

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
Centro de Ciências Exatas e da Natureza  
Departamento de Química Fundamental  
Programa de Pós-Graduação em Química



**Maria de Jesus Lessa Santos**

**Classificação de mangas *Tommy Atkins*  $\gamma$ -irradiadas:  
Um modelo metabólico**

Recife  
2014

**Maria de Jesus Lessa Santos**

**Classificação de mangas *Tommy Atkins*  $\gamma$ -irradiadas:  
Um modelo metabolômico**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Química da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadores: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>a</sup> Daniela Ferraz  
Navarro  
Prof. Dr. Ricardo Oliveira  
da Silva

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup> Josenilda Maria da  
Silva

Recife  
2014

Catálogo na fonte  
Bibliotecária Joana D'Arc Leão Salvador CRB4-532

S237i Santos, Maria de Jesus Lessa.  
Classificação de mangas *Tommy Atkins*  $\lambda$ -irradiadas: um modelo  
metabolômico / Maria de Jesus Lessa Santos. – Recife: O Autor, 2014.  
100 f.: fig., tab., graf.

Orientadora: Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.  
CCEN. Química Fundamental, 2014.  
Inclui referências e apêndices.

1. Química analítica. 2. Manga. I. Navarro, Daniela Maria do Amaral  
Ferraz (Orientador). II. Título.

543 CDD (22. ed.) UFPE-FQ 2014-57

Dissertação submetida ao Corpo Docente do Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre em Química.

Aprovada:

---

**Prof<sup>a</sup>. Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro**  
(Orientadora)

**1.1. Departamento de Química Fundamental**  
**Universidade Federal de Pernambuco**

---

**Prof. Alexandre Ricardo Pereira Schuller**

**1.2. Departamento de Engenharia Química**  
**Universidade Federal de Pernambuco**

---

**Prof. Artur Campos Dália Maia**  
**Departamento de Química Fundamental**  
**Universidade Federal de Pernambuco**

**Classificação de mangas Tommy Atkins  $\lambda$  irradiadas:**  
**Um modelo metabólico**

**Por**

**Maria de Jesus Lessa Santos**

**Departamento de Química Fundamental**  
**Centro de Ciências Exatas e da Natureza**  
**Universidade Federal de Pernambuco**  
**Recife-PE-Brasil**  
**14 de Março de 2014**

*Dedico este trabalho a minha família  
e aos meus amigos, por todo incentivo  
e apoio que recebi durante o meu  
mestrado.*

## Agradecimentos

Como não poderia deixar de ser, o meu primeiro agradecimento é para Deus, por me dar forças para seguir sempre em frente, principalmente nos momentos em que pensei em desistir. Agradeço a Ele também por colocar na minha vida essas pessoas especiais, sem as quais eu não teria conseguido essa minha conquista.

A meus pais, Manoel e Piedade, por serem grandes exemplos de pais, meu infinito agradecimento, por sempre poder contar com vocês nos momentos mais importantes da minha vida.

A meu marido Isaac, e a minha filha Manuela, por todo amor e carinho que recebi de vocês. Obrigada pela paciência e desculpas pelas tantas ausências, mas vocês sabem que esse sacrifício foi em prol da nossa família. Eu os amo muito!

A minha irmã Márcia, a meu cunhado Edilberto, aos meus sobrinhos Amanda, Lucas, Vanessa, Vitor, a minha sogra Eulália e ao meu genro Igor. O apoio, o incentivo, o carinho e a torcida de vocês foi de fundamental importância para essa minha conquista.

Ao prof. Ricardo Oliveira da Silva, que, mesmo sem me conhecer, aceitou ser meu orientador. Obrigada pelo incentivo, dedicação e muita calma para comigo.

À prof<sup>a</sup>. Daniela M. do A. Ferraz Navarro, pela orientação na realização desse trabalho e por todo apoio necessário nas pesquisas realizadas no Laboratório de Ecologia Química.

À Dr<sup>a</sup> Josenilda Maria da Silva, que também participou na orientação para a realização deste trabalho. Ao seu apoio nas idas à Central de Abastecimento de Alimentos, ao Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste e ao Centro de Energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco.

Aos professores Oscar Malta, Ricardo longo, Fernando Hallwas e Fernanda Pimentel, pelas oportunidades de aprendizado que me foram oferecidas.

Aos professores Alexandre Schuler e Artur Maia, por aceitarem fazer parte da minha banca, contribuindo através de críticas e sugestões para melhoria deste trabalho.

Aos meus amigos do Colégio Militar do Recife, Alberes Lopes, Correia da Cunha, Maria José, Goretti, Silvânia, Fernando Ivo, Aberis, Wagner, Marcelo, Ronaldo Melo, Bernadete Ben, e, em especial, meus muitíssimo amigos Ana Paula e Aderivaldo Silva, que aguentaram todos os meus estágios emocionais durante o período do meu mestrado, obrigada pelas críticas, sugestões e apoio, não medindo esforços para me ajudar.

Meu agradecimento para aqueles que costumo chamá-los de antigos alunos, pois sei que torceram e acreditaram em mim: Rodrigo Lopes, Thais, Gabriela, Felipe Jardim, Ícaro, Caio Henrique, Rodrigo Mendes, Müller. E como não poderia deixar de ser, meu agradecimento especial a Bruno Soares, Érico Medeiros e Luyara, que além de antigos alunos, são grandes amigos. Obrigada pelo apoio e pelas muitas ajudas.

Aos meus amigos da sala F, Gustavo, Augusto, Adonias, Neirivaldo, Leandro, Everaldo, Guilherme, Thiago e Gilson, por todo apoio e incentivo. Um agradecimento especial a Alianda, Érika, Paulo e Pedro, pela amizade, incentivo e apoio.

Aos meus amigos do Laboratório de Ecologia Química, Camila, Bhia, Suyana, Kamila, Paloma, Paulo, Rayane, pelo apoio e incentivo. A Patrícia, Geanne e Marcelo, um agradecimento especial pela grande ajuda na extração dos voláteis das mangas, que não foram poucas, por todo apoio e incentivo.

A todos que fazem o Departamento de Química Fundamental, que, de alguma forma, muito me ajudaram, Patrícia, Maurílio, Mariza Lima, Eliete, Diego, Jadson e, em especial, Carlos Jonnatan, por sua grande ajuda no tratamento estatístico realizado nesta dissertação.

E, por fim, a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para esta dissertação tornar-se realidade.

OBRIGADA!

*“O êxito da vida não se mede pelo caminho que você conquistou, mas pelas dificuldades que superou no caminho”.*

Abraham Lincoln

## Resumo

Neste trabalho foram investigadas as composições dos voláteis a partir de mangas da cultivar *Tommy Atkins* expostas à radiação gama na dose de 0,5 kGy quando comparadas à composição de voláteis obtidos a partir de mangas que não passaram por este tratamento fitossanitário. O objetivo foi construir um modelo metabolômico para classificar as mangas através de modelo não invasivo. Foram analisadas 80 amostras classificadas com grau de maturação entre 4 e 5, segundo classificação da Embrapa. Os voláteis foram coletados após 18 dias de armazenamento sob temperatura de 12°C, usando um sistema *Headspace* Dinâmico (HD) e submetidos à corrida cromatográfica em fase gasosa seguida de detecção por espectrometria de massas (GC/MS). Os compostos foram identificados a partir da determinação do Índice de Retenção Van den Dool and Kratz e do espectro de massas, que foram comparados aos descritos na biblioteca de espectros do ADAMS. Foram identificados 16 compostos já mencionados na literatura e classificados como terpenos (mono e sesquiterpenos) e ésteres. Entre os terpenos, o  $\alpha$ -Pineno e o 3-Careno foram os majoritários tanto para as mangas irradiadas, como para as não irradiadas. Após a identificação dos mesmos, os cromatogramas foram utilizados para a construção de uma matriz para tratamento estatístico, o qual foi realizado utilizando a plataforma *online MetaboAnalyst 2.0* e o software “*R Program*”. As ferramentas de estatística multivariada utilizadas foram a PCA (Análise de Componentes Principais), PLS-DA (Análise Discriminante e Regressão por Mínimos Quadrados Parciais) e KNN (*K-nearest neighbor*). A PCA não apresentou um resultado satisfatório para a discriminação entre as mangas irradiadas e não irradiadas. Na PLS-DA, treze compostos foram responsáveis pela discriminação entre as mangas da cultivar *Tommy Atkins* irradiadas e não irradiadas, com destaque para o Octanoato de Etila, o  $\alpha$ -Felandreno e o Germacreno-D. O KNN também indicou que os teores de Octanoato de Etila,  $\alpha$ -Felandreno e Germacreno-D são responsáveis pela discriminação entre as mangas irradiadas e não irradiadas. No entanto, a acurácia observada na classificação utilizando KNN foi maior que a observada utilizando PLS-DA. No modelo construído com KNN, o teste de validação cruzada indicou acurácia igual a 81% contra 55% da observada para o modelo construído utilizando PLS-DA. Esse resultado garante um modelo metabolômico que

é capaz de classificar as amostras de mangas da cultivar *Tommy Atkins* que foram expostas, ou não, à radiação gama para fins fitossanitários.

**Palavras-chave:** Manga.Irradiação gama.Metabolômica.GC-MS.PLS-DA,KNN.

## Abstract

Herein, we investigated the changes in the composition of volatile compounds from *Tommy Atkins cultivar* mangoes exposed to gamma radiation at 0.5 kGy, in comparison to the volatile compounds obtained from mangoes that did not have a phytosanitary treatment, which does not use pesticides or toxic compounds. We built a metabolomics and non-invasive model to distinguish the mangoes by using 80 (eighty) samples of mangoes which had their maturation degree classified at four or five, according to Embrapa criteria. The volatile compounds were collected after eighteen days of storage, at 12°C, using Dynamic Headspace system, and were analyzed by Gas Chromatography and Mass Spectrometry (GC/MS). The compounds were identified by determination of Van den Dool and Kratz's Retention Index and mass spectrum and compared to the ones described in the – ADAMS' Library spectrum. Sixteen compounds, already mentioned in literature, were identified as terpenes (mono and sesquiterpenes) and esters. Among the terpenes,  $\alpha$ -Pinene and 3-Carene were the majority, both for the irradiated and non-irradiated mangoes. After the identification, the chromatograms were utilized to build a matrix which was used to statistic treatment on *MetaboAnalyst 2.0* and *R program* platforms. We used PCA, PLS-DA and KNN formalisms to build metabolomics model. PCA didn't discriminate the samples. PLS-DA indicated thirteen compounds which are discriminatory, especially Ethyl Octanoate,  $\alpha$ -Phellandrene and germacrene-D. Similar results were observed when using KNN formalism, however the accuracy using KNN formalism was greater than the observed when PLS-DA was used. In KNN model, the cross-validation showed 81% of accuracy *versus* 55% in PLS-DA model. Therefore, the metabolomics model was able to classify the samples of mangoes exposed or not to gamma radiation for phytosanitary aims.

Keywords: Metabolomics. Tommy Atkins Mangoes. gamma irradiation. GC/MS.KNN. PLS-DA.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Aspecto geral da cor da casca e polpa de manga da cultivar <i>Tommy Atkins</i> .	24
<b>Figura 2</b>	Modelo de irradiador de alimentos com fonte de $^{60}\text{Co}$ . Fonte: MDS Nordion, Canadá - Empresa fabricante de irradiadores.	27
<b>Figura 3</b>	Logotipo Internacional da Irradiação de Alimentos.	29
<b>Figura 4</b>	Aspecto externo de manga da cultivar <i>Tommy Atkins</i> em função do grau de maturação.	45
<b>Figura 5</b>	Seleção de manga da cultivar <i>Tommy Atinkns</i> para realização do experimento	46
<b>Figura 6</b>	Distribuição e embalagem de mangas da cultivar <i>Tommy Atkins</i> para realização do experimento.	46
<b>Figura 7</b>	Irradiador do tipo Gammacell com fonte de $^{60}\text{Co}$ , modelo 220 Excel_MDS da Nordilon do Departamento de Energia Nuclear (DEN) da UFPE.	47
<b>Figura 8</b>	Extração de voláteis de mangas da cultivar <i>Tommy Atkins</i> mediante o método de <i>Headspace</i> dinâmico.	48
<b>Figura 9</b>	Extrator em série de compostos voláteis para <i>headspace</i> dinâmico, construído no Laboratório de Ecologia Química do Departamento de Química Fundamental da UFPE.	51
<b>Figura 10</b>	Aparência externa de manga da cultivar <i>Tommy Atkins</i> no dia da extração. (A= mangas irradiadas; B= mangas não irradiadas).	53
<b>Figura 11</b>	Aparência interna de manga da cultivar <i>Tommy Atkins</i> no dia da extração. (superior = mangas irradiadas; inferior = mangas não irradiadas).	53
<b>Figura 12</b>	Perfil cromatográfico de manga da cultivar <i>Tommy Atkins</i> .	53
<b>Figura 13</b>	Espectro de massas do Octanoato de etila da literatura Adams	89

(superior) e da amostra (inferior).

<b>Figura 14</b>	Espectro de massas do Germacreno-D de etila da literatura Adams (superior) e da amostra (inferior).	90
<b>Figura 15</b>	Espectro de massas do $\alpha$ – Felandreno da literatura Adams (superior) e da amostra (inferior).	90
<b>Figura 16</b>	Espectro de massas do 3- Careno da literatura Adams (superior) e da amostra (inferior).	91
<b>Figura 17</b>	Espectro de massas do $\alpha$ – Pineno da literatura Adams (superior) e da amostra (inferior).	91
<b>Figura 18</b>	Espectro de massas do Butanoato de etila da literatura Adams (superior) e da amostra (inferior).	92
<b>Figura 19</b>	Espectro de massas do Canfeno da literatura Adams (superior) e da amostra (inferior).	92
<b>Figura 20</b>	Espectro de massas do $\beta$ – Pineno da literatura Adams (superior) e da amostra (inferior).	93
<b>Figura 21</b>	Espectro de massas do $\beta$ – Mirceno da literatura Adams (superior) e da amostra (inferior).	93
<b>Figura 22</b>	Espectro de massas do Hexanoato de etila da literatura Adams (superior) e da amostra (inferior).	94
<b>Figura 23</b>	Espectro de massas do $\alpha$ – Terpineno da literatura Adams (superior) e da amostra (inferior).	94
<b>Figura 24</b>	Espectro de massas do Limoneno da literatura Adams (superior) e da amostra (inferior).	95
<b>Figura 25</b>	Espectro de massas do $\gamma$ – Terpineno da literatura Adams (superior) e da amostra (inferior).	95
<b>Figura 26</b>	Espectro de massas do Isoterpinoleno da literatura Adams (superior) e da amostra (inferior).	96

<b>Figura 27</b>	Espectro de massas do Terpinoleno da literatura Adams (superior) e da amostra (inferior).	96
<b>Figura 28</b>	Espectro de massas do (E) Cariofileno da literatura Adams (superior) e da amostra (inferior).	97
<b>Figura 29</b>	Espectro de massa da manga Thommy Atkins controle (A) e irradiada (B) com o registro dos dois compostos majoritários 3-Careno (m) e $\alpha$ -Pineno (n).	58
<b>Figura 30</b>	Espectro de massa do octanoato de etila.	60
<b>Figura 31</b>	Mecanismo de fragmentação do íon molecular m/z para formação do íon m/z 127 .	60
<b>Figura 32</b>	Mecanismo proposto para formação do íon m/z 101 a partir do íon. Molecular.	61
<b>Figura 33</b>	Rearranjo McLafferty do íon molecular para a formação do íon m/z 88.	61
<b>Figura 34</b>	Fórmula estrutural do Germacreno-D.	61
<b>Figura 35</b>	Espectro de massa do Germacreno - D	62
<b>Figura 36</b>	Proposta para a fragmentação do Germacreno – D segundo modelo adaptado de Steliopoulos e Mosandi.	63
<b>Figura 37</b>	Formação do íon tropílio.	64
<b>Figura 38</b>	Proposta para a fragmentação dos íons m/z 133 e m/z 119, na obtenção dos íons m/z 105 e m/z 91.	64
<b>Figura 39</b>	Fórmula estrutural do $\alpha$ -Felandreno.	65
<b>Figura 40</b>	Espectro de massa do $\alpha$ -Felandreno.	65
<b>Figura 41</b>	Fragmentação do íon m/z 136 para a formação do íon m/z 93.	65
<b>Figura 42</b>	Formação do fragmento m/z 77 a partir do íon molecular.	66
<b>Figura 43</b>	Variação apresentada pelas PCs.	67
<b>Figura 44</b>	Gráfico de scores PC1 x PC2.	68

<b>Figura 45</b>	Gráfico de <i>scores</i> das três principais PCs apresentadas em 3D. O valor da variância está em parênteses.	69
<b>Figura 46</b>	Gráfico de <i>escores</i> das três variáveis latentes de manga da cultivar Tommy Atkins. Os valores das variâncias estão apresentados em parênteses.	70
<b>Figura 47</b>	Representação do número de componentes PLS-DA de acordo com $R^2$ , $Q^2$ e Acurácia. O asterisco vermelho mostra a acurácia com melhor resultado para o número de componentes	71
<b>Figura 48</b>	Principais compostos responsáveis pela discriminação entre grupos de mangas da cultivar <i>Tommy Atkins</i> irradiadas e não irradiadas identificados por PLS-DA.	72

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Quantidade de mangas produzidas por região no Brasil em 2012	22
<b>Tabela 2</b>	Identificação dos principais compostos voláteis encontrados em manga da cultivar Tommy Atkins após 18 dias de armazenamento sob temperatura de 12°C.	54
<b>Tabela 3</b>	Teste de hipótese múltiplas com valor crescente de $p$ .	74
<b>Tabela 4</b>	Acurácia da validação cruzada do KNN de mangas da cultivar Tommy Atkins	75
<b>Tabela 5</b>	Média e desvio padrão da área relativa do octanoato de etila, $\alpha$ -Felandreno e germacreno D mangas da cultivar Tommy Atkins	76

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b>	Exportações Brasileiras de Frutas Frescas no ano de 2010.	20
<b>Gráfico 2</b>	Frequência de monoterpenos nas amostras de mangas da cultivar Tommy Atkins.	53
<b>Gráfico 3</b>	Frequência de sesquiterpenos nas amostras de mangas da cultivar Tommy Atkins.	53
<b>Gráfico 4</b>	Frequência de ésteres nas amostras de mangas da cultivar Tommy Atkins	54

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AIEA</b>	Associação Internacional de Energia Atômica
<b>ANN</b>	Redes Neurais Artificiais
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>CE-MS</b>	Eletroforese Capilar acoplada a Espectrometria de Massas
<b>CENA</b>	Centro de Energia Nuclear na Agricultura
<b>CGEE</b>	Centro de Gestão e Estudos Estratégicos
<b>CNEN</b>	Comissão Nacional de Energia Nuclear
<b>CRCN-NE</b>	Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste
<b>CTEx</b>	Centro Tecnológico do Exército
<b>DEN</b>	Departamento de Energia Nuclear
<b>DIMS</b>	Espectrometria de Massas por Inserção Direta
<b>EDB</b>	1,2-dibromoetano
<b>FAO</b>	Food and Agriculture Organization
<b>FTIR</b>	Infravermelho com Transformada de Foürier
<b>GA</b>	Algoritmo Genético
<b>GC</b>	Cromatografia Gasosa
<b>GC-MS</b>	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
<b>Gy</b>	Gray
<b>HCA</b>	Análise de Agrupamentos Hierárquicos
<b>HPLC</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<b>HSD</b>	<i>Headspace</i> Dinâmico
<b>HSE</b>	<i>Headspace</i> Estático
<b>IBGE</b>	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.
<b>IBRAF</b>	Instituto Brasileiro de Frutas

<b>IPEN</b>	Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares
<b>ISPM</b>	<i>International Standards for Phytosanitary Measures</i>
<b>JECFI</b>	Comitê Misto de Peritos em Irradiação de Alimentos
<b>KNN</b>	Regra dos Vizinhos mais Próximos
<b>LC-MS</b>	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas
<b>LOOCV</b>	<i>Leave-one-out cross-validation</i>
<b>N-PLS</b>	Mínimos Quadrados Parciais não Lineares
<b>PCA</b>	Análise de Componentes Principal
<b>PCR</b>	Regressões em Componentes Principais
<b>PCs</b>	Componentes Principais
<b>PLS</b>	Regressão por Mínimos Quadrados Parciais
<b>PLS-DA</b>	Análise Discriminante com Calibração Multivariada por Mínimos Quadrados Parciais
<b>RMN</b>	Ressonância Magnética Nuclear
<b>SIMCA</b>	Modelagem Independente e Flexível por Analogia de Classe
<b>SPME</b>	Microextração em Fase Sólida
<b>UFPE</b>	Universidade Federal de Pernambuco
<b>VIP</b>	<i>Variable Importance in Projection</i>
<b>VSF</b>	Vale do São Francisco

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b>	<b>22</b>
<b>1.1 Manga</b>	<b>23</b>
<b>1.2 Aspectos Fitossanitários</b>	<b>25</b>
<b>1.3 Irradiação de Alimentos</b>	<b>26</b>
<b>1.4 Metabolômica e Metabonômica</b>	<b>31</b>
<b>1.5 Espectrometria de Massas e Cromatografia Gasosa</b>	<b>33</b>
<b>1.6 Perfil de compostos voláteis da manga</b>	<b>35</b>
<b>1.7 Headspace Dinâmico</b>	<b>37</b>
<b>1.8 Análise Multivariada</b>	<b>39</b>
<b>1.8.1 Análise de Componentes Principais –PCA</b>	<b>41</b>
<b>1.8.2 Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais – PLS-DA</b>	<b>42</b>
<b>1.8.3 K-Vizinhos mais Próximos – KNN</b>	<b>43</b>
<b>2. Objetivos</b>	<b>44</b>
<b>2.1 Objetivo Geral</b>	<b>44</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos</b>	<b>44</b>
<b>3. Materiais e Métodos</b>	<b>45</b>
<b>3.1 Preparação da amostra</b>	<b>45</b>
<b>3.2 Extração dos compostos voláteis de manga da cultivar <i>Tommy Atkins</i> pela técnica de headspace dinâmico</b>	<b>47</b>
<b>3.3 Análises Multivariadas</b>	<b>50</b>
<b>4. Resultados e Discussões</b>	<b>51</b>
<b>4.1 Extração dos compostos voláteis via headspace dinâmico</b>	<b>51</b>

<b>4.2 Aparência geral das mangas</b>	<b>52</b>
<b>4.3 Perfil cromatográfico dos compostos voláteis através do GC-MS</b>	<b>53</b>
<b>4.3.1 Identificação dos compostos voláteis através do índice de retenção</b>	<b>53</b>
<b>4.3.2 Identificação dos compostos voláteis através dos espectros de massas</b>	<b>59</b>
4.3.2.1 Octanoato de etila	59
4.3.2.2 Germacreno-D	61
4.3.2.3 $\alpha$ - Felandreno	65
<b>4.4 Análise Multivariada</b>	<b>66</b>
<b>4.4.1 PCA</b>	<b>66</b>
<b>4.4.2 PLS-DA</b>	<b>70</b>
<b>4.4.3 KNN</b>	<b>73</b>
<b>5. Conclusões</b>	<b>78</b>
<b>6. Perspectiva</b>	<b>79</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>80</b>
<b>Apêndice A - Espectros de massas dos compostos voláteis das amostras de mangas da cultivar <i>Tommy Atkins</i> irradiadas e não irradiadas com a literatura Adams</b>	<b>89</b>
<b>Apêndice B - Matriz transposta usada para tratamento estatístico</b>	<b>98</b>

## 1. Introdução

A manga é o nome popular do fruto da mangueira (*Mangifera indica* L.; Anacardiaceae), uma espécie tropical, nativa da Ásia, mais precisamente da Índia. É um fruto climatérico [1], bastante apreciado pelos consumidores, destacando-se por seu sabor e aroma agradáveis, aliado a um valor nutritivo [2]. As mangas são ricas em sais minerais e vitaminas e está entre os frutos tropicais de maior expressão econômica nos mercados brasileiro e internacional [2,3]. As variedades existentes no Brasil são oriundas da Ásia e da Flórida. Das provenientes da Flórida, a cultivar *Tommy Atkins* é a que mais se destaca como produto de exportação [4].

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de frutas, perdendo apenas para a China e a Índia [5] e também o sétimo produtor mundial de mangas, sendo a região Nordeste responsável por 66% da produção nacional em 2012. O principal pólo frutícola brasileiro é o de Petrolina (PE) – Juazeiro (BA). Essas duas cidades fazem parte do Submédio São Francisco que é uma das regiões do Vale do São Francisco (VSF) [6,7]. A Tabela 1 apresenta a produção de mangas por região no Brasil em 2012.

**Tabela 1:** Quantidade de mangas produzidas por região no Brasil em 2012.

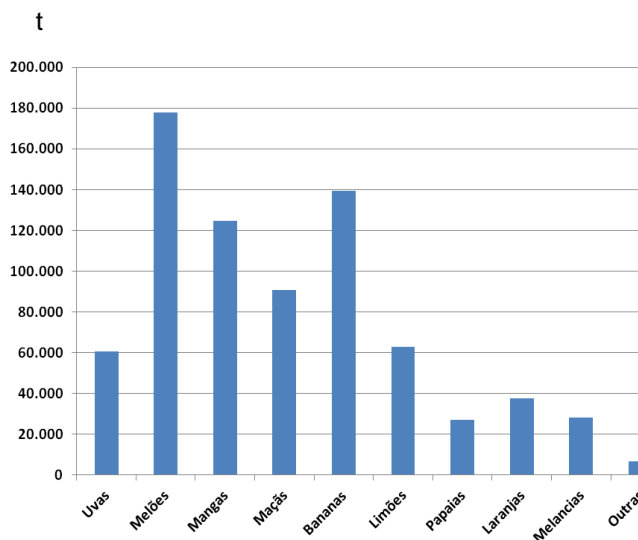
Região	Quant. (t)	%
Norte	2.132	0,2
Nordeste	782.365	66,5
Sudeste	377.819	32,1
Sul	9.674	0,8
Centro-oeste	3.745	0,3

Fonte: IBGE [8]

Entre outros fatores, o clima com baixa umidade do ar, que minimiza a incidência de fitopatologias, uma luminosidade superior a 12 horas por dia e uma temperatura média anual de aproximadamente 26°C, são fatores que favorecem a produção nordestina de mangas [9,10].

No submédio São Francisco, a comercialização de frutas é quase totalmente voltada ao mercado internacional, sendo 95% do produzido destinado à exportação, o que faz dessa região a maior exportadora de frutas brasileiras. Suas principais culturas são uva e manga. Ainda assim, o Brasil ocupa o décimo quinto lugar no ranking de exportação de frutas, o que pode ser explicado também pelo consumo do mercado interno [11].

Em 2010, a manga ocupou o terceiro lugar em exportação de frutas frescas, sendo exportados 124,7 t [12], o que representa 16,4% do total de frutas exportadas nesse ano (ver Gráfico1)



**Gráfico 1:** Exportações Brasileiras de Frutas Frescas no ano de 2010.

**Fonte :** Secex/Elaboração IBRAF em 12/01/2011 [12].

### 1.1. Manga

A manga é uma importante fonte de vitaminas A, B, C e E, e de nutrientes essenciais como cobre, potássio e aminoácidos [2,4,8]. É uma fruta climatérica com grande predisposição de acúmulo de reservas de amido [7]. Entre as frutas tropicais, é a responsável por quase 50% da produção mundial. As mangas são oriundas do Sul e Sudeste da Ásia [10].

O Brasil é o sétimo produtor mundial de mangas [6]. Em 2012, a produção brasileira foi de 1.175.735 toneladas. As maiores produções brasileira foram registradas nas regiões Nordeste e Sudeste, responsáveis por 66,5% e 32,1% da produção nacional, respectivamente. Destacam-se os estados da Bahia, Pernambuco, São Paulo e Minas Gerais como os principais produtores de mangas do país. [8].

Das mangas oferecidas no mercado, a cultivar *Tommy Atkins* é uma das mais comercializadas no mundo, principalmente nos Estados Unidos e na União Europeia [2]. Esta cultivar apresenta formato ovalado, superfície lisa, uma coloração laranja-

amarelado coberta com nuances de vermelho e púrpuro intenso além de polpa de coloração amarelo-escura (Figura 1).



Figura 1 – Aspecto geral da cor da casca e polpa de manga da cultivar *Tommy Atkins*.

No Brasil, a perda pós-colheita de frutos tropicais é da ordem de 30% [13]. Como todo fruto, a qualidade da manga pode ser comprometida por fatores como doenças, pragas e deficiências nutricionais, dependendo da cultivar, do grau de maturação e dos tratamentos utilizados na pré-colheita, colheita e pós-colheita [14].

A exportação de frutas tropicais, como a manga, por exemplo, requer tratamentos fitossanitários para atender o mercado externo [15]. Diversos tratamentos químicos ou físicos são utilizados após a colheita para retardar o amadurecimento e/ou infestações causadas por larvas de moscas [16]. No Brasil, o tratamento térmico (46°C, por 90 a 110 minutos) é o mais utilizado [15]. Esse tratamento é muito eficiente contra a infestação por larvas de moscas, pode porém acelerar, sem nenhum controle, o metabolismo do fruto, diminuindo o seu tempo de vida [16].

Exportadores brasileiros estão interessados no tratamento fitossanitário por radiação ionizante, devido à sua prevalência entre os países exportadores mundiais [15]. A Índia, um dos grandes produtores e exportadores de mangas, assinou um acordo com os Estados Unidos para exportar frutos irradiados. O México, que também exporta manga para os Estados Unidos, instalou uma unidade de cobalto para irradiá-las [17].

Essa tecnologia está regulamentada em termos internacionais e nacionais pelas disposições da Publicação nº18 de abril de 2003 da FAO [18] e da Resolução

RDC nº 21 de 26 de janeiro de 2001 da ANVISA [19]. Uma dose de até 10 kGy não apresenta riscos toxicológicos ou nutricionais em alimentos [5].

A vida de prateleira e comercialização das mangas, via de regra, não ultrapassam 3 (três) semanas, por causa da rápida maturação e degradação por microorganismos e insetos. A exposição das mangas a doses de radiação gama, além de eliminar larvas de insetos, retarda a maturação, aumentando assim o tempo de prateleira sem prejuízos à qualidade das mesmas. A radiação ionizante em alimentos é um tratamento bastante promissor na pós-colheita, pois tanto atua na desinfestação como também aumenta a vida útil dos frutos [5,16,20].

## **1.2. Aspectos Fitossanitários**

Frutos, em geral, fazem parte da alimentação humana sendo fontes importantes principalmente de vitaminas, sais minerais e carboidratos. Quando frutos, principalmente frutos climatéricos, são retirados da planta, os processos de modificação metabólica continuam para que o desenvolvimento das características sensoriais como adoçamento, coloração e textura continuem ocorrendo [11]. Em função disso, é necessário observar uma série de cuidados para que esses frutos sejam consumidos em tempo hábil e que sejam evitados casos de infestação e/ou contaminação dos mesmos, minimizando desperdícios.

Para exportar mangas, o produtor deve atender algumas exigências fitossanitárias, que por sua vez, exigem tratamentos específicos [12]. Para isso, são necessários procedimentos após a colheita, que podem ser químicos, como o uso de inseticidas, ou físicos, como o tratamento térmico, armazenamento a baixas temperaturas ou exposição à radiação.

Produtos químicos foram usados por um bom tempo no controle de larvas de moscas. Em 1984, nos EUA, o 1,2-dibromoetano (EDB), um composto primordialmente sintético, usado como inseticida químico, teve seu uso proibido devido a sérios problemas relacionados ao homem (seja ele trabalhador ou consumidor) e também a questões ambientais. Outro motivo que leva ao não uso de produtos químicos como inseticidas é o fato de os mesmos poderem modificar o metabolismo dos frutos de tal maneira que alteram a sua qualidade.

O tratamento térmico, que consiste na imersão dos frutos em água a temperaturas entre 40-45°C, embora eficiente contra a infestação de larvas de dípteros, pode ocasionar uma aceleração metabólica descontrolada, diminuindo o seu tempo de vida útil. Por outro lado, o tratamento de armazenamento a baixas temperaturas (em torno de 3°C) não é muito indicado para frutas tropicais, pois são muito sensíveis ao frio, podendo ocasionar manchas na casca ou ressecamento [11].

### **1.3 Irradiação de Alimentos**

A irradiação é um método alternativo para redução das perdas de alimentos que são causadas pela infestação de insetos em grãos ou leguminosas, como também em produtos de origem animal. Também serve como tratamento de quarentena para muitas frutas, legumes, nozes, e outros, a fim de facilitar o comércio internacional [16,20].

Para a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, órgão responsável pelo Regulamento Técnico para Irradiação de Alimentos no Brasil, a irradiação de alimentos é um processo de tratamento físico que consiste em submeter o alimento, embalado ou a granel, a doses controladas de radiação ionizante, com finalidades sanitárias, fitossanitárias e ou tecnológicas [19].

Radiações ionizantes são cuja energia desloca os elétrons dos átomos e moléculas sobre a qual incidem, transformando-os em íons [21]. Para a ANVISA, são consideradas radiações ionizantes apenas aquelas de energia inferior ao limiar das reações nucleares que poderiam induzir radioatividade no alimento.

Ainda para a ANVISA, qualquer alimento poderá ser tratado por irradiação, desde que sejam observadas as seguintes condições:

- ✓ A dose mínima absorvida deve ser suficiente para alcançar a finalidade pretendida;
- ✓ A dose máxima absorvida deve ser inferior àquela que comprometeria as propriedades funcionais e ou atributos sensoriais do alimento.

A Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN) é o órgão responsável pela autorização de radiação de alimentos. As fontes de radiação ionizante permitidas pela CNEN [19] são:

- ✓ Isótopos radioativos emissores de radiação gama, tendo os radionuclídeos  $^{60}\text{Co}$  ou  $^{137}\text{Cs}$ .
- ✓ Raios X gerados por máquinas que trabalham com energias de até 5 MeV;
- ✓ Elétrons acelerados, gerados por máquinas que trabalham com energias de até 10 MeV.

Os raios gama têm maior poder de penetração, que os elétrons acelerados, por isso os raios gama são os mais indicados para irradiação de alimentos frescos, como quarentena para frutas, e congelados. Embora o radionuclídeo  $^{137}\text{Cs}$  tenha meia-vida de 30 anos, não é o radionuclídeo mais utilizado como fonte de raios  $\gamma$ , pois não há quantidade comercial suficiente. Já para o radionuclídeo  $^{60}\text{Co}$ , mesmo tendo meia-vida de 5,3 anos, é o mais comumente utilizado, pois, além da maior disponibilidade, é sólido e insolúvel em água, garantindo uma maior segurança ambiental [21,22,23]. O Canadá é responsável por 80% da produção de  $^{60}\text{Co}$  disponível no mercado mundial. A Federação Russa, a República da China, a Índia e a África do Sul também fornecem  $^{60}\text{Co}$  [21]. Um modelo de irradiador de alimentos com fonte de  $^{60}\text{Co}$ , é mostrado na Figura 2.

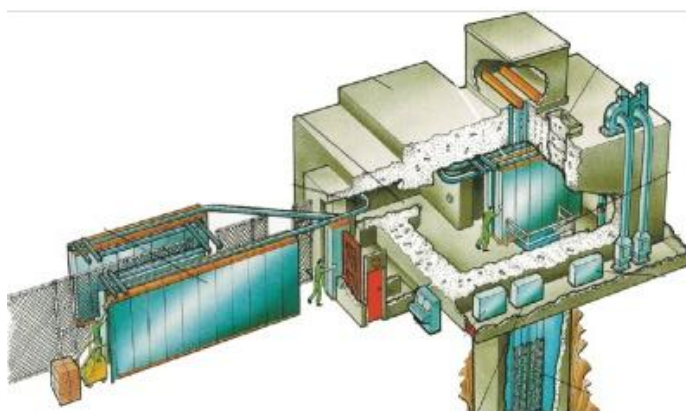


Figura 2 – Modelo de irradiador de alimentos com fonte de  $^{60}\text{Co}$ . Fonte: MDS Nordion, Canadá - Empresa fabricante de irradiadores [24].

A fonte de  $^{60}\text{Co}$  desses equipamentos é instalada num *bunker*, que é nada mais do que uma câmara de irradiação com paredes cujas blindagens são de concreto. Quando não está em uso, a fonte de  $^{60}\text{Co}$  fica armazenada numa piscina com água tratada, revestida no interior da blindagem com aço inox. Os alimentos que serão submetidos à irradiação, são colocados em *containers* e conduzidos através de monotrilhos para o interior da câmara de irradiação e recebem a

dosagem programada de radiação gama. Esse processo é controlado por operadores qualificados que fazem o controle e monitoramento eletrônico da fonte de radiação e do tratamento dos produtos através de um console localizado fora da câmara de irradiação [5].

A unidade de radiação é o Gray (Gy), que representa a quantidade de energia absorvida pelo sistema irradiado, e equivale a  $1 \text{ J.kg}^{-1}$  do material irradiado. De acordo com as doses aplicadas nas irradiações de alimentos os processos podem ser chamados de [15,21]:

- ✓ Radurização ou baixa dose ( $< 1 \text{ kGy}$ ) – usada para inibir brotamentos e desinfestação de insetos, e retardar o tempo de maturação de frutas;
  - ✓ Radiciação ou média dose ( $1 - 10 \text{ kGy}$ ) – usada para eliminar ou reduzir patógenos alimentares em carnes frescas, frutos do mar e ovos, por exemplo;
  - ✓ Radapertização ou Alta dose ( $> 10 \text{ kGy}$ ) – usada para fins de esterilização.
- Frutas e vegetais frescos se deterioram à altas doses de irradiação, não sendo recomendada essa prática. Porém, carnes e aves se mantêm com uma boa qualidade quando submetidos a doses dessa ordem de grandeza, desde que sejam tomadas algumas precauções como, por exemplo, utilizar temperatura entre  $-20^{\circ}\text{C}$  e  $-40^{\circ}\text{C}$ .

Segundo Bustos-Griffin et al [25], a publicação, em 2003, do “*Guideline for the use of irradiation as a phytosanitary measures*” pela *International Standards for Phytosanitary Measures –ISPM* [18] foi um passo decisivo para estabelecer o uso de irradiação como estratégia para superar barreiras fitossanitárias e facilitar, nesse aspecto, o comércio internacional de produtos agrícolas. Hoje, há pelo menos 60 países com uma estrutura regulamentar permitindo o uso de radiação em pelo menos um alimento. Frutas tropicais, como a manga e mamão, por exemplo, são bons candidatos no uso da irradiação para exportação [5].

Não encontramos nenhum estudo científico consistente, que indique que o consumo de alimentos ou uso de produtos da agropecuária e seus derivados, após passarem pelo processo de radiação, tenham causado algum risco para a saúde de consumidores. A radiação em alimentos, além de reduzir as perdas dos mesmos, reduz também à dependência de pesticidas químicos, alguns dos quais são extremamente nocivos para a saúde e o meio ambiente [5].

Em 1980, um Comitê Misto de Peritos em Irradiação de Alimentos (JECFI), junto com a Organização para Alimentação e Agricultura das Nações Unidas (FAO) e a Associação Internacional de Energia Atômica (AIEA), baseados nos resultados de estudos, afirmaram que qualquer alimento irradiado até 10 kGy não apresenta riscos toxicológicos ou nutricionais [5,18,19,26,27].

Isso é muito importante de ser dito, pois ainda há pessoas que acreditam que alimentos irradiados seja a mesma coisa que alimentos radioativos. O que precisa ficar esclarecido é que em nenhum momento durante o processo de irradiação, os alimentos entram em contato direto com a fonte radioativa. Essa rejeição diminui quando há esclarecimento de como é feito o processo de irradiação de alimentos [21].

Um logotipo internacional denominado “Radura” (Figura 3) foi criado para rotular produtos vendidos a granel para o consumidor final. O processo de radiação é conhecido como um processo limpo, isto é, não deixa resíduo, não deixando evidências físicas que o alimento foi irradiado. No Brasil, a resolução RDC nº 21, de janeiro de 2001, determina que os alimentos irradiados tenham em seu rótulo a frase: “ALIMENTO TRATADO POR PROCESSO DE IRRADIAÇÃO” [5,19,26].



Figura 3 – Logotipo Internacional da Irradiação de Alimentos [5]

As exigências dos mercados internacionais, como os Estados Unidos, Japão, China, dentre outros, conduzirão o Brasil ao uso cada vez mais frequente da irradiação de alimentos para fins fitossanitários. Se houver incentivos e facilidades de financiamentos para produtores de mangas e mamões, os tratamentos convencionais deverão ser substituídos pelo tratamento por irradiação [5].

Segundo estudo da Cadeia de Suprimento do Programa Nuclear Brasileiro, realizado pelo Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (CGEE) [5], em 2010, no Brasil há cinco organizações que irradiam alimentos, inclusive frutas. São elas:

- CBE Embrarad: possui duas unidades de processamento. Uma na cidade de Cotia (SP) com dois irradiadores. E outra, na cidade de Jarinu (SP).
- Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares: IPEN – CNEN/SP.
- Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP): Localizado em Piracicaba.
- Aceletron Irradiação Industrial: Localizada na Avenida Brasil, em Inajá-RJ.
- Centro Tecnológico do Exército (CTEx) : Localizado no Rio de Janeiro.

Além de ser uma alternativa aos inseticidas, que tem se mostrados agressivos ao meio ambiente, outras vantagens estão associadas ao uso de radiação ionizante com fins fitossanitários:

- É economicamente viável para grandes e pequenas quantidades de produtos;
- É um dos processos mais rápidos de esterilização existentes na atualidade;
- Possui alto poder de penetração, podendo assim o processo ser realizado na embalagem final do produto;
- Não há necessidade do manuseio dos produtos, pois é um processo totalmente automatizado;
- Não é necessário quarentena ou tratamento pós-esterilização, permitindo assim, o uso dos materiais após o término do processo, pois não deixa resíduos, sendo assim um processo de esterilização de menos agressivo ao meio ambiente.

#### 1.4 Metabolômica e Metabonômica

Metaboloma é o conjunto de todas as moléculas de baixa massa molecular (metabólitos), que participam das reações metabólicas celulares são necessárias ao crescimento, manutenção e funcionamento normal de uma célula, seja ela animal ou vegetal [28,29]. A magnitude do metaboloma depende do organismo em estudo. A levedura do pão e da cerveja *Saccharomyces cerevisiae*, por exemplo, contém aproximadamente 600 metabólitos, enquanto células da maior parte das plantas têm aproximadamente 200.000 metabólitos primários e secundários e o metaboloma humano pode vir a ser ainda maior em magnitude [28,30].

Dois grupos de substâncias constituem o metaboloma: metabólitos primários, relacionados aos processos de crescimento, desenvolvimento e rendimento agrícola; e metabólitos secundários, relacionados com o aroma, as cores dos alimentos e com a resistência contra pragas e doenças [31].

Quando comparado com a proteoma (arranjos de 20 aminoácidos) e transcriptoma (arranjos de 4 bases nucleotídicas ligadas com açúcar e grupos fosfatos), o metaboloma oferece infinitas possibilidades de combinações [28,31]. O conjunto de técnicas voltadas para descrever qualitativa e quantitativamente todos os metabólitos (primários e secundários) presentes em um organismo é denominado de metabolômica [28,30]. Entre as tecnologias “ômicas”, a metabolômica é a mais recente [32]. Representa uma análise não específica que abrange a maioria dos metabólitos de um sistema biológico. Em outras palavras, a análise metabolômica intenciona fornecer informações sobre as concentrações absolutas de todos os metabólitos possíveis de serem extraídos em uma amostra (quantificação absoluta), ajudando a tornar os dados comparáveis [33].

A metabolômica está intimamente relacionada com a metabonômica [34]. A metabonômica é definida como a medida quantitativa da resposta metabólica multiparamétrica e dinâmica dos seres vivos a estímulos fisiopatológicos ou modificação genética [28,34]. Embora na prática os termos sejam tratados como sinônimos, a metabonômica é às vezes tratada separadamente na pesquisa metabolômica [33]. A discriminação entre a metabolômica e a metabonômica consiste em parte no fato de que a metabonômica não trata da identificação de sinais individuais, buscando identificar uma resposta metabólica de uma célula ou

organismo [35], a uma ação externa, enquanto a metabolômica visa à identificação dos metabólitos responsáveis pela discriminação de grupos com status bioquímico diferentes.

Embora nos últimos anos vários trabalhos em metabolômica ou em metabonômica deem mais ênfase a aplicações clínicas ou farmacêuticas, na avaliação de medicamento e na toxicologia clínica, a metabolômica também tem recebido interesse crescente dos cientistas nas áreas de alimentos e nutrição [32]. Diversos estudos metabolômicos foram feitos usando alimentos, como por exemplo, suco de melão [36], uva [37], milho [38,39], soja [40], tomate [41] e bebidas, como cerveja [42].

Para Koek *et al.* [33], as estratégias analíticas para investigação metabólica são as seguintes:

- **Análise de Metabólitos:** Determinação quantitativa (absoluta ou relativa) de um ou mais metabólitos específicos. Tipicamente, essa determinação envolve tratamento prévio e seletivo da amostra seguido de separação cromatográfica (GC ou HPLC) acoplada a um sistema de detecção sensível como espectrometria de massas, por exemplo.
- **Perfil Metabólito:** Determinação qualitativa (identificação) e quantitativa (absoluta ou relativa) de vários componentes a partir do metaboloma, buscando definir ou associar padrões metabólicos em função do status bioquímico da amostra. Em geral, exige-se tratamento prévio para introdução da amostra no sistema cromatográfico, se for o caso, seguida de detecção por espectrometria de massas.
- **Impressão Digital Metabólica:** Neste caso, busca-se a identificação de um perfil que esteja associado ao status bioquímico da amostra, sem a necessidade de identificação individual dos metabólitos. Geralmente, não há quantificação ou apenas quantificação relativa. Como não há necessidade de identificação individual, normalmente as técnicas cromatográficas são dispensadas e são utilizadas diretamente as técnicas espectrométricas, como espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) ou espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), ou ainda a espectrometria de massas por inserção direta (DIMS).

Para a identificação e quantificação dos metabólitos é preciso uma instrumentação sofisticada, tal como Espectrometria de Massa (MS) e Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). A técnica de metabolômica baseada em RMN é altamente seletiva e não destrutiva, porém apresenta baixa sensibilidade. No caso da espectrometria de massas, ocorre uma excelente combinação de seletividade e sensibilidade, aspectos indispensáveis para a identificação e quantificação dos metabólitos [43,44].

### **1.5 Espectrometria de Massas e Cromatografia Gasosa**

A espectrometria de massas é uma ferramenta analítica baseada na detecção da razão massa-carga ( $m/z$ ) das espécies (íon ou íon-radical). Os íons analisados são oriundos de uma fonte de ionização sobre a molécula ionizada, que gera esses íons na fase gasosa a partir de moléculas neutras. Os íons são então encaminhados para o analisador onde são detectados a partir de sua razão  $m/z$ . Em seguida, são contados pelo detector e o sinal é registrado e processado, gerando o espectro de massas – um gráfico do número de íons detectados como uma função de sua razão  $m/z$  mostrando a distribuição das espécies e suas abundâncias relativas. As fragmentações são próprias da estrutura química de cada composto, gerando um espectro de massas próprio, empregado como uma “impressão digital” do composto estudado [31,44,45,46]. Portanto, a cromatografia acoplada à espectrometria de massas fornece dois parâmetros que podem ser utilizados para a identificação do analito, que são o próprio espectro de massas e o tempo de retenção do composto que permite a obtenção do índice de retenção. Por definição, o índice de retenção para um alcano de cadeia normal é igual a 100 vezes o número de carbonos no composto, independentemente do tipo da coluna, da temperatura e de outras condições cromatográficas, o que não acontece com outros compostos, pois os índices de retenção variam por centenas de unidades com as variáveis da coluna [47]. Uma das maneiras de se determinar o índice de retenção de um composto, é a partir de um cromatograma de uma mistura de um composto com uma série homóloga de pelo menos dois alcanos de cadeia normal como padrões, sob as mesmas condições cromatográficas [47]. O cálculo do índice de retenção pode ser

feito pelo Índice de Kovats (sem mudança de temperatura) ou pelo Índice de *Van den Dool and Kratz* (com programação de temperatura).

Entre as ferramentas analíticas citadas, a espectrometria de massas talvez seja a mais aplicada, devido às informações que se pode obter sobre as estruturas de moléculas inorgânicas, orgânicas e biológicas, como também a composição qualitativa e quantitativa de misturas complexas [47]. A primeira aplicação da técnica de espectrometria de massa foi no início dos anos de 1940 pela indústria de petróleo. A partir dos anos de 1950, com o aperfeiçoamento dos espectrômetros de massas comerciais, vários compostos orgânicos foram identificados e suas estruturas elucidadas. A continuação da aplicação de espectrometria de massas, fez com que a década de 1980 testemunhasse novos métodos para produzir íons a partir de moléculas termicamente lábeis ou não voláteis. Atualmente estruturas com altas massas molares como polipeptídeos, proteínas e outros biopolímeros, estão sendo determinados através da espectrometria de massas [47].

A espectrometria de massas é um eficiente método de identificação de compostos, mas não de separação. Para as análises de misturas, que evidentemente necessitam de uma separação prévia, as técnicas hifenizadas como cromatografia gasosa-espectrometria de massas (GC-MS), cromatografia líquida-espectrometria de massas (LC-MS) e eletroforese capilar-espectrometria de massas (CE-MS) são geralmente preferidas por permitir a identificação e quantificação dos metabólitos individualmente.[31,32].

Para a IUPAC (1993), cromatografia é um método físico de separação em que os componentes a serem separados são distribuídos entre duas fases, uma estacionária, e outra que se move numa direção definida [48]. A cromatografia está entre os métodos modernos de análise, que associadas a técnicas como a espectrometria de massas e espectrofotometria, possibilitam além de separar os constituintes da mistura, identificá-los e quantificá-los com segurança [49].

A cromatografia gasosa foi introduzida nos anos de 1950 tendo grande aceitação para análises de compostos orgânicos voláteis [50]. É uma técnica de separação por distribuição mássica (partição ou adsorção) dos componentes de uma amostra vaporizada que ocorre em uma coluna que contém a fase estacionária (sólida ou líquida) e a fase móvel (gás). Essa técnica é baseada na vaporização e inserção da amostra na coluna cromatográfica, seguida de uma

eluição por um fluxo de um gás de arraste, quimicamente inerte. Durante a eluição, os analitos são retidos por um determinado tempo na coluna, e no final da coluna são detectados em tempos diferentes e enviados a um sistema de dados gerando um gráfico denominado cromatograma [50,51]. Devido a sua excelência como técnica quantitativa, além de sua sensibilidade, a técnica torna possível a obtenção de resultados que variam entre picogramas a miligramas [48,51]. O uso do GC-MS é uma excelente solução para análises de misturas complexas e tem sido amplamente utilizada na metabolômica [44]. Voláteis e metabólitos termoestáveis polares e apolares são identificados ou confirmados pela comparação dos Índices de Retenção (IRs) dos compostos e a interpretação do espectro de massas, ou ainda utilizando padrões de referência [52].

A análise de metabólitos usando a técnica de GC-MS foi usada nesse trabalho, uma vez que o objetivo foi identificar e quantificar um determinado metabólito ou um conjunto de metabólitos que possam discriminar amostras de mangas que foram expostas à radiação gama daquelas que não passaram por esse processo.

## **1.6 Perfil de Compostos Voláteis da Manga**

A aceitação dos produtos alimentícios no mercado depende de sua qualidade, sendo o aroma como um dos principais atributos na escolha e consumo do alimento [53]. Estão associados ao aroma estado de conservação adequado dos alimentos, estágio de maturação de frutas e hortaliças e perdas nutricionais decorrentes da degradação térmica [54].

O aroma e sabor característico são conferidos aos alimentos pela presença de compostos voláteis [55], que chegam aos receptores olfativos, inicialmente pelas narinas (aroma) e, depois que o alimento é colocado na boca, pela cavidade retronasal (sabor) [56].

O aroma de frutas é constituído por compostos voláteis de baixa massa molecular (MM) e de baixa polaridade [57]. pertencentes a diversas classes químicas como: ácidos carboxílicos, aldeídos, ésteres, lactonas, álcoois e éteres de cadeias alquílicas curtas, terpenos (principalmente mono e sesquiterpenos) e ainda, em menor escala, compostos aminados e sulfurados. A concentração desses

compostos é geralmente expressa em microgramas por litro ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ), podendo ser afetado por fatores agronômicos (variedades, condições climáticas, estágio de maturação) e tecnológicos (colheita, pós-colheita, tratamentos, condições de armazenamentos e processamentos) [46,57,58,59].

Os primeiros estudos sobre constituintes voláteis em mangas foram desenvolvidos em cultivares da Índia [51]. Desde então, diversas pesquisas vem sendo realizadas com o intuito de identificar os voláteis em mangas em diversas partes do mundo. Pela sua complexa composição química, mais de 300 compostos voláteis pertencentes as mais variadas classes já foram identificados em mangas [58].

Mono e sesquiterpenoides representam entre 16–90% dos compostos voláteis em mangas, ficando os demais compostos responsáveis pelos odores peculiares ao aroma de cada cultivar [57,60], caracterizando assim as mangas conforme sua origem [55]:

- Ásia: ésteres, furanonas e lactonas.
- África: compostos glicolisados como, monoterpenos oxigenados, ésteres, aldeídos e norisoprenoides.
- Américas: terpenos, com destaque para o  $\delta$ -3-careno.

Quinze cultivares brasileiras foram analisadas por GC/MS resultando na formação de três grupos, classificados de acordo com o composto majoritário, ficando assim distribuído [58]:

- $\alpha$ -Terpinoleno: Cheiro, Chana, Bacuri, Cametá, Gojoba, Carlota, Coquinho e Comum.
- $\delta$ -3-Careno: *Tommy Atkins*, *Haden* e *Keit*.
- Mirceno: Cavalo, Rosa, Espada, Paulista.

Segundo Lebrun *et al* [61], a principal classe de compostos em mangas são os hidrocarbonetos terpenólicos, sendo o  $\delta$ -3-Careno o composto majoritário na maioria das cultivares de manga, junto com o limoneno,  $\beta$ -ocimeno, mirceno e  $\alpha$ -terpinoleno.

Os terpenos são constituídos por sucessivas unidades de isopreno (2-metil-but-1,3-dieno), cuja fórmula molecular é  $C_5H_8$ . De acordo com o número de unidades de isopreno, os mesmos são classificados como: monoterpenos (formados por duas unidades –  $C_{10}H_{16}$ ); sesquiterpenos (por 3 unidades –  $C_{15}H_{24}$ ); diterpenos (por 4 unidades –  $C_{20}H_{32}$ ); triterpenos (por 6 unidades –  $C_{30}H_{48}$ ); tetraterpenos (por 8 unidades –  $C_{40}H_{64}$ ); e os politerpenos (formados por mais de 8 unidades) [62]

Segundo Canuto *et al* [58], em três estádios de maturação da cultivar *Tommy Atkins*, dezesseis componentes representam a constituição volátil básica dessa variedade:  $\alpha$  e  $\beta$ -pineno,  $\beta$ -mirceno, 3-careno,  $\alpha$ -terpineno, *p*-cimeno, D-limoneno,  $\beta$ -ocimeno,  $\gamma$ -terpineno,  $\alpha$ -terpinoleno,  $\alpha$ -copaeno,  $\alpha$ -gurjuneno, *trans*- $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -cariofileno,  $\beta$ -selineno, além de um composto que não foi identificado.

Ainda para Canuto *et al* [58], o aroma desenvolvido pelos frutos ao longo do amadurecimento de manga da cultivar *Tommy Atkins* mostrou que monoterpenos são os constituintes mais abundantes e que a presença de ésteres etílicos e etanol estão associados à maturação. Os autores ainda afirmam que os compostos, metacrilato de etila, limonen-4-ol, *p*-cimen-8-ol, eucarvona,  $\gamma$ -elemeno e  $\alpha$ -amorfeno, foram relatados pela primeira vez como componentes do aroma de manga da cultivar *Tommy Atkins*.

## 1.7 Headspace Dinâmico

A técnica de *headspace* foi desenvolvida pelo perfumista suíço Roman Kaiser nos anos de 1970. Usada por perfumistas do mundo inteiro com o objetivo de extrair compostos que compõe os aromas de plantas tropicais, para depois reproduzi a partir de compostos sintéticos similares [63].

O termo “headspace” é usado para designar a fase gasosa imediatamente acima da fase sólida ou líquida, armazenada em recipiente hermeticamente fechado [64], ou expressão adaptada para a fase gasosa em equilíbrio com a matriz [53].

A análise por *headspace* não depende da concentração e da pressão de vapor dos compostos voláteis presentes, mas de todos os componentes da matriz que exercem influência na estabilidade e liberação dos compostos responsáveis pelo aroma [53]. A principal característica do *headspace* é a possibilidade da

determinação de componentes voláteis da amostra a ser analisada de forma direta. Isto a torna muito eficiente, pois possibilita a introdução da amostra no cromatógrafo a gás sem pré-tratamento [65].

A técnica de análise por *headspace* é muito utilizada na pré-concentração de compostos voláteis em baixas concentrações [66]. É uma técnica excelente e sensível, e vem oferecendo resultados significativos e reprodutíveis [53]. Nessa técnica, o analito, por ser necessariamente mais volátil que a matriz, volatiliza preferencialmente, podendo ser determinado sem os interferentes dos outros componentes da amostra, através da análise do vapor desprendido do analito [65].

A análise por *headspace* é geralmente definida como a extração da fase gasosa, envolvendo a partição dos constituintes voláteis entre a matriz e a fase gasosa [67]. Pode-se dizer que existem dois tipos gerais de análise por *headspace*: *headspace* estático e *headspace* dinâmico.

Na análise por *headspace* estático, a amostra (sólida ou líquida) é confinada em um recipiente fechado podendo ser submetida a aquecimento ou não para que entre em equilíbrio com seu vapor. Esta análise requer um controle rigoroso da temperatura, para que seja mantido o equilíbrio entre as fases do sistema. A concentração do analito é mantida nas diferentes fases com o passar do tempo [64,67]. Uma desvantagem apresentada por essa técnica é que a vaporização não é completa, pois quando o equilíbrio líquido-vapor é atingido, não há incremento na concentração dos voláteis. A pressão de vapor do analito mais volátil inibe a vaporização do menos volátil [68].

Na análise por *headspace* dinâmico, a extração dos voláteis da matriz é contínua [66]. Na verdade é uma associação do *headspace* com outra técnica de amostragem denominada *purge & trap* (purgar e aprisionar) [68]. A passagem de um gás inerte remove os voláteis da matriz de forma contínua, alterando assim a todo instante o equilíbrio e a composição da fase gasosa durante a extração [67].

A coleta contínua dos compostos voláteis, realizada a vácuo, é uma das vantagens dessa técnica. Outras vantagens são: pouco manuseio necessário; isolamento e enriquecimento dos voláteis em temperatura ambiente; estudos qualitativos e quantitativos são permitidos; sensibilidade para compostos de alta volatilidade e baixo custo [50,64]. Embora a análise por *headspace* dinâmico não

seja muito sensível aos compostos de baixa e média volatilidade, em comparação com *headspace* estático apresenta uma maior sensibilidade para esses compostos [67].

O favorecimento em concentrar os voláteis orgânicos, faz com que a extração de compostos voláteis por adsorção em sólidos seja bastante usada. Três tipos básicos de adsorventes são usados para esse tipo de extração: substâncias inorgânicas, carvão adsorvente (Carbopack) e polímeros orgânicos adsorventes (Tenax) [69].

O óxido 2,6-difenil-p-fenileno conhecido como Tenax<sup>®</sup> TA é um polímero orgânico poroso usado para capturar voláteis e semivoláteis de matrizes sólidas ou líquidas. É termicamente estável, apresenta baixa afinidade por água e baixo nível de impurezas [68,69,70]. O Tenax<sup>®</sup> TA apresenta a desvantagem de ter uma pequena capacidade de adsorção de compostos muito voláteis (<C<sub>7</sub>), ou polares. Adsorventes a base de carbono (Carbopack), têm um maior poder adsorptivo para compostos muito voláteis quando comparados com os polímeros orgânicos, por isso estão entre as melhores opções na remoção de compostos voláteis [68]. São geralmente não porosos, hidrofóbicos, de baixo custo e possuem grande eficácia na remoção de compostos com massa molar entre 45 a 130 g mol<sup>-1</sup>, que é a faixa da maioria dos compostos odorantes [71,72].

## 1.8 Análise Multivariada

A Quimiometria pode ser definida como a parte da química que aplica métodos matemáticos e estatísticos para definir ou escolher as melhores condições para realização de um experimento ou obter uma maior quantidade de informação e melhores resultados analíticos a partir de um conjunto de dados [73].

Segundo Barros Neto *et al* [74], foi na primeira metade da década de 1970 que a quimiometria começou formalmente, porém, somente quando o computador passou a ser utilizado em laboratório como componente de instrumento de medição, que se deu sua consolidação definitiva. Ainda segundo esses autores, as três áreas da quimiometria que se consolidaram no Brasil foram: planejamento e otimização de experimentos; reconhecimentos de padrões e calibração multivariada.

No planejamento e otimização de experimentos, o objetivo é encontrar quais variáveis exercem maior influência sobre um determinado processo e a relação entre elas. No Reconhecimento de Padrão (PR), uma certa quantidade de objetos químicos (como espectros ou cromatogramas), são descritos por uma determinada quantidade de variáveis (por exemplo, altura de picos de perfis cromatográficos). Na Calibração Multivariada é necessário construir um modelo de calibração que relacione uma série de medidas, como por exemplo, químicas ou espectrais, realizadas em amostras com uma determinada propriedade, como concentração por exemplo [73,74].

Duas aplicações importantes dos métodos de Reconhecimento de Padrões são: a Análise Exploratória de Dados e a Classificação de Amostras. A Análise Exploratória de Dados tem como objetivos: 1) procurar localizar padrões de combinações no conjunto de dados; 2) associar relações entre objetos e variáveis; 3) detectar amostras anômalas ou 4) agrupar amostras. Os dois métodos de análise exploratória mais usados são a Análise de Componentes Principal (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) e Análise de Agrupamentos Hierárquico (HCA, do inglês *Hierarchical Cluster Analysis*) [74,75].

Outra aplicação dos métodos de Reconhecimento de Padrões é a Classificação de Amostras, que tem sua aplicação em um conjunto de amostras cujas propriedades e medidas são conhecidas. Os métodos mais comuns utilizados na química são a Regra dos Vizinhos mais Próximos – KNN (*K-Nearest Neighbor*), Modelagem Independente e Flexível por Analogia de Classe (SIMCA, do inglês *Soft Independent Modeling by Class Analogy*) [74], e a Análise Discriminante com Calibração Multivariada por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA, do inglês *Partial least squares Discriminant Analysis*), que é utilizada para aumentar a separação entre os grupos de observações [34].

No método de Calibração Variada, é preciso construir um modelo de calibração (criar uma relação entre propriedades medidas e concentrações, por exemplo). Os métodos mais utilizados são: Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS - *Partial Least Squares*), Regressões em Componentes Principais (PCR), Algoritmo Genético (GA), as Redes Neurais Artificiais (ANN) e os Mínimos Quadrados Parciais Não Lineares (N-PLS) [74].

Como já mencionado no item 1.4, a metabolômica visa identificar metabólitos responsáveis pela discriminação de grupos com *status* bioquímicos diferentes, por isso se faz necessário o uso de análises multivariadas através de tratamentos quimiométricos. Os formalismos multivariados utilizados neste trabalho, foram: PCA, PLS –DA e KNN.

### 1.8.1 Análise de Componentes Principais (PCA)

Um dos mais importante métodos utilizado na quimiometria [75], a PCA visa diminuir a dimensionalidade do conjunto de dados original, mantendo a maior quantidade de informações (variância) possível. Isso acontece através da formação de novas variáveis, em um novo sistema de eixo denominadas de Componentes Principais (PCs), que são ortogonais entre si. Cada PC é uma combinação linear das variáveis originais e os coeficientes dessa combinação são denominados pesos ou *loading* [74,75,76]. Os eixos das PCs são calculados em ordem decrescente de importância. Isto quer dizer a PC1 é traçada no sentido da maior parte da variância do conjunto de dados, a PC2 é traçada ortogonalmente em relação a PC1, apresentando a maior variância não explicada pela PC1, a PC3 é traçada ortogonalmente em relação as PC1 e PC2, e assim sucessivamente [29,74,75].

É possível projetar em gráficos bi ou tridimensionais os escores alcançados por cada amostra nas PCs ou o pesos de cada variável nas PCs. Com isso, pode-se investigar a formação de grupos, detectar amostras anômalas (*outlier*) e determinar quais variáveis são mais importantes para as diferenças observadas [29,77]. A PCA é também um método não supervisionado, ou seja, não utiliza as informações acerca da classe das amostras. Mas é muito sensível a *outliers*, o que é interessante pois pode auxiliar na seleção de amostras a ser utilizada quando da utilização de métodos supervisionados de análise, como o PLS-DA, pois a normalização de dados e remoção de *outliers* são necessários para o obtenção de bons resultados [77].

### 1.8.2 Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais – PLS-DA

De um modo geral, a PCA precede a PLS-DA, que é a ferramenta de estatística multivariada supervisionada mais empregada em trabalhos de metabolômica [34]. Isto porque ela é utilizada para eliminar *outliers*, impedindo que amostras anômalas atrapalhem a construção do modelo de classificação.

A PLS-DA é um método supervisionado, muito empregado na quimiometria e apropriado para construção de modelos de classificação e identificação de metabólitos potencialmente importantes envolvidos nas alterações metabólicas [78]. Por isso, é frequentemente utilizada na estratégia metabolômica [79]. Em tese, é a associação de um método de classificação, a Análise Discriminante (DA), e de uma regressão, PLS, aplicada neste caso a problemas de classificação [80]. É importante, no uso da PLS-DA, definir o número de variáveis latentes (componentes) a ser utilizado para a construção do modelo de variância. Essas variáveis latentes, assim como as PCs, são combinações lineares das variáveis originais. No entanto, elas são construídas considerando a classe das amostras, que no caso da metabolômica, é o *status* bioquímico da amostra. Assim, a PLS-DA projeta os dados (x) para um espaço de baixa dimensão (redução de dimensionalidade), que aumenta a separação entre diferentes grupos de dados nas primeiras dimensões (variáveis latentes) [77]

Investigando as variáveis mais importantes para a classificação, pode-se extrair informações acerca da intervenção externa que provocou a diferenciação das amostras. É muito comum que os trabalhos que usam esta estratégia metabolômica tenham um número reduzido de amostras, o que em alguns casos torna inviável a utilização de um grupo de teste para validar o modelo. Nestes casos, utiliza-se a validação cruzada (*cross validation*), um método usado para avaliar um modelo a partir de um conjunto de dados, onde a escolha do número de componentes principais se baseia na análise de quão acurado é o seu desempenho para um novo conjunto de dados [81]. Em outras palavras, a validação cruzada testa a predição do novo modelo construído com as amostras restantes. O teste de validação cruzada utilizado neste trabalho foi o *Leave-one-out cross-validation* (LOOCV).

### 1.8.3 K- Vizinhos mais Próximos – KNN

O algoritmo dos K- Vizinhos mais Próximos (KNN do inglês , *K-Nearest Neighbor*) é uma abordagem muito simples, utilizada mais pelos químicos do que pelos estatísticos, pois não requer métodos elaborados que envolvam modelagem de dados que são inerentes a fazer suposições como a normalidade das distribuições de ruído, que nem sempre são experimentalmente justificados. O KNN faz poucas hipóteses [82].

KNN é um método de classificação não paramétrico [83], pois independe dos parâmetros populacionais e suas respectivas estimativas. Métodos não paramétricos não exigem populações distribuídas normalmente. Métodos não paramétricos estão relacionado com o teste de hipóteses múltiplas de *Brunner-Munzel*.

Tradicionalmente o KNN classifica a amostra desconhecida baseando-se na determinação da distância Euclidiana ou de Mahalanobis, para as amostras com classificação conhecida. A classificação da amostra desconhecida, é realizada baseada na distância desta amostra em relação às K amostras mais próximas do conjunto de treinamento, isto é, de acordo com a similaridade que a amostra desconhecida apresenta em relação às amostras do conjunto de treinamento [77]. A classificação da amostra desconhecida é feita através do maior número de vizinhos relacionados ou mais próximo a ele [84]. Assim, determinar o K (números de vizinhos) e o tipo de distância a ser considerado para aumentar a eficiência da classificação é de fundamental importância.

## 2 Objetivos

### 2.1 Objetivo geral

Construir um modelo metabolômico para classificar as mangas da cultivar *Tommy Atkins* em função da exposição à radiação gama, identificando os metabólitos responsáveis pela classificação.

### 2.2 Objetivos específicos

- 2.2.1 Extrair compostos voláteis, via *headspace* dinâmico e obter o perfil cromatográfico dos compostos voláteis, usando GC-MS a partir de amostras de mangas da cultivar *Thommy Atkins* que foram expostas, ou não, à radiação gama;
- 2.2.2 Realizar análise exploratória de dados e classificação (PCA, PLS-DA e KNN) a partir dos cromatogramas obtidos e investigar se há dissimilaridades estatisticamente confiáveis entre grupos compostos por frutos irradiados e não - irradiados;
- 2.2.3 Identificar quais compostos são responsáveis pela discriminação, se houver, entre os grupos.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Preparação da amostra

120 mangas da cultivar *Tommy Atkins* com grau de maturação 4 (25% verde e 75% vermelha), de acordo com a classificação proposta pela Embrapa [85], visualizada na Figura 4, foram adquiridas na Central de Abastecimento de Alimentos (CEASA/CEAGEPE), sendo os frutos originários do Vale do São do Francisco, Petrolina-PE.



Figura 4 – Aspecto externo de manga da cultivar *Tommy Atkins* em função do grau de maturação. Fonte: Embrapa Semi-Árido [85]

Os frutos foram conduzidos até o Laboratório de Pós-colheita de Frutas do Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste (CRCN-NE). Lá foram selecionados 80, então lavados em água corrente e colocados sobre uma bancada forrada com papel toalha para secarem. Em seguida, foram enumerados aleatoriamente de 1 a 80, conforme apresentado na Figura 5.



Figura 5 – Seleção de manga da cultivar *Tommy Atkins* para realização do experimento

Os frutos foram colocados dois a dois em bandejas de poliestireno expandido (EPS) e em seguida cobertos por filme aderente de PVC. Após serem embalados, as bandejas receberam numeração aleatória de 1 a 40, conforme Figura 6.



Figura 6 – Distribuição e embalagem de mangas da cultivar Tommy Atkins para realização do experimento.

Os frutos foram divididos em dois grupos: Controle – amostras não irradiadas, e irradiado – amostras irradiadas com dose igual a 0,5 kGy, padrão utilizado para retardar o tempo de maturação de frutas [15,21].

Os frutos do Grupo Controle foram levados ao Departamento de Energia Nuclear (DEN) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), onde foram irradiados no irradiador do tipo Gammacell com fonte de  $^{60}\text{Co}$ , modelo 220 Excel – MDS, Nordilon (Figura 7), cuja taxa no momento da irradiação era de 4,658 kGy/h, com tempo de exposição de 6 min e 26 seg.



Figura 7 – Irradiador do tipo Gammacell com fonte de  $^{60}\text{Co}$ , modelo 220 Excel\_MDS da Nordilon do Departamento de Energia Nuclear (DEN) da UFPE.

Todos os frutos foram armazenados em câmara de refrigeração sob temperatura de  $12 (\pm 2^\circ\text{C})$  e umidade relativa do ar de 60% no Laboratório de Pós-colheita de Frutas do CRCN-NE, durante 18 dias, com o objetivo de simular o tempo de armazenamento e transporte para o mercado externo. No décimo oitavo dia, os frutos foram retirados do acondicionamento e levados para o Laboratório de Ecologia Química da UFPE, apresentando grau de maturação 5 (25% amarela e 75% vermelha), de acordo com a classificação proposta pela Embrapa [85]. Os frutos foram mantidos a  $25^\circ\text{C}$  por 18 horas quando foi iniciada a etapa de extração de voláteis, através da técnica *headspace* dinâmico.

### 3.2 Extração dos compostos voláteis de mangas da cultivar *Tommy Atkins* pela técnica de *headspace* dinâmico.

Foram realizadas oito extrações, com intervalos de trinta minutos cada, sendo que cada extração foi composta por um branco e cinco amostras. As bandejas foram escolhidas de forma aleatória para a realização da extração dos voláteis.

Os voláteis foram coletados usando dois frutos por amostra, que foram colocados em um saco plástico de polietileno (Assa Pratsy - marca. Alumileste), conforme apresentado na Figura 8. Na extração foi utilizada uma bomba de sucção (Thomas G12/01EB) em fluxo constante de aproximadamente  $6 \text{ L.min}^{-1}$ , através de *traps* adsorventes, contendo uma mistura 1:1 Tenax<sup>TM</sup> TA (malha 60/80 mesh, da

SUPELCO) e Carboxen<sup>TM</sup> X (malha 40/60 mesh, da SUPELCO). Neste trabalho foi usada uma mistura de Tenax<sup>®</sup> TA e Carboxen . A mistura Tenax-Carboxen visando aumentar a capacidade de absorção de voláteis orgânicos [65]. Os brancos seguiram o mesmo padrão, porém sem a presença dos frutos.



Figura 8 – Extração de voláteis de mangas da cultivar *Tommy Atkins* mediante o método de *headspace* dinâmico.

A dessorção dos voláteis orgânicos capturados nos *traps*, foi realizada com aproximadamente 300  $\mu$ L de hexano destilado, sendo recolhidas as três primeiras gotas. As amostras foram armazenadas sob refrigeração de aproximadamente -18°C até a análise. Também foi colocado em uma das extremidades do saco um filtro de carvão ativado, com o propósito de filtrar o ar que passava pelos frutos na hora da extração.

Antes da extração, os *traps* e filtros de carvão ativado foram condicionados, para garantir a eliminação de qualquer substância volátil presente nos mesmos. Inicialmente, os *traps* foram lavados com um volume aproximado de 2 mL de hexano, por três vezes, colocados sobre uma chapa de aquecimento a uma temperatura inicial de aproximadamente 50°C por 10 minutos, em seguida elevada a 200°C, por 3 horas.

As análises dos compostos voláteis das mangas foram feitas através de cromatógrafo gasoso (Modelo 7890, Agilent Technologies) acoplado a um espectrômetro de massas (Modelo 5975, Agilent Technologies). O sistema cromatográfico consistiu de uma coluna capilar DB-5MS (5% difenil dimetil

polissiloxano) com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura do filme. A temperatura do forno foi mantida em 40°C por 2 min., aumentada em 4°C min<sup>-1</sup> até 180°C e mantida por 5 min., totalizando um tempo de corrida igual a 42 min. A temperatura do injetor foi mantida a 250°C. Razão de divisão mantida igual a 1:10. O volume injetado foi igual a 1 µL. A linha de transferência foi mantida a 260°C. O gás hélio foi utilizado como fase móvel com fluxo igual a 1 mL min<sup>-1</sup>. O espectrômetro de massa operou com temperatura da fonte de íons igual a 230°C; energia para ionização igual a 70 eV e faixa de m/z entre 30 e 350 uma.

Os compostos foram identificados através dos seus índices de retenção (IR) e da comparação dos seus espectros de massas com os da literatura Adams [83]. Para a determinação dos IRs, foi realizada uma co-injeção utilizando uma das amostras misturada a uma alíquota de solução contendo uma série homóloga de alcanos C<sub>9</sub>-C<sub>30</sub>. O Índice de *Van den Dool and Kratz*, foi o determinado neste trabalho. A fórmula usada para o índice de retenção de *Van den Dool e Kratz* [86] é apresentada na Equação 1.

$$IR = 100i \left[ \frac{t_{(x)} - t_{(HA)}}{t_{(HD)} - t_{(HA)}} \right] + 100n \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

IR	Índice de Retenção
t <sub>(x)</sub>	tempo de retenção do composto de interesse.
t <sub>(HA)</sub>	tempo de retenção do hidrocarboneto que elui antes do composto de interesse.
t <sub>(HD)</sub>	tempo de retenção do hidrocarboneto que elui depois do composto de interesse.
i	diferença entre os números de carbonos entre os hidrocarbonetos que eluem antes de depois do composto de interesse.
n	número de carbonos do hidrocarboneto que elui antes do composto de interesse.

### 3.3 Análise multivariada

Uma matriz de dados 37 casos X 41 variáveis (Apêndice B) foi construída como ponto de partida para o tratamento quimiométrico.

Para as análises de PCA e PLS-DA os dados foram pré-processados através do autoescalamento, no qual a matriz é centrada na média dos valores através da subtração do valor de cada elemento da matriz da média de cada variável (coluna), e depois, normalizada pelo desvio padrão variável. Isso é feito para que todas as variáveis possam exercer influência equivalente sobre os resultados, como também torná-los adimensionais [87]. Para o KNN, por ser uma ferramenta não paramétrica, não foi preciso normalizar a matriz, ou seja, foram usados os dados brutos da matriz.

O tratamento estatístico foi realizado usando a plataforma *on-line* MetaboAnalyst 2.0, para as análises quimiométricas por PCA e PLS-DA, e o software "R program", usado para a análise por KNN. Os modelos foram validados através do *Leave-one-out* (LOOCV). A validação cruzada LOOCV foi utilizada para a elaboração do modelo de calibração (modelo de previsão). O modelo de calibração criado foi elaborado com as amostras restantes (n-1) pela retirada de uma amostra, de forma aleatória, do conjunto de dados. A retirada da primeira amostra foi testada como primeira validação do modelo de calibração criado. Isso foi feito para cada amostra retirada, de forma contínua e sempre aleatória, criando e testando assim, um "n" números de modelos de calibração.

## 4 Resultados e Discussão

### 4.1 Extração dos compostos voláteis via headspace dinâmico

A extração dos compostos voláteis por *headspace* dinâmico realizada através de um extrator de compostos voláteis em série construído no Laboratório de Ecologia Química do Departamento de Química Fundamental da UFPE (Figura 9), foi muito relevante para a redução de tempo de extração dos compostos voláteis, como também na diminuição da variação das condições ambientais do laboratório entre a primeira e a última extração. O extrator de compostos voláteis em série, é um sistema inovado, é constituído de três bombas de sucção (Thomas G12/01EB) com duas saídas cada, com o controle de fluxo independentes e o sistema utilizado pode ser elétrico ou por bateria. Uma nota técnica será enviada à revista Química Nova.

O tempo de cada extração foi de aproximadamente 60 minutos, caso a extração tivesse acontecido com uma ou duas amostras por cada extração, o tempo total para as extrações teriam sido de 40 ou 20 horas respectivamente. A extração com o extrator em série de compostos voláteis para o *headspace* dinâmico, o tempo gasto foi de aproximadamente 8 horas.

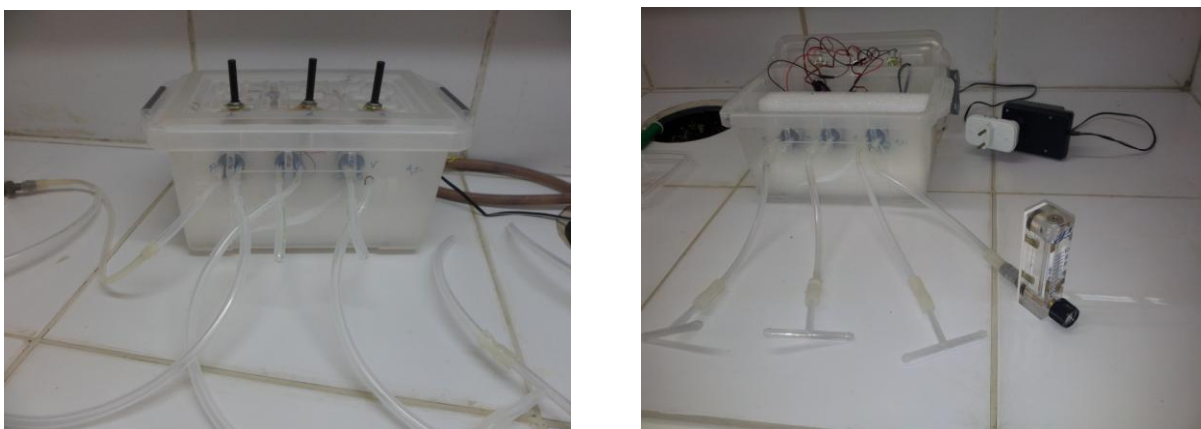


Figura 9 – Extrator em série de compostos voláteis para *headspace* dinâmico, construído no Laboratório de Ecologia Química do Departamento de Química Fundamental da UFPE.

Nas literaturas consultadas, as mangas utilizadas para a extração dos compostos voláteis, foram usadas na forma de polpa ou suco, independente da técnica usada, seja por *headspace* dinâmico (HSD) [88] ou *headspace* estático (HSE) [54], microextração em fase sólida (SPME) [53,] ou pelo método *Likens-Nickerson* (destilação-extração com solvente) [89]. No trabalho aqui apresentado, a

extração se deu de forma não invasiva, caracterizando assim, uma nova condição para a extração de compostos voláteis.

#### 4.2 Aparência geral das mangas

Comparando as mangas irradiadas e não-irradiadas, não foi observada qualquer diferença no que diz respeito a aparência externa, Figura 10, ou interna, Figura 11.



Figura 10 – Aparência externa de manga da cultivar *Tommy Atkins* no dia da extração. (A= mangas irradiadas; B= mangas não-irradiadas).



Figura 11 – Aparência interna de manga da cultivar *Tommy Atkins* no dia da extração. (superior = mangas irradiadas; inferior = mangas não-irradiadas).

### 4.3 Perfil cromatográfico dos compostos voláteis através do GC-MS

#### 4.3.1 Identificação dos compostos voláteis através do índice de retenção

Foram submetidas à corrida cromatográfica por GC-MS, 18 amostras irradiadas e 19 controle.

O perfil cromatográfico típico do odor de mangas da cultivar *Tommy Atkins* está apresentado na Figura 12.

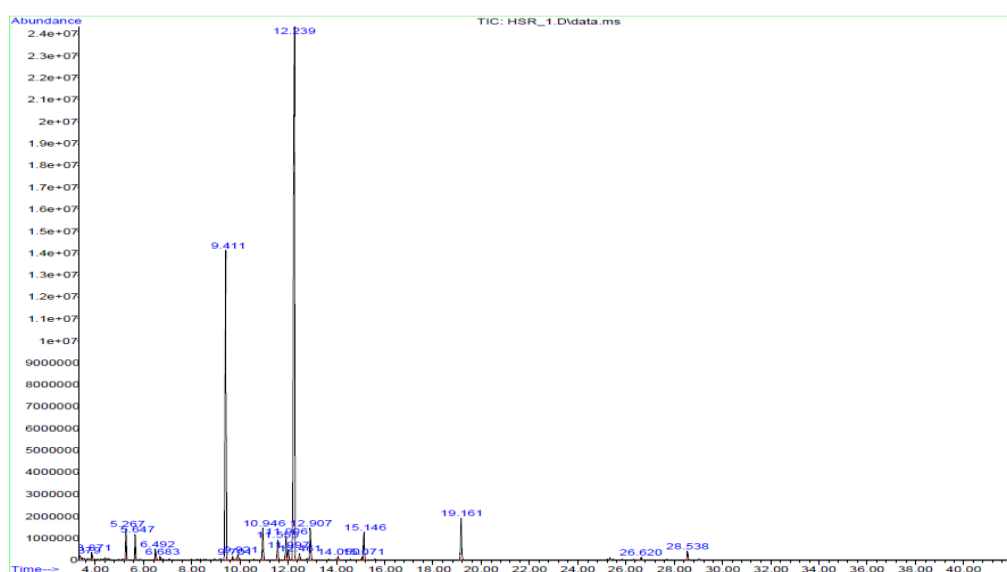


Figura 12 – Perfil cromatográfico de manga da cultivar *Tommy Atkins*.

A análise dos cromatogramas resultou em dois compostos majoritários,  $\alpha$ -pineno ( $t_r = 9,41$  min), e 3-careno ( $t_r = 12,24$  min) identificados na Tabela 2 e no cromatograma da Figura 12. Na análise estatística dos dados, que será discutida no Item 4.3, três compostos foram considerados importantes para discriminar as amostras em função da exposição, ou não, à radiação gama.  $\alpha$ -felandreno, o octanoato de etila e o germacreno-D. No entanto, foram identificados mais 11 (onze) compostos nas amostras análises, identificados a partir dos seus IRs e através da comparação de seus espectros de massas descritos na literatura [86]. Além dos 16 (dezesesseis) compostos já citados, destacam-se mais cinco sinais não identificados, que no entanto foram utilizados na análise estatística multivariada. A Tabela 2 apresenta esses compostos, que estão ordenados em função do tempo de seus tempos de retenção.

Tabela 2 – Identificação dos principais compostos voláteis encontrados em manga da cultivar *Tommy Atkins* após 18 dias de armazenamento sob temperatura de 12°C.

Pico <sup>(1)</sup>	Tr (min.) <sup>(2)</sup>	IR <sub>AM</sub> <sup>(3)</sup>	IR <sub>Adams</sub> <sup>(4)</sup>	Composto
1	3,380	-	-	Não-identificado
2	3,871	-	-	Não-identificado
3	5,268	-	-	Butanoato de etila
4	5,648	-	-	Não-identificado
5	6,682	-	-	Não-identificado
6	9,411	932	932	$\alpha$ -Pineno
7	9,700	940	-	Não-identificado
8	9,921	946	946	Canfeno
9	10,947	974	974	$\beta$ -Pineno
10	11,555	991	988	$\beta$ -Mirceno
11	11,905	1001	997	Hexanoato de etila
12	11,997	1003	1002	$\alpha$ -Felandreno
13	12,238	1010	1008	3-Careno
14	12,460	1016	1014	$\alpha$ -Terpineno
15	12,906	1028	1024	Limoneno
16	14,051	1058	1054	$\gamma$ -Terpineno
17	15,071	1086	1085	Isoterpinoleno
18	15,145	1088	1086	Terpinoleno
19	19,160	1198	1196	Octanoato de etila
20	26,619	1422	1423	Cariofileno
21	28,538	1483	1484	Germacreno-D

**Nota:** <sup>(1)</sup> Número do pico pela ordem de eluição na coluna; <sup>(2)</sup> Tr: tempo de retenção dos compostos; <sup>(3)</sup> IR<sub>AM</sub>: índice de retenção da amostra; <sup>(4)</sup> IR<sub>Adams</sub>: índice de retenção da literatura [87].

As Figuras de 13 a 28 do Apêndice A, mostram a comparação entre os espectros de massas do composto da amostra com os descritos na literatura [86]:

A determinação cromatográfica da composição de voláteis de mangas da cultivar *Tommy Atkins* irradiadas e não-irradiadas, usando GC-MS, apresentou como principais constituintes químicos os terpenos e os ésteres. Os terpenos são característicos das variedades de mangas americanas [58,88,90]. Estudos realizados por [54,58,88] indicam que os monoterpenos são os voláteis majoritários tanto na cultivar *Tommy Atkins*, como em outras cultivares.

Em geral, quando se fala de compostos voláteis de frutas, terpenos e ésteres são compostos voláteis majoritários em frutas. No caqui (*Diospyrus kaki* L., Ebenaceae), o 3-careno (monoterpeno) é o composto majoritário, seguido dos ésteres de cadeia longa como o octanoato de metila e heptanoato de etila [91]. sobre a composição do aroma de frutos da pitangueira (*Eugenia uniflora* L., Myrtaceae), indicam que os terpenos são os majoritários, e no Araçá-Boi (*Eugenia stipitata*, Myrtaceae), os compostos voláteis majoritários são germacreno-D,  $\beta$ -pineno e  $\alpha$ -pineno [92].

Além dos terpenos, ésteres também são constituintes majoritários de frutas como maracujá (*Passiflora edulis* forma *Flavicarpa*, Passifloraceae), cajá (*Spondias mombin* L., Anacardiaceae) [93], pequi (*Caryocar brasiliense* Camb., Caryocaraceae) (ésteres com 81,4% a 96,40% e terpenos com 3,59% a 23,5%) [94] e a cagaita (*Eugenia dysenterica*, Myrtaceae) (apresentando como aroma frutal o hexanoato de etila e o butanoato de etila) [92].

A presença dos ésteres em frutos pode estar associado ao metabolismo de aminoácidos, que formam aldeídos, podendo esses serem convertidos a álcoois, ácidos carboxílicos ou ésteres, como produto de reduções, oxidações e esterificações, respectivamente [92].

Os ésteres são os responsáveis pelos aroma frutal de um modo geral, assim como os terpenos, os responsáveis pela nota de aroma verde. Aroma frutal, como o nome diz, é característico de frutas, não estando associado diretamente a uma ou outra fruta especificamente. Ésteres de três a oito átomos de carbono estão associados às notas de aroma mais típicas e mais intensas. Já a nota de aroma verde quando designado para as mangas nas variedades *Tommy Atkins*, *Haden*, *Espada* e *Rubi*, é primordialmente atribuída ao monoterpeno 3-careno essa [54].

Resumindo, foram observados compostos de três classes – monoterpenos, sesquiterpenos e ésteres. Os gráficos 2, 3 e 4, apresentam a frequência observada para os monoterpenos, sesquiterpenos e ésteres, respectivamente, nas amostras irradiadas e controle.

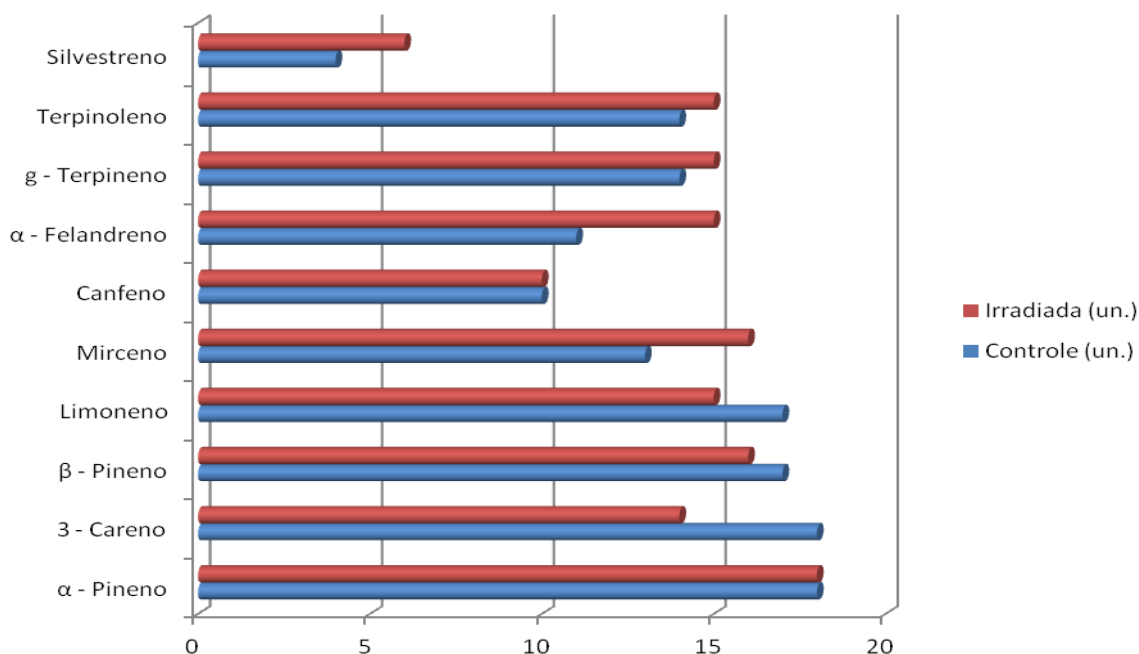


Gráfico 2 – Frequência de monoterpenos nas amostras de mangas da cultivar *Tommy Atkins*.

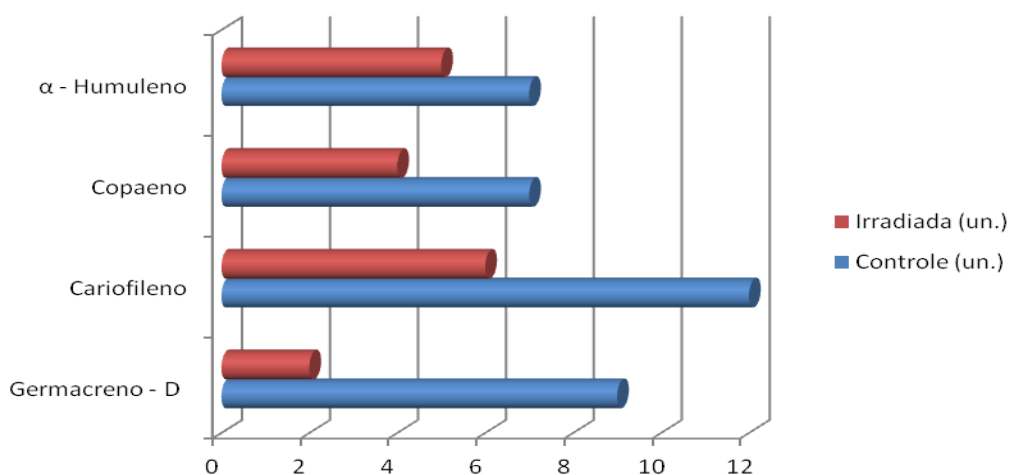


Gráfico 3 – Frequência de sesquiterpenos nas amostras de mangas da cultivar *Tommy Atkins*.

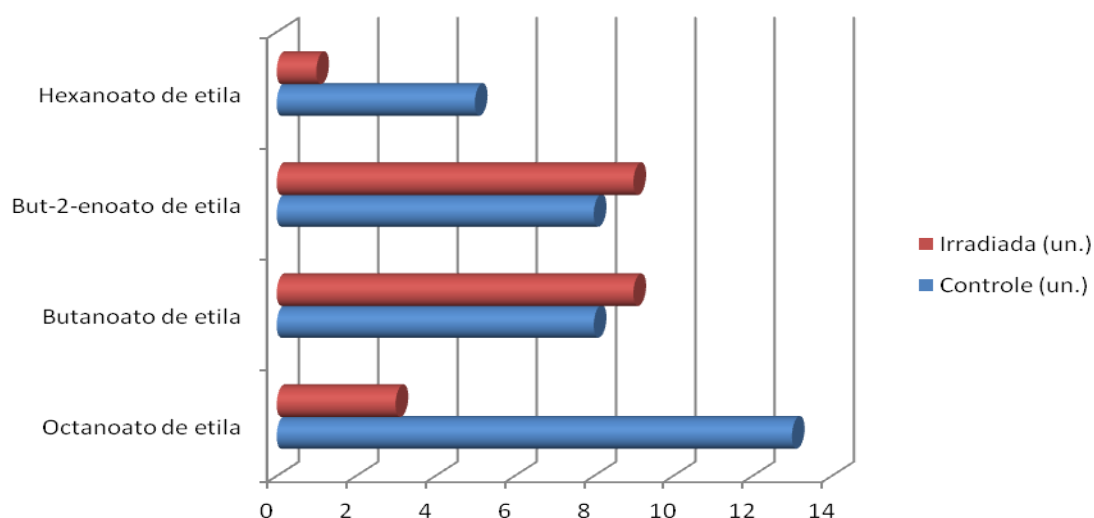


Gráfico 4 – Frequência de ésteres nas amostras de mangas da cultivar *Tommy Atkins*.

A comparação entre os cromatogramas obtidos a partir das amostras de mangas *Tommy Atkins* irradiadas (Figura 29 A) e não irradiadas (Figura 29 B) indica que em ambos, 3-Careno (m) e  $\alpha$ -Pineno (n) (Figuras 29 A e 29 B), são os dois compostos majoritários. Vários artigos [54,58,88,89,90] confirmam que esses dois compostos são de fundamental importância na característica e especificidade do aroma das mangas *Tommy Atkins*, como também são majoritários em outras cultivares, como mostrado a seguir.

Para Franco *et al.* [88], o 3-careno é o composto majoritário para as cultivares *Tommy Atkins*, Haden e Keitt, enquanto que  $\alpha$ -pineno é o segundo composto majoritário na cultivar *Tommy Atkins*. Esses mesmos autores concluíram que o 3-careno e o  $\alpha$ -pineno são os dois componentes de maior abundância na cultivar *Tommy Atkins*.

Canuto *et al.* [58], pesquisaram a composição química volátil de manga da cultivar *Tommy Atkins* do Vale de São Francisco em três estádios de maturação e relataram que, independentemente, o 3-careno foi o composto majoritário.

Canuto *et al.* [90], também pesquisaram os efeitos de inibidores de etileno sobre a produção de voláteis em manga, visto que o etileno é muito importante na indução do amadurecimento de frutas climatéricas. O resultado mostrou que o 3-careno é o composto majoritário em qualquer estágio de maturação, com ou sem inibidor. O  $\alpha$ -pineno aparece como o segundo majoritário para as mangas maduras, independentemente da presença ou ausência de inibidores.

A pesquisa realizada por McLeod e Snyder [89], mostrou a comparação dos componentes voláteis entre duas cultivares de mangas: a *Tommy Atkins* e a *Keitt*. O resultado mostrou que ambas apresentaram semelhanças na concentração total dos voláteis, com uma elevada predominância da mesma classe dos compostos, os terpenos, e também o mesmo constituinte 3-careno.  $\alpha$ -Pineno apresentou-se em maior concentração na cultivar *Tommy Atkins*.

McLeod e Snyder [89], nesse mesmo artigo apresentam uma tabela de comparação das classes de compostos de aromas e de alguns constituintes voláteis específicos entre oito cultivares de mangas (*Tommy Atkins*, *Keitt*, *Venezuelan*, *Alphonso*, *Baladi*, *Jaffna*, *Willrad*, *Parrot*). Os hidrocarbonetos monoterpênicos também foram a classe dominante em todas as cultivares.

#### **4.3.2 Identificação dos compostos voláteis através do espectro de massas**

Os compostos foram identificados a partir de seus IRs e da análise de seus espectros de massas. Aqui, discutiremos apenas os espectros de massas dos compostos que, no estudo quimiométrico, se mostraram responsáveis pela discriminação entre as amostras que foram expostas ou não à radiação gama.

##### **4.3.2.1 Octanoato de etila**

O octanoato de etila (IR = 1198) tem fórmula molecular  $C_{10}H_{20}O_2$ . Seu íon molecular tem sinal fraco, mas em geral é observável [43], o íon-molecular tem  $m/z$  172 e os principais fragmentos são os que possuem  $m/z$  127, 101 e 88, apresentados na Figura 30.

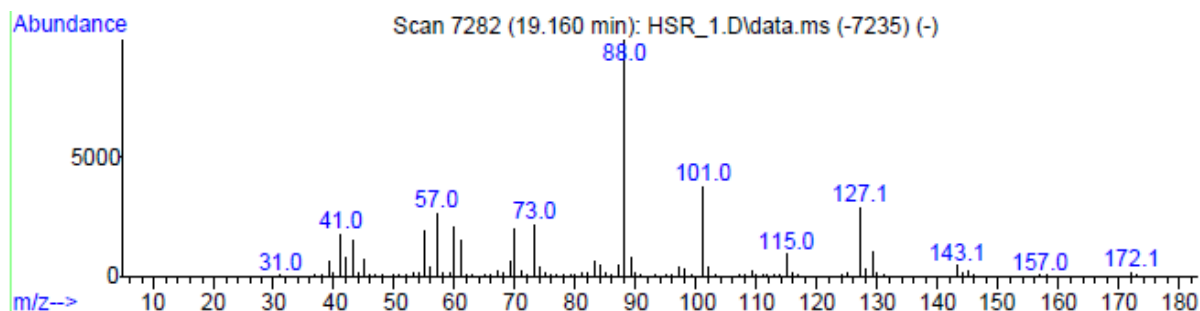


Figura 30 – Espectro de massa do octanoato de etila.

Assim como os ésteres de metila, os ésteres de etila, propila, butila e alquilas de cadeia longa, também passam por fragmentação do tipo segmentação  $\alpha$  e rearranjo McLafferty [46,95].

O íon  $m/z$  127 é formado pela perda de massa 45 uma ( $C_2H_5O^\bullet$ ) do íon molecular através da fragmentação  $\alpha$ . A fragmentação  $\alpha$  é a mais importante dos ésteres, envolve a perda do grupo alcoxi (nesse caso, massa 45 uma) para formar o íon acílio  $RC\equiv O^+$  [46], (nesse caso  $m/z$  127). O íon acílio é característico dos ésteres [96]. O mecanismo de fragmentação é mostrado na Figura 31.

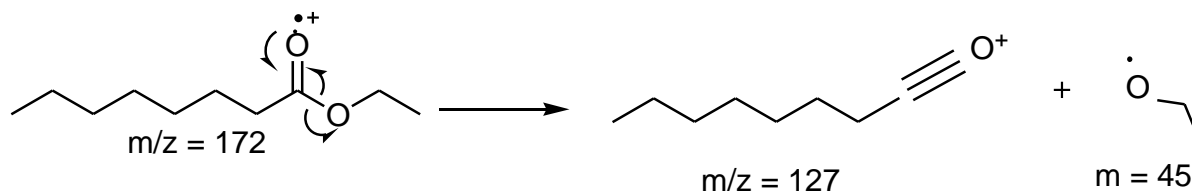


Figura 31 – Mecanismo de fragmentação do íon molecular para formação do íon  $m/z$  127.

A formação do íon  $m/z$  101, de fórmula  $C_5H_9O_2^+$ , ocorre a partir do íon molecular e se deve ao rearranjo do hidrogênio da ligação  $\beta$ . Além do rearranjo de MacLafferty (Figura 33), os espectros de massa de ácidos ou ésteres de cadeia longa se assemelham às séries de aglomerados hidrocarbônicos a intervalos de 14 unidades, em cada aglomerado existe um pico intenso em  $C_nH_{2n-1}O_2$  [95], como mostra a Figura 32.

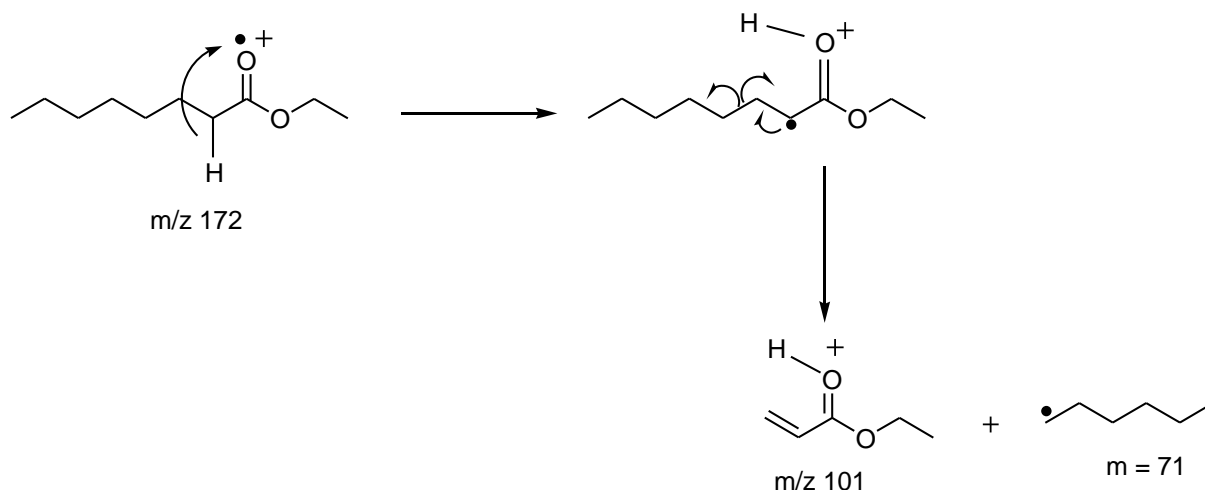


Figura 32 – Mecanismo proposto para formação do íon  $m/z\ 101$  a partir do íon. Molecular.

O íon  $m/z\ 88$  é o pico mais intenso (pico base), e o mais característico, devido ao rearranjo *McLafferty*, que é próprio de ésteres etílico lineares. O rearranjo *McLafferty* ocorre com a quebra da ligação  $\beta$  em relação ao grupo  $C=O$  e migração do hidrogênio da ligação gama, como mostrado na Figura 33.

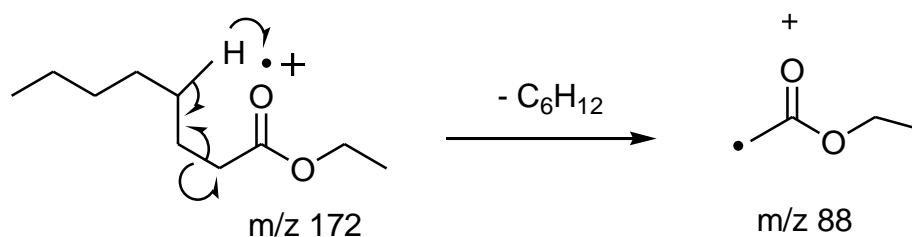


Figura 33 – Rearranjo *McLafferty* do íon molecular para a formação do íon  $m/z\ 88$ .

#### 4.3.2.2 Germacreno-D

O Germacreno-D (IR = 1483) é um sesquiterpeno que tem fórmula molecular  $C_{15}H_{24}$ , com  $m/z\ 204\ (M^+)$ . Sua fórmula estrutural é mostrada na Figura 34.

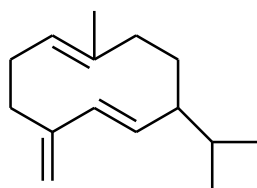


Figura 34 – Fórmula estrutural do Germacreno-D.

O espectro de massas do Germacreno - D apresenta como principais fragmentos  $m/z$ : 161, 119, 105, 91, que pode ser visto na Figura 35.

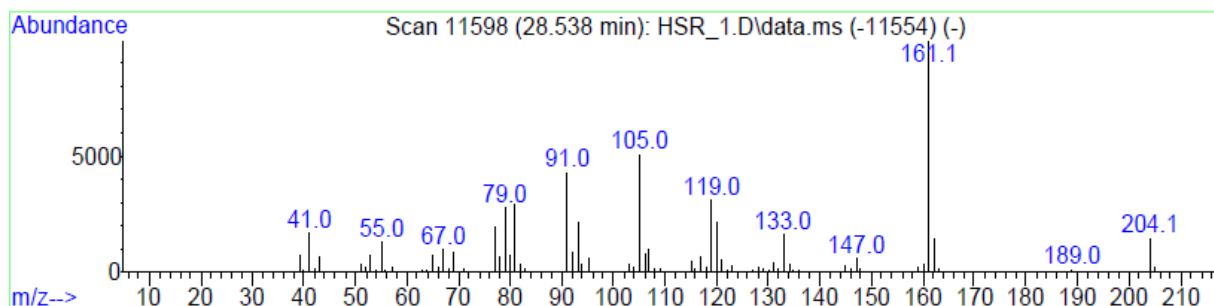


Figura 35 – Espectro de massa do Germacreno - D.

O esquema proposto para a fragmentação do Germacreno-D segundo *Steliopoulos e Mosani* [96] é mostrado na Figura 36.

O  $m/z$  161 é o pico base. É formado pela perda do radical isopropil ( $^{\bullet}\text{C}_3\text{H}_7$ ) a partir do íon molecular, através da segmentação  $\alpha$  (rota a, Figura 36).

A segmentação  $\alpha$  é uma das mais conhecidas. É iniciada no *sítio radical*. O termo “segmentação  $\alpha$ ” é tido como confuso, pois a ligação quebrada não está diretamente ligada ao sítio radical e sim ao átomo vizinho (posição  $\alpha$ ). Pode ocorrer em áreas saturadas ou não saturadas, e ainda envolver heteroátomo ou não [46].

Uma outra proposta para a formação do  $m/z$  161 é através da saída da molécula neutra  $\text{C}_2\text{H}_4$  ( $m = 28$ ) do íon  $m/z$  189 (rota c, Figura 36). A formação do  $m/z$  189 foi obtida, por sua vez, pela saída do radical metil ( $^{\bullet}\text{CH}_3$ ,  $m = 15$  uma) do íon molecular (rota b, Figura 36). A fragmentação do  $m/z$  189 também dá origem ao  $m/z$  147 pela saída da molécula neutra  $\text{C}_3\text{H}_6$  ( $m = 42$  uma) (rota f, Figura 36).

As propostas para a formação do  $m/z$  119, segundo *Steliopoulos e Mosani* [96] são as seguintes: uma ocorre pela saída da molécula neutra  $\text{C}_3\text{H}_6$  ( $m = 42$  uma), a partir do  $m/z$  161 (rota e, Figura 35); e a outra proposta se dar a partir do  $m/z$  147 (rota g, Figura 36), com a saída da molécula neutra  $\text{C}_2\text{H}_4$  ( $m = 28$  uma).

Para o  $m/z$  105, duas propostas de fragmentação também são apresentadas por *Steliopoulos e Mosani* [96]. Uma ocorre com a saída do  $\text{C}_2\text{H}_4$  ( $m = 28$  uma, rota d, Figura 36), a partir do  $m/z$  161, formando o  $m/z$  133, que em seguida sofre fragmentação, formando o  $m/z$  105 (perda do  $\text{C}_2\text{H}_4$ ,  $m = 28$  uma). A outra proposta, é a fragmentação do  $m/z$  147 (rota g, Figura 36), com a perda do  $\text{C}_3\text{H}_6$  ( $m = 42$  uma).

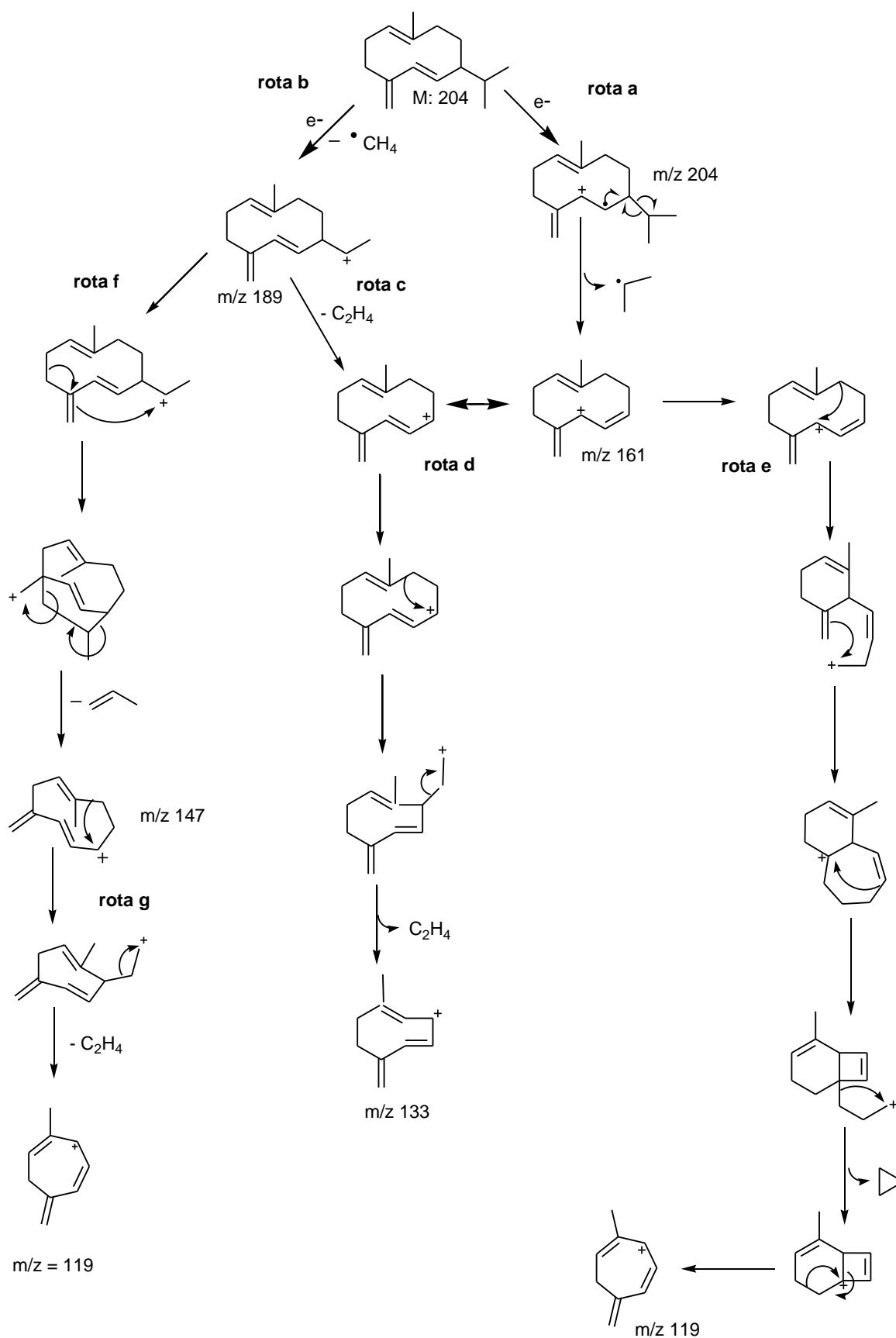


Figura 36 – Proposta para a fragmentação do Germacreno – D segundo modelo adaptado de Steliopoulos e Mosandi [96].

O  $m/z$  91 é atribuído ao íon Tropílio. O íon tropílio é originado de compostos aromáticos alquil substituídos (Figura 37). A provável quebra na ligação  $\beta$ , em relação ao anel, forma o íon benzila, que é estabilizado pela ressonância ou o mais provável íon tropílio [95].

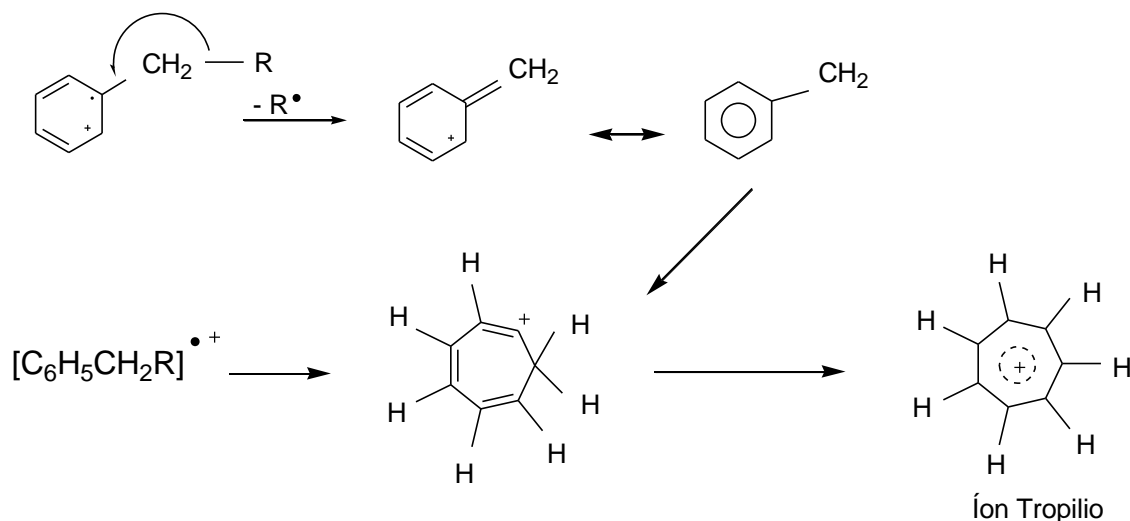


Figura 37 – Formação do íon tropílio. Fonte: Silverstein [92].

O mecanismo abaixo (Figura 38).representa a formação dos íons  $m/z$  105 e 91, a partir dos íons  $m/z$  133 e 119, respectivamente:

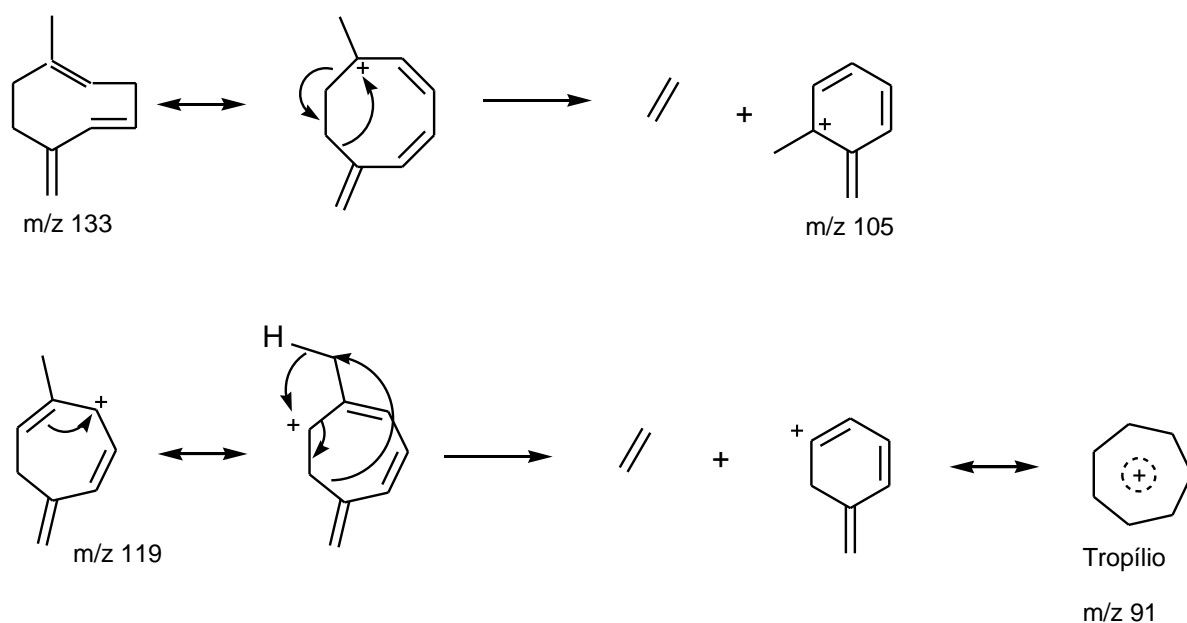


Figura 38 – Proposta para a fragmentação dos íons  $m/z$  133 e  $m/z$  119, na obtenção dos íons  $m/z$  105 e  $m/z$  91.

### 4.3.2.3 $\alpha$ -Felandreno

O  $\alpha$ -Felandreno (IR = 1003) é um monoterpreno de fórmula molecular  $C_{10}H_{16}$  com massa molar  $136 \text{ g mol}^{-1}$ . Sua fórmula estrutural é apresentada na Figura 39.

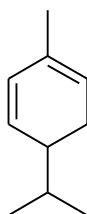


Figura 39 – Fórmula estrutural do  $\alpha$ -Felandreno

O espectro de massas do  $\alpha$ -Felandreno mostra um pico do íon molecular  $M^+$  136. Normalmente, alkenos cíclicos apresentam um pico molecular distinto [95]. Seus principais fragmentos são os de  $m/z$ : 93 e 77 (Figura 40).

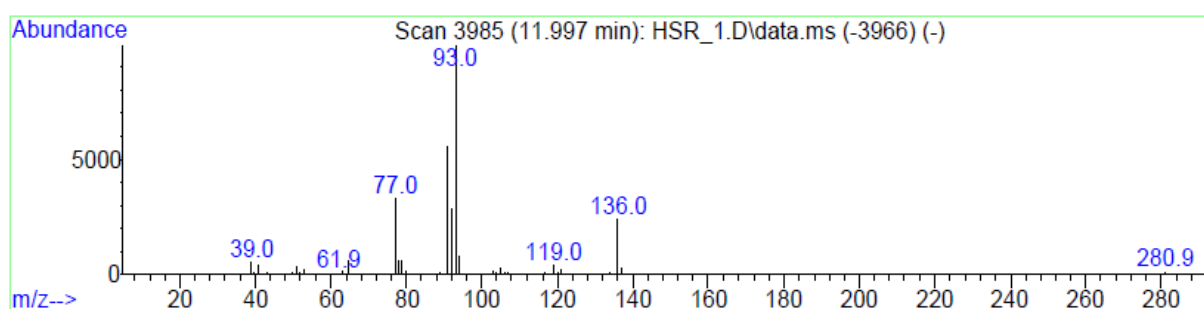


Figura 40 – Espectro de massa do  $\alpha$ -Felandreno.

O íon  $m/z$  93 (pico base), de fórmula  $C_7H_9^+$ , é formado por isomerização, seguida de uma clivagem alílica [95], com perda do radical isopropil ( $^{\bullet}C_3H_7$ ,  $m = 43$  uma) a partir do íon molecular (Figura 41).

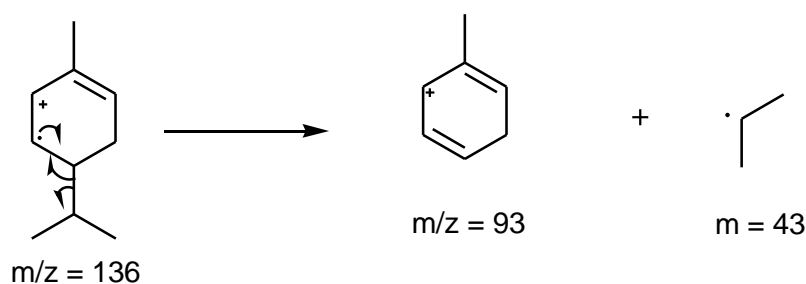


Figura 41 – Fragmentação do íon  $m/z$  136 para a formação do íon  $m/z$  93.

Já o íon  $m/z$  77, apresenta fórmula  $C_6H_5^+$ , formado pela fragmentação simultânea com as perdas da molécula neutra  $CH_4$  ( $m=16$  uma) e do radical isopropil ( $^{\bullet}C_3H_7$ ,  $m=43$  uma), através do rearranjo de hidrogênio, como mostrado na Figura 42 a partir do íon molecular.

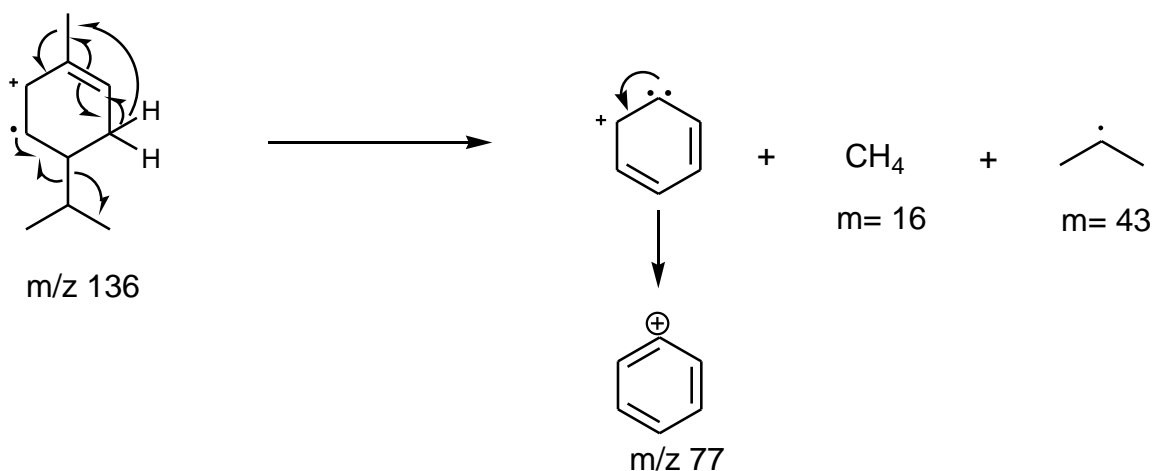


Figura 42 – Formação do fragmento  $m/z$  77 a partir do íon molecular.

#### 4.4 Análise Multivariada

Os resultados analíticos obtidos foram autoescalonados (média zero e variância um) antes de aplicar as técnicas quimiométricas. A análise exploratória de dados PCA e as de classificação PLS-DA e KNN foram as ferramentas estatísticas multivariadas utilizadas neste trabalho.

##### 4.4.1 PCA

A Figura 43 mostra o gráfico de contribuição das componentes principais na explicação da variabilidade dos dados coletados. A linha verde (acima) representa a variação acumuladas entre as PCs, e a linha azul (abaixo), representa a variação de cada PC individualmente.

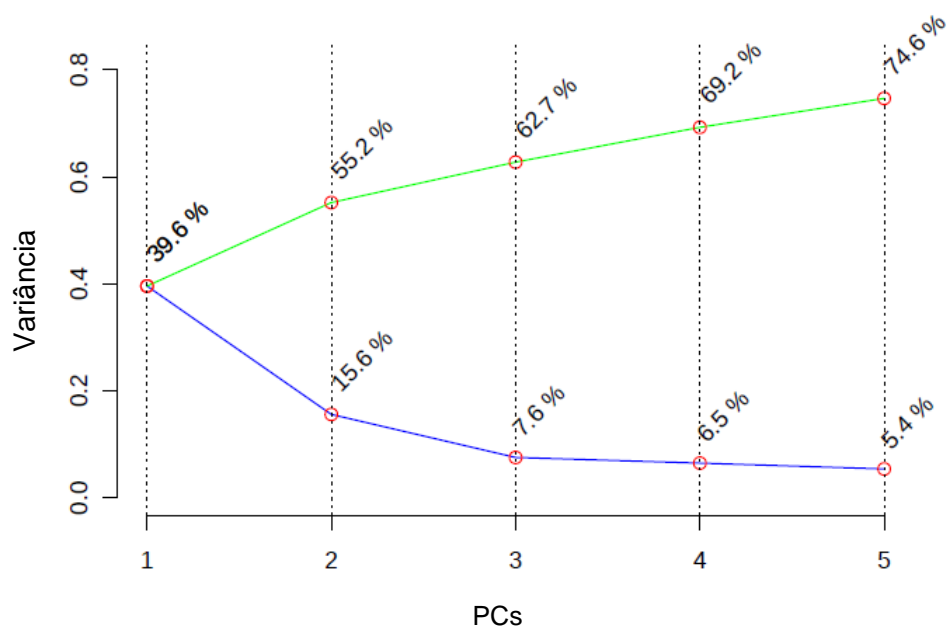


Figura 43– Variação apresentada pelas PCs.

A soma dos valores obtidos para as três primeiras componentes principais (PC1 – 39,6%, PC2 – 15,6% e PC3 – 7,6%) apresenta uma explicação de 62,8% do total da variância do banco de dados.

Quando os resultados são mostrados através do gráfico de escores PC1 *versus* PC2 (Figura 44), nenhum resultado significativo para distinção entre os grupos foi identificado. Os pontos vermelhos representam as mangas *Tommy Atkins* não-irradiadas e os verdes representam as mangas irradiadas.

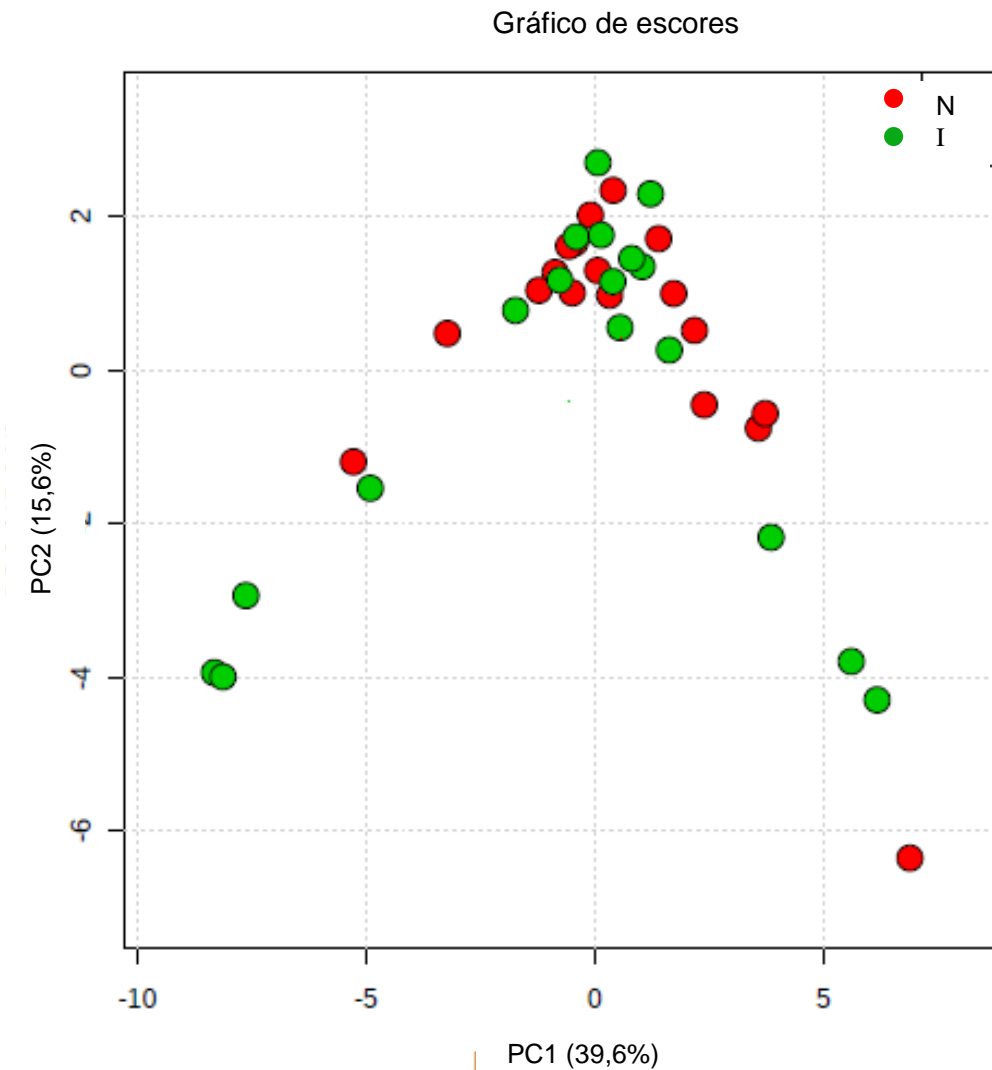


Figura 44 – Gráfico de *scores* PC1 x PC2.

O mesmo pode ser afirmado quando são feitas projeções em 3D usando as PC1, PC2 e PC3 (Figura 45). Não é possível afirmar categoricamente que há uma separação entre as mangas irradiadas e não-irradiadas.

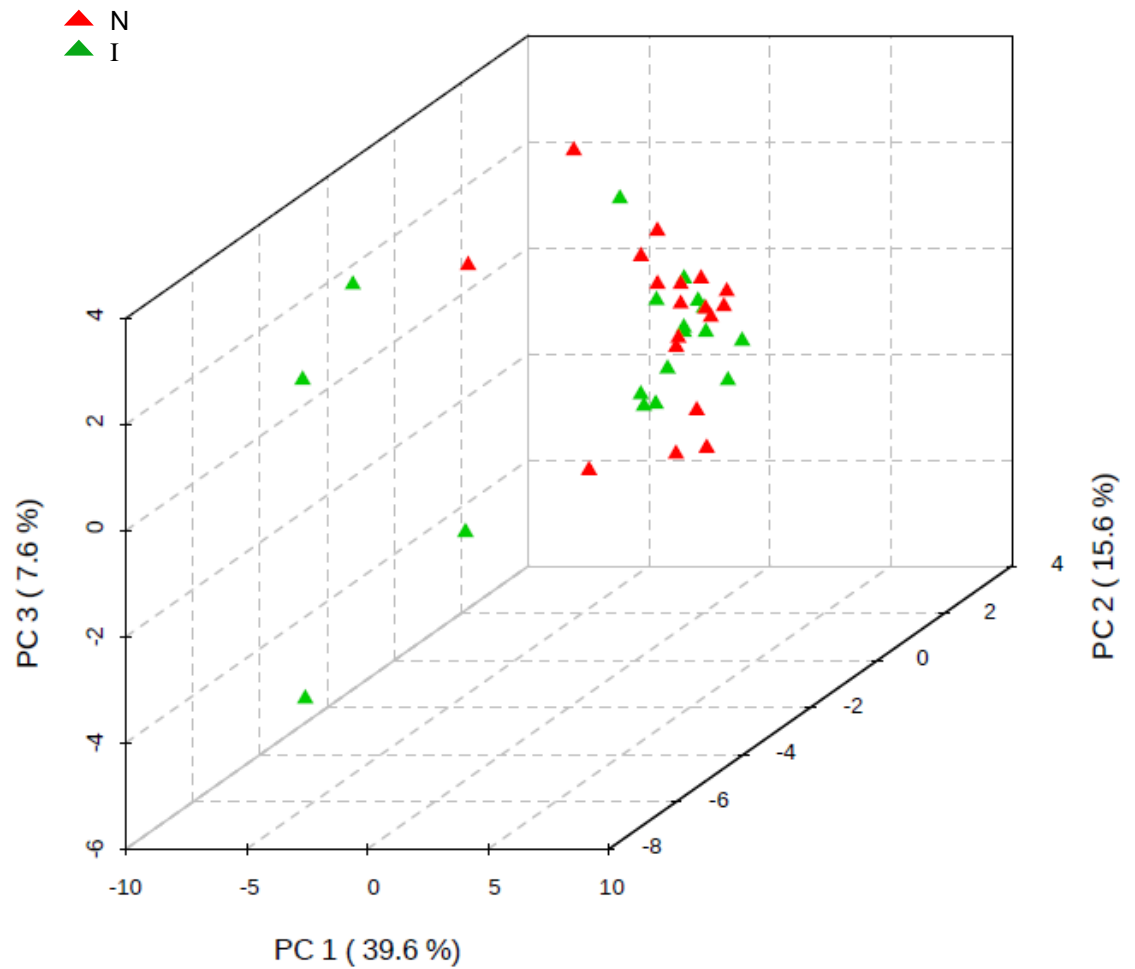


Figura 45 – Gráfico de scores das três principais PCs apresentadas em 3D. O valor das variâncias estão apresentadas em parênteses.

Isso faz com que seja necessário o uso de métodos classificatórios supervisionados como o PLS-DA e KNN.

#### 4.4.2 PLS-DA

A figura 46 apresenta o gráfico de escores utilizando três componentes latentes. Observa-se uma separação, ou tendência de separação entre os grupos representados em vermelho (não-irradiado), e verde (irradiado).

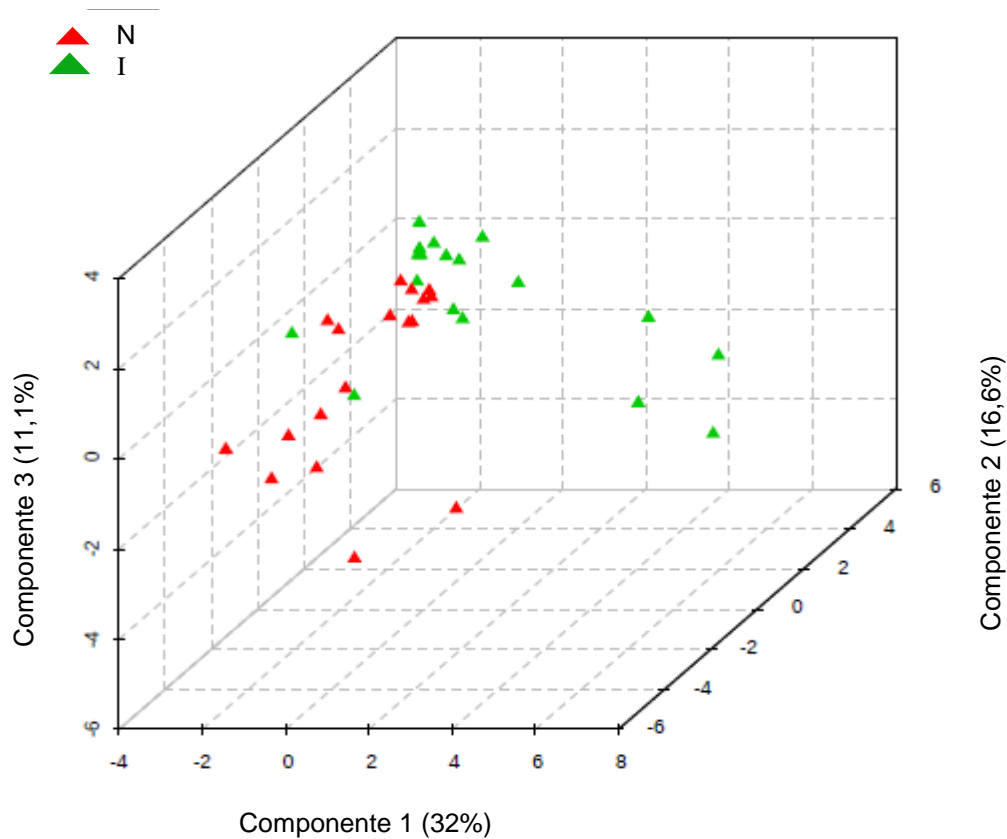


Figura 46 – Gráfico de escores das três variáveis latentes de manga da cultivar *Tommy Atkins*. Os valores das variâncias estão apresentados em parênteses.

Para saber se a separação apresentada é estatisticamente significativa ou é devido ao ruído aleatório, um teste de validação cruzada foi realizado. O resultado da validação cruzada é mostrado no gráfico de paletas (Figura 47), considerando os valores de  $R^2$ ,  $Q^2$  e Acurácia, para diferentes quantidades de componentes (variáveis latentes).

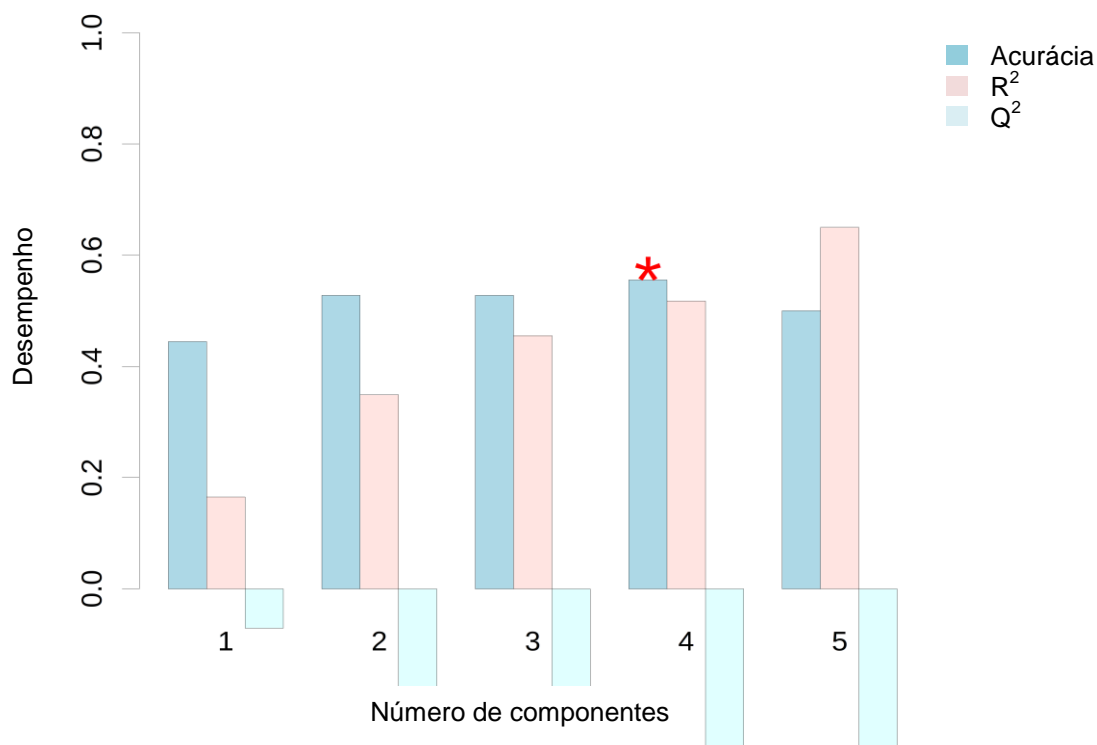


Figura 47– Representação do número de componentes PLS-DA de acordo com R<sup>2</sup>, Q<sup>2</sup> e Acurácia. O asterisco vermelho mostra a acurácia com melhor resultado para o número de componentes.

R<sup>2</sup> e Q<sup>2</sup> são duas medidas de desempenho comuns de avaliação dos modelos PLS-DA, onde R<sup>2</sup> representa a soma dos quadrados capturados pelo modelo, isto é, o coeficiente de correlação quadrado, e Q<sup>2</sup> representa capacidade preditiva [41,77]. A acurácia podemos dizer que é a precisão da validação cruzada. O asterisco em vermelho (\*) indica que o melhor resultado é representado na Acurácia para a utilização de 4 componentes, que foi em torno 55%. Este resultado, apesar de ser melhor que o observado quando utilizamos PCA, ainda é um resultado ruim, pois em tese apresenta um erro de 45%. No entanto, podemos extrair uma informação importante: quais compostos têm maior poder discriminatório entre os grupos. Isto foi realizado considerando os escores VIP (*Variable Importance in Projection*) de cada variável (composto). O escore VIP indica a importância de uma variável para a discriminação entre dois grupos, por exemplo. Sendo assim, ele funciona como uma ferramenta de seleção de variáveis, e é utilizado com frequência para esse fim [97].

No gráfico apresentado na figura 48, destacam-se  $\alpha$ -felandreno, octanoato de etila e o germacreno-D com os maiores escores VIP observados. Em média, o  $\alpha$ -felandreno apresentou-se mais concentrado (relativamente) no odor de mangas irradiadas, enquanto o octanoato de etila e o germacreno-D apresentaram-se mais concentrados no odor de mangas não-irradiadas.

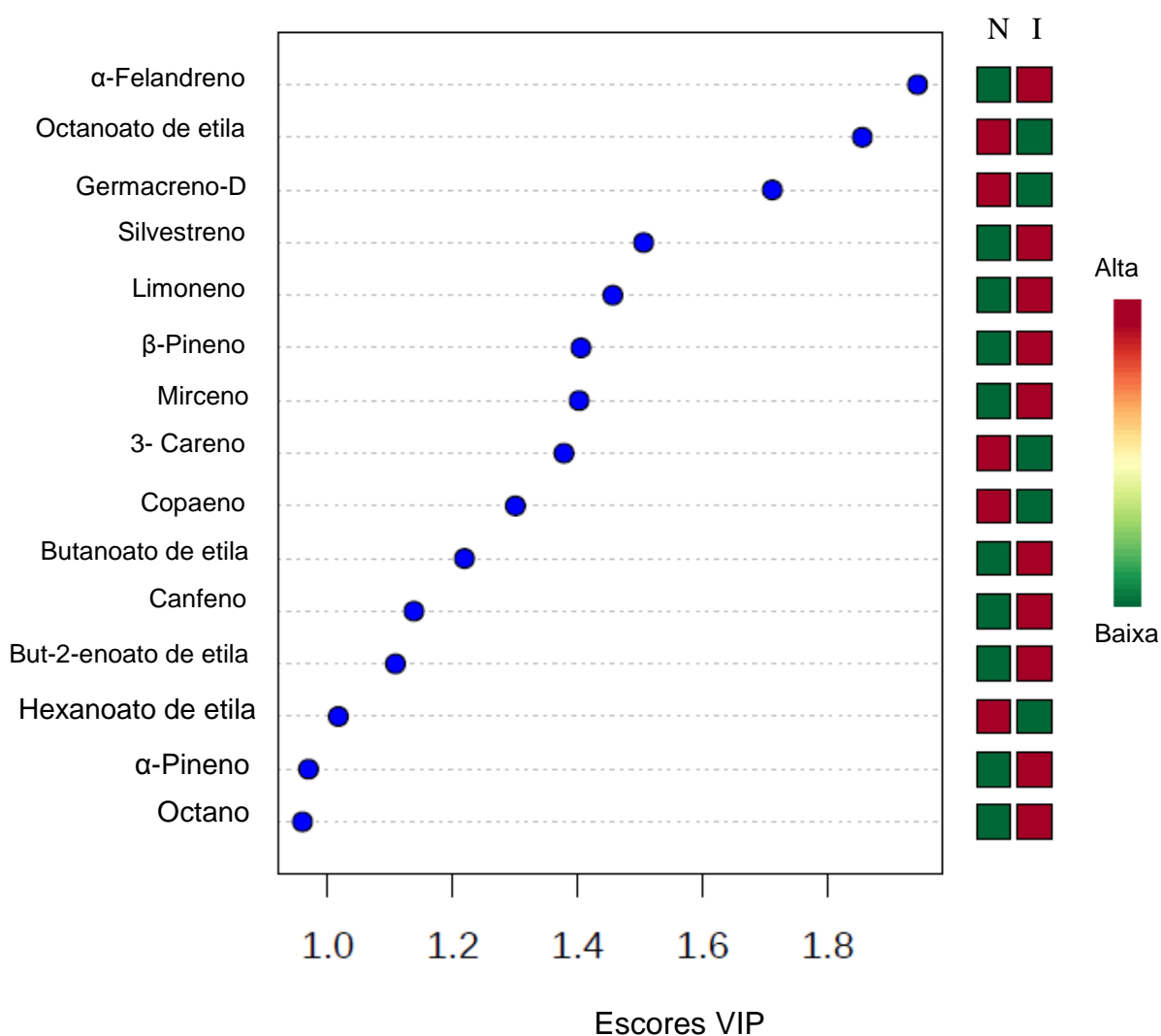


Figura 48- Principais compostos responsáveis pela discriminação entre grupos de mangas da cultivar *Tommy Atkins* irradiadas e não irradiadas identificados por PLS-DA.

#### 4.4.3 KNN

Alternativamente fizemos o uso o uso da análise classificatória pelo KNN.

O KNN classifica a amostra desconhecida, de acordo com sua similaridade em relação às amostras de um conjunto de treinamento [74], onde K é a quantidade de vizinhos mais próximos da amostra desconhecida. O melhor valor de K, ou seja, aquele valor que maximiza o número de classificações corretas, é determinado usando o método de validação cruzada [84]. O procedimento é feito pela exclusão de composto, um por vez do conjunto de treinamento que então é classificado através dos restantes dos compostos. Esse procedimento é feito para diversos valores de K. O número de erros de classificação determina o número de vizinhos ótimos no modelo. No nosso estudo, o melhor K encontrado foi igual a 9 (nove).

O resultado do teste de hipótese múltiplas (Brunner-Munzel) apresentado na Tabela 3, mostra que para um nível de significância  $p < 5\%$ , os compostos voláteis octanoato de etila, germacreno-D e  $\alpha$ -felandreno são os compostos responsáveis pela discriminação entre os grupos de mangas da cultivar *Tommy Atkins* irradiadas e não irradiadas. Esses mesmos três compostos estão bem destacados em relação aos outros no gráfico de escores VIP (Figura 48) do PLS-DA.

Tabela 3 – Teste de hipótese múltiplas com valor crescente de  $p$ .

Variáveis	Valor de $p$	Variáveis	Valor de $p$	Variáveis	Valor de $p$
<b>Octanoato de etila</b>	<b>0,0007</b>	Limoneno	0,3751	$\beta$ -Ocimeno E	0,6873
<b>Germacreno-D</b>	<b>0,0080</b>	Metilciclohexeno	0,3826	Terpinoleno	0,7122
<b><math>\alpha</math>-Felandreno</b>	<b>0,0175</b>	Silvestreno	0,4034	Hexan- 2- ona	0,7370
$\alpha$ -Pineno	0,0535	Canfeno	0,4126	$\gamma$ - Terpineno	0,7442
$\beta$ -Pineno	0,0582	Azuleno	0,4255	$\alpha$ -Humeleno	0,7770
But-2-enoato de etila	0,1140	2,3-dimetil-Hexano	0,4450	2-metil-Heptano	0,7917
Hexanoato de etila	0,1192	$\alpha$ -Terpineno	0,5330	2,4-dimetil-Hexano	0,8023
Mirceno	0,1356	Ciclotrissiloxano	0,5655	Tolueno	0,8376
Cariofileno	0,2278	2,2-dimetil-hexano	0,6180	Terpinoleno	0,8907
$\alpha$ -Tujeno	0,2526	Naftaleno	0,6321	But-2- enoato de etila	0,9104
Butanoato de etila	0,2591	3-metil-Heptano	0,6512	1,3-Ciclohexadieno	1,0000
Copaeno	0,2613	Octano	0,6515	$\alpha$ -Selineno	1,0000
3-Careno	0,3402	2,5-dimetil Hexano	0,6618		

O resultado da validação cruzada *Leave-one-out* (LOOCV), tendo os três compostos discriminantes, apresentado na Tabela 4, mostra uma acurácia de 83% de acerto das mangas pertencentes ao grupo de mangas irradiadas e 79% de acerto para o grupo de mangas não-irradiadas. No geral, a validação cruzada apresentou 81% de acerto para o K=9, resultado seja bastante expressivo se comparado ao apresentado na validação cruzada pelo PLS-DA.

Tabela 4 - Acurácia da validação cruzada do KNN de mangas da cultivar *Tommy Atkins*

Grupo Real	Grupo Estimado		Acurácia
	Irradiado	Não Irradiado	(%)
Irradiado (I)	15	3	83
Não Irradiado (N)	4	15	79

**Fonte:** Dados da pesquisa

Os resultados apresentados pelos dados estatísticos do KNN mostraram mais uma vez, através da média da área relativa visto na Tabela 5, que octanoato de etila e germacreno-D encontram-se em maior concentração relativa nos odores de mangas ao grupo das mangas não-irradiadas, enquanto que  $\alpha$ -felandreno é mais predominante no grupo das mangas irradiadas. Compostos voláteis são responsáveis pela discriminação entre os grupos de mangas irradiadas das não-irradiadas.

Tabela 5 – Média e desvio padrão da área relativa\* do octanoato de etila,  $\alpha$ -Felandreno e germacreno D de mangas da cultivar *Tommy Atkins*

Composto	Grupo	Estatística		
		N	Média	Desvio Padrão
Octanoato de etila	I	18	0,27	0,91
	N	19	2,67	6,39
Germacreno-D	I	18	0,02	0,08
	N	19	1,6	3.96
$\alpha$ -Felandreno	I	18	1,35	1,24
	N	19	0,61	0,68

\* Área relativa após pré-processamento.

O octanoato de etila, o germacreno-D e o  $\alpha$ -felandreno pertencem às classes dos ésteres, sesquiterpenos e monoterpenos, respectivamente. Estes são classes básicas das frutas de modo geral, isto é, fazem parte da composição química dos voláteis de frutas, conforme mostrado na literatura [58,88,94]. Os ésteres (de 3 a 8 átomos de carbono, como o octanoato de etila) são característicos de aromas frutais [54]. Canuto *et al* [90] estudaram o efeito de inibidores de etileno sobre a composição de voláteis a partir de mangas *Tommy Atkins* em diferentes estágios de maturação. Eles observaram a presença de octanoato de etila em um estágio avançado de maturação na ausência de inibidores. Tal observação sugere, no nosso estudo, que a radiação poderia estar atuando como inibidor do etileno.

Com relação ao sesquiterpeno germacreno-D, Canuto *et al.* [58,88] o referenciam apenas como constituinte volátil do odor de manga, característico de grau de maturação intermediária, isto é, de frutos semi-maduros.

O monoterpeno  $\alpha$ -felandreno é pouco citado em estudos com aroma de frutos das cultivares *Tommy Atkins* e *Keitt*. Seu isômero,  $\beta$ -felandreno, contudo é citado [54,,58,88,89]. Blakesley *et al.* [98], em seu trabalho com mangas da cultivar *Kent* irradiadas ou não, estudaram a composição dos compostos voláteis dos frutos e

verificaram não haver nenhuma diferença na composição entre os diferentes tratamentos.

## 5 Conclusões

Diante dos resultados obtidos na presente pesquisa podemos concluir que:

- ✓ Nenhum composto diferente daqueles já citados previamente na literatura foi encontrado nas amostras de aromas de mangas da cultivar *Tommy Atkins* abordadas no presente estudo;
- ✓ Os dois compostos majoritários do aroma de mangas da cultivar *Tommy Atkins* foram 3-careno e  $\alpha$ -pineno;
- ✓ Octanoato de etila, germacreno-D e  $\alpha$ -felandreno foram os constituintes responsáveis pela discriminação entre os aromas de mangas da cultivar *Tommy Atkins* irradiadas e não-irradiadas nos dois tratamentos estatísticos classificatórios;
- ✓ Nas análises multivariadas, a PCA não foi um modelo estatístico ideal para identificar a separação dos grupos irradiados dos não-irradiados;
- ✓ Entre os modelos estatísticos de classificação testados, o KNN apresentou o resultado mais consistente;
- ✓ A acurácia da validação cruzada do KNN foi de 81%, enquanto a do PLS-DA foi de 55%;
- ✓ Foi possível construir um modelo metabolômico para classificar as mangas da cultivar *Tommy Atkins* em função de sua exposição à radiação gama ou não. Os resultados mostraram que há uma relação entre o grau de maturação e os compostos discriminantes (octanoato de etila, germacreno-D e  $\alpha$ -felandreno), para a classificação de mangas da cultivar *Tommy Atkins* irradiadas ou não, o que sugere que a radiação ionizante atua como um inibidor do processo de maturação.

## 6 Perspectiva

Realizar teste de validação da predição do modelo metabolômico através de amostras codificadas de mangas da cultivar *Tommy Atkins* irradiadas e não irradiadas, o qual deverá confirmar a classificação dos grupos das mangas irradiadas e não irradiadas.

## REFERÊNCIAS

- [1] CRUZ, J. N. da. **Estudo de tratamentos fitossanitários na manga (*Mangífera Indica* L.) para exportação**. 2010. 88f. Dissertação (Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear). Ipen-Autarquia Associada a Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2010.
- [2] TORRES, L. B. de V. **Qualidade e conservação pós -colheita de mangas oriundas de sistemas de produção orgânica ou integrada**. 2010. 239f. Tese (Doutorado em Agricultura Tropical) Universidade Federal da Paraíba, Areia, PB, 2010.
- [3] DIAS, M. S. C.; LIMA, L.C.; CASTRO, M. V.; RIBEIRO JUNIOR, P. M.; SILVA, E. de B. Controle da antracnose e qualidade de mangas (*Mangifera indica* L.) cv. Van Dyke, após tratamento hidrotérmico e químico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 2, p. 289–295, 2005.
- [4] MELO, E. de A.; ARAUJO, C. R. de. Mangas das variedades espada, rosa e *Tommy Atkins*: Compostos bioativos e pPotencial antioxidante. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 4, p. 1451–1450, 2011.
- [5] CGEE - Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. **Estudo da Cadeia de Suprimento do Programa Nuclear Brasileiro**. Brasília, 2010, 134p.
- [6] BNB - Banco do Nordeste do Brasil. **Produção e efetivo de manga no nordeste**. 7f. v. 18, Ano 4, 2010..
- [7] BROISLER, P. O. **Simulação do transporte de mangas irradiadas para exportação**. 2007. 99f. Dissertação (Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear). Ipen - Autarquia Associada à Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- [8] IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Quantidade de mangas produzidas por região**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?z=t&c=1613>>. Acessado em 14 jan 2014..
- [9] LUCAFÓ, B. H. S. **Potencial da manga brasileira no mercado internacional**. 2001. 51f. Monografia (Estágio Profissionalizante em Engenharia Agrônoma). - Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz, Universidade de São Paulo. Piracicaba, SP. Nov 2001.
- [10] JAMES, J. B.; NGARMSAK, T. **Processing of fresh-cut tropical fruits and vegetables: A technical guide**. FAO. p. 7–9. 2010.
- [11] SANTOS, R. C. dos; OLIVEIRA, G. B. de. Um estudo sobre o cultivo de frutas como alternativa de desenvolvimento do sub-médio São Francisco. **Revista das Faculdades Santa Cruz**, v.7, n.2, p. 31–48, 2009.

- [12] IBRAF. Instituto Brasileiro de Frutas. Comparativo das exportações brasileiras de frutas frescas. Disponível em: <[http://www.ibraf.org.br/estatistica,est\\_frutas.asp](http://www.ibraf.org.br/estatistica,est_frutas.asp)>. Acessado em: 14 jan 2014.
- [13] XAVIER, I. F.; LEITE, A.G.; MEDEIROS, E. V.; MORAIS, P. L. D. de; LIMA, L. M. Qualidade pós-colheita da manga '*Tommy Atkins*' comercializada em diferentes estabelecimentos comerciais no município de Mossoró-RN. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 22, n. 4, p. 7–13, out-dez 2009.
- [14] SILVA, A. V. C. da; MENEZES, J. B.; Caracterização físico-química da manga '*Tommy Atkins*' submetida a aplicação de cloreto de cálcio pré-colheita e armazenamento refrigerado. **Scientia Agricola**, v. 58, n. 1, p. 67–72, jan-mar 2001.
- [15] SABATO, S. F.; SILVA, J. M. da; CRUZ, J. N. da; SALMIER, S.; RELA, P. R.; LACROIX, M. Study of physical–chemical and sensorial properties of irradiated Tommy Atkins mangoes (*Mangifera indica* L.) in an international consignment. **Food Control**. v. 20, n. 3, p. 284–288, mar. 2009.
- [16] GOMEZ, M. L. P. A.; LAJOLO, F. M.; CORDENUSI, B. R. Metabolismo de carboidratos durante o amadurecimento do mamão (*Carica papaya* L. Cv. Solo): Influência da radiação gama. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 19, p. 246–252, may-aug, 1999. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20611999000200017>. Acesso em: 16 Abr 2013.
- [17] SABATO, S. F.; SILVA, J. M. da; CRUZ, J. N. da; BROILER, P. O.; RELA, P. R.; SALMIERE, S.; LACROIX, M. Advances in commercial application of gamma radiation in tropical fruits at Brazil. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 78, n. 7–8, p. 655–658, Jul 2009.
- [18] FAO - Food and Agriculture Organization. **ISPM 18**: International standards for phytosanitary measures. Guidelines for the use of irradiation as a phytosanitary measure. April 2003. Modificada em: August 2011. p.9-15.
- [19] ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC n. 21, 26 jan 2001. p. 3–5.
- [20] MOY, J. H. Tropical fruit irradiation – from research to commercial application. in: International Symposium "New Frontier of Irradiated food and Non-Food Products". Bangkok, 2005, p. 22–23.
- [21] ICGFI - International Consultative Group on Food Irradiations. Facts about food irradiation. p 3-53. 1999
- [22] MOSTAFAVI, H. A.; FATHOLLAHI, H.; MOTAMEDI, F.; MIRMAJLESSI. Food irradiation : Applications, public acceptance and global trade. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 20, p. 2826–2833, May 2010.

- [23] <<http://www.cena.usp.br/irradiacao/principios.htm>>. **Divulgação da tecnologia de irradiação e de alimentos e outros materiais**. Consultado em 18 de maio de 2013.
- [24] <<http://www.cena.usp.br/irradiacao/irradiador.htm>>. **Modelo de irradiador com fonte de  $^{60}\text{Co}$** . Consultado em 18 de maio de 2013.
- [25] BUSTOS-GRIFFIN, E.; HALLMAN, G. J.; GRIFFIN, R. L. Current and potential trade in horticultural products irradiated for phytosanitary purposes. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 81, n. 8, p. 1203–1207, 2012.
- [26] [FLORIANO, C.M. **Conservação pós-colheita de frutos do maracujazeiro-doce irradiados**. 2004. 65f. Dissertação (Mestre em Ciências) - Universidade Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2004.
- [27] Codex Alimentarius. **Codex Stan 106**: General standard for irradiated foods. 1983. Revisado jan-2003. p. 1–10. Disponível em: <http://www.piwet.pulawy.pl/irradiacja/codexalimentarius1.pdf>. acesso em: 10 jan 2014.
- [28] LOAHARANU, P. Food irradiation: Facts or fiction?. **IAEA- International Atomic Energy Agency**. Buletin. Fev 1990.
- [29] SILVA, R. O. da. **A Espectroscopia de RMN como ferramenta elucidativa: estruturas moleculares, mecanismos de reação e metabonômica**. 2010. 231p. Tese (Doutor em Química) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 2010.
- [30] DUNN, W. B.; ELLIS, D. I. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 24, n. 4, p. 285–294, Apr. 2005.
- [31] BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**. v. 33, n. 1, p. 229–239, 2010.
- [32] WISHART, D. S. Metabolomics: Applications to food science and nutrition research. **Trends in Food Science & Technology**. v. 19, n. 9, p. 482–493, September. 2008.
- [33] KOEK, M. M.; JELLEMA, R. H.; GREEF, J. VAN DER; TAS, A. C.; HANKEMEIR, T. Quantitative metabolomics based on gas chromatography mass spectrometry: status and perspectives. **Metabolomics** : . v. 7, n. 3, p. 307–328, Sep. 2011.
- [34] Lu, XIN; ZHAO, X.; BAI, C.; ZHAO, C.; LU, G.; XU, G. LC-MS-based metabonomics analysis. **Journal of chromatography. B**, v. 866, n. 1–2, p. 64–76, April. 2008.

- [35] NOBELI, I.; THORNTON, J. M. A bioinformatician's view of the metabolome. **BioEssays**. v. 28, n. 5, p. 534–45, May 2006.
- [36] CAVALCANTE, J. M. **Avaliação dos efeitos do tratamento térmico sobre o suco de melão: Uso da metabolômica**. 2010. 66f. Dissertação (Mestre em Engenharia Química) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 2010.
- [37] FRAIGE, K. **Estudo comparativo do perfil metabolômico e proteômico de uvas (*Vitis vinifera*) durante o processo de maturação utilizando ferramentas bioanalíticas**. 2012. 227f. Tese (Doutor em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Carlos, SP.2012.
- [38] [KUHNEN, S. **Metabolômica e bioprospecção de variedades de milho crioulas e locais de milho**. 2007. 267f. Tese (Doutor em Recursos SC. 2007.
- [39] LEON, C.; RODRIGUEZ-MEIZOSO, I.; LUCIO, M.; GRACIA-CANAS, V.; ALBANES, E.; SCHMITT-KOPPLIN, P.; CIFUENTES, A. Metabolomics of transgenic maize combining fourier transform-ion cyclotron resonance-Mass spectrometry, capillary electrophoresis-mass spectrometry and pressurized liquid extraction. **Journal of chromatography, A**. v. 1216, n. 43, p. 7314–23, Oct. 2009
- [40] RIBEIRO, A. S.; GOUVEIA, L. R.; BARROS, C. J. P.; FIRMINO, R. A.; SILVA, R. O. Discriminating gamma-irradiated soybean seeds by <sup>1</sup>H NMR-based metabonomics. **Food Control**. v. 36, n. 1, p. 266–272, Feb. 2014.
- [41] [THISSEN, U.; COULIER, L.; OVERKAMP, K. M.; JETTEN, J.; WERFF, B. J. C.; VEN, T. VAN de; WERF, M. J. VAN DER. Proper metabolomics strategy supports efficient food quality improvement: A case study on tomato sensory properties. **Food Quality and Preference**. v. 22, n. 6, p. 499–506, Sep. 2011.
- [42] Almeida, C; Duarte, I. F.; Barros, A.; Rodrigues, J.; Sprau, M.; Gil, A. M. Composition of beer by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy: effects of brewing site and date of production. **Journal of agricultural and food chemistry**. v. 54, n. 3, p. 700–6, Feb. 2006.
- [43] ABDELNUR, P. V. Metaboômica e espectrometria de massas. **Embrapa - Circular Técnica**. Brasília, DF, n.10, p. 1- 4, Dez 2011. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/917736/1/CITE10.pdf>. Acesso em: 10 jan 2014.
- [44] LEI, Z.; HUHMANN D. V.; SUMMER, L. W. Mass spectrometry strategies in metabolomics. **The Journal of biological chemistry**, v. 286, n. 29, p. 25435–42, Jul. 2011.
- [45] ABDELNUR, P. V. Imageamento químico por espectrometria de massas utilizando MALDI (MALDI Imaging Mass Spectrometry) aplicado a tecidos vegetais. **Embrapa - Circular Técnica**. Brasília, DF, n.6, p. 1- 6, Junho 2011.

- [46] PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**, 4. Ed. Washington: Cengage Learning Edições Ltda, p. 399 - 478. 2010.
- [47] SKOOG; Hooller; Crouch, **Princípios de análise instrumental**, 6. Ed. p. 564–598.
- [48] BRAITHWATE, A.; SMITH, F. J. **Chromatographic-methods**. 5. ed. Kluwer Academic Publishers, p. 2. 1999. Reimpresso 1999.
- [49] COLLINS. C. H.; BRAGA, G.; L.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatógrafos**, 7. Ed. Editora da Unicamp, p. 143–149. 1997.
- [50] CARRILHO, E.; TAVARES, M. C. H.; e LANÇAS, F. M. Fluidos supercríticos em química analítica. I. Cromatografia com fluido supercrítico: Conceitos termodinâmicos. **Química Nova**. São Paulo, SP, v. 24, n. 4, p. 509–515. Jul./Ago.2001.
- [51] PINO, J. A.; MESA, J.; MUNOZ, Y.; MARTÍ, M. P. Volatile components from mango (*Mangifera indica* L.) cultivars. **Journal of agricultural and food chemistry**.v. 53, n. 6, p. 2213–2223, Mar. 2005.
- [52] LI, F.; WANG, J.; NIE, L.; ZHANG, W. Computational methods to interpret and integrate metabolomic data. **Metabolomics**. p.100-102. Fev. 2012.
- [53] SIMÕES, D. R. S.; WASZCZYNSKYJ, N.; WOSIACKI, G. Aromas em maçãs , suco e sidra. **Boletim CEPPA**, v. 27, n. 1, p. 153–172, 2009.
- [54] LOPES, D. C.; FRAGA, S. R.; REZENDE, C. M. Principais substâncias responsáveis pelo aroma de mangas comerciais brasileiras identificadas por cromatografia gasosa de alta resolução/olfatometria/espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 22, n. 1, p. 31–36, 1999.
- [55] BASTOS, D. H. M.; FRANCO, M. R. B.; SILVA, A. A. P. da; JANZANTTI, N. S.; MARQUES, M. O. M. Composição de voláteis e perfil de aroma e sabor de méis de eucalipto e laranja. **Ciênc. Tecnol. Aliment**. Campinas, SP,v. 22, n. 2, p. 122–129, 2002.
- [56] FACUNDO, H. V. de V.; GARRUTI, D. dos S.; ALVES, V. C. C.; CORDENUSI, B. R.; LAJOLO, F. M. Procedimento para análise de compostos voláteis de banana pela técnica de microextração em fase sólida. **Embrapa Agroindústria Tropical**. Fortaleza, CE, n. 149, p.1-19. Novembro 2011.
- [57] CANUTO, K. M.; GARRUTI, D. dos S.; MAGALHÃES, H. C. R.; Microextração em fase sólida: Método analítico prático para extração de compostos voláteis de frutas. **Embrapa Agroindústria Tropical**. Fortaleza, CE, n. 166, p.1-5, Abril 2011.

- [58] CANUTO, K. M.; NETO, M. A. de S.; GARRUTI, D. dos S. Composição química volátil, em diferentes estádios de maturação, de manga 'Tommy Atkins' produzida no Vale do São Francisco., **Química Nova**. v. 32, n. 9, p. 2377–2381, 2009.
- [59] PONTES, M.; MARQUES, J. C.; CÂMARA, J. S. Headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-quadrupole mass spectrometric methodology for the establishment of the volatile composition of *Passiflora* fruit species. **Microchemical Journal**. v. 93, n. 1, p. 1–11, Sep. 2009.
- [60] MOALEMIYAN, M.; VIKRAM, A.; KUSHALAPPA, A. C.; YAYLAYAN, V. Volatile metabolite profiling to detect and discriminate stem-end rot and anthracnose diseases of mango fruits. **Plant Pathology**, v. 55, n. 6, p. 792–802, Dec. 2006.
- [61] LEBRUN, M.; PLOTTO, A.; GOODNER, K.; DUCAMP, MARIE-NOELLE; BALDWIN, E. Discrimination of mango fruit maturity by volatiles using the electronic nose and gas chromatography. **Postharvest Biology and Technology**. v. 48, n. 1, p. 122–131, Apr. 2008.
- [62] ALBUQUERQUE, R. D. D. G.; **Estudo fitoquímico e biológico de folhas da espécie vegetal *xylopia ochrantha* (Mart.)**. 2013, 94f. Dissertação (Mestre em Pesquisa e desenvolvimento de Produtos para a Saúde) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, 2013.
- [63] BARATA, G. Com Ciência: Revista Eletrônica de Jornalismo Científico. Entrevista com Roman Kaiser. Set. 2007. Disponível em: <<http://comciencia.br/comciencia/?section=8&tipo=entrevista&edicao=28>>. Acesso em: 03 de julho de 2013
- [64] MARIA, C. A. B. de; MOREIRA, R. F. A. Compostos voláteis em méis florais," **Química Nova**. São Paulo, SP. v. 26, n. 1, p. 90–96, Jan./Fev. 2003.
- [65] GOBATO, E. A. A. F.; LANÇAS, F. M. Comparação entre injeção na coluna ('on-Column') e headspace dinâmico na determinação de benzeno, tolueno e xileno (BTX) em amostras de água. **Química Nova**. v. 24, n. 2, p. 176–179, Mar./Apr. 2001.
- [66] NAVARRO, M.; SENA, V. L. M.; SRIVASTAVA, R. M.; NAVARRO, D. M. do A. F. Atualizando a Química Orgânica Experimental da Licenciatura. **Química Nova**. v. 28, n. 6, p. 1111–1115, Dez. 2005.
- [67] BRITO, G. **Tipificação de méis do Estado de Sergipe através do perfil químico dos compostos voláteis obtidos por headspace dinâmico seguido por cromatografia em fase casosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM)**. 2012. 74f. Dissertação (Mestre em Química) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE, 2012.
- [68] SCHULER, A. **Cromatografia a Gás e a Líquido**. 12.ed. 2010.

- [69] NUNES, T. F. V. **Emissões biogênicas de hidrocarbonetos não metano**. Contribuição para a determinação das taxas de emissão de compostos orgânicos voláteis (COVs) pelos ecossistemas florestais. 1996. 225f. Tese (Doutor em Ciências aplicadas ao meio ambiente) - Universidade de Aveiro., Portugal, 1996.
- [70] GRABOWSKA-POLANOWSKA, B.; FABER, J.; SKOWRON, M.; MIARKA, P.; PIETRZYCKA, A.; SLIWKA, I.; AMANN, A. Detection of potential chronic kidney disease markers in breath using gas chromatography with mass-spectral detection coupled with thermal desorption method. **Journal of chromatography A**. v. 1301, n. 2, p. 179–89, Aug. 2013.
- [71] SCHIMER, W. N.; LISBOA, H. de M. MOREIRA, R. F. P. M.; QUADROS, M. E. Avaliação da força de retenção de compostos orgânicos ( COV ) em nanoestruturas de carbono "Cup Staked". **Tecno-Lógica**. Santa Cruz do Sul, RS, v.12, n. 2, p. 31–36, Jul./Dez. 2008.
- [72] Tenax<sup>®</sup> TA Adsorbent resin for trapping volatiles, in: SIS Catalog Online, Scientific Instrument Services, Inc., Ringoes, NJ, USA, Disponível em: <http://www.sisweb.com/catalog/08/C16>. Acesso em 24 set. 2013.
- [73] BRUNS, R. E.; FAIGLE, J. F. G. Quimiometria. **Química Nova**, p. 84 – 99, Abril 1985.
- [74] [BARROS NETO, B. de; BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S.; 25 anos de quimiometria no Brasil. **Química Nova**. v. 29, n. 6, p. 1401–1406, Dez. 2006.
- [75] SOUZA, A. M. de; POPPI, R. J. Experimentos didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho e análises de componentes principais: Um tutorial, Parte I. **Química Nova**. v. 35, n. 1, p. 223–229, 2012.
- [76] CORREIA, P. R. M.; FERREIRA, M. M. C. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: Explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. **Química Nova**, São Paulo, SP, v. 30, n. 2, p. 481–487, Mar./Apr. 2007.
- [77] XIA, J.; WISHART, D. S. Web-based inference of biological patterns functions and pathways from metabolomic data using Metaboanalyst. **Nature Protocols**. v. 6, n. 6, p. 743 – 760, 2011.
- [78] AZIZAN, K. A.; BAHARUM, S. N.; RESSOM, H. W.; NOOR, N. M. GC-MS analysis and PLS-DA validation of the trimethyl silyl-derivatization techniques. **American Journal of Applied Sciences**. v. 9, n. 7, p. 1124–1136, 2012.
- [79] [WESTERHUIS, J. A.; HOEFSLOOT, H. C. J.; SMIT, S.; VIS, D. J.; SMIDE, A. K.; VELZEN, E. J. J. VAN; DUIJNHOF, J. P. M. VAN; DORSTEN, F. A. VAN. Assessment of PLS-DA cross validation. **Metabolomics**. v. 4, n. 1, p. 81–89, Jan. 2008.

- [80] PÉREZ-ENCISO, M.; TENENHAUS, M. Prediction of clinical outcome with microarray data: a partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) approach. **Hum genet.** v. 112, n. 5–6, p. 581–92, May 2003.
- [81] FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; VOLPE, P. L. O. Quimiometria I\_ calibração multivariada, um tutorial.pdf. **Qumica Nova**, v. 22, n. 5, 1999.
- [82] BRERETON, R. G.; **Chemometrics: data analysis for the laboratory and chemical Plant**, v. 8, p. 0–471, 2003.
- [83] LUO, W.; HUAN ,S.; FU,H.; WEN G.; CHENG, H.; ZHOU, J., WU, H.; SHEN G.; YU, R. Preliminary study on the application of near infrared spectroscopy and pattern recognition methods to classify different types of apple samples. **Food Chemistry**, v. 128, n. 2, p. 555–561, Sep. 2011.
- [84] MOTA, S. G. R. **Ensaio in vitro e análise quimiométrica de inibidores da enzima lanosterol 14 alfa- desmetilase de monoliophthora perniciosa**. 2009. 79f. Dissertação (Mestre em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Feira de Santana, BA, 2009.
- [85] EMBRAPA - Semiárido. **Foto do grau de maturacao da manga**. 2004. Disponível.<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Manga/CultivodaMangueira/colheita.htm>>. Acessado em: jun 2013
- [86] ADAMS, R. P. **Identification of Essencial Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**, 4<sup>a</sup> ed. Allured Publishing Corporation, 2007.
- [87] LYRA, W. da S.; SILVA, E.C. da; ARAÚJO, M. C. U. de; FRAGOSO, W. D. Classificação periódica: Um exemplo didático para ensinar análise de componentes. **Química Nova**,
- [88] Franco, D. M. R. B.; Lanças, F. M.; Rodrigues Amaya, D. Compostos Voláteis de Três Cultivares de Manga (*Mangifera indica* L.). v. 24, n. 2, p. 165–169, 2004.
- [89] MACLEOD, A. J.; SNYDER, C. H. Volatile Components of Two Cultivars of Mango from Florida. v. 33, p. 380–384, 1985.
- [90] CANUTO K. M; SOUZA NETO, M. A. de; GARRUTI, D. dos S. Avaliação do uso de Inibidores de Etileno sobre a produção de Compostos Voláteis e de Mangiferina em Manga. **Química Nova**, vl. 33, n. 7, p. 1535–1540, 2010.
- [91] MARTINELI, M.; ALVES, A. A. R.; FIGUEIREDO, G. M. de; RESENDE, C. M. de; FONSECA, M. J. de O. Caqui cv 'Mikado': Análise de compostos voláteis em frutos adstringentes e destanizados. **Ciência Rural**. Santa maria, RS, v. 43, n. 8, p. 1516–1521, Ago. 2013.

- [92] MIYAZAWA, T. M. **Compostos voláteis da uvaia**. 2009, 109f. Dissertação (Mestre em Alimentose Nutrição) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, SP, 2009.
- [93] NARAIN, N.; Compostos voláteis dos frutos de maracujá (*Passiflora edulis* forma *Flavicarpa*) E DE CAJÁ (*Spondias mombin* L.) obtidos pela técnica de headspace dinâmico., **Ciênc. Tecnol. Aliment.**.Campinas, SP, v. 24, n. 2, p. 212–216, Abr./Jun. 2004.
- [94] CORDEIRO, M. W. S. **Caracterização física e química de frutos de pequiizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) de diferentes regiões do Estado de Mato Grosso**. 2012, 51f. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, 2012.
- [95] SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**, 6 Ed. LTC - Livros Técnicos e Científicos Editora S.A, p. 2 - 36. 2000.
- [96] STELIOPOULOS, P.; MOSANDL, A. Electron impact-induced fragmentation of the sesquiterpene germacrene D. **Eur. J. Mass Spectrom**, v. 7, n. 6, p. 503–508, 2001.
- [97] CHONG, II-GYO; JUN, CGI-HYUCK. Perfomance of some variable selection methods when multicollinearity is present. *Chemometrics and Intelligent Laboratory*. vol 78, p. 103-112, 2005.
- [98] BLAKESLEY, C. N.; LOOTS, J. G, de.  $\gamma$  irradiation of subtropical fruits . 2. Volatile components, lipids, and Amino Acids of Mango, Papaya, and Strawberry Pulp. **J. Agric. Food Chem**. v 27, n. 1, p. 42–48, 1979.

## Apêndice A

A comparação entre dos espectros de massas dos compostos voláteis das amostras de mangas da cultivar *Tommy Atkins* irradiadas e não irradiadas com a literatura Adams [86] são mostrados a seguir e estão distribuídos da seguinte forma: Os três (03) primeiros espectros dos compostos voláteis representam os que foram responsáveis pela discriminação entre as mangas irradiadas e não irradiadas, e os dois espectros seguintes, representam os principais compostos majoritários. O restante dos espectros de massas estão na sequência de acordo com a Tabela 2 do Item 4.2.1.

### Octanoato de etila

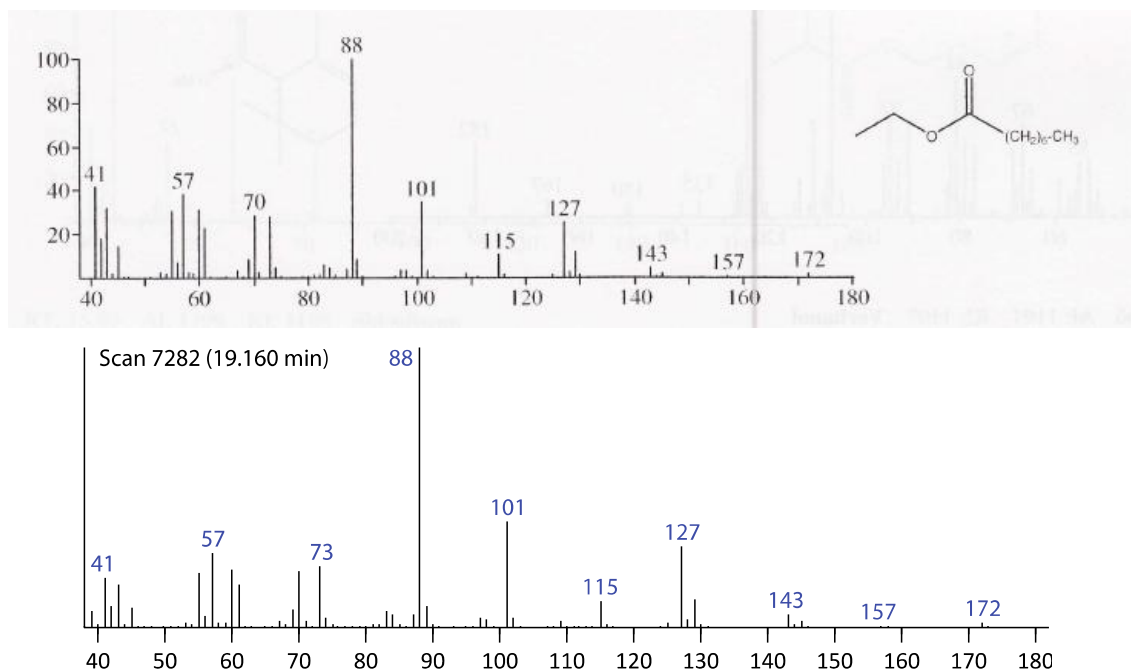


Figura 13 – Espectro de massas do Octanoato de etila entre a literatura Adams [86] (superior) e a amostra (inferior).

## Germacreno-D

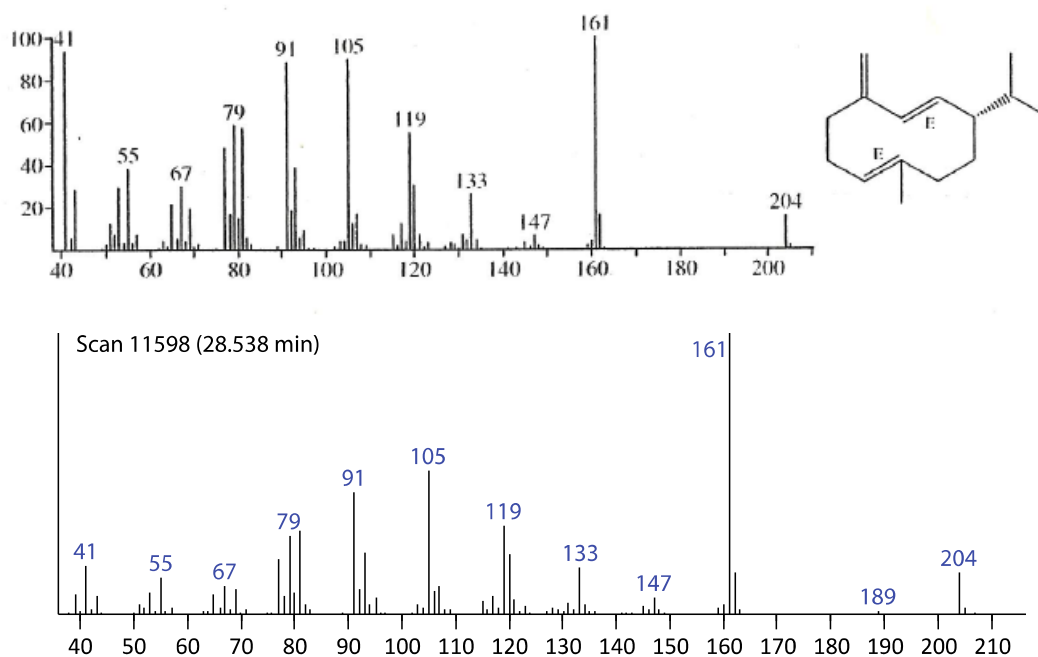


Figura 14 – Espectro de massas do Germacreno-D da literatura Adams [86] (superior) e da amostra (inferior).

## $\alpha$ -Felandreno

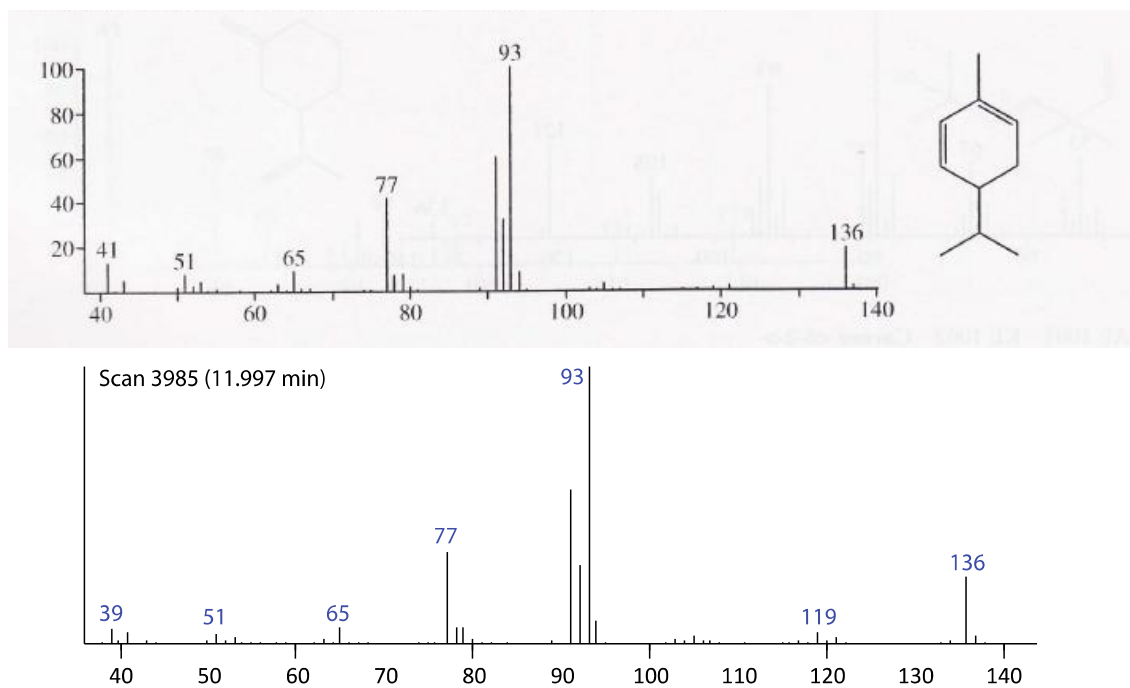


Figura 15 – Espectro de massas do  $\alpha$ -Felandreno da literatura Adams [86] (superior) e da amostra (inferior).

### 3- Careno

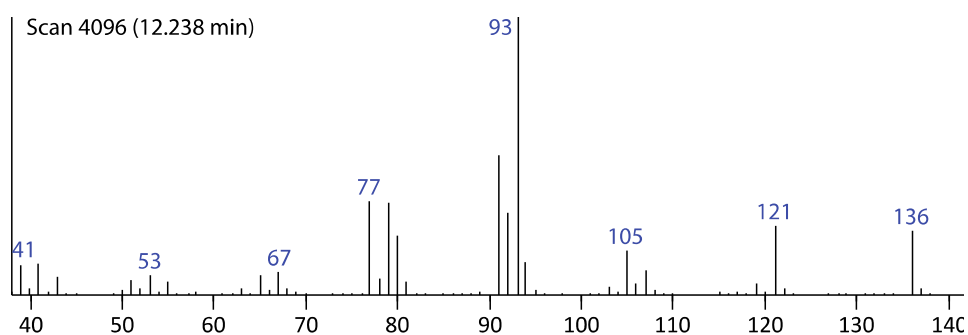
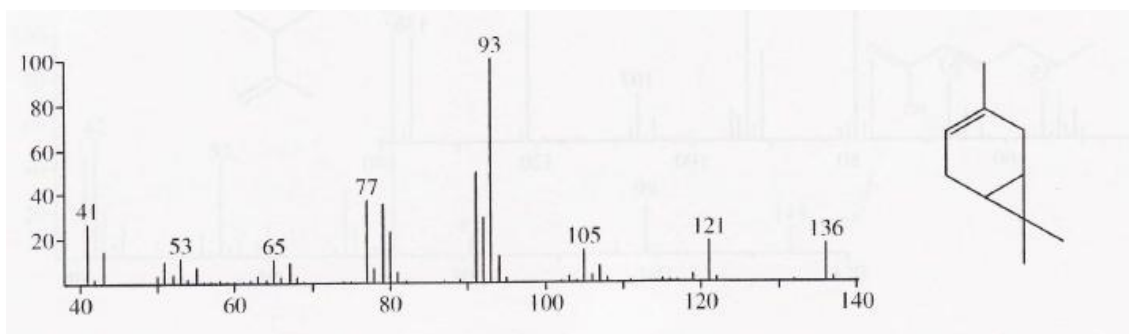


Figura 16 – Espectro de massas do 3-Careno da literatura Adams [86] (superior) e da amostra (inferior).

### $\alpha$ -Pineno

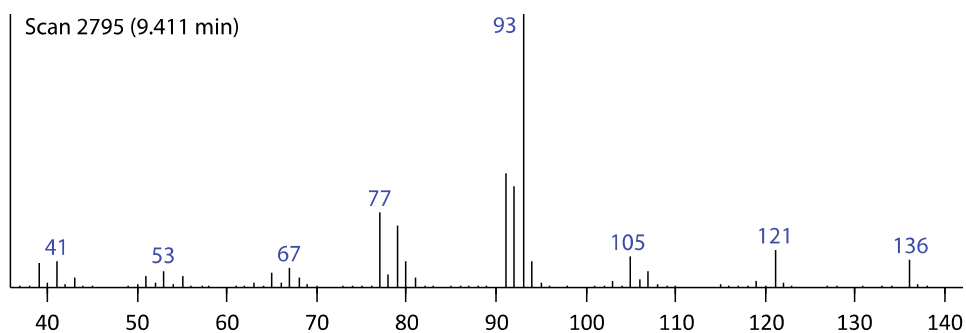
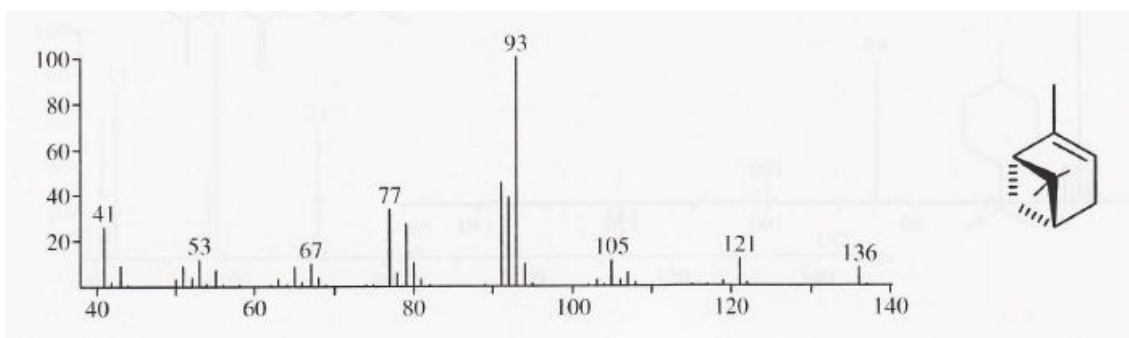


Figura 17 – Espectro de massas do  $\alpha$ -Pineno da literatura Adams [86] (superior) e da amostra (inferior).

## Butanoato de etila

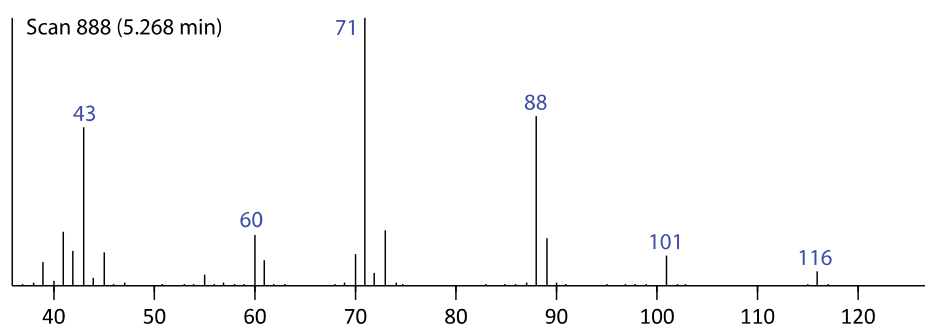
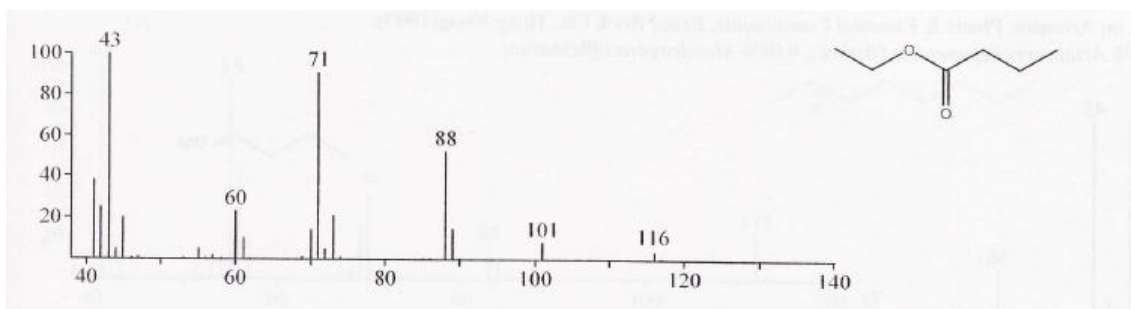


Figura 18 – Espectro de massas do Butanoato de etila da literatura Adams [86] (superior) e da amostra (inferior).

## Canfeno

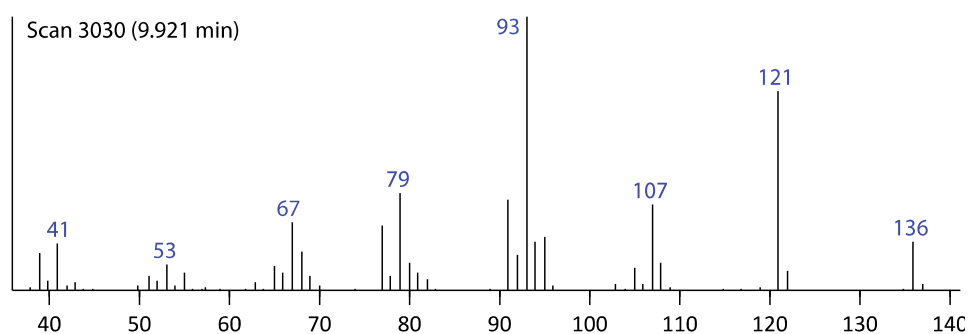
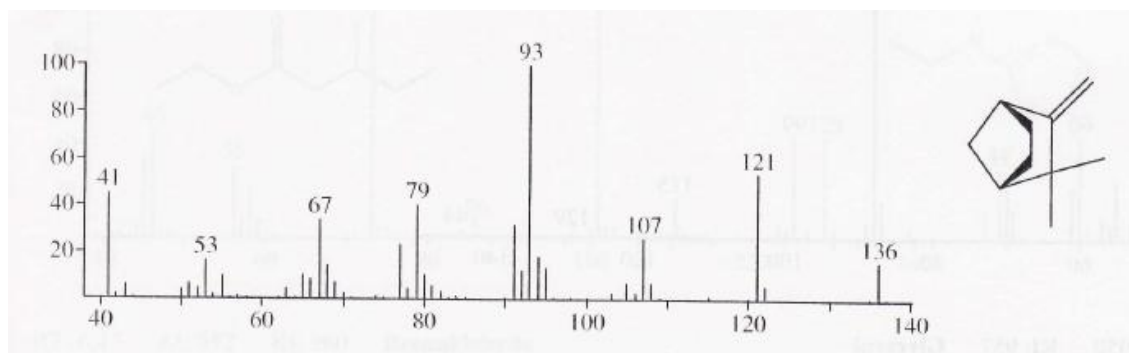


Figura 19 – Espectro de massas do Canfeno da literatura Adams [86] (superior) e da amostra (inferior).

### $\beta$ – Pineno

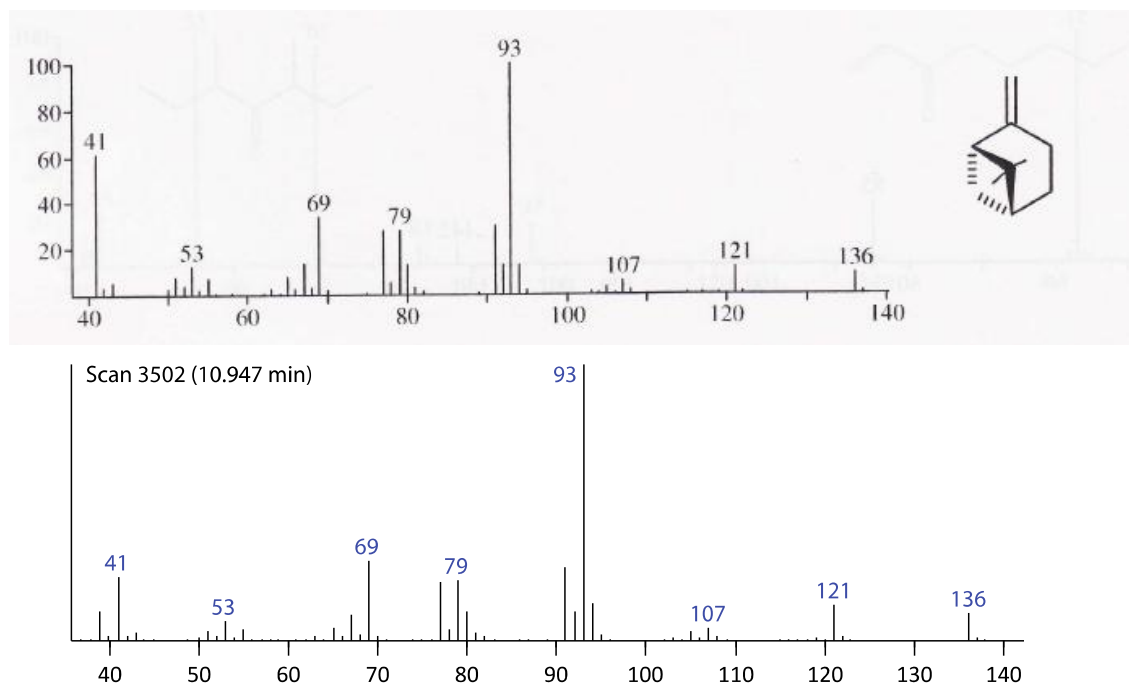


Figura 20 – Espectro de massas do  $\beta$  – Pineno da literatura Adams [86] (superior) e da amostra (inferior).

### $\beta$ – Mirceno

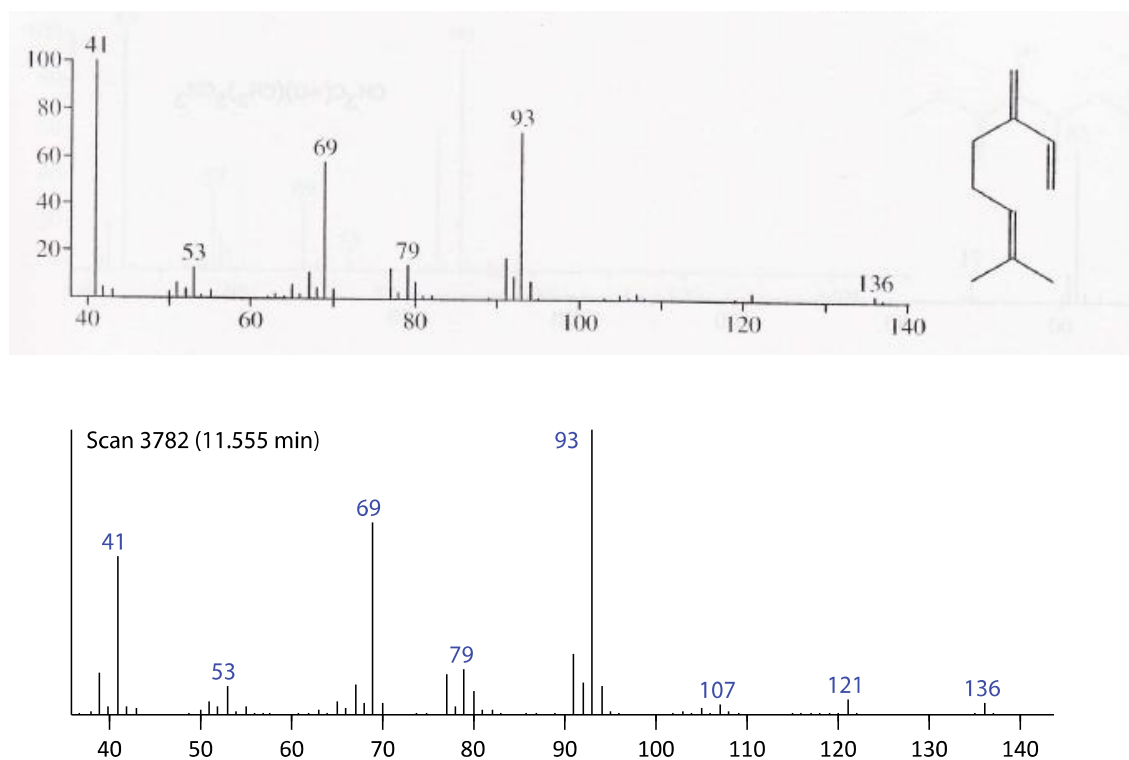


Figura 21 – Espectro de massas do  $\beta$  – Mirceno da literatura Adams [86] (superior) e da amostra (inferior).

### Hexanoato de etila

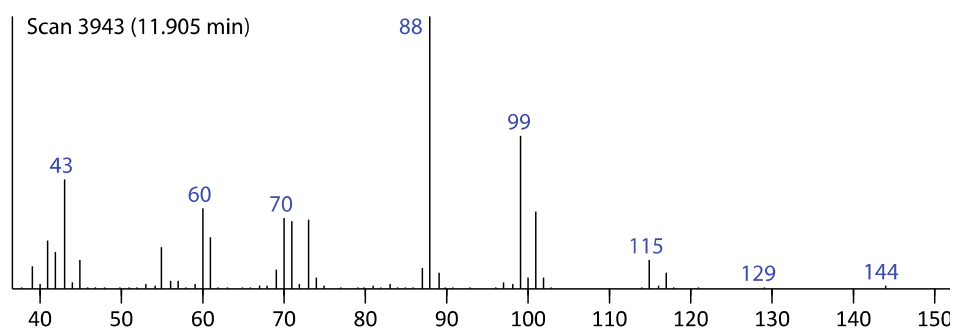
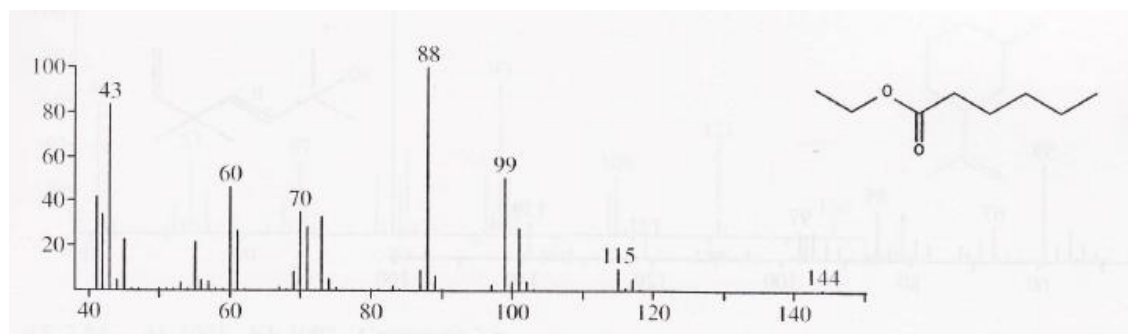


Figura 22 – Espectro de massas do Hexanoato de etila da literatura Adams [86] (superior) e da amostra (inferior).

### $\alpha$ -Terpineno

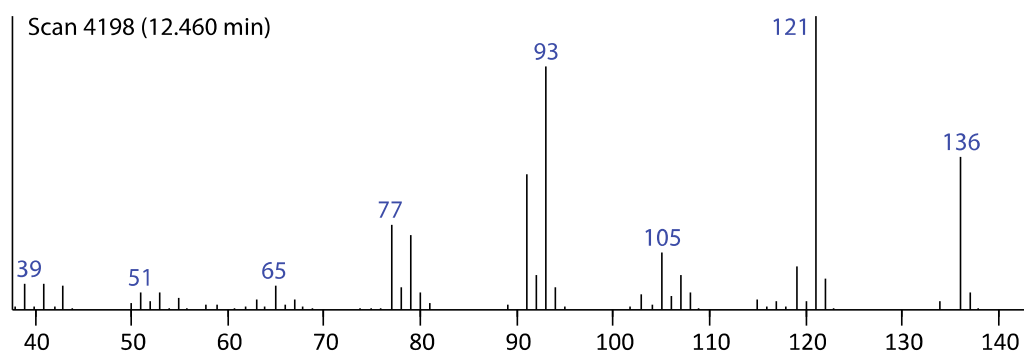
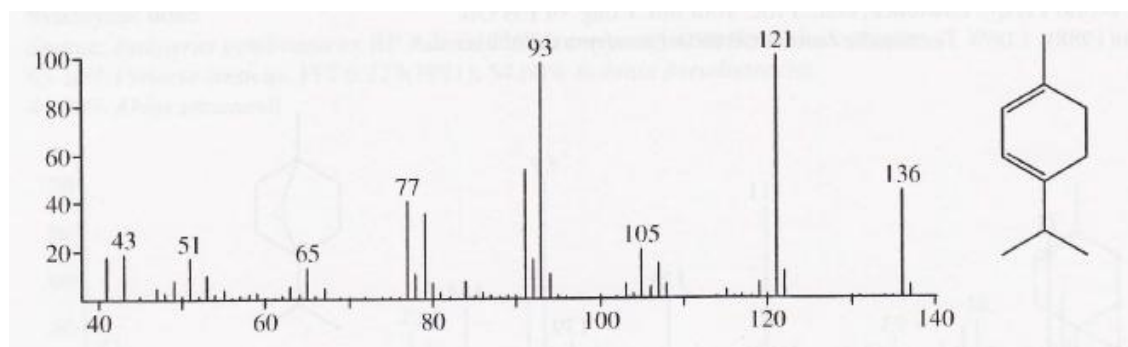


Figura 23 – Espectro de massas do  $\alpha$ -Terpineno da literatura Adams [86] (superior) e da amostra (inferior).

## Limoneno

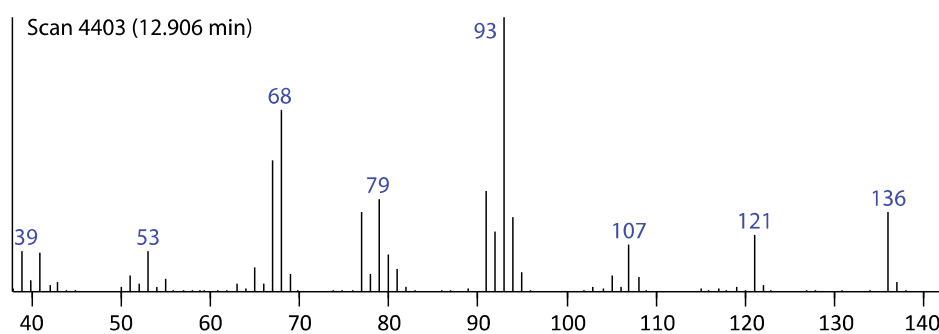
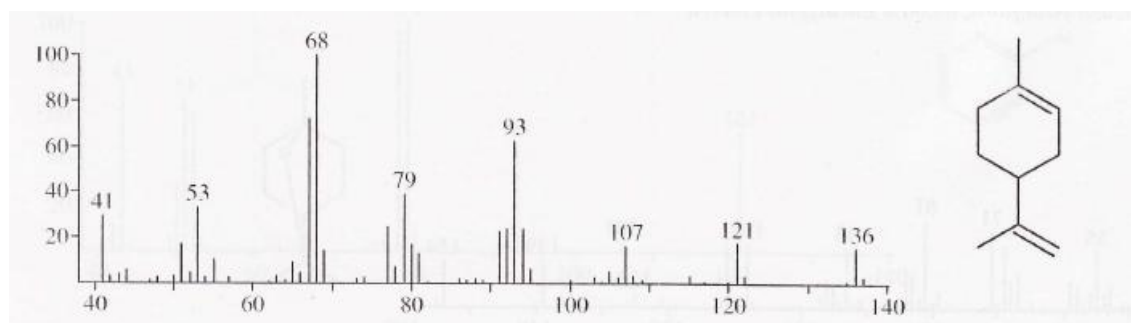


Figura 24 – Espectro de massas do Limoneno da literatura Adams [86] (superior) e da amostra (inferior).

## $\gamma$ -Terpineno

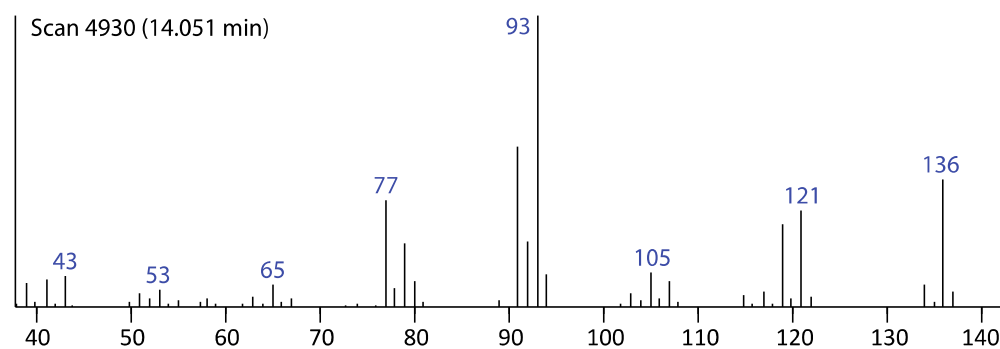
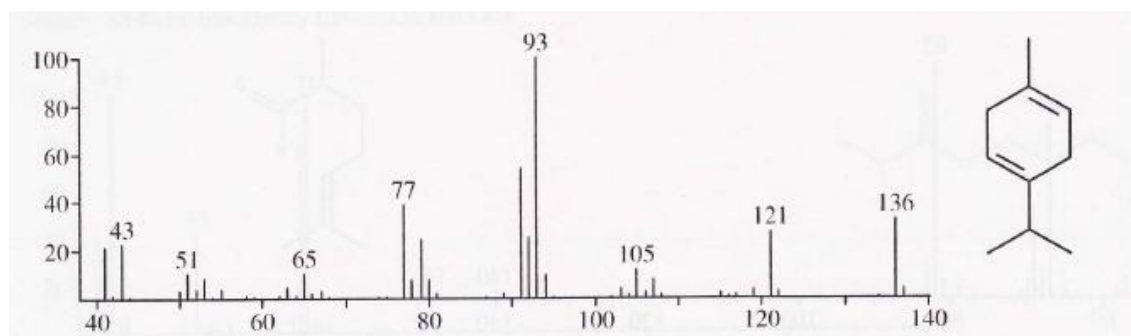


Figura 25 – Espectro de massas do  $\gamma$ -Terpineno da literatura Adams [86] (superior) e da amostra (inferior).

### Isoterpinoleno

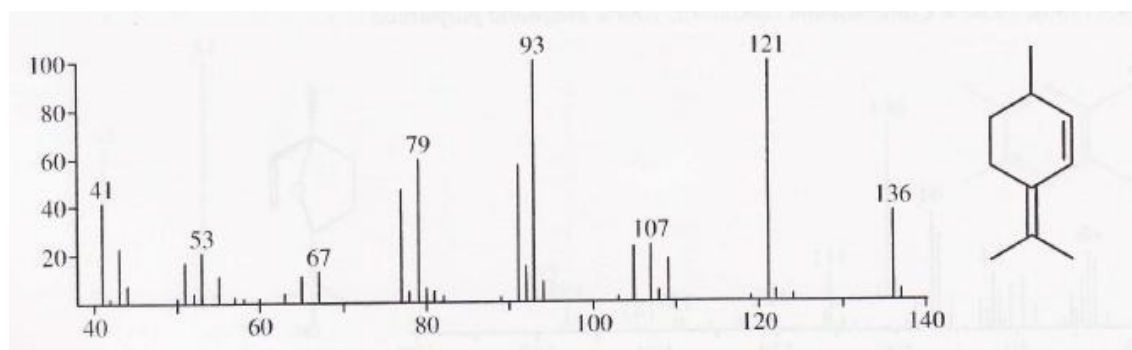


Figura 26 – Espectro de massas do Isoterpinoleno da literatura Adams [86] (superior) e da amostra (inferior).

### Terpinoleno

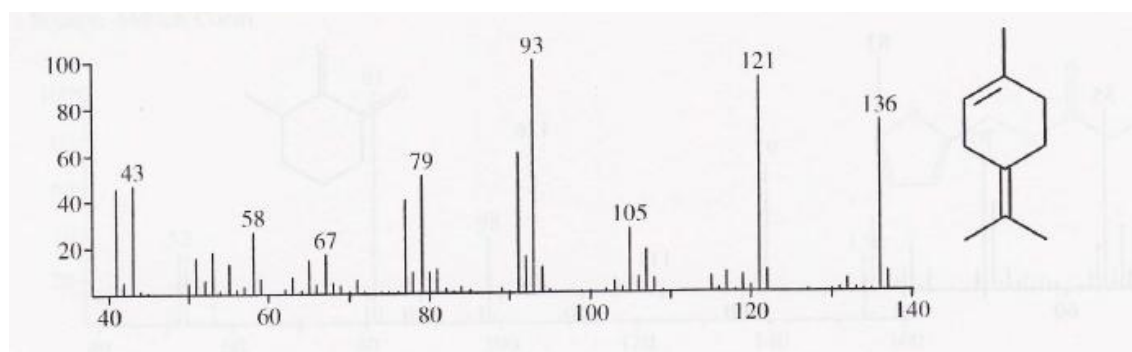


Figura 27 – Espectro de massas do Terpinoleno da literatura Adams [86] (superior) e da amostra (inferior).

## (E) Cariofileno

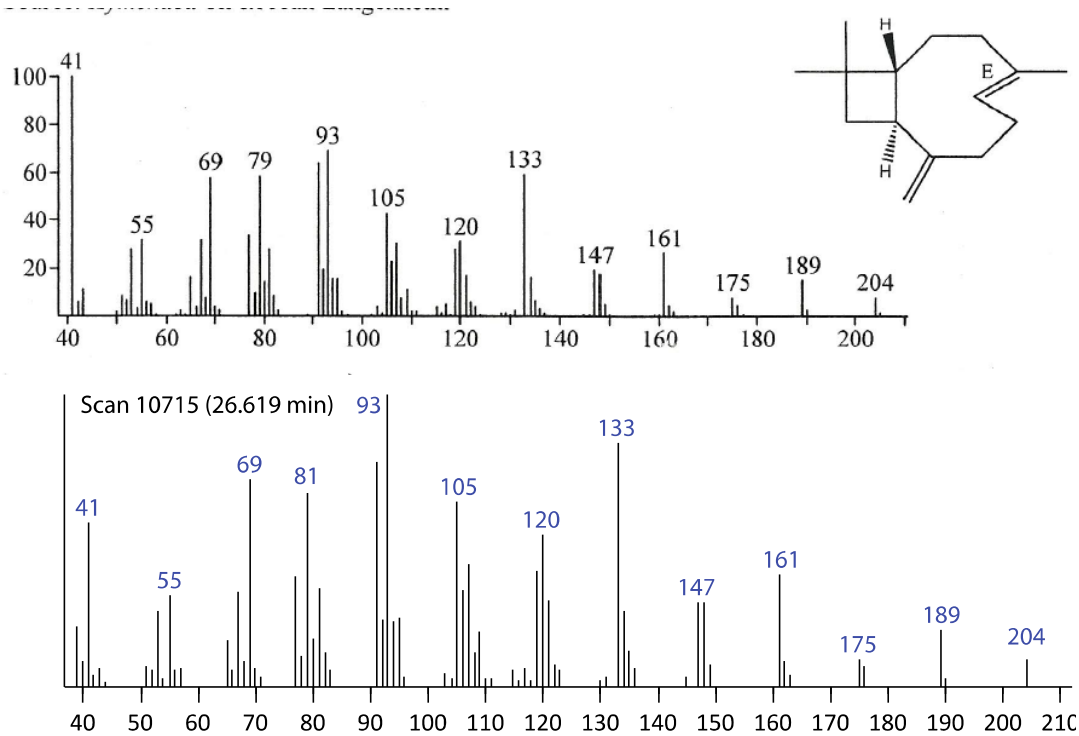


Figura 28 – Espectro de massas do (E) Cariofileno da literatura Adams [86] (superior) e da amostra (inferior).

## Apêndice B

Após identificação dos sinais nos cromatogramas, foi construída uma matriz contendo 41 variáveis (área sob o sinal de cada composto nos cromatogramas) e 37 casos (amostras), conforme representação abaixo:

Variáveis	Composto	Variáveis	Composto
V1	Octanoato de etila	V 21	Terpinoleno (2)
V 2	Germacreno-D	V 22	(E)-Cariofileno
V 3	$\alpha$ -Felandreno	V 23	Metilciclohexano
V 4	3-Careno	V 24	2,2-dimetil-hexano
V 5	$\alpha$ - Pineno	V 25	2,4-dimetil-henano
V 6	2,5-dimetil-hexano	V 26	Octano
V 7	Limoneno	V 27	$\alpha$ -Humeleno
V 8	Mirceno	V 28	Naftaleno
V 9	Hexa-2-nona	V 29	$\alpha$ -Selineno
V 10	Butanoato de etila	V 30	azuleno
V 11	Tolueno	V 31	copaeno
V 12	But-2-enoato de etila	V 32	Butanoato de isopentila
V 13	2-metil-heptano	V 33	(E)- $\beta$ -Ocimeno
V 14	3-metil-heptano	V 34	Silvestreno
V 15	Ciclotrissiloxano	V 35	$\alpha$ -Terpineno
V 16	Canfeno	V 36	$\alpha$ -Tujeno
V 17	$\beta$ -Pineno	V 37	But-2-enoato de etila
V 18	1,3-Ciclohexadieno	V 38	2,3-dimetil-hexano
V 19	$\gamma$ -Terpineno	V 39	3-metil-butan-1-ol
V 20	Terpinoleno	V 40	Hexanoato de etila

Variável	AM 1	AM 2	AM 3	AM 4	AM 5	AM 6	AM 7	AM 8	AM 9	AM 10	AM 11	AM 12	AM 13	AM 14	AM 15	AM 16	AM 17	AM 18	AM 19
V 1	27,95	0,00	0,44	0,00	1,42	0,00	4,42	0,89	6,71	0,00	2,45	0,00	0,00	0,66	0,88	3,68	0,62	0,16	0,48
V 2	16,42	0,25	0,51	0,07	2,76	0,00	0,00	1,18	0,00	7,03	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,86	0,00	0,00	0,00
V 3	0,00	1,03	1,27	0,00	2,60	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,86	1,27	0,61	0,71	0,85	0,00	0,80	0,91	0,75
V 4	0,00	65,95	60,99	68,74	7,44	34,44	47,94	64,21	45,99	53,37	61,93	60,51	61,70	44,74	60,80	58,54	58,11	61,03	57,53
V 5	0,00	20,17	20,81	7,16	50,96	10,50	23,15	22,59	18,76	22,71	19,67	16,23	22,36	20,78	20,87	18,64	19,02	21,55	19,52
V 6	0,00	0,12	0,24	0,01	0,00	0,00	0,97	0,00	0,94	0,48	0,00	0,62	0,33	0,00	0,17	0,14	0,15	0,08	0,26
V 7	25,34	2,82	2,83	0,00	7,35	0,00	1,80	1,69	1,68	1,83	2,23	2,19	1,81	2,04	2,53	2,68	2,96	3,03	2,26
V 8	0,00	1,69	1,63	5,44	4,56	0,00	0,00	0,89	0,00	0,00	1,22	1,24	0,00	1,29	1,53	1,66	1,21	1,48	1,24
V 9	0,00	0,64	0,98	0,11	1,18	21,69	5,64	2,82	6,47	3,51	1,40	3,98	2,61	0,91	1,56	0,94	1,36	0,63	1,81
V10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,87	0,00	1,01	0,76	0,00	12,80	0,40	0,39	0,39	0,00	2,95
V11	0,00	0,25	0,49	0,00	0,00	8,21	2,25	1,18	2,52	1,77	0,55	1,77	1,17	0,37	0,63	0,46	0,55	0,28	0,72
V12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,48	0,00	1,31	0,00	0,39	2,85	0,51	0,65	0,40	0,00	1,00
V13	0,00	0,21	0,57	0,03	0,00	6,66	2,08	0,85	2,33	1,16	0,35	1,36	0,84	0,27	0,45	0,36	0,41	0,21	0,52
V14	0,00	0,27	0,62	0,04	0,54	8,87	2,66	1,21	3,11	1,69	0,56	1,93	1,20	0,40	0,63	0,50	0,57	0,28	0,79
V15	0,79	0,31	0,32	0,00	0,00	0,00	2,86	0,00	1,39	0,94	0,00	1,47	0,73	0,24	0,37	0,88	0,41	0,20	0,31
V16	0,00	0,40	0,44	0,13	1,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,45	0,41	0,31	0,37	0,36	0,44
V17	0,00	1,92	1,94	1,16	5,18	0,00	2,09	1,44	1,54	1,96	1,69	1,33	1,86	1,82	1,83	1,70	2,21	2,08	1,78
V18	0,00	0,49	0,53	0,00	1,36	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,41	0,00	0,00	0,42	0,48	0,00	0,48	0,46	0,43
V19	0,00	0,21	0,27	0,87	0,83	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,23	0,28	0,26	0,48	0,33	0,00
V20	0,00	0,23	0,23	0,86	0,66	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20	0,20	0,00	0,29	0,00
V21	1,92	2,42	2,64	7,56	7,58	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,42	0,00	1,36	1,58	2,35	2,32	3,79	3,28	2,11
V22	16,76	0,45	0,85	3,42	2,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,78	1,38	0,00	0,00	0,46	0,67	1,20	1,64	0,63
V23	0,00	0,18	0,28	0,00	0,34	5,61	1,44	0,74	1,66	1,11	0,37	1,09	0,70	0,27	0,40	0,30	0,35	0,17	0,47
V24	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,48	0,30	0,00	0,16	0,13	0,14	0,07	0,20
V25	0,00	0,00	0,26	0,00	0,26	4,02	1,74	0,00	1,39	0,78	0,30	1,06	0,56	0,22	0,29	0,23	0,25	0,13	0,42
V26	0,00	0,00	0,23	0,00	0,00	0,00	0,97	0,00	1,17	0,68	0,00	0,79	0,46	0,17	0,27	0,22	0,24	0,11	0,32
V27	0,00	0,00	0,35	1,63	0,91	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,28	0,40	0,70	0,24
V28	1,52	0,00	0,00	0,39	0,00	0,00	0,00	0,00	0,39	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,15	0,00
V29	0,00	0,00	0,00	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
V30	3,68	0,00	0,28	0,16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,12	0,00
V31	3,08	0,00	0,00	1,28	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,30	0,25	1,71	2,67	0,00	0,00
V32	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
V33	1,16	0,00	0,00	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,12	0,00	0,00	0,00
V34	2,16	0,00	0,00	0,48	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,23	0,00	0,18	0,00
V35	0,00	0,00	0,00	0,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
V36	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
V37	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	6,13	0,00	0,00	0,00	0,00	2,29
V38	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,58	0,00	0,00	0,19	0,15	0,17	0,08	0,13
V39	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
V40	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	0,00	0,00	0,35	0,78	0,78	0,28	0,00	0,00
Status	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

