

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CAMPUS DE ARARAQUARA - INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**JOSILEI DA SILVA FERREIRA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Estimativa da atividade enzimática em amostras comerciais de mandioca  
utilizando ressonância magnética nuclear no domínio do tempo (TD-NMR)  
e modelos quimiométricos**

**ARARAQUARA  
2018**

JOSILEI DA SILVA FERREIRA

**Estimativa da atividade enzimática em amostras comerciais de mandioca utilizando ressonância magnética nuclear no domínio do tempo (TD-NMR) e modelos quimiométricos**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabíola Manhas Verbi Pereira

**ARARAQUARA**

**2018**

FICHA CATALOGRÁFICA

F383e      Ferreira, Josilei da Silva  
Estimativa da atividade enzimática em amostras comerciais  
de mandioca utilizando ressonância magnética nuclear no  
domínio do tempo (TD-NMR) e modelos quimiométricos / Josilei  
da Silva Ferreira. – Araraquara : [s.n.], 2018  
79 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,  
Instituto de Química  
Orientador: Fabíola Manhas Verbi Pereira

1. Quimiometria. 2. Análise enzimática. 3. Alimentos - Análise.  
4. Análise multivariada. 5. Alimentos - Qualidade. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Estimativa da atividade enzimática em amostras comerciais de mandioca utilizando ressonância magnética nuclear no domínio do tempo (TD-NMR) e modelos quimiométricos"

AUTOR: JOSILEI DA SILVA FERREIRA

ORIENTADORA: FABIOLA MANHAS VERBI PEREIRA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:

VIDEO CONFERÊNCIA

Profª. Drª. FABIOLA MANHAS VERBI PEREIRA

Departamento de Química Analítica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Profª. Drª. MIRIAN CRISTINA DOS SANTOS

Departamento de Química Analítica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. PEDRO SÉRGIO FADINI

Departamento de Química / Universidade Federal de São Carlos - UFSCar - São Carlos

Araraquara, 20 de abril de 2018

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:** "Estimativa da atividade enzimática em amostras comerciais de mandioca utilizando ressonância magnética nuclear no domínio do tempo (TD-NMR) e modelos quimiométricos"

**AUTOR:** JOSILEI DA SILVA FERREIRA

**ORIENTADORA:** FABIOLA MANHAS VERBI PEREIRA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. FABIOLA MANHAS VERBI PEREIRA  
Departamento de Química Analítica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. MIRIAN CRISTINA DOS SANTOS  
Departamento de Química Analítica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. PEDRO SÉRGIO FADINI  
Departamento de Química / Universidade Federal de São Carlos - UFSCar - São Carlos

Araraquara, 20 de abril de 2018

## **DADOS CURRICULARES**

### **IDENTIFICAÇÃO:**

Nome: Josilei da Silva Ferreira

Nome em citações bibliográficas: Ferreira, J. S.; Ferreira, Josilei S.; J. da Silva Ferreira; da Silva Ferreira, J.

Contato: josilei.ferreira@gmail.com

---

### **FORMAÇÃO ACADÊMICA:**

Bacharelado em Química (2012 - 2016)

Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, São Carlos/SP.

---

### **ATIVIDADES ACADÊMICAS**

1. Centro Acadêmico da Química - CAQuí UFSCar (2012 - 2014)

Função: Membro integrante

2. Semana da Química UFSCar - 2013

Função: Organizador/Tesoureiro

2. Núcleo de Extensão UFSCar-Escola - NUEsc (06/2012 - 07/2016)

Função: Monitor (2012 - 2014) e Professor (2014 - 2016)

3. Laboratório de BioGeoquímica Ambiental - LBGqA (03/2013 - 07/2016)

Função: Iniciação Científica

4. Programa de Educação Tutorial - PET Química (05/2014 - 10/2015)

Função: Aluno bolsista

5. III Escola de Inverno em Quimiometria (EIQ 2017)

Função: Membro da equipe de apoio

---

## PRODUÇÃO:

1. Pantano, Glaucia; Ferreira, Josilei S.; Aquino, Francisco W. B.; Pereira-Filho, Edenir R.; Mozeto, Antonio A.; Fadini, Pedro S. **Biosorbent, a promising material for remediation of eutrophic environments: studies in microcosm.** Environmetal Science and Pollution Research International, v. 24, p. 2685-2696, 2017. (Artigo publicado em periódico)
2. da Silva Ferreira, J.; Moraes, T. B.; Colnago, L. A.; Pereira, F. M. V. **Enzymatic activity prediction using time-domain nuclear magnetic resonance (TD-NMR) and multivariate analysis: a case study using cassava roots.** Applied Magnetic Resonance, DOI: 10.1007/s00723-018-0995-0 (Artigo publicado em periódico)
3. Ferreira, J. S.; Pereira, F. M. V. **Evaluation of physiological deterioration of *in natura* cassava roots by TD-NMR combined with chemometrics.** VIII Workshop de Quimiometria, Salvador - BA, 2017. (Apresentação de trabalho/painel)
4. Ferreira, J. S.; Pereira F. M. V. **TD-NMR signals combined with chemometrics to classificate the shelf life of *in natura* cassava roots.** III Escola de inverno em Quimiometria, Araraquara - SP, 2017. (Apresentação de trabalho/painel)

***“ Se mais pessoas valorizassem o lar mais do que o ouro, o mundo seria um lugar melhor. ”***

**J. R. R. Tolkien, O Hobbit.**



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, pois, ainda que minha fé não tenha sido inabalada durante todos estes anos, foi Nele em que depusitei minha confiança e encontrei conforto nos momentos de maior dificuldade.

Ao Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Química, pela oportunidade de aprimorar os meus estudos e ampliar a minha visão de mundo.

À CAPES, pelo apoio financeiro, na forma de bolsa de pesquisa, sem o qual eu não teria condições de realizar este estudo.

À minha mãe, Zenilda, ao meu pai, José e meus irmãos, Zerli e Zirlei, pois foi com eles que aprendi a dar o devido valor às pessoas e ao conhecimento. Que fique claro que não consigo encontrar palavras para agradecê-los e que se me tornei digno de qualquer reconhecimento foi graças a vocês.

Aos meus colegas da escola técnica, de graduação e república, por me proporcionarem sua amizade e conforto durante todos estes anos de lamentos e alegrias.

À minha psicóloga Amanda Sardisco, que me proporcionou apoio psicológico durante os momentos difíceis, estando sempre disposta a me amparar, me fazendo compreender que cada indivíduo possui seu próprio ritmo e que é normal não se saber o que quer fazer daqui a 10 anos.

Às funcionárias da Seção Técnica de Pós-graduação, em especial a Ana Paula e a Cíntia, sempre dispostas a me prestar esclarecimentos e a me tranquilizar em cada uma de minhas visitas.

Aos meus colegas do Grupo de Abordagens Analíticas Alternativas, Mônica e Wesley, por proporcionarem uma das melhores experiências de trabalho em equipe que já vivenciei, sempre dispostos a me ajudar.

À Profa. Dra. Fabíola Manhas Verbi Pereira, pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa, por todo o conhecimento que me proporcionou e sobretudo pela sua paciência nos meus momentos de teimosia.

A mim mesmo, por continuar acreditando que nunca se está sozinho quando a autoconfiança é maior que qualquer dúvida ou lamentação.

## RESUMO

Autor: Josilei da Silva Ferreira

Orientadora: Profa. Dra. Fabíola Manhas Verbi Pereira

Estimativa da atividade enzimática em amostras comerciais de mandioca utilizando ressonância magnética nuclear no domínio do tempo (TD-NMR) e modelos quimiométricos

O objetivo desta dissertação de mestrado foi o desenvolvimento de um método não-invasivo e rápido para o monitoramento dos processos relacionados com a deterioração fisiológica pós-colheita (PPD), tendo como estudo de caso amostras comerciais de mandioca não-resfriadas e resfriadas, utilizando sinais de TD-NMR em combinação com modelos quimiométricos. Os modelos de classificação multivariados se mostraram promissores somente para as amostras não-resfriadas. Um método analítico foi desenvolvido com os sinais TD-NMR combinados com valores de referência provenientes de método padrão bioquímico e PLS (*partial least squares*). As figuras de mérito evidenciaram excelentes limites de detecção e de quantificação de  $0,06 \text{ UA}\cdot\text{mL}^{-1}$  e de  $0,2 \text{ UA}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectivamente. A sensibilidade foi de  $0,4 \text{ [intensidade (u.a.)/(UA}\cdot\text{mL}^{-1})]$  e o erro padrão de validação cruzada de  $0,7 \text{ UA}\cdot\text{mL}^{-1}$  para o modelo que considera os dois tipos de amostras no mesmo conjunto de dados.

## ABSTRACT

Author: Josilei da Silva Ferreira

Advisor: Prof. Dr. Fabíola Manhas Verbi Pereira

Estimation of enzymatic activity in commercial samples of cassava using time domain nuclear magnetic resonance (TD-NMR) and chemometric models

The objective of this master's thesis was the development of a non-invasive and rapid method for the monitoring of processes related to post-harvest physiological deterioration (PPD), having as case study commercial samples of non-refrigerated and refrigerated cassava using TD-NMR signals in combination with chemometric models. The multivariate classification models were promising only for the non-refrigerated samples. An analytical method was developed with TD-NMR signals combined with reference values from standard biochemical and partial least squares (PLS) methods. The merit figures showed excellent detection and quantification limits of  $0.06 \text{ UA} \cdot \text{mL}^{-1}$  and  $0.2 \text{ UA} \cdot \text{mL}^{-1}$ , respectively. The sensitivity was  $0.4 [\text{intensity (a.u.)}/(\text{UA} \cdot \text{mL}^{-1})]$  and the standard error of cross-validation (SECV) of  $0.7 \text{ UA} \cdot \text{mL}^{-1}$  for the model considering the two types of samples in the same set of data.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Produção mundial e dos maiores produtores de raízes de mandioca no mundo segundo dados da FAO (2016).                                                                                                         | 21 |
| <b>Figura 2.</b> Representação vetorial do alinhamento dos spins nucleares ao campo estático $B_0$ resultando na magnetização macroscópica $M_0$ .                                                                             | 25 |
| <b>Figura 3.</b> Representação vetorial do deslocamento da magnetização macroscópica ( $M_0$ ) em um ângulo $\theta$ pela ação de um campo magnético $B_1$ resultante da aplicação de um pulso de rádio frequência.            | 26 |
| <b>Figura 4.</b> Esquema de obtenção dos dados para a finalidade de construção do modelo de classificação multivariada para avaliação do estágio de PPD em raízes de mandioca não-resfriadas.                                  | 32 |
| <b>Figura 5.</b> Curvas normalizadas típicas dos decaimentos CPMG para amostras de mandioca não-resfriadas.                                                                                                                    | 33 |
| <b>Figura 6.</b> Curvas normalizadas típicas dos decaimentos CPMG para amostras de mandioca resfriadas.                                                                                                                        | 34 |
| <b>Figura 7.</b> Curvas normalizadas típicas dos decaimentos CPMG para amostras de mandioca após 96 horas de exposição ao ar atmosférico.                                                                                      | 35 |
| <b>Figura 8.</b> Gráficos de <i>scores</i> (a) e <i>loadings</i> (b) da PCA para os dados de TD-NMR das amostras de mandioca não-resfriadas, evidenciando a separação pelo tempo de exposição ao ar atmosférico.               | 37 |
| <b>Figura 9.</b> Gráficos de <i>scores</i> (a) e <i>loadings</i> (b) da PCA para os dados de TD-NMR das amostras de mandioca resfriadas, evidenciando a separação pelo tempo de exposição ao ar atmosférico.                   | 42 |
| <b>Figura 10.</b> Esquema de obtenção dos dados para a finalidade de construção do modelo de regressão PLS para a determinação da atividade enzimática de POD em raízes de mandioca não-resfriadas e resfriadas.               | 43 |
| <b>Figura 11.</b> Gráfico de probabilidade (valores de $z$ ) para os contrastes observados. Os valores entre parênteses correspondem à contribuição do contraste para a variância dos dados.                                   | 48 |
| <b>Figura 12.</b> Curva de correlação para o conjunto de treinamento do modelo PLS construído com TD-NMR e valores de referência para atividade enzimática de POD para raízes de mandioca não-resfriadas (N) e resfriadas (R). | 51 |
| <b>Figura 13.</b> Curva de correlação para o conjunto de validação do modelo PLS construído com TD-NMR e valores de referência para atividade enzimática de POD para raízes de mandioca não-resfriadas (N) e resfriadas (R).   | 52 |

|                                                                                                                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 14.</b> Curva de correlação para o conjunto de treinamento do modelo PLS construído com TD-NMR e valores de referência para atividade enzimática de POD para raízes de mandioca não-resfriadas..... | 53 |
| <b>Figura 15.</b> Curva de correlação para o conjunto de validação do modelo PLS construído com TD-NMR e valores de referência para atividade enzimática de POD para raízes de mandioca não-resfriadas.....   | 53 |
| <b>Figura 16.</b> Curva de correlação para o conjunto de treinamento do modelo PLS construído com TD-NMR e valores de referência para atividade enzimática de POD para raízes de mandioca resfriadas.....     | 54 |
| <b>Figura 17.</b> Curva de correlação para o conjunto de validação do modelo PLS construído com TD-NMR e valores de referência para atividade enzimática de POD para raízes de mandioca resfriadas.....       | 55 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1.</b> Diferença média de massa, em relação ao tempo zero, registrada para amostras não-resfriadas e resfriadas após os períodos de 24, 48 e 72 h.....                                  | 34 |
| <b>Tabela 2.</b> Parâmetros de avaliação de sensibilidade e seletividade do modelo de classificação por KNN, k=1.....                                                                             | 39 |
| <b>Tabela 3.</b> Parâmetros de avaliação de sensibilidade e seletividade do modelo de classificação por SIMCA (2 PC, 99 e 100% de variância explicada para os níveis 1 e 2, respectivamente)..... | 40 |
| <b>Tabela 4.</b> Parâmetros de avaliação de sensibilidade e seletividade do modelo de classificação por PLS-DA (2 LV, ~100% de variância explicada e SECV = 0,19).....                            | 41 |
| <b>Tabela 5.</b> Matriz de planejamento do experimento fatorial fracionário $2^{4-1}$ para determinação de condições ótimas na execução do método de referência.....                              | 47 |
| <b>Tabela 6.</b> Valores médios de atividade enzimática de POD observados para as amostras de mandioca avaliadas.....                                                                             | 50 |
| <b>Tabela 7.</b> Figuras de mérito estimadas para os modelos empregados na previsão da atividade de POD em raízes de mandioca.....                                                                | 56 |

## LISTA DE SIGLAS

| <b>Sigla</b>  | <b>Significado</b>                                 | <b>Tradução</b>                                      |
|---------------|----------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| <b>CPMG</b>   | Carr-Purcell-Meiboom-Gill                          | ---                                                  |
| <b>KNN</b>    | <i>K-nearest neighbor</i>                          | K-ésimo vizinho mais próximo                         |
| <b>LD</b>     | Limite de detecção                                 | ---                                                  |
| <b>LQ</b>     | Limite de quantificação                            | ---                                                  |
| <b>LV</b>     | <i>Latent variable</i>                             | Variável latente                                     |
| <b>NMR</b>    | <i>Nuclear magnetic resonance</i>                  | Ressonância magnética nuclear                        |
| <b>PC</b>     | <i>Principal component</i>                         | Componente principal                                 |
| <b>PCA</b>    | <i>Principal components analysis</i>               | Análise de componentes principais                    |
| <b>PLS</b>    | <i>Partial least squares</i>                       | Mínimos quadrados parciais                           |
| <b>PLS DA</b> | <i>Partial least squares discriminant analysis</i> | Análise discriminante por mínimos quadrados parciais |
| <b>POD</b>    | Peroxidase                                         | ---                                                  |
| <b>PPD</b>    | <i>Postharvest physiological deterioration</i>     | Deterioração fisiológica pós-colheita                |
| <b>SECV</b>   | <i>Standard error of cross-validation</i>          | Erro padrão de validação cruzada                     |
| <b>SEV</b>    | <i>Standard error of validation</i>                | Erro padrão de validação                             |
| <b>SIMCA</b>  | <i>Soft independent modeling of class analogy</i>  | Modelagem independente suave de analogia de classes  |
| <b>TD NMR</b> | <i>Time-domain nuclear magnetic resonance</i>      | Ressonância magnética nuclear no domínio do tempo    |
| <b>UA</b>     | <i>Unit of activity</i>                            | Unidade de atividade                                 |



## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                 |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                                                       | <b>17</b> |
| <b>2 OBJETIVOS.....</b>                                                                                                                         | <b>19</b> |
| <b>3 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>                                                                                                            | <b>20</b> |
| <b>3.1 Mandioca .....</b>                                                                                                                       | <b>20</b> |
| <b>3.1.1 Origem e taxonomia .....</b>                                                                                                           | <b>20</b> |
| <b>3.1.2 Características socioeconômicas .....</b>                                                                                              | <b>20</b> |
| <b>3.1.3 Deterioração fisiológica pós-colheita (PPD).....</b>                                                                                   | <b>22</b> |
| <b>3.2. Princípios da ressonância magnética nuclear .....</b>                                                                                   | <b>24</b> |
| <b>3.3 TD-NMR e quimiometria na análise direta de alimentos.....</b>                                                                            | <b>27</b> |
| <b>4 PARTE I: AVALIAÇÃO DO ESTADO DE DETERIORAÇÃO DAS RAÍZES<br/>DE MANDIOCA EMPREGANDO SINAIS DE TD-NMR E MODELOS<br/>QUIMIOMÉTRICOS .....</b> | <b>31</b> |
| <b>4.1 Materiais e métodos.....</b>                                                                                                             | <b>31</b> |
| <b>4.2.1 Amostras .....</b>                                                                                                                     | <b>31</b> |
| <b>4.2.2 Obtenção do sinal de TD-NMR.....</b>                                                                                                   | <b>32</b> |
| <b>4.2.3 Tratamento dos dados .....</b>                                                                                                         | <b>32</b> |
| <b>4.2 Resultados e discussão .....</b>                                                                                                         | <b>33</b> |
| <b>5 PARTE II: PREVISÃO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM MANDIOCA<br/>EMPREGANDO TD-NMR E MODELOS DE REGRESSÃO PLS .....</b>                          | <b>43</b> |
| <b>5.1 Materiais e métodos.....</b>                                                                                                             | <b>43</b> |
| <b>5.1.3 Amostras .....</b>                                                                                                                     | <b>43</b> |
| <b>5.1.4 Preparo de soluções.....</b>                                                                                                           | <b>44</b> |
| <b>5.1.5 Obtenção do sinal de TD-NMR.....</b>                                                                                                   | <b>44</b> |
| <b>5.1.6 Determinação da atividade enzimática de POD .....</b>                                                                                  | <b>45</b> |
| <b>5.1.7 Tratamento dos dados .....</b>                                                                                                         | <b>45</b> |
| <b>5.2. Resultados e discussão .....</b>                                                                                                        | <b>46</b> |
| <b>5.2.1 Estudo das condições experimentais para a determinação da<br/>atividade de peroxidase em mandioca .....</b>                            | <b>46</b> |
| <b>5.2.2 Avaliação das medidas de atividade enzimática nas amostras de<br/>mandioca.....</b>                                                    | <b>49</b> |

|                                                                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.2.3 Modelo de estimativa da atividade enzimática por regressão em mínimos quadrados parciais (PLS) .....                                                           | 50 |
| 6 CONCLUSÃO .....                                                                                                                                                    | 57 |
| REFERÊNCIAS.....                                                                                                                                                     | 58 |
| <i>ANEXO - Enzymatic Activity Prediction Using Time-Domain Nuclear Magnetic Resonance (TD-NMR) and Multivariate Analysis: A Case Study Using Cassava Roots</i> ..... | 64 |

## 1 INTRODUÇÃO

Processos de deterioração fisiológica em leguminosas causados por impactos durante o transporte ou manipulação são difíceis de serem reconhecidos pelo consumidor final devido a presença da casca nestes alimentos.

A raiz de mandioca e a batata-doce, por exemplo, apresentam uma rápida reação de escurecimento (FAO, 1995; RICKARD, 1985) devido à presença de enzimas, principalmente as peroxidases (POD, E.C.1.11.1.7.), que atuam na recuperação e prevenção de infecções em partes lesionadas destas leguminosas (HIRAGA, 2001; ISAMAH, 2004) que podem estar sob a casca. Os produtos dessas reações tem influência direta nas propriedades organolépticas do alimento, tais como odor, textura e sabor (BRITO *et al.*, 2005).

Os métodos tradicionais empregados na análise de alimentos são geralmente laboriosos, podendo levar de horas ou até dias para serem executados, geram grandes quantidades de resíduos tóxicos e consistem em destruir a amostra (FREITAS *et al.*, 2008; RAMOS *et al.*, 2013; RICKARD, 1985; ZANATTA; ZOTARELLI; CLEMENTE, 2006). Além disso, a maioria deles exigem equipamentos dedicados e específicos que monitoram apenas uma propriedade de interesse, como é o caso nas medições de atividade de água, teor de sólidos solúveis totais, umidade, lipídios, dentre outros.

Estudos já consolidados reportam relevância na utilização da ressonância magnética nuclear (NMR) para caracterizar e determinar a composição de raízes de mandioca (IULIANELLI; TAVARES, 2011; YI *et al.*, 2011). Contudo, esses estudos se concentram na utilização de NMR em alto campo, no domínio de frequência, que apresenta um elevado custo de operação e de manutenção, além de demandar grandes períodos de tempo, necessitando na maior parte das vezes um preparo rigoroso da amostra, como por exemplo, na extração dos componentes de interesse para fase líquida ou em processos de purificação (ATTA-UR-RAHMAN; CHOUDHARY, 2015; DEFERNEZ *et al.*, 2017).

A ressonância magnética nuclear no domínio do tempo (TD-NMR), por outro lado, é uma técnica analítica não-invasiva empregada habitualmente no controle de qualidade de óleos e sementes, na determinação de umidade em alimentos e no

estudo de propriedades relacionadas a processos de difusão molecular (ATTA-UR-RAHMAN; CHOUDHARY, 2015; BLÜMICH, 2016; GUTHAUSEN, 2016; KIRTIIL *et al.*, 2017; MARCONE *et al.*, 2013; TODT *et al.*, 2001).

A TD-NMR possibilita alta frequência analítica com baixos custos de operação e manutenção, facilidade na aquisição dos sinais com preparo mínimo de amostras, sendo possível a geração de sinais também em alimentos embalados. Ainda, em contraste aos métodos tradicionais em análise de alimentos, esta técnica analítica de análise direta pode ser combinada com modelos multivariados para prever mais de um parâmetro (PEREIRA; HASHIMOTO; *et al.*, 2015; PEREIRA; REBELLATO; *et al.*, 2015).

## 2 OBJETIVOS

Este estudo de mestrado teve como objetivo principal o desenvolvimento de um método analítico para avaliar parâmetros relacionados com a deterioração fisiológica em alimentos sólidos utilizando a técnica TD-NMR combinada com ferramentas quimiométricas, utilizando como estudo de caso amostras comerciais de mandioca. Os objetivos específicos foram:

- Avaliar o potencial da TD-NMR para diferenciar estágios de deterioração fisiológica em amostras comerciais de mandioca não-resfriadas e resfriadas;
- Utilizar os sinais de TD-NMR combinados com valores de referência de um método padrão bioquímico para a previsão da atividade enzimática.

### **3 REVISÃO DA LITERATURA**

#### **3.1 Mandioca**

##### **3.1.1 Origem e taxonomia**

A mandioca (*manihot esculenta*, Crantz) é uma raiz tuberosa comum à regiões tropicais amplamente utilizada na alimentação humana por ser uma excelente fonte de carboidratos (FARIAS *et al.*, 2006; UARROTA, 2015). A composição centesimal estimada é de 60% de massa úmida, 36% de carboidratos na forma de amido e os demais constituintes distribuídos entre proteínas, fibras e minerais (NEPA - NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO, 2011).

A maniva, como é chamada a planta, é um arbusto perene pertencente à família *Euphorbiaceae* que se desenvolve mesmo em solos com uma variedade de deficiências. A suposição mais aceita é de que sua origem tenha ocorrido no sul da Amazônia brasileira e que foi domesticada pelos habitantes locais ainda no período pré-histórico, sendo disseminada até a região da mesoamérica (AKINPELU, A O, L. E.F. AMAMGBO, A.O. OLOJEDE, 2011; FAO, 2013; OLSEN; SCHAAL, 1999). Esta notável adaptabilidade torna a mandioca uma das mais promissoras culturas na solução para o problema da segurança alimentar de regiões pobres, especialmente as mais áridas (FAO, 2013; PRAKASH, 2013). Além disso, desde que não tenha sido colhida, a mandioca pode ficar armazenada no solo por um longo período de tempo até que seu consumo seja necessário (UARROTA, 2015).

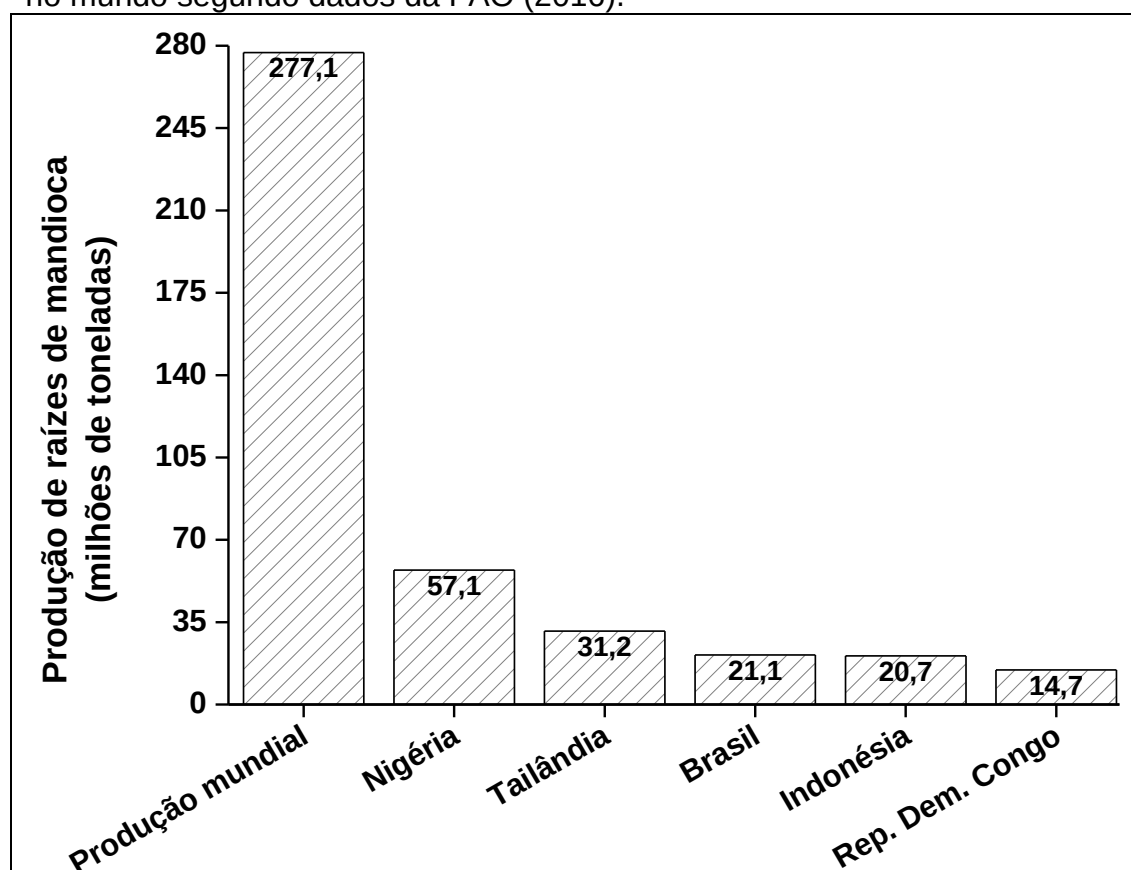
##### **3.1.2 Características socioeconômicas**

Ainda no período colonial a mandioca era um dos principais alimentos nas embarcações que levavam mercadorias das américas para o continente europeu, sendo estocadas como farinha ou pães (SUPER, 1984). Durante esta época também houve a inserção da cultura de mandioca em solo africano, onde se tem

atualmente a maior produção da raiz (AKINPELU, A O, L. E.F. AMAMGBO, A.O. OLOJEDE, 2011; FAO, 2013).

Segundo dados da FAO, em 2016, (Figura 1), a Nigéria se consolidou como o maior produtor de raízes de mandioca no mundo, sendo responsável por 20,6% das mais de 277 milhões de toneladas de raízes de mandioca produzidas mundialmente, seguido por Tailândia (11,2%), Brasil (7,6%), Indonésia (7,5%), e República Democrática do Congo (5,3%).

**Figura 1.** Produção mundial e dos maiores produtores de raízes de mandioca no mundo segundo dados da FAO (2016).



A mandioca é um alimento amplamente consumido. Estima-se que a raiz e seus derivados seja a base alimentar de cerca de 800 milhões de pessoas no mundo, sendo a quarta fonte de carboidratos mais consumida, estando em desvantagem apenas para o milho, o trigo e o arroz que ocupam os 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> posições, respectivamente (AKINPELU, A O, L. E.F. AMAMGBO, A.O. OLOJEDE, 2011; FAO, 2013; PRAKASH, 2013). Além disso, cabe destacar ainda o seu uso na

alimentação de animais e na produção de combustíveis por meio de sua biomassa rica em amido (OZOEGWU *et al.*, 2017; PRAKASH, 2013).

Enquanto que sua produção no continente africano está voltada principalmente para subsistência familiar e abastecimento do mercado de alimentos, uma crescente demanda pelas raízes de mandioca tem surgido na Ásia como alternativa energética para os combustíveis fósseis (ADENLE; MANNING; AZADI, 2017; OZOEGWU *et al.*, 2017). Países como China, República da Coreia e Japão, são grandes importadores do produto e apostam no desenvolvimento de novas tecnologias para o aproveitamento da biomassa da mandioca na produção de etanol.

O Brasil é responsável por cerca de 74% das raízes mandioca produzidas na América do Sul (FAO, 2016) e, embora o cultivo seja comum à todas as regiões do país, a maior quantidade desta é cultivada nas regiões norte e nordeste do país (CONAB, 2017). A região Norte do país, além de ser a maior produtora, é também onde se encontra a maior parcela das raízes destinadas ao consumo humano. No Nordeste, o cultivo de mandioca, além de servir a alimentação humana, também é destinado a suprir a demanda para a alimentação animal, enquanto que nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste a maior parcela é destinada à produção de farinha e fécula de mandioca (NETO, CALIXTO ROSA; MARCOLAN, 2010).

### **3.1.3 Deterioração fisiológica pós-colheita (PPD)**

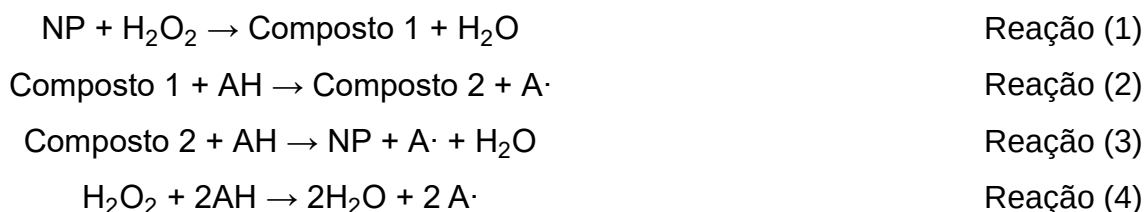
Apesar de apresentar elevado valor nutricional e econômico, uma das principais características que ainda torna o cultivo da mandioca dispendioso é a rápida deterioração fisiológica pós-colheita (PPD) (FAO, 1995; ISAMAH, 2004; UARROTA, 2015). Isto se deve a um complexo mecanismo de sinalização e expressão genética no qual pode-se destacar a formação de espécies reativas de oxigênio e o aumento na atividade de enzimas, dentre as quais podemos citar as peroxidases. Esta enzima atua no processo de reparo dos tecidos lesionados de leguminosas (DJABOU *et al.*, 2017; REILLY *et al.*, 2004; ZAINUDDIN *et al.*, 2017).

O termo peroxidase se refere a um vasto grupo de oxirredutases que utilizam peróxido de hidrogênio como espécie oxidante para uma variedade de substratos orgânicos (DIXON; WEBB, 1964). A maior parte das peroxidases contém um grupo



prostético heme, sítio em que ocorre a redução de peróxido de hidrogênio e oxidação do substrato, assistido por resíduos de histidina e arginina (DUNFORD, 1999). A superfamília da peroxidase-catalase é um grupo de hemeperoxidases de grande importância na fisiologia das plantas e é geralmente subdividida em três classes segundo a sua atuação. A classe I, das denominadas peroxidases de origem procariótica, atuam principalmente na remoção de peróxido de hidrogênio intracelular. A classe II, das peroxidases dependentes de manganês (que possuem manganês como centro metálico no grupo heme), lignina peroxidases e peroxidases versáteis, atuam principalmente na decomposição da lignina. E as peroxidases de classe III, ou peroxidases secretadas por plantas, atuam em uma variedade de setores, incluindo lignificação, suberização, defesa contra patógenos, recuperação de ferimentos, dentre outros (HIRAGA, 2001; UARROTA, 2015).

A seguir é representada as etapas de atuação de uma peroxidase. Inicialmente (1), por meio de seu centro metálico, a enzima em sua forma natural (NP) quebra a molécula de peróxido formando água e um composto intermediário (Composto 1) contendo o íon ferrilo ( $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$ ). Em seguida (2), ocorre a oxidação de um substrato orgânico AH pelo Composto 1, gerando uma espécie radicalar A e uma segunda espécie intermediária (Composto 2). Esta segunda espécie intermediária reage com outra molécula AH (3), formando uma espécie radicalar A e água, restaurando a enzima à sua forma natural. O sumário da reação (4) é a transferência de elétrons do substrato a AH para a molécula de peróxido (BELITZ; GORSCH; SCHIEBERLE, 2009; DIXON; WEBB, 1964; LI; POULOS, 1994).



Desta forma, para reduzir o peróxido de hidrogênio acumulado no interior dos tecidos, há um aumento na atividade de peroxidases que atuam na oxidação da matéria orgânica disponível, principalmente ácidos graxos, sendo em parte

responsáveis pelo escurecimento da raiz (FAO, 1995; ISAMAH, 2004; RICKARD, 1985).

Em um estudo realizado por Isamah, 2004, foi verificado que este incremento na atividade de peroxidase ocorreu nas primeiras 24 horas após a colheita, seguida de uma redução gradual que pode estar relacionada com a diminuição nos níveis de  $\text{Ca}^{+2}$  (DJABOU *et al.*, 2017), sendo um forte indício do processo de PPD, uma vez que os íons de cálcio apresentam grande importância como cofatores enzimáticos e na constituição da parede celular de células vegetais.

### 3.2. Princípios da ressonância magnética nuclear

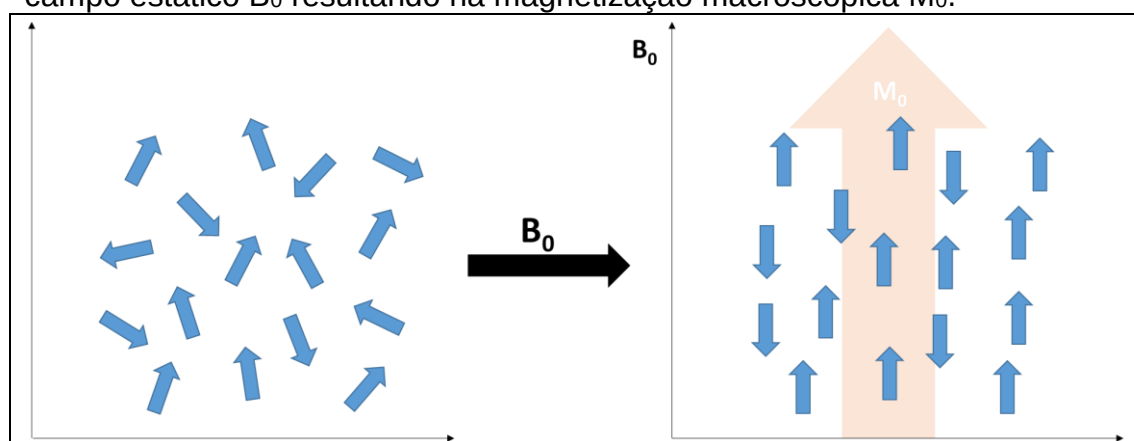
O fenômeno de ressonância magnética nuclear foi primeiramente observado pelo holandês Pieter Zeeman, que descreveu um comportamento diferente de alguns elementos quando sob o efeito de um campo magnético externo (BETTEN; COLLEGE, 2004). Tal descoberta foi reconhecida com o prêmio Nobel de física em 1902 à Zeeman. Contudo, a tecnologia para o estudo da ressonância magnética nuclear só ficou disponível 50 anos depois, com o desenvolvimento do primeiro instrumento de NMR pelos físicos Bloch e Purcell, se tornando em pouco tempo uma das ferramentas de maior importância na elucidação de estruturas moleculares (BETTEN; COLLEGE, 2004; FIELD; STERNHELL; KALMAN, 2008).

O emprego das técnicas de NMR é possível em virtude de alguns núcleos atômicos apresentarem momento de dipolo magnético, qual é associado a um campo magnético correspondente. Em geral, os núcleos que podem ser observados em NMR são aqueles que possuem número quântico de spin ( $I$ ) diferente de zero. Isto ocorre porque os núcleos que possuem spin nulo não interagem com campos magnéticos, uma vez que não possuem momento de dipolo magnético. Os núcleos mais explorados são  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$  e  $^{19}\text{F}$ , ambos com  $I = \frac{1}{2}$  (BLÜMICH, 2016; FIELD; STERNHELL; KALMAN, 2008).

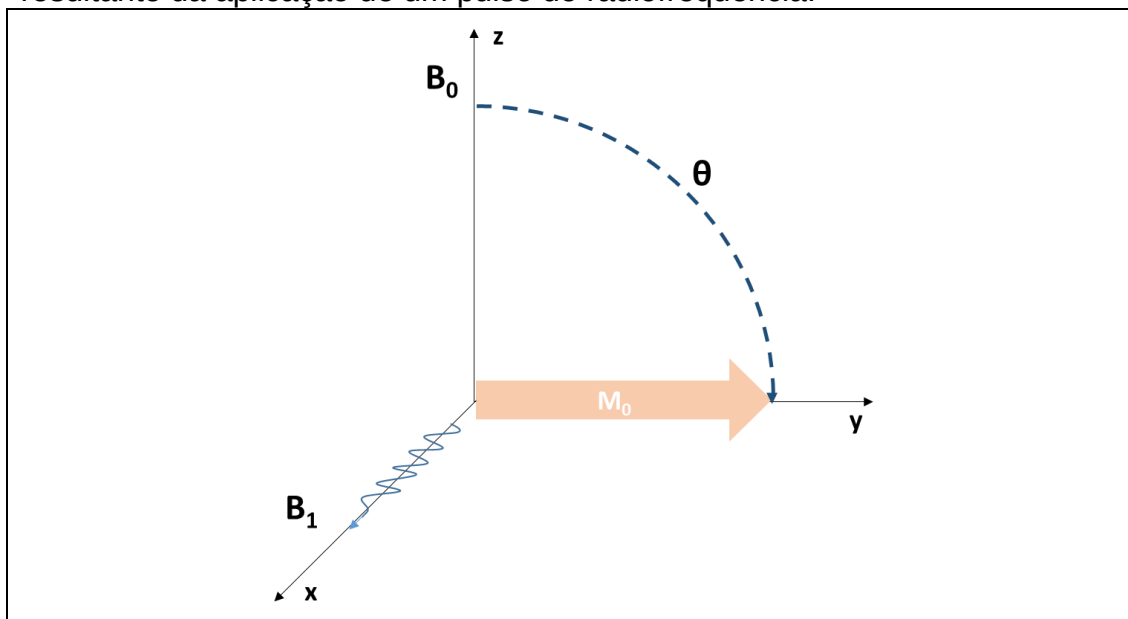
Para que o fenômeno de NMR seja detectado, é necessário orientar os spins dos núcleos a serem estudados impondo um campo magnético externo e constante  $B_0$ , consequentemente o alinhamento dos spins nucleares gera uma magnetização macroscópica  $M_0$  (Figura 2). Em seguida é aplicado um pulso de radiofrequência

que irá reorientar, sob a ação de um campo magnético oscilante  $B_1$ , os spins dos núcleos e deslocar a magnetização  $M_0$  em determinado ângulo  $\theta$  (Figura 3). Uma vez cessada a aplicação do pulso de radiofrequência os spins dos núcleos tendem a se reorientar ao campo  $B_0$  estático, sendo o sinal observado na forma de um decaimento exponencial, conhecido por decaimento livre de indução (FID). Este fenômeno é denominado relaxação e pode se dar simultaneamente de duas formas, a relaxação longitudinal (processo de característica entálpica, decorrente da interação com a rede) e a relaxação transversal (processo de característica entrópica, decorrente da interação spin-spin). Estes processos são referidos como  $T_1$  e  $T_2$ , respectivamente (BLÜMICH, 2016; FIELD; STERNHELL; KALMAN, 2008).

**Figura 2.** Representação vetorial do alinhamento dos spins nucleares ao campo estático  $B_0$  resultando na magnetização macroscópica  $M_0$ .



**Figura 3.** Representação vetorial do deslocamento da magnetização macroscópica ( $M_0$ ) em um ângulo  $\theta$  pela ação de um campo magnético  $B_1$  resultante da aplicação de um pulso de radiofrequência.



O tempo de relaxação transversal ( $T_2$ ) é da ordem de milissegundos a poucos segundos, enquanto que a magnitude do tempo de relaxação longitudinal ( $T_1$ ), pode ser maior, chegando a alguns minutos (VENÂNCIO *et al.*, 2005). Atualmente, a maneira mais usual de se obter  $T_2$  é a partir de uma sequência de pulsos Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) e para  $T_1$  tem sido empregado o método de precessão livre de onda contínua (CWFP) (VAN DUYNHOVEN *et al.*, 2010; VENÂNCIO *et al.*, 2005).

A popularidade no emprego da sequência CPMG para a determinação dos valores de  $T_2$  está, principalmente, relacionada a falta de homogeneidade nos campos magnéticos alcançados nos equipamentos tipicamente empregados para estudos de relaxometria. A baixa homogeneidade dos campos magnéticos resulta numa maior defasagem entre isocromatas e, conseqüentemente, no sinal FID é observado um decaimento ( $T_2^*$ ) muito mais rápido do que o esperado (MELEDANDRI; BROUGHAM, 2012). O método por CPMG, por outro lado, consiste na aplicação de um pulso de radiofrequência em  $90^\circ$  no eixo  $y'$ , seguida da aplicação de pulsos alternados de  $180^\circ$  no eixo  $x'$  que corrigem a defasagem entre as isocromatas, resultando em ecos de ressonância, quais a amplitude diminui com uma constante de tempo igual a  $T_2$ . (BLÜMICH, 2016; KIRTIL *et al.*, 2017; VAN DUYNHOVEN *et al.*, 2010).

### 3.3 TD-NMR e quimiometria na análise direta de alimentos

O primeiro marco na inserção da TD-NMR na indústria de alimentos ocorreu na década de 1970, fruto da parceria entre a Brucker Physik (Alemanha) e da Unilever (Países Baixos) (TODT *et al.*, 2001; VAN DUYNHOVEN *et al.*, 2010). O resultado desta cooperação foi o desenvolvimento de um instrumento capaz de determinar a razão sólido/líquido na composição de gorduras (SFC), método hoje consolidado como referência internacional para esta finalidade (AOAC, 1990; AOCS, 2017). Isto se deu em parte ao esgotamento do método tradicional por dilatometria, que era mais demorado e fornecia resultados menos precisos (VAN DUYNHOVEN *et al.*, 2010).

Na década de 1980, outras potencialidades da técnica de TD-NMR começaram a surgir, como por exemplo a determinação simultânea dos teores de óleo e umidade em oleaginosas, um outro método reconhecido pela comunidade internacional, e na determinação do tamanho de gotículas de óleo e água em diferentes emulsões, levando ao desenvolvimento dos primeiros equipamentos de bancada para uso industrial no controle e garantia da qualidade (TODT *et al.*, 2006).

A aplicação da TD-NMR para determinar simultaneamente os teores de óleo e umidade é possível em virtude de estes dois componentes apresentarem magnitudes de tempos de relaxação bastante distintas, sendo possível determinar os dois componentes por meio de sequências de pulso específicas (TODT *et al.*, 2001, 2006). Entretanto, uma limitação deste método é observada para amostras com grande quantidade de água livre, pois neste caso os dois componentes não são bem resolvidos apenas pelo tempo de relaxação (TODT *et al.*, 2001, 2006). Uma solução a esta limitação surgiu com a utilização de campos gradientes (PFG) de modo que a mobilidade das moléculas passaria a ter uma função principal na medida do teor de óleo para amostras com esta característica (ATTA-UR-RAHMAN; CHOUDHARY, 2015; TODT *et al.*, 2006).

A avaliação da distribuição no tamanho de gotículas dispersas em emulsões é um outro parâmetro de grande interesse na indústria de alimentos. O tamanho das gotículas de água dispersas em óleos e gorduras, por exemplo, podem influenciar de maneira drástica na conservação do alimento, deixando-o mais ou menos suscetível à contaminação por microrganismos (TODT *et al.*, 2001). O

método tradicional para esta determinação é a contagem de gotículas em microscópio, o que consome uma grande quantidade de tempo e demanda a manipulação da amostra, alterando suas características físicas em virtude da necessidade de espalhar a amostra entre duas lâminas de vidro, além disso, o analista também deve levar em consideração o tamanho das gotículas na contagem, resultando em uma certa subjetividade na análise. Em contrapartida, empregando a TD-NMR é possível estimar este parâmetro sem a necessidade do preparo da amostra pelo método de pulsos em campo gradiente (PFG). Para isto é realizada a análise da difusão restrita de moléculas de água, de modo que, os sinais de NMR para as moléculas de água nas gotículas são registrados em função da separação temporal de dois pulsos de campo gradiente, de modo que um aumento na separação implica na diminuição da amplitude do sinal. Como apenas os sinais provenientes das moléculas de água são de interesse para a análise, é necessário que se faça a supressão do sinal proveniente do óleo. A aplicação de campos gradientes é bastante útil para a separação de sinais de componentes que apresentam tempos de relaxação similares, mas que possuem coeficientes de difusão diferentes (GUTHAUSEN, 2016; TODT *et al.*, 2001; VAN DUYNHOVEN *et al.*, 2010).

Ainda nos anos 90, os primeiros equipamentos portáteis para utilização em controle de qualidade de produtos embalados começaram a ser desenvolvidos e recentes avanços no arranjo dos imãs possibilitaram um aumento na robustez e sensibilidade dos aparelhos mais novos. Outro aspecto de grande interesse para a indústria de alimentos é a incorporação de equipamentos *online* para monitoramento em cadeias de produção. O conceito para a implementação deste método é o emprego de um campo contínuo de radiofrequência e a translação da amostra para a obtenção do sinal de TD-NMR, para a obtenção tanto de T1 quanto T2 por meio das sequências de pulso usuais, contudo esta realidade ainda não é encontrada além da pesquisa acadêmica (TODT *et al.*, 2001; VAN DUYNHOVEN *et al.*, 2010).

Desde então, a TD-NMR tem conquistado um espaço cada vez maior no estudo das propriedades dos alimentos (KIRTI *et al.*, 2017), em especial para o controle de qualidade, se tornando também uma ferramenta de grande interesse acadêmico e não apenas no âmbito industrial. Nas últimas duas décadas, se

observa uma grande tendência no emprego da TD-NMR combinada com recursos da quimiometria para explorar o caráter multivariado da técnica. Nestas aproximações, em geral, é feita a correlação do sinal obtido com parâmetros físico-químicos ou composição dos materiais de interesse (VAN DUYNHOVEN *et al.*, 2010). A PCA é uma das ferramentas mais usadas para a verificação da existência de padrões nos conjuntos de dados obtidos por TD-NMR, podendo inclusive ser empregada na construção de regressões para parâmetros de qualidade, embora uma outra ferramenta, a regressão PLS, atualmente, seja mais utilizada e apresente melhores resultados para esta finalidade (FERREIRA, 2015; KUMAR *et al.*, 2014; MILLER; MILLER, 2010; NETO, BENÍCIO DE BARROS; SCARMINIO; BRUNS, 2006).

A combinação entre TD-NMR e quimiometria foi utilizada por Santos *et al.*, 2017, para a investigação de adulteração de amostras de azeite de oliva com óleo de soja. Isto é possível porque a diferença na proporção dos ácidos graxos que compõe um óleo resulta numa diferenciação nos valores de  $T_2$  observados (DIEFFENBACHER; POCKLINGTON, 1991; MARCONE *et al.*, 2013). O estudo ilustra curvas de decaimento CPMG nas quais as amostras que contém apenas azeite de oliva apresenta tempos de relaxação maiores enquanto que as amostras de óleo de soja apresentam tempos de relaxação menores e, ainda, que o resultado de uma mistura entre óleo e azeite apresenta decaimentos intermediários de acordo com a proporção azeite/óleo, o que pôde ser melhor averiguado com a PCA. Além disso, com o emprego de um modelo SIMCA construído, foi detectada adulteração de marcas comerciais de azeite com óleos ricos em ácidos graxos poli-insaturados, o que se comprovou com um estudo de NMR de alta resolução. Outro ponto de grande destaque foi a realização das medidas de TD-NMR sem a violação da embalagem, um dos atrativos da técnica (PEREIRA; REBELLATO; *et al.*, 2015; SANTOS, POLIANA M. *et al.*, 2017).

Um outro potencial da técnica de TD-NMR está na inspeção da qualidade pós-colheita de produtos vegetais (KHAN *et al.*, 2016; RIBEIRO, 2008). Trabalhos reportam o sucesso no emprego da TD-NMR em combinação com modelos de regressão PLS para a determinação de propriedades de interesse na qualidade do milho (SHAO; LI, 2012) e na determinação de parâmetros sensoriais em suco de laranja em frutos intactos (BIZZANI *et al.*, 2017; FLORES *et al.*, 2016). Esta

possibilidade foi explorada por Pereira et al., 2013, para correlacionar os sinais de TD-NMR com o teor de sólidos solúveis totais na construção de um modelo de classificação multivariado com a técnica SIMCA para avaliar a doçura de ameixas frescas. No estudo realizado por Flores *et al.*, 2016, foi possível de se correlacionar o decaimento CPMG de laranjas aos seus teores de sólidos solúveis totais (TSS) por meio do método de regressão PLS. O TSS é um parâmetro de grande importância por estar relacionado a doçura de frutos, embora outros fatores, como o pH, exerçam grande influência na percepção sensorial (FLORES *et al.*, 2016).

Desta forma, a TD-NMR destaca-se como uma ferramenta promissora para o controle da qualidade de uma extensa variedade de alimentos, apresentando excelentes resultados em análise rápidas e não invasivas e, ainda, podendo ser combinada com ferramentas quimiométricas de classificação e/ou calibração multivariada com o objetivo de extrair o máximo de informações úteis.



## **4 PARTE I: AVALIAÇÃO DO ESTADO DE DETERIORAÇÃO DAS RAÍZES DE MANDIOCA EMPREGANDO SINAIS DE TD-NMR E MODELOS QUIMIOMÉTRICOS**

Nesta primeira parte foi abordada a potencialidade dos sinais de TD-NMR para diferir estágios de deterioração de amostras comerciais não-resfriadas e resfriadas de mandioca. Os experimentos a seguir envolveram testes de exposição ao ar e posterior medidas com a TD-NMR.

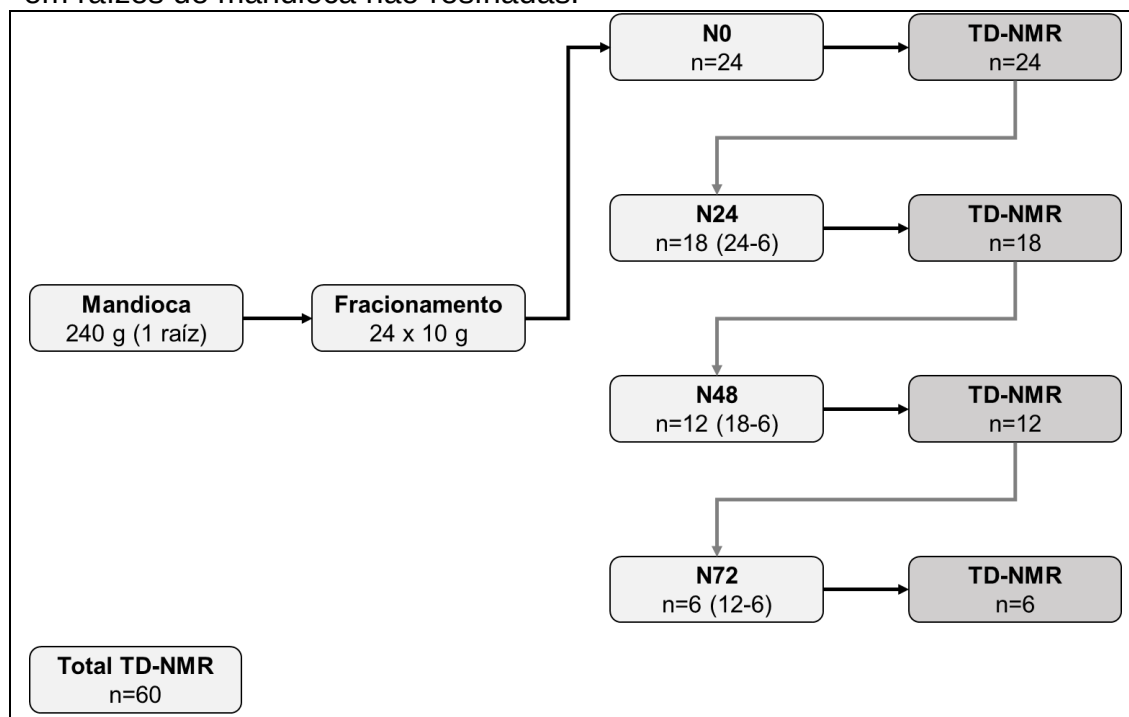
### **4.1 Materiais e métodos**

#### **4.2.1 Amostras**

Para esta proposta, foram consideradas 4 amostras de mandioca não-resfriadas e estocadas à temperatura ambiente e 3 amostras comerciais resfriadas oriundas de comércios locais (Araraquara/SP) e das cidades de São Carlos/SP e de Mogi Mirim/SP. Cada amostra não-resfriada foi lavada, seca com papel absorvente para remoção do excesso de água da lavagem, descascada, triturada utilizando um processador de alimentos doméstico HC32 120 W (Black&Decker, Uberaba, Brasil) e fracionada em 24 subamostras de 10 g. As amostras resfriadas foram diretamente trituradas e fracionadas em 24 subamostras de 10 g, uma vez que já são comercializadas limpas e sem casca.

As medidas para avaliação dos estágios de deterioração fisiológica das amostras foram efetuadas no primeiro dia (N0), após 24h (N24), 48h (N48) e 72h (N72), a Figura 4 ilustra a sequência de preparo da amostra, bem como as frações utilizadas para cada período.

**Figura 4.** Esquema de obtenção dos dados para a finalidade de construção dos modelos de classificação multivariada para avaliação do estágio de PPD em raízes de mandioca não-resfriadas.



A diminuição do número de amostras em períodos de 24 horas corresponde à utilização destas para obtenção dos valores de referência para atividade enzimática, discutidos na seção 5.

#### 4.2.2 Obtenção do sinal de TD-NMR

As medidas com a TD-NMR foram realizadas em um instrumento de bancada SLK 200 (Spinlock Magnetic Resonance Solutions, Córdoba, Argentina) que possui ímã permanente de 0,27 T com frequência de 11,3 MHz para  $^1\text{H}$ . Uma sonda de 32 mm em diâmetro e 32 mm em altura foi utilizada para as medidas das amostras. Os parâmetros utilizados na sequência CPMG foram  $\frac{\pi}{2}=11,56 \mu\text{s}$ ,  $\pi=19,6 \mu\text{s}$  e 1500 ecos com  $\tau=600 \mu\text{s}$ . Cada sinal foi resultante de uma média de quatro varreduras. A temperatura foi mantida constante a 23°C.

#### 4.2.3 Tratamento dos dados

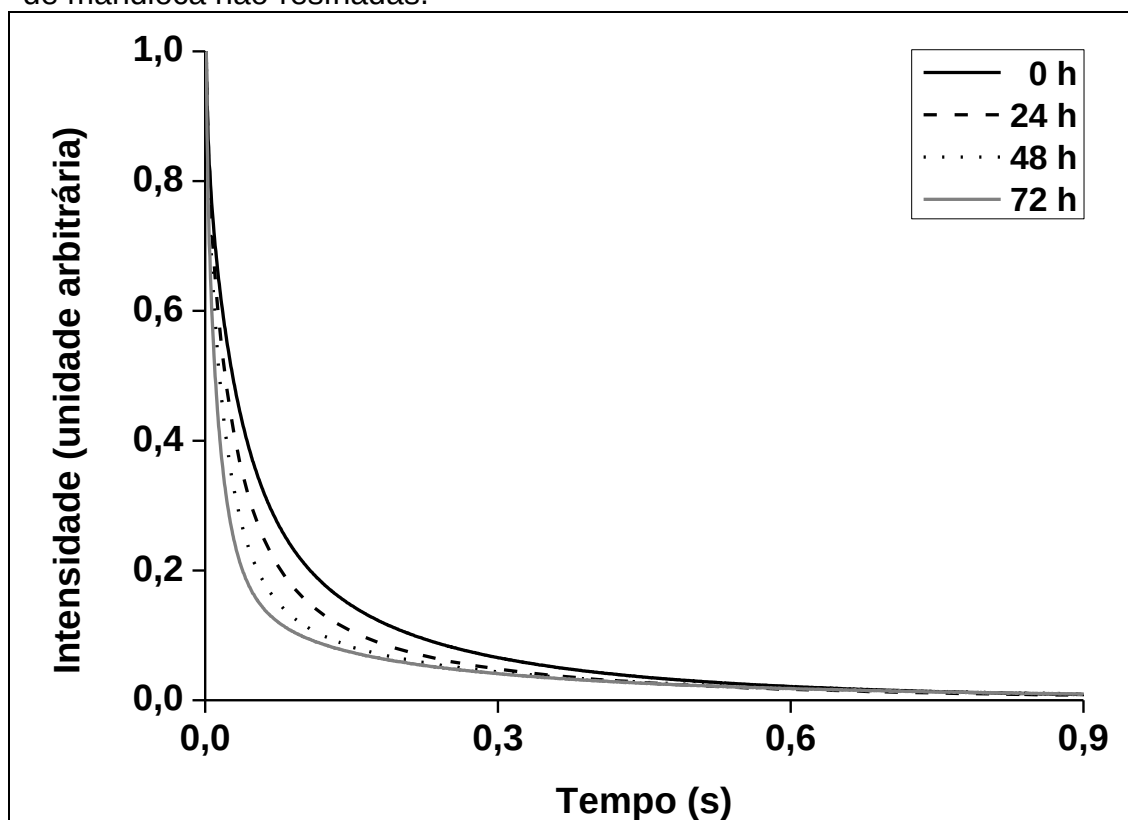
A ferramentas quimiométricas aplicadas neste estudo estão disponíveis no programa computacional Pirouette 4.5 rev. 1 (Infometrix, Bothell, WA, EUA).

## 4.2 Resultados e discussão

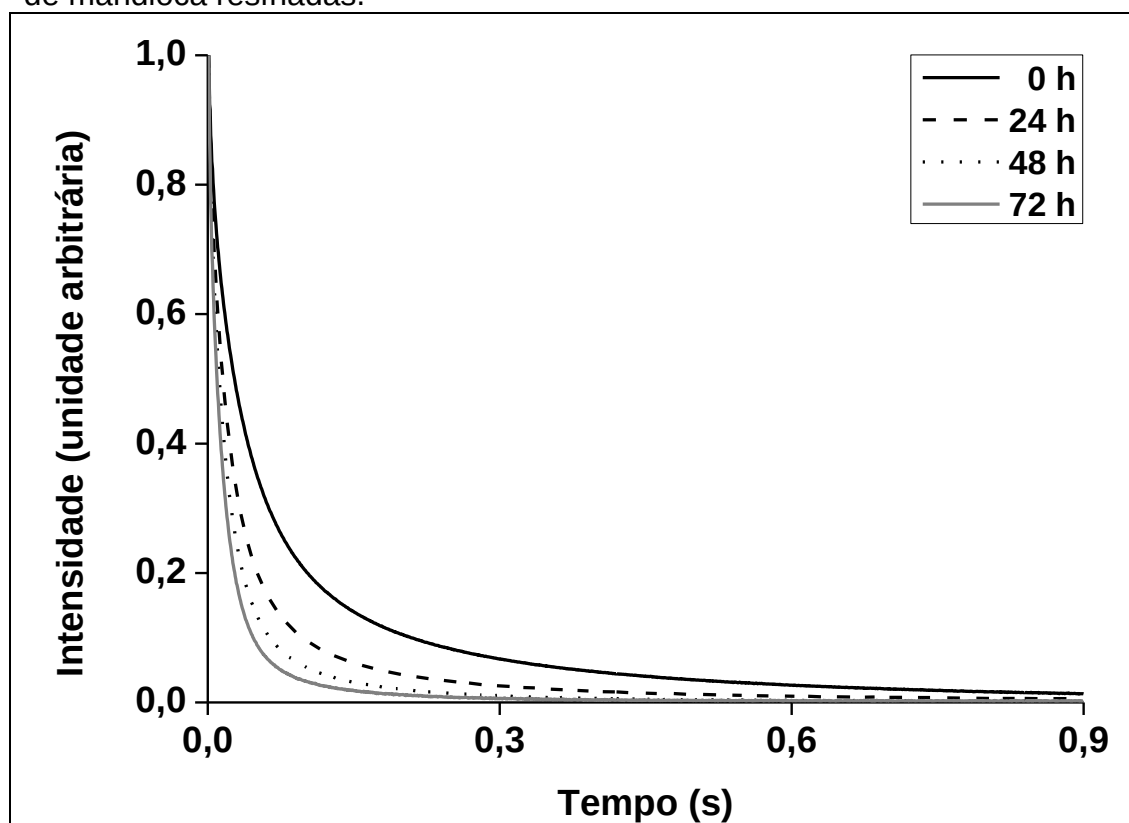
As curvas normalizadas típicas dos decaimentos CPMG para as raízes de mandioca não-resfriadas e resfriadas podem ser verificadas nas Figuras 5 e 6. Os valores de  $T_2$  estimados para os tempos de 0, 24, 48 e 72 h, respectivamente ficaram entre 0,2 e 0,02 s para ambos os tipos de amostras. Estes valores de  $T_2$  levam em consideração uma única componente exponencial (de maior valor). Pode ser observado que, com o passar do tempo e o avanço da degradação fisiológica, principalmente para amostras N72, os decaimentos exponenciais foram bem mais rápidos do que para os outros tempos.

Isto é de se esperar uma vez que a intensidade dos sinais de TD-NMR obtidos pela sequência CPMG estão relacionados à variações na no conteúdo de água presente no alimento (KIRTIIL *et al.*, 2017; SANTOS, POLIANA M. *et al.*, 2014) e, durante a PPD, há perda de umidade e espécies voláteis para o ambiente (COLESTINO, 2010; ZAINUDDIN *et al.*, 2017). Os valores de variação de massa das amostras durante o estudo corroboram com esta última informação.

**Figura 5.** Curvas normalizadas típicas dos decaimentos CPMG para amostras de mandioca não-resfriadas.



**Figura 6.** Curvas normalizadas típicas dos decaimentos CPMG para amostras de mandioca resfriadas.



Na Tabela 1, podem ser verificados os valores de perda de massa relativa onde é possível observar que a perda de massa para as amostras N72 foi da ordem de 3 vezes maior em relação às N24. Por outro lado, nas amostras resfriadas esta variação foi mais acentuada; esta diferença pode ser atribuída ao tempo de pós-colheita que pode ser inferido como maior em comparação àquelas não-resfriadas e ainda à condição de resfriamento, dado que o abaixamento da temperatura pode provocar o colapso das células vegetais pela formação de microcristais de gelo e pelo comprometimento da membrana celular, que favorecem a desidratação dos tecidos (QUEIROZ, 1997).

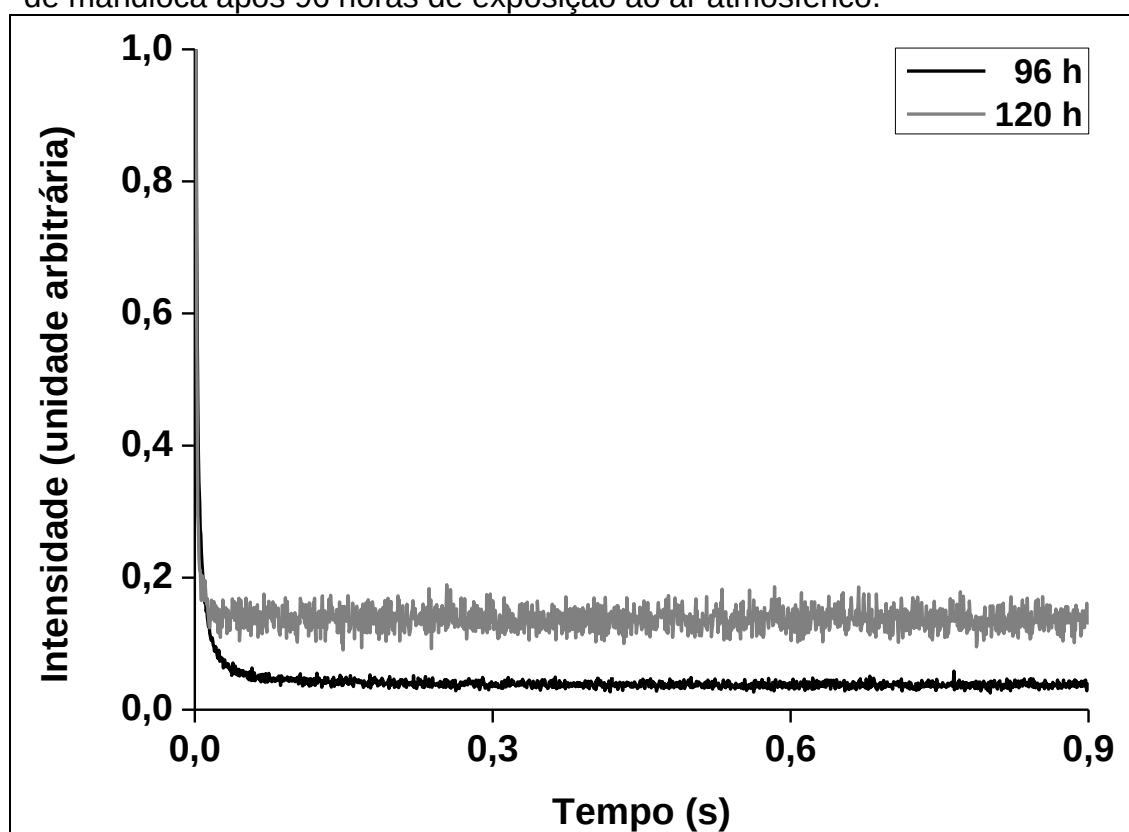
**Tabela 1.** Perda de massa relativa, em relação ao tempo zero, registrada para amostras não-resfriadas e resfriadas após os períodos de 24, 48 e 72 h.

| Tempo (h) | Valores médios (%)    |                   |
|-----------|-----------------------|-------------------|
|           | Não-resfriadas (n=36) | Resfriadas (n=18) |
| 24        | 5,27±1,91             | 4,52±2,25         |
| 48        | 10,79±4,72            | 12,33±0,87        |
| 72        | 17,61±6,06            | 17,69±1,60        |

Os valores de desvios padrão observados para as amostras não-resfriadas podem estar relacionados às diferenças na composição das raízes em decorrência da sua variedade e origem de produção. Para as amostras resfriadas esta variação pode ter sido menor em virtude do processamento anterior ao acondicionamento das raízes nas embalagens, como o uso de substâncias conservantes, ou ainda o próprio processo de resfriamento (RAMOS *et al.*, 2013; RINALDI *et al.*, 2010).

O estudo se restringiu a 72h de exposição pelo fato de as curvas de decaimento CPMG se apresentarem muito ruidosas após este tempo, uma vez que era nítido o estágio de PPD estar bem avançado. A Figura 7 ilustra curvas típicas de decaimento CPMG para amostras de mandioca após 96 horas de exposição ao ar.

**Figura 7.** Curvas normalizadas típicas dos decaimentos CPMG para amostras de mandioca após 96 horas de exposição ao ar atmosférico.



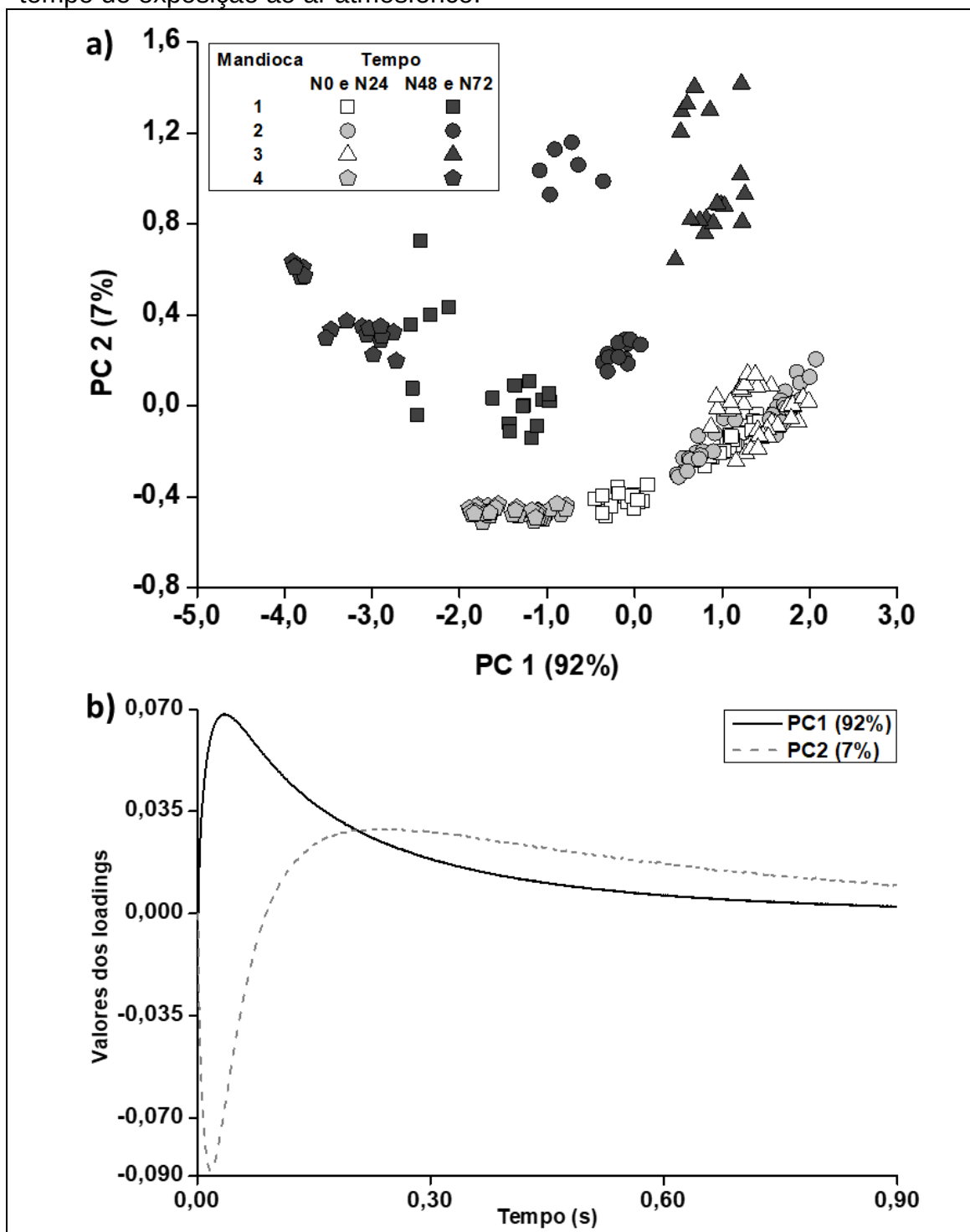
Os dados obtidos para as 4 raízes não-resfriadas testadas nesta etapa foram avaliados com uma análise exploratória pela PCA para verificar possíveis tendências. Assim, os sinais foram previamente normalizados pelo primeiro eco correspondente ao primeiro sinal que é o mais intenso, conforme mostrado nas

Figuras 5 e 6 e, posteriormente, centrados na média. Desta forma, foi construída uma matriz **X** com 240 linhas e 1500 colunas (240x1500), onde 240 é o número de amostras e 1500 são o número de variáveis independentes, correspondentes aos valores de tempo em que os 1500 ecos foram adquiridos.

O gráfico de *scores* (Figura 8.a) mostra que houve uma tendência na separação pela PC1, com 92 % de variância explicada entre os dias de exposição, após 48h de exposição ao ar. Nos tempos de 48 e 72 h, a separação pela PC1 é muito mais evidente, o que foi relacionada com diferenças entre os tipos de amostras (DJABOU *et al.*, 2017; UARROTA, 2015). A PC 2, com cerca de 7% da variância explicada, evidencia que as amostras ficaram separadas em virtude dos períodos de exposição ao ar. As amostras nos tempos de 0 e 24 h ficaram agrupadas e com pouca separação, contudo as amostras nos tempos de 48 e 72 h apresentaram uma separação mais significativa. Com estas informações foi possível verificar que as amostras N0 e N24 eram bem similares frente aos sinais de TD-NMR configurando um grupo de amostras e aquelas N48 e N72 outro grupo.

Pelo gráfico de *loadings* (Figura 8.b) verifica-se que os valores de *loadings* da PC1 estão relacionados aos maiores tempos de relaxação e aqueles da PC2 estão relacionados aos tempos de relaxação menores, indicando diferenças de umidade entre as amostras do grupo 1 (N0 e N24) e grupo 2 (N48 e 72), visto que a separação de acordo com a PPD foi pela PC2.

**Figura 8.** Gráficos de *scores* (a) e *loadings* (b) da PCA para os dados de TD-NMR das amostras de mandioca não-resfriadas, evidenciando a separação pelo tempo de exposição ao ar atmosférico.



Com base na tendência de agrupamento pelos dias de exposição observada na PCA para as amostras de mandioca não-resfriadas, foram propostos modelos de classificação com o intuito de verificar a possibilidade de utilização dos sinais de

TD-NMR para avaliação da PPD. A classe utilizada foi o período de exposição ao ar, considerando os dois grupos, que a partir daqui serão denominados de nível 1, para o grupo 1 das amostras N0 e N24 e de nível 2 para o grupo 2 para aquelas N48 e N72.

O conjunto de dados para esta proposta consistiu de um total de 240 amostras, sendo 192 incluídas no conjunto de treinamento, gerando uma matriz 192x1500 e 48 utilizadas no conjunto de validação, gerando uma matriz 48x1500. As ferramentas empregadas para o cálculo dos modelos foram KNN, SIMCA e PLS-DA.

O desempenho dos modelos de classificação foram avaliados com os seguintes parâmetros: de sensibilidade (Equação 1), seletividade (Equação 2) e exatidão (Equação 3) (FERREIRA, 2015; OLIVERI, 2016; PEREIRA *et al.*, 2013). A sensibilidade está associada à capacidade do modelo de classificação em dizer que amostras de uma classe C pertencem de fato à classe C, enquanto que a seletividade de um método se refere à capacidade deste em distinguir as amostras da classe C de amostras que não pertencem a classe C. Existem quatro possibilidades de resposta que precisam ser levadas em consideração nos cálculos dos indicadores de sensibilidade, seletividade e exatidão, são eles:

- Verdadeiro positivo (VP): a amostra que pertence à uma classe C e que foi classificada como pertencente à classe C;
- Verdadeiro negativo (VN): a amostra que não pertence à classe C e que foi classificada como pertencente a uma outra classe ou, ainda, não classificada;
- Falso positivo (FP): a amostra que não corresponde à classe C e que foi classificada como pertencente à classe C; e
- Falso negativo (FN): a amostra que pertence à classe C e que foi classificada como pertencente à uma outra classe ou, ainda, não classificada.

$$\text{Sensibilidade} = \frac{VP}{VP + FN} \quad \text{Equação (1)}$$



$$\text{Seletividade} = \frac{VN}{VN + FP} \quad \text{Equação (2)}$$

$$\text{Exatidão} = \frac{VP + VN}{VP + VN + FP + FN} \quad \text{Equação (3)}$$

A ferramenta KNN foi a que apresentou o maior índice de acertos dentre os três métodos empregados, num total de 100% tanto para o conjunto de treinamento quanto para o conjunto de validação. Isto acontece porque o KNN leva em consideração os votos das amostras vizinhas à amostra a ser classificada. Como a própria natureza dos dados proporcionou que amostras parecidas ficassem bem próximas umas às outras, ainda que em pequenos agrupamentos, o modelo KNN se mostrou excelente conforme mostra a Tabela 2.

**Tabela 2.** Parâmetros de avaliação de sensibilidade e seletividade do modelo de classificação por KNN, k=1.

|                          | Nível 1 | Nível 2 |
|--------------------------|---------|---------|
| <b>Total de amostras</b> | 144     | 48      |
| <b>VP</b>                | 144     | 48      |
| <b>VN</b>                | 48      | 144     |
| <b>FP</b>                | 0       | 0       |
| <b>FN</b>                | 0       | 0       |
| <b>Sensibilidade</b>     | 1,0     | 1,0     |
| <b>Seletividade</b>      | 1,0     | 1,0     |
| <b>Exatidão</b>          | 1,0     | 1,0     |

Como apresentado, o modelo construído com KNN apresenta alta sensibilidade e seletividade para ambos os níveis, um indicativo de que possui uma capacidade elevada de diferenciar as amostras quanto ao seu estado de deterioração que também é evidenciado pela exatidão de 1,0, sendo este o valor máximo.

A classificação utilizando SIMCA, apresentou 99% de classificações corretas para o conjunto de treinamento e 98% de classificações corretas para o conjunto de validação, com uma distância entre os dois níveis da ordem de 5,2, sendo considerado um bom valor para este parâmetro. Os erros de classificação do modelo SIMCA resultam da sobreposição das regiões (num espaço vetorial) de probabilidade de ocorrência calculadas para cada nível sendo desejada a maior

distância possível entre estas regiões de probabilidade, a um nível de confiança de 95%, (HE; RODRIGUEZ-SAONA; GIUSTI, 2007; OLIVERI; DOWNEY, 2012).

No conjunto de treinamento do modelo SIMCA houve índice de acertos de 100% para as amostras pertencentes ao nível 1, enquanto que, para as pertencentes ao nível 2, de um total de 48, uma foi classificada como pertencente ao nível 1 e outra amostra não foi considerada pertencente a nenhum dos dois níveis totalizando 96% de acertos. No conjunto de validação, 100% das amostras pertencentes ao nível 1 foram classificadas corretamente, enquanto que, para as pertencentes ao nível 2, de um total de 24, uma não foi considerada pertencente a nenhum dos níveis, correspondendo a uma taxa de acertos de 96%.

**Tabela 3.** Parâmetros de avaliação de sensibilidade e seletividade do modelo de classificação por SIMCA (2 PC, 99 e 100% de variância explicada para os níveis 1 e 2, respectivamente).

|                          | Nível 1 | Nível 2 |
|--------------------------|---------|---------|
| <b>Total de amostras</b> | 144     | 48      |
| <b>VP</b>                | 144     | 46      |
| <b>VN</b>                | 46      | 144     |
| <b>FP</b>                | 1       | 0       |
| <b>FN</b>                | 0       | 2       |
| <b>Sensibilidade</b>     | 1,0     | 0,96    |
| <b>Seletividade</b>      | 0,98    | 1,0     |
| <b>Exatidão</b>          | 0,99    | 0,99    |

O modelo construído com SIMCA também apresentou bons índices para todos os parâmetros, o que pode ser evidenciado como outra alternativa para a finalidade de classificar as amostras em relação a PPD.

O modelo de classificação utilizando PLS-DA, teve um desempenho inferior frente ao SIMCA e ao KNN, alcançando um total de 92% de classificações corretas com 2 LV e erro padrão de validação cruzada (SECV) de 0,19. Para amostras pertencentes ao nível 1, tanto no conjunto de treinamento como no conjunto de validação, houve uma taxa de 100% de classificações corretas. Contudo, das 48 amostras pertencentes ao nível 2, no conjunto de treinamento, 8 foram classificadas erroneamente e 8 foram identificadas como não pertencentes a nenhum dos níveis, totalizando 67% de acertos. Das 24 amostras pertencentes ao nível 2 no conjunto de validação, 4 foram classificadas erroneamente e outras 4 foram consideradas como não pertencentes a nenhum dos dois níveis, equivalente a 67% de acertos.

A base da PLS-DA é o critério de decisão para uma amostra ser membro de uma classe, para isto é necessário que cada valor previsto seja superior a um limiar, a um certo nível de confiança. Para uma amostra ser considerada pertencente a esta classe esta diferença precisa ser bem evidente, ou seja, os valores previstos precisam ser maiores do que este limiar. Fato que não ocorreu com este conjunto de dados.

O modelo construído com PLS-DA apresentou limitações que podem comprometer a avaliação das amostras, no caso daquelas com tempo de exposição superior a 48h, principalmente por apresentar um elevado número de falsos negativos.

**Tabela 4.** Parâmetros de avaliação de sensibilidade e seletividade do modelo de classificação por PLS-DA (2 LV, aproximadamente 100% de variância explicada e SECV = 0,19).

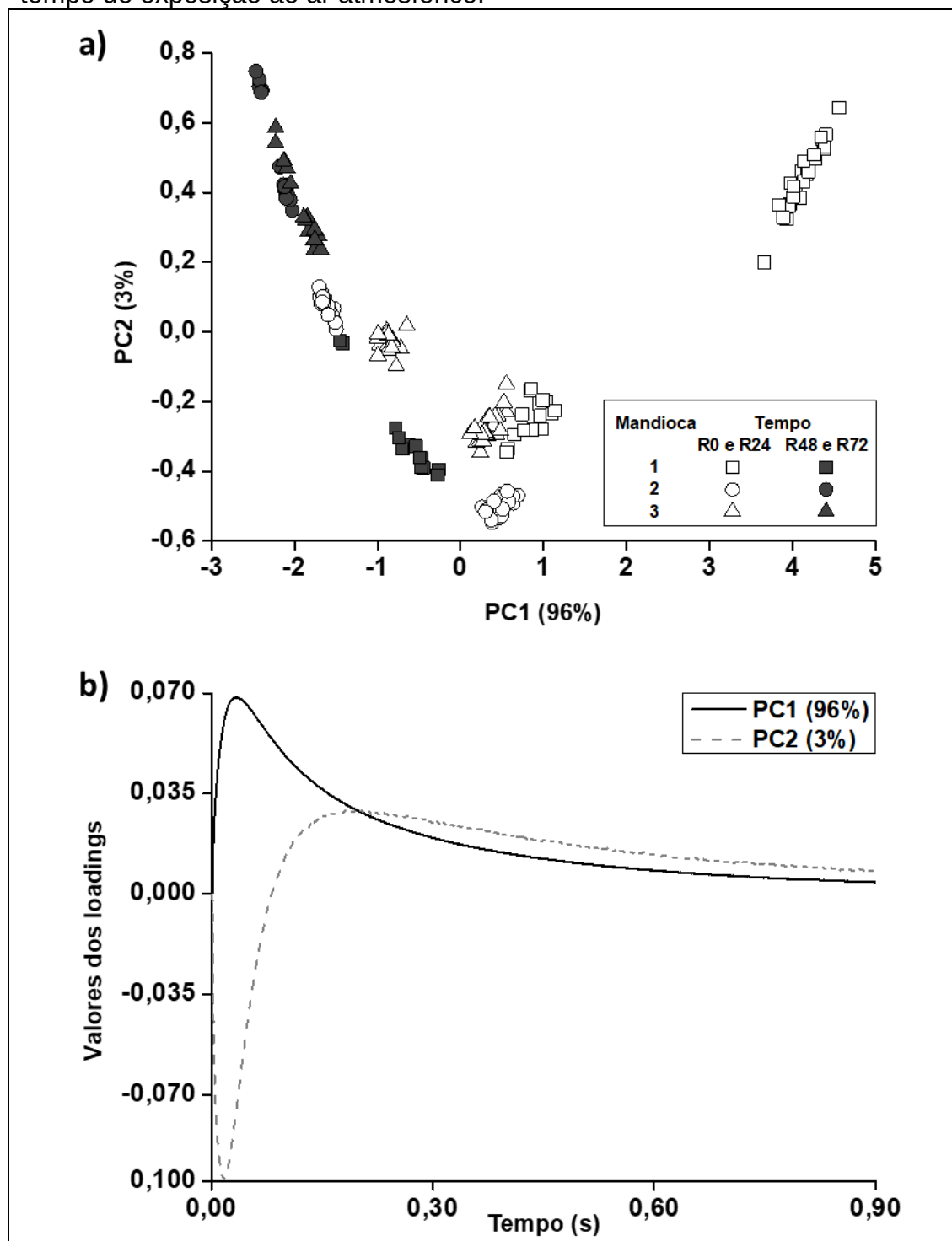
|                          | Nível 1 | Nível 2 |
|--------------------------|---------|---------|
| <b>Total de amostras</b> | 144     | 48      |
| <b>VP</b>                | 144     | 32      |
| <b>VN</b>                | 32      | 144     |
| <b>FP</b>                | 8       | 0       |
| <b>FN</b>                | 0       | 16      |
| <b>Sensibilidade</b>     | 1,0     | 0,67    |
| <b>Seletividade</b>      | 0,80    | 1,0     |
| <b>Exatidão</b>          | 0,96    | 0,92    |

Para as amostras resfriadas foi construída uma matriz **X** com 180 linhas e 1500 colunas (180x1500). O gráfico dos *scores*, Figura 9.a, mostra que a maioria das amostras dos tempos R0 e R24 foram discriminadas daquelas R48 e R72 pela PC1, com 96% de variância explicada.

O gráfico de *loadings* (Figura 9.b), assim como para as amostras não-resfriadas, mostra que os valores positivos de *loadings* da PC1 e PC2 estão relacionados aos maiores e menores tempos de relaxação, respectivamente.

Em virtude de não ser obtido uma separação tão satisfatória quanto a observada para as amostras não-resfriadas, não foi considerada a construção de modelos de classificação para avaliar o estado de deterioração das amostras resfriadas.

**Figura 9.** Gráficos de *scores* (a) e *loadings* (b) da PCA para os dados de TD-NMR das amostras de mandioca resfriadas, evidenciando a separação pelo tempo de exposição ao ar atmosférico.



## 5 PARTE II: PREVISÃO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM MANDIOCA EMPREGANDO TD-NMR E MODELOS DE REGRESSÃO PLS

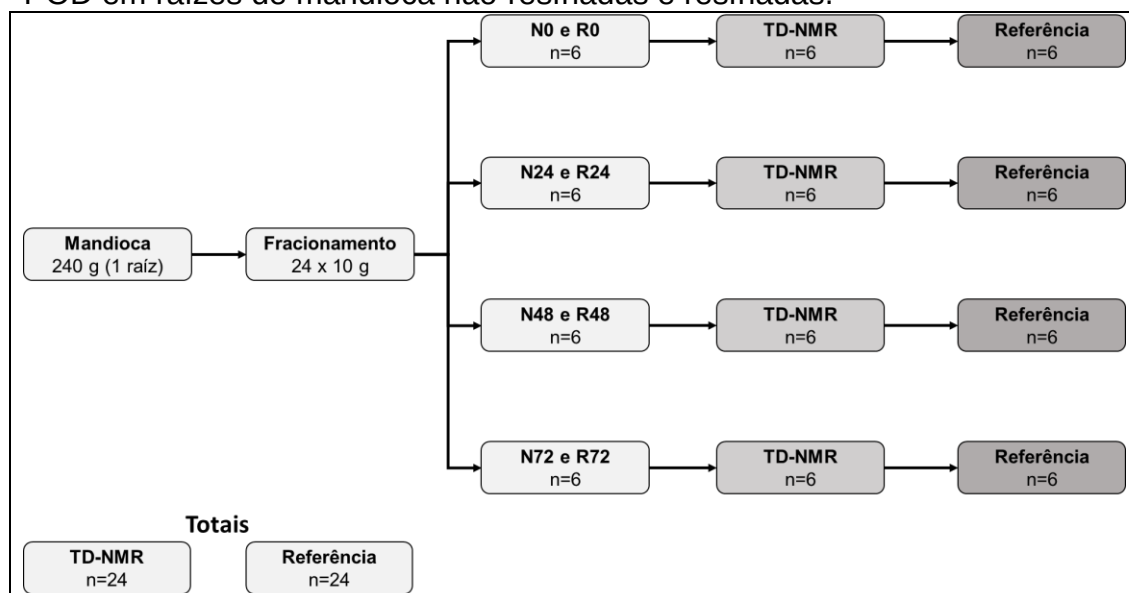
Nesta segunda parte serão apresentados os modelos de previsão de atividade enzimática para as amostras de mandioca não-resfriadas, bem como para aquelas resfriadas.

### 5.1 Materiais e métodos

#### 5.1.3 Amostras

A Figura 10 mostra a continuidade dos experimentos para a estimativa da atividade enzimática com as mesmas amostras já descritas na seção 4.2.1. O número de subamostras foi 6 para os dois tipos de amostras.

**Figura 10.** Esquema de obtenção dos dados para a finalidade de construção do modelo de regressão PLS para a determinação da atividade enzimática de POD em raízes de mandioca não-resfriadas e resfriadas.



#### **5.1.4 Preparo de soluções**

I. Solução  $1,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de guaiacol:

Em um balão volumétrico de 100 mL foram adicionados 1685  $\mu\text{L}$  de guaiacol 98 % (Sigma Aldrich, Estados Unidos) e o volume foi completado com água destilada e deionizada, homogeneizando-se o conteúdo. Em seguida uma alíquota de 1000  $\mu\text{L}$  desta solução foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL e o volume completado com água destilada e deionizada, homogeneizando-se o conteúdo em seguida.

II. Solução  $1,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de peróxido de hidrogênio:

Em um balão volumétrico de 100 mL adicionou-se 1505  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio 30 % (Synth, Brasil) e completou-se o volume com água destilada e deionizada, homogeneizando-se o conteúdo. Em seguida, uma alíquota de 1000  $\mu\text{L}$  desta solução foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL e o volume completado com água destilada e deionizada, homogeneizando-se o conteúdo em seguida.

III. Solução tampão  $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de fosfato de potássio:

Em um balão volumétrico de 1000 mL foram adicionados 17,42 g de fosfato bibásico de potássio (Synth, Brasil) e o volume completado com água destilada e deionizada, homogeneizando-se o conteúdo. Em um outro balão volumétrico, de 250 mL, foram adicionados 3,42 g de fosfato monobásico de potássio (Synth, Brasil) e o volume completado com água destilada e deionizada, homogeneizando-se o conteúdo. Em seguida, verteu-se a solução de fosfato monobásico de potássio na solução de fosfato bibásico de potássio até que se chegasse o pH desejado.

#### **5.1.5 Obtenção do sinal de TD-NMR**

As medidas foram realizadas conforme descrito na seção 4.2.2.

### **5.1.6 Determinação da atividade enzimática de POD**

#### **I. Obtenção do extrato enzimático da mandioca**

As amostras foram previamente pesadas e processadas com solução tampão  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de fosfato de potássio gelada ( $\text{pH} = 7,5$ ;  $10^\circ\text{C}$ ) e  $0,200 \text{ g}$  de polivinilpirrolidona (PVP-10, Sigma Aldrich, Estados Unidos) em um processador de alimentos doméstico HC32 120 W (Black&Decker, Uberaba, Brasil). A mistura foi filtrada em gaze e o filtrado foi centrifugado por 30 min à 3800 rpm em uma centrífuga modelo 80-2BU 220 (Centrilab, Monte Alto, Brasil). O sobrenadante que contém o extrato enzimático das peroxidases foi mantido resfriado.

#### **II. Das medidas de absorbância**

Para a determinação da atividade enzimática de POD pelo método bioquímico foram utilizados  $500 \mu\text{L}$  do extrato enzimático bruto,  $500 \mu\text{L}$  de solução  $1,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de guaiacol,  $500 \mu\text{L}$  de solução  $1,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de peróxido de hidrogênio e  $1500 \mu\text{L}$  de solução tampão  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de fosfato de potássio ( $\text{pH} = 7,5$ ). As soluções foram agitadas manualmente e, após 4 minutos, as absorbâncias em  $470 \text{ nm}$ , que é o comprimento de onda onde valor de absorbância é máximo para o tetraguaiacol ( $\epsilon_{470} = 26,6 \text{ mmol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ ), foram registradas empregando uma cubeta com caminho óptico de  $1 \text{ cm}$  em um espectrofotômetro Femto 600 plus (Femto Ind. e Com. de Instrumentos, São Paulo, SP, Brasil). O ensaio bioquímico e as medidas foram realizadas a uma temperatura de  $22^\circ\text{C}$ . Os parâmetros da reação (concentração dos reagentes,  $\text{pH}$  e tempo) foram previamente estudados com a realização de um planejamento de experimentos, discutido na seção 5.2.1.

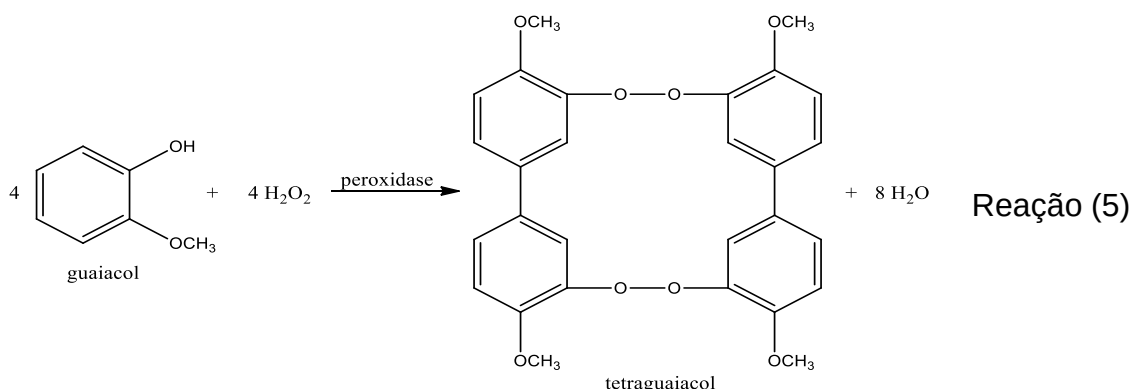
### **5.1.7 Tratamento dos dados**

Para o desenvolvimento dos modelos de estimativa da atividade enzimática foi utilizado o mesmo programa computacional Pirouette 4.5 rev. 1. As variáveis independentes foram a resposta instrumental de TD-NMR para cada tempo e a variável dependente, os valores de referência da atividade enzimática gerados pelo método padrão bioquímico descrito na seção 5.1.6.

## 5.2. Resultados e discussão

### 5.2.1 Estudo das condições experimentais para a determinação da atividade de peroxidase em mandioca

Os valores de referência para a atividade enzimática de POD foram obtidos por meio de método bioquímico que emprega a reação de redução do peróxido de hidrogênio, catalisada pelas peroxidases, utilizando guaiacol como substrato e formando uma espécie cromogênica, o tetraguaiacol (BELITZ; GORSCH; SCHIEBERLE, 2009; DOS SANTOS, MICHELE CRISTINA, 2010; MIKA; LÜTHJE, 2003; ZERAIK *et al.*, 2008). Esta reação de oxido-redução é representada abaixo.



Adaptado de: Zeraik *et. al.*, 2008.

Em virtude das divergências quanto as condições experimentais reportadas em trabalhos na literatura para a determinação da atividade enzimática de POD e com o objetivo de atingir condições ótimas para o ensaio bioquímico (Reação 5), foi proposto um planejamento de experimento fatorial fracionário  $2^{4-1}$ .

Os fatores investigados foram a concentração da solução de guaiacol ( $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  e  $1,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), a concentração da solução de peróxido de hidrogênio ( $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  e  $1,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) e o pH da solução tampão  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de fosfato de potássio (6,5 e 7,5) e o tempo de reação (2 e 4 minutos). Os sinais para a variável tempo correspondem à multiplicação dos sinais das variáveis guaiacol, peróxido e pH. A Tabela 5 ilustra os dados adquiridos na execução do planejamento fatorial  $2^{4-1}$  proposto.



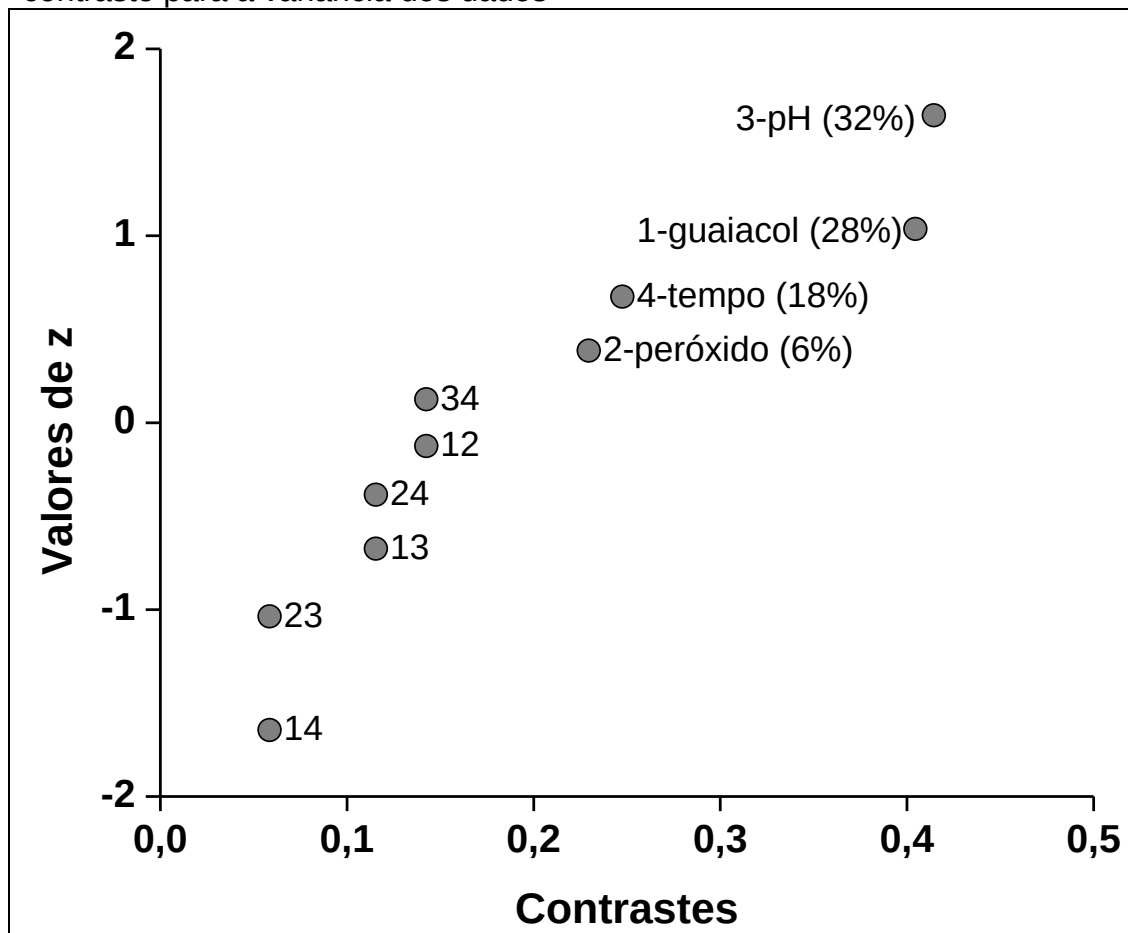
Os resultados obtidos corroboram com a importância em se manter o pH e a concentração da solução de guaiacol nos níveis mais altos, também houve uma indicação de que o tempo de reação é decisivo na observação de maiores valores de resposta. A concentração do peróxido de hidrogênio, em algumas das comparações, não figurou como sendo de grande influência, contudo, para satisfazer uma relação equimolar entre os reagentes, optou-se por mantê-la numa mesma concentração que a solução de guaiacol.

**Tabela 5.** Matriz de planejamento do experimento fatorial fracionário  $2^{4-1}$  para determinação de condições ótimas na execução do método de referência.

| Experimento | Nível do fator |                               |    |       | Resposta |
|-------------|----------------|-------------------------------|----|-------|----------|
|             | Guaiacol       | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | pH | Tempo |          |
| <b>1</b>    | -              | -                             | -  | -     | 0,068    |
| <b>2</b>    | +              | -                             | -  | +     | 0,167    |
| <b>3</b>    | -              | +                             | -  | +     | 0,137    |
| <b>4</b>    | +              | +                             | -  | -     | 0,183    |
| <b>5</b>    | -              | -                             | +  | +     | 0,190    |
| <b>6</b>    | +              | -                             | +  | -     | 0,223    |
| <b>7</b>    | -              | +                             | +  | -     | 0,165    |
| <b>8</b>    | +              | +                             | +  | +     | 0,392    |

A Figura 11 ilustra a distribuição dos contrastes segundo a probabilidade de ocorrência. Os pontos mais isolados correspondem aos fatores que apresentaram maior influência na resposta.

**Figura 11.** Gráfico de probabilidade (valores de z) para os contrastes observados. Os valores entre parênteses correspondem à contribuição do contraste para a variância dos dados



As informações adquiridas por meio dos contrastes entre as variáveis apontaram o nível mais alto para todos os fatores. Isto é, concentração da solução de guaiacol em  $1,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , concentração da solução de peróxido de hidrogênio em  $1,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH = 7,5 e tempo de reação de 4 min.

Alternativamente, foram testados mais níveis do fator tempo, num intervalo que compreende 1 a 5 minutos. Os valores entre as variâncias para o método utilizando somente o valor de absorbância com 4 minutos de reação foram comparados com aquele onde foi considerada a inclinação todas as absorbâncias medidas de 1 em 1 min até completar 5 min, utilizando um teste F com nível de 95% de confiança. Para as amostras não-resfriadas houve diferença estatística entre as variâncias com uma razão de 1,394 superior ao valor de F tabelado, onde  $F_{143,143} = 1,318$ ,  $p > 0.05$ . Caso que não ocorreu para as amostras resfriadas com

o mesmo parâmetro em 1,166 e  $F_{71,71} = 1,481$ ,  $p > 0.05$ . Assim, optou-se pelo tempo de 4 min para todos os experimentos.

De acordo com a literatura, o método de referência preconiza que nenhum dos reagentes empregados apresenta absorvância em 470 nm, podendo ser utilizado como branco analítico a solução tampão de fosfato de potássio ou água destilada/deionizada e sendo a atividade enzimática de POD calculada segundo a Equação (4) (ISAMAH, 2004; ZERAIK *et al.*, 2008).

$$E_a = \frac{A}{\epsilon \cdot b} \cdot \frac{1}{t} \cdot \frac{1}{V_{ex}} \cdot f \quad \text{Equação (4)}$$

Onde,  $E_a$  é a atividade enzimática da peroxidase ( $\text{UA} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),  $A$  é a absorvância observada no tempo de 4 minutos,  $\epsilon$  é o coeficiente de absorvidade molar do tetraguaiacol ( $26,600 \text{ mmol}^{-1} \text{L cm}^{-1}$ ),  $t$  é o tempo de processamento da reação (4 min),  $V_{ex}$  é o volume de extrato enzimático bruto (0,500 mL) e  $f$  é um fator de correção ( $10^3 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{mmol}^{-1}$ ). A unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1  $\mu\text{mol}$  de tetraguaiacol por minuto de reação.

### 5.2.2 Avaliação das medidas de atividade enzimática nas amostras de mandioca

Os valores de atividade relativa de POD para as amostras de mandioca podem ser verificados na Tabela 6. O total de medidas ( $n$ ) considerado para cada média consistiu de 6 frações x 6 amostras para as raízes não-resfriadas e de 6 frações x 3 amostras para as resfriadas, em cada um dos tempos de observação.

É possível verificar que ao longo do tempo de exposição ao ar atmosférico há uma diminuição na ação catalisadora da enzima, consistente com o comportamento reportado na literatura, o que pode indicar a ocorrência do comprometimento do processo de lignificação e, conseqüentemente no colapso da membrana celular (DJABOU *et al.*, 2017; ISAMAH, 2004; UARROTA, 2015).

Adicionalmente, pode ser notado que os valores de atividade de POD são superiores para as amostras não-resfriadas do que para as amostras comerciais

resfriadas, isto pode ser decorrente do uso de conservantes nas raízes resfriadas e do próprio processo de resfriamento, ao passo que a atividade enzimática da peroxidase é favorecida por temperaturas mais elevadas e, além disso, ainda há a influência causada pelo colapso da estrutura celular e redução da concentração de íons de cálcio (BRITO *et al.*, 2005; RAMOS *et al.*, 2013; RICKARD, 1985).

**Tabela 6.** Valores médios de atividade enzimática de POD observados para as amostras de mandioca avaliadas.

| Tempo (h) | Atividade enzimática (UA·mL <sup>-1</sup> ) |                   |
|-----------|---------------------------------------------|-------------------|
|           | Não-resfriadas (n=36)                       | Resfriadas (n=18) |
| 0         | 3,9±1,2                                     | 2,7±0,7           |
| 24        | 2,9±1,2                                     | 1,6±0,2           |
| 48        | 1,8±0,9                                     | 1,5±0,2           |
| 72        | 1,8±1,4                                     | 1,4±0,2           |

Os maiores valores de desvio padrão das amostras não-resfriadas quando comparados as amostras resfriadas pode estar relacionada à variabilidade das raízes, cabendo ressaltar que, como as amostras foram adquiridas no comércio é possível que tenham sido produzidas em regiões distintas ou mesmo serem de variedades diferentes, o que interfere na expressão genética e consequentemente na atividade metabólica das raízes (DJABOU *et al.*, 2017; UARROTA, 2015).

### 5.2.3 Modelo de estimativa da atividade enzimática por regressão em mínimos quadrados parciais (PLS)

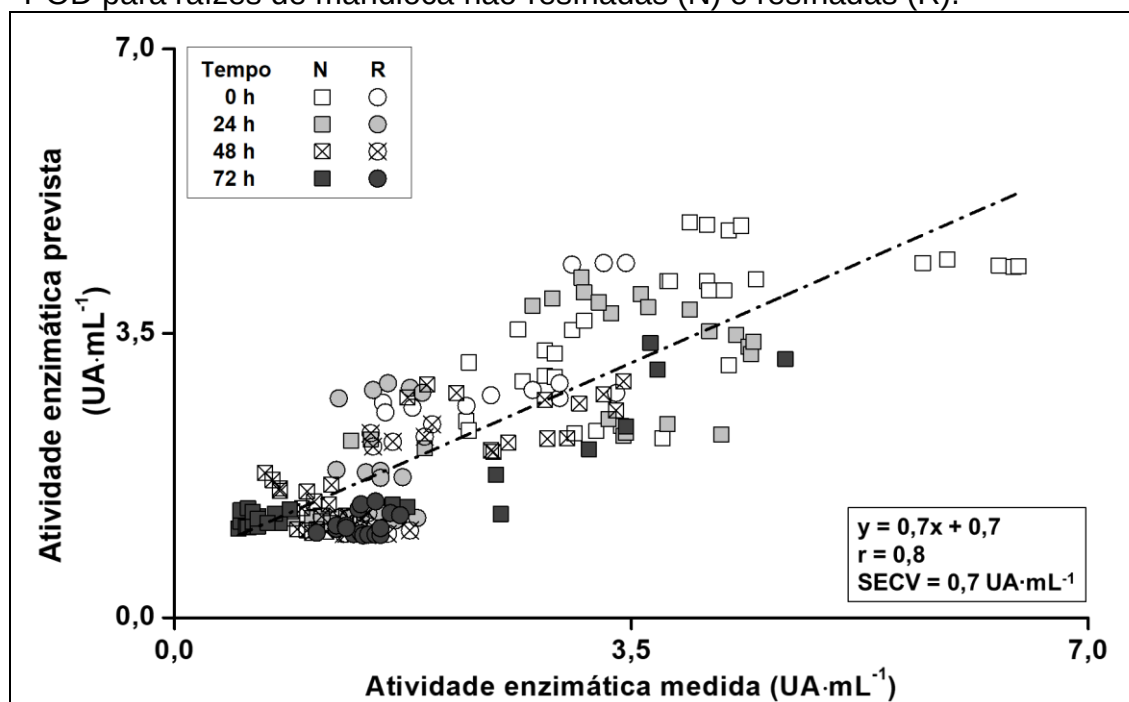
Com os resultados obtidos foi possível inferir a potencialidade da TD-NMR para detectar variações de PPD. Assim sendo, como a atividade enzimática está diretamente relacionada com variações de PPD, para esta proposta, foram utilizadas as informações dos decaimentos CPMG de amostras de mandioca não-resfriadas, n=144 (6 amostras x 6 frações x 4 tempos de exposição), e resfriadas, n=72 (3 amostras x 6 frações x 4 tempos de exposição).

Inicialmente foi considerada a construção de um modelo que contemplasse tanto raízes de mandioca não-resfriadas quanto raízes resfriadas, utilizando todo o perfil dos decaimentos CPMG (1500 variáveis independentes). O conjunto de treinamento consistiu de 173 amostras, sendo 112 correspondentes às raízes não-

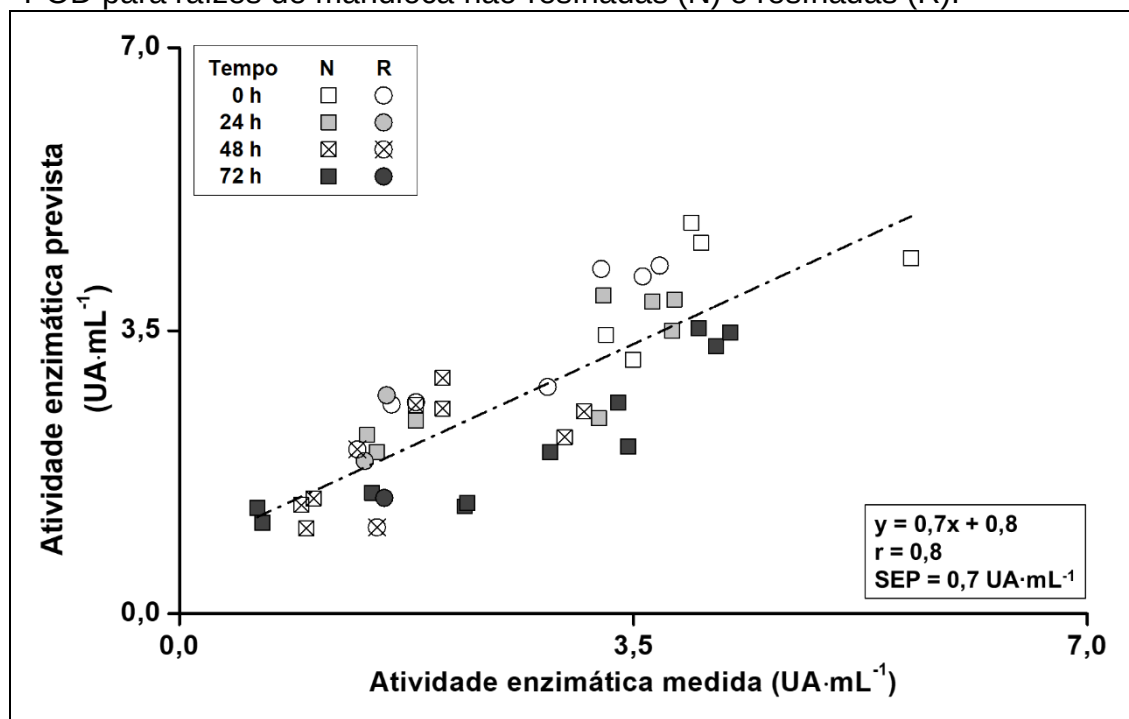
resfriadas e 61 às raízes resfriadas e o conjunto de validação um total de 43 amostras, sendo 32 para raízes não-resfriadas e 11 para raízes resfriadas. O cálculo do modelo levou em consideração a utilização de validação cruzada *leave-one-out* e 3 variáveis latentes (LV) que explicam aproximadamente 100% na variância dos dados do conjunto de treinamento.

As Figuras 12 e 13 mostram os resultados do modelo de regressão PLS para o conjunto de treinamento e para o conjunto de validação, nesta ordem. O conjunto de validação compreendeu apenas amostras que não eram pertencentes ao conjunto de treinamento do modelo e apresentou um erro padrão de previsão (SEP) da mesma dimensão apresentada pelo erro padrão da validação cruzada (SECV), apontando na possibilidade da utilização do modelo para a previsão da atividade enzimática de POD.

**Figura 12.** Curva de correlação para o conjunto de treinamento do modelo PLS construído com TD-NMR e valores de referência para atividade enzimática de POD para raízes de mandioca não-resfriadas (N) e resfriadas (R).



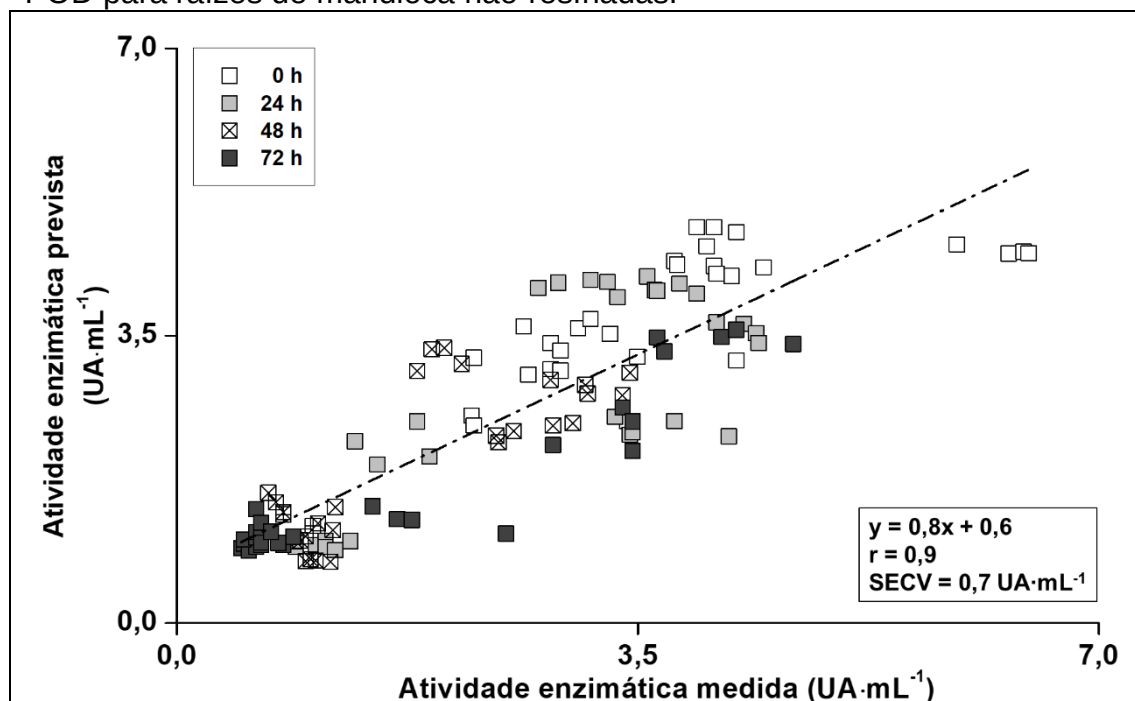
**Figura 13.** Curva de correlação para o conjunto de validação do modelo PLS construído com TD-NMR e valores de referência para atividade enzimática de POD para raízes de mandioca não-resfriadas (N) e resfriadas (R).



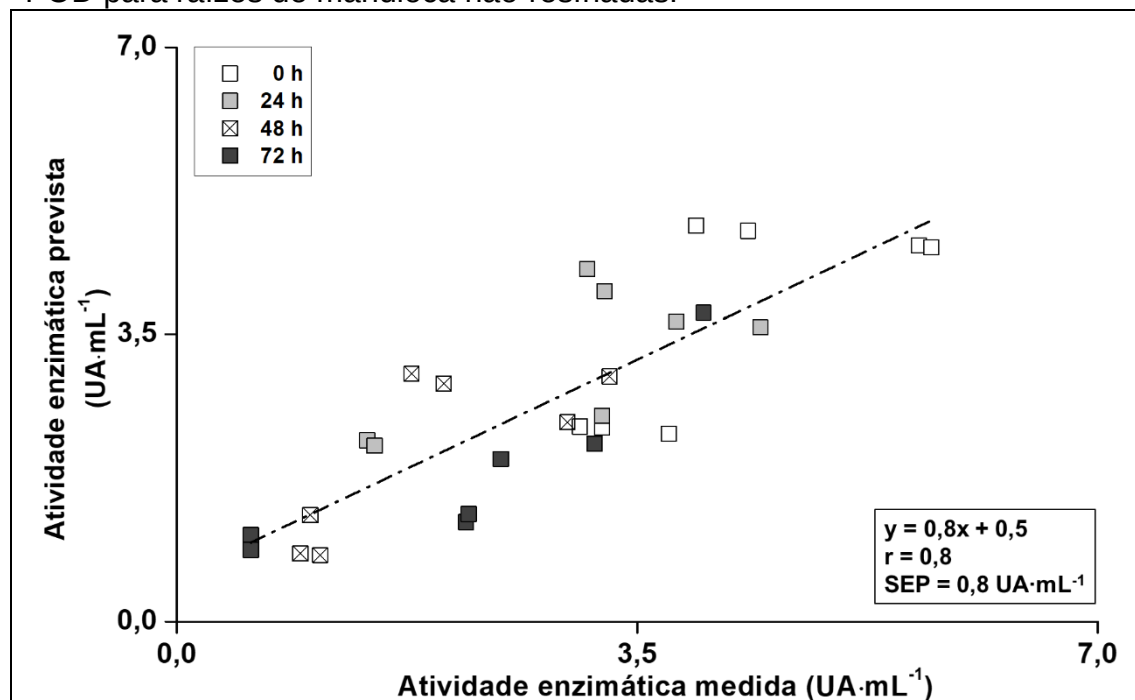
Dada as distinções entre os tipos de raízes de mandioca (não-resfriadas ou resfriadas) e a consequente diferença na magnitude dos valores de atividade enzimática de POD (Tabela 6), foram construídos outros dois modelos individuais.

Para a construção do modelo para amostras não-resfriadas foram considerados 144 decaimentos CPMG, sendo 116 empregados como conjunto de treinamento e 28 como conjunto de validação. Neste caso foi feita uma seleção de variáveis, sendo considerados os primeiros 0,19 s do decaimento CPMG, isto porque após este tempo a resposta instrumental apresenta valores muito próximos a zero, não acrescentando informação significativa para a construção do modelo. A utilização de 3 LV, que explicam cerca de 100% da variância, levou a valores de SECV (Figura 14) e SEP (Figura 15) próximos aos obtidos para o modelo contendo ambos os tipos de raízes e uma elevada correlação entre os valores de referência e os valores previstos pelo modelo ( $r=0,9$ ).

**Figura 14.** Curva de correlação para o conjunto de treinamento do modelo PLS construído com TD-NMR e valores de referência para atividade enzimática de POD para raízes de mandioca não-resfriadas.

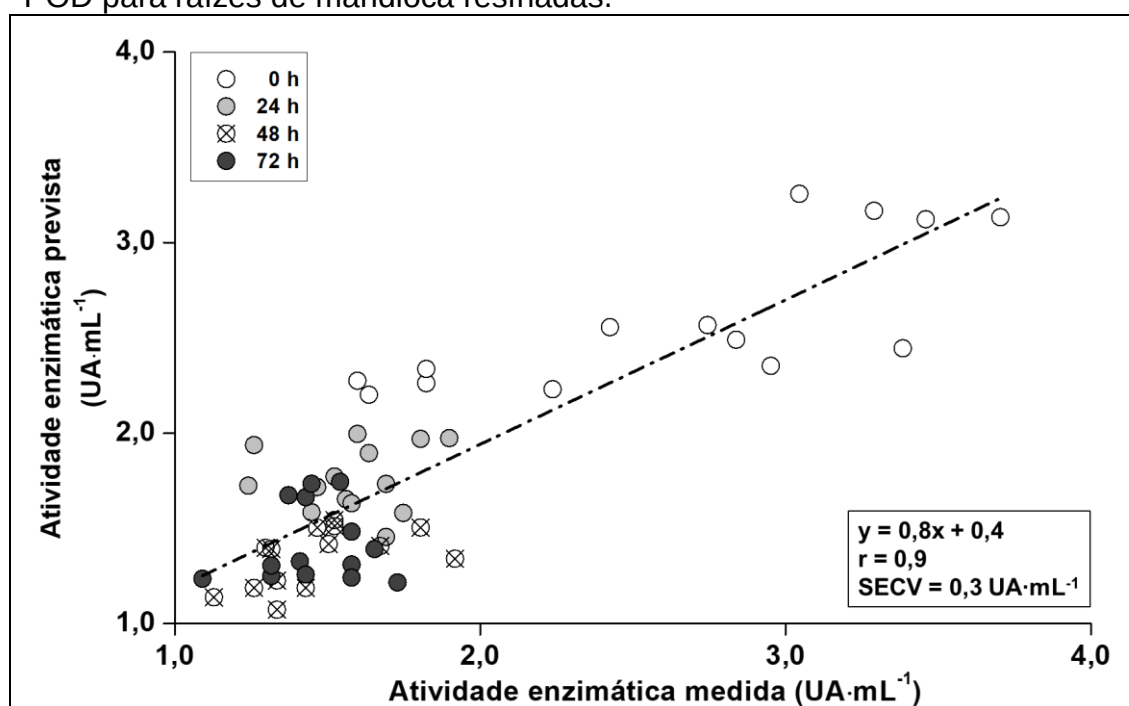


**Figura 15.** Curva de correlação para o conjunto de validação do modelo PLS construído com TD-NMR e valores de referência para atividade enzimática de POD para raízes de mandioca não-resfriadas.



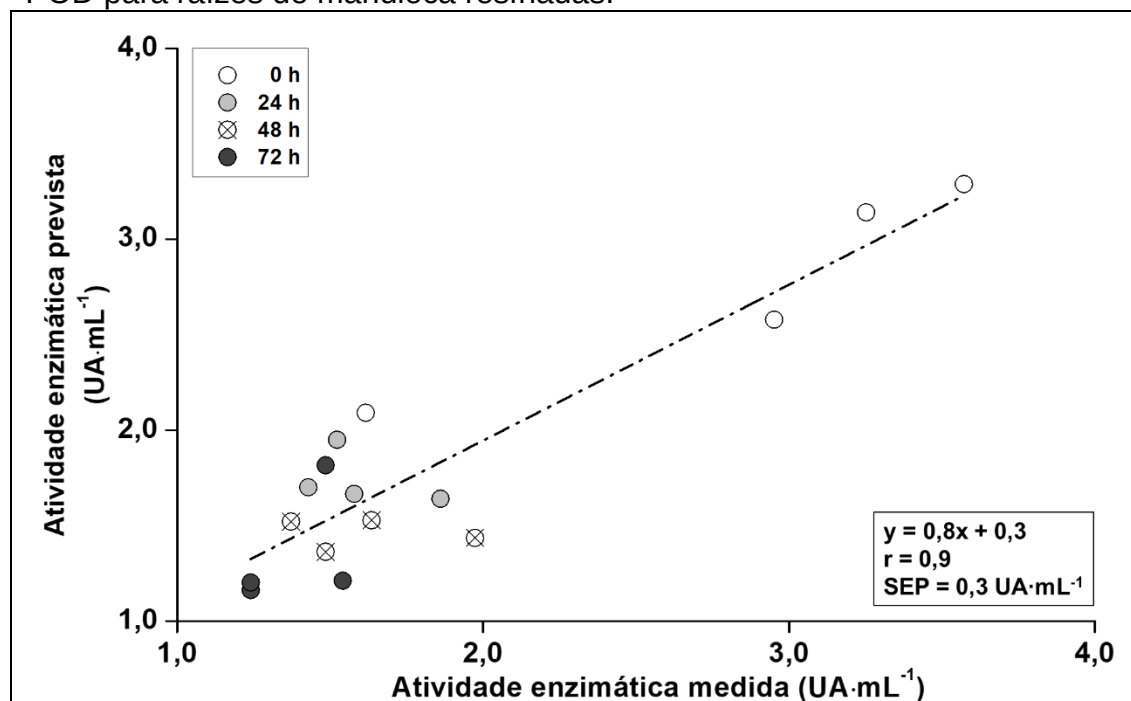
Os resultados de maior destaque foram os encontrados para o modelo construído para as raízes resfriadas, utilizando 360 variáveis independentes (0 a 0,22 s do decaimento CPMG). Neste modelo foram obtidos baixos erros e uma alta correlação entre os valores previstos pelo modelo e os medidos pelo método de referência, com um total de 4 LV que explicam aproximadamente 100% na variância dos dados. As Figuras 16 e 17 ilustram as curvas de correlação entre os valores de referência e os valores previstos pelo modelo para o conjunto de treinamento e para o conjunto de validação, respectivamente.

**Figura 16.** Curva de correlação para o conjunto de treinamento do modelo PLS construído com TD-NMR e valores de referência para atividade enzimática de POD para raízes de mandioca resfriadas.





**Figura 17.** Curva de correlação para o conjunto de validação do modelo PLS construído com TD-NMR e valores de referência para atividade enzimática de POD para raízes de mandioca resfriadas.



Uma das principais diferenças entre os modelos individuais para cada tipo de mandioca é a magnitude encontrada para os valores de SECV e SEP, o que ocorre em razão de as faixas nos valores de atividade de POD serem diferentes para raízes não-resfriadas e resfriadas.

Para fins de comparação foram calculadas as figuras de mérito sensibilidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) de todos os modelos seguindo o mesmo procedimento de PEREIRA *et al.*, 2006.

Nestes dados, para o cálculo das figuras de mérito, foram utilizados os valores de resposta instrumental da região entre 0,8 e 0,9 s dos sinais de TD-NMR como branco analítico, pois esta é considerada uma região que contém somente ruído instrumental, em outras palavras, valores com magnitudes na ordem de 0. O cálculo da sensibilidade do método foi feito somando-se os coeficientes de regressão ao quadrado e extraíndo-se a raiz deste somatório, sendo a sensibilidade dada pelo inverso deste valor calculado.

Um resumo dos modelos com as principais figuras de mérito é mostrado na Tabela 7, evidenciando resultados promissores para um modelo global que envolve ambos os tipos de amostras, considerando que os limites de detecção e quantificação foram os mais sensíveis possíveis.

**Tabela 7.** Figuras de mérito estimadas para os modelos empregados na previsão da atividade de POD em raízes de mandioca.

| <b>Figura de mérito</b>   | <b>Método</b>                                      |                                   |                               |
|---------------------------|----------------------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
|                           | Não-resfriadas e<br>resfriadas (1500<br>variáveis) | Não-resfriadas<br>(319 variáveis) | Resfriadas (360<br>variáveis) |
| Sensibilidade             | 0,4                                                | 0,2                               | 0,05                          |
| LD (UA·mL <sup>-1</sup> ) | 0,06                                               | 0,1                               | 0,5                           |
| LQ (UA·mL <sup>-1</sup> ) | 0,2                                                | 0,4                               | 1,7                           |

## 6 CONCLUSÃO

Os sinais de TD-NMR gerados por meio da sequência CPMG foram capazes de detectar variações na composição de amostras comerciais de raízes de mandioca não-resfriadas e resfriadas durante a PPD.

Para as raízes não-resfriadas foi possível construir modelos de classificação multivariada que apresentaram resultados promissores para diferenciar raízes de mandioca com indícios de estágio mais avançado de PPD, após 48h de exposição ao ambiente.

A TD-NMR também se mostrou promissora para estimar a atividade enzimática de POD em amostras de mandioca não-resfriadas e resfriadas, apresentando bons índices para as figuras de mérito.

Estes resultados indicam que a TD-NMR combinada com modelos quimiométricos pode ser apresentada como um método analítico para avaliação de deterioração fisiológica em alimentos sólidos, com o estudo de caso da mandioca podendo ser estendido a outros tipos de produtos.

## REFERÊNCIAS

- ADENLE, Ademola A.; MANNING, Louise; AZADI, Hossein. Agribusiness innovation: A pathway to sustainable economic growth in Africa. **Trends in Food Science and Technology** v. 59, p. 88–104 , 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2016.11.008>>.
- AKINPELU, A O, L. E.F. AMAMGBO, A.O. OLOJEDE, A.S. OYEKALE. Cassava production and consumption: Health implications. **Journal of Agriculture and Social Research (JASR)** v. 11, n. 1, p. 118–125 , 2011.
- AOAC. **AOAC Official Methods of Analysis**. 15. ed. Arlington: Association of Official Analytical Chemists Inc., 1990. 1 v. .9780935584752.
- AOCS. **AOCS Official Method Cd 16b-93: Solid Fat Content (SFC) by Low-Resolution Nuclear Magnetic Resonance, Direct Method**. [S.l: s.n.], 2017.
- ATTA-UR-RAHMAN, FRS; CHOUDHARY, M. Iqbal. **Applications of NMR Spectroscopy**. [S.l.]: BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS, 2015. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/128289/volume/1>> . 9781608059621.
- BELITZ, H.-D.; GORSCH, Werner; SCHIEBERLE, Peter. **Food Chemistry**. 4. ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009. 1070 p. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-69934-7>> . 978-3-540-69933-0.
- BETTEN, Mark; COLLEGE, Calvin. Betten- Basic Theory of Nuclear Magnetic Resonance. n. 2 , 2004.
- BIZZANI, Marilia *et al.* Non-invasive spectroscopic methods to estimate orange firmness, peel thickness, and total pectin content. **Microchemical Journal** v. 133, p. 168–174 , 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2017.03.039>>.
- BLÜMICH, Bernhard. Introduction to compact NMR: A review of methods. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry** v. 83, p. 2–11 , 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2015.12.012>>. 0165-9936.
- BRITO, Carlos Alexandre Kogushi De *et al.* Características da atividade da peroxidase de abacaxis (*Ananas comosus* (L.) Merrill) da cultivar IAC Gomo-de-mel e do clone IAC-1. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** v. 25, n. 2, p. 244–249 , 2005.
- COLESTINO, Sonia Maria Costa. Princípios de Secagem de Alimentos. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária** n. 2176–5081, p. 50 , 2010.1517-5111.
- CONAB. MANDIOCA: RAIZ, FARINHA E FÉCULA. **Conjuntura mensal**. Janeiro. , 2017.
- DEFERNEZ, Marianne *et al.* Low-field <sup>1</sup>H NMR spectroscopy for distinguishing between arabica and robusta ground roast coffees. **Food Chemistry** v. 216, p. 106–113 , 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.028>>.

DIEFFENBACHER, A.; POCKLINGTON, W. D. (Orgs.). **Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives**. 7. ed. [S.l: s.n.], 1991. 1-151 p. International Union of Pure and Applied Chemistry.0-632-03337-1.

DIXON, Malcom; WEBB, Edwin C. **Enzymes**. 2. ed. London: Longmans Green and Co. Ltd., 1964. .

DJABOU, Astride S.M. *et al.* Cassava postharvest physiological deterioration: a complex phenomenon involving calcium signaling, reactive oxygen species and programmed cell death. **Acta Physiologiae Plantarum** v. 39, n. 4 , 2017.0137-5881 (Print)r0137-5881.

DOS SANTOS, Michele Cristina. **Estudos bioquímicos de tegumento de soja brasileira : isolamento , purificação e caracterização de peroxidase com guaiacol como substrato**. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, 2010. 111 p.

DUNFORD, H. Brian. **Heme Peroxidases**. 1. ed. [S.l.]: Wiley-VCH, 1999. 532 p. .9780471242444.

FAO. Post-harvest deterioration of cassava. **FAO Corporate Document Repository** n. Figure 7, p. 1 , 1995. Disponível em: <<http://www.fao.org/documents/en/detail/21004>>.9251036071.

FAO. **Save and Grow: Cassava. A Guide to Sustainable Production Intensification**. [S.l: s.n.], 2013. 142 p. .9789251076415.

FARIAS, Alba Rejane Nunes *et al.* **Mandioca: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. 176 p. .85-7383-368-8.

FERREIRA, Márcia Miguel Castro. **Quimiometria - conceitos, métodos e aplicações**. 1. ed. Campinas: UNICAMP, 2015. 493 p. .9788526810631.

FIELD, L. D.; STERNHELL, S.; KALMAN, J. R. **Organic Structures from Spectra**. 4. ed. [S.l.]: John Wilhey and Sons Ltd., 2008. 453 p. 1 v. .9780470319260.

FLORES, D. W.M. *et al.* Prediction of Orange juice sensorial attributes from intact fruits by TD-NMR. **Microchemical Journal** v. 128, p. 113–117 , 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2016.04.009>>.0925-5214.

FREITAS, Andreia Andrade De *et al.* Atividades das enzimas peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) nas uvas das cultivares benitaka e rubi e em seus sucos e geleias. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** v. 28, n. 1, p. 172–177 , 2008. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-20612008000100025&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612008000100025&lng=en&nrm=iso&tlng=pt)>.

GUTHAUSEN, Gisela. Analysis of food and emulsions. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry** v. 83, p. 103–106 , 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2016.02.011>>.

HE, Jian; RODRIGUEZ-SAONA, Luis E; GIUSTI, M Monica. Midinfrared Spectroscopy for Juice Authentication s Rapid Differentiation of Commercial Juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 55, p. 4443–4452 , 2007.

HIRAGA, S. A Large Family of Class III Plant Peroxidases. **Plant and Cell Physiology** v. 42, n. 5, p. 462–468 , 2001. Disponível em:  
<<https://academic.oup.com/pcp/article-lookup/doi/10.1093/pcp/pce061>>.0032-0781.

ISAMAH, G. K. ATPase, peroxidase and lipoxygenase activity during post-harvest deterioration of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) root tubers. **International Biodeterioration and Biodegradation** v. 54, n. 4, p. 319–323 , 2004.0964-8305.

IULIANELLI, Gisele C V; TAVARES, Maria I B. Caracterização de diferentes amostras de mandioca por espectroscopia de ressonância magnética nuclear. v. 21, p. 131–136 , 2011.

KHAN, Md Imran H. *et al.* Investigation of bound and free water in plant-based food material using NMR T2 relaxometry. **Innovative Food Science and Emerging Technologies** v. 38, p. 252–261 , 2016.

KIRTIL, Emrah *et al.* Recent Advances in Time Domain NMR & MRI Sensors and Their Food Applications. **Current Opinion in Food Science** , 2017. Disponível em:  
<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214799317301078>>.3122105632.

KUMAR, Naveen *et al.* Chemometrics tools used in analytical chemistry: An overview. **Talanta** v. 123, p. 186–199 , 2014. Disponível em:  
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2014.02.003>>.9198788825.

LI, Huiying; POULOS, Thomas L. Structural variation in heme enzymes: a comparative analysis of peroxidase and P450 crystal structures. **Structure** v. 2, n. 6, p. 461–464 , 1994.0969-2126 (Print)0969-2126 (Linking).

MARCONI, Massimo F. *et al.* Diverse food-based applications of nuclear magnetic resonance (NMR) technology. **Food Research International** v. 51, n. 2, p. 729–747 , 2013. Disponível em:  
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2012.12.046>>.0963-9969.

MELEDANDRI, Carla J.; BROUGHAM, Dermot F. Low field magnetic resonance techniques in the development of nanomaterials for biomedical applications. **Analytical Methods** v. 4, n. 2, p. 331 , 2012. Disponível em:  
<<http://xlink.rsc.org/?DOI=c2ay05420e>>.10.1039/C2AY05420E.

MIKA, Angela; LÜTHJE, Sabine. Properties of Guaiacol Peroxidase Activities Isolated from Corn Root Plasma Membranes. **Plant Physiology** v. 132, n. 3, p. 1489–1498 , 2003. Disponível em:  
<<http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.103.020396>>.0032-0889 (Print)0032-0889 (Linking).

MILLER, James N.; MILLER, Jane C. **Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry**. 6. ed. [S.l.]: Pearson Education Canada, 2010. 296 p. .978-0-273-73042-2.

NEPA - NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO. **Tabela brasileira de composição de alimentos**. [S.l.: s.n.], 2011. 161 p. Disponível em:  
<<http://www.unicamp.br/nepa/taco/>>. .1578810728.

NETO, Benício De Barros; SCARMINIO, Ieda S.; BRUNS, Roy E. 25 Anos de

quimiometria no Brasil. **Química Nova** v. 29, n. 6, p. 1401–1406 , 2006.0100-4042.

NETO, Calixto Rosa; MARCOLAN, Alaerto Luiz. Estudo exploratório acerca do comportamento de consumo de mandioca e derivados no Brasil , com ênfase na Região Norte . **Sociedade Brasileira de Economia** p. 1–20 , 2010. Disponível em: <<http://www.sober.org.br/palestra/15/401.pdf>>.

OLIVERI, Paolo. Class-modelling in food analytical chemistry: Development, sampling, optimisation and validation issues - A tutorial. **Analytica Chimica Acta** p. 1–11 , 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2017.05.013>>.

OLIVERI, Paolo; DOWNEY, Gerard. Multivariate class modeling for the verification of food-authenticity claims. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry** v. 35, p. 74–86 , 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2012.02.005>>.0165-9936.

OLSEN, K M; SCHAAL, B A. Evidence on the origin of cassava: phylogeography of *Manihot esculenta*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 96, n. 10, p. 5586–91 , 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10318928>>5Cn<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC21904>>.0027-8424.

OZOEGWU, C. G. *et al.* Biomass and bioenergy potential of cassava waste in Nigeria: Estimations based partly on rural-level garri processing case studies. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** v. 72, n. January, p. 625–638 , 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2017.01.031>>.

PEREIRA, Fabíola Manhas Verbi *et al.* Classification of intact fresh plums according to sweetness using time-domain nuclear magnetic resonance and chemometrics. **Microchemical Journal** v. 108, p. 14–17 , 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2012.12.003>>.

PEREIRA, Fabíola Manhas Verbi; HASHIMOTO, Juliana Campos; *et al.* Determination of Quality Parameters for Mustard Sauces in Sealed Packets Using Time-Domain Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Chemometrics. **Food Analytical Methods** v. 8, n. 1, p. 122–125 , 2015.

PEREIRA, Fabíola Manhas Verbi; REBELLATO, Ana Paula; *et al.* Through-package fat determination in commercial samples of mayonnaise and salad dressing using time-domain nuclear magnetic resonance spectroscopy and chemometrics. **Food Control** v. 48, p. 62–66 , 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.02.028>>.

PEREIRA, Fabíola Manhas Verbi; PEREIRA-FILHO, Edenir Rodrigues; BUENO, Maria Izabel Maretti Silveira. Development of a Methodology for Calcium, Iron, Potassium, Magnesium, Manganese, and Zinc Quantification in Teas Using X-ray Spectroscopy and Multivariate Calibration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 54, n. 16, p. 5723–5730 , ago. 2006. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf0603782>>.

PRAKASH, Adam. Cassava: International Market Profile. p. 2–11 , 2013. Disponível em: <<http://go.worldbank.org/XSRUM2ZXMO>>.

QUEIROZ, Cristina Generosa de Senna. *Avaliação de estresse por resfriamento em raízes de café : identificação dos danos oxidativos por microcalorimetria, espectroscopia EPR e atividade de enzimas antioxidantes*. Campinas: UNICAMP. Disponível em: <<http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/314870>>. , 1997

RAMOS, Paula Acácia Silva *et al.* Efeito de inibidores da peroxidase sobre a conservação de raízes de mandioca in natura Effect of peroxidase inhibitors on the conservation of fresh cassava roots. **Brazilian Journal of Food Technology** v. 16, n. 2, p. 116–124 , 2013.

REILLY, Kim *et al.* Oxidative stress responses during cassava post-harvest physiological deterioration. **Plant Molecular Biology** v. 56, p. 621–637 , 2004.0167-4412 (Print)r0167-4412 (Linking).

RIBEIRO, Fayene Zeferino. Avaliação da qualidade de frutas por Ressonância Magnética Nuclear em baixa resolução. p. 103 , 2008.

RICKARD, June E. Physiological deterioration of cassava roots. **Journal of the Science of Food and Agriculture** v. 36, n. 3, p. 167–176 , 1985.1097-0010.

RINALDI, Maria Madalena *et al.* Processamento Mínimo: uma alternativa para os produtores de mandioca de mesa do Cerrado. p. 47 , 2010.

SANTOS, Poliana M. *et al.* A fast and non-destructive method to discriminate beef samples using TD-NMR. **Food Control** v. 38, n. 1, p. 204–208 , 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.10.026>>.

SANTOS, Poliana M. *et al.* Non-invasive detection of adulterated olive oil in full bottles using time-domain NMR relaxometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society** v. 28, n. 2, p. 385–390 , 2017.

SHAO, Xiaolong; LI, Yunfei. Classification and Prediction by LF NMR. **Food and Bioprocess Technology** v. 5, n. 5, p. 1817–1823 , 2012.

SUPER, John C. Spanish Diet in the Atlantic Crossing, the 1570s. **Terrae Incognitae** v. 16, n. 1, p. 57–70 , 1984. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1179/tin.1984.16.1.57>>.

TODT, Harald *et al.* Quality control with time-domain NMR. **European Journal of Lipid Science and Technology** v. 103, n. 12, p. 835–840 , 2001. Disponível em: <[http://doi.wiley.com/10.1002/1438-9312\(200112\)103:12%3C835::AID-EJLT835%3E3.0.CO;2-P](http://doi.wiley.com/10.1002/1438-9312(200112)103:12%3C835::AID-EJLT835%3E3.0.CO;2-P)>.1438-9312.

TODT, Harald *et al.* Water/moisture and fat analysis by time-domain NMR. **Food Chemistry** v. 96, n. 3, p. 436–440 , 2006.0308-8146.

UARROTA, Virgílio Gavicho. **Análises metabólômicas, enzimáticas e histológicas de raízes de mandioca (manihot esculenta crantz), durante a deterioração fisiológica em pós-colheita**. 2015. 174 p. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/133077>>. 9788578110796.

VAN DUYNHOVEN, J. *et al.* **Time-domain NMR applied to food products**. 1. ed. [S.l.]: Elsevier Ltd., 2010. 145-197 p. 69 v. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0066-4103\(10\)69003-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0066-4103(10)69003-5)>. .0066-4103n978-0-12-



381355-8.

VENÂNCIO, Tiago et al. **Medida Rápida e Simultânea dos Tempos de Relaxação Longitudinal e Transversal por RMN-CWFP**. São Carlos: [s.n.], 2005.

YI, Bo *et al.* Antioxidant phenolic compounds of cassava (*Manihot esculenta*) from Hainan. **Molecules** v. 16, n. 12, p. 10157–10167 , 2011.1420-3049.

ZAINUDDIN, Ima M. *et al.* Cassava post-harvest physiological deterioration: From triggers to symptoms. **Postharvest Biology and Technology** n. January, p. 0–1 , 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.09.004>>.

ZANATTA, Caroline Lima; ZOTARELLI, Marta Fernanda; CLEMENTE, Edmar. Peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) em polpa de goiaba (*Psidium guajava* R.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos** v. 26, n. 3, p. 705–708 , 2006.

ZERAIK, Ana Eliza *et al.* Desenvolvimento de um spot test para o monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação. **Química Nova** v. 31, n. 4, p. 731–734 , 2008.



# Enzymatic Activity Prediction Using Time-Domain Nuclear Magnetic Resonance (TD-NMR) and Multivariate Analysis: A Case Study Using Cassava Roots

Josilei da Silva Ferreira<sup>1</sup> · Tiago Bueno Moraes<sup>2</sup> · Luiz Alberto Colnago<sup>3</sup> · Fabíola Manhas Verbi Pereira<sup>1</sup> 

Received: 18 December 2017 / Revised: 14 February 2018  
© Springer-Verlag GmbH Austria, part of Springer Nature 2018

**Abstract** Time-domain nuclear magnetic resonance (NMR) has been widely used in food science. In this work, we demonstrate that the NMR decay obtained with the Carr–Purcell–Meiboom–Gill (CPMG) sequence can be used to estimate the peroxidase activity (PA) in cassava roots. This enzyme has been involved in post-harvest physiological deterioration (PPD), which limits the storage of fresh cassava to a few days. Cassava is a staple food for almost one billion people in tropical areas in Americas, Africa and Asia. A multivariate method using CPMG data and reference values of PA from a standard biochemical assay was built with 216 measurements for non-refrigerated and refrigerated samples of cassava roots. The figures of merit of the global partial least squares model using both types of roots showed a  $0.06 \mu\text{mol min}^{-1}$  limit of detection (LOD) and a  $0.2 \mu\text{mol min}^{-1}$  limit of quantification (LOQ) for PA, with  $0.4 [\text{intensity (a.u.)}/(\mu\text{mol min}^{-1})]$  sensitivity and a standard error of cross-validation (SECV) of  $0.7 \mu\text{mol min}^{-1}$ . All of the results demonstrated that TD-NMR has the potential to predict PA in cassava roots that is indicative of the PPD problem.

## 1 Introduction

Time-domain nuclear magnetic resonance (TD-NMR) has been used in food quality control and quality assurance for more than five decades. However, only in the last

✉ Fabíola Manhas Verbi Pereira  
fabiola@iq.unesp.br

<sup>1</sup> Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araraquara, São Paulo 14800-060, Brazil

<sup>2</sup> Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, Av. Trabalhador São-carlense 400, São Carlos, São Paulo 13566-590, Brazil

<sup>3</sup> Embrapa Instrumentação, São Carlos, São Paulo 13560-570, Brazil

two decades has TD-NMR expanded its applications to basic food studies, including water status, water compartmentalization and molecular mobility, using relaxation and diffusion measurements [1–3]. Transverse relaxation ( $T_2$ ) measurements have been performed with the Carr–Purcell–Meiboom–Gill (CPMG) pulse sequence, and measurements of longitudinal relaxation time ( $T_1$ ) or the  $T_1/T_2$  ratio have been performed using continuous wave free precession (CWFP) pulse sequences [1–5].

To the best of our knowledge, there is no application of TD-NMR to predict enzyme activity in foodstuff. Therefore, we propose a rapid and simple method to monitor peroxidase activity (PA) in cassava using a benchtop time-domain NMR relaxometer. The method is based on a multivariate regression model with exponential decay of the NMR signal measured via the CPMG pulse sequence as the independent variable and PA measured with a standard biochemical assay as the dependent variable.

Cassava, also known as manioc or tapioca (*Manihot esculenta* Crantz), is a staple food for almost a billion people living in tropical areas of Africa, Latin America, Oceania and Asia [6–8]. Cassava roots have been considered the “food for the poor”, comprising more than 80% of starch [6] and are an important food source in tropical areas, including sub-Saharan countries, due to drought resistance and the ability to grow in marginal land [6, 7, 9]. Cassava is also cultivated in these areas because it produces approximately ten times more starch per unit area than most of the cereals [9, 10].

Despite the high agronomical productivity, cassava production is constrained by biotic and abiotic stresses when compared with other carbohydrate sources such as maize, wheat, rice and potato. The major cassava post-harvest constraint is the short life of fresh roots, limiting storage to a few days. Compared to potato tuber, fresh cassava roots deteriorate shortly after harvesting due to the post-harvest physiological deterioration (PPD) process that is induced by wounds suffered during harvesting and handling. PPD reduces cassava eating and processing quality; specifically, it takes a longer time to cook and acquires an unpalatable bitter taste, lower elasticity and unattractive appearance. PPD is a complex process involving changes in gene expression and environmental factors. The wounds in the roots trigger an oxidative burst that changes the activity of oxidative enzymes such as peroxidases, converting phenols into tannins [6, 7]. The oxidative trigger is supported by the fact that oxygen exclusion, by immersion in water, low temperature or antioxidant compounds can eliminate or minimize the PPD process [7].

Therefore, a rapid, simple and non-destructive NMR method to monitor PA in cassava roots can be a highly practical alternative approach to the standard biochemical assay, which is laborious, time consuming and destructive and requires chemical reagents and specialized professionals [11, 12].

## 2 Methods

### 2.1 Sampling

Cassava roots, non-refrigerated (samples N) and stored at room temperature or peeled and refrigerated at 10–12 °C (samples R), were purchased locally. The N

root samples were washed to remove soil and other impurities, dried with absorbent paper and peeled. The R samples had no need for cleanup procedure. None of the samples showed any damage or deterioration. In the case of industrialized R products, the expiration date was appropriate during the time of the tests. Subsequently, the N and R samples were milled with a domestic food chopper (Black & Decker, Uberaba, MG, Brazil). The N and R samples were fractionated in 24 subsamples of 10 g each. The subsamples were exposed to air and subsequently analyzed by TD-NMR and the enzymatic assay at time 0, 24, 48 and 72 h.

## 2.2 TD-NMR Measurements

The TD-NMR analyses were carried out at 22 °C in a 0.27 T (11.3 MHz for  $^1\text{H}$ ) benchtop SLK200 Spinlock instrument (Spinlock Magnetic Resonance Solutions, Cordoba, Argentina) using a probe 32 mm in diameter and 32 mm in height. The measurements were performed using the standard CPMG sequence to obtain the exponential decay signal that is governed by the transverse relaxation time ( $T_2$ ). The sequence used  $\pi/2$  and  $\pi$  of 11.56 and 19.6  $\mu\text{s}$ , respectively, an echo time of 600  $\mu\text{s}$ , four scans and 1500 echoes.

## 2.3 Reference Method for Enzymatic Activity

Just after the TD-NMR analyses, the subsamples were used to measure the enzymatic activity by a standard biochemical assay [12]. This method used the reaction between guaiacol ( $(\text{CH}_3\text{O})\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$ ) and hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , 30%; Synth) in the presence of enzymatic extracts of the milled cassava roots.

The extractions were performed at 10 °C, using 50 mL of buffer solution containing 0.1 mol  $\text{L}^{-1}$  potassium phosphates ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  and  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; Synth, Diadema/SP, Brazil (pH 7.5) and 200 mg of polyvinylpyrrolidone ( $\text{C}_6\text{H}_9\text{NO}$ )<sub>n</sub>, PVP-10); Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA. The milled cassava sample and the extraction solution were mixed using a domestic food chopper. Afterward, the suspensions were filtered using gauze. Then, the supernatant that contains the enzymatic extract of peroxidases was separated using an 80-2BU centrifuge (Centrilab, Monte Alto, SP, Brazil) for 30 min at 3800 rpm.

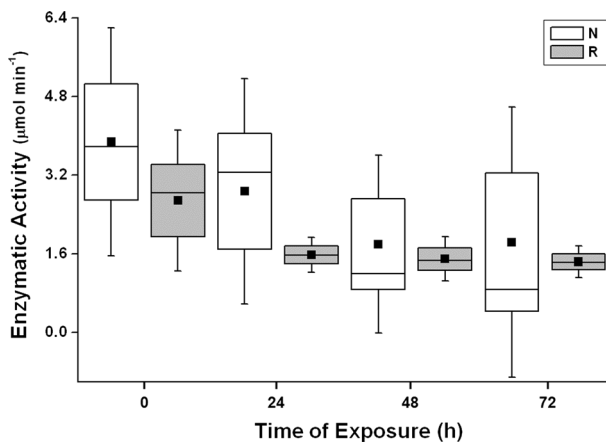
The biochemical assay was performed with 500  $\mu\text{L}$  of enzymatic extract from cassava, 500  $\mu\text{L}$  of 1.5 mmol  $\text{L}^{-1}$  guaiacol (98%; Sigma Aldrich), 500  $\mu\text{L}$  of 1.5 mmol  $\text{L}^{-1}$  hydrogen peroxide (30%; Synth) and 1500  $\mu\text{L}$  of 0.1 mol  $\text{L}^{-1}$  (pH 7.5) potassium phosphate buffer solution. The solutions were stirred manually, and after 4 min the reactions were monitored at 470 nm (the maximum absorbance for tetraguaiacol,  $\epsilon_{470} = 26.6 \text{ mmol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ ) using a 1 cm optical length cuvette in a Femto 600 plus instrument (Femto Ind. e Com. de Instrumentos, São Paulo, SP, Brazil) to measure PA. The calculations of PA were based on the definition that one unit of peroxidase is equal to the amount of enzyme that yields 1  $\mu\text{mol L}^{-1}$  tetraguaiacol per minute. The reactions and spectrophotometric measurements were performed at 22 °C.

## 2.4 Data Evaluation

Multivariate analyses were performed using the partial least squares (PLS) algorithm available in Pirouette 4.5 rev. 1 (Infometrix, Bothell, WA, USA). To determine the composition of the samples in the training and validation datasets, the Kennard–Stone algorithm was applied [13]. The TD-NMR decays data were used as independent variables, and the measured values of PA using the reference method for enzymatic activity were used as dependent variable. The goal was to estimate the enzymatic activity of two types of cassava (non-refrigerated and refrigerated) exposed to air environments using reference values from a standard biochemical assay and signals of TD-NMR combined with PLS.

## 3 Results and Discussion

Figure 1 shows the values of peroxidase activity (PA) in non-refrigerated (N) and refrigerated (R) samples at 0, 24, 48 and 72 h after milling. For the N and R samples at time 0, the means and standard deviations were  $3.9 \pm 1.2$  and  $2.7 \pm 0.73$ , respectively. The PA for the N samples decays to  $2.9 \pm 1.2$ ,  $1.8 \pm 0.9$  and  $1.8 \pm 1.4$  for 24, 48 and 72 h, respectively. A similar monotonic tendency was observed for the R samples with the PA decay to  $1.6 \pm 0.18$ ,  $1.5 \pm 0.23$  and  $1.4 \pm 0.16$ , for 24, 48 and 72 h, respectively. It is relevant to emphasize that the refrigerated samples were purchased from three different markets, with differences in expiration dates. Therefore, Fig. 1 shows that the PA was higher in the N samples than in the R samples and that the upper magnitude for activity was observed in the N sample at time 0 (N0). The higher SD values for cassava samples non-refrigerated than for the refrigerated samples is associated with higher variability of PA. A possible explanation for these

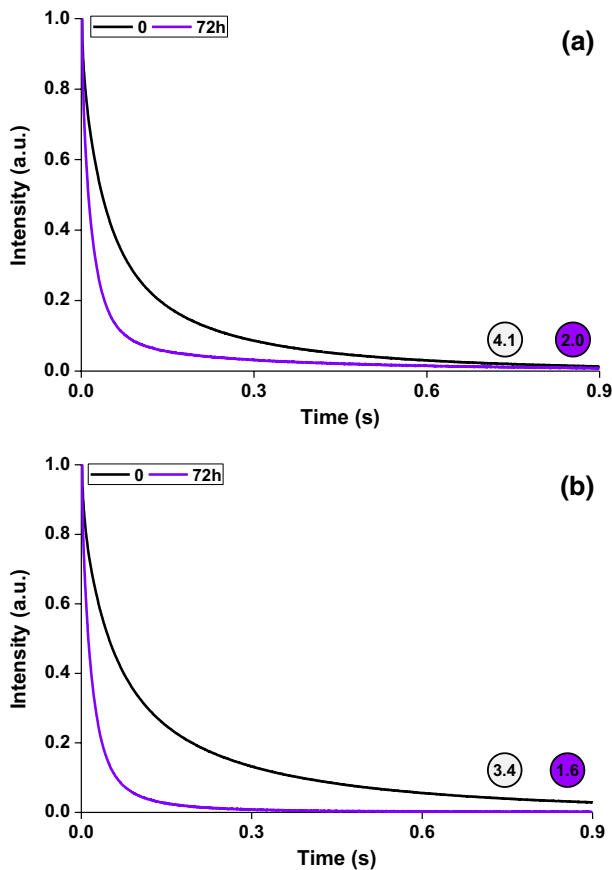


**Fig. 1** Box plots for enzymatic activity measured using a standard biochemical assay for non-refrigerated (N) and refrigerated (R) commercial cassava samples

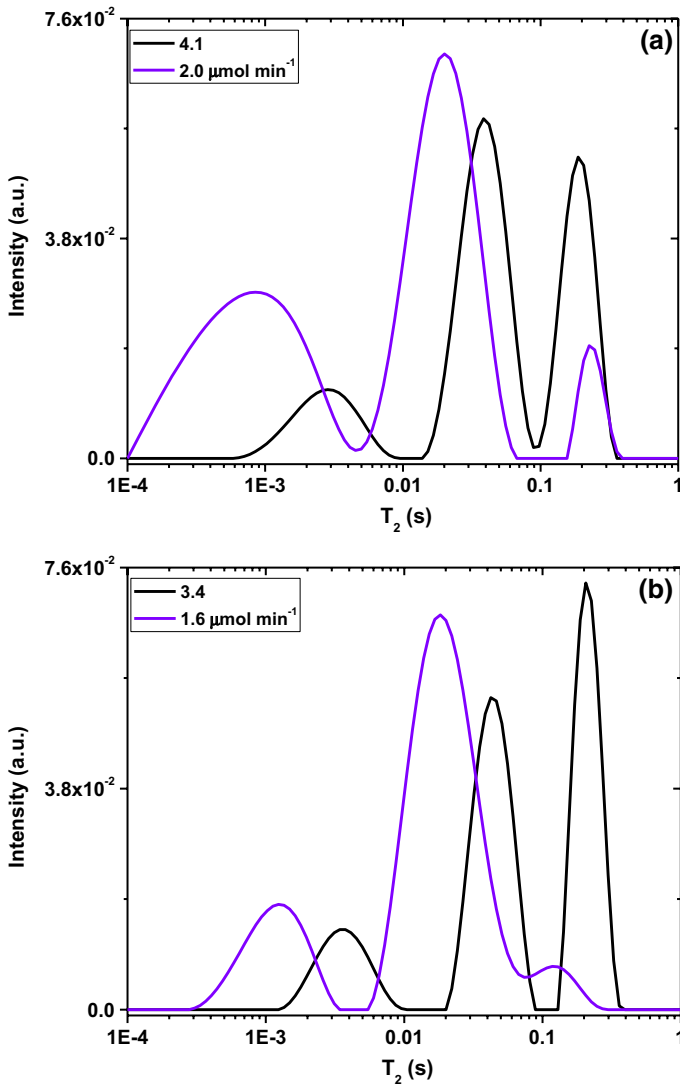
differences is that the R roots are normally treated with sodium or potassium chlorides that have been used as preservatives in refrigerated cassava [14].

Figure 2a, b shows the typical normalized CPMG decays for the N and R samples, respectively, at time 0 and after 72 h. In both plots, the CPMG was much shorter for samples after 72 h of experiments and showed lower PA values than at time 0, as shown in Fig. 1.

Figure 3a, b shows the inverse Laplace transform relaxation distribution of the CPMG decays of the N and R samples of Fig. 2a, b, respectively. All samples showed three  $T_2$  peaks. In Fig. 3a, the black line shows a small peak at  $2.8 \times 10^{-3}$  s and two intense peaks at  $3.9 \times 10^{-2}$  and  $1.9 \times 10^{-1}$  s for the N0 sample with a PA of  $4.1 \mu\text{mol min}^{-1}$ . The violet line in Fig. 3a shows the relaxation distribution of the sample with  $2.0 \mu\text{mol min}^{-1}$  PA, with a broad peak at  $8.5 \times 10^{-4}$ , an intense peak at  $2.0 \times 10^{-2}$  and a small peak at  $2.3 \times 10^{-1}$  s. The relaxation profile of the R samples



**Fig. 2** Transverse relaxation time ( $T_2$ ) from CPMG signals representing non-refrigerated samples (time 0) and after 72 h of air environment exposure for **a** non-refrigerated (N0) and **b** refrigerated (R) samples. The peroxidase activity (PA) values in  $\mu\text{mol min}^{-1}$  are denoted by circles



**Fig. 3** Transverse relaxation time ( $T_2$ ) distribution for the CPMG signals calculated with inverse Laplace transform for **a** non-refrigerated (N) and **b** refrigerated (R) samples for times 0 and 72 h

was similar to that of the N samples with similar PA, i.e., with the increase in the intensities of the peaks with shorter relaxation times, for samples with lower PA, as shown in Fig. 3b.

The potential of TD-NMR for measuring the enzymatic activity of cassava roots using a minimum sample preparation method was evaluated using multivariate PLS models. The total signals were from 6 fractions  $\times$  6 samples  $\times$  4 exposure times for

non-refrigerated samples ( $n = 144$ ) and 6 fractions  $\times$  3 samples  $\times$  4 exposure times for refrigerated samples ( $n = 72$ ). The first model was built with CPMG signals up to 0.9 s (1500 independent variables) from N and R samples with the entire matrix data, with a total of 216 signals. The CPMG and PA data from N and R contributed 112 and 61 samples, respectively, for the training set and 43 samples for the validation set (32 for N and 11 for R). The information of three latent variables (LVs) explained almost 100% of the variance from the training set using leave-one-out cross-validation.

Figure 4a, b shows the PLS regression model of the training and validation datasets. The reference values were obtained using a standard biochemical assay that was correlated with CPMG signals for the PLS models. The validation set comprised samples that were not included in the training data. As also verified, a notable result was the same magnitude of standard errors of cross-validation (SECV) and of prediction (SEP) for the sets, which indicates that the models are very promising for the prediction of PA.

Two other models were constructed for samples N and R, considering their differences in the magnitude of enzymatic activity (Fig. 5). For this case, a selection of variables was also performed considering the first 319 independent variables, from 0 to 0.19 s of CPMG signals, with approximately 100% of explained variance using 3 LVs. This selection of variables was based on the evidence that after 0.19 s, the signal response has low values of almost zero that did not contribute to the model. The data were highly correlated ( $r = 0.9$ ) for the non-refrigerated set and the SECV with the same values reported for the previous model, as shown in Fig. 5a. The external samples showed slight differences considering the correlation and SEP, as can be verified in Fig. 5b. The model including the entire profile of CPMG decays showed the same magnitude of errors.

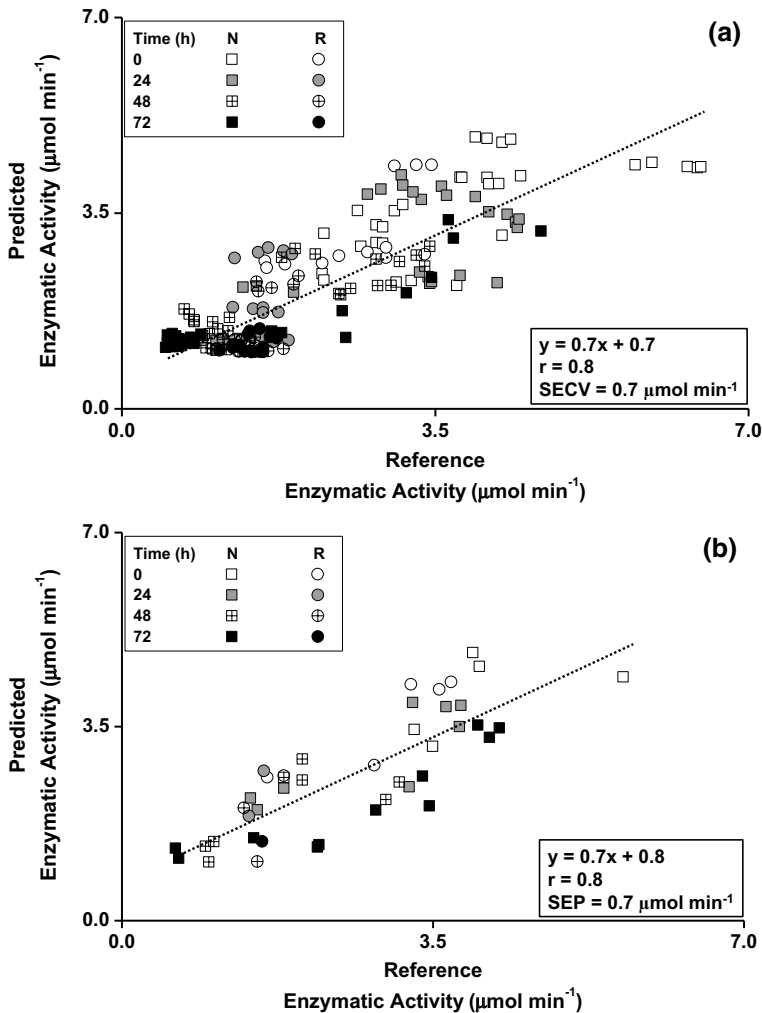
The noteworthy result was for the refrigerated samples using a model with 360 independent variables from 0 to 0.22 s and the same above-mentioned criteria for variable selection. Figure 6a, b shows that the models confirmed the high correlation of both datasets with a low magnitude for SECV and SEP equal to  $0.3 \mu\text{mol min}^{-1}$  for both parameters, using 4 LVs, with approximately 100% of explained variance.

In the case of the separate models for N and R, the errors showed different magnitudes due to the differences in ranges for PA. To select the better model, the figures of merit for the PLS models were calculated [15], and Table 1 summarizes the lowest limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) for the global model with both type of samples. These results show that the model with all samples (N and R) has a greater potential to predict enzymatic activity in cassava roots than the individual models constructed for either N or R samples.

## 4 Conclusions

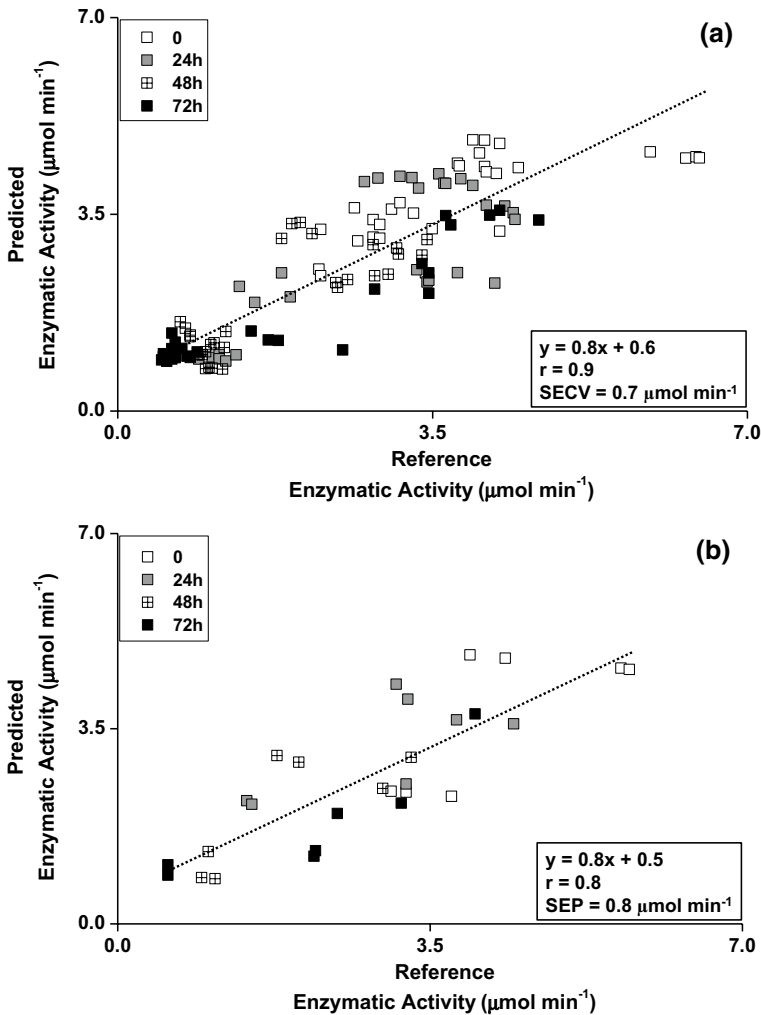
CPMG signals were able to verify variations in PA for both types of cassava roots, such as non-refrigerated roots and those industrialized refrigerated. In addition,





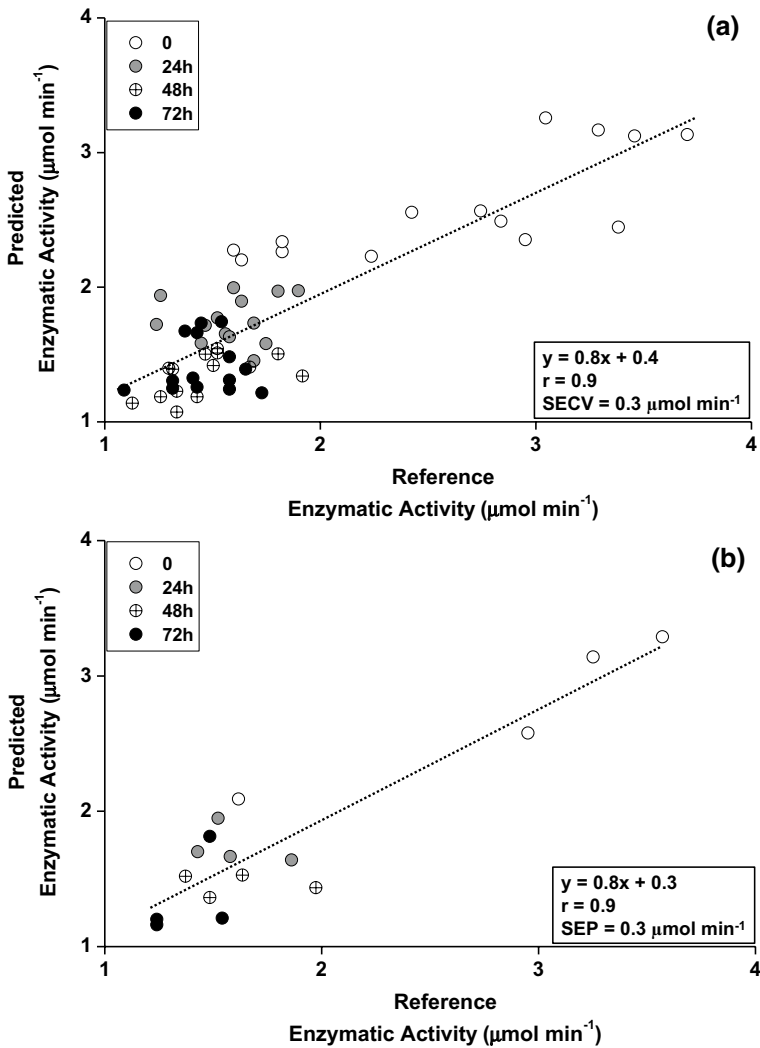
**Fig. 4** Correlation between reference values from a standard biochemical assay to predict the enzymatic activity of peroxidase and predicted values using TD-NMR signals and partial least squares (PLS) algorithm for a global model with non-refrigerated (N) and refrigerated (R) samples for the **a** training and **b** validation datasets, calculated with 1500 independent variables

variations in PPD were also monitored upon exposure of the samples to air. This evidence was supported using the calculations of inverse Laplace transform for the decays.



**Fig. 5** Correlation between reference values from a standard biochemical assay to predict enzymatic activity of peroxidase and predicted values using TD-NMR signals and partial least squares (PLS) algorithm for non-refrigerated (N) samples for the **a** training and **b** validation datasets, calculated with 319 independent variables

The model with either samples (N and R) was shown to be promising for the prediction of the enzymatic activity of peroxidase, with low standard errors and good indexes for figures of merit. Furthermore, this method will minimize the use of chemical reagents and accelerate this parameter in solid foods with high water contents.



**Fig. 6** Correlation between reference values from a standard biochemical assay to predict enzymatic activity of peroxidase and predicted values using TD-NMR signals and partial least squares (PLS) algorithm for refrigerated (R) samples for the **a** training and **b** validation datasets, calculated with 360 independent variables

**Table 1** Figures of merit estimated for the developed methods to measure enzymatic activity

| Figures of merit                                            | Method                                                   |                                                 |                                                         |                                                     |
|-------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
|                                                             | TD-NMR for non-refrigerated (N) samples (1500 variables) | TD-NMR for non-refrigerated (R) (319 variables) | TD-NMR for non-refrigerated (N) samples (360 variables) | TD-NMR for refrigerated (R) samples (360 variables) |
| Sensitivity [intensity (a.u.)/( $\mu\text{mol min}^{-1}$ )] | 0.4                                                      | 0.2                                             | 0.05                                                    | 0.05                                                |
| LOD ( $\mu\text{mol min}^{-1}$ )                            | 0.06                                                     | 0.1                                             | 0.5                                                     | 0.5                                                 |
| LOQ ( $\mu\text{mol min}^{-1}$ )                            | 0.2                                                      | 0.4                                             | 1.7                                                     | 1.7                                                 |

**Acknowledgements** This study was funded by the São Paulo Research Foundation (FAPESP, 2016/00779-6 and 2017/12864-0), the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, 445729/2014-7 and 303837/2013-6) and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, J.S.F. Grant fellowship).

## References

1. E. Kirtıl, S. Cikrikci, M.J. McCarthy, M.H. Oztop, *Curr. Opin. Food Sci.* **17**, 9 (2017)
2. J. van Duynhoven, A. Voda, M. Witek, H. Van As, *Annu. Rep. NMR Spectrosc.* **69**, 145 (2010)
3. P.S. Belton, A.M. Gil, G.A. Webb, D. Rutledge, F. Cornejo, P. Chinachoti, in *Magnetic Resonance in Food Science: Latest Developments*, ed. by P.S. Belton, A.M. Gil, G.A. Webb, D. Rutledge (The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2003), pp. 25–37
4. L.A. Colnago, F.D. Andrade, A.A. Souza, R.B.V. Azeredo, A.A. Lima, L.M. Cerioni, T.M. Osán, D.J. Pusiol, *Chem. Eng. Technol.* **37**, 191 (2014)
5. B. Blümich, *Trends Anal. Chem.* **83**, 2 (2016)
6. V.G. Uarrota, M. Maraschin, *BMC Res. Notes* **8**, 648 (2015)
7. V.G. Uarrota, E.C. Nunes, L.A.M. Peruch, E.O. Neubert, B. Coelho, R. Moresco, M.G. Domínguez, T. Sánchez, J.L.L. Meléndez, D. Dufour, H. Ceballos, L.A.B. Lopez-Lavalle, C. Hershey, M. Rocha, M. Maraschin, *Food Sci. Nutr.* **4**, 409 (2016)
8. I.M. Zainuddin, A. Fathoni, E. Sudarmonowati, J.R. Beeching, W. Gruissem, H. Vanderschuren, *Postharvest Biol. Tec.* (2017). <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.09.004>
9. R.H. Howeler (ed.), *The Cassava Handbook. A Reference Manual Based on the Asian Regional Cassava Training Course held in Thailand*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) (2011)
10. V.G. Uarrota, R. Moresco, E.C. Schmidt, Z.L. Bouzon, E.C. Nunes, E.O. Neubert, L.A.M. Peruch, M. Rocha, M. Maraschin, *Food Chem.* **197**, 737 (2016)
11. F.M.V. Pereira, S.B. Pflanzner, T. Gomig, C.L. Gomes, P.E. de Felício, *Talanta* **108**, 88 (2013)
12. C.C. Lin, C.H. Kao, *Plant Soil* **216**, 147 (1999)
13. M. Daszykowski, B. Walczak, D.L. Massart, *Anal. Chim. Acta.* **468**, 91 (2002)
14. J.A. Troller, J.H.B. Christian, *Water Activity and Food* (Academic Press Inc., New York, 1978)
15. F.M.V. Pereira, E.R. Pereira-Filho, M.I.M.S. Bueno, J. Agric. Food Chem. **54**, 5723 (2006)

## SPRINGER NATURE LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Apr 16, 2018

This Agreement between UNESP -- Fabiola Pereira ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

|                                        |                                                                                                                                                                      |
|----------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| License Number                         | 4331030266094                                                                                                                                                        |
| License date                           | Apr 16, 2018                                                                                                                                                         |
| Licensed Content Publisher             | Springer Nature                                                                                                                                                      |
| Licensed Content Publication           | Applied Magnetic Resonance                                                                                                                                           |
| Licensed Content Title                 | Enzymatic Activity Prediction Using Time-Domain Nuclear Magnetic Resonance (TD-NMR) and Multivariate Analysis: A Case Study Using Cassava Roots                      |
| Licensed Content Author                | Josilei da Silva Ferreira, Tiago Bueno Moraes, Luiz Alberto Colnago et al                                                                                            |
| Licensed Content Date                  | Jan 1, 2018                                                                                                                                                          |
| Type of Use                            | Thesis/Dissertation                                                                                                                                                  |
| Requestor type                         | academic/university or research institute                                                                                                                            |
| Format                                 | print and electronic                                                                                                                                                 |
| Portion                                | full article/chapter                                                                                                                                                 |
| Will you be translating?               | no                                                                                                                                                                   |
| Circulation/distribution               | 2,001 to 5,000                                                                                                                                                       |
| Author of this Springer Nature content | yes                                                                                                                                                                  |
| Title                                  | Estimativa da atividade enzimática em amostras comerciais de mandioca utilizando ressonância magnética nuclear no domínio do tempo (TD-NMR) e modelos quimiométricos |
| Instructor name                        | Fabíola Manhas Verbi Pereira                                                                                                                                         |
| Institution name                       | Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista (Unesp)                                                                                           |
| Expected presentation date             | Apr 2018                                                                                                                                                             |
| Requestor Location                     | UNESP<br>Rua Professor Francisco Degni, 55<br><br>Araraquara, Sao Paulo 14800-060<br>Brazil<br>Attn: UNESP                                                           |
| Billing Type                           | Invoice                                                                                                                                                              |
| Billing Address                        | UNESP<br>Rua Professor Francisco Degni, 55<br><br>Araraquara, Brazil 14800-060<br>Attn: UNESP                                                                        |
| Total                                  | 0.00 USD                                                                                                                                                             |
| Terms and Conditions                   |                                                                                                                                                                      |

### Springer Nature Terms and Conditions for RightsLink Permissions

**Springer Customer Service Centre GmbH (the Licensor)** hereby grants you a non-exclusive, world-wide licence to reproduce the material and for the purpose and requirements specified in the attached copy of your order form, and for no other use, subject to the conditions below:

1. The Licensor warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of this material. However, you should ensure that the material you are requesting is original to the Licensor and does not carry the copyright of another entity (as credited in the published version).

If the credit line on any part of the material you have requested indicates that it was reprinted or adapted with permission from another source, then you should also seek permission from that source to reuse the material.

2. Where **print only** permission has been granted for a fee, separate permission must be obtained for any additional electronic re-use.
3. Permission granted **free of charge** for material in print is also usually granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to your work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for, the print version.
4. A licence for 'post on a website' is valid for 12 months from the licence date. This licence does not cover use of full text articles on websites.
5. Where **'reuse in a dissertation/thesis'** has been selected the following terms apply: Print rights for up to 100 copies, electronic rights for use only on a personal website or institutional repository as defined by the Sherpa guideline ([www.sherpa.ac.uk/romeo/](http://www.sherpa.ac.uk/romeo/)).
6. Permission granted for books and journals is granted for the lifetime of the first edition and does not apply to second and subsequent editions (except where the first edition permission was granted free of charge or for signatories to the STM Permissions Guidelines <http://www.stm-assoc.org/copyright-legal-affairs/permissions/permissions-guidelines/>), and does not apply for editions in other languages unless additional translation rights have been granted separately in the licence.
7. Rights for additional components such as custom editions and derivatives require additional permission and may be subject to an additional fee. Please apply to [Journalpermissions@springernature.com](mailto:Journalpermissions@springernature.com)/[bookpermissions@springernature.com](mailto:bookpermissions@springernature.com) for these rights.
8. The Licensor's permission must be acknowledged next to the licensed material in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figures/tables/illustrations or abstract, and must be hyperlinked to the journal/book's homepage. Our required acknowledgement format is in the Appendix below.
9. Use of the material for incidental promotional use, minor editing privileges (this does not include cropping, adapting, omitting material or any other changes that affect the meaning, intention or moral rights of the author) and copies for the disabled are permitted under this licence.
10. Minor adaptations of single figures (changes of format, colour and style) do not require the Licensor's approval. However, the adaptation should be credited as shown in Appendix below.

## **Appendix — Acknowledgements:**

### **For Journal Content:**

Reprinted by permission from [the Licensor]: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)]

### **For Advance Online Publication papers:**

Reprinted by permission from [the Licensor]: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION

(Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication), advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].)

**For Adaptations/Translations:**

Adapted/Translated by permission from [the Licensor]: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)]

**Note: For any republication from the British Journal of Cancer, the following credit line style applies:**

Reprinted/adapted/translated by permission from [the Licensor]: on behalf of Cancer Research UK: : [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)]

**For Advance Online Publication papers:**

Reprinted by permission from The [the Licensor]: on behalf of Cancer Research UK: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication), advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM])]

**For Book content:**

Reprinted/adapted by permission from [the Licensor]: [Book Publisher (e.g. Palgrave Macmillan, Springer etc)] [Book Title] by [Book author(s)] [COPYRIGHT] (year of publication)

**Other Conditions:**

Version 1.0

**Questions? [customercare@copyright.com](mailto:customercare@copyright.com) or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.**