*Pouteria campechiana* (Kunth) Baehni),” *Rev. Bras. Frutic.*, vol. 32, pp. 903–906, 2010.
- [30] B. R. Saraiva *et al.*, “Effects of inulin and canistel addition in the physical characteristics of fat-reduced processed cheese,” *Res. Soc. Dev.*, vol. 9, no. 11, pp. e4289119917–e4289119917, 2020.
- [31] T. S. A. Costa, *et al.*, “Carotenoids composition of canistel (*Pouteria campechiana* (Kunth) Baehni),” *Rev. Bras. Frutic.*, vol. 32, no. 3, pp. 903–906, 2010, doi: 10.1590/S0100-29452010005000083.
- [32] N. E. Quaranta, *et al.* “The Characterization Of Brewing Waste And Feasibility Of Its Use For The Production Of Porous Ceramics.” *Waste Management* 202 (2016): 299-310.
- [33] C. Y. L. Ogawa, “Técnicas espectroscópicas para identificação e quantificação de compostos fenólicos sólidos,” *Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Física (PFI/UEM)*. Maringá-PR, 2016.

- [34] A. Barth, "Infrared spectroscopy of proteins," vol. 1767, pp. 1073–1101, 2007, doi: 10.1016/j.bbabbio.2007.06.004.
- [35] D. L. Pavia, G. M. Lampman, G. S. Kriz, e J. R. Vyvyan, *Introduction to Spectroscopy*, 4th ed. Washinton, 2009.
- [36] "Chemical compound - Spectroscopy of organic compounds | Britannica." .
- [37] I. E. Borissevith, P. J. Gonçalves, E F. A. Schaberle, *Fundamentos Da Espectroscopia De Absorção Óptica*, 1st Ed. Editora Livraria da Física.
- [38] "The Light-Dependent Reactions of Photosynthesis | Boundless Biology." .
- [39] Peter Larkin, *Infrared And Raman Spectroscopy - Principles And Spectral Interpretation*. Elsevier, 2011.
- [40] P. Atkins e J. de Paula, *Físico-Química Biológica*, 11th ed. LTC, 2008.
- [41] Z. Arifin, S. Soeparman, D. Widhiyanuriyawan, e S. Suyitno, "Performance Enhancement of Dye-Sensitized Solar Cells Using a Natural Performance Enhancement of Dye-Sensitized Solar Cells Using a Natural Sensitizer," no. January, 2017, doi: 10.1155/2017/2704864.
- [42] H. R. G. Da Silva, C. M. Quintella, e M. Meira, "Separation and identification of functional groups of molecules responsible for fluorescence of biodiesel using FTIR spectroscopy and principal component analysis," *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 28, no. 12, pp. 2348–2356, 2017, doi: 10.21577/0103-5053.20170088.
- [43] S. He *et al.*, "Baseline correction for Raman spectra using an improved asymmetric least squares method," *Anal. Methods*, vol. 6, no. 12, pp. 4402–4407, 2014, doi: 10.1039/c4ay00068d.
- [44] R. Gautam, S. Vanga, F. Ariese, e S. Umapathy, "Review of multidimensional data processing approaches for Raman and infrared spectroscopy," *EPJ Tech. Instrum.*, 2015, doi: 10.1140/epjti/s40485-015-0018-6.
- [45] P. Atkins, "Introduction to spectroscopy," pp. 1–37, 2006.
- [46] L. A. Gobbo, T. J. Montanheiro, F. Montanheiro, e L. M. Sant'agostino, "Avaliação de cimento portland a partir da difração de raios x associada à análise por agrupamento," *Rev. do Inst. Geológico*, vol. 34, no. 2, pp. 41–49, 2013.
- [47] K. Hongyu, V. L. M. Sandanielo, e G. J. de Oliveira Junior, "Análise de componentes principais: resumo teórico, aplicação e interpretação," *E&S Eng. Sci.*, vol. 5, no. 1, pp. 83–90, 2016.
- [48] C. B. Y. Cordella, "Mathematical Methods to Analyze Spectroscopic Data – New

- Applications,” in *PCA: The Basic Building Block of Chemometrics*, 2012.
- [49] M. Richardson, “Principal Component Analysis,” vol. 1, no. Maio. 2009.
- [50] A. M. de Souza, R. J. Poppi. "Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: um tutorial, parte I", *Quím. Nova* 35 (1) • 2012 • <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000100039> .
- [51] D. I. Santos, J. Manuel, A. Saraiva, A. A. Vicente, e M. Moldão-martins, *Methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds and nutrients*. Elsevier Inc., 2019.
- [52] S. R. Rosatti, *et al.*, “Quantificação dos teores de carboidratos, acidez e compostos bioativos em frutos de mangueira de origens diversas.,” 2012.
- [53] C. M. McGoverin, *et al.*, “Review: The application of near infrared spectroscopy to the measurement of bioactive compounds in food commodities,” *J. Near Infrared Spectrosc.*, vol. 18, no. 2, pp. 87–111, 2010, doi: 10.1255/jnirs.874.
- [54] “Carotenoids: properties e bioprotective effects – Journal of BioProcess e Chemical Technology.” .
- [55] O. Abbas, G *et al.*, “Phenolic compound explorer : a mid-infrared spectroscopy database,” *Vib. Spectrosc.*, 2017, doi: 10.1016/j.vibspec.2017.05.008.
- [56] E. L. de Souza, T *et al.*, “Potential interactions among phenolic compounds and probiotics for mutual boosting of their health-promoting properties and food functionalities—A review,” *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 59, no. 10, pp. 1645–1659, 2019, doi: 10.1080/10408398.2018.1425285.
- [57] A. Hosikian, *et al.*, “Chlorophyll extraction from microalgae: A review on the process engineering aspects,” *Int. J. Chem. Eng.*, vol. 2010, 2010, doi: 10.1155/2010/391632.
- [58] L. Taiz e E. Zeiger. "*Fisiologia vegetal*". 5.ed. Porto Alegre:Artemed, 2013. 954p.
- [59] M. Hayes e B. K. Tiwari, “Bioactive carbohydrates and peptides in foods: An overview of sources, downstream processing steps and associated bioactivities,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 16, no. 9, pp. 22485–22508, 2015, doi: 10.3390/ijms160922485.
- [60] R. E. Aluko, “Bioactive carbohydrates,” *Second. Metab. Funct. Food Components Role Heal. Dis.*, pp. 197–222, 2018, doi: 10.1007/978-1-4614-3480-1_1.

- [61] S. Aryal. "Carbohydrates - Monosaccharides, Disaccharides, Polysaccharides." *Microbe Notes*. Junho, 2019.
- [62] B. Walther e R. Sieber, "Bioactive Proteins and Peptides in Foods," *Int. J. Vitam. Nutr. Res*, vol. 81, no. 3, pp. 181–191, 2011, doi: 10.1024/0300.
- [63] H. Korhonen, *et al.*, "Impact of processing on bioactive proteins and peptides," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 9, no. 8–9, pp. 307–319, 1998, doi: 10.1016/S0924-2244(98)00054-5.
- [64] D. H. Ngo *et al.*, "Angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides from antihypertensive skate (*Okamejei kenojei*) skin gelatin hydrolysate in spontaneously hypertensive rats," *Food Chem.*, vol. 174, pp. 37–43, 2015.
- [65] T. Matsui e K. Matsumoto, "Antihypertensive peptides from natural resources," *Adv. Phytomedicine*, vol. 2, pp. 255–271, 2006.
- [66] R. J. S. de Castro e H. H. Sato, "Biologically active peptides: Processes for their generation, purification and identification and applications as natural additives in the food and pharmaceutical industries," *Food Res. Int.*, vol. 74, pp. 185–198, 2015.
- [67] "Estrutura das proteínas." <https://www.preparaenem.com/quimica/estrutura-das-proteinas.htm> (acesso em Jan. 14, 2021).
- [68] Y. Yahia, *et al.*, "Bioactive compounds, antioxidant and antimicrobial activities of extracts from different plant parts of two *Ziziphus* Mill. species," *PLoS One*, vol. 15, no. 5, pp. 1–16, 2020, doi: 10.1371/journal.pone.0232599.
- [69] J. L. Aleixandre-Tudo e W. du Toit, "The Role of UV-Visible Spectroscopy for Phenolic Compounds Quantification in Winemaking," in *Frontiers and New Trends in the Science of Fermented Food and Beverages*, 2020, pp. 1–15.
- [70] L. E. Borissevitch, P. J. Gonçalves e F. A. Schaberle. *Fundamentos da espectroscopia de absorção óptica*, 1 ed., Editora Livraria da Física, 2016
- [71] E. Sehn, "Utilização da espectroscopia fotoacústica na determinação da propagação de formulações de uso tópico utilizadas para a cicatrização de feridas da pele de ratos", Universidade Estadual de Maringá, 2006.
- [72] L. M. Parron, H. de F. Muniz, e C. M. Pereira, "Manual de procedimentos de amostragem e análise físico-química de água.," *Embrapa Florestas-Documentos (INFOTECA-E)*, 2011.
- [73] O. Sala, *Fundamentos da espectroscopia raman e no infravermelho*. 2. Ed. [S.l.]:

- unesp, 2008.
- [74] T. G. M. Bonadio, “Estudos dos Compósitos TiO₂-Hidroxiapatita e Nb₂O₅-Hidroxiapatita: comportamento físico-mecânico, estrutural e de bioatividade”, Dissertação (Mestrado em Física) - Universidade Estadual de Maringá, 2011
- [75] B. C. Smith, *Fundamentals of Fourier transform infrared spectroscopy*. CRC press, 2 ed., 2011.
- [76] Antons Paar: Attenuated total reflectance (ATR). <https://wiki.anton-paar.com/tw-zh/attenuated-total-reflectance-atr/> . Acesso em 01/12/2021
- [77] F. F. Veiga, *et al.*, “Fusarium oxysporum is na onychomycosis etiopathogenic agent”. *Future Microbiol.* 2018.
- [78] F. Q. Ames, *et al.*, “Evidence of anti-inflammatory effect and percutaneous penetration of a topically applied fish oil preparation: a photoacoustic spectroscopy study,” *J. Biomed. Opt.* 22(5), 055003 (2017), doi: 10.1117/1.JBO.22.5.055003.
- [79] B. H. Vilsinski *et al.*, “Formulation of chloroaluminum phthalocyanine incorporated into PS-b-PAA diblock copolymer nanomicelles,” *J. Mol. Liq.*, vol. 271, pp. 949–958, 2018, doi: 10.1016/j.molliq.2018.09.034.
- [80] I.G.P. Occhi-Alexandre, *et al.*, “Evaluation of photosensitizer penetration into sound and decayed dentin: A photoacoustic study”. *Photodiagnosis and photodynamic Therapy*. 21 (2018) 108-114.
- [81] B. R. Saraiva, “Utilização de resíduo de cervejaria (*trub*) no enriquecimento proteico de gelado comestível.” *Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos*,. Maringá-PR, 2019.
- [82] B. R. Saraiva *et al.*, “Waste from brewing (*trub*) as a source of protein for the food industry,” *Int. J. Food Sci. Technol.*, vol. 54, no. 4, pp. 1247–1255, 2019, doi: 10.1111/ijfs.14101.
- [83] W. A. de Alvarenga, *et al.*, “Characterization of Compounds in the Plant *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reissek during the Initial and Adult Development Stage,” *European J. Med. Plants*, vol. 31, no. 12, pp. 61–71, 2020, doi: 10.9734/ejmp/2020/v31i1230304.
- [84] F. A. Anjo, “Caracterização de canistel (*Pouteria campechiana* (Kunth) Baehni) e sua influência nas propriedades tecnológicas de gelado comestível,” *Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em*

- Ciência de Alimentos (PPC/UEM)*. Maringá-PR, 2018.
- [85] A. C. Wisniewski, M. Â. L. de Almeida, M. B. Palma, e L. B. B. Tavares, "Produção de enzimas amilolíticas por *Macrocybe titans* em resíduo do processamento de cerveja," *Rev. Bras. Biociências*, vol. 8, no. 3, 2010.
- [86] W. Waldman, L. C. Oliveira, e C. D. Aldana, "Uma visão geral da valorização de subprodutos gerados na indústria cervejeira," *Rev. Virtual Química*, 2016.
- [87] D. Usoltsev, V. Sitnikova, A. Kajava, e M. Uspenskaya, "Systematic FTIR Spectroscopy Study of the Secondary Structure Changes in Human Serum Albumin under Various Denaturation Conditions," 2019, doi: 10.3390/biom9080359.
- [88] A. Adochitei e g. Drochioiu, "Rapid Characterization of peptide secondary structure by FT-IR spectroscopy," *Rev. Roum. Chim.*, no. August 2011, pp. 783–791, 2011.
- [89] B. R. Singh, D. B. Deoliveira, F. Fu, e M. P. Fuller, "Fourier transform infrared analysis of amide III bands of proteins for the secondary structure estimation," vol. 1890, 1993.
- [90] M. E. Karpen e K. E. Neet, "Differences in the amino acid distributions of 310-helices and α -helices," *Protein Sci.*, pp. 1333–1342, 1992.
- [91] R. M. Jorge, J. P. V Leite, A. B. Oliveira, e C. A. Tagliati, "Evaluation of antinociceptive , anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*," vol. 94, pp. 93–100, 2004, doi: 10.1016/j.jep.2004.04.019.
- [92] P. M. Ramos, J. M. Gil, M. C. R. Sánchez, M. N. Gracia, S. H. Navarro, e J. M. Gil, "Vibrational and thermal characterization of seeds, pulp, leaves and seed oil of *rosa rubiginosa*," vol. 51, no. 3, pp. 429–439, 2016.
- [93] B. Ribeiro e B. Ribeiro, "Attenuated total reflectance spectroscopy of plant leaves : a tool for ecological and botanical studies," 1998.
- [94] G. Gayathri e N. Campus, "Isolation And Characterization Of A Triterpenoid From The Leaves Of," vol. 7, no. 5, pp. 2090–2096, 2016, doi: 10.13040/IJPSR.0975-8232.7(5).2090-96.
- [95] K. Kitade, N. Katayama, e A. Kuwae, "FT-IR/ATR Spectral Analysis of Black Sesame Constituents," vol. 3, pp. 215–219.
- [96] H. E. Tahir, Z. Xiaobo, L. Zhihua, S. Jiyong, e X. Zhai, "Rapid prediction of phenolic compounds and antioxidant activity of Sudanese honey using Raman

- and Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy,” *Food Chem.*, 2017, doi: 10.1016/j.foodchem.2017.01.024.
- [97] H. Hasana, “Characterization and Quantification of Phenolic Compounds from Leaf of *Agarista salicifolia*,” *iMedPub Journals*, pp. 1–5, 2017, doi: 10.21767/2472-0151.100022.
- [98] T. A. Canassa, A. L. Lamonato, e A. V. Ribeiro, “Utilização da lei de Lambert-Beer para determinação da concentração de soluções,” *J. Exp. Tech. Instrum.*, vol. 1, no. 2, 2018.
- [99] S. K. Bhattacharyya *et al.*, “Development of a fast fiber based UV-Vis multiwavelength detector for an ultracentrifuge,” *Prog. Colloid Polym. Sci.*, vol. 131, pp. 9–22, 2006, doi: 10.1007/2882_002.
- [100] S. Vass, “Spatial correlation functions of radially distributed quantities applied to small-angle scattering,” *Acta Crystallogr. Sect. A Found. Crystallogr.*, vol. 54, no. 2, pp. 249–250, 1998, doi: 10.1107/S0108767397016693.
- [101] P. Wrolstad, Ronald E.; Acree, Terry E.; Decker, Eric A.; Penner, Michael H.; Reid, David S.; Schwartz, Steven J.; Shoemaker, Charles F.; Smith, Denise; Sporns, “Chlorophylls and Carotenoids : Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy,” *Curr. Protoc. Food Anal. Chem.*, pp. 1–8, 2001, doi: doi:10.1002/0471142913.faf0403s01.
- [102] D. Cvetkovic e D. Markovic, “Stability of carotenoids toward UV-irradiation in hexane solution Stability of carotenoids toward UV-irradiation in hexane solution,” no. September 2016, 2008, doi: 10.2298/JSC0801015C.
- [103] O. Matsuda, A. Tanaka, T. Fujita, e K. Iba, “Hyperspectral Imaging Techniques for Rapid Identification of Arabidopsis Mutants with Altered Leaf Pigment Status,” vol. 53, no. 6, pp. 1154–1170, 2012, doi: 10.1093/pcp/pcs043.
- [104] J. M. S. Lopes, S. G. C. Moreira, e N. M. B. Neto, “Selective Inner-Filter on the Fluorescence Response of Chlorophyll and Pheophytin Molecules Extracted from,” vol. 31, no. 1, pp. 162–169, 2020.
- [105] N. A. Welschmeyer, “Fluorometric analysis of chlorophyll a in the presence of chlorophyll b and pheopigments,” *Limnol. Oceanogr.*, vol. 39, no. 8, pp. 1985–1992, 1994.
- [106] T. Chlorophylls, N. M. Streit, e L. P. Canterle, “As Clorofilas,” pp. 748–755, 2005.
- [107] P. A. Marques, C. H. Callado, C. F. Barros, e C. G. Costa, “Variação

- intraespecífica do lenho de *Eugenia uniflora* L. em duas diferentes fitofisionomias do complexo vegetacional atlântico,” *Floresta e Ambient.*, vol. 19, no. 4, pp. 483–496, 2012.
- [108] W. Zheng, P. Wang, H. Zhang, e D. Zhou, “Photosynthetic characteristics of the cotyledon e first true leaf of castor (*Ricinus communis* L .),” vol. 5, no. 6, pp. 702–708, 2011.
- [109] J. H. G. de Oliveira, M. C. Iwazaki e D. M. T. Oliveira. "Morfologia das plântulas, anatomia e venação dos cotilédones e eófilos de três espécies de *Mimosa* (Fabaceae, Mimosoideae)". *Rodriguésia* 65(3): 777-789. 2014 <http://rodriguesia.jbrj.gov.br> . DOI: 10.1590/2175-7860201465315
- [110] K. Esau, *Anatomia das plantas com sementes*. Editora Blucher, 1974.
- [111] M. S. De Lanerolle, A. M. B. Priyadarshani, D. B. Sumithraarachchi, e E. R. Jansz, “The carotenoids of of *Pouteria campechiana* (sinhala: ratalawulu),” vol. 36, no. 1, 2008.
- [112] M. G. I. Galinato, D. Niedzwiedzki, C. Deal, R. R. Birge, e H. A. Frank, “Cation radicals of xanthophylls,” *Photosynth. Res.*, vol. 94, no. 1, pp. 67–78, 2007, doi: 10.1007/s11120-007-9218-5.
- [113] A. V. Ruban, A. A. Pascal, B. Robert, e P. Horton, “Configuration and dynamics of xanthophylls in light-harvesting antennae of higher plants: Spectroscopic analysis of isolated light-harvesting complex of photosystem II and thylakoid membranes,” *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 27, pp. 24862–24870, 2001, doi: 10.1074/jbc.M103263200.
- [114] M. Meinhardt-Wollweber, C. Suhr, A. K. Kniggendorf, e B. Roth, “Absorption and resonance Raman characteristics of β -carotene in water-ethanol mixtures, emulsion and hydrogel,” *AIP Adv.*, vol. 8, no. 5, 2018, doi: 10.1063/1.5025788.
- [115] N. Hidayah, S. N. Fitriansyah, D. L. Aulifa, S. Dewi, and W. Barkah, “Determination of Total Phenolic , Flavonoid Content and Antioxidant Activity of Campolay (*Pouteria campechiana* (Kunth) Baehni) Extract,” vol. 26, pp. 107–110, 2020.
- [116] S. Avital, V. Brumfeld, and S. Malkin, “A micellar model system for the role of zeaxanthin in the non-photochemical quenching process of photosynthesis — chlorophyll fluorescence quenching by the xanthophylls,” vol. 1757, pp. 798–810, 2006, doi: 10.1016/j.bbabbio.2006.05.038.

- [117] G. Ke, R. Litvín, D. Bína, M. Durchan, e Š. Václav, “Efficient light-harvesting using non-carbonyl carotenoids : Energy transfer dynamics in the VCP complex from *Nannochloropsis oceanica* Biochimica et Biophysica Acta Ef fi cient light-harvesting using non-carbonyl carotenoids : Energy transfer dynamics in t,” no. Dezembro, 2015, doi: 10.1016/j.bbabbio.2015.12.011.
- [118] “Beta-carotene.” <https://omlc.org/spectra/PhotochemCAD/html/041.html> (acesso em Dezembro. 30, 2020).
- [119] G. Britton, S. Liaaen-Jensen, and H. Pfander, *Carotenoids*. Washinton, USA: Springer Basel AG, 2004.